



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2020.03.13

(21) Номер заявки  
201592081

(22) Дата подачи заявки  
2014.04.30

(51) Int. Cl. C12N 15/11 (2006.01)  
C12N 15/113 (2010.01)  
A61K 31/7125 (2006.01)

(54) СОЕДИНЕНИЯ НА ОСНОВЕ МИКРОРНК И СПОСОБЫ МОДУЛИРОВАНИЯ АКТИВНОСТИ miR-122

(31) 61/818,432; 61/822,112; 61/839,550;

61/895,784; 61/898,704; 61/927,897

(32) 2013.05.01; 2013.05.10; 2013.06.26;  
2013.10.25; 2013.11.01; 2014.01.15

(33) US

(43) 2016.06.30

(86) PCT/US2014/036137

(87) WO 2014/179446 2014.11.06

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
РЕГБЮЛЭС ТЕРАПЬЮТИКС ИНК.  
(US)

(72) Изобретатель:  
Бхат Балкришен, Хоган Дэниел (US)

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

(56) WO-A2-2009043353  
WO-A2-2008091703  
WO-A2-2007027775  
WO-A1-2013033230  
FABANI M. M. ET AL.: "miR-122 targeting with LNA/2'-O-methyl oligonucleotide mixmers, peptide nucleic acids (PNA), and PNA-peptide conjugates", RNA, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, US, vol. 14, 11 December 2007 (2007-12-11), pages 336-346, XP002533356, ISSN: 1355-8382, DOI: 10.1261/RNA.844108, page 344, left-hand column; figure 5  
MAIER M. A. ET AL.: "Synthesis of antisense oligonucleotides conjugated to a multivalent carbohydrate cluster for cellular targeting", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, ACS, WASHINGTON, DC, US, vol. 14, 3 December 2002 (2002-12-03), pages 18-29, XP002510288, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/BC020028V [retrieved on 2002-12-03], table 2

KARSKELA MARIKA ET AL.: "Synthesis and Cellular Uptake of Fluorescently Labeled Multivalent Hyaluronan Disaccharide Conjugates of Oligonucleotide Phosphorothioates", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, ACS, WASHINGTON, DC, US, vol. 19, no. 12, 19 November 2008 (2008-11-19), pages 2549-2558, XP002551183, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/BC800260Y [retrieved on 2008-11-19], figures 2, 3

KATAJISTO J. ET AL.: "Solid-phase synthesis of multiantennary oligonucleotide glycoconjugates utilizing on-support oximation", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, ACS, WASHINGTON, DC, US, vol. 15, no. 4, 29 June 2004 (2004-06-29), pages 890-896, XP002551180, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/BC049955N [retrieved on 2004-06-29], the whole document

ZATSEPIN TIMOFEI S. ET AL.: "Synthesis and applications of oligonucleotide-carbohydrate conjugates", CHEMISTRY & BIODIVERSITY, HELVETICA CHIMICA ACTA, ZUERICH, CH, vol. 1, no. 10, 21 October 2004 (2004-10-21), pages 1401-1417, XP002428047, ISSN: 1612-1872, DOI: 10.1002/CBDV.200490104, page 1413-1415

E. VAN ROOIJ ET AL.: "Developing MicroRNA Therapeutics", CIRCULATION RESEARCH, vol. 110, no. 3, 3 February 2012 (2012-02-03), pages 496-507, XP055144403, ISSN: 0009-7330, DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.247916, page 497, right-hand column - page 498, left-hand column, page 505

BALKRISHEN BHAT ET AL.: "RG-101, a GalNAC-conjugated anti-miR employing a unique mechanism of action by targeting host factor microRNA-122 (miR-122), demonstrates potent activity and reduction of HCV in preclinical studies", HEPATOLOGY; 64TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVE R-DISEASES; WASHINGTON, DC, USA; NOVEMBER 01-05, 2013, JOHN WILEY & SONS, INC, USA, vol. 58, no. 6, suppl, December 2013 (2013-12), page 1393A, XP002723153, ISSN: 0270-9139 [retrieved on 2013-11-06], the whole document

(57) В данном документе описаны композиции и способы для ингибирования активности miR-122. Композиции имеют определенные модификации нуклеозидов, позволяющие получать сильные ингибиторы активности miR-122. Соединения могут содержать конъюгаты для облегчения доставки в печень. Композиции можно вводить субъектам, инфицированным вирусом гепатита С, в качестве лечения вируса гепатита С и связанных с ним состояний.

### Область настоящего изобретения

В данном документе представлены соединения и способы для применения в модулировании активности miR-122. Такие способы включают лечение заболеваний, связанных с активностью miR-122, таких как инфекция HCV.

### Описание известного уровня техники

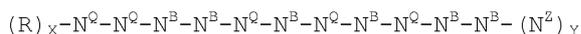
МикроРНК (микроРНК), также известные как "зрелые микроРНК", являются небольшими (имеющими длину приблизительно 18-24 нуклеотидов) молекулами некодирующих РНК, закодированными в геномах растений и животных. В некоторых случаях высококонсервативные, эндогенно экспрессирующиеся микроРНК регулируют экспрессию генов путем связывания с 3'-нетранслируемыми областями (3'-UTR) конкретных мРНК. Более 1000 различных микроРНК были выявлены у растений и животных. Определенные зрелые микроРНК, по-видимому, происходят из длинных эндогенных первичных транскриптов микроРНК (также известных как при-микроРНК, при-miR, при-miR или при-пре-микроРНК), которые часто имеют длину в несколько сотен нуклеотидов (Lee et al., EMBO J., 2002, 21(17), 4663-4670).

miR-122, микроРНК в большом количестве и специфически экспрессируемая в печени, является существенно важным фактором хозяина для накопления вируса гепатита С (Jopling et al., Science, 2005, 309(5740), 1577-81). miR-122 взаимодействует с HCV путем связывания с двумя близко расположенными сайтами затравочной последовательности в 5' некодирующей области генома HCV, что приводит к стабилизации генома HCV, способствуя репликации и трансляции (Jangra et al., J Virol., 2010, 84: 6615-6625; Machlin et al., 2011). Важно отметить, что сайты связывания miR-122 полностью консервативны в геноме HCV всех генотипов и подтипов (Wilson et al., J. Virol., 2011, 85: 2342-2350). Ингибирование miR-122 с помощью anti-miR приводит к пониженным уровням общего циркулирующего холестерина у мышей и яванского макака, а также к изменениям в экспрессии генов, вовлеченных в гомеостаз холестерина, метаболизм жирных кислот и липидов (Esau et al., 2006, Cell Metabolism, 3: 87-98). У шимпанзе, хронически инфицированных HCV, проводили еженедельное внутривенное введение anti-miR для длительного и обратимого подавления уровней РНК HCV и пониженного общего сывороточного холестерина (Lanford et al., 2010, Science, 327:198-201). При длительном лечении ранее не получавших терапии пациентов, инфицированных HCV, лечение anti-miR-122 приводило к понижению сывороточной РНК HCV, таким образом демонстрируя клиническое подтверждение концепции.

Гепатит С (HCV) представляет собой гепатотропный РНК-вирус семейства Flaviviridae и, в дополнение к вызыванию инфекции HCV, является главной причиной хронического заболевания печени и гепатоцеллюлярной карциномы. Современный стандарт лечения, пегилированный интерферон в комбинации с рибавирином, плохо переносится многими пациентами и может иметь частоту ответа всего лишь 50% у некоторых пациентов. Несколько противовирусных ингибиторов протеазы NS3 прямого действия в настоящее время одобрены для применения у HCV-инфицированных пациентов, однако появление мутаций устойчивости у HCV требует лечения дополнительными средствами. Развивающиеся виды терапии включают ингибиторы протеазы NS3/4A, белковые ингибиторы NS5A, нуклеозидные/нуклеотидные ингибиторы полимеразы NS5B и нуклеозидные ингибиторы NS5B. Однако остается необходимость в дополнительных видах терапии для лечения инфицированных индивидуумов, которые не отвечают на текущие способы лечения, у которых происходит рецидив после успешного лечения или которые обладают низкой переносимостью к одному или нескольким применяемым лекарственным средствам. Устойчивость к антивирусной терапии является главной проблемой, связанной с высокой частотой мутаций HCV, и наблюдается даже с комбинациями лекарственных средств, работающих посредством многочисленных механизмов. Соответственно, терапевтические средства, которые целенаправленно воздействуют на консервативные, устойчивые к мутациям вирусные факторы хозяина, такие как miR-122, представляют возможность получения более высоких и более устойчивых показателей эффективности лечения.

### Краткое описание изобретения

В данном документе представлены соединения, содержащие модифицированный олигонуклеотид, состоящий из 16-22 связанных нуклеозидов, где нуклеотидная последовательность модифицированного олигонуклеотида комплементарна miR-122 (SEQ ID NO: 1) и где модифицированный олигонуклеотид содержит по меньшей мере 16 смежных нуклеозидов из следующего нуклеозидного паттерна I в ориентации 5'-3'



где каждый R независимо представляет собой небициклический нуклеозид или бициклический нуклеозид;

X равняется от 4 до 10;

каждый N<sup>B</sup> независимо представляет собой бициклический нуклеозид;

каждый N<sup>Q</sup> независимо представляет собой небициклический нуклеозид;

Y равняется от 0 до 1 и

N<sup>Z</sup> представляет собой модифицированный нуклеозид или немодифицированный нуклеозид.

В определенных вариантах осуществления соединения, представленное в данном документе, содержит модифицированный олигонуклеотид, содержащий по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21 или 22 смежных нук-



$N^{R4}-N^{R5}-N^{R6}-N^{R7}-N^{R8}-N^{R9}-N^{R10}$ , где каждый из  $N^{R1}$ ,  $N^{R2}$ ,  $N^{R3}$ ,  $N^{R4}$ ,  $N^{R5}$  и  $N^{R6}$  представляет собой 2'-О-метоксиэтилнуклеозид, каждый из  $N^{R7}$  и  $N^{R9}$  представляет собой S-cEt-нуклеозид, и каждый из  $N^{R8}$  и  $N^{R10}$  представляет собой  $\beta$ -D-дезоксирибонуклеозид; каждый  $N^B$  представляет собой S-cEt-нуклеозид; каждый  $N^Q$  представляет собой  $\beta$ -D-дезоксирибонуклеозид; Y равняется 1 и  $N_z$  представляет собой 2'-О-метоксиэтилнуклеозид.

В определенных вариантах осуществления X равняется 4;  $(R)_x$  представляет собой  $N^{R1}-N^{R2}-N^{R3}-N^{R4}$ , где каждый из  $N^{R1}$  и  $N^{R4}$  представляет собой S-cEt-нуклеозид и каждый из  $N^{R2}$  и  $N^{R3}$  представляет собой  $\beta$ -D-дезоксирибонуклеозид; каждый  $N^B$  представляет собой S-cEt-нуклеозид; каждый  $N^Q$  представляет собой  $\beta$ -D-дезоксирибонуклеозид; Y равняется 1 и  $N^Z$  представляет собой  $\beta$ -D-дезоксирибонуклеозид.

В определенных вариантах осуществления X равняется 4;  $(R)_x$  представляет собой  $N^{R1}-N^{R2}-N^{R3}-N^{R4}$ , где  $N^{R1}$  представляет собой 2'-О-метоксиэтилнуклеозид, каждый из  $N^{R2}$  и  $N^{R4}$  представляет собой S-cEt-нуклеозид, и  $N^{R3}$  представляет собой  $\beta$ -D-дезоксирибонуклеозид; каждый  $N^B$  представляет собой S-cEt-нуклеозид; каждый  $N^Q$  представляет собой  $\beta$ -D-дезоксирибонуклеозид; Y равняется 1 и  $N^Z$  представляет собой 2'-О-метоксиэтилнуклеозид.

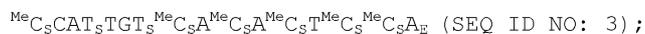
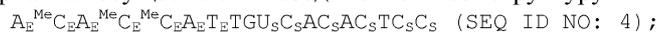
В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность модифицированного олигонуклеотида по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% комплементарна нуклеотидной последовательности miR-122 (SEQ ID NO: 1).

В определенных вариантах осуществления, где по меньшей мере одна межнуклеозидная связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь или, где каждая межнуклеозидная связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь и, необязательно, где модифицированная межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную межнуклеозидную связь.

В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность модифицированного олигонуклеотида выбрана из SEQ ID NO: 3-6, где каждый T независимо выбран из T и U.

В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит 0, 1, 2 или 3 несовпадения по отношению к нуклеотидной последовательности miR-122.

В определенных вариантах осуществления соединение имеет структуру:



где верхний индекс "Me" обозначает 5-метилцитозин; нуклеозиды без последующего нижнего индекса представляют собой  $\beta$ -D-дезоксирибонуклеозиды; нуклеозиды с последующим нижним индексом "E" представляют собой 2'-МОЕ-нуклеозиды; нуклеозиды с последующим нижним индексом "S" представляют собой S-cEt-нуклеозиды; и каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную межнуклеозидную связь.

В некоторых вариантах осуществления соединение имеет структуру:



где нуклеозиды без последующего нижнего индекса представляют собой  $\beta$ -D-дезоксирибонуклеозиды; нуклеозиды с последующим нижним индексом "S" представляют собой S-cEt-нуклеозиды, и каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную межнуклеозидную связь. В некоторых таких вариантах осуществления соединение представляет собой соединение 38591, 38633, 38998 или 38634.

Любое из соединений, представленных в данном документе, может содержать сопряженный фрагмент, связанный с 5'-концом или 3'-концом модифицированного олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления соединение содержит сопряженный фрагмент, связанный с 3'-концом модифицированного олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления соединение содержит сопряженный фрагмент, связанный с 5'-концом модифицированного олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления соединение содержит первый сопряженный фрагмент, связанный с 3'-концом модифицированного олигонуклеотида, и второй сопряженный фрагмент, связанный с 5'-концом модифицированно-

го олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления сопряженный фрагмент содержит по меньшей мере один лиганд, выбранный из углевода, холестерина, липида, фосфолипида, антитела, липопротеина, гормона, пептида, витамина, стероида и катионного липида.

В определенных вариантах осуществления соединение имеет структуру  $L_n$ -линкер-МО, где каждый L независимо представляет собой лиганд и n равняется от 1 до 10; и МО представляет собой модифицированный олигонуклеотид.

В определенных вариантах осуществления соединение имеет структуру  $L_n$ -линкер-X-МО, где каждый L независимо представляет собой лиганд и n равняется от 1 до 10; X представляет собой фосфодиэфирную связь или фосфотиоатную связь и МО представляет собой модифицированный олигонуклеотид.

В определенных вариантах осуществления соединение имеет структуру  $L_n$ -линкер- $X_1$ - $N_m$ - $X_2$ -МО, где каждый L независимо представляет собой лиганд и n равняется от 1 до 10; каждый N независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеозид и m равняется от 1 до 5; каждый  $X_1$  и  $X_2$  независимо представляет собой фосфодиэфирную связь или фосфотиоатную связь и МО представляет собой модифицированный олигонуклеотид.

В определенных вариантах осуществления соединения имеет структуру  $L_n$ -линкер-X- $N_m$ -Y-МО, где каждый L независимо представляет собой лиганд и n равняется от 1 до 10; каждый N независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеозид и m равняется от 1 до 5; X представляет собой фосфодиэфирную связь или фосфотиоатную связь; Y представляет собой фосфодиэфирную связь и МО представляет собой модифицированный олигонуклеотид.

В определенных вариантах осуществления соединения имеет структуру  $L_n$ -линкер-Y- $N_m$ -Y-МО, где каждый L независимо представляет собой лиганд и n равняется от 1 до 10; каждый N независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеозид и m равняется от 1 до 5; каждый Y представляет собой фосфодиэфирную связь и МО представляет собой модифицированный олигонуклеотид.

В определенных вариантах осуществления, если n больше 1,  $L_n$ -линкер имеет структуру:

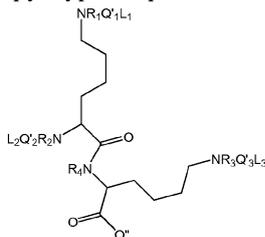


где каждый L независимо представляет собой лиганд; n равняется от 1 до 10; S представляет собой остов и Q' и Q'' независимо представляют собой связующие группы.

В определенных вариантах осуществления каждая Q' и Q'' независимо выбрана из пептида, эфира, полиэтиленгликоля, алкила,  $C_1$ - $C_{20}$ -алкила, замещенного  $C_1$ - $C_{20}$ -алкила, а  $C_2$ - $C_{20}$ -алкенила, замещенного  $C_2$ - $C_{20}$ -алкенила, а  $C_2$ - $C_{20}$ -алкинила, замещенного  $C_2$ - $C_{20}$ -алкинила,  $C_1$ - $C_{20}$ -алкокси, замещенного  $C_1$ - $C_{20}$ -алкокси, amino, амидо, пирролидина, 8-амино-3,6-диоксооктановой кислоты (ADO), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилата и 6-аминогексановой кислоты.

В определенных вариантах осуществления остов связывает 2, 3, 4 или 5 лигандов с модифицированным олигонуклеотидом. В определенных вариантах осуществления остов связывает 3 лиганда с модифицированным олигонуклеотидом.

Неограничивающая иллюстративная структура E представляет собой структуру E(i)

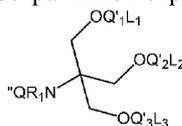


где каждый  $L_1$ ,  $L_2$  и  $L_3$  независимо представляет собой лиганд;

каждый  $Q'_1$ ,  $Q'_2$ ,  $Q'_3$  и  $Q''$  независимо представляет собой связующую группу и каждый  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  и  $R_4$  независимо выбран из H,  $C_1$ - $C_6$ -алкила и замещенного  $C_1$ - $C_6$ -алкила.

В некоторых вариантах осуществления каждая  $Q'_1$ ,  $Q'_2$ ,  $Q'_3$ , и  $Q''$  независимо выбрана из пептида, эфира, полиэтиленгликоля, алкила,  $C_1$ - $C_{20}$ -алкила, замещенного  $C_1$ - $C_{20}$ -алкила,  $C_2$ - $C_{20}$ -алкенила, замещенного  $C_2$ - $C_{20}$ -алкенила,  $C_2$ - $C_{20}$ -алкинила, замещенного  $C_2$ - $C_{20}$ -алкинила,  $C_1$ - $C_{20}$ -алкокси, замещенного  $C_1$ - $C_{20}$ -алкокси, amino, амидо, пирролидина, 8-амино-3,6-диоксооктановой кислоты (ADO), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилата и 6-аминогексановой кислоты. В некоторых вариантах осуществления каждый  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  и  $R_4$  независимо выбран из H, метила, этила, пропила, изопропила и бутила. В некоторых вариантах осуществления каждый  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  и  $R_4$  выбран из H и метила.

Дополнительной неограничивающей иллюстративной структурой E является структура E(ii)

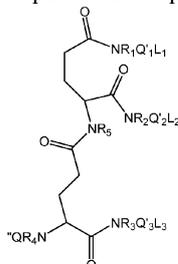


где каждый  $L_1$ ,  $L_2$  и  $L_3$  независимо представляет собой лиганд;

каждый  $Q'_1$ ,  $Q'_2$ ,  $Q'_3$  и  $Q''$  независимо представляет собой связующую группу и  $R_1$  выбран из H,  $C_1$ - $C_6$ -алкила и замещенного  $C_1$ - $C_6$ -алкила.

В некоторых вариантах осуществления каждая  $Q'_1$ ,  $Q'_2$ ,  $Q'_3$  и  $Q''$  независимо выбрана из пептида, эфира, пропиленгликоля, алкила,  $C_1$ - $C_{20}$ -алкила, замещенного  $C_1$ - $C_{20}$ -алкила,  $C_2$ - $C_{20}$ -алкенила, замещенного  $C_2$ - $C_{20}$ -алкенила,  $C_2$ - $C_{20}$ -алкинила, замещенного  $C_2$ - $C_{20}$ -алкинила,  $C_1$ - $C_{20}$ -алкокси, замещенного  $C_1$ - $C_{20}$ -алкокси, amino, амидо, пирролидина, 8-амино-3,6-диоксооктановой кислоты (ADO), сукцинимидил-4-(N-малеидометил)-циклогексан-1-карбоксилата и 6-аминогексановой кислоты. В некоторых вариантах осуществления  $R_1$  выбран из H, метила, этила, пропила, изопропила и бутила. В некоторых вариантах осуществления  $R_1$  представляет собой H или метил.

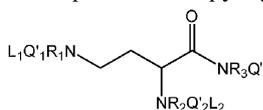
Дополнительной неограничивающей иллюстративной структурой E является структура E(iii)



где каждый  $L_1$ ,  $L_2$  и  $L_3$  независимо представляет собой лиганд; каждая  $Q'_1$ ,  $Q'_2$ ,  $Q'_3$  и  $Q''$  независимо представляет собой связующую группу и каждый  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  и  $R_5$  независимо выбран из H,  $C_1$ - $C_6$ -алкила и замещенного  $C_1$ - $C_6$ -алкила.

В некоторых вариантах осуществления каждая  $Q'_1$ ,  $Q'_2$ ,  $Q'_3$  и  $Q''$  независимо выбрана из пептида, эфира, пропиленгликоля, алкила,  $C_1$ - $C_{20}$ -алкила, замещенного  $C_1$ - $C_{20}$ -алкила,  $C_2$ - $C_{20}$ -алкенила, замещенного  $C_2$ - $C_{20}$ -алкенила,  $C_2$ - $C_{20}$ -алкинила, замещенного  $C_2$ - $C_{20}$ -алкинила,  $C_1$ - $C_{20}$ -алкокси, замещенного  $C_1$ - $C_{20}$ -алкокси, amino, амидо, пирролидина, 8-амино-3,6-диоксооктановой кислоты (ADO), сукцинимидил-4-(N-малеидометил)-циклогексан-1-карбоксилата и 6-аминогексановой кислоты. В некоторых вариантах осуществления каждый  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  и  $R_5$  независимо выбраны из H, метила, этила, пропила, изопропила и бутила. В некоторых вариантах осуществления каждый  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  и  $R_5$  выбран из H и метила.

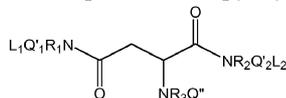
Дополнительной неограничивающей иллюстративной структурой E является структура E(iv)



где каждый  $L_1$  и  $L_2$  независимо представляет собой лиганд; каждая  $Q'_1$ ,  $Q'_2$  и  $Q''$  независимо представляет собой связующую группу и каждый  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$  независимо выбран из H,  $C_1$ - $C_6$ -алкила и замещенного  $C_1$ - $C_6$ -алкила.

В некоторых вариантах осуществления каждая  $Q'_1$ ,  $Q'_2$  и  $Q''$  независимо выбрана из пептида, эфира, пропиленгликоля, алкила,  $C_1$ - $C_{20}$ -алкила, замещенного  $C_1$ - $C_{20}$ -алкила,  $C_2$ - $C_{20}$ -алкенила, замещенного  $C_2$ - $C_{20}$ -алкенила,  $C_2$ - $C_{20}$ -алкинила, замещенного  $C_2$ - $C_{20}$ -алкинила,  $C_1$ - $C_{20}$ -алкокси, замещенного  $C_1$ - $C_{20}$ -алкокси, amino, амидо, пирролидина, 8-амино-3,6-диоксооктановой кислоты (ADO), сукцинимидил-4-(N-малеидометил)циклогексан-1-карбоксилата и 6-аминогексановой кислоты. В некоторых вариантах осуществления каждый  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$  независимо выбран из H, метила, этила, пропила, изопропила и бутила. В некоторых вариантах осуществления каждый  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$  выбран из H и метила.

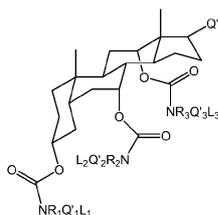
Дополнительной неограничивающей иллюстративной структурой E является структура E(v)



где каждый  $L_1$  и  $L_2$  независимо представляет собой лиганд; каждая  $Q'_1$ ,  $Q'_2$  и  $Q''$  независимо представляет собой связующую группу и каждый  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$  независимо выбран из H,  $C_1$ - $C_6$ -алкила и замещенного  $C_1$ - $C_6$ -алкила.

В некоторых вариантах осуществления каждая  $Q'_1$ ,  $Q'_2$  и  $Q''$  независимо выбрана из пептида, эфира, пропиленгликоля, алкила,  $C_1$ - $C_{20}$ -алкила, замещенного  $C_1$ - $C_{20}$ -алкила,  $C_2$ - $C_{20}$ -алкенила, замещенного  $C_2$ - $C_{20}$ -алкенила,  $C_2$ - $C_{20}$ -алкинила, замещенного  $C_2$ - $C_{20}$ -алкинила,  $C_1$ - $C_{20}$ -алкокси, замещенного  $C_1$ - $C_{20}$ -алкокси, amino, амидо, пирролидина, 8-амино-3,6-диоксооктановой кислоты (ADO), сукцинимидил-4-(N-малеидометил)циклогексан-1-карбоксилата и 6-аминогексановой кислоты. В некоторых вариантах осуществления каждый  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$  независимо выбран из H, метила, этила, пропила, изопропила и бутила. В некоторых вариантах осуществления каждый  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$  выбран из H и метила.

Дополнительной неограничивающей иллюстративной структурой E является структура E(vi)



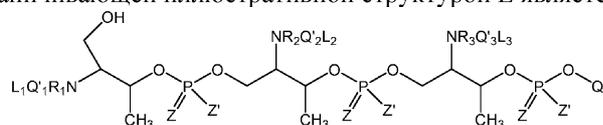
где каждый  $L_1$ ,  $L_2$ , и  $L_3$  независимо представляет собой лиганд;

каждая  $Q'_1$ ,  $Q'_2$ ,  $Q'_3$ , и  $Q''$  независимо представляет собой связующую группу и

каждый  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$  независимо выбран из H,  $C_1$ - $C_6$ -алкила и замещенного  $C_1$ - $C_6$ -алкила.

В некоторых вариантах осуществления каждая  $Q'_1$ ,  $Q'_2$ ,  $Q'_3$ , и  $Q''$  независимо выбрана из пептида, эфира, пропиленгликоля, алкила,  $C_1$ - $C_{20}$ -алкила, замещенного  $C_1$ - $C_{20}$ -алкила,  $C_2$ - $C_{20}$ -алкенила, замещенного  $C_2$ - $C_{20}$ -алкенила,  $C_2$ - $C_{20}$ -алкинила, замещенного  $C_2$ - $C_{20}$ -алкинила,  $C_1$ - $C_{20}$ -алкокси, замещенного  $C_1$ - $C_{20}$ -алкокси, amino, амидо, пирролидина, 8-амино-3,6-диоксаоктановой кислоты (ADO), сукцинимидил-4-(N-малеидометил)циклогексан-1-карбоксилата и 6-аминогексановой кислоты. В некоторых вариантах осуществления каждый  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$  независимо выбран из H, метила, этила, пропила, изопропила и бутила. В некоторых вариантах осуществления каждый  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$  выбран из H и метила.

Дополнительной неограничивающей иллюстративной структурой E является структура E(vii)



где каждый  $L_1$ ,  $L_2$  и  $L_3$  независимо представляет собой лиганд;

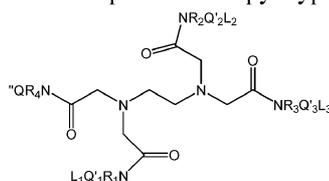
каждая  $Q'_1$ ,  $Q'_2$ ,  $Q'_3$  и  $Q''$  независимо представляет собой связующую группу;

каждый  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$  независимо выбран из H,  $C_1$ - $C_6$ -алкила и замещенного  $C_1$ - $C_6$ -алкила и

каждый  $Z$  и  $Z'$  независимо выбраны из O и S.

В некоторых вариантах осуществления каждая  $Q'_1$ ,  $Q'_2$ ,  $Q'_3$ , и  $Q''$  независимо выбрана из пептида, эфира, пропиленгликоля, алкила,  $C_1$ - $C_{20}$ -алкила, замещенного  $C_1$ - $C_{20}$ -алкила,  $C_2$ - $C_{20}$ -алкенила, замещенного  $C_2$ - $C_{20}$ -алкенила,  $C_2$ - $C_{20}$ -алкинила, замещенного  $C_2$ - $C_{20}$ -алкинила,  $C_1$ - $C_{20}$ -алкокси, замещенного  $C_1$ - $C_{20}$ -алкокси, amino, амидо, пирролидина, 8-амино-3,6-диоксаоктановой кислоты (ADO), сукцинимидил-4-(N-малеидометил)циклогексан-1-карбоксилата и 6-аминогексановой кислоты. В некоторых вариантах осуществления каждый  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$  независимо выбран из H, метила, этила, пропила, изопропила и бутила. В некоторых вариантах осуществления каждый  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$  выбран из H и метила. В некоторых вариантах осуществления  $Z$  или  $Z'$  на по меньшей мере одном атоме P представляет собой S, а другой  $Z$  или  $Z'$  представляет собой O (т.е. фосфотиоатная связь). В некоторых вариантах осуществления каждый  $-OP(Z)(Z')O-$  представляет собой фосфотиоатную связь. В некоторых вариантах осуществления и  $Z$ , и  $Z'$  представляют собой O на по меньшей мере одном атоме P (т.е. фосфодизэфирная связь). В некоторых вариантах осуществления каждый  $-OP(Z)(Z')O-$  представляет собой фосфодизэфирную связь.

Дополнительной неограничивающей иллюстративной структурой E является структура E(viii)



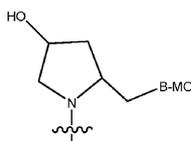
где каждый  $L_1$ ,  $L_2$  и  $L_3$  независимо представляет собой лиганд;

каждый  $Q'_1$ ,  $Q'_2$ ,  $Q'_3$  и  $Q''$  независимо представляет собой связующую группу и

каждый  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  и  $R_4$  независимо выбран из H,  $C_1$ - $C_6$ -алкила и замещенного  $C_1$ - $C_6$ -алкила.

В некоторых вариантах осуществления каждая  $Q'_1$ ,  $Q'_2$ ,  $Q'_3$  и  $Q''$  независимо выбрана из пептида, эфира, пропиленгликоля, алкила,  $C_1$ - $C_{20}$ -алкила, замещенного  $C_1$ - $C_{20}$ -алкила,  $C_2$ - $C_{20}$ -алкенила, замещенного  $C_2$ - $C_{20}$ -алкенила,  $C_2$ - $C_{20}$ -алкинила, замещенного  $C_2$ - $C_{20}$ -алкинила,  $C_1$ - $C_{20}$ -алкокси, замещенного  $C_1$ - $C_{20}$ -алкокси, amino, амидо, пирролидина, 8-амино-3,6-диоксаоктановой кислоты (ADO), сукцинимидил-4-(N-малеидометил)циклогексан-1-карбоксилата и 6-аминогексановой кислоты. В некоторых вариантах осуществления каждый  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  и  $R_4$  независимо выбран из H, метила, этила, пропила, изопропила и бутила. В некоторых вариантах осуществления каждый  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  и  $R_4$  выбран из H и метила.

Неограничивающие иллюстративные остовы и/или линкеры, содержащие остовы, и их синтез описаны, например, в публикации PCT № WO 2013/033230, патенте США № 8106022 B2, публикации США № 2012/0157509 A1; патенте США № 5994517; патенте США № 7491805 B2; патенте США № 8313772 B2; Manoharan, M., Chapter 16, Antisense Drug Technology, Crooke, S.T., Marcel Dekker, Inc., 2001, 391-469.



В определенных вариантах осуществления соединение имеет структуру, где В выбран из -O-, -S-, -N(R<sup>N</sup>)-, -Z-P(Z')(Z'')O-, -Z-P(Z')(Z'')O-N<sub>m</sub>-X- и -Z-P(Z')(Z'')O-N<sub>m</sub>-Y-; MO представляет собой модифицированный олигонуклеотид;

R<sup>N</sup> выбран из H, метила, этила, пропила, изопропила, бутила и бензила;

каждый Z, Z' и Z'' независимо выбран из O и S;

каждый N независимо выбран из модифицированного или немодифицированного нуклеозида; m равняется от 1 до 5;

X выбран из фосфодиэфирной связи и фосфотиоатной связи;

Y представляет собой фосфодиэфирную связь и волнистая линия обозначает связь с остальной частью линкера и лигандом(ами).

В определенных вариантах осуществления X представляет собой фосфодиэфирную связь.

В определенных вариантах осуществления n равняется от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3 или от 1 до 2. В определенных вариантах осуществления p равняется 3.

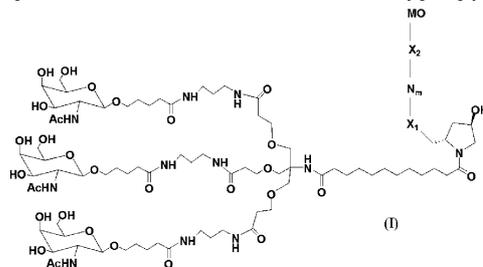
В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один лиганд представляет собой углевод.

В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один лиганд выбран из маннозы, глюкозы, галактозы, рибозы, арабинозы, фруктозы, фукозы, ксилозы, D-маннозы, L-маннозы, D-галактозы, L-галактозы, D-глюкозы, L-глюкозы, D-рибозы, L-рибозы, D-арабинозы, L-арабинозы, D-фруктозы, L-фруктозы, D-фукозы, L-фукозы, D-ксилозы, L-ксилозы, альфа-D-маннофуранозы, бета-D-маннофуранозы, альфа-D-маннопиранозы, бета-D-маннопиранозы, альфа-D-глюкофуранозы, бета-D-глюкофуранозы, альфа-D-глюкопиранозы, бета-D-глюкопиранозы, альфа-D-галактофуранозы, бета-D-галактофуранозы, альфа-D-галактопиранозы, бета-D-галактопиранозы, альфа-D-рибофуранозы, бета-D-рибофуранозы, альфа-D-рибопиранозы, бета-D-рибопиранозы, альфа-D-фруктофуранозы, альфа-D-фруктопиранозы, глюкозамина, галактозамина, сиаловой кислоты, N-ацетилгалактозамина.

В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один лиганд выбран из N-ацетилгалактозамина, галактозы, галактозамина, N-формилгалактозамина, N-пропионилгалактозамина, N-n-бутаноилгалактозамина и N-изобутаноилгалактозамина.

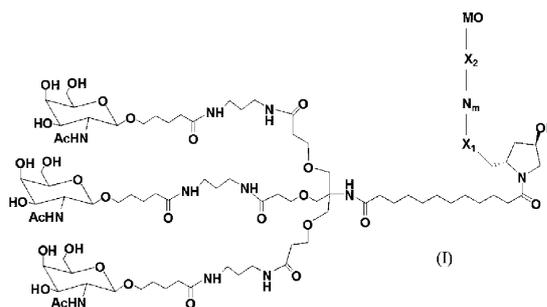
В определенных вариантах осуществления каждый лиганд представляет собой N-ацетилгалактозамин.

В определенных вариантах осуществления соединение имеет структуру



где каждый N независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеозид и m равняется от 1 до 5; каждый X<sub>1</sub> и X<sub>2</sub> независимо представляет собой фосфодиэфирную связь или фосфотиоатную связь и MO представляет собой модифицированный олигонуклеотид.

В определенных вариантах осуществления соединение, представленное в данном документе, содержит модифицированный нуклеотид и сопряженный фрагмент, где модифицированный олигонуклеотид имеет структуру C<sub>L</sub>CA<sub>L</sub>TTG<sub>L</sub>T<sub>L</sub>CAC<sub>L</sub>AC<sub>L</sub>TC<sub>L</sub>C<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 7), где нижний индекс "L" обозначает LNA и нуклеозиды без последующего нижнего индекса представляют собой β-D-дезоксирибонуклеозиды, и каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную межнуклеозидную связь, и где сопряженный фрагмент связан с 3'-концом модифицированного олигонуклеотида и имеет структуру



где каждый N независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеозид и  $m$  равняется от 1 до 5; каждый  $X_1$  и  $X_2$  независимо представляют собой фосфодиэфирную связь или фосфотиоатную связь и MO представляет собой модифицированный олигонуклеотид.

В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один из  $X_1$  и  $X_2$  представляет собой фосфодиэфирную связь. В определенных вариантах осуществления каждый из  $X_1$  и  $X_2$  представляет собой фосфодиэфирную связь. В определенных вариантах осуществления  $m$  равняется 1. В определенных вариантах осуществления  $m$  равняется 2, 3, 4 или 5.

В определенных вариантах осуществления  $N_m$  представляет собой  $N'_pN''$ , где каждый  $N'$  независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеозид и  $p$  равняется от 0 до 4; и  $N''$  представляет собой нуклеозид, содержащий немодифицированный сахарный фрагмент. В определенных вариантах осуществления  $p$  равняется 0. В определенных вариантах осуществления  $p$  равняется 1, 2, 3 или 4.

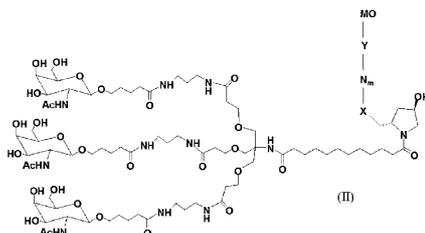
В определенных вариантах осуществления каждый  $N'$  содержит немодифицированный сахарный фрагмент. В определенных вариантах осуществления каждый немодифицированный сахарный фрагмент независимо представляет собой  $\beta$ -D-рибозу или  $\beta$ -D-дезоксирибозу.

В определенных вариантах осуществления  $N''$  содержит пуриновое нуклеотидное основание. В определенных вариантах осуществления  $N''$  содержит пиримидиновое нуклеотидное основание. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один  $N'$  содержит пуриновое нуклеотидное основание. В определенных вариантах осуществления каждое пуриновое нуклеотидное основание независимо выбрано из аденина, гуанина, гипоксантина, ксантина, и 7-метилгуанина. В определенных вариантах осуществления  $N''$  представляет собой  $\beta$ -D-дезоксирибоаденозин или  $\beta$ -D-дезоксирибогуанозин. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один  $N'$  содержит пиримидиновое нуклеотидное основание. В определенных вариантах осуществления каждое пиримидиновое нуклеотидное основание независимо выбрано из цитозина, 5-метилцитозина, тимина, урацила и 5,6-дигидроурацила.

В любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе, сахарный фрагмент каждого N независимо выбран из  $\beta$ -D-рибозы,  $\beta$ -D-дезоксирибозы, 2'-O-метоксисахара, 2'-O-метилового сахара, 2'-фторсахара и бициклического сахарного фрагмента. В определенных вариантах осуществления каждый бициклический сахарный фрагмент независимо выбран из cEt-сахарного фрагмента, LNA-сахарного фрагмента и ENA-сахарного фрагмента. В определенных вариантах осуществления cEt-сахарным фрагментом является S-cEt-сахарный фрагмент. В определенных вариантах осуществления cEt-сахарным фрагментом является R-cEt-сахарный фрагмент. В любом варианте осуществления, описанном в данном документе, сахарный фрагмент каждого N может независимо быть выбранным из  $\beta$ -D-рибозы,  $\beta$ -D-дезоксирибозы и 2'-фторсахара.

В данном документе представлены соединения, содержащие модифицированный нуклеотид и сопряженный фрагмент, где модифицированный олигонуклеотид имеет структуру  $A_E^{Me}C_E^{Me}A_E^{Me}C_E^{Me}C_EA_ET_E T_E TGU_5C_SAC_SAC_STC_S C_S$  (SEQ ID NO: 4), где нуклеозиды без последующего нижнего индекса представляют собой  $\beta$ -D-дезоксирибонуклеозиды, нуклеозиды с последующим нижним индексом.

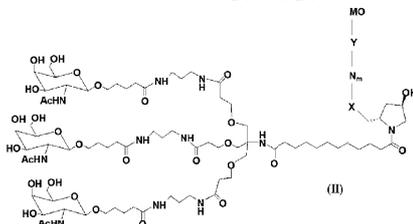
"E" представляют собой 2'-МОЕ-нуклеозиды, нуклеозиды с последующим нижним индексом "S" представляют собой S-cEt-нуклеозиды, и каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную межнуклеозидную связь; и где сопряженный фрагмент связан с 3'-концом модифицированного олигонуклеотида и имеет структуру



где X представляет собой фосфодиэфирную связь;  $m$  равняется 1; N представляет собой  $\beta$ -D-дезоксирибоаденозин; Y представляет собой фосфодиэфирную связь и MO представляет собой модифи-

цированный олигонуклеотид.

В данном документе представлены соединения, содержащие модифицированный нуклеотид и сопряженный фрагмент, где модифицированный олигонуклеотид имеет структуру  $C_LCA_LTTG_LT_LCA-C_LAC_LTC_LC_L$  (SEQ ID NO: 7), где нижний индекс "L" обозначает LNA и нуклеозиды без последующего нижнего индекса представляют собой  $\beta$ -D-дезоксирибонуклеозиды, и каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную межнуклеозидную связь, и где сопряженный фрагмент связан с 3'-концом модифицированного олигонуклеотида и имеет структуру



где X представляет собой фосфодиэфирную связь; m равняется 1; N представляет собой  $\beta$ -D-дезоксирибоаденозин; Y представляет собой фосфодиэфирную связь и MO представляет собой модифицированный олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления все  $C_L$ -нуклеозиды представляют собой  $MeC_L$ -нуклеозиды, где верхний индекс "Me" обозначает 5-метилцитозин.

В данном документе представлены способы ингибирования активности miR-122 в клетке, включающие приведение клетки в контакт с любым соединением, представленным в данном документе. В определенных вариантах осуществления клетка находится в условиях *in vivo*. В определенных вариантах осуществления клетка находится в условиях *in vitro*.

В данном документе предусмотрены способы введения HCV-инфицированному субъекту любого из соединений, представленных в данном документе. В определенных вариантах осуществления введение снижает симптомы инфекции HCV. В определенных вариантах осуществления введение предупреждает восстановление в сыворотке РНК HCV. В определенных вариантах осуществления введение отсрочивает восстановление в сыворотке РНК HCV. В определенных вариантах осуществления субъект, имеющий инфекцию HCV, выбран для лечения соединением, представленным в данном документе. В определенных вариантах осуществления HCV-инфицированный субъект инфицирован одним или несколькими генотипами HCV, выбранными из генотипа 1, генотипа 2, генотипа 3, генотипа 4, генотипа 5 и генотипа 6. В определенных вариантах осуществления перед введением соединения, представленного в данном документе, субъекта определяли как инфицированного одним или несколькими генотипами HCV, выбранными из генотипа 1, генотипа 2, генотипа 3, генотипа 4, генотипа 5 и генотипа 6. В определенных вариантах осуществления генотип HCV выбран из генотипа 1a, генотипа 1b, генотипа 2a, генотипа 2b, генотипа 2c, генотипа 2d, генотипа 3a, генотипа 3b, генотипа 3c, генотипа 3d, генотипа 3e, генотипа 3f, генотипа 4a, генотипа 4b, генотипа 4c, генотипа 4d, генотипа 4e, генотипа 4f, генотипа 4g, генотипа 4h, генотипа 4i, генотипа 4j, генотипа 5a и генотипа 6a. В определенных вариантах осуществления генотип HCV выбран из генотипа 1a, 1b и 2.

Любой из способов, представленных в данном документе, может включать введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одно терапевтическое средство выбрано из ингибитора протеазы, ингибитора полимеразы, ингибитора кофактора, ингибитора РНК-полимеразы, ингибитора структурного белка, ингибитора неструктурного белка, ингибитора циклофилина, ингибитора входа, агониста TLR7 и интерферона. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одно терапевтическое средство выбрано из ингибитора протеазы, ингибитора NS5A, ингибитора NS3/4A, нуклеозидного ингибитора NS5B, нуклеотидного ингибитора NS5B, нунуклеозидного ингибитора NS5B, ингибитора циклофилина и интерферона. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одно терапевтическое средство выбрано из интерферона альфа-2a, интерферона альфа-2b, интерферона альфакон-1, пегинтерферона альфа-2b, пегинтерферона альфа-2a, интерферона альфа-2b длительного высвобождения, интерферона лямбда, софосбувира, рибавирина, теллапревира, боцепревира, ванипревира, асунапревира, ритонавира, сетробувира, даклатавира, симепревира, алиспоривири, мерцицитабина, тегобувира, данопревира, совапревира и неспевирира. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одно терапевтическое средство выбрано из интерферона, рибавирина и теллапревира.

В определенных вариантах осуществления субъект инфицирован HCV-вариантом, который является устойчивым по меньшей мере к одному терапевтическому средству. В определенных вариантах осуществления субъект инфицирован HCV-вариантом, который является устойчивым к противовирусному средству прямого действия. В определенных вариантах осуществления субъект инфицирован HCV-вариантом, который является устойчивым по меньшей мере к одному терапевтическому средству, выбранному из ингибитора протеазы, ингибитора полимеразы, ингибитора кофактора, ингибитора РНК-полимеразы, ингибитора структурного белка, ингибитора неструктурного белка и ингибитора циклофилина. В определенных вариантах осуществления субъект инфицирован HCV-вариантом, который является

ся устойчивым по меньшей мере к одному терапевтическому средству, выбранному из ингибитора протеазы, ингибитора NS5A, ингибитора NS3/4A, нуклеозидного ингибитора NS5B, нуклеотидного ингибитора NS5B, ненуклеозидного ингибитора NS5B и ингибитора циклофилина. В определенных вариантах осуществления субъект инфицирован HCV-вариантом, который является устойчивым по меньшей мере к одному терапевтическому средству, выбранному из софосбувира, рибавирин, теллапревира, боцепревира, ванипревира, асунапревира, ритонавира, сетробувира, даклатасвира, симепревира, алиспоривири, мерситабина, тегобувира, данопревира, совапревира и нецепревира.

В определенных вариантах осуществления HCV-инфицированный субъект является пациентом, не дающим клинического ответа по меньшей мере на одно терапевтическое средство. В определенных вариантах осуществления HCV-инфицированный субъект является пациентом, не дающим клинического ответа на интерферон. В определенных вариантах осуществления HCV-инфицированный субъект является пациентом, не дающим клинического ответа на противовирусное средство прямого действия.

Любой из способов, представленных в данном документе, может включать отбор субъекта, имеющего уровень РНК HCV больший, чем 350000 копий на миллилитр сыворотки. В определенных вариантах осуществления субъект имеет уровень РНК HCV от 350000 до 3500000 копий на миллилитр сыворотки. В определенных вариантах осуществления субъект имеет уровень РНК HCV более чем 3500000 копий на миллилитр сыворотки.

В определенных вариантах осуществления HCV-инфицированный субъект имеет HCV-ассоциированное заболевание. В определенных вариантах осуществления HCV-ассоциированное заболевание представляет собой цирроз, фиброз печени, стеатогепатит, (гипер)стеатоз или гепатоцеллюлярную карциному.

В определенных вариантах осуществления HCV-инфицированный субъект имеет одно или несколько заболеваний, которые не являются HCV-ассоциированными заболеваниями. В определенных вариантах осуществления HCV-инфицированный субъект инфицирован одним или несколькими вирусами, отличными от HCV. В определенных вариантах осуществления HCV-инфицированный субъект инфицирован вирусом иммунодефицита человека (HIV). В определенных вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, включают введение дополнительного терапевтического средства, представляющего собой противовирусное средство, применяемое в лечении инфекции HIV. В определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (NNRTI). В определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (NRTI). В определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой ингибитор протеазы. В определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой ингибитор входа или ингибитор слияния. В определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой ингибитор интегразы. В определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой выбранное из эфавиренза, этравирин, невирапин, абакавира, эмитрацитабина, тенофовири, ламивудина, зидовудина, атазанавири, дарунавири, фосампренавири, ритонавири, энфувиртида, маравироки и ралтегравира.

Любой из способов, представленных в данном документе, может включать введение дозы соединения, достаточной для снижения уровня РНК HCV. В определенных вариантах осуществления введенная доза соединения снижает уровень РНК HCV ниже 40 копий на мл сыворотки. В определенных вариантах осуществления введенная доза соединения достигает по меньшей мере 2-лог снижения уровня РНК HCV. В определенных вариантах осуществления введение соединения, представленного в данном документе, достигает устойчивого вирусологического ответа. В определенных вариантах осуществления введенная доза соединения является достаточной для достижения снижения уровня РНК HCV по меньшей мере в 0,5 раза, по меньшей мере в 1,0 раз, по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 2,0 раза или по меньшей мере в 2,5 раза. В определенных вариантах осуществления снижение уровня РНК HCV достигается через две недели, три недели, четыре недели, пять недель или шесть недель после первого введения соединения. В определенных вариантах осуществления соединение, представленное в данном документе, вводят один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели или один раз в месяц. В определенных вариантах осуществления соединение, представленное в данном документе, вводят один раз в два месяца или один раз в три месяца. В некоторых вариантах осуществления соединение, представленное в данном документе, вводят один раз в четыре недели.

В определенных вариантах осуществления доза соединения, которое вводят, менее чем или равна 5 мг/кг в неделю, менее чем или равна 5 мг/кг, менее чем или равна 4,5 мг/кг, менее чем или равна 4,0 мг/кг, менее чем или равна 3,5 мг/кг, менее чем или равна 3,0 мг/кг, менее чем или равна 2,5 мг/кг, менее чем или равна 2,0 мг/кг, менее чем или равна 1,5 мг/кг или менее чем или равна 1,0 мг/кг. В определенных вариантах осуществления соединение вводят в дозе в диапазоне от 1 до 5 мг/кг, или от 1 до 4 мг/кг, или от 2 до 5 мг/кг, или от 2 до 4 мг/кг. В определенных вариантах осуществления доза соединения, которое вводят, менее чем или равна 10 мг/кг, менее чем или равна 7,5 мг/кг, менее чем или равна 10 мг/кг в неделю или менее чем или равна 7,5 мг/кг в неделю.

В определенных вариантах осуществления введение соединения, представленного в данном документе, нормализует уровни ферментов печени, где фермент печени необязательно представляет собой аланинаминотрансферазу.

В любом из вариантов осуществления, представленных в данном документе, соединение присутствует в фармацевтической композиции.

В данном документе представлены соединения для применения в лечении HCV-инфицированного субъекта.

В определенных вариантах осуществления субъектом является человек.

#### Краткое описание фигур

Фиг. 1А и 1В: Активность *in vivo* модифицированных олигонуклеотидов anti-miR-122. (А) Начало и продолжительность действия anti-miR-122 после однократного введения соединения при указанных дозах. (В) Дерепрессия ALDOA через семь дней после однократной дозы соединения anti-miR-122 при указанных дозах.

Фиг. 2: Структура сопряженного фрагмента, содержащего три лиганда GalNAc.

Фиг. 3А, 3В и 3С: Конъюгированные структуры модифицированных олигонуклеотидов.

Фиг. 4А, 4В и 4С: Активность *in vivo* GalNAc-конъюгированных модифицированных олигонуклеотидов anti-miR-122.

Фиг. 5А и 5В: Антисмысловое ингибирование miR-122 снижает титр HCV.

Фиг. 6А и 6В: Активность *in vivo* GalNAc-конъюгированных модифицированных олигонуклеотидов anti-miR-122.

Фиг. 7А и 7В: Активность *in vivo* GalNAc-конъюгированных модифицированных олигонуклеотидов anti-miR-122.

Фиг. 8А и 8В: Активность *in vivo* GalNAc-конъюгированных модифицированных олигонуклеотидов anti-miR-122.

Фиг. 9А и 9В: Фармакокинетики соединений anti-miR-122.

#### Подробное описание

Если не указано иное, все технические и научные термины, использованные в данном документе, имеют то же значение, какое обычно понимает специалист в данной области, к которой относится настоящее изобретение. Если не приводятся конкретные определения, номенклатура, используемая по отношению к аналитической химии, синтетической органической химии и медицинской и фармацевтической химии и их способам и методикам, описываемым в данном документе, хорошо известна и широко применяется в данной области техники. В случае если в данном документе имеются несколько определенных терминов, преимущество имеют таковые из данного раздела. Для химического синтеза, химического анализа, получения, составления и доставки фармацевтических препаратов и лечения субъектов можно применять стандартные методики. Такие определенные методики и способы можно найти, например, в "Carbohydrate Modifications in Antisense Research" под редакцией Sangvi и Cook, American Chemical Society, Washington D.C., 1994; и в "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, Pa., 18-е издание, 1990 г.; и которые включены в данный документ при помощи ссылки для любых целей. В допустимых случаях все патенты, заявки на патенты, опубликованные заявки и публикации, последовательности из GENBANK, веб-сайты и другие опубликованные материалы, на которые ссылаются по всему полному раскрытию в данном документе, если не указано иное, включены ссылкой во всем объеме. Если ссылка делается на URL или другой подобный идентификатор или адрес, то понимают, что такие идентификаторы могут изменяться, и конкретная информация в интернете может изменяться, но путем поиска в Интернете можно найти эквивалентную информацию. Ссылки на нее свидетельствуют о доступности и публичном распространении такой информации.

Перед тем, как будут раскрыты и описаны настоящие композиции и способы, следует понимать, что терминология, использованная в данном документе, служит только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена быть ограничивающей. Следует отметить, что использованные в описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа, включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное.

#### Определения

"Инфекция HCV" означает инфицирование одним или несколькими генотипами вируса гепатита С.

"HCV-инфицированный субъект" означает субъекта, который был инфицирован одним или несколькими генотипами вируса гепатита С. HCV-инфицированный субъект может проявлять или не проявлять симптомы инфекции HCV. HCV-инфицированные субъекты включают субъекты, которые были инфицированы одним или несколькими генотипами HCV, но РНК HCV в крови субъекта ниже обнаруживаемых уровней.

"HCV-ассоциированное заболевание" означает патологический процесс, опосредованный инфекцией HCV. HCV-ассоциированные заболевания включают без ограничения цирроз, фиброз печени, стеатогепатит и гепатоцеллюлярную карциному.

"РНК HCV в крови" означает РНК вируса гепатита С, присутствующую в крови HCV-инфицированного субъекта. "Кровь" включает цельную кровь и сыворотку.

"Восстановление в сыворотке РНК HCV" означает повышение уровня РНК HCV после предыдущего понижения уровня РНК HCV.

"Уровень РНК HCV" означает количество РНК HCV в данном объеме крови субъекта. Уровень РНК HCV может быть выражен как копии РНК на миллилитр. "Уровень РНК HCV" также можно назвать "вирусная нагрузка HCV" или "титр РНК HCV".

"Устойчивый вирусологический ответ" означает необнаруживаемую РНК вируса гепатита С в крови субъекта в конце полного курса лечения и по истечении дальнейших шести месяцев. В определенных вариантах осуществления РНК HCV считается необнаруживаемой при ниже 40 копий на миллилитр крови.

"Пациент, не дающий клинического ответа" означает субъекта, который получил лечение, но не проявляет клинически приемлемого улучшения признаков или симптомов заболевания.

"Пациент, не дающий клинического ответа на интерферон" означает HCV-инфицированного субъекта, получившего лечение интерфероном, но не проявляющего клинически приемлемого снижения уровня РНК HCV.

"Противовирусное средство прямого действия" означает фармацевтическое средство, которое ингибирует активность фермента HCV.

"Пациент, не дающий клинического ответа на противовирусное средство прямого действия" означает HCV-инфицированного субъекта, получившего лечение противовирусным средством прямого действия, но не проявляющего клинически приемлемого снижения уровня РНК HCV. В определенных вариантах осуществления вирус обладает выработанной устойчивостью к противовирусному средству прямого действия.

"miR-122-ассоциированное состояние" означает любое заболевание, нарушение или состояние, которое можно лечить, предупреждать или облегчать с помощью модулирования miR-122. miR-122-ассоциированное заболевание не должно характеризоваться избытком miR-122. miR-122-ассоциированные заболевания включают без ограничения инфекцию HCV, повышенный холестерин и нарушения, связанные с перенасыщением железом.

"Нарушение, связанное с перенасыщением железом" означает любое заболевание, нарушение или состояние, характеризующееся избытком железа в организме. "Субъект" означает человека или животное, отличное от человека, выбранное для лечения или терапии.

"Субъект, нуждающийся в этом" означает субъекта, который идентифицирован как нуждающийся в терапии или лечении.

"Субъект, предположительно имеющий" означает субъекта, у которого проявляется один или несколько клинических индикаторов заболевания.

"Введение" означает предоставление субъекту фармацевтического средства или композиции, и оно включает без ограничений введение медицинским работником и самостоятельное введение.

"Парентеральное введение" означает введение посредством инъекции или инфузии. Парентеральное введение включает без ограничений подкожное введение, внутривенное введение и внутримышечное введение.

"Подкожное введение" означает введение непосредственно под кожу.

"Внутривенное введение" означает введение в вену.

"Вводимый сопутствующим образом" относится к совместному введению двух или нескольких средств субъекту любым способом, при котором у субъекта присутствуют фармакологические эффекты каждого средства. При сопутствующем введении не требуется, чтобы оба средства вводили в одной фармацевтической композиции, в одной и той же лекарственной форме или используя один и тот же путь введения. Не требуется, чтобы эффекты обоих средств присутствовали в одно и то же время. Требуется только, чтобы эффекты перекрывались в течение определенного периода времени, и не требуется, чтобы они были одинакового протяжения во времени.

"Продолжительность" означает период времени, в течение которого продолжается активность или событие. В определенных вариантах осуществления продолжительность лечения представляет собой период времени, в течение которого вводят дозы фармацевтического средства или фармацевтической композиции.

"Терапия" означает способ лечения заболевания. В определенных вариантах осуществления терапия включает без ограничений химиотерапию, радиотерапию или введение фармацевтического средства.

"Лечение" означает применение одной или нескольких конкретных процедур, применяемых для лечения или облегчения заболевания. В определенных вариантах осуществления конкретная процедура представляет собой введение одного или нескольких фармацевтических средств.

"Облегчение" означает уменьшение тяжести по меньшей мере одного индикатора состояния или заболевания. В определенных вариантах осуществления облегчение включает отсрочку или замедление прогрессирования одного или нескольких индикаторов состояния или заболевания. Тяжесть индикаторов может определяться с помощью субъективных или объективных мер, известных специалистам в данной области.

"Подверженный риску развития" означает статус, при котором субъект предрасположен к развитию

состояния или заболевания. В определенных вариантах осуществления субъект, подверженный риску развития состояния или заболевания, проявляет один или несколько симптомов состояния или заболевания, но не проявляет достаточного числа симптомов, чтобы у него можно было диагностировать состояние или заболевание. В определенных вариантах осуществления субъект, подверженный риску развития состояния или заболевания, проявляет один или несколько симптомов состояния или заболевания, но в меньшей степени, чем требуется для диагностирования состояния или заболевания.

"Предупредить начало развития" означает предупредить развитие состояния или заболевания у субъекта, подверженного риску развития заболевания или состояния. В определенных вариантах осуществления субъект, подверженный риску развития заболевания или состояния, получает лечение, подобное лечению, получаемому субъектом, у которого уже есть заболевание или состояние.

"Отсрочить начало развития" означает отсрочить развитие состояния или заболевания у субъекта, подверженного риску развития заболевания или состояния. В определенных вариантах осуществления субъект, подверженный риску развития заболевания или состояния, получает лечение, подобное лечению, получаемому субъектом, у которого уже есть заболевание или состояние.

"Терапевтическое средство" означает фармацевтическое средство, применяемое для излечения, облегчения или предупреждения заболевания.

"Доза" означает установленное количество фармацевтического средства, обеспеченного в однократном введении. В определенных вариантах осуществления дозу можно вводить в двух или более болюсах, таблетках или инъекциях. Например, в определенных вариантах осуществления, где необходимо подкожное введение, для необходимой дозы требуется объем, который нелегко предоставить посредством однократной инъекции. В таких вариантах осуществления можно применять две или более инъекций для достижения необходимой дозы. В определенных вариантах осуществления дозу можно вводить в двух или более инъекциях для того, чтобы свести к минимуму реакцию в месте инъекции у индивида. В определенных вариантах осуществления дозу вводят посредством медленной инфузии.

"Единица дозирования" означает форму, в которой предусмотрено фармацевтическое средство. В определенных вариантах осуществления единица дозирования представляет собой флакон, содержащий лиофилизированный олигонуклеотид. В определенных вариантах осуществления единица дозирования представляет собой флакон, содержащий перерастворенный олигонуклеотид.

"Терапевтически эффективное количество" относится к количеству фармацевтического средства, обеспечивающему терапевтическую пользу животному.

"Фармацевтическая композиция" означает смесь веществ, подходящих для введения индивиду, включающую фармацевтическое средство. Например, фармацевтическая композиция может содержать стерильный водный раствор.

"Фармацевтическое средство" означает вещество, обеспечивающее терапевтический эффект при введении субъекту.

"Активный фармацевтический ингредиент" означает вещество в фармацевтической композиции, обеспечивающее необходимый эффект.

"Улучшенная функция органа" означает изменение функции органа в сторону нормального диапазона значений. В определенных вариантах осуществления функцию органа определяют путем измерения уровня молекул, обнаруживаемых в крови или моче субъекта. Например, в определенных вариантах осуществления улучшенную функцию печени измеряют по уменьшению уровней печеночной трансаминазы в крови. В определенных вариантах осуществления улучшенную функцию почки измеряют по снижению остаточного азота мочевины, снижению степени протеинурии, снижению степени альбуминурии и т.д.

"Приемлемый профиль безопасности" означает картину побочных эффектов, находящуюся в клинически приемлемых пределах.

"Побочный эффект" означает физиологический ответ, связанный с лечением, отличный от необходимых эффектов. В определенных вариантах осуществления побочные эффекты включают безграничные реакции в месте инъекции, аномалии функциональных проб печени, аномалии почечной функции, гепатотоксичность, нефротоксичность, аномалии центральной нервной системы и виды миопатии. Такие побочные эффекты можно обнаружить прямо или косвенно. Например, повышенные уровни аминотрансферазы в сыворотке могут указывать на гепатотоксичность или отклонение от нормы функции печени. Например, повышенный уровень билирубина может указывать на гепатотоксичность или аномалию функции печени.

"Реакция в месте инъекции" означает воспаление или аномальное покраснение кожи в месте инъекции у индивида.

"Приверженность субъекта к лечению" означает соблюдение субъектом указаний в отношении рекомендованной или назначенной терапии.

"Следовать предписаниям" означает соблюдение субъектом указаний в отношении рекомендованной терапии.

"Рекомендованная терапия" означает лечение, рекомендованное медицинским работником для лечения, улучшения течения, отсрочки или предупреждения заболевания.

"miR-122" означает микроРНК с нуклеотидной последовательностью UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG (SEQ ID NO: 1).

"miR-122 со структурой типа "стебель-петля"" означает предшественника микроРНК с нуклеотидной последовательностью CCUAGCAGAGCUGUGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGUGUCUAAAACUAUCAACGCCAUUAUCA CACUAAAUAGCUACUGCUAGGC (SEQ ID NO: 2).

"Anti-miR" означает олигонуклеотид с нуклеотидной последовательностью, комплементарной микроРНК. В определенных вариантах осуществления anti-miR представляет собой модифицированный олигонуклеотид.

"Anti-miR-122" означает олигонуклеотид с нуклеотидной последовательностью, комплементарной miR-122. В определенных вариантах осуществления anti-miR-122 полностью комплементарна miR-122 (т.е. на 100% комплементарна). В определенных вариантах осуществления anti-miR-122 по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95 или на 100% комплементарна. В определенных вариантах осуществления anti-miR-122 представляет собой модифицированный олигонуклеотид.

"Целевая нуклеиновая кислота" означает нуклеиновую кислоту, с которой предназначено гибридизировать олигомерное соединение.

"Нацеливание" означает процесс разработки и выбора нуклеотидной последовательности, которая будет гибридизироваться с целевой нуклеиновой кислотой.

"Нацеленный на" означает имеющий нуклеотидную последовательность, которая будет позволять осуществлять гибридизацию с целевой нуклеиновой кислотой.

"Модуляция" означает отклонение функции, количества или активности. В определенных вариантах осуществления модуляция означает увеличение функции, количества или активности. В определенных вариантах осуществления модуляция означает уменьшение функции, количества или активности.

"Экспрессия" означает любые функции и этапы, благодаря которым кодируемая геном информация превращается в структуры, присутствующие и функционирующие в клетке.

"5'-концевой целевой сайт" означает нуклеотидное основание целевой нуклеиновой кислоты, комплементарное самому крайнему с 3'-конца нуклеотидному основанию конкретного олигонуклеотида.

"3'-концевой целевой сайт" означает нуклеотидное основание целевой нуклеиновой кислоты, комплементарное самому крайнему с 5'-конца нуклеотидному основанию конкретного олигонуклеотида.

"Область" означает часть из связанных нуклеозидов в нуклеиновой кислоте. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид имеет нуклеотидную последовательность, комплементарную области целевой нуклеиновой кислоты. Например, в конкретных подобных вариантах осуществления олигонуклеотид комплементарен области последовательности микроРНК. В конкретных подобных вариантах осуществления олигонуклеотид полностью комплементарен области микроРНК.

"Сегмент" означает меньшую часть или субфрагмент области.

"Нуклеотидная последовательность" означает порядок смежных нуклеотидных оснований в олигомерном соединении или нуклеиновой кислоте, как правило, перечисленных в ориентации 5'-3', независимо от какой-либо модификации сахаров, связей и/или нуклеотидных оснований.

"Смежные нуклеотидные основания" означают нуклеотидные основания, непосредственно прилегающие друг к другу в нуклеиновой кислоте.

"Комплементарность нуклеотидных оснований" означает способность двух нуклеотидных оснований к нековалентному спариванию посредством образования водородных связей.

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

"Полностью комплементарный" означает, что каждое нуклеотидное основание олигонуклеотида способно спариваться с нуклеотидным основанием в каждом соответствующем положении в целевой нуклеиновой кислоте. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид полностью комплементарен микроРНК, т.е. каждое нуклеотидное основание олигонуклеотида комплементарно нуклеотидному основанию в соответствующем положении в микроРНК. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид, где каждое нуклеотидное основание обладает комплементарностью по отношению к нуклеотидному основанию в пределах области последовательности микроРНК, полностью комплементарен последовательности микроРНК.

"Процентная комплементарность" означает процентную долю нуклеотидных оснований олигонуклеотида, комплементарных части целевой нуклеиновой кислоты, имеющей такую же длину. Процентную комплементарность вычисляют путем деления числа нуклеотидных оснований олигонуклеотида, комплементарных нуклеотидным основаниям в соответствующих положениях в целевой нуклеиновой кислоте, на общее число нуклеотидных оснований в олигонуклеотиде.

"Процентная идентичность" означает число нуклеотидных оснований в первой нуклеиновой кислоте, идентичных нуклеотидным основаниям в соответствующих положениях во второй нуклеиновой кислоте, деленное на общее число нуклеотидных оснований в первой нуклеиновой кислоте. В определенных вариантах осуществления первая нуклеиновая кислота представляет собой микроРНК, и вторая нук-

леиновая кислота представляет собой микроРНК. В определенных вариантах осуществления первая нуклеиновая кислота представляет собой олигонуклеотид, и вторая нуклеиновая кислота представляет собой олигонуклеотид.

"Гибридизировать" означает гибридизацию комплементарных нуклеиновых кислот, происходящую в результате комплементарности нуклеотидных оснований.

"Несовпадение" означает, что нуклеотидное основание первой нуклеиновой кислоты не способно спариваться по Уотсону-Крику с нуклеотидным основанием в соответствующем положении второй нуклеиновой кислоты.

"Идентичный", применительно к нуклеотидным последовательностям, означает имеющий такую же нуклеотидную последовательность независимо от модификаций сахаров, связей и/или нуклеотидных оснований и независимо от метилированного состояния любых присутствующих пиримидинов.

"МикроРНК" означает эндогенную некодирующую РНК, имеющую длину от 18 до 25 нуклеотидных оснований, являющуюся продуктом расщепления пре-микроРНК с помощью фермента Dicer. Примеры зрелых микроРНК находятся в базе данных микроРНК, известной как miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>). В определенных вариантах осуществления микроРНК сокращают как "микроРНК" или "miR".

"Пре-микроРНК" или "пре-miR" означает некодирующую РНК, имеющую шпилечную структуру, являющуюся продуктом расщепления при-miR с помощью рибонуклеазы, специфичной к двухнитевым РНК, известной как Drosha.

"Последовательность со структурой типа "стебель-петля"" означает РНК, имеющую шпилечную структуру и содержащую последовательность зрелой микроРНК. Последовательности пре-микроРНК и последовательности со структурами типа стебель-петля могут перекрываться. Примеры последовательностей со структурами типа стебель-петля находятся в базе данных микроРНК, известной как miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>).

"Pri-микроРНК" или "pri-miR" означает некодирующую РНК, имеющую шпилечную структуру, являющуюся субстратом для рибонуклеазы Drosha, специфичной к двухнитевым РНК.

"Предшественник микроРНК" означает транскрипт, происходящий из геномной ДНК и содержащий некодирующую структурированную РНК, содержащую одну или несколько последовательностей микроРНК. Например, в определенных вариантах осуществления предшественник микроРНК представляет собой пре-микроРНК. В определенных вариантах осуществления предшественник микроРНК представляет собой при-микроРНК.

"МикроРНК-регулируемый транскрипт" означает транскрипт, регулируемый с помощью микроРНК.

"Моноцистронный транскрипт" означает предшественник микроРНК, содержащий одну последовательность микроРНК.

"Полицистронный транскрипт" означает предшественник микроРНК, содержащий две или более последовательности микроРНК.

"Затравочная последовательность" означает нуклеотидную последовательность, содержащую от 6 до 8 смежных нуклеотидных оснований из нуклеотидных оснований 1-9 с 5'-конца последовательности зрелой микроРНК.

"Последовательность, соответствующая затравочной" означает нуклеотидную последовательность, комплементарную затравочной последовательности и имеющую такую же длину, как затравочная последовательность.

"Олигомерное соединение" означает соединение, содержащее несколько связанных мономерных субъединиц. Олигомерные соединения включают олигонуклеотиды.

"Олигонуклеотид" означает соединение, содержащее несколько 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, обнаруживаемый в ДНК (2'-Н) или РНК (2'-ОН).

"Межнуклеозидная связь" означает ковалентную связь между прилегающими нуклеозидами.

"Связанные нуклеозиды" означает нуклеозиды, соединенные с помощью ковалентной связи.

"Нуклеотидное основание" означает гетероциклический фрагмент, способный к нековалентному спариванию с другим нуклеотидным основанием.

"Нуклеозид" означает нуклеотидное основание, связанное с сахарным фрагментом.

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

"Соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид, состоящий из" ряда связанных нуклеозидов, означает соединение, которое включает модифицированный олигонуклеотид, имеющий установленное число связанных нуклеозидов. Таким образом, соединение может включать дополнительные заместители или конъюгаты. Если не указано иное, соединение не включает каких-либо дополнительных нуклеозидов, помимо таковых модифицированного олигонуклеотида.

"Модифицированный олигонуклеотид" означает олигонуклеотид, имеющий одну или несколько модификаций относительно встречающихся в природе конца, сахара, нуклеинового основания и/или межнуклеозидной связи. Модифицированный олигонуклеотид может содержать немодифицированные нуклеозиды.

"Однонитевой модифицированный олигонуклеотид" означает модифицированный олигонуклеотид, не гибридизирующийся с комплементарной нитью.

"Модифицированный нуклеозид" означает нуклеозид, имеющий любое изменение по сравнению со встречающимся в природе нуклеозидом. Модифицированный нуклеозид может иметь модифицированный сахар и немодифицированное нуклеотидное основание. Модифицированный нуклеозид может иметь модифицированный сахар и модифицированное нуклеотидное основание. Модифицированный нуклеозид может иметь природный сахар и модифицированное нуклеотидное основание. В определенных вариантах осуществления модифицированный нуклеозид представляет собой бициклический нуклеозид. В определенных вариантах осуществления модифицированный нуклеозид представляет собой небиициклический нуклеозид.

"2'-модифицированный нуклеозид" означает нуклеозид, содержащий сахар с любой модификацией в положении, эквивалентном 2'-положению фуранозильного кольца, поскольку положения пронумерованы от 2-дезоксирибозы или рибозы. Следует понимать, что 2'-модифицированные нуклеозиды включают без ограничения нуклеозиды, содержащие бициклические сахарные фрагменты.

"Модифицированная межнуклеозидная связь" означает любое изменение по сравнению со встречающейся в природе межнуклеозидной связью.

"Фосфотиоатная межнуклеозидная связь" означает связь между нуклеозидами, где один из немостиковых атомов является атомом серы. "Фосфотиоатная связь" означает связь между двумя химическими фрагментами, имеющими такую же структуру, как фосфотиоатная межнуклеозидная связь, например -OP(O)(S)O-.

"Фосфодиэфирная связь" означает связь между двумя химическими фрагментами, имеющими такую же структуру, как фосфодиэфирная межнуклеозидная связь, например -OP(O)<sub>2</sub>O-.

"Немодифицированное нуклеотидное основание" означает встречающиеся в природе гетероциклические основания РНК или ДНК: пуриновые основания аденин (А) и гуанин (G), и пиримидиновые основания тимин (Т), цитозин (С) (в том числе 5-метилцитозин) и урацил (U).

"5-метилцитозин" означает цитозин, содержащий метильную группу, присоединенную к 5-положению.

"Неметилированный цитозин" означает цитозин, не имеющий метильной группы, присоединенной к 5-положению.

"Модифицированное нуклеотидное основание" означает любое нуклеотидное основание, не являющееся немодифицированным нуклеотидным основанием.

"Фуранозил" означает структуру, содержащую 5-членное кольцо, состоящее из четырех атомов углерода и одного атома кислорода.

"Встречающийся в природе фуранозил" означает рибофуранозил, обнаруженный во встречающихся в природе РНК, или дезоксирибофуранозил, обнаруженный во встречающейся в природе ДНК.

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

"Модифицированный сахарный фрагмент" означает замещенный сахарный фрагмент или заместитель сахара.

"Замещенный сахарный фрагмент" означает фуранозил, не являющийся встречающимся в природе фуранозилом. Замещенные сахарные фрагменты включают без ограничения сахарные фрагменты, содержащие модификации в 2'-положении, 5'-положении и/или 4'-положении встречающегося в природе фуранозила. Конкретные замещенные сахарные фрагменты являются бициклическими сахарными фрагментами.

"Заместитель сахара" означает структуру, не содержащую фуранозил, и способную заменять встречающийся в природе фуранозил нуклеозида таким образом, чтобы полученный в результате нуклеозид был способен (1) включаться в состав олигонуклеотида и (2) гибридизироваться с комплементарным нуклеозидом. Такие структуры включают относительно простые изменения фуранозила, такие как кольца, содержащие различное число атомов (например, 4-, 6- или 7-членные кольца); замену кислорода фуранозила атомом, не являющимся кислородом (например, углеродом, серой или азотом); или как изменение числа атомов, так и замену кислорода. Такие структуры могут также содержать замещения, соответствующие таковым, описанным в отношении замещенных сахарных фрагментов (например, 6-членные карбоциклические бициклические заместители сахара, необязательно содержащие дополнительные заместители). Заместители сахара также включают более сложные замены сахара (например, некольцевые системы пептидной нуклеиновой кислоты). Заместители сахара включают без ограничения морфолино, циклогексенилы и циклотекситы.

"β-D-дезоксирибоза" означает встречающийся в природе сахарный фрагмент ДНК.

"β-D-рибоза" означает встречающийся в природе сахарный фрагмент РНК.

"2'-О-метиловый сахар" или "2'-ОМЕ-сахар" означает сахар, имеющий О-метильную модификацию в 2'-положении.

"2'-О-метоксиэтиловый сахар" или "2'-МОЕ-сахар" означает сахар, имеющий О-метоксиэтиловую модификацию в 2'-положении.

"2'-О-фтор" или "2'-F" означает сахар, имеющий фтормодификацию в 2'-положении.

"Бициклический сахарный фрагмент" означает модифицированный сахарный фрагмент, содержащий 4-7-членное кольцо (включая без ограничения фуранозил), содержащее мостик, соединяющий два атома 4-7-членного кольца с образованием второго кольца, что дает в результате бициклическую структуру. В определенных вариантах осуществления 4-7-членное кольцо является кольцом сахара. В определенных вариантах осуществления 4-7-членное кольцо представляет собой фуранозил. В конкретных предпочтительных вариантах осуществления мостик соединяет 2'-углерод и 4'-углерод фуранозила. Неограничивающие иллюстративные бициклические сахарные фрагменты включают LNA, ENA, cEt, S-cEt и R-cEt.

"Сахарный фрагмент закрытой нуклеиновой кислоты (LNA)" означает замещенный сахарный фрагмент, содержащий (CH<sub>2</sub>)-О мостик между 4' и 2' атомами кольца фуранозы.

"Сахарный фрагмент ENA" означает замещенный сахарный фрагмент, содержащий (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-О мостик между 4' и 2' атомами кольца фуранозы.

"Сахарный фрагмент с закрепленным этилом (cEt)" означает замещенный сахарный фрагмент, содержащий CH(CH<sub>3</sub>)-О мостик между 4' и 2' атомами кольца фуранозы. В определенных вариантах осуществления мостик CH(CH<sub>3</sub>)-О закреплен в S-ориентации. В определенных вариантах осуществления мостик CH(CH<sub>3</sub>)-О закреплен в R-ориентации.

"S-cEt-сахарный фрагмент" означает замещенный сахарный фрагмент, содержащий S-закрепленный мостик CH(CH<sub>3</sub>)-О между 4' и 2' атомами кольца фуранозы.

"R-cEt-сахарный фрагмент" означает замещенный сахарный фрагмент, содержащий R-закрепленный мостик CH(CH<sub>3</sub>)-О между 4' и 2' атомами кольца фуранозы.

"2'-О-метилнуклеозид" означает модифицированный нуклеозид, имеющий 2'-О-метильную модификацию сахара.

"2'-О-метоксиэтилнуклеозид" означает модифицированный нуклеозид, имеющий 2'-О-метоксиэтиловую модификацию сахара. 2'-О-метоксиэтилнуклеозид может содержать модифицированное или немодифицированное нуклеотидное основание.

"2'-фторнуклеозид" означает модифицированный нуклеозид, имеющий 2'-фтормодификацию сахара. 2'-фторнуклеозид может содержать модифицированное или немодифицированное нуклеотидное основание.

"Бициклический нуклеозид" означает модифицированный нуклеозид, имеющий бициклический сахарный фрагмент.

Бициклический нуклеозид может иметь модифицированное или немодифицированное нуклеотидное основание.

"cEt-нуклеозид" означает нуклеозид, содержащий cEt-сахарный фрагмент. cEt-нуклеозид может содержать модифицированное или немодифицированное нуклеотидное основание.

"S-cEt-нуклеозид" означает нуклеозид, содержащий S-cEt-сахарный фрагмент.

"R-cEt-нуклеозид" означает нуклеозид, содержащий R-cEt-сахарный фрагмент.

"Небициклический нуклеозид" означает нуклеозид, имеющий сахар, отличный от бициклического сахара. В определенных вариантах осуществления небициклический нуклеозид содержит встречающийся в природе сахар. В определенных вариантах осуществления небициклический нуклеозид содержит модифицированный сахар. В определенных вариантах осуществления небициклический нуклеозид представляет собой β-D-дезоксирибонуклеозид. В определенных вариантах осуществления небициклический нуклеозид представляет собой 2'-О-метоксиэтилнуклеозид.

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

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

"LNA-нуклеозид" означает нуклеозид, содержащий сахарный фрагмент LNA.

"ENA-нуклеозид" означает нуклеозид, содержащий сахарный фрагмент ENA.

"Мотив" означает паттерн модифицированных и/или немодифицированных нуклеотидных оснований, сахаров и/или межнуклеотидных связей в олигонуклеотиде. В определенных вариантах осуществления мотив представляет собой нуклеотидный паттерн.

"Нуклеотидный паттерн" означает паттерн модификаций нуклеотидов в модифицированном олигонуклеотиде или его области. Нуклеотидный паттерн представляет собой мотив, описывающий расположение модификаций нуклеотидов в олигонуклеотиде.

"Полностью модифицированный олигонуклеотид" означает, что каждое нуклеотидное основание, каждый сахар и/или каждая межнуклеотидная связь модифицированы.

"Единообразно модифицированный олигонуклеотид" означает, что каждое нуклеотидное основание, каждый сахар и/или каждая межнуклеотидная связь имеют одну и ту же модификацию во всем мо-

дифицированном олигонуклеотиде.

"Стабилизирующая модификация" означает модификацию нуклеозида, обеспечивающую повышенную стабильность модифицированного олигонуклеотида в присутствии нуклеаз, по сравнению с таковой, обеспеченной 2'-дезоксинуклеозидами, связанными фосфодиэфирными межнуклеозидными связями. Например, в определенных вариантах осуществления стабилизирующая модификация представляет собой стабилизирующую модификацию нуклеозида. В определенных вариантах осуществления стабилизирующая модификация представляет собой модификацию межнуклеозидной связи.

"Стабилизирующий нуклеозид" означает нуклеозид, модифицированный для обеспечения повышенной нуклеазной стабильности олигонуклеотида по сравнению с таковой, обеспеченной 2'-дезоксинуклеозидом. В одном из вариантов осуществления стабилизирующий нуклеозид представляет собой 2'-модифицированный нуклеозид.

"Стабилизирующая межнуклеозидная связь" означает межнуклеозидную связь, обеспечивающую улучшенную нуклеазную стабильность олигонуклеотида, по сравнению с таковой, обеспеченной фосфодиэфирной межнуклеозидной связью. В одном из вариантов осуществления стабилизирующая межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную межнуклеозидную связь.

"Связующая группа", используемая в данном документе, относится к атому или группе атомов, которые присоединяют первую химическую структурную единицу ко второй химической структурной единице посредством одной или нескольких ковалентных связей.

"Линкер", используемый в данном документе, относится к атому или группе атомов, которые присоединяют один или несколько лигандов к модифицированному или немодифицированному нуклеозиду посредством одной или нескольких ковалентных связей. Модифицированный или немодифицированный нуклеозид может быть частью модифицированного олигонуклеотида, описанного в данном документе, или может присоединяться к модифицированному олигонуклеотиду с помощью фосфодиэфирной или фосфотиоатной связи. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединяет один или несколько лигандов к 3'-концу модифицированного олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединяет один или несколько лигандов к 5'-концу модифицированного олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединяет один или несколько лигандов к модифицированному или немодифицированному нуклеозиду, присоединенному к 3'-концу модифицированного олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединяет один или несколько лигандов к модифицированному или немодифицированному нуклеозиду, присоединенному к 5'-концу модифицированного олигонуклеотида. Если линкер присоединяет один или несколько лигандов к 3'-концу модифицированного олигонуклеотида или к модифицированному или немодифицированному нуклеозиду, присоединенному к 3'-концу модифицированного олигонуклеотида, в некоторых вариантах осуществления точкой присоединения для линкера может быть 3' углерод модифицированного или немодифицированного сахарного фрагмента. Если линкер присоединяет один или несколько лигандов к 5'-концу модифицированного олигонуклеотида или к модифицированному или немодифицированному нуклеозиду, присоединенному к 5'-концу модифицированного олигонуклеотида, в некоторых вариантах осуществления точкой присоединения для линкера может быть 5' углерод модифицированного или немодифицированного сахарного фрагмента.

### Обзор

Для идентификации сильных ингибиторов miR-122 было разработано и синтезировано множество соединений на основе anti-miR-122. Соединения содержали модифицированные олигонуклеотиды, которые варьировали по длине и числу, расположению и идентичности бициклических нуклеозидов и небциклических нуклеозидов. Исходную серию соединений тестировали в *in vitro* анализе с применением люциферазы, в котором идентифицировали подгруппу соединений как *in vitro* активные соединения. Эти *in vitro* активные соединения затем тестировали в *in vivo* анализах для идентификации тех соединений, которые являлись сильными ингибиторами miR-122 *in vivo*. Из первоначальных *in vitro* и *in vivo* этапов скрининга выбирали конкретные соединения в качестве основы для разработки дополнительных соединений. Экспериментально наблюдаемые корреляции между структурой и активностью (как *in vitro*, так и *in vivo*) применяли для информационного обеспечения разработки этих дополнительных соединений, с дополнительными изменениями длины, и отбора, и расположения бициклических и небциклических нуклеозидов. Скрининговые анализы *in vitro* и *in vivo* повторяли в отношении дополнительных соединений. Конкретные соединения также тестировали по другим свойствам, например восприимчивости к активности экзонуклеаз, накоплению в тканях и периоду полувыведения из тканей.

Среди более 400 соединений, подвергнутых скринингу *in vitro* в ходе этого способа, приблизительно 150 идентифицировали как активные в анализе *in vitro* с применением люциферазы. Приблизительно 70 из этих соединений дополнительно оценивали в отношении *in vivo* активности и безопасности. В ходе этого повторяющегося способа разработки и скрининга соединений наблюдали, что конкретные соединения, как неконъюгированные модифицированные олигонуклеотиды anti-miR-122, так и конъюгированные модифицированные олигонуклеотиды anti-miR-122, были сильными ингибиторами miR-122 *in vivo*. Эти соединения, как таковые, применимы для модуляции клеточных процессов, стимулируемых активностью miR-122. Дополнительно такие соединения применимы для лечения, предупреждения и/или от-

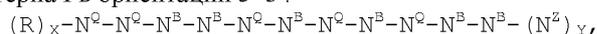
сроки начала развития заболеваний, ассоциированных с miR-122. Такие заболевания включают без ограничения инфекцию HCV и HCV-связанные осложнения, такие как цирроз, фиброз печени, стеатогепатит, (гипер)стеатоз и гепатоцеллюлярная карцинома.

### Конкретные соединения Anti-miR-122

В данном документе представлены модифицированные олигонуклеотиды, имеющие определенные паттерны бициклических и небициклических нуклеозидов. Модифицированные олигонуклеотиды с паттернами, идентифицированными в данном документе, являются эффективными ингибиторами активности miR-122.

Каждый из нуклеозидных паттернов, проиллюстрированных в данном документе, показан в ориентации 5'-3'.

В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрены соединения, содержащие модифицированный олигонуклеотид, состоящий из 16-22 связанных нуклеозидов, где нуклеотидная последовательность модифицированного олигонуклеотида комплементарна miR-122 (SEQ ID NO: 1) и где модифицированный олигонуклеотид содержит по меньшей мере 16 смежных нуклеозидов из следующего нуклеозидного паттерна I в ориентации 5'-3':



где каждый R независимо представляет собой небициклический нуклеозид или бициклический нуклеозид;

X равняется от 4 до 10;

каждый  $N^B$  независимо представляет собой бициклический нуклеозид;

каждый  $N^Q$  независимо представляет собой небициклический нуклеозид;

Y равняется 0 или 1 и

$N^Z$  представляет собой модифицированный нуклеозид или немодифицированный нуклеозид, небициклический нуклеозид или бициклический нуклеозид.

В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21 или 22 смежных нуклеозидов нуклеозидного паттерна I.

В определенных вариантах осуществления каждый бициклический нуклеозид независимо выбран из LNA-нуклеозида, cEt-нуклеозида и ENA-нуклеозида.

В определенных вариантах осуществления по меньшей мере два бициклических нуклеозида отличаются друг от друга.

В определенных вариантах осуществления все бициклические нуклеозиды имеют тот же тип сахарного фрагмента.

В определенных вариантах осуществления каждый бициклический нуклеозид представляет собой cEt-нуклеозид. В определенных вариантах осуществления cEt-нуклеозидом является S-cEt-нуклеозид. В определенных вариантах осуществления cEt-нуклеозидом является R-cEt-нуклеозид.

В определенных вариантах осуществления каждый бициклический нуклеозид представляет собой LNA-нуклеозид.

В определенных вариантах осуществления по меньшей мере два небициклических нуклеозида содержат сахарные фрагменты, которые отличаются друг от друга. В определенных вариантах осуществления каждый небициклический нуклеозид имеет тот же тип сахарного фрагмента.

В определенных вариантах осуществления каждый небициклический нуклеозид независимо выбран из  $\beta$ -D-дезоксирибонуклеозида,  $\beta$ -D-рибонуклеозида, 2'-O-метилнуклеозида, 2'-O-метоксиэтилнуклеозида и 2'-фторнуклеозида. В определенных вариантах осуществления каждый небициклический нуклеозид независимо выбран из  $\beta$ -D-дезоксирибонуклеозида и 2'-O-метоксиэтилнуклеозида. В определенных вариантах осуществления каждый небициклический нуклеозид представляет собой  $\beta$ -D-дезоксирибонуклеозид. В определенных вариантах осуществления каждый небициклический нуклеозид представляет собой 2'-МОЕ-нуклеозид.

В определенных вариантах осуществления более двух небициклических нуклеозидов представляют собой 2'-МОЕ-нуклеозиды. В определенных вариантах осуществления более двух небициклических нуклеозидов представляют собой 2'-МОЕ-нуклеозиды, и любой другой небициклический нуклеозид представляет собой  $\beta$ -D-дезоксирибонуклеозид.

В определенных вариантах осуществления 5'-концевой и 3'-концевой небициклические нуклеозиды представляют собой 2'-МОЕ-нуклеозиды и любой другой небициклический нуклеозид представляет собой  $\beta$ -D-дезоксирибонуклеозид.

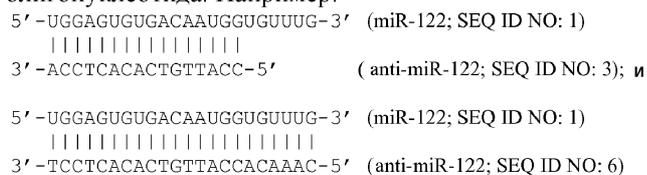
В определенных вариантах осуществления два небициклических нуклеозида представляют собой 2'-МОЕ-нуклеозиды и любой другой небициклический нуклеозид представляет собой  $\beta$ -D-дезоксирибонуклеозид.

В определенных вариантах осуществления любой нуклеозид R представляет собой 2'-МОЕ-нуклеозид.

В определенных вариантах осуществления X равняется 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.



олигонуклеотида комплементарна miR-122, так что положение 1 SEQ ID NO: 1 спарено с 3'-концевым нуклеотидным основанием олигонуклеотида. Например:



В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна межнуклеозидная связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь. В определенных вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь. В определенных вариантах осуществления модифицированная межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную межнуклеозидную связь.

В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один пиримидин модифицированного олигонуклеотида содержит 5-метильную группу. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один цитозин модифицированного олигонуклеотида представляет собой 5-метилцитозин. В определенных вариантах осуществления каждый цитозин модифицированного олигонуклеотида представляет собой 5-метилцитозин. В определенных вариантах осуществления каждый модифицированный нуклеотид, который содержит цитозин, содержит 5-метилцитозин. В определенных вариантах осуществления каждый 2'-О-метоксиэтилнуклеозид, который содержит цитозин, содержит 5-метилцитозин.

В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность модифицированного олигонуклеотида выбрана из SEQ ID NO: 3-6, где каждый Т независимо выбран из Т и U.

В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит 0, 1, 2 или 3 несовпадения по отношению к нуклеотидной последовательности miR-122. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит 0 несовпадений по отношению к нуклеотидной последовательности miR-122. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит 1 несовпадение по отношению к нуклеотидной последовательности miR-122. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит 2 несовпадения по отношению к нуклеотидной последовательности miR-122.

В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид состоит более чем из 22 связанных нуклеозидов и содержит по меньшей мере 8 связанных нуклеозидов нуклеозидного паттерна I. Нуклеозиды, присутствующие в дополнение к нуклеозидам, описанным нуклеозидным паттерном I, являются либо модифицированными, либо немодифицированными.

В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид состоит менее чем из 16 связанных нуклеозидов и содержит по меньшей мере 8 связанных нуклеозидов нуклеозидного паттерна I.

В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид имеет нуклеотидную последовательность и модификации, как показано в табл. 1. Нуклеозиды и нуклеотидные основания обозначаются следующим образом: верхний индекс "Me" обозначает 5-метилцитозин; нуклеозиды без последующего нижнего индекса представляют собой β-D-деоксирибонуклеозиды; нуклеозиды с последующим нижним индексом "E" представляют собой 2'-МОЕ-нуклеозиды; нуклеозиды с последующим нижним индексом "S" представляют собой S-cEt-нуклеозиды и каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную межнуклеозидную связь.

Таблица 1. Соединения anti-miR-122

№ соединения	Последовательность и модификации	SEQ ID NO
38649	A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> T <sub>E</sub> TGU <sub>S</sub> C <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> TC <sub>S</sub> C <sub>S</sub>	4
38012	C <sub>S</sub> CA <sub>S</sub> TTGU <sub>S</sub> C <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> TC <sub>S</sub> C <sub>S</sub> A	3
38016	<sup>Me</sup> C <sub>S</sub> CAT <sub>S</sub> TGT <sub>S</sub> <sup>Me</sup> C <sub>S</sub> A <sup>Me</sup> C <sub>S</sub> A <sup>Me</sup> C <sub>S</sub> T <sup>Me</sup> C <sub>S</sub> <sup>Me</sup> C <sub>S</sub> A <sub>E</sub>	3
38646	A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> CA <sub>S</sub> TTGU <sub>S</sub> C <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> TC <sub>S</sub> C <sub>S</sub>	4
38647	A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>S</sub> TTGU <sub>S</sub> C <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> TC <sub>S</sub> C <sub>S</sub>	4
38648	A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> TTGU <sub>S</sub> C <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> TC <sub>S</sub> C <sub>S</sub>	4
38652	<sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> A <sub>E</sub> A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> C <sub>S</sub> CA <sub>S</sub> TTGU <sub>S</sub> C <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> TC <sub>S</sub> C <sub>S</sub>	5
38659	C <sub>S</sub> CA <sub>S</sub> TTGU <sub>S</sub> C <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> TC <sub>S</sub> C <sub>S</sub> T <sub>E</sub>	10
38660	<sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> A <sub>S</sub> A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> C <sub>S</sub> CA <sub>S</sub> TTGU <sub>S</sub> C <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> TC <sub>S</sub> C <sub>S</sub> T <sub>E</sub>	6
38872	C <sub>S</sub> CAU <sub>S</sub> TGU <sub>S</sub> C <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> TC <sub>S</sub> C <sub>S</sub> A	3
38910	<sup>Me</sup> C <sub>E</sub> C <sub>S</sub> AU <sub>S</sub> TGU <sub>S</sub> C <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> TC <sub>S</sub> C <sub>S</sub> A <sub>E</sub>	3

В некоторых вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид имеет нуклеотидную последовательность и модификации, как показано ниже:

$U_5TGU_5C_5AC_5AC_5TC_5C_5A_5$  (SEQ ID NO: 8) или

$C_5A_5C_5A_5C_5U_5C_5C_5$  (SEQ ID NO: 9);

где нуклеозиды без последующего нижнего индекса представляют собой  $\beta$ -D-дезоксирибонуклеозиды; нуклеозиды с последующим нижним индексом "S" представляют собой S-cEt-нуклеозиды, и каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную межнуклеозидную связь. В некоторых таких вариантах осуществления соединение представляет собой 38591, 38633, 38998 или 38634.

### Соединения anti-miR-122, содержащие конъюгаты

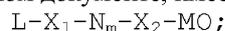
В определенных вариантах осуществления соединение, предусмотренное в данном документе, содержит модифицированный олигонуклеотид, конъюгированный с одним или несколькими фрагментами, которые повышают активность, клеточное распределение и/или клеточное поглощение олигонуклеотида. Например, увеличенное клеточное поглощение соединения может быть достигнуто с использованием конъюгатов, являющихся лигандами для рецепторов клеточной поверхности. Связывание лиганда, сопряженного с экзогенной молекулой (например, лекарственным средством), с его рецептором клеточной поверхности приводит к интернализации сопряженной молекулы, таким образом повышая трансмембранный транспорт экзогенной молекулы. Любой из модифицированных олигонуклеотидов anti-miR-122, представленных в данном документе, может связываться с одним или несколькими фрагментами с образованием соединения, содержащего конъюгированный модифицированный олигонуклеотид anti-miR-122.

В определенных вариантах осуществления соединение, представленное в данном документе, содержит сопряженный фрагмент, связанный с 5'-концом или 3'-концом модифицированного олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления соединение содержит сопряженный фрагмент, связанный с 3'-концом модифицированного олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления соединение содержит сопряженный фрагмент, связанный с 5'-концом модифицированного олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления соединения содержит первый сопряженный фрагмент, связанный с 3'-концом модифицированного олигонуклеотида, и второй сопряженный фрагмент, связанный с 5'-концом модифицированного олигонуклеотида.

В определенных вариантах осуществления сопряженный фрагмент содержит по меньшей мере один лиганд, выбранный из углевода, холестерина, липида, фосфолипида, антитела, липопротеина, гормона, пептида, витамина, стероида или катионного липида.

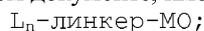
Лиганды могут ковалентно присоединяться к модифицированному олигонуклеотиду с помощью подходящего линкера. Различные линкеры известны из уровня техники, и конкретные неограничивающие иллюстративные линкеры описаны, например, в публикации PCT № WO 2013/033230 и патенте США № 8106022 B2. В некоторых вариантах осуществления может быть выбран линкер, который является устойчивым к ферментативному расщеплению *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления может быть выбран линкер, который является устойчивым к гидролитическому расщеплению *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления может быть выбран линкер, который будет подвергаться ферментативному расщеплению *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления может быть выбран линкер, который будет подвергаться гидролитическому расщеплению *in vivo*.

В определенных вариантах осуществления соединения, содержащего конъюгированный модифицированный олигонуклеотид, описанный в данном документе, имеет структуру



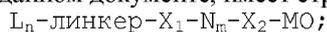
где каждый L представляет собой лиганд; каждый N независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеозид и m равняется от 1 до 5; каждый  $X_1$  и  $X_2$  независимо представляют собой фосфодиэфирную связь или фосфотиоатную связь, и MO представляет собой модифицированный олигонуклеотид. В определенных вариантах осуществления m равняется 1. В определенных вариантах осуществления m равняется 2. В определенных вариантах осуществления m равняется 2, 3, 4 или 5. В определенных вариантах осуществления m равняется 3, 4 или 5. В определенных вариантах осуществления, когда m равняется более 1, каждый модифицированный или немодифицированный нуклеозид  $N_m$  может быть связан с прилегающим модифицированным или немодифицированным нуклеозидом  $N_m$  с помощью фосфодиэфирной межнуклеозидной связи или фосфотиоатной межнуклеозидной связи. В определенных вариантах осуществления m равняется 1, и каждый  $X_1$  и  $X_2$  представляет собой фосфодиэфир.

В определенных вариантах осуществления соединения, содержащего конъюгированный модифицированный олигонуклеотид, описанный в данном документе, имеет структуру A



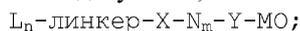
где каждый L независимо представляет собой лиганд, n равняется от 1 до 10 и MO представляет собой модифицированный олигонуклеотид.

В определенных вариантах осуществления соединения, содержащего конъюгированный модифицированный олигонуклеотид, описанный в данном документе, имеет структуру B



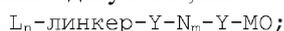
где каждый L независимо представляет собой лиганд и n равняется от 1 до 10; каждый N независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеозид и m равняется от 1 до 5; каждый X<sub>1</sub> и X<sub>2</sub> независимо представляет собой фосфодиэфирную связь или фосфотиоатную связь, и MO представляет собой модифицированный олигонуклеотид. В определенных вариантах осуществления m равняется 1. В определенных вариантах осуществления m равняется 2. В определенных вариантах осуществления m равняется 2, 3, 4 или 5. В определенных вариантах осуществления m равняется 3, 4 или 5. В определенных вариантах осуществления, когда m равняется более 1, каждый модифицированный или немодифицированный нуклеозид N<sub>m</sub> может быть связан с прилегающим модифицированным или немодифицированным нуклеозидом N<sub>m</sub> с помощью фосфодиэфирной межнуклеозидной связи или фосфотиоатной межнуклеозидной связи.

В определенных вариантах осуществления соединение, содержащее конъюгированный модифицированный олигонуклеотид, описанный в данном документе, имеет структуру C



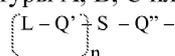
где каждый L независимо представляет собой лиганд, и n равняется от 1 до 10; каждый N независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеозид, и m равняется от 1 до 5; X представляет собой фосфодиэфирную связь или фосфотиоатная связь Y представляет собой фосфодиэфирную связь, и MO представляет собой модифицированный олигонуклеотид. В определенных вариантах осуществления m равняется 1. В определенных вариантах осуществления m равняется 2. В определенных вариантах осуществления m равняется 2, 3, 4 или 5. В определенных вариантах осуществления m равняется 3, 4 или 5. В определенных вариантах осуществления, когда m равняется более чем 1, каждый модифицированный или немодифицированный нуклеозид N<sub>m</sub> может быть связан с прилегающим модифицированным или немодифицированным нуклеозидом N<sub>m</sub> с помощью фосфодиэфирной межнуклеозидной связи или фосфотиоатной межнуклеозидной связи.

В определенных вариантах осуществления соединения, содержащее конъюгированный модифицированный олигонуклеотид, описанный в данном документе, имеет структуру D



где каждый L независимо представляет собой лиганд и n равняется от 1 до 10; каждый N независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеозид и m равняется от 1 до 5; каждый Y представляет собой фосфодиэфирную связь и MO представляет собой модифицированный олигонуклеотид. В определенных вариантах осуществления m равняется 1. В некоторых вариантах осуществления m равняется 2. В определенных вариантах осуществления m равняется 3, 4 или 5. В определенных вариантах осуществления m равняется 2, 3, 4 или 5. В определенных вариантах осуществления, когда m больше 1, каждый модифицированный или немодифицированный нуклеозид N<sub>m</sub> может быть связан с прилегающим модифицированным или немодифицированным нуклеозидом N<sub>m</sub> с помощью фосфодиэфирной межнуклеозидной связи или фосфотиоатной межнуклеозидной связи.

В определенных вариантах осуществления, когда n больше 1, линкер содержит остов, способный связывать более одного L с остальной частью соединения (т.е. с модифицированным олигонуклеотидом (MO), с X<sub>1</sub>-N<sub>m</sub>-X<sub>2</sub>-MO, с X-N<sub>m</sub>-Y-MO и т.д.). В некоторых таких вариантах осуществления L<sub>n</sub>-линкерная часть соединения (такого как соединение структуры A, B, C или D) содержит структуру E

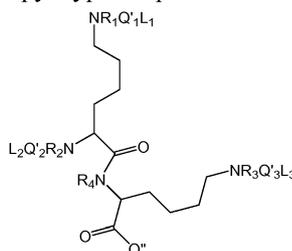


где каждый L независимо представляет собой лиганд; n равняется от 1 до 10; S представляет собой остов и Q' и Q'' независимо представляют собой связующие группы.

В определенных вариантах осуществления каждая Q' и Q'' независимо выбрана из пептида, эфира, пропиленгликоля, алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкила, замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-алкенила, замещенного C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-алкенила, C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-алкинила, замещенного C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-алкинила, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкокси, замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкокси, amino, амидо, пирролидина, 8-амино-3,6-диоксооктановой кислоты (ADO), сукцинимидил-4-(N-малеидометил)-циклогексан-1-карбоксилата и 6-аминогексановой кислоты.

В определенных вариантах осуществления остов связывает 2, 3, 4 или 5 лигандов с модифицированным олигонуклеотидом. В определенных вариантах осуществления остов связывает 3 лиганда с модифицированным олигонуклеотидом.

Неограничивающая иллюстративная структура E представляет собой структуру E(i)

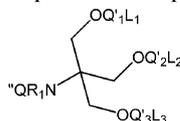


где каждый L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> и L<sub>3</sub> независимо представляет собой лиганд; каждый Q'<sub>1</sub>, Q'<sub>2</sub>, Q'<sub>3</sub> и Q'' независимо представляет собой связующую группу и каждый R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> независимо выбран из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкила и

замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкила.

В некоторых вариантах осуществления каждая Q<sup>1</sup>, Q<sup>2</sup>, Q<sup>3</sup> и Q<sup>"</sup> независимо выбрана из пептида, эфира, пропиленгликоля, алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкила, замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-алкенила, замещенного C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-алкенила, C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-алкинила, замещенного C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-алкинила, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкокси, замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкокси, amino, амидо, пирролидина, 8-амино-3,6-диоксаоктановой кислоты (ADO), сукцинимидил-4-(N-малеидометил)циклогексан-1-карбоксилата и 6-аминогексановой кислоты. В некоторых вариантах осуществления каждый R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> независимо выбран из H, метила, этила, пропила, изопропила и бутила. В некоторых вариантах осуществления каждый R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> выбран из H и метила.

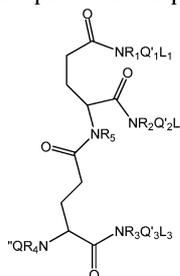
Дополнительной неограничивающей иллюстративной структурой E является структура E(ii)



где каждый L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> и L<sub>3</sub> независимо представляет собой лиганд; каждый Q<sup>1</sup>, Q<sup>2</sup>, Q<sup>3</sup> и Q<sup>"</sup> независимо представляет собой связующую группу и R<sub>1</sub> выбран из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкила и замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкила.

В некоторых вариантах осуществления каждая Q<sup>1</sup>, Q<sup>2</sup>, Q<sup>3</sup> и Q<sup>"</sup> независимо выбрана из пептида, эфира, пропиленгликоля, алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкила, замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-алкенила, замещенного C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-алкенила, C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-алкинила, замещенного C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-алкинила, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкокси, замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкокси, amino, амидо, пирролидина, 8-амино-3,6-диоксаоктановой кислоты (ADO), сукцинимидил-4-(N-малеидометил)циклогексан-1-карбоксилата и 6-аминогексановой кислоты. В некоторых вариантах осуществления R<sub>1</sub> выбран из H, метила, этила, пропила, изопропила и бутила. В некоторых вариантах осуществления R<sub>1</sub> представляет собой H или метил.

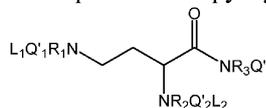
Дополнительной неограничивающей иллюстративной структурой E является структура E(iii)



где каждый L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> и L<sub>3</sub> независимо представляет собой лиганд; каждая Q<sup>1</sup>, Q<sup>2</sup>, Q<sup>3</sup> и Q<sup>"</sup> независимо представляет собой связующую группу и каждый R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> и R<sub>5</sub> независимо выбран из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкила и замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкила.

В некоторых вариантах осуществления каждая Q<sup>1</sup>, Q<sup>2</sup>, Q<sup>3</sup> и Q<sup>"</sup> независимо выбрана из пептида, эфира, пропиленгликоля, алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкила, замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-алкенила, замещенного C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-алкенила, C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-алкинила, замещенного C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-алкинила, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкокси, замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкокси, amino, амидо, пирролидина, 8-амино-3,6-диоксаоктановой кислоты (ADO), сукцинимидил-4-(N-малеидометил)циклогексан-1-карбоксилата и 6-аминогексановой кислоты. В некоторых вариантах осуществления каждый R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> и R<sub>5</sub> независимо выбраны из H, метила, этила, пропила, изопропила и бутила. В некоторых вариантах осуществления каждый R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> и R<sub>5</sub> выбран из H и метила.

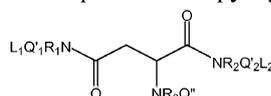
Дополнительной неограничивающей иллюстративной структурой E является структура E(iv)



где каждый L<sub>1</sub> и L<sub>2</sub> независимо представляет собой лиганд; каждая Q<sup>1</sup>, Q<sup>2</sup> и Q<sup>"</sup> независимо представляет собой связующую группу и каждый R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> и R<sub>3</sub> независимо выбран из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкила и замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкила.

В некоторых вариантах осуществления каждая Q<sup>1</sup>, Q<sup>2</sup> и Q<sup>"</sup> независимо выбрана из пептида, эфира, пропиленгликоля, алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкила, замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-алкенила, замещенного C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-алкенила, C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-алкинила, замещенного C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-алкинила, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкокси, замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкокси, amino, амидо, пирролидина, 8-амино-3,6-диоксаоктановой кислоты (ADO), сукцинимидил-4-(N-малеидометил)циклогексан-1-карбоксилата и 6-аминогексановой кислоты. В некоторых вариантах осуществления каждый R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> и R<sub>3</sub> независимо выбран из H, метила, этила, пропила, изопропила и бутила. В некоторых вариантах осуществления каждый R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> и R<sub>3</sub> выбран из H и метила.

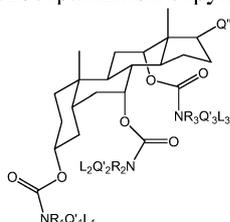
Дополнительной неограничивающей иллюстративной структурой E является структура E(v)



где каждый  $L_1$  и  $L_2$  независимо представляет собой лиганд; каждая  $Q'_1$ ,  $Q'_2$  и  $Q''$  независимо представляет собой связующую группу и каждый  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$  независимо выбран из H,  $C_1$ - $C_6$ -алкила и замещенного  $C_1$ - $C_6$ -алкила.

В некоторых вариантах осуществления каждая  $Q'_1$ ,  $Q'_2$  и  $Q''$  независимо выбрана из пептида, эфира, пропиленгликоля, алкила,  $C_1$ - $C_{20}$ -алкила, замещенного  $C_1$ - $C_{20}$ -алкила,  $C_2$ - $C_{20}$ -алкенила, замещенного  $C_2$ - $C_{20}$ -алкенила,  $C_2$ - $C_{20}$ -алкинила, замещенного  $C_2$ - $C_{20}$ -алкинила,  $C_1$ - $C_{20}$ -алкокси, замещенного  $C_1$ - $C_{20}$ -алкокси, amino, амидо, пирролидина, 8-амино-3,6-диоксаоктановой кислоты (ADO), сукцинимидил-4-(N-малеидометил)-циклогексан-1-карбоксилата и 6-аминогексановой кислоты. В некоторых вариантах осуществления каждый  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$  независимо выбран из H, метила, этила, пропила, изопропила и бутила. В некоторых вариантах осуществления каждый  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$  выбран из H и метила.

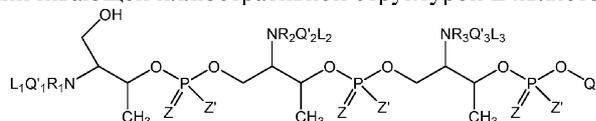
Дополнительной неограничивающей иллюстративной структурой E является структура E(vi)



где каждый  $L_1$ ,  $L_2$  и  $L_3$  независимо представляет собой лиганд; каждая  $Q'_1$ ,  $Q'_2$ ,  $Q'_3$  и  $Q''$  независимо представляет собой связующую группу и каждый  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$  независимо выбран из H,  $C_1$ - $C_6$ -алкила и замещенного  $C_1$ - $C_6$ -алкила.

В некоторых вариантах осуществления каждая  $Q'_1$ ,  $Q'_2$ ,  $Q'_3$  и  $Q''$  независимо выбрана из пептида, эфира, пропиленгликоля, алкила,  $C_1$ - $C_{20}$ -алкила, замещенного  $C_1$ - $C_{20}$ -алкила,  $C_2$ - $C_{20}$ -алкенила, замещенного  $C_2$ - $C_{20}$ -алкенила,  $C_2$ - $C_{20}$ -алкинила, замещенного  $C_2$ - $C_{20}$ -алкинила,  $C_1$ - $C_{20}$ -алкокси, замещенного  $C_1$ - $C_{20}$ -алкокси, amino, амидо, пирролидина, 8-амино-3,6-диоксаоктановой кислоты (ADO), сукцинимидил-4-(N-малеидометил)циклогексан-1-карбоксилата и 6-аминогексановой кислоты. В некоторых вариантах осуществления каждый  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$  независимо выбран из H, метила, этила, пропила, изопропила и бутила. В некоторых вариантах осуществления каждый  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$  выбран из H и метила.

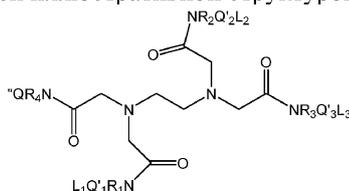
Дополнительной неограничивающей иллюстративной структурой E является структура E(vii)



где каждый  $L_1$ ,  $L_2$  и  $L_3$  независимо представляет собой лиганд; каждая  $Q'_1$ ,  $Q'_2$ ,  $Q'_3$  и  $Q''$  независимо представляет собой связующую группу; каждый  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$  независимо выбран из H,  $C_1$ - $C_6$ -алкила и замещенного  $C_1$ - $C_6$ -алкила и каждый  $Z$  и  $Z'$  независимо выбраны из O и S.

В некоторых вариантах осуществления каждая  $Q'_1$ ,  $Q'_2$ ,  $Q'_3$  и  $Q''$  независимо выбрана из пептида, эфира, пропиленгликоля, алкила,  $C_1$ - $C_{20}$ -алкила, замещенного  $C_1$ - $C_{20}$ -алкила,  $C_2$ - $C_{20}$ -алкенила, замещенного  $C_2$ - $C_{20}$ -алкенила,  $C_2$ - $C_{20}$ -алкинила, замещенного  $C_2$ - $C_{20}$ -алкинила,  $C_1$ - $C_{20}$ -алкокси, замещенного  $C_1$ - $C_{20}$ -алкокси, amino, амидо, пирролидина, 8-амино-3,6-диоксаоктановой кислоты (ADO), сукцинимидил-4-(N-малеидометил)циклогексан-1-карбоксилата и 6-аминогексановой кислоты. В некоторых вариантах осуществления каждый  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$  независимо выбран из H, метила, этила, пропила, изопропила и бутила. В некоторых вариантах осуществления каждый  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$  выбран из H и метила. В некоторых вариантах осуществления  $Z$  или  $Z'$  по меньшей мере на одном атоме P представляет собой S, а другой  $Z$  или  $Z'$  представляет собой O (т.е. фосфотиоатная связь). В некоторых вариантах осуществления каждый -OP(Z)(Z')O- представляет собой фосфотиоатную связь. В некоторых вариантах осуществления и  $Z$ , и  $Z'$  представляют собой O на по меньшей мере одном атоме P (т.е. фосфодиэфирная связь). В некоторых вариантах осуществления каждый -OP(Z)(Z')O- представляет собой фосфодиэфирную связь.

Дополнительной неограничивающей иллюстративной структурой E является структура E(viii)



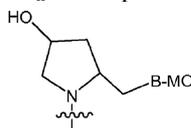
где каждый  $L_1$ ,  $L_2$  и  $L_3$  независимо представляет собой лиганд; каждый  $Q'_1$ ,  $Q'_2$ ,  $Q'_3$  и  $Q''$  независимо представляет собой связующую группу и каждый  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  и  $R_4$  независимо выбран из H,  $C_1$ - $C_6$ -алкила и замещенного  $C_1$ - $C_6$ -алкила.

В некоторых вариантах осуществления каждая  $Q'_1$ ,  $Q'_2$ ,  $Q'_3$  и  $Q''$  независимо выбрана из пептида, эфира, пропиленгликоля, алкила,  $C_1$ - $C_{20}$ -алкила, замещенного  $C_1$ - $C_{20}$ -алкила,  $C_2$ - $C_{20}$ -алкенила, замещенного  $C_2$ - $C_{20}$ -алкенила,  $C_2$ - $C_{20}$ -алкинила, замещенного  $C_2$ - $C_{20}$ -алкинила,  $C_1$ - $C_{20}$ -алкокси, замещенного  $C_1$ -

C<sub>20</sub>-алкокси, amino, амидо, пирролидина, 8-амино-3,6-диоксооктановой кислоты (ADO), сукцинимидил-4-(N-малеидометил)циклогексан-1-карбоксилата и 6-аминогексановой кислоты. В некоторых вариантах осуществления каждый R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> независимо выбран из H, метила, этила, пропила, изопропила и бутила. В некоторых вариантах осуществления каждый R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> выбран из H и метила.

Неограничивающие иллюстративные остовы и/или линкеры, содержащие остовы, и их синтез описаны, например, в публикации РСТ № WO 2013/033230, патенте США № 8106022 B2, публикации США № 2012/0157509 A1; патенте США № 5994517; патенте США № 7491805 B2; патенте США № 8313772 B2; Manoharan, M., Chapter 16, Antisense Drug Technology, Crooke, S.T., Marcel Dekker, Inc., 2001, 391-469.

В определенных вариантах осуществления L<sub>n</sub>-линкерная часть соединения содержит структуру F



где

B выбран из -O-, -S-, -N(R<sup>N</sup>)-, -Z-P(Z')(Z'')O-, -Z-P(Z')(Z'')O-N<sub>m</sub>-X- и -Z-P(Z')(Z'')O-N<sub>m</sub>-Y-;

МО представляет собой модифицированный олигонуклеотид;

R<sup>N</sup> выбран из H, метила, этила, пропила, изопропила, бутила и бензила;

каждый Z, Z', и Z'' независимо выбран из O и S;

каждый N независимо выбран из модифицированного или немодифицированного нуклеозида;

m равняется от 1 до 5;

X выбран из фосфодиэфирной связи и фосфотиоатной связи;

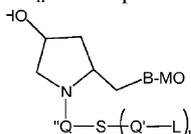
Y представляет собой фосфодиэфирную связь и

волнистая линия обозначает связь с остальной частью линкера и лигандом(ами).

В определенных вариантах осуществления волнистая линия обозначает связь со структурой E, представленной выше.

В определенных вариантах осуществления n равняется от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3 или от 1 до 2. В определенных вариантах осуществления n равняется 1. В определенных вариантах осуществления n равняется 2. В определенных вариантах осуществления n равняется 3. В определенных вариантах осуществления n равняется 4. В определенных вариантах осуществления n равняется 5.

В определенных вариантах осуществления L<sub>n</sub>-линкерная часть соединения содержит структуру G



где

B выбран из -O-, -S-, -N(R<sup>N</sup>)-, -Z-P(Z')(Z'')O-, -Z-P(Z')(Z'')O-N<sub>m</sub>-X- и -Z-P(Z')(Z'')O-N<sub>m</sub>-Y-;

МО представляет собой модифицированный олигонуклеотид;

R<sup>N</sup> выбран из H, метила, этила, пропила, изопропила, бутила и бензила;

каждый Z, Z', и Z'' независимо выбран из O и S;

каждый N независимо выбран из модифицированного или немодифицированного нуклеозида;

m равняется от 1 до 5;

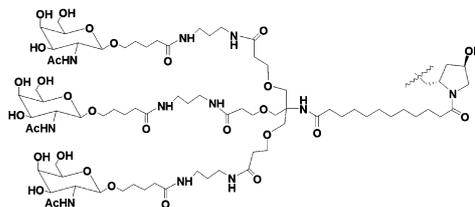
X выбран из фосфодиэфирной связи и фосфотиоатной связи;

Y представляет собой фосфодиэфирную связь;

каждый L независимо представляет собой лиганд; n равняется от 1 до 10; S представляет собой остов и Q' и Q'' независимо представляют собой связующие группы.

В определенных вариантах осуществления каждая Q' и Q'' независимо выбраны из пептида, эфира, пропиленгликоля, алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкила, замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-алкенила, замещенного C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-алкенила, C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-алкинила, замещенного C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-алкинила, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкокси, замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкокси, amino, амидо, пирролидина, 8-амино-3,6-диоксооктановой кислоты (ADO), сукцинимидил-4-(N-малеидометил)циклогексан-1-карбоксилата и 6-аминогексановой кислоты.

Неограничивающая иллюстративная L<sub>n</sub>-линкерная часть (например, структуры F или G) соединения представлена структурой H ниже



где волнистая линия обозначает присоединение к модифицированному олигонуклеотиду (МО), к X<sub>1</sub>, например, в структуре B, или к X или Y, например, в структуре C или D.

В определенных вариантах осуществления каждый лиганд представляет собой углевод. Соединение, содержащее углевод-конъюгированный модифицированный олигонуклеотид, при распознавании лектином клеточной поверхности транспортируется через клеточную мембрану в клетку. В определенных вариантах осуществления лектин клеточной поверхности представляет собой лектин С-типа. В определенных вариантах осуществления лектин С-типа присутствует на клетке Купфера. В определенных вариантах осуществления лектин С-типа присутствует на макрофаге. В определенных вариантах осуществления лектин С-типа присутствует на эндотелиальной клетке. В определенных вариантах осуществления лектин С-типа присутствует на моноците. В определенных вариантах осуществления лектин С-типа присутствует на лейкоците. В определенных вариантах осуществления лектин С-типа присутствует на дендритной клетке. В определенных вариантах осуществления лектин С-типа присутствует на В-клетке. Конъюгат может облегчать поглощение соединения anti-miR-122 любым типом клеток, экспрессирующим лектин С-типа.

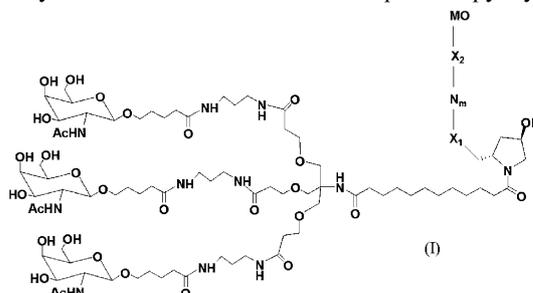
В определенных вариантах осуществления лектин С-типа представляет собой асиалогликопротеиновый рецептор (ASGPR). В определенных вариантах осуществления конъюгат содержит один или несколько лигандов, обладающих аффинностью к ASGPR, включая без ограничения галактозу или производное галактозы. В определенных вариантах осуществления лиганд, обладающий аффинностью к ASGPR, представляет собой N-ацетилгалактозамин, галактозу, галактозамин, N-формилгалактозамин, N-пропионил-галактозамин, N-n-бутаноилгалактозамин или N-изо-бутаноил-галактозамин. Такие конъюгаты облегчают поглощение соединения клетками, которые экспрессируют ASGPR, например, гепатоцитами и дендритными клетками.

В определенных вариантах осуществления лиганд представляет собой углевод, выбранный из маннозы, глюкозы, галактозы, рибозы, арабинозы, фруктозы, фукозы, ксилозы, D-маннозы, L-маннозы, D-галактозы, L-галактозы, D-глюкозы, L-глюкозы, D-рибозы, L-рибозы, D-арабинозы, L-арабинозы, D-фруктозы, L-фруктозы, D-фукозы, L-фукозы, D-ксилозы, L-ксилозы, альфа-D-маннофуранозы, бета-D-маннофуранозы, альфа-D-маннопиранозы, бета-D-маннопиранозы, альфа-D-глюкофуранозы, бета-D-глюкофуранозы, альфа-D-глюкопиранозы, бета-D-глюкопиранозы, альфа-D-галактофуранозы, бета-D-галактофуранозы, альфа-D-галактопиранозы, бета-D-галактопиранозы, альфа-D-рибофуранозы, бета-D-рибофуранозы, альфа-D-рибопиранозы, бета-D-рибопиранозы, альфа-D-фруктофуранозы, альфа-D-фруктопиранозы, глюкозамина, галактозамина, сиаловой кислоты и N-ацетилгалактозамина.

В определенных вариантах осуществления лиганд выбран из N-ацетилгалактозамина, галактозы, галактозамина, N-формилгалактозамина, N-пропионилгалактозамина, N-n-бутаноилгалактозамина и N-изобутаноилгалактозамина.

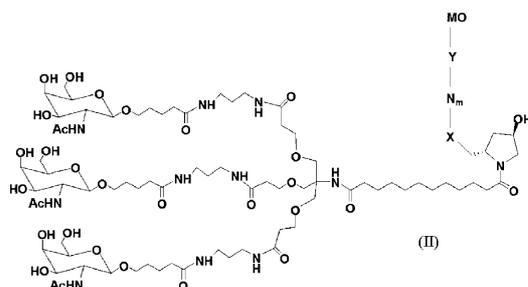
В определенных вариантах осуществления лиганд представляет собой N-ацетилгалактозамин.

В определенных вариантах осуществления соединение содержит структуру



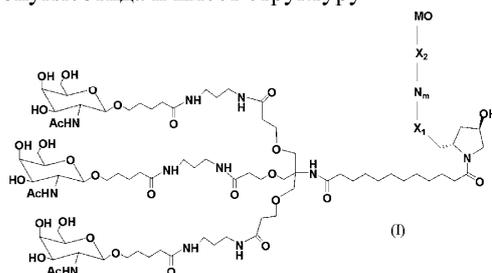
где каждый N независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеозид и  $m$  равняется от 1 до 5; каждый  $X_1$  и  $X_2$  независимо представляет собой фосфодиэфирную связь или фосфотиоатную связь и MO представляет собой модифицированный олигонуклеотид. В определенных вариантах осуществления  $m$  равняется 1. В определенных вариантах осуществления  $m$  равняется 2. В определенных вариантах осуществления  $m$  равняется 3, 4 или 5. В определенных вариантах осуществления, когда  $m$  больше 1, каждый модифицированный или немодифицированный нуклеозид  $N_m$  может быть связан с прилегающим модифицированным или немодифицированным нуклеозидом  $N_m$  с помощью фосфодиэфирной межнуклеозидной связи или фосфотиоатной межнуклеозидной связи.

В определенных вариантах осуществления соединение содержит структуру



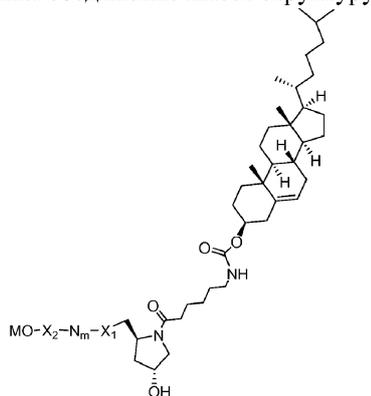
где X представляет собой фосфодиэфирную связь или фосфотиоатную связь; каждый N независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеозид и  $m$  равняется от 1 до 5; Y представляет собой фосфодиэфирную связь и MO представляет собой модифицированный олигонуклеотид. В определенных вариантах осуществления  $m$  равняется 1. В определенных вариантах осуществления  $m$  равняется 2. В определенных вариантах осуществления  $m$  равняется 2, 3, 4 или 5. В определенных вариантах осуществления  $m$  равняется 3, 4 или 5. В определенных вариантах осуществления, когда  $m$  больше 1, каждый модифицированный или немодифицированный нуклеозид  $N_m$  может быть связан с прилегающим модифицированным или немодифицированным нуклеозидом  $N_m$  с помощью фосфодиэфирной межнуклеозидной связи или фосфотиоатной межнуклеозидной связи.

В определенных вариантах осуществления соединение содержит модифицированный нуклеотид и сопряженный фрагмент, где модифицированный олигонуклеотид имеет структуру  $C_L C_A L T T G_L T_L C A - C_L A C_L T C_L C_L$  (SEQ ID NO: 7), где нижний индекс "L" обозначает LNA и нуклеозиды без последующего нижнего индекса представляют собой  $\beta$ -D-дезоксирибонуклеозиды и каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную межнуклеозидную связь, и где сопряженный фрагмент связан с 3'-концом модифицированного олигонуклеотида и имеет структуру



где каждый N независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеозид и  $m$  равняется от 1 до 5; каждый  $X_1$  и  $X_2$  независимо представляют собой фосфодиэфирную связь или фосфотиоатную связь, и MO представляет собой модифицированный олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления все  $C_L$ -нуклеозиды представляют собой  $^{Me}C_L$ -нуклеозиды, где верхний индекс "Me" обозначает 5-метилцитозин.

В некоторых вариантах осуществления соединение имеет структуру



где каждый N независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеозид, и  $m$  равняется от 1 до 5; каждый  $X_1$  и  $X_2$  независимо представляет собой фосфодиэфирную связь или фосфотиоатную связь и MO представляет собой модифицированный олигонуклеотид.

В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один из  $X_1$  и  $X_2$  представляет собой фосфодиэфирную связь. В определенных вариантах осуществления каждый из  $X_1$  и  $X_2$  представляет собой фосфодиэфирную связь.

В определенных вариантах осуществления  $m$  равняется 1. В определенных вариантах осуществления  $m$  равняется 2. В определенных вариантах осуществления  $m$  равняется 3, 4 или 5. В определенных вариантах осуществления  $m$  равняется 2, 3, 4 или 5. В определенных вариантах осуществления, когда  $m$

больше 1, любой модифицированный или немодифицированный нуклеозид  $N_m$  может быть связан с прилегающим модифицированным или немодифицированным нуклеозидом  $N_m$  с помощью фосфодиэфирной межнуклеозидной связи или фосфотиоатной межнуклеозидной связи.

В любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе,  $N_m$  может представлять собой  $N^r p N''$ , где каждый  $N^r p N''$ , где каждый  $N^r$  независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеозид и  $r$  равняется от 0 до 4; и  $N''$  представляет собой нуклеозид, содержащий немодифицированный сахарный фрагмент.

В определенных вариантах осуществления  $r$  равняется 0. В определенных вариантах осуществления  $r$  равняется 1, 2, 3 или 4. В определенных вариантах осуществления, когда  $r$  равняется 1, 2, 3 или 4, каждый  $N^r$  содержит немодифицированный сахарный фрагмент.

В определенных вариантах осуществления немодифицированный сахарный фрагмент представляет собой  $\beta$ -D-рибозу или  $\beta$ -D-дезоксирибозу.

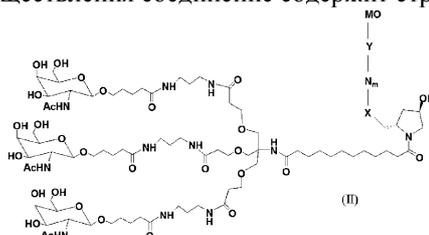
В определенных вариантах осуществления, где  $r$  равняется 1, 2, 3 или 4,  $N^r$  содержит пуриновое нуклеотидное основание. В определенных вариантах осуществления  $N''$  содержит пуриновое нуклеотидное основание. В определенных вариантах осуществления пуриновое нуклеотидное основание выбрано из аденина, гуанина, гипоксантина, ксантина и 7-метилгуанина. В определенных вариантах осуществления  $N^r$  представляет собой  $\beta$ -D-дезоксирибоаденозин или  $\beta$ -D-дезоксирибогуанозин. В определенных вариантах осуществления  $N''$  представляет собой  $\beta$ -D-дезоксирибоаденозин или  $\beta$ -D-дезоксирибогуанозин.

В определенных вариантах осуществления  $r$  равняется 1, каждый  $N^r$  и  $N''$  представляет собой  $\beta$ -D-дезоксирибоаденозин, и  $N^r$  и  $N''$  связаны с помощью фосфодиэфирной межнуклеозидной связи. В определенных вариантах осуществления  $r$  равняется 1, каждый  $N^r$  и  $N''$  представляет собой  $\beta$ -D-дезоксирибоаденозин, и  $N^r$  и  $N''$  связаны с помощью фосфодиэфирной межнуклеозидной связи. В определенных вариантах осуществления  $r$  равняется 1, каждый  $N^r$  и  $N''$  представляет собой  $\beta$ -D-дезоксирибоаденозин, и  $N^r$  и  $N''$  связаны с помощью фосфотиоатной межнуклеозидной связи.

В определенных вариантах осуществления, где  $r$  равняется 1, 2, 3 или 4,  $N^r$  содержит пиримидиновое нуклеотидное основание. В определенных вариантах осуществления  $N''$  содержит пиримидиновое нуклеотидное основание. В определенных вариантах осуществления пиримидиновое нуклеотидное основание выбрано из цитозина, 5-метилцитозина, тимина, урацила и 5,6-дигидроурацила.

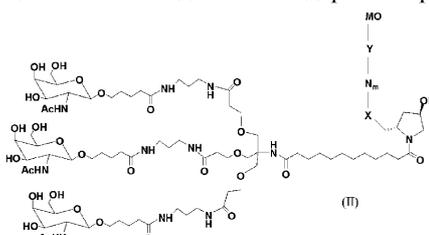
В определенных вариантах осуществления сахарный фрагмент каждого  $N$  независимо выбран из  $\beta$ -D-рибозы,  $\beta$ -D-дезоксирибозы, 2'-O-метокси-сахара, 2'-O-метилового сахара, 2'-фторсахара и бициклического сахарного фрагмента. В определенных вариантах осуществления каждый бициклический сахарный фрагмент независимо выбран из сEt-сахарного фрагмента, LNA-сахарного фрагмента и ENA-сахарного фрагмента. В определенных вариантах осуществления сEt-сахарный фрагмент представляет собой S-сEt-сахарный фрагмент. В определенных вариантах осуществления сEt-сахарный фрагмент представляет собой R-сEt-сахарный фрагмент.

В определенных вариантах осуществления соединение содержит структуру



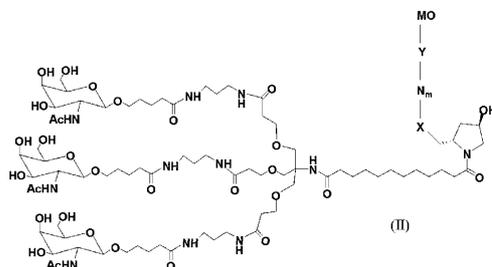
где  $X$  представляет собой фосфодиэфирную связь;  $m$  равняется 1;  $N$  представляет собой  $\beta$ -D-дезоксирибоаденозин;  $Y$  представляет собой фосфодиэфирную связь и  $MO$  представляет собой модифицированный олигонуклеотид.

В определенных вариантах осуществления соединение содержит структуру



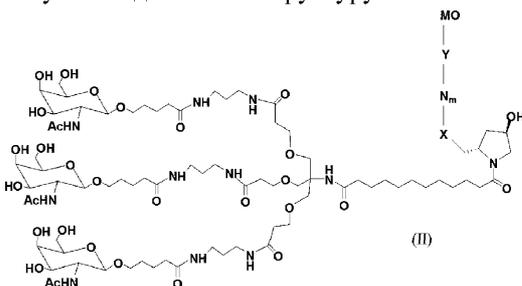
где  $X$  представляет собой фосфодиэфирную связь;  $m$  равняется 2; каждый  $N$  представляет собой  $\beta$ -D-дезоксирибоаденозин; нуклеозиды  $N$  связаны с помощью фосфодиэфирной межнуклеозидной связи;  $Y$  представляет собой фосфодиэфирную связь и  $MO$  представляет собой модифицированный олигонуклеотид.

В определенных вариантах осуществления соединение содержит модифицированный нуклеотид и сопряженный фрагмент, где модифицированный олигонуклеотид имеет структуру  $A_E^{Me}C_EC_E^{Me}C_E^{Me}C_EA_ET_E TGU_3C_5AC_5AC_5TC_5C_5$  (SEQ ID NO: 4), где нуклеозиды без последующего нижнего индекса представляют собой  $\beta$ -D-дезоксирибонуклеозиды, нуклеозиды с последующим нижним индексом "E" представляют собой 2'-МОЕ-нуклеозиды, нуклеозиды с последующим нижним индексом "S" представляют собой S-cEt-нуклеозиды, и каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную межнуклеозидную связь и где сопряженный фрагмент связан с 3'-концом модифицированного олигонуклеотида и имеет структуру:



где X представляет собой фосфодиэфирную связь; m равняется 1; N представляет собой  $\beta$ -D-дезоксирибоаденозин; Y представляет собой фосфодиэфирную связь и MO представляет собой модифицированный олигонуклеотид.

В определенных вариантах осуществления соединение содержит модифицированный нуклеотид и сопряженный фрагмент, где модифицированный олигонуклеотид имеет структуру  $C_LCA_LTTG_LT_LCA-C_LAC_LTC_LC_L$  (SEQ ID NO: 7), где нижний индекс "L" обозначает LNA и нуклеозиды без последующего нижнего индекса представляют собой  $\beta$ -D-дезоксирибонуклеозиды, и каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную межнуклеозидную связь, и где сопряженный фрагмент связан с 3'-концом модифицированного олигонуклеотида и имеет структуру:



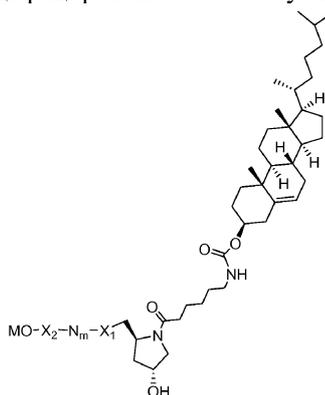
где X представляет собой фосфодиэфирную связь; m равняется 1; N представляет собой  $\beta$ -D-дезоксирибоаденозин; Y представляет собой фосфодиэфирную связь и MO представляет собой модифицированный олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления все  $C_L$ -нуклеозиды представляют собой  $^{Me}C_L$ -нуклеозиды, где верхний индекс "Me" обозначает 5-метилцитозин.

В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид имеет нуклеотидную последовательность и модификации, как показано в табл. 2. Нуклеозиды и нуклеотидные основания обозначаются следующим образом: верхний индекс "Me" обозначает 5-метилцитозин; нуклеозиды без последующего нижнего индекса представляют собой  $\beta$ -D-дезоксирибонуклеозиды; нуклеозиды с последующим нижним индексом "E" представляют собой 2'-МОЕ-нуклеозиды; нуклеозиды с последующим нижним индексом "S" представляют собой S-cEt-нуклеозиды и каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную межнуклеозидную связь.

Таблица 2. Конъюгированные модифицированные олигонуклеотиды

№ соед.	Последовательность (5'-3') и модификации																Связь со структурой GalNAc	SEQ ID NO		
	A <sub>E</sub>	MeC <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	MeC <sub>E</sub>	MeC <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	T <sub>E</sub>	T	G	U <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	T			C <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>
38368																			Структура III на фигуре 3С, где X представляет собой фосфодиэфирную связь, и МО представляет собой соединение 38649	4
38371																			Структура III на фигуре 3С, где X представляет собой фосфотиоатную связь, и МО представляет собой соединение 38649	4
38458																			Структура I на фигуре 3С, где X <sub>2</sub> представляет собой фосфотиоатную связь, m равняется 1, N <sub>m</sub> представляет собой β-D-дезоксинуклеозид (dA), X <sub>1</sub> представляет собой фосфотиоатную связь, и МО представляет собой соединение 38649	4
38459																			Структура I на фигуре 3С, где X <sub>2</sub> представляет собой фосфодиэфирную связь, m равняется 1, N <sub>m</sub> представляет собой β-D-дезоксинуклеозид (dA), X <sub>1</sub> представляет собой фосфотиоатную связь, и МО представляет собой соединение 38649	4
38597																			Структура I на фигуре 3С, где X <sub>1</sub> представляет собой фосфотиоатную связь, m равняется 1, N <sub>m</sub> представляет собой 2'-O-метоксинитилнуклеозид, X <sub>1</sub> представляет собой фосфотиоатную связь, и МО представляет собой соединение 38649	4
38598																			Структура I на фигуре 3С, где X <sub>2</sub> представляет собой фосфотиоатную связь, m равняется 1, N <sub>m</sub> представляет собой X <sub>1</sub> , представляет собой фосфотиоатную связь, и МО представляет собой соединение 38649	4

В определенных вариантах осуществления соединение, представленное в данном документе, содержит модифицированный нуклеотид и сопряженный фрагмент, где модифицированный олигонуклеотид имеет структуру C<sub>S</sub>A<sub>S</sub>C<sub>S</sub>A<sub>S</sub>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub>C<sub>S</sub>C<sub>S</sub> (SEQ ID NO: 9), где нижний индекс "S" обозначает S-cEt и нуклеозиды без последующего нижнего индекса представляют собой β-D-дезоксирибонуклеозиды, и каждый межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную межнуклеозидную связь, и где сопряженный фрагмент связан с 3'-концом модифицированного олигонуклеотида и имеет структуру



где X<sub>1</sub> и X<sub>2</sub> представляют собой фосфодиэфирные связи; m равняется 1; N представляет собой β-D-дезоксирибоаденозин и МО представляет собой модифицированный олигонуклеотид.

Дополнительные фрагменты для конъюгирования с модифицированным олигонуклеотидом включают феназин, фенантридин, антрахинон, акридин, флюоресцины, родамины, кумарины и красители. В определенных вариантах осуществления группа конъюгата присоединена непосредственно к модифицированному олигонуклеотиду.

#### Конкретные продукты метаболизма

Под воздействием экзонуклеаз и/или эндонуклеаз *in vitro* или *in vivo* соединения могут подвергаться расщеплению в различных положениях по всему соединению. Продукты такого расщепления могут сохранять некоторую степень активности исходного соединения и как таковые считаются активными метаболитами. Продукт метаболизма соединения как таковой можно применять в способах, описанных в данном документе. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид (неконъюгированный или конъюгированный) подвергается расщеплению на 5'-конце и/или 3'-конце, приводя к образованию продукта метаболизма, имеющего на 1, 2 или 3 нуклеотида меньше на 5'-конце и/или 3'-конце по сравнению с исходным модифицированным олигонуклеотидом. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид подвергается расщеплению на 5'-конце, высвобождая 5'-концевой нуклеотид и приводя к образованию продукта метаболизма, имеющего на 5'-конце нуклеотидов на 1 меньше по сравнению с исходным модифицированным олигонуклеотидом. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид подвергается расщеплению на 5'-конце, высвобождая 25'-концевых нуклеозидов и приводя к образованию продукта метаболизма, имеющего на 5'-конце на 2 нуклеотида меньше по сравнению с исходным модифицированным олигонуклеотидом. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид подвергается рас-

щеплению на 3'-конце, высвобождая 3'-концевой нуклеотид и приводя к образованию продукта метаболизма, который имеет на 3'-конце нуклеотидов на одну единицу меньше по сравнению с исходным модифицированным олигонуклеотидом. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид подвергается расщеплению на 3'-конце, высвобождая два 3'-концевых нуклеозидов и приводя к образованию продукта метаболизма, имеющего на 3'-конце на два нуклеотида меньше по сравнению с исходным модифицированным олигонуклеотидом.

Соединения, содержащие модифицированный олигонуклеотид, связанный с сопряженным фрагментом, может также подвергаться расщеплению в сайте в пределах линкера между модифицированным олигонуклеотидом и лигандом. В определенных вариантах осуществления расщепление приводит к образованию исходного модифицированного олигонуклеотида, содержащего часть сопряженного фрагмента. В определенных вариантах осуществления расщепление приводит к образованию исходного модифицированного олигонуклеотида, содержащего одну или несколько субъединиц линкера между модифицированным олигонуклеотидом и лигандом. Например, в случае, когда соединение имеет структуру  $L_n$ -линкер- $N_m$ -P-МО, в некоторых вариантах осуществления расщепление приводит к образованию исходного модифицированного олигонуклеотида, содержащего один или несколько нуклеотидов  $N_m$ . В некоторых вариантах осуществления расщепление конъюгированного модифицированного олигонуклеотида приводит к образованию исходного модифицированного олигонуклеотида. В некоторых таких вариантах осуществления, например, в случаях, когда соединение имеет структуру  $L_n$ -линкер- $N_m$ -P-МО, в некоторых вариантах осуществления расщепление приводит к образованию исходного модифицированного олигонуклеотида без какого-либо из нуклеотидов  $N_m$ .

### **Некоторые нуклеотидные последовательности**

Нуклеотидные последовательности зрелой miR-122 и соответствующей ей последовательности со структурой типа "стебель-петля" находятся в miRBase, онлайн базе данных с возможностью поиска последовательностей микроРНК, и примечания находятся на [microrna.sanger.ac.uk](http://microrna.sanger.ac.uk). Записи в базе данных последовательностей miRBase представляют собой прогнозируемую часть "шпильки" транскрипта микроРНК ("стебель-петля") с информацией относительно локализации и последовательности зрелой последовательности микроРНК. Последовательности микроРНК со структурой типа "стебель-петля" в базе данных не являются строго предшественниками микроРНК (пре-микроРНК) и могут в некоторых случаях включать пре-микроРНК и некоторые фланкирующие последовательности из предполагаемого первичного транскрипта. Нуклеотидные последовательности микроРНК, описанные в данном документе, охватывают любую версию микроРНК, включая последовательности, описанные в базе данных последовательностей miRBase выпуска 15.0 и последовательности, описанные в каком-либо более раннем выпуске базы данных последовательностей miRBase. Другой выпуск базы данных последовательностей может приводить к переименованию некоторых конкретных микроРНК. Настоящее изобретение охватывает модифицированные олигонуклеотиды, которые являются комплементарными любой версии нуклеотидной последовательности микроРНК, описанных в данном документе.

В определенных вариантах осуществления каждое нуклеотидное основание модифицированного олигонуклеотида, нацеленного на miR-122, способно подвергаться спариванию оснований с нуклеотидным основанием в соответствующем положении в нуклеотидной последовательности miR-122 или ее предшественнике. В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность модифицированного олигонуклеотида может содержать одну или несколько несовпадающих пар оснований по отношению к целевой микроРНК или предшественнику последовательности и остается способной гибридизоваться с ее целевой последовательностью.

В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид имеет нуклеотидную последовательность, которая является комплементарной нуклеотидной последовательности предшественника miR-122, такой как последовательность miR-122 со структурой типа "стебель-петля". Поскольку miR-122 содержится в последовательности предшественника miR-122, модифицированный олигонуклеотид с нуклеотидной последовательностью, комплементарной miR-122, также является комплементарным области предшественника miR-122.

В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид имеет нуклеотидную последовательность, которая является комплементарной нуклеотидным основаниям 1-16, 1-17, 1-18, 1-19, 1-20, 1-21, или 1-22 SEQ ID NO: 1.

В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид имеет нуклеотидную последовательность, которая является комплементарной нуклеотидным основаниям 2-16, 2-17, 2-18, 2-19, 2-20, 2-21 или 2-22 SEQ ID NO: 1.

В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид имеет нуклеотидную последовательность, которая является комплементарной нуклеотидным основаниям 3-17, 3-18, 3-19, 3-20, 3-21 или 3-22 SEQ ID NO: 1.

В определенных вариантах осуществления число связанных нуклеозидов модифицированного олигонуклеотида меньше длины miR-122 или ее предшественника. В конкретных подобных вариантах осуществления олигонуклеотид имеет нуклеотидную последовательность, которая является комплементарной области miR-122 или ее предшественнику. Модифицированный олигонуклеотид с числом связанных



вариантах осуществления два дополнительных нуклеотида находятся на 3'-конце модифицированного олигонуклеотида. В таких определенных вариантах осуществления один дополнительный нуклеотид локализован на 5'-конце, и один дополнительный нуклеотид локализован на 3'-конце модифицированного олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления область олигонуклеотида может быть полностью комплементарна нуклеотидной последовательности miR-122, но весь модифицированный олигонуклеотид не полностью комплементарен miR-122. Например, модифицированный олигонуклеотид, состоящий из 23 связанных нуклеотидов, где каждое из нуклеотидных оснований нуклеотидов 1-22 комплементарно соответствующему положению miR-122, которая состоит из 22 нуклеотидных оснований в длину, содержит часть в 22 нуклеотида, которая полностью комплементарна нуклеотидной последовательности miR-122.

В определенных вариантах осуществления соединение содержит модифицированный олигонуклеотид, присоединенный к лиганду посредством линкера, содержащего один или несколько нуклеотидов. В целях вычисления процентной доли комплементарности любые дополнительные нуклеотиды линкера считаются частью линкера, а не частью модифицированного олигонуклеотида. Соответственно нуклеотидная последовательность модифицированного олигонуклеотида конъюгированного соединения может по-прежнему быть на 100% комплементарной miR-122 даже в тех случаях, когда линкер содержит один или несколько нуклеотидов, которые не являются комплементарными miR-122.

Нуклеотидные последовательности miR-122, изложенные в данном документе, включая без ограничения те, которые находятся в примерах и в перечне последовательностей, не зависят от любой модификации нуклеиновой кислоты. Поэтому нуклеиновые кислоты, определенные в SEQ ID NO, могут независимо содержать одну или несколько модификаций одного или нескольких остатков сахара, одной или нескольких межнуклеотидных связей и/или одного или нескольких нуклеиновых оснований.

Хотя в перечне последовательностей, прилагаемом к данной заявке, каждая нуклеотидная последовательность указывается либо как "РНК", либо "ДНК" в соответствии с требованием, на практике эти последовательности могут быть модифицированы с помощью любой комбинации химических модификаций. Специалист в данной области техники легко поймет, что такое обозначение как "РНК" или "ДНК" для описания модифицированных олигонуклеотидов носит несколько условный характер. Например, модифицированный олигонуклеотид, содержащий нуклеотид, содержащий сахарный фрагмент 2'-ОН и основание тимина, может быть описан как ДНК, содержащая модифицированный сахар (2'-ОН вместо природного 2'-Н ДНК) или как РНК, содержащая модифицированное основание (тимин (метилированный урацил) вместо природного урацила РНК).

Соответственно нуклеотидные последовательности, предусмотренные в данном документе, включая без ограничения те, которые находятся в перечне последовательностей, предназначены охватить нуклеиновые кислоты, содержащие какую-либо комбинацию природной или модифицированной РНК и/или ДНК, включая без ограничения такие нуклеиновые кислоты с модифицированными нуклеотидными основаниями. В качестве дополнительного примера и без ограничения модифицированный олигонуклеотид с нуклеотидной последовательностью "ATCGATCG" охватывает любой олигонуклеотид, имеющий такую нуклеотидную последовательность, или модифицированный, или немодифицированный, включая без ограничения такие соединения, содержащие РНК-основания, такие как те, которые имеют последовательность "AUCGAUCG", и те, которые имеют некоторые ДНК-основания и некоторые РНК-основания, такие как "AUCGATCG", и олигонуклеотиды, содержащие другие модифицированное основания, такие как "AT<sup>me</sup>CGAUCG," где <sup>me</sup>C обозначает 5-метилцитозин. Подобным образом, модифицированный олигонуклеотид с нуклеотидной последовательностью "AUCGAUCG" охватывает любой олигонуклеотид с такой нуклеотидной последовательностью, или модифицированный, или немодифицированный, включая без ограничения такие соединения, содержащие ДНК-основания, такие как те, которые имеют последовательность "ATCGATCG" и те, которые имеют некоторые ДНК-основания и некоторые РНК-основания, такие как "AUCGATCG", и олигонуклеотиды, содержащие другие модифицированные основания, такие как "AT<sup>me</sup>CGAUCG," где <sup>me</sup>C обозначает 5-метилцитозин.

#### **Некоторые применения композиций miR-122**

МикроРНК miR-122 представляет собой экспрессируемую в печени микроРНК, которая представляет собой важный эндогенный "фактор хозяина" для репликации HCV, и олигонуклеотиды, нацеленные на miR-122, блокируют репликацию HCV (Jopling et al. (2005) Science 309, 1577-81). Ингибирование miR-122 у шимпанзе, хронически инфицированного вирусом гепатита С, понижало уровень РНК HCV. У HCV-инфицированных пациентов ингибирование miR-122 приводило к среднему 2 log снижению уровня РНК HCV после 5 еженедельных доз соединения anti-miR-122. Соединения описанные в данном документе, являются сильными ингибиторами активности miR-122. Соответственно в данном документе представлены способы лечения инфекции HCV, предусматривающие соединение, представленное в данном документе, у HCV-инфицированного субъекта.

В данном документе представлены способы лечения HCV-инфицированного субъекта, содержащие введение субъекту соединения, представленного в данном документе. В определенных вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, включают отбор HCV-инфицированного субъекта. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек.

В определенных вариантах осуществления введение снижает симптомы инфекции HCV. Симптомы инфекции HCV включают без ограничения боль в печени, желтуху, тошноту, потерю аппетита и утомляемость.

На основании схемы лечения HCV HCV-инфицированный субъект может испытывать понижение уровня РНК HCV, следующее после повышения уровня РНК HCV, последующее увеличение которого известно как восстановление уровня РНК HCV. В определенных вариантах осуществления соединения и способы, представленные в данном документе, предупреждают восстановление уровня РНК HCV.

В определенных вариантах осуществления соединения и способы, представленные в данном документе, отсрочивают восстановление уровня РНК HCV.

Уровень РНК HCV можно применять для диагностирования инфекции HCV, мониторинга активности заболевания и мониторинга ответа субъекта на лечение. В определенных вариантах осуществления введение соединения, представленного в данном документе, снижает уровень РНК HCV. В определенных вариантах осуществления соединения в данном документе вводят в дозе, достаточной для снижения уровня РНК HCV. В определенных вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, включают отбор субъекта, имеющего уровень РНК HCV более чем 350000 копий на миллилитр сыворотки, от 350000 до 3500000 копий на миллилитр сыворотки или более чем 3500000 копий на миллилитр сыворотки. В определенных вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, включают снижение уровня РНК HCV. В определенных вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, включают снижение уровня РНК HCV до уровня ниже 200 копий на миллилитр сыворотки, ниже 100 копий на миллилитр сыворотки или ниже 40 копий на миллилитр сыворотки. Уровень РНК HCV также можно называть как "вирусная нагрузка" или "титр РНК HCV".

Изменения уровня РНК HCV можно описать как log изменения. Например, спад от 60000 до 600 будет означать 2-log спад уровня РНК HCV. В определенных вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, достигают понижения уровня РНК HCV более чем или равного 2 log. В определенных вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, достигают понижения уровня РНК HCV по меньшей мере в 0,5 раза, по меньшей мере в 1,0 раза, по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 2,0 раза или по меньшей мере в 2,5 раза.

В определенных вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, включают достижение устойчивого вирусологического ответа.

У HCV-инфицированных субъектов могут развиваться HCV-ассоциированные заболевания. Основным гематологическим последствием инфекции HCV является цирроз и его осложнения, включая кровоизлияние, печеночную недостаточность и гепатоцеллюлярную карциному. Дополнительным осложнением является фиброз, который является результатом хронического воспаления, вызывающего отложение компонента внеклеточного матрикса, который приводит к искажению печеночной архитектуры и блокаде микроциркуляции и функции печени. Учитывая то, что цирроз прогрессирует и фибротическая ткань накапливается, в результате возникает тяжелая некровоспалительная активность и начинается (гипер)стеатоз. (Гипер)стеатоз приводит к внепеченочным патологиям, включая сахарный диабет, белковую недостаточность, гипертензию, клеточные токсины, ожирение и гипоксию. В силу того, что фиброз и (гипер)стеатоз будут приобретать тяжелую форму, печень в конечном итоге прекратит работу и потребуются трансплантация печени. У HCV-инфицированных субъектов также может развиваться гепатоцеллюлярная карцинома. В определенных вариантах осуществления HCV-инфицированный субъект имеет HCV-ассоциированное заболевание. В определенных вариантах осуществления HCV-ассоциированное заболевание представляет собой цирроз, фиброз, стеатогепатит, (гипер)стеатоз и/или гепатоцеллюлярную карциному.

В определенных вариантах осуществления HCV-инфицированный субъект имеет одно или несколько заболеваний. В определенных вариантах осуществления HCV-инфицированный субъект инфицирован одним или несколькими вирусами, отличными от HCV. В определенных вариантах осуществления HCV-инфицированный субъект инфицирован вирусом иммунодефицита человека (HIV). Соединения, представленные в данном документе, могут вводиться сопутствующим образом с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами. В определенных вариантах осуществления одно или несколько дополнительных терапевтических средств включают иммунотерапию, иммуномодулятор, терапевтическую вакцину, антифибротическое средство, противовоспалительное средство, бронхолитическое средство, муколитическое средство, противомускариновое средство, антилейкотриеновое средство, ингибитор неспецифической адгезии клеток, антиоксидант, агонист цитокинов, антагонист цитокинов, сурфактант легких, противомикробное средство, противовирусное средство, средство против HCV, противоопухолевое средство, соединение anti-miR-122, средство для РНК-интерференции или ингибитор циклофилина.

В определенных вариантах осуществления одно или несколько дополнительных терапевтических средств может быть выбрано из ингибитора протеазы, ингибитора полимеразы, ингибитора кофактора, ингибитора РНК-полимеразы, ингибитора структурного белка, ингибитора неструктурного белка, ингибитора циклофилина, ингибитора входа, агониста TLR7 и интерферона.

В определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет

собой модифицированный олигонуклеотид, имеющий структуру  $C_LCA_LTTG_LT_LCAC_LAC_LTC_LC_L$  (SEQ ID NO: 7), где нуклеозиды без последующего нижнего индекса обозначают  $\beta$ -D-дезоксирибонуклеозиды; нуклеозиды с последующим нижним индексом "L" обозначают LNA-нуклеозиды, и каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную межнуклеозидную связь. В определенных вариантах осуществления терапевтическое средство представляет собой GalNAc- конъюгированный  $C_LCA_LTTG_LT_LCAC_LAC_LTC_LC_L$  (SEQ ID NO: 7). В некоторых вариантах осуществления все  $C_L$ -нуклеозиды представляют собой  $MeC_L$ -нуклеозиды, где верхний индекс "Me" обозначает 5-метилцитозин.

В определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство выбрано из ингибитора протеазы, ингибитора NS5A, ингибитора NS3/4A, нуклеозидного ингибитора NS5B, нуклеотидного ингибитора NS5B, ненуклеозидного ингибитора NS5B, ингибитора циклофилина и интерферона.

В определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство выбрано из интерферона альфа-2а, интерферона альфа-2b, интерферона альфакон-1, пегинтерферона альфа-2b, пегинтерферона альфа-2а, интерферона альфа-2b длительного возбудения, интерферона лямбда, софосбувира, рибавирина, теллапревира, боцепревира, ванипревира, асунапревира, ритонавира, сетробувира, даклатавира, симепревира, алиспоривира, мерицитабина, тегобувира, данопревира, совапревира и нецепревира. В определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство выбрано из фалдапревира, АВТ-450, МК-5172, мерицитабина, ледипасвира, омбитасвира, GS-5816, МК-8742, дасабувира, BMS-791325 и АВТ-072.

В определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство выбрано из интерферона, рибавирина и теллапревира. В определенных вариантах осуществления интерферон выбран из интерферона альфа-2а, интерферона альфа-2b, интерферона альфакон-1, пегинтерферона альфа-2b и пегинтерферона альфа-2а.

В определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство включает пегинтерферон альфа-2b и рибавирин. Например, субъект может получать терапию, которая включает соединение, представленное в данном документе, пегинтерферон альфа-2b и рибавирин. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство включает пегинтерферон альфа-2а и рибавирин. Например, субъект может получать терапию, которая включает соединение, представленное в данном документе, пегинтерферон альфа-2а и рибавирин. В определенных вариантах осуществления дополнительные терапевтические средства представляют собой омбитасвир и АВТ-450. В определенных вариантах осуществления дополнительные терапевтические средства представляют собой асунапревир, даклатасвир и BMS-791325. В определенных вариантах осуществления дополнительные терапевтические средства представляют собой софосбувир и ледипасвир. В определенных вариантах осуществления дополнительные терапевтические средства представляют собой МК-8742 и МК-5172.

Некоторые субъекты, получающие определенную терапию, например терапию интерфероном или рибавирином, могут не испытывать существенного или терапевтически благоприятного снижения уровня РНК HCV. Такие субъекты могут получать пользу от введения одного или нескольких дополнительных терапевтических средств. В определенных вариантах осуществления субъект способен, представленный в данном документе, является пациентом, не дающим клинического ответа. В определенных вариантах осуществления субъект представляет собой пациента, не дающего клинического ответа на интерферон. В определенных вариантах осуществления субъект представляет собой пациента, не дающего клинического ответа на противовирусное средство прямого действия.

В определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой противовирусное средство, применяемое в лечении инфекции HIV. В определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (NNRTI). В определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (NRTI). В определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой ингибитор протеазы. В определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой ингибитор входа или ингибитор слияния. В определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой ингибитор интегразы. В определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой выбранное из эфавиренза, этравирина, невирапина, абакавира, эмитрацитабина, тенофувира, ламивудина, зидовудина, атазанавира, дарунавира, фосампренавира, ритонавира, энфувиртида, маравирока и ралтегравира.

Субъект, инфицированный HCV, может испытывать аномальную функцию печени, которую определяют путем измерения билирубина, альбумина и протромбина один или несколько раз. Измерение уровня ферментов печени, аланинаминотрансферазы (ALT) и аспартатаминотрансферазы (AST), выполняют для определения воспаления печени. Один или несколько аномальных уровней этих маркеров могут обозначать аномальную функцию печени. В определенных вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, включают нормализацию функции печени. В определенных вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, включают нормализацию уровней фер-

ментов печени.

В любом из способов, представленных в данном документе, соединение может присутствовать в фармацевтической композиции.

Соединения, представленные в данном документе, могут применяться в терапии. В определенных вариантах осуществления соединения предназначено для применения в лечении HCV-инфицированного субъекта. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек. Соединение для применения в лечении HCV-инфицированного субъекта в определенных вариантах осуществления может быть предназначено для применения в любом способе лечения, описанном в данном документе.

В данном документе представлены способы, включающие введение соединения, представленного в данном документе, субъекту, имеющему miR-122-ассоциированное состояние. В определенных вариантах осуществления miR-122-ассоциированное состояние представляет собой инфекцию HCV.

В определенных вариантах осуществления miR-122-ассоциированное состояние представляет собой повышенный холестерин. В определенных вариантах осуществления введение соединения anti-miR-122 субъекту приводит к снижению сывороточного холестерина. Соответственно, в определенных вариантах осуществления в данном документе представлены способы снижения уровня холестерина у субъекта, включающие введение субъекту соединения, представленного в данном документе. В определенных вариантах осуществления уровни холестерина можно использовать в качестве биомаркера для определения активности соединения anti-miR-122, представленного в данном документе, отдельно или в дополнение к другому индикатору эффективности, например, снижения уровней РНК HCV. Соответственно, в данном документе представлены способы, включающие введение соединения, представленного в данном документе, субъекту, забор образца крови у субъекта, и измерение холестерина в образце крови субъекта. Уровень холестерина можно применять в качестве индикатора активности соединения anti-miR-122 у субъекта.

В определенных вариантах осуществления miR-122-ассоциированным состоянием является (гипер)стеатоз.

Соответственно, в определенных вариантах осуществления в данном документе представлены способы снижения (гипер)стеатоза у субъекта, включающие введение субъекту соединения, представленного в данном документе.

В определенных вариантах осуществления miR-122-ассоциированное состояние представляет собой нарушение с перенасыщением железом. Нарушение, связанное с перенасыщением железом, может проявляться в результате генетической мутации, вызывающей поглощение организмом избыточного количества железа. Нарушение, связанное с перенасыщением железом, может иметь также негенетические причины, включая без ограничения постоянные переливания крови, хронический гепатит или прием внутрь избыточного количества железа. В определенных вариантах осуществления нарушение, связанное с перенасыщением железом, выбрано из перенасыщения железом вследствие трансфузий, перенасыщения железом вследствие диеты, наследственного гемохроматоза, серповидноклеточной анемии, талласемии, X-сцепленной сидеробластной анемии, недостаточности пируваткиназы и недостаточности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. В определенных вариантах осуществления нарушение, связанное с перенасыщением железом, представляет собой наследственный гемохроматоз, выбранный из гемохроматоза типа 1, гемохроматоза типа 2А, гемохроматоза типа 2В, гемохроматоза типа 3, гемохроматоза типа 4 (или ферропортиновой болезни), африканского гемохроматоза, неонатального гемохроматоза, ацерулоплазминеми и атрансферринемии. В определенных вариантах осуществления введение соединения, представленного в данном документе, субъекту, имеющему нарушение, связанное с перенасыщением железом, приводит к снижению избытка железа в организме субъекта.

#### **Некоторые модификации**

Модифицированный олигонуклеотид может содержать один или несколько модификаций нуклеотидного основания, сахара и/или межнуклеозидной связи. Модифицированное нуклеотидное основание, сахар и/или межнуклеозидная связь могут быть выбраны среди немодифицированных форм из-за необходимых свойств, таких как, например, повышенное клеточное поглощение, повышенное сродство в отношении других мишеней олигонуклеотидов или нуклеиновой кислоты 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 стабилизирующий нуклеозид. Пример стабилизирующего нуклеозида представляет собой 2'-модифицированный нуклеозид.

В определенных вариантах осуществления модифицированный нуклеозид содержит модифицированный сахарный фрагмент. В определенных вариантах осуществления модифицированный нуклеозид, содержащий модифицированный сахарный фрагмент, содержит немодифицированное нуклеотидное основание. В определенных вариантах осуществления модифицированный сахар содержит модифицированное нуклеотидное основание. В определенных вариантах осуществления модифицированный нуклеозид представляет собой 2'-модифицированный нуклеозид.

В определенных вариантах осуществления 2'-модифицированный нуклеозид содержит бицикличес-

ский сахарный фрагмент. В таких определенных вариантах осуществления фрагмент бициклического сахара представляет собой D-сахар в альфа-конфигурации. В таких определенных вариантах осуществления фрагмент бициклического сахара представляет собой D-сахар в бета-конфигурации. В таких определенных вариантах осуществления фрагмент бициклического сахара представляет собой L-сахар в альфа-конфигурации. В таких определенных вариантах осуществления фрагмент бициклического сахара представляет собой L-сахар в бета-конфигурации.

В определенных вариантах осуществления бициклический сахарный фрагмент содержит мостиковую группу между 2' и 4' атомами углерода. В таких определенных вариантах осуществления мостиковая группа содержит от 1 до 8 связанных бирадикальных групп. В определенных вариантах осуществления бициклический сахарный фрагмент содержит от 1 до 4 связанных бирадикальных групп. В определенных вариантах осуществления бициклический сахарный фрагмент содержит 2 или 3 связанные бирадикальные группы. В определенных вариантах осуществления бициклический сахарный фрагмент содержит 2 связанные бирадикальные группы. Примеры таких 4'-2' заместителей сахара включают без ограничения  $-[C(R_a)(R_b)]_n-$ ,  $-[C(R_a)(R_b)]_n-O-$ ,  $-C(R_aR_b)-N(R)-O-$  или  $-C(R_aR_b)-O-N(R)-$ ; 4'-CH<sub>2</sub>-2', 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-2', 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-2'; 4'-(CH<sub>2</sub>)-O-2'(LNA); 4'-(CH<sub>2</sub>)-S-2'; 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2'(ENA); 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2' (сEt) и 4'-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)-O-2' и их аналоги (см., например, патент США 7399845, выданный 15 июля 2008 г.); 4'-C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)-O-2' и его аналоги, (см., например, WO 2009/006478, опубликованную 8 января 2009 г.); 4'-CH<sub>2</sub>-N(OCH<sub>3</sub>)-2' и его аналоги (см., например, WO 2008/150729, опубликованную 11 декабря 2008 г.); 4'-CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-2' (см., например, US 2004/0171570, опубликованную 2 сентября 2004 г.); 4'-CH<sub>2</sub>-O-N(R)-2' и 4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2', где каждый R независимо представляет собой H, защитную группу, или C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкил; 4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2', где R представляет собой H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкил или защитную группу (см., патент США 7427672, выданный 23 сентября 2008 г.); 4'-CH<sub>2</sub>-C(H)(CH<sub>3</sub>)-2' (см., например, Chattopadhyaya, et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134); и 4'-CH<sub>2</sub>-C(=CH<sub>2</sub>)-2' и его аналоги (см. опубликованную международную заявку PCT WO 2008/154401, опубликованную 8 декабря 2008 г.).

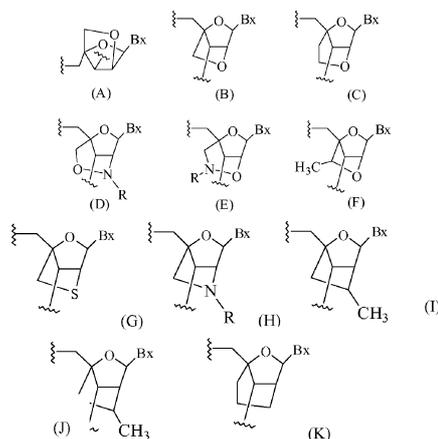
В определенных вариантах осуществления такие 4'-2' мостики независимо содержат 1 или от 2 до 4 связанных групп, независимо выбранных из  $-[C(R_a)(R_b)]_n-$ ,  $-C(R_a)=C(R_b)-$ ,  $-C(R_a)=N-$ ,  $-C(=NR_a)-$ ,  $-C(=O)-$ ,  $-C(=S)-$ ,  $-O-$ ,  $-Si(R_a)_2-$ ,  $-S(=O)_x-$  и  $-N(R_a)-$ ;

где x равен 0, 1 или 2;

n равен 1, 2, 3 или 4;

каждый R<sub>a</sub> и R<sub>b</sub> независимо представляет собой H, защитную группу, гидроксил, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкил, замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкил, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкенил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкинил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкинил, C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>-арил, замещенный C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>-арил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал, гетероарил, замещенный гетероарил, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>-ациклический радикал, замещенный C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>-ациклический радикал, галоген, OJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, COOJ<sub>1</sub>, ацил (C(=O)-H), замещенный ацил, CN, сульфонил (S(=O)<sub>2</sub>-J<sub>1</sub>) или сульфоксил (S(=O)-J<sub>1</sub>); и каждый J<sub>1</sub> и J<sub>2</sub> независимо представляет собой H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкил, замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкил, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкенил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкинил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкинил, C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>-арил, замещенный C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>-арил, ацил (C(=O)-H), замещенный ацил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-аминоалкил, замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-аминоалкил или защитную группу.

Нуклеозиды, содержащие бициклические сахарные фрагменты, называют бициклическими нуклеозидами или BNA. В определенных вариантах осуществления бициклические нуклеозиды включают без ограничения (A) α-L-метиленокси (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') BNA; (B) β-D-метиленокси (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') BNA; (C) этиленокси (4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2') BNA; (D) аминоокси (4'-CH<sub>2</sub>-O-N(R)-2') BNA; (E) оксиамино (4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2') BNA; (F) метил(метиленокси)(4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2') BNA (также называемый связанный этил или сEt); (G) метилентиио (4'-CH<sub>2</sub>-S-2') BNA; (H) метиленамино (4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-2') BNA; (I) метилкарбоциклический (4'-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-2') BNA; (J) с-MOE (4'-CH<sub>2</sub>-OMe-2') BNA и (K) пропиленкарбоциклический (4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-2') BNA, как изложено ниже.



где  $V_x$  представляет собой фрагмент нуклеинового основания и  $R$  независимо представляет собой  $H$ , защитную группу или  $C_1$ - $C_{12}$ -алкил.

В определенных вариантах осуществления 2'-модифицированный нуклеозид содержит 2'-замещенную группу, выбранную из галогена, аллила, amino, азидо,  $SH$ ,  $CN$ ,  $OCN$ ,  $CF_3$ ,  $OCF_3$ ,  $O$ -,  $S$ - или  $N(R_m)$ -алкила;  $O$ -,  $S$ - или  $N(R_m)$ -алкенила;  $O$ -,  $S$ - или  $N(R_m)$ -алкинила;  $O$ -алкиленил- $O$ -алкила, алкинила, алкарила, аралкила,  $O$ -алкариал,  $O$ -аралкил,  $O(CH_2)_2SCH_3$ ,  $O-(CH_2)_2-O-N(R_m)(R_n)$  или  $O-CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n)$ , где каждый  $R_m$  и  $R_n$  независимо представляет собой  $H$ , защитную аминогруппу или замещенный, или незамещенный  $C_1$ - $C_{10}$ -алкил. Такие 2'-замещенные группы могут быть дополнительно замещены одной или несколькими замещенными группами, независимо выбранными из гидроксила, amino, алкокси, карбокси, бензила, фенила, нитро ( $NO_2$ ), тиола, тиоалкокси ( $S$ -алкила), галогена, алкила, арила, алкенила и алкинила.

В определенных вариантах осуществления 2'-модифицированный нуклеозид содержит 2'-замещенную группу, выбранную из  $F$ ,  $NH_2$ ,  $N_3$ ,  $OCF_3$ ,  $O-CH_3$ ,  $O(CH_2)_3NH_2$ ,  $CH_2-CH=CH_2$ ,  $O-CH_2-CH=CH_2$ ,  $OCH_2CH_2OCH_3$ ,  $O(CH_2)_2SCH_3$ ,  $O-(CH_2)_2-O-N(R_m)(R_n)$ ,  $-O(CH_2)_2O(CH_2)_2N(CH_3)_2$ , и  $N$ -замещенного ацетамида ( $O-CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n)$ , где каждый  $R_m$  и  $R_n$  независимо представляет собой  $H$ , защитную аминогруппу или замещенный, или незамещенный  $C_1$ - $C_{10}$ -алкил.

В определенных вариантах осуществления 2'-модифицированный нуклеозид содержит 2'-замещенную группу, выбранную из  $F$ ,  $OCF_3$ ,  $O-CH_3$ ,  $OCH_2CH_2OCH_3$ ,  $2'-O(CH_2)_2SCH_3$ ,  $O-(CH_2)_2-O-N(CH_3)_2$ ,  $-O(CH_2)_2O(CH_2)_2N(CH_3)_2$  и  $O-CH_2-C(=O)-N(H)CH_3$ .

В определенных вариантах осуществления 2'-модифицированный нуклеозид содержит 2'-замещенную группу, выбранную из  $F$ ,  $O-CH_3$  и  $OCH_2CH_2OCH_3$ .

В определенных вариантах осуществления 2'-модифицированный нуклеозид представляет собой 4'-тио-модифицированный нуклеозид. В определенных вариантах осуществления 2'-модифицированный нуклеозид представляет собой 4'-тио-2'-модифицированный нуклеозид. 4'-Тео-модифицированный нуклеозид содержит  $\beta$ -D-рибонуклеозид, где 4'-O заменен на 4'-S. 4'-Тео-2'-модифицированный нуклеозид представляет собой 4'-тио-модифицированный нуклеозид, содержащий 2'-ОН, замененный 2'-замещающей группой. Подходящие 2'-замещенные группы включают 2'- $OCH_3$ , 2'- $O-(CH_2)_2-OCH_3$  и 2'-F.

В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит одну или несколько межнуклеозидных модификаций. В таких определенных вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связь модифицированного олигонуклеотида представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь. В определенных вариантах осуществления модифицированная межнуклеозидная связь содержит атом фосфора.

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

В определенных вариантах осуществления модифицированная межнуклеозидная связь не содержит атом фосфора. В конкретных подобных вариантах осуществления межнуклеозидная связь образуется межнуклеозидной связью на основе короткоцепочечного алкила. В конкретных подобных вариантах осуществления межнуклеозидная связь образуется межнуклеозидными связями на основе циклоалкила. В конкретных подобных вариантах осуществления межнуклеозидная связь образуется смешанной межнуклеозидной связью на основе гетероатома и алкила. В конкретных подобных вариантах осуществления межнуклеозидная связь образуется смешанными межнуклеозидными связями на основе гетероатома и циклоалкила. В конкретных подобных вариантах осуществления межнуклеозидная связь образуется одной или несколькими короткоцепочечными гетероатомными межнуклеозидными связями. В конкретных подобных вариантах осуществления межнуклеозидная связь образуется одной или несколькими гетероциклическими межнуклеозидными связями. В конкретных подобных вариантах осуществления межнуклеозидная связь имеет амидный скелет. В таких определенных вариантах осуществления межнуклеозидная связь содержит смешанные составные части на основе  $N$ ,  $O$ ,  $S$  и  $CH_2$ .

В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит одно или несколько модифицированных нуклеотидных оснований. В определенных вариантах осуществления модифицированное нуклеотидное основание выбрано из 7-дезагуанина, 7-дезаденина, гипоксантина, ксантина, 7-метилгуанина, 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 с образованием нуклеинового основания, известного из уровня техники как G-clamp.

В таких определенных вариантах осуществления соединение содержит модифицированный олигонуклеотид, содержащий одну или несколько стабилизирующих групп, которые присоединены к одному или обоим концам модифицированного олигонуклеотида, для улучшения свойств, таких как, например, стабильность по отношению к воздействию нуклеазы. Включенные стабилизирующие группы являются сар-структурами. Такие концевые модификации защищают модифицированный олигонуклеотид от экзонуклеазного разрушения и могут помочь при доставке в клетку и/или локализации в пределах клетки. Сар может присутствовать на 5'-конце (5'-сар) или на 3'-конце (3'-сар), или может присутствовать на обоих концах. Сар-структуры включают, например, инвертированные дезоксиабазические сар.

Подходящие сар-структуры включают 4',5'-метилен-нуклеотид, 1-(бета-D-эритрофуранозил)-нуклеотид, 4'-тио-нуклеотид, карбоциклический нуклеотид, 1,5-ангидрогекситол-нуклеотид, L-нуклеотид, альфа-нуклеотид, нуклеотид с модифицированным основанием, фосфородиоатную связь, трео-пентофуранозил нуклеотид, ациклический 3',4'-секонуклеотид, ациклический 3,4-дигидроксипентил-нуклеотид, ациклический 3,5-дигидроксипентил-нуклеотид, 3'-3'-инвертированный фрагмент нуклеотида, 3'-3'-инвертированный абазический фрагмент, 3'-2'-инвертированный фрагмент нуклеотида, 3'-2'-инвертированный абазический фрагмент, 1,4-бутандиолфосфат, 3'-фосфорамидат, гексилфосфат, аминоксидфосфат, 3'-фосфат, 3'-фосфотиоат, фосфородиоат, образующий мостик фрагмент метилфосфоната и необразующий мостик фрагмент метилфосфоната, 5'-аминоалкилфосфат, 1,3-диамино-2-пропилфосфат, 3-аминопропилфосфат, 6-аминогексилфосфат, 1,2-аминододецилфосфат, гидроксипропилфосфат, 5'-5'-инвертированный фрагмент нуклеотида, 5'-5'-инвертированный абазический фрагмент, 5'-фосфорамидат, 5'-фосфотиоат, 5'-амино, образующий мостик и/или необразующий мостик 5'-фосфорамидат, фосфотиоат и фрагмент 5'-меркапто.

#### **Некоторые способы синтеза**

Модифицированные олигонуклеотиды могут быть получены с помощью автоматических твердофазных способов синтеза, известных из уровня техники. В ходе твердофазного синтеза мономеры фосфорамидита последовательно связываются с нуклеозидом, ковалентно связанным с твердой подложкой. Этот нуклеозид является 3'-концевым нуклеозидом модифицированного олигонуклеотида. Как правило, цикл связывания включает 4 этапа: детритилирование (отщепление 5'-гидроксильную защитную группу с кислотой), связывание (присоединение активированного фосфорамидита к связанному с подложкой нуклеозиду или олигонуклеотиду), окисление или сульфурование (перегруппировка новообразованного фосфитного триэфира с помощью окисляющего или сульфурующего средства) и эквипирование (ацетилирование непрореагировавших 5'-гидроксильных групп). После конечного цикла связывания олигонуклеотид, связанный с твердой подложкой, подвергают этапу детритилирования с последующим расщеплением и этапом снятия защиты, в котором одновременно олигонуклеотид освобождается от твердой подложки и с оснований удаляются защитные группы. Твердую подложку удаляют с помощью фильтрации, фильтрат концентрируют и полученный раствор тестируют в отношении идентичности и чистоты. Олигонуклеотид затем очищают, например, с применением колонки, заполненной ионообменной смолой.

GalNAc-конъюгированные модифицированные олигонуклеотиды можно получать с помощью автоматического твердофазного синтеза, подобного твердофазному синтезу, с помощью которого получают неконъюгированные олигонуклеотиды. В ходе синтеза GalNAc-конъюгированных олигонуклеотидов мономеры фосфорамидита последовательно связаны с GalNAc-конъюгатом, который ковалентно связан с твердой подложкой. Синтез GalNAc-конъюгатов и твердой подложки GalNAc-конъюгатов описан, например, в патенте США № 8106022 и публикации международной заявки № WO 2013/033230, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для описания синтеза углевод-содержащих конъюгатов, включая конъюгаты, содержащие один или несколько GalNAc-фрагментов, и синтеза конъюгата, ковалентно связанного с твердой подложкой.

#### **Некоторые фармацевтические композиции**

Любое из соединений, представленных в данном документе, можно получать в виде фармацевтической композиции. В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в форме единицы дозирования (например, таблетки, капсулы, болюса и т.п.). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит соединение, представленное в данном документе в дозе в диапазоне, выбранном из от 25 до 800 мг, от 25 до 700 мг, от 25 до 600 мг, от 25 до 500 мг, от 25 до 400 мг, от 25 до 300 мг, от 25 до 200 мг, от 25 до 100 мг, от 100 до 800 мг, от 200 до 800 мг, от 300 до 800 мг, от 400 до 800 мг, от 500 до 800 мг, от 600 до 800 мг, от 100 до 700 мг, от 150 до 650 мг, от 200 до 600 мг, от 250 до 550 мг, от 300 до 500 мг, от 300 до 400 мг и от 400 до 600 мг. В определенных вариантах осуществления такие фармацевтические композиции содержат соединение, представленное в данном документе, присутствующее в дозе, выбранной из 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 270, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 505, 510, 515, 520, 525, 530, 535, 540, 545, 550, 555, 560, 565, 570, 575, 580, 585, 590, 595, 600, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645,

650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795 и 800 мг. В конкретных подобных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит дозу соединения, представленного в данном документе, выбранную из 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700 и 800 мг.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую соединение, представленное в данном документе, вводят в дозе 10 мг/кг или меньше, 9 мг/кг или меньше, 8 мг/кг или меньше, 7,5 мг/кг или меньше, 7 мг/кг или меньше, 6,5 мг/кг или меньше, 6 мг/кг или меньше, 5,5 мг/кг или меньше, 5 мг/кг или меньше, 4,5 мг/кг или меньше, 4 мг/кг или меньше, 3,5 мг/кг или меньше, 3 мг/кг или меньше, 2,5 мг/кг или меньше, 2 мг/кг или меньше, 1,5 мг/кг или меньше, 1 мг/кг или меньше, 0,75 мг/кг или меньше, 0,5 мг/кг или меньше или 0,25 мг/кг или меньше.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическое средство представляет собой стерильное лиофилизированное соединение, переработанное с помощью подходящего растворителя, например стерильной воды для инъекций или стерильного солевого раствора для инъекций. Переработанный продукт вводят в виде подкожной инъекции или в виде внутривенной инфузии после разбавления в солевом растворе. Продукт лиофилизированного лекарственного средства состоит из соединения, которое было приготовлено в воде для инъекций или в солевом растворе для инъекций, доведенного до pH 7,0-9,0 с помощью кислоты или основания во время приготовления, и затем лиофилизирован. Лيوфилизированное соединение может составлять 25-800 мг олигонуклеотида. Понятно, что диапазон включает 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775 и 800 мг модифицированного лиофилизированного олигонуклеотида. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления лиофилизированное соединение присутствует в количестве, которое находится в диапазоне от 25 до 800 мг, от 25 до 700 мг, от 25 до 600 мг, от 25 до 500 мг, от 25 до 400 мг, от 25 до 300 мг, от 25 до 200 мг, от 25 до 100 мг, от 100 до 800 мг, от 200 до 800 мг, от 300 до 800 мг, от 400 до 800 мг, от 500 до 800 мг, от 600 до 800 мг, от 100 до 700 мг, от 150 до 650 мг, от 200 до 600 мг, от 250 до 550 мг, от 300 до 500 мг, от 300 до 400 мг или от 400 до 600 мг. Продукт лиофилизированного лекарственного средства может быть упакован в 2 мл флакон типа I из прозрачного стекла (обработанный сульфатом аммония), закрытый пробкой из бромбутиловой резины и герметично закрытый алюминиевой крышкой FLIP-OFF®.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в данном документе, содержит соединение в терапевтически эффективном количестве. В определенных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество является достаточным для предупреждения, облегчения или улучшения течения симптомов заболевания или для продления жизни субъекта, подвергающегося лечению. Определение терапевтически эффективного количества находится в пределах возможности специалистов в данной области техники.

В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции, представленные в данном документе, могут дополнительно содержать другие вспомогательные компоненты, традиционно находящиеся в фармацевтических композициях, при их уровнях применения, установленных в области техники. Таким образом, например, композиции могут содержать дополнительные совместимые фармацевтически активные материалы, такие как, например, противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные средства, или могут содержать дополнительные материалы, применяемые при физическом составлении различных лекарственных форм композиций согласно настоящему изобретению, такие как красители, ароматизирующие средства, консерванты, антиоксиданты, замутняющие средства, загустители и стабилизаторы. Однако такие материалы при добавлении не должны чрезмерно препятствовать биологическим активностям компонентов композиции настоящего изобретения. Составы можно стерилизовать и при необходимости смешивать со вспомогательными средствами, например, смазывающими веществами, консервантами, стабилизаторами, смачивающими средствами, эмульгаторами, солями, влияющими на осмотическое давление, буферами, красящими веществами, отдушками и/или ароматическими веществами и т.п., которые не оказывают вредного воздействия на олигонуклеотид(ы) состава.

Липидные фрагменты применялись при различных видах терапии нуклеиновыми кислотами в разнообразных способах. В одном способе нуклеиновую кислоту вводят в предварительно сформированные липосомы или липоплексы, полученные из смесей катионных липидов и нейтральных липидов. В другом способе ДНК-комплексы с моно- или поликатионными липидами образуются без присутствия нейтральных липидов. В определенных вариантах осуществления липидный фрагмент выбирают для повышения распределения фармацевтического средства в определенной клетке или ткани. В определенных вариантах осуществления липидный фрагмент выбирают для повышения распределения фармацевтического средства в жировой ткани. В определенных вариантах осуществления липидный фрагмент выбирают для повышения распределения фармацевтического средства в мышечной ткани.

В определенных вариантах осуществления INTRALIPID применяют для получения фармацевтической композиции, содержащей олигонуклеотид. Intralipid является жировой эмульсией, полученной для внутривенного введения. В ее составе содержится 10% соевого масла, 1,2% фосфолипидов яичного желтка, 2,25% глицерина и воды для инъекций. К тому же гидроксид натрия добавляли для доведения pH

так, чтобы конечный pH продукта находился в диапазоне 6-8,9.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в данном документе, содержит соединение полиамина или липидный фрагмент, образующий комплекс с нуклеиновой кислотой. Такие препараты описаны в публикации PCT WO/2008/042973, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме для раскрытия липидных препаратов. Некоторые дополнительные препараты описаны в Akinc et al., Nature Biotechnology 26, 561-569 (1 мая 2008 г.), которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме для раскрытия липидных препаратов.

В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции, представленные в данном документе, содержат одно или несколько соединений и одну или несколько сред. В таких определенных вариантах осуществления среды выбирают из воды, солевых растворов, спирта, полиэтиленгликолей, желатина, лактозы, амилазы, стеарата магния, талька, кремниевой кислоты, вязкого парафина, гидроксиметилцеллюлозы и поливинилпирролидона.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию, предусмотренную в данном документе, получают с использованием известных способов, включая без ограничения способы смешивания, растворения, гранулирования, получения драже, отмучивания, эмульгирования, помещения в капсулы, захватывания или таблетирования.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, предусмотренная в данном документе, представляет собой жидкость (например, суспензию, крепкий настой и/или раствор). В таких определенных вариантах осуществления жидкую фармацевтическую композицию получают с использованием ингредиентов, известных из уровня техники, включая без ограничения воду, гликоли, масла, спирты, ароматизирующие средства, консерванты и красящие вещества.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, предусмотренная в данном документе, представляет собой твердое вещество (например, порошок, таблетку и/или капсулу). В таких определенных вариантах осуществления твердую фармацевтическую композицию, содержащую один или несколько олигонуклеотидов, получают с использованием ингредиентов, известных из уровня техники, включая без ограничения крахмалы, сахара, разбавители, гранулирующие средства, смазывающие вещества, связующие средства и средства для улучшения распадаемости таблеток.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, предусмотренная в данном документе, составлена в виде депо-препарата. Некоторые такие депо-препараты, как правило, являются длительно действующими по сравнению с препаратами, не относящимися к депо-препаратам. В определенных вариантах осуществления такие препараты вводят путем имплантации (например, подкожно или внутримышечно) или путем внутримышечной инъекции. В определенных вариантах осуществления депо-препараты получают с использованием подходящих полимерных или гидрофобных материалов (например, эмульсия в подходящем масле), или ионообменных смол, или в виде труднорастворимых производных, например, в виде труднорастворимой соли.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в данном документе, содержит систему доставки. Примеры систем доставки включают без ограничения липосомы и эмульсии. Некоторые системы доставки применяют для получения некоторых фармацевтических композиций, включая такие, которые содержат гидрофобные соединения. В определенных вариантах осуществления используют некоторые органические растворители, например, диметилсульфоксид.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в данном документе, содержит одну или несколько тканеспецифических молекул доставки, разработанных для доставки одного или нескольких соединений, представленных в данном документе, к специфическим тканям или типам 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 соразтворителей. Конкретные такие системы соразтворителей содержат, например, бензиловый спирт, неполярное поверхностно активное вещество, водорастворимый органический полимер и водную фазу. В определенных вариантах осуществления такую систему соразтворителей применяют для гидрофобных соединений. Неограничивающим примером такой системы соразтворителей является система соразтворителей VPD, которая представляет собой раствор абсолютного этанола, содержащего 3% вес./об. бензинового спирта, 8% вес./об. неполярного поверхностно-активного вещества Polysorbate 80™ и 65% вес./об. полиэтиленгликоля 300. Пропорции таких систем соразтворителей можно существенно варьировать без значительного изменения их характеристик растворимости и токсичности. Кроме того, идентичность компонентов соразтворителей может варьировать, например, вместо Polysorbate 80™ можно применять другие поверхностно-активные вещества; может варьировать размер фракции полиэтиленгликоля; полиэтиленгликоль можно заменять другими биосовместимыми полимерами, например, поливинилпирролидоном; а также декстрозу можно заменять на другие сахара или полисахариды.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, предусмотренная в данном документе, содержит систему замедленного высвобождения. Неограничивающий пример такой сис-

темы замедленного высвобождения представляет собой полупроницаемую матрицу из твердых гидрофобных полимеров. В определенных вариантах осуществления системы замедленного высвобождения могут, в зависимости от их химической природы, высвобождать фармацевтические средства в течение часов, дней, недель или месяцев.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию, представленную в данном документе, получают для перорального введения. В таких определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию составляют путем комбинирования одного или нескольких соединений, содержащих модифицированный олигонуклеотид с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями. Такие конкретные носители позволяют составлять фармацевтические композиции в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, паст, суспензий и т.п. для перорального приема внутрь субъектом. В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции для перорального применения получены путем смешивания олигонуклеотида и одного или нескольких твердых сред. Подходящие среды включают без ограничения наполнители, такие как сахара, включая лактозу, сахарозу, маннит или сорбит; препараты целлюлозы, такие как, например, кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал, картофельный крахмал, желатин, трагантовую камедь, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, натрий карбоксиметилцеллюлозу и/или поливинилпирролидон (PVP). В определенных вариантах осуществления такая смесь необязательно является измельченной, и необязательно добавляют вспомогательные средства. В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции формируют с получением таблеток или ядер драже. В определенных вариантах осуществления добавляют средства для распада таблеток (например, поперечно-сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновую кислоту, или ее соль, такую как альгинат натрия).

В определенных вариантах осуществления на ядрах драже предусматривается покрытие. В таких определенных вариантах осуществления могут применять концентрированные сахарные растворы, которые необязательно могут содержать гуммиарабик, тальк, поливинилпирролидон, карбопол-гель, полиэтиленгликоль и/или диоксид титана, растворы глазури и подходящие органические растворители или смеси растворителей. В таблетки или покрытия драже могут добавлять красящие вещества или пигменты.

В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции для перорального введения находятся в твердых капсулах, изготовленных из желатина. Некоторые из таких твердых капсул содержат одно или несколько фармацевтических средств согласно настоящему изобретению в смеси с одной или несколькими наполнителями для лекарства, такими как лактоза, связующими веществами, такими как крахмалы, и/или смазывающими веществами, такими как тальк или стеарат магния, и необязательно стабилизаторами. В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции для перорального введения находятся в мягких герметизированных капсулах, изготовленных из желатина и пластификатора, такого как глицерин или сорбит. В конкретных мягких капсулах одно или несколько фармацевтических средств согласно настоящему изобретению растворяют или суспендируют в подходящих жидкостях, таких как жирные масла, вазелиновое масло или жидкие полиэтиленгликоли. К тому же можно добавлять стабилизаторы.

В конкретных вариантах осуществления фармацевтические композиции получают для буккального введения. Некоторые из таких фармацевтических композиций представляют собой таблетки или пастилки, составленные традиционным способом.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию получают для введения путем инъекции (например, внутривенной, подкожной, внутримышечной и т.д.). В таких определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит носитель и составлена в водном растворе, таком как вода или физиологически совместимые буферы, такие как раствор Хенкса, раствор Рингера или физиологический солевой буфер. В определенных вариантах осуществления включают другие ингредиенты (например, ингредиенты которые способствуют растворимости или служат в качестве консервантов). В определенных вариантах осуществления инъекцируемые суспензии получают с применением подходящих жидких носителей, суспендирующих средств и т.п. Некоторые фармацевтические композиции для инъекций представлены в стандартной лекарственной форме, например, в ампулах или в многодозных контейнерах. Некоторые фармацевтические композиции для инъекций являются суспензиями, растворами или эмульсиями в масляных или водных средах и могут содержать средства для составления, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие средства. Некоторые растворители, подходящие для применения в фармацевтических композициях для инъекций, включают без ограничения липофильные растворители и жирные масла, такие как кунжутное масло, сложные эфиры синтетической жирной кислоты, такие как этилолеат или триглицериды, и липосомы. Водные суспензии для инъекции могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, такие как натрий карбоксиметилцеллюлоза, сорбит или декстран. Необязательно такие суспензии могут также содержать подходящие стабилизаторы или средства, которые повышают растворимость фармацевтических средств, что делает возможным получение высококонцентрированных растворов.

В определенных вариантах осуществления получают фармацевтическую композицию для чресслизистого введения. В таких определенных вариантах осуществления применяют в составе смачивающие

средства, соответствующие барьеру, через который они проходят. Такие смачивающие средства, как правило, известны из уровня техники.

В определенных вариантах осуществления один или несколько модифицированных олигонуклеотидов, представленных в данном документе, вводят в виде пролекарственного средства. В определенных вариантах осуществления при введении *in vivo* пролекарственное средство химически или ферментативным путем превращается в биологически, фармацевтически или терапевтически более активную форму олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления применяют пролекарственные средства, поскольку они являются более простыми для введения, чем соответствующая активная форма. Например, в некоторых случаях пролекарственное средство может быть более биодоступным (например, посредством перорального введения), чем соответствующая активная форма. В определенных вариантах осуществления пролекарственные средства обладают превосходной передачей через клеточные мембраны. В определенных вариантах осуществления пролекарственные средства облегчают доставку модифицированного олигонуклеотида в необходимый тип клеток, ткань, или орган. В определенных вариантах осуществления пролекарственное средство представляет собой соединение, содержащее конъюгированный модифицированный олигонуклеотид. В некоторых случаях пролекарственное средство может обладать улучшенной растворимостью по сравнению с соответствующей активной формой. В определенных вариантах осуществления пролекарственные средства менее водорастворимы, чем соответствующая активная форма. В определенных вариантах осуществления пролекарственное средство представляет собой сложный эфир. В таких определенных вариантах осуществления сложный эфир метаболически гидролизуется в карбоновую кислоту при введении. В определенных случаях карбоновая кислота, содержащаяся в соединении, находится в соответствующей активной форме. В определенных вариантах осуществления пролекарственное средство содержит короткий пептид (полиаминокислоту), связанный с кислотной группой. В таких определенных вариантах осуществления пептид расщепляется при введении с образованием соответствующей активной формы.

В определенных вариантах осуществления пролекарственное средство получают путем модифицирования фармацевтически активного соединения так, чтобы активное соединение образовывалось при введении *in vivo*. Пролекарственное средство может быть разработано для изменения метаболической стабильности или транспортных характеристик лекарственного средства, защиты от побочных эффектов или токсичности, для улучшения аромата лекарственного средства или изменения других характеристик или свойств лекарственного средства. В силу знания фармакодинамических процессов и метаболизма лекарственного средства *in vivo* специалист в данной области техники, как только фармацевтически активное соединение стало известно, может разработать пролекарственные средства соединения (см., например, Nogrady (1985) *Medicinal Chemistry A Biochemical Approach*, Oxford University Press, New York, pages 388-392).

#### **Некоторые пути введения**

В определенных вариантах осуществления введение субъекту включает парентеральное введение. В определенных вариантах осуществления введение субъекту включает внутривенное введение. В определенных вариантах осуществления введение субъекту включает подкожное введение.

В определенных вариантах осуществления введение субъекту включает внутриартериальное, ингаляционное, пероральное, ректальное, чресслизистное, интестинальное, энтеральное, местное, трансдермальное, посредством суппозитория, интратекальное, интравентрикулярное, интраперитонеальное, интраназальное, интраокулярное, внутримышечное, внутримозговое и внутриопухольное введение.

#### **Некоторые наборы miR-122**

Настоящее изобретение также предусматривает наборы. В некоторых вариантах осуществления наборы содержат одно или несколько соединений, представленных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления соединение, представленное в данном документе, находится во флаконе. Несколько флаконов, например 10, могут находиться, например, в распределительных упаковках. В некоторых вариантах осуществления флакон изготовлен так, чтобы он был доступным для шприца. Набор также может содержать инструкции для применения соединений, представленных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления наборы можно применять для введения соединения, представленного в данном документе, субъекту. В таких случаях в дополнение к содержанию по меньшей мере одного соединения, представленного в данном документе, набор может дополнительно содержать одно или несколько из следующего: шприц, тампон, пропитанный спиртом, ватный шарик и/или марлевую повязку. В некоторых вариантах осуществления соединения, комплементарные miR-122, могут находиться в предварительно наполненном шприце (например, шприцах с разовой дозой, например, с калибром иглы 27, иглой  $\frac{1}{2}$  дюйма с колпачком иглы), вместо флакона. Несколько предварительно заполненных шприцов, например, 10, могут находиться, например, в распределительных упаковках. Набор также может содержать инструкции для введения соединения, представленного в данном документе.

#### **Некоторые экспериментальные модели**

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривает способы применения и/или тестирования соединения, представленного в данном документе, на экспериментальной модели. Специалисты в данной области техники имеют возможность выбирать и модифицировать про-

токолы для таких экспериментальных моделей для оценки соединения, представленного в данном документе.

Эффекты антисмыслового ингибирования микроРНК после введения соединений anti-miR можно определять с помощью разнообразных способов, известных в данной области техники. В определенных вариантах осуществления такие способы применяют для проведения количественного анализа уровней микроРНК в клетках или тканях *in vitro* или *in vivo*. В определенных вариантах осуществления изменения уровней микроРНК измеряют с помощью микроматричного анализа. В определенных вариантах осуществления изменения уровней микроРНК измеряют с помощью одного или нескольких коммерчески доступных ПЦР-анализов, таких как анализ микроРНК TaqMan® (Applied Biosystems, торговая марка Life Technologies).

*In vitro* активность соединения anti-miR можно определять с применением анализа клеточной культуры с использованием люциферазы. В этом анализе конструктор с люциферазой в качестве датчика для выявления микроРНК конструировали так, чтобы он содержал один или несколько сайтов связывания микроРНК, представляющей интерес, слитых с геном люциферазы. Когда микроРНК связывается с распознаваемым ею сайтом в конструкторе с люциферазой в качестве датчика, экспрессия люциферазы подавляется. Когда соответствующую anti-miR вводили в клетки, она связывалась с целевой микроРНК и ослабляла подавление экспрессии люциферазы. Таким образом, в этом анализе anti-miR, которые являются эффективными ингибиторами микроРНК, представляющей интерес, будут вызывать повышение экспрессии люциферазы.

Активность соединений anti-miR можно определять путем измерения уровня мРНК и/или белка мишени микроРНК. МикроРНК связывается с комплементарным сайтом в одной или нескольких целевых РНК, приводя к подавлению целевой РНК, таким образом ингибирование микроРНК приводит к повышению уровня мРНК и/или белка мишени микроРНК (т.е. дерепрессии). Дерепрессию одной или нескольких целевых РНК можно измерять *in vivo* или *in vitro*. Например, мишенью miR-122 является альдолаза А (ALDOA). Ингибирование miR-122 приводит к повышению уровня ALDOA мРНК, таким образом, уровни ALDOA мРНК можно применять для оценки ингибирующей активности соединения anti-miR-122.

Эффекты соединения anti-miR-122 на репликацию HCV можно измерять в анализе репликаона HCV. В этом анализе соединения вводят в клеточную линию (например, клеточную линию гепатомы человека), которая содержит субгеномный репликаон HCV со стабильным геном-репортером люциферазы и тремя адаптивными мутациями клеточной культуры (luc-ubi-neo/ET). Ген-репортер люциферазы применяют в качестве косвенного показателя репликации HCV. Используемый репликаон может представлять собой исходный генотип HCV или генотип HCV с мутациями, которые обеспечивают устойчивость к противовирусным средствам. Соединения anti-miR-122 можно оценивать отдельно или в комбинации с другими средствами, применяемыми в лечении HCV-инфекции. В некоторых вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид можно тестировать с помощью анализа *in vivo* или *in vitro* и затем конъюгировать с образованием соединения для применения в способах, описанных в данном документе.

### Примеры

Следующие примеры представлены для того, чтобы более полно проиллюстрировать некоторые варианты осуществления настоящего изобретения. Однако их не следует рассматривать как ограничивающие широкий объем настоящего изобретения. Специалистам в данной области техники будет легко позаимствовать основополагающие принципы данного открытия для разработки различных соединений без отклонения от сущности настоящего изобретения.

#### Пример 1. Разработка и оценка соединений anti-miR-122

Для идентификации сильных ингибиторов miR-122 разрабатывали и синтезировали множество модифицированных олигонуклеотидов anti-miR-122. Модифицированные олигонуклеотиды варьировали по длине, а также по числу, расположению и идентичности бициклических нуклеозидов и небиициклических нуклеозидов. Соединения оценивали с помощью множества анализов для идентификации anti-miR, являющихся подходящими терапевтическими средствами для лечения инфекции HCV. Оценку соединений выполняли итерационным способом, в котором высокоактивные соединения дополнительно оптимизировали посредством разработки изменений, и полученные соединения затем подвергали дополнительному скринингу. Способ оценки соединения включал определение активности, безопасности и физико-химических характеристик.

В целом более 400 модифицированных олигонуклеотидов anti-miR-122 разрабатывали и тестировали в первом анализе активности клеточной культуры с применением люциферазы. После дополнительного анализа с применением люциферазы и для измерения уровня метаболической стабильности некоторых соединений приблизительно 70 из этих соединений отбирали для дальнейшего тестирования *in vivo*. Из этих 70 соединений приблизительно 10 соединений идентифицировали как обладающие подходящей активностью *in vivo* (например, ED<sub>50</sub> менее чем 5 мг/кг). Подгруппу этих соединений идентифицировали как обладающие определенным профилем безопасности у грызунов и отличных от человека приматов. Таким образом, из сотен соединений, подвергнутых скринингу, только небольшая подгруппа из первоначально более 400 соединений соответствовала определенной активности, безопасности и физико-

химическим критериям.

Определенные соединения anti-miR-122 показаны в табл. А. "Положение на miR-122" представляет собой положение, в котором нуклеозид в этой колонке комплементарен SEQ ID NO: 1, считая от 5'-конца SEQ ID NO: 1.

Таблица А. Определенные соединения Anti-miR-122

№ соед.	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ (5'-3') и МОДИФИКАЦИИ																				SEQ ID NO		
	22	21	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3		2	1
Положение на miR-122																							
38011							C <sub>S</sub>	C	A	U <sub>S</sub>	T	G <sub>S</sub>	U <sub>S</sub>	C	A	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	T	C <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A	3
38012							C <sub>S</sub>	C	A <sub>S</sub>	T	T	G	U <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	T	C <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A	3
38013							C <sub>S</sub>	C	A	U <sub>S</sub>	T	G <sub>S</sub>	T	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	T	C <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A	3
38014							C <sub>S</sub>	C	A	U <sub>S</sub>	T	G <sub>S</sub>	U <sub>S</sub>	C	A	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	T	C <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A <sub>E</sub>	3
38015							MeC <sub>S</sub>	C	A	T <sub>S</sub>	T	G <sub>S</sub>	T <sub>S</sub>	C	A	MeC <sub>S</sub>	A	MeC <sub>S</sub>	T	MeC <sub>S</sub>	MeC <sub>S</sub>	A <sub>E</sub>	3
38016							MeC <sub>S</sub>	C	A	T <sub>S</sub>	T	G	T <sub>S</sub>	MeC <sub>S</sub>	A	MeC <sub>S</sub>	A	MeC <sub>S</sub>	T	MeC <sub>S</sub>	MeC <sub>S</sub>	A <sub>E</sub>	3
38021							C <sub>L</sub>	C	A	T <sub>L</sub>	T	G	T <sub>L</sub>	C <sub>L</sub>	A	C <sub>L</sub>	A	C <sub>L</sub>	T	C <sub>L</sub>	C <sub>L</sub>		4
38646				A <sub>E</sub>	MeC <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	MeC <sub>E</sub>	C	A <sub>S</sub>	T	T	G	U <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	T	C <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>		4
38647				A <sub>E</sub>	MeC <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	MeC <sub>E</sub>	MeC <sub>E</sub>	A <sub>S</sub>	T	T	G	U <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	T	C <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>		4
38648				A <sub>E</sub>	MeC <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	MeC <sub>E</sub>	MeC <sub>E</sub>	A <sub>S</sub>	T	T	G	U <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	T	C <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>		4
38649				A <sub>E</sub>	MeC <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	MeC <sub>E</sub>	MeC <sub>E</sub>	A <sub>S</sub>	T <sub>E</sub>	T	G	U <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	T	C <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>		4
38650				A <sub>E</sub>	MeC <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	MeC <sub>E</sub>	MeC <sub>E</sub>	A <sub>S</sub>	T <sub>E</sub>	T <sub>E</sub>	G	U <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	T	C <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>		4
38651				A <sub>E</sub>	MeC <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	MeC <sub>E</sub>	MeC <sub>E</sub>	A <sub>S</sub>	T <sub>E</sub>	T <sub>E</sub>	G <sub>E</sub>	U <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	T	C <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>		4
38652	MeC <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	MeC <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	C <sub>S</sub>	C	A <sub>S</sub>	T	T	G	U <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	T	C <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>		5
38660	MeC <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	MeC <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	C <sub>S</sub>	C	A <sub>S</sub>	T	T	G	U <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	T	C <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	T <sub>E</sub>	6
38872							C <sub>S</sub>	C	A	U <sub>S</sub>	T	G	U <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	T	C <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A	3
38910							MeC <sub>E</sub>	C <sub>S</sub>	A	U <sub>S</sub>	T	G	U <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	T	C <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A <sub>E</sub>	3

Сахарные фрагменты обозначаются следующим образом: нуклеозиды без последующего нижнего индекса обозначают β-D-дезоксирибонуклеозиды; нуклеозиды с последующим нижним индексом "E" обозначают 2'-МОЕ-нуклеозиды; нуклеозиды с последующим нижним индексом "S" обозначают S-cEt-нуклеозиды; нуклеозиды с последующим нижним индексом "L" обозначают LNA-нуклеозиды. Каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную межнуклеозидную связь. Верхний индекс "Me" обозначает 5-метильную группу при основании нуклеозида.

#### Активность

##### Активность in vitro и in vivo

Анализ с применением люциферазы in vitro применяли для измерения способности каждого соединения ингибировать активность miR-122 в клеточной культуре. В этом анализе конструктор с люциферазой в качестве датчика для выявления микроРНК конструировали так, чтобы он содержал несколько сайтов связывания miR-122, слитых с геном люциферазы. Когда miR-122 связывается с распознаваемыми ею целевыми сайтами в конструкторе с люциферазой в качестве датчика, экспрессия люциферазы подавляется. Когда активное соединение anti-miR-122 вводят в клетки, оно связывается с miR-122 и ослабляет подавление экспрессии люциферазы. Таким образом, в данном анализе соединения anti-miR-122, которые являются эффективными ингибиторами miR-122, будут вызывать повышение экспрессии люциферазы.

Конструктор с люциферазой в качестве датчика и второй конструктор, экспрессирующий miR-122, вводили в клетки Hela. Клетки трансфицировали соединениями anti-miR-122 при нескольких различных концентрациях. Соединения с EC<sub>50</sub> менее чем 100 нМ подвергали дополнительному анализу с применением люциферазы при более широком диапазоне концентраций anti-miR, чем в первоначальном анализе с применением люциферазы, для подтверждения активности. Соединения тестировали в двух отдельных экспериментах, как указано в табл. В. Среднее значение EC<sub>50</sub> для каждого соединения показано в табл. В.

Результаты демонстрируют, что изменения сахарного фрагмента или нуклеотидного основания могут влиять на активность соединения anti-miR-122 in vitro.

Таблица В. Среднее значение EC<sub>50</sub> в анализе клеточной культуры с применением люциферазы

№ соединения	Последовательность и химический состав	SEQ ID NO	№ эксперимента	Анализ с применением люциферазы, среднее значение EC <sub>50</sub>	
38011	C <sub>5</sub> CAU <sub>5</sub> TG <sub>5</sub> U <sub>5</sub> CAC <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> TC <sub>5</sub> C <sub>5</sub> A	3	1	38,45	
38012	C <sub>5</sub> CA <sub>5</sub> TTGU <sub>5</sub> C <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> TC <sub>5</sub> C <sub>5</sub> A	3	1	43,78	
38013	C <sub>5</sub> CAU <sub>5</sub> TG <sub>5</sub> TC <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> TC <sub>5</sub> C <sub>5</sub> A	3	1	53,27	
38014	C <sub>5</sub> CAU <sub>5</sub> TG <sub>5</sub> U <sub>5</sub> CAC <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> TC <sub>5</sub> C <sub>5</sub> A <sub>E</sub>	3	1	42,71	
38015	<sup>Me</sup> C <sub>5</sub> CAT <sub>5</sub> TG <sub>5</sub> T <sub>5</sub> CA <sup>Me</sup> C <sub>5</sub> A <sup>Me</sup> C <sub>5</sub> T <sup>Me</sup> C <sub>5</sub> <sup>Me</sup> C <sub>5</sub> A <sub>E</sub>	3	1	42,40	
38016	<sup>Me</sup> C <sub>5</sub> CAT <sub>5</sub> TGT <sub>5</sub> <sup>Me</sup> C <sub>5</sub> A <sup>Me</sup> C <sub>5</sub> A <sup>Me</sup> C <sub>5</sub> T <sup>Me</sup> C <sub>5</sub> <sup>Me</sup> C <sub>5</sub> A <sub>E</sub>	3	1	14,07	
38021	<sup>Me</sup> C <sub>1</sub> CAT <sub>1</sub> TGT <sub>1</sub> <sup>Me</sup> C <sub>1</sub> A <sup>Me</sup> C <sub>1</sub> A <sup>Me</sup> C <sub>1</sub> T <sup>Me</sup> C <sub>1</sub> <sup>Me</sup> C <sub>1</sub> A <sub>E</sub>	3	1	11,18	
38872	C <sub>5</sub> CAU <sub>5</sub> TGU <sub>5</sub> C <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> TC <sub>5</sub> C <sub>5</sub> A	3	2	18,3	
38910	<sup>Me</sup> CC <sub>5</sub> AU <sub>5</sub> TGU <sub>5</sub> C <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> TC <sub>5</sub> C <sub>5</sub> A <sub>E</sub>	3	Не тестировали		
38646	A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> CA <sub>5</sub> TTGU <sub>5</sub> C <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> TC <sub>5</sub> C <sub>5</sub>	4	2	77,15	
38647	A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>5</sub> TTGU <sub>5</sub> C <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> TC <sub>5</sub> C <sub>5</sub>	4	2	57,44	
38648	A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> TTGU <sub>5</sub> C <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> TC <sub>5</sub> C <sub>5</sub>	4	2	97,68	
38649	A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> T <sub>E</sub> TGU <sub>5</sub> C <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> TC <sub>5</sub> C <sub>5</sub>	4	2	46,76	
38650	A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> T <sub>E</sub> T <sub>E</sub> GU <sub>5</sub> C <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> TC <sub>5</sub> C <sub>5</sub>	4	2	28,16	
38651	A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> T <sub>E</sub> T <sub>E</sub> G <sub>E</sub> U <sub>5</sub> C <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> TC <sub>5</sub> C <sub>5</sub>	4	2	26,12	
38652	<sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> A <sub>E</sub> A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> C <sub>5</sub> CA <sub>5</sub> TTGU <sub>5</sub> C <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> TC <sub>5</sub> C <sub>5</sub>	5	2	31,86	
38659	C <sub>5</sub> CA <sub>5</sub> TTGU <sub>5</sub> C <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> TC <sub>5</sub> C <sub>5</sub> T <sub>E</sub>	10	2	130,01	
38660	<sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> A <sub>E</sub> A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> C <sub>5</sub> CA <sub>5</sub> TTGU <sub>5</sub> C <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> TC <sub>5</sub> C <sub>5</sub> T <sub>E</sub>	6	2	17,02	

Для определения активности *in vivo* некоторые соединения оценивали в отношении их способности дерепрессировать экспрессию альдозы А (ALDOA) печени, гена, который в норме подавляется при активности miR-122. Ингибирование miR-122 приводит к повышению экспрессии ALDOA, таким образом уровни мРНК ALDOA можно применять для измерения ингибирующей активности miR-122 *in vivo*. Соединения вводили мышам в однократной дозе в количествах, указанных в табл. С, и через 7 дней исследование прекращали и измеряли уровни мРНК ALDOA с помощью количественной ПЦР в РНК, выделенной из печени. За исключением соединения 38910 каждое соединение в табл. С тестировали в одном и том же исследовании. Кратное изменение уровня мРНК ALDOA по отношению к солевому раствору вычисляли для определения активности *in vivo* ("ND" обозначает "не определено").

Таблица С. Сравнение структуры и активности соединений anti-miR-122

№ соединения	Последовательность и химический состав	SEQ ID	Кратное изменение ALDOA по отношению к солевому раствору		
			1 мг/кг	3 мг/кг	10 мг/кг
38011	C <sub>5</sub> CAU <sub>5</sub> TG <sub>5</sub> U <sub>5</sub> CAC <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> TC <sub>5</sub> C <sub>5</sub> A	3	1,47	2,10	3,89
38012	C <sub>5</sub> CA <sub>5</sub> TTGU <sub>5</sub> C <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> TC <sub>5</sub> C <sub>5</sub> A	3	1,79	4,69	4,57
38013	C <sub>5</sub> CAU <sub>5</sub> TG <sub>5</sub> TC <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> TC <sub>5</sub> C <sub>5</sub> A	3	1,31	1,61	2,55
38014	C <sub>5</sub> CAU <sub>5</sub> TG <sub>5</sub> U <sub>5</sub> CAC <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> TC <sub>5</sub> C <sub>5</sub> A <sub>E</sub>	3	1,16	1,82	2,94
38015	<sup>Me</sup> C <sub>5</sub> CAT <sub>5</sub> TG <sub>5</sub> T <sub>5</sub> CA <sup>Me</sup> C <sub>5</sub> A <sup>Me</sup> C <sub>5</sub> T <sup>Me</sup> C <sub>5</sub> <sup>Me</sup> C <sub>5</sub> A <sub>E</sub>	3	1,43	1,64	1,82
38016	<sup>Me</sup> C <sub>5</sub> CAT <sub>5</sub> TGT <sub>5</sub> <sup>Me</sup> C <sub>5</sub> A <sup>Me</sup> C <sub>5</sub> A <sup>Me</sup> C <sub>5</sub> T <sup>Me</sup> C <sub>5</sub> <sup>Me</sup> C <sub>5</sub> A <sub>E</sub>	3	1,43	2,34	4,18
38021	<sup>Me</sup> C <sub>1</sub> CAT <sub>1</sub> TGT <sub>1</sub> <sup>Me</sup> C <sub>1</sub> A <sup>Me</sup> C <sub>1</sub> A <sup>Me</sup> C <sub>1</sub> T <sup>Me</sup> C <sub>1</sub> <sup>Me</sup> C <sub>1</sub> A <sub>E</sub>	3	1,46	3,01	3,91
38872	C <sub>5</sub> CAU <sub>5</sub> TGU <sub>5</sub> C <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> TC <sub>5</sub> C <sub>5</sub> A	3	1,80	4,04	4,89
38910	<sup>Me</sup> CC <sub>5</sub> AU <sub>5</sub> TGU <sub>5</sub> C <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> TC <sub>5</sub> C <sub>5</sub> A <sub>E</sub>	3	ND	2,35	3,26

Как можно видеть в табл. С, одиночные изменения в расположении сахарного фрагмента или нуклеотидного основания могут оказывать влияние на активность *in vivo*. Например, единственным отличием между 38872 и 38011 является расположение сEt-сахарного фрагмента, однако активность *in vivo* 0011 существенно ниже, чем таковая 38872, с относительным уровнем дерепрессии ALDOA, достигаемым только при более высокой дозе 10 мг/кг 38011 по сравнению с дозой 3 мг/кг для соединения 38872. Со-

единение 38021 по сравнению с 38016 содержит LNA вместо сEt-сахарных фрагментов и характеризуется активностью, подобной 38016, таким образом это отличие не влияло на активность. Из этой группы соединений соединения 38012, 38016, 38021 и 38872 идентифицировали как активные соединения.

Дополнительные исследования выполняли для оценки определенных дополнительных соединений anti-miR-122. Результаты этих исследований показаны в табл. D. Соединения 38646, 38647, 38648, 38649, 38650, 38651 и 38652 тестировали вместе в одном исследовании *in vivo* и соединения 38659 и 38660 тестировали вместе в другом исследовании *in vivo*.

Таблица D. Сравнение структуры и активности соединений anti-miR-122

№ соединения	Последовательность и структура	SEQ ID	Анализ с применением люциферазы, среднее значение EC <sub>50</sub>	Кратное изменение ALDOA по отношению к солевому раствору	
				3 мг/кг	10 мг/кг
38646	A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> CA <sub>S</sub> TTGU <sub>S</sub> C <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> TC <sub>S</sub> C <sub>S</sub> --	4	77,15	ND	ND
38647	A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>S</sub> TTGU <sub>S</sub> C <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> TC <sub>S</sub> C <sub>S</sub> --	4	57,44	2,61	4,81
38648	A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> TTGU <sub>S</sub> C <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> TC <sub>S</sub> C <sub>S</sub> --	4	97,68	3,28	4,36
38649	A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> TE <sub>E</sub> TTGU <sub>S</sub> C <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> TC <sub>S</sub> C <sub>S</sub> --	4	46,76	2,84	4,46
38650	A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> TE <sub>E</sub> TE <sub>E</sub> TTGU <sub>S</sub> C <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> TC <sub>S</sub> C <sub>S</sub> --	4	28,16	1,51	2,03
38651	A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> TE <sub>E</sub> TE <sub>E</sub> GU <sub>S</sub> C <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> TC <sub>S</sub> C <sub>S</sub> --	4	26,12	1,26	1,46
38652	<sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> A <sub>E</sub> A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> C <sub>S</sub> CA <sub>S</sub> TTGU <sub>S</sub> C <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> TC <sub>S</sub> C <sub>S</sub> --	5	31,86	1,86	4,27
38659	C <sub>S</sub> CA <sub>S</sub> TTGU <sub>S</sub> C <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> TC <sub>S</sub> C <sub>S</sub> TE	10	130,01	4,44	4,82
38660	<sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> A <sub>E</sub> A <sub>E</sub> <sup>Me</sup> C <sub>E</sub> A <sub>E</sub> C <sub>S</sub> CA <sub>S</sub> TTGU <sub>S</sub> C <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> AC <sub>S</sub> TC <sub>S</sub> C <sub>S</sub> TE	6	17,02	3,84	4,44

Как указано выше, эти данные показывают, что одиночные изменения относительно расположения сахарного фрагмента могут оказывать существенное влияние на активность *in vivo*. Кроме того, показано, что активности *in vitro* и *in vivo* не обязательно коррелируют. Например, соединение 38659 характеризуется низкой активностью *in vitro*, но представляет собой очень сильный ингибитор miR-122 *in vivo*.

Сравнения структур соединений anti-miR-122 и активности *in vivo* выявили, что коровая последовательность 11 нуклеотида характерна для группы активной anti-miR-122. Эта коровая последовательность, где В-D-дезоксисахарные фрагменты и бициклические сахарные фрагменты находятся в одном и том же положении на последовательности нуклеотида anti-miR-122, выделена в табл. D-2. Коровая нуклеотидная последовательность 11 нуклеотида комплементарна нуклеотидным основаниям 2-12 miR-122 (SEQ ID NO: 1).

Таблица D-2. Сильные модифицированные олигонуклеотиды anti-miR-122 с одинаковой коровой последовательностью

№ соед.	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ (5'-3') и СТРУКТУРА																			SEQ ID NO			
	22	21	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4		3	2	1
Положение на miR-122																							
38012							C <sub>S</sub>	C	A <sub>S</sub>	T	T	G	U <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	T	C <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A	3
38016							<sup>Me</sup> C <sub>E</sub>	C	A	T <sub>S</sub>	T	G	T <sub>S</sub>	<sup>Me</sup> C <sub>E</sub>	A	<sup>Me</sup> C <sub>E</sub>	A	<sup>Me</sup> C <sub>E</sub>	T	<sup>Me</sup> C <sub>E</sub>	<sup>Me</sup> C <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	3
38021							C <sub>L</sub>	C	A	T <sub>L</sub>	T	G	T <sub>L</sub>	C <sub>L</sub>	A	C <sub>L</sub>	A	C <sub>L</sub>	T	C <sub>L</sub>	C <sub>L</sub>	A	4
38646					A <sub>E</sub>	<sup>Me</sup> C <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	<sup>Me</sup> C <sub>E</sub>	C	A <sub>S</sub>	T	T	G	U <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	T	C <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	4
38647					A <sub>E</sub>	<sup>Me</sup> C <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	<sup>Me</sup> C <sub>E</sub>	<sup>Me</sup> C <sub>E</sub>	A <sub>S</sub>	T	T	G	U <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	T	C <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	4
38648					A <sub>E</sub>	<sup>Me</sup> C <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	<sup>Me</sup> C <sub>E</sub>	<sup>Me</sup> C <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	T	T	G	U <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	T	C <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	4
38649					A <sub>E</sub>	<sup>Me</sup> C <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	<sup>Me</sup> C <sub>E</sub>	<sup>Me</sup> C <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	TE	T	G	U <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	T	C <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	4
38652	<sup>Me</sup> C <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	<sup>Me</sup> C <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	C <sub>S</sub>	C	A <sub>S</sub>	T	T	G	U <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	T	C <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>		5
38659							C <sub>S</sub>	C	A <sub>S</sub>	T	T	G	U <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	T	C <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	TE	10
38660	<sup>Me</sup> C <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	<sup>Me</sup> C <sub>E</sub>	A <sub>E</sub>	C <sub>S</sub>	C	A <sub>S</sub>	T	T	G	U <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	T	C <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	TE	6
38872							C <sub>S</sub>	C	A	U <sub>S</sub>	T	G	U <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	T	C <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A	3
38910							<sup>Me</sup> C <sub>E</sub>	C <sub>S</sub>	A	U <sub>S</sub>	T	G	U <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	A	C <sub>S</sub>	T	C <sub>S</sub>	C <sub>S</sub>	A <sub>E</sub>	3

Эти данные показывают открытие определенного корового нуклеотидного паттерна, что позволяет получить сильный ингибитор miR-122 *in vivo*.

### Исследования репликона HCV

Анализ репликона HCV использовали для определения способности соединения anti-miR-122 ингибировать репликацию HCV, включая исходные генотипы HCV и генотипы HCV с мутациями, которые обеспечивают устойчивость к противовирусным средствам. Соединение 38649 тестировали в данном анализе для определения его способности ингибировать репликацию субгеномных репликонов HCV генотипа 1a (штамм H77), генотипа 1b и нескольких вариантов генотипа 1b (A156T, A156S, D168a и V36M).

Клеточная линия, используемая для этого анализа, представляла собой клеточную линию ET, клеточную линию гепатомы человека Huh7, которая содержит субгеномный репликон HCV со стабильным геном-репортером люциферазы и тремя адаптивными мутациями клеточной культуры (luc-ubi-neo/ET). Ген-репортер люциферазы применяют в качестве косвенного показателя репликации HCV. С помощью противовирусного анализа оценки репликона HCV изучали эффекты соединения при 6,5- $\log$  концентрациях каждого соединения. Интерферон альфа-2b человека включали в качестве соединения для положительного контроля. Субконфлюэнтные культуры линии ET высевали в 96-луночные планшеты и на следующий день клетки трансфицировали соединением anti-miR-122 с катионным липидом. Клетки обрабатывали через 72 ч, когда клетки были все еще субконфлюэнтными. Уровни репликона HCV определяли как активность люциферазы, полученную на основе РНК репликона HCV.  $EC_{50}$  (концентрация, при которой наблюдали 50% ингибирования) вычисляли для каждого генотипа HCV, и она показана в табл. Е. Также вычисляли индекс избирательности ( $SI_{50}$ , соотношение  $EC_{50}$  репликации вируса и  $EC_{50}$  природной цитотоксичности), и он показан в табл. Е.

Таблица Е. Противовирусная активность соединения 38649

Генотип HCV	Противовирусная активность $EC_{50}$ (нМ)	Индекс избирательности $SI_{50}$
Генотип 1b HCV	57,8 нМ	4,0
Вариант V36M генотипа 1b HCV	139,6 нМ	>2,0
Мутантный A156S HCV	45,9 нМ	5,7
Мутантный A156T HCV	26,7 нМ	10,0
Мутантный D168A HCV	16,2 нМ	12,0
Генотипа 1a HCV (штамм H77)	14,1 нМ	15,0

Результаты анализа репликона показывают противовирусную активность соединения 38649 против нескольких генотипов HCV. Противовирусную активность поддерживали в течение периода времени, за которое выполняли анализ (18 дней). Активность соединения 38649 подобным образом устойчива к репликонам HCV, содержащим мутации, которые, как известно, устойчивы к определенным ингибиторам протеаз, которые назначают для лечения инфекции HCV.

### Исследования однократной дозы Anti-miR-122

Соединение 38649 тестировали в исследовании однократной дозы у мышей для определения начала действия, максимальной депрессии мишени и продолжительности действия при дозах, находящихся в диапазоне от 0,3 до 30 мг/кг. Из этого исследования также вычисляли  $ED_{50}$ .

Соединение Anti-miR вводили интраперитонеально каждой группе из 5 мышей в дозах 0,3, 1,0, 3,0, 10 и 30 мг/кг. В случае доз 0,3 и 1,0 группы животных умерщвляли на дни 3, 7 и 28. В случае доз 3,0, 10 и 30 мг/кг группы животных умерщвляли на дни 3, 5, 7, 14, 21 и 28. Уровни мРНК ALDOA в печени измеряли с помощью количественной ПЦР и сравнивали с уровнями мРНК ALDOA в печени мышей, обработанных солевым раствором, для вычисления кратного изменения экспрессии ALDOA.

Как показано на фиг. 1А, дерепрессию ALDOA наблюдали уже на день 3 и поддерживали в течение 28 дней после дозирования соединения 38649. Максимальную дерепрессию мишени достигали при 10 мг/кг.  $ED_{50}$  6,7 мг/кг вычисляли из данных дня 7 (фиг. 1В).

### Физико-химические характеристики

Оценка физико-химических характеристик может включать измерение уровня вязкости для определения, является ли раствор anti-miR подходящим для введения посредством определенных типов парентерального введения, например подкожного введения; вычисление времени полужизни anti-miR в печени для оценки частоты, при которой соединение anti-miR-122 можно вводить субъектам-людям; и анализ метаболической стабильности для идентификации соединения, которое может подвергаться расщеплению нуклеазами.

Метаболическую стабильность оценивали с помощью инкубирования соединения anti-miR-122 с лизатом печени отличного от человека примата. Активность нуклеаз в гомогенате ткани печени подтверждали с помощью применения эталонных олигонуклеотидов, которые включали соединение с известной устойчивостью к активности нуклеаз, соединение, чувствительное к активности 3'-экзонуклеаз и соединение, чувствительное к активности эндонуклеаз. Соединение внутреннего стандарта применяли

для контроля эффективности экстракции. В моменты времени 0 и 24 ч каждый образец подвергали высокоэффективной жидкостной хроматографии/времяпролетной масс-спектрометрии (HPLC-TOF MS) для измерения длины и количества олигонуклеотидов. Процентную долю потерь определяли путем сравнения количества соединения полной длины в моменты времени 0 и 24 ч. Соединения 38646, 38647, 38648, 38649, 38650, 38651, 38652, 38659 и 38660 проявляли процентную долю потерь 10% или менее в момент времени 24 ч. Соединение 38012 проявляло процентную долю потерь приблизительно 50% в момент времени 24 ч.

Дополнительное исследование однократной дозы выполняли у мышей для оценки периода полувыведения соединения 38649. Период полувыведения из печени по оценкам должен был составлять по меньшей мере две недели.

#### Безопасность

Для определения различных параметров безопасности у грызунов выполняли исследование *in vivo* для определенных соединений, описанных в данном документе, для оценки потенциала соединения для вызова провоспалительного ответа. Определяемые параметры включали изменения масс органов, таких как масса селезенки и масса печени, и экспрессию интерферон-индуцибельных генов, таких как IFIT и OASL, в печени. Также оценивали химические составы сыворотки. Дополнительно для определенных соединений оценивали параметры безопасности у отличных от человека приматов и включали гематологические конечные показатели, химический состав сыворотки, массы органов, коагулирование, активацию комплемента, изменения уровней цитокина/хемокина и экспрессию провоспалительного гена.

Поскольку тестируемые соединения проявляли некоторую изменчивость среди оцениваемых параметров безопасности, было установлено, что несколько соединений, включая соединение 38649, имеют особенно подходящие профили безопасности.

##### Пример 2. Конъюгированные модифицированные олигонуклеотиды anti-miR-122

Модифицированные олигонуклеотиды anti-miR-122 конъюгировали с GalNAc-содержащим фрагментом для определения, будет ли конъюгирование улучшать активность олигонуклеотидов.

GalNAc-содержащие соединения образовывали путем конъюгирования структуры на фиг. 2 с 3'-концом модифицированного олигонуклеотида 38649. Связь между GalNAc-содержащим фрагментом и 3'-концом 38649 изменяли, как показано в табл. F-1. Например, в соединении 38368 GalNAc-содержащий фрагмент является непосредственно связанным с 3'-концевым нуклеозидом 38649 с помощью фосфодиэфирной связи, как показано на фиг. 3C, где X представляет собой фосфодиэфирную связь, и MO представляет собой соединение 38649. В соединении 38458 GalNAc-содержащий фрагмент связан с 3'-концевым нуклеозидом 38649 посредством  $\beta$ -D-дезоксинуклеозида, с помощью фосфотиоатной связи между 3'-концевым нуклеозидом 38649 и с помощью фосфодиэфирной связи между  $\beta$ -D-дезоксинуклеозидом и GalNAc-содержащим фрагментом, как показано на фиг. 3A, где X<sub>2</sub> представляет собой фосфотиоатную связь, m равняется 1, N<sub>m</sub> представляет собой  $\beta$ -D-дезоксинуклеозид, X<sub>1</sub> представляет собой фосфодиэфирную связь, и MO представляет собой соединение 38649.

Таблица F-1. GalNAc-содержащие соединения

№ соединения	Структура соединения
38368	Структура III на фигуре 3С, где X представляет собой фосфоэфирную связь, и MO представляет собой соединение 38649
38371	Структура III на фигуре 3С, где X представляет собой фосфотиоатную связь, и MO представляет собой соединение 38649
38458	Структура I на фигуре 3А, где X <sub>2</sub> представляет собой фосфотиоатную связь, m равняется 1, N <sub>m</sub> представляет собой β-D-дезоксинуклеозид, X <sub>1</sub> представляет собой фосфоэфирную связь, и MO представляет собой соединение 38649
38459	Структура I на фигуре 3А, где X <sub>2</sub> представляет собой фосфоэфирную связь, m равняется 1, N <sub>m</sub> представляет собой β-D-дезоксинуклеозид (dA), X <sub>1</sub> представляет собой фосфоэфирную связь, и MO представляет собой соединение 38649
38597	Структура I на фигуре 3А, где X <sub>2</sub> представляет собой фосфотиоатную связь, m равняется 1, N <sub>m</sub> представляет собой 2'-O-метоксиэтилнуклеозид, X <sub>1</sub> представляет собой фосфоэфирную связь, и MO представляет собой соединение 38649
38598	Структура I на фигуре 3А, где X <sub>2</sub> представляет собой фосфотиоатную связь, m равняется 1, N <sub>m</sub> представляет собой X <sub>1</sub> представляет собой фосфоэфирную связь, и MO представляет собой соединение 38649

GalNAc-конъюгированные модифицированные олигонуклеотиды оценивали в отношении активности *in vivo*, высвобождения неконъюгированного модифицированного олигонуклеотида из GalNAc-конъюгированного модифицированного олигонуклеотида и концентрации в печени и тканях.

Исследования в отношении активности проводили в соответствии с протоколом, используемым для оценки неконъюгированных модифицированных олигонуклеотидов, описанных выше. Соединение инъектировали мышам и на день 7 определяли активность *in vivo* путем измерения депрессии ALDOA. Дозировки конъюгированных соединений обозначают дозировки вводимого модифицированного олигонуклеотида.

Как показано на фиг. 4, каждый из трех тестируемых GalNAc-конъюгированных модифицированных олигонуклеотидов был более сильным, чем неконъюгированный модифицированный олигонуклеотид. Соединения 38368 и 38371 проявляли повышение активности приблизительно в 3 раза по отношению к неконъюгированному 38649 (фиг. 4А). Соединения 38458 и 38459, каждое из которых содержит связующую группу β-D-деоксирибонуклеозида, проявляли повышение активности по меньшей мере в 10 раз (фиг. 4В). Соединения 38597 и 38598, каждое из которых содержит связующую группу 2'-сахара, также проявляли повышение активности по меньшей мере в 10 раз (фиг. 4С). В дополнительных исследованиях повышения активности до 20 раз наблюдали для соединений 38459, 38458, 38597 и 38598.

Дополнительный эксперимент проводили для включения более широкого диапазона доз соединения 38459. Соединение 38459 (n=6) или соединение 38649 (n=3) вводили мышам и через семь дней измеряли уровни ALDOA в печени и уровни холестерина в крови. Вычисляли средний уровень ALDOA и уровни холестерина, которые показаны в табл. F-2. Как показано в табл. F-2, однократная подкожная доза соединения 38459 проявляла увеличенную активность по отношению к неконъюгированному соединению 38649, в отношении увеличения уровней ALDOA и снижения уровней холестерина. В этом эксперименте вычисленное значение ED<sub>50</sub> для соединения 38459 составляло 0,19 мг/кг, и вычисленное значение ED<sub>50</sub> для соединения 38649 составляло 3,5 мг/кг (отличие активности в 18 раз).

Таблица F-2. Увеличенная активность конъюгированного соединения anti-miR-122

Соединение	Доза	ALDOA Кратное изменение	Холестерин мг/дл
38649 (неконъюгированный)	1,0 мг/кг	1,2	100,2
	3,0 мг/кг	2,2	81,2
	10 мг/кг	3,3	73,4
38459 (GalNAc- конъюгированный)	0,03 мг/кг	1,1	95,4
	0,1 мг/кг	1,7	84,4
	0,3 мг/кг	2,8	74
	1 мг/кг	3,5	59,2
	3 мг/кг	3,8	61,8
	10 мг/кг	3,8	61,4

Также измеряли количество неконъюгированного модифицированного олигонуклеотида в ткани печени и почек через 7 дней после однократной подкожной дозы соединений 38368 и 38371 при дозах 1 и 3 мг/кг и соединений 38458 и 38459 при дозах 0,3, 1 и 3 мг/кг. Каждый образец подвергали высокоэффективной жидкостной хроматографии/времетрающей масс-спектрометрии (HPLC-TOF MS) для измерения длины и количества олигонуклеотидов. Нижний предел количественного определения (LLOQ) с помощью этого способа составлял 0,2-1,0 мкг/г.

Было обнаружено, что GalNAc-конъюгированные модифицированные олигонуклеотиды имеют различные скорости образования неконъюгированного модифицированного олигонуклеотида. Например, после введения соединения 38368 менее чем 10% соединения 38649 (неконъюгированный модифицированный олигонуклеотид) обнаруживали в печени. После введения соединения 38371 соединение 38649 не обнаруживали в печени при любой дозе соединения 38371. Напротив, через 7 дней после подкожного введения соединения 38459 единственным обнаруживаемым видом неконъюгированного модифицированного олигонуклеотида был 38649; исходное соединение 38459 не обнаруживали. После введения соединения 38458 неконъюгированный модифицированный олигонуклеотид обнаруживали в двух формах: 38649, а также 38649-PO-A (метаболит соединения 38458). Этот метаболит обнаруживали при более высоких уровнях, чем неконъюгированный 38649.

Также измеряли количество неконъюгированного модифицированного олигонуклеотида в печени через 24 часа после однократной подкожной дозы соединений 38458 и 38459 при дозах 0,3, 1 и 3 мг/кг. Уровень anti-miR измеряли при помощи LC-TOF. Нижний предел количественного определения (LLOQ) с помощью этого способа составлял 0,2-1,0 мкг/г. Наблюдали, что после введения соединения 38459 90% от общего количества соединения, присутствующего в печени, составляло неконъюгированное соединение 38649. После введения 38458 приблизительно 46% от общего количества соединения, присутствующего в печени, составляло неконъюгированное соединение 38649. Таким образом, неконъюгированное соединение 38649 быстрее высвобождалось из соединения 38459, чем из соединения 38458. Эти данные позволяют предположить, что на метаболизм конъюгированного соединения оказывает влияние присоединение между линкером и модифицированным олигонуклеотидом.

Олигонуклеотиды, как правило, накапливаются в самых высоких уровнях в ткани почек, а затем в ткани печени. Для определения, являлся ли GalNAc-конъюгат причиной изменения накопления соединения в ткани печени по сравнению с тканью почек по отношению к неконъюгированному соединению, количество неконъюгированного 38649 также измеряли в ткани почек. Как описано выше, после введения соединения 38459 100% от общего количества соединения, обнаруженного в печени, составлял неконъюгированный 38649, указывая на полное высвобождение 38649 из GalNAc-конъюгированного соединения 38459. После введения соединения 38459 соединение 38649 меньше накапливалось в почках по сравнению с печенью (т.е. проявляло более низкое соотношение почки:печень) по отношению к накоплению соединения 38649 после введения соединения 38649. Таким образом, соединение 38459 может преимущественно обеспечивать доставку соединения 38649 в печень при минимизации доставки в почки по сравнению с неконъюгированным 38649.

Начало и продолжительность действия соединения 38459 оценивали в исследовании *in vivo*. Группам мышей давали однократную подкожную (SC) дозу соединения 38459 при 0,1, 0,3, 1 и 3 мг/кг. Дополнительной группе мышей вводили соединение 38649 при дозе 10 мг/кг. Группу животных, поддававшуюся каждой из обработок, умерщвляли на каждый из дней 1, 2, 3, 4, 5, 6, 14, 21, 28 и 56. ПНК выделяли из печени и уровни мПНК ALDOA измеряли с помощью ПЦР в реальном времени. Вычисляли среднее значение уровня ALDOA для каждой группы. Кратное изменение по сравнению с контрольной группой (PBS-обработанные) показано в табл. G.

Таблица Г. Начало и продолжительность действия соединения 38459

Дни после однократной SC-дозы	Кратное изменение уровня ALDOA				
	38459 3 мг/кг	38459 1 мг/кг	38459 0,3 мг/кг	38459 0,1 мг/кг	38649 10 мг/кг
1	4,9	3,6	1,7	1,4	2,2
2	4,2	3,2	2,4	1,4	4,7
3	4,4	4,6	3,5	1,6	3,4
4	5,1	4,9	3,3	2,2	4,6
5	5,9	4,9	3,9	2,1	4,5
6	5,1	4,5	3,2	2,2	3,6
14	4,8	4,3	3,4	1,7	3,1
21	5,9	4,9	4,0	2,2	3,6
28	4,8	4,7	2,9	2,0	4,2
56	5,6	4,6	2,6	1,7	3,2

Данные в табл. Г показывают, что соединение 38459, а также соединение 38649, имеют быстрое начало действия, о чем свидетельствует депрессия ALDOA уже через 1 день после однократной дозы соединения. Кроме того, депрессию ALDOA поддерживали в течение по меньшей мере 8 недель после однократной дозы соединения.

Эти данные показывают, что GalNAc-конъюгированное соединение 38459, которое является по меньшей мере в 10 раз более сильным, чем неконъюгированное соединение 38649, достигает этой активности при существенно более низких концентрациях в ткани печени, с предпочтительной доставкой в ткань печени. Кроме того, соединение 38459 проявляет быстрое начало действия и продолжительность действия по меньшей мере 8 недель.

Также тестировали LNA-содержащие неконъюгированные и конъюгированные модифицированные олигонуклеотиды, показанные в табл. Н.

Таблица Н. LNA-содержащие соединения

№ соединения	Последовательность (5'-3') и модификации	Структура	SEQ ID NO
36848	C <sub>1</sub> CA <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> T <sub>1</sub> CAC <sub>1</sub> AC <sub>1</sub> TC <sub>1</sub> CL	Неконъюгированный	7
36852	C <sub>1</sub> CA <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> T <sub>1</sub> CAC <sub>1</sub> AC <sub>1</sub> TC <sub>1</sub> CL	Конъюгированный, как в структуре III фигуры 3С, где X представляет собой PO, и MO представляет собой 36848	7
36632	C <sub>1</sub> CA <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> T <sub>1</sub> CAC <sub>1</sub> AC <sub>1</sub> TC <sub>1</sub> CL	Конъюгированный, как в структуре I фигуры 3А, где X <sub>2</sub> представляет собой фосфодиэфирную связь, m равняется 1, N <sub>m</sub> представляет собой β-D-дезоксинуклеозид (dA), X <sub>1</sub> представляет собой фосфодиэфирную связь, и MO представляет собой соединение 36848	7

Сахар и фрагменты связи обозначаются следующим образом: нуклеозиды без последующего нижнего индекса обозначают β-D-деоксирибонуклеозиды; нуклеозиды с последующим нижним индексом "L" обозначают LNA-нуклеозиды и каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную межнуклеозидную связь.

Соединения 36848 и 36852 тестировали по активности *in vivo* в соответствии с тем же протоколом, как описано выше, для оценки способности соединений ингибировать активность miR-122 и повышение экспрессии ALDOA. Поскольку каждое соединение представляло собой сильный ингибитор miR-122, GalNAc-конъюгированное соединение 36852 проявляло большую активность, чем неконъюгированное соединение 36848 (приблизительно в 3 раза больше).

Соединение 36632 также тестировали в отношении активности *in vivo* в исследовании введения однократной дозы, следуя такому же протоколу, как описано выше, при дозах 0,03, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 и 10,0 мг/кг. Соединение 36632 демонстрировало кратные увеличения экспрессии ALDOA 1,6, 2,7, 3,7, 4,3, 4,7, 6,0 соответственно, по отношению к PBS-обработанному контролю. Соединение 36848 при дозах 1,0, 3,0 и 10 мг/кг приводило к кратным увеличениям экспрессии ALDOA 1,6, 2,5 и 5,3 соответственно. На основании сравнения соединения 36632 с соединением 36848 выявили повышение активности приблизительно в 30 раз для конъюгированного соединения по отношению к неконъюгированному соединению.

### Пример 3. Модель инфекции HCV на мыши

В связи со специфичностью хозяин-патоген HCV может инфицировать только людей и шимпанзе. Соответственно, более мелкие виды, такие как мышь, которую, как правило, используют для экспериментальных исследований *in vivo*, нельзя инфицировать HCV для тестирования кандидатных средств для лечения инфекции HCV. Для решения этой проблемы можно использовать модели химерных мышей с человеческой печенью (см., например, Bissig et al., Proc Natl Acad Sci US A, 2007, 104:20507-20511; Bissig et al., J Clin Invest., 2010, 120: 924-930). В этой модели в печени иммунодефицитных мышей вживляли гепатоциты человека, приводя к образованию химерной печени, в которой большинство гепатоцитов являются гепатоцитами человека. Мышей затем инфицировали HCV и обрабатывали средствами против HCV. Эта модель на мыши коммерчески доступна от, например, PhoenixBio.

Соединения anti-miR-122 тестировали у мышей с химерными печенями человека, которые инфицировали HCV. Группы животных (n=5-10) получали одну или несколько доз соединения anti-miR-122, например, при дозе, установленной в схеме лечения исследования. Для фармакокинетических анализов и измерения уровней РНК HCV плазму собирали в различные моменты времени. Ткань печени собирали, когда исследование завершалось.

В некоторых вариантах осуществления ингибирование miR-122 подтверждали путем измерения уровней мРНК ALDOA человека. Можно предположить, что введение соединения anti-miR-122 снижает уровни РНК HCV в сыворотке мыши.

### Пример 4. Снижение уровня РНК HCV в ответ на ингибирование miR-122

Модель химерных мышей с человеческой печенью применяли для оценки эффектов ингибирования miR-122 на целевую экспрессию гена miR-122 и титр вируса HCV.

#### Мыши с химерной печенью человека

Эффекты ингибирования miR-122 на экспрессию целевого гена оценивали у мышей с химерной печенью человека без инфекции HCV. Группы мышей (n=6) обрабатывали однократной дозой PBS, 0,3, 1,0, 3,0 или 10 мг/кг соединения 38459. Через 7 дней после лечения исследование прекращали и ткань печени собирали для измерения уровня экспрессии ALDOA и концентрации соединения в ткани. Уровни мРНК ALDOA были увеличенными по отношению к уровням мРНК ALDOA у PBS-обработанных мышей, однако дерепрессия экспрессии ALDOA была в 3-5 раз меньше, чем наблюдаемая у мышей дикого типа. Уровни соединения 38459 были приблизительно в 3 раза ниже у мышей с химерной печенью по отношению к концентрациям у мышей дикого типа. Эти наблюдения согласуются со сниженной экспрессией асиалогликопротеинового рецептора (ASGPR) у мышей с химерной печенью человека по отношению к мышам дикого типа. Поскольку накопление соединения в клетке печени зависит от поглощения ASGPR, сниженная экспрессия ASGPR, как ожидается, будет приводить к снижению накоплению GalNAc-конъюгированного модифицированного олигонуклеотида и, вследствие этого, сниженной чувствительности к способности соединения 38459 дерепрессировать эндогенные мишени miR-122, такие как ALDOA. Соответственно, модель химерных мышей с человеческой печенью может приблизительно прогнозировать активность соединения 38459 у субъекта, где поддерживается экспрессия ASGPR.

Предварительные данные свидетельствуют, что экспрессия ASGPR поддерживается на тех же уровнях в печенях HCV-инфицированных пациентов по отношению к печеням HCV-неинфицированных субъектов.

#### Лечение HCV-инфицированных мышей с химерной печенью человека

Соединения anti-miR-122 тестировали в модели инфекции HCV на химерных мышах с человеческой печенью. В печени иммунодефицитных мышей вживляли гепатоциты человека, приводя к образованию химерной печени, в которой большинство гепатоцитов являлись гепатоцитами человека. Приблизительно через 3,5 недель после инокулирования генотипом 1a HCV мыши с уровнем РНК HCV  $> 1 \times 10^6$  копий/мл отбирали для включения в это исследование (день -7).

Для недельного исследования группу из 3 животных обрабатывали однократной дозой 10 мг/кг 38459 на день 0. Кровь собирали на дни -7, 0, 3 и 7. Исследование прекращали на день 7, когда в дополнение к крови собирали ткань печени и ткань почек. В этом исследовании уровни РНК HCV снижали на дни 3 и 7.

Для исследования в несколько недель каждую группу из 5 животных обрабатывали следующим образом: PBS (n=5); 3 мг/кг 38459 (n=5); 10 мг/кг 38459 (n=4-5) или 30 мг/кг 38459 (n=4-5). Дополнительную группу животных обрабатывали 10 мг/кг неконъюгированного соединения 36848 (n=5). Лечение проводили в виде однократной подкожной инъекции в день 0. Кровь собирали на дни -7, 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28 и 35. Уровни РНК HCV в крови измеряли с помощью ПЦР в реальном времени в соответствии с обычными способами, которые показаны в табл. I. Если не указано иное, каждая группа лечения содержала 5 животных. Как показано в табл. I, уровни РНК HCV были значительно снижены уже на день 3 в группах, обработанных 10 или 30 мг/кг соединения 38459, снижение которой поддерживали по меньшей мере по день 35. Статистическую значимость вычисляли с помощью 2 способов анализа ANOVA средних уровней РНК HCV у обработанных соединением животных, нормализованных до средних уровней РНК HCV у PBS-обработанных животных. В этом исследовании неконъюгированное соединение 36848 не снижало уровни РНК HCV. Эти результаты также показаны в графической форме на фиг. 5A.

Таблица I. GalNAc-конъюгированное соединение anti-miR-122 снижает титр HCV

День	Средняя величина PBS	36848 10 мг/кг	38459 3 мг/кг	38459 10 мг/кг	38459 30 мг/кг
-7	2,66E+08	2,90E+08	2,54E+08	2,76E+08	2,60E+08
0	2,08E+08	2,92E+08	3,26E+08	2,38E+08	2,70E+08
3	1,97E+08	3,20E+08	2,90E+08	8,10E+07*	4,76E+07****
7	1,65E+08	3,26E+08	1,76E+08	3,16E+07****	1,22E+07****
10	1,59E+08	2,74E+08	1,21E+08	2,70E+07****	7,52E+06****
14	1,19E+08	2,02E+08	9,34E+07	2,37E+07****	4,82E+06****
17	1,67E+08	2,10E+08	9,68E+07	2,94E+07****	4,89E+06****
21	1,49E+08	2,36E+08	9,72E+07	3,06E+07****	7,65E+06**** (n=4)
24	1,43E+08	2,14E+08	8,46E+07	3,35E+07****	7,95E+06**** (n=4)
28	1,43E+08	1,63E+08	8,48E+07	4,16E+07***	1,13E+07**** (n=4)
31	1,37E+08	1,99E+08	9,22E+07	5,18E+07* (n=4)	1,98E+07**** (n=4)
35	1,44E+08	1,88E+08	1,03E+08	5,80E+07* (n=4)	2,35E+07**** (n=4)

\*\*\*\*p<,0001; \*\*\*p<0,0005; \*p<0,05

Эти результаты демонстрируют, что после однократного введения GalNAc-конъюгированного модифицированного олигонуклеотида 38459, титр вируса HCV существенно снизился у HCV-инфицированных животных с ранним началом и устойчивой продолжительностью действия.

Дополнительное исследование выполняли для оценки эффектов соединения 38459 в модели инфекции HCV на химерных мышах с человеческой печенью, где мыши инфицированы генотипом 3a HCV. Каждую группу из 5 животных обрабатывали следующим образом: PBS (n=4); 10 мг/кг 38459 (n=5) или 30 мг/кг 38459 (n=5). Мышей инокулировали генотипом 3a HCV. За семь дней до лечения у мышей собирали кровь для измерения уровня титра вируса. Лечение проводили в виде однократной подкожной инъекции в день 0. Кровь собирали на дни 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24 и 28 после лечения. Уровень РНК HCV в крови измеряли с помощью ПЦР в реальном времени в соответствии с обычными способами. Как показано на фиг. 5B, уровни РНК HCV были значительно снижены уже на день 3 в группах, обработанных 10 или 30 мг/кг соединения 38459, и это снижение поддерживали по меньшей мере по день 28.

Также наблюдалось существенное снижение (гипер)стеатоза в печени мышей, обработанных соединением 38459. Снижение (гипер)стеатоза наблюдали у мышей, инфицированных HCV, и у неинфицированных мышей, предполагая, что ингибирование miR-122 может снижать (гипер)стеатоз как в присутствии, так и в отсутствии инфекции HCV.

Пример 5.

Конъюгированные более короткие модифицированные олигонуклеотиды GalNAc-содержащие соединения образовывали путем конъюгирования структуры на фиг. 3 с 3'-концом модифицированных олигонуклеотидов, показанных в табл. J. Сахарные фрагменты, межнуклеозидные связи и нуклеотидные основания обозначаются следующим образом: нуклеозиды без последующего нижнего индекса представляют собой β-D-дезоксирибонуклеозиды; нуклеозиды с последующим нижним индексом "S" представляют собой S-cEt-нуклеозиды, и каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную межнуклеозидную связь.

Таблица J. Неконъюгированные и конъюгированные модифицированные олигонуклеотиды

	Последовательность и модификации	Структура	SEQ ID NO
38591	U <sub>5</sub> TGU <sub>5</sub> C <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> TC <sub>5</sub> C <sub>5</sub> As	Неконъюгированный	8
38633	U <sub>5</sub> TGU <sub>5</sub> C <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> AC <sub>5</sub> TC <sub>5</sub> C <sub>5</sub> As	Структура I на фигуре 3A, где X <sub>2</sub> представляет собой фосфодиэфирную связь, m равняется 1, N <sub>m</sub> представляет собой β-D-дезоксинуклеозид (dA), X <sub>1</sub> представляет собой фосфодиэфирную связь	8
38998	C <sub>5</sub> AsC <sub>5</sub> AsC <sub>5</sub> U <sub>5</sub> C <sub>5</sub> C <sub>5</sub> ,	Неконъюгированный	9
38634	C <sub>5</sub> AsC <sub>5</sub> AsC <sub>5</sub> U <sub>5</sub> C <sub>5</sub> C <sub>5</sub> ,	Структура I на фигуре 3A, где X <sub>2</sub> представляет собой фосфодиэфирную связь, m равняется 1, N <sub>m</sub> представляет собой β-D-дезоксинуклеозид (dA), X <sub>1</sub> представляет собой фосфодиэфирную связь	9

Для определения активности *in vivo* соединения оценивали в отношении их способности дерепрессировать экспрессию альдолазы A (ALDOA) печени. Соединения вводили мышам и измеряли уровни мРНК ALDOA с помощью количественной ПЦР в РНК, выделенной из печени. Кратное изменение уровня мРНК ALDOA по отношению к солевому раствору вычисляли для определения активности *in vivo* (фиг. 6A и 6B и 7A и 7B). ED<sub>50</sub> (концентрацию соединения, при которой дерепрессия ALDOA составляет 50% от максимальной) и ED<sub>90</sub> (концентрацию соединения, при которой дерепрессия ALDOA составляла 90% от максимальной), вычисленные по результатам этих экспериментов, показаны в табл. K и L.

Таблица K. Активность *in vivo* конъюгированных и неконъюгированных соединений anti-miR-122

Соединение	ED50 (мг/кг)	Кратное изменение	ED90 (мг/кг)	Кратное изменение
Эксперимент 1 (фигура 6A)				
38634	0,03	456	0,3	212
38998	13,7		63,8	
Эксперимент 2 (фигура 6B)				
38634	0,04	290	0,43	99,3
38998	11,6		42,7	

Таблица L. Активность *in vivo* конъюгированных и неконъюгированных соединений anti-miR-122

Соединение	ED50 (мг/кг)	Кратное изменение	ED90 (мг/кг)	Кратное изменение
Эксперимент 1 (фигура 7A)				
38633	0,08	27	0,25	26
38591	2,2		6,62	
Эксперимент 2 (фигура 7B)				
38633	0,15	20	0,94	10
38591	3,0		8,9	

Как показано в табл. K, GalNAc-конъюгирование в соответствии с настоящим изобретением улучшало показатели ED<sub>50</sub> и ED<sub>90</sub> 8-мерного соединения anti-miR-122 по меньшей мере в 100 раз. Как показано в табл. L, GalNAc-конъюгирование в соответствии с настоящим изобретением улучшало показатели ED<sub>50</sub> и ED<sub>90</sub> 13-мерного соединения anti-miR-122 по меньшей мере в 10 раз.

Также для соединений 38634 и 38998 определяли дерепрессию другого целевого гена miR-122, CD320. Результаты были подобны результатам, полученным для ALDOA, показанным в табл. K: GalNAc-конъюгирование в соответствии с настоящим изобретением улучшало показатели ED<sub>50</sub> в 343 раза и 272 раза в экспериментах 1 и 2, соответственно, и улучшало показатели ED<sub>90</sub> в 492 раза и 545 раза в экспериментах 1 и 2 соответственно.

GalNAc-конъюгирование, описанное в данном документе, также улучшало активность понижения холестерина, наблюдаемую для соединений, содержащих GalNAc. Иллюстративные результаты экспе-

римента 1 показаны на фиг. 8А и 8В. Соединения 38633 и 38634, которые представляют собой GalNAc-конъюгаты, были более сильными, чем соединения 38591 и 38998, в которых отсутствует GalNAc. Подобные результаты получали для эксперимента 2 (данные не показаны).

Пример 6. Фармакодинамическая активность соединения anti-miR-122 у отличных от человека приматов

Соединения anti-miR-122 тестировали у нормальных отличных от человека приматов (яванские макаки). Однократную дозу GalNAc-конъюгированного соединения 38459 или неконъюгированного соединения 38649 вводили подкожно (n=3 для каждого соединения). PBS вводили в качестве контроля лечения (n=5). На день 4 и день 8 после введения соединения ткань печени собирали и выделяли РНК для измерения уровней ALDOA. Общий холестерин в крови измеряли на день 8. Как показано в табл. L, депрессию ALDOA наблюдали на день 4 и день 8 при каждой дозе соединения 38459, включая самую низкую дозу в 1 мг/кг. Понижение холестерина также наблюдали при самой низкой дозе соединения 38459. Таким образом, GalNAc-конъюгированное соединение 38459 является существенно более сильным у отличных от человека приматов по отношению к неконъюгированному соединению 38649. Кроме того, оба соединения характеризуются продолжительностью действия по меньшей мере одна неделя после однократной дозы у отличных от человека приматов.

Таблица L. Ингибирование miR-122 у отличных от человека приматов

Обработка	ALDOA (день 4) Кратное изменение	ALDOA (день 8) Кратное изменение	Холестерин (день 8) мг/дл
PBS	1,0		95,3
38649, 100 мг/кг	3,4	4,0	67,0
38459, 1 мг/кг	5,0	3,9	64,3
38459, 10 мг/кг	3,0	3,6	66,7
38459, 100 мг/кг	4,0	4,1	65,3

Пример 7. Фармакокинетическая активность конъюгированных соединений anti-miR-122

Фармакокинетику плазмы и ткани соединений anti-miR-122 оценивали у мышей и отличных от человека приматов.

Однократную подкожную дозу соединения 38649 или GalNAc-конъюгированное соединение 38459 вводили мышам CD-1. Кровь собирали в несколько моментов времени в течение периода 24 ч после введения и измеряли общее количество соединения в крови с помощью ELISA на основе гибридизации.

Однократную подкожную дозу соединения 38649 или GalNAc-конъюгированного соединения 38459 вводили отличными от человека приматам. Кровь собирали в несколько моментов времени в течение периода 24 ч после введения и измеряли общее количество соединения в крови с помощью LC-MS.

Как показано на фиг. 9, у мыши (фиг. 9А) и отличных от человека приматов (фиг. 9В) GalNAc-конъюгированное соединение 38459 более быстро отделяли от плазмы по сравнению с неконъюгированным соединением 38649. После введения GalNAc-конъюгированного соединения 38459 неконъюгированное соединение 38649 не обнаруживалось, указывая на то, что конъюгированное соединение 38459 не метаболизируется в крови (данные не показаны).

В этом исследовании также измеряли уровни соединения в тканях печени и почек мышей (табл. М) и отличных от человека приматов (табл. N).

Таблица М. Уровни соединения в тканях у мышей через 24 ч после однократной дозы

Вводимое соединение		38459 (+GalNAc)			38649		
Ткань		Почки	Печень	Поч./печ.	Почки	Печень	Поч./печ.
Доза	Обнаруживаемое соединение	Среднее значение (мкг/г)	Среднее значение (мкг/г)	Соотношение	Среднее значение (мкг/г)	Среднее значение (мкг/г)	Соотношение
1 мг/кг	38649	1,1	5,7	0,19	18,4	4	4,6
	Общее количество соединения	1,1	7,4	0,15			
3 мг/кг	38649	8,2	15,8	0,52	83,9	10,8	7,6
	Общее количество соединения	16,8	27,7	0,61			

Таблица N. Уровни соединения в тканях у отличных от человека приматов через 72 ч после однократной дозы

Вводимое соединение		38459 (+GalNAc)			38649		
Ткань		Почки	Печень	Поч./печ.	Почки	Печень	Поч./печ.
Доза	Обнаруживаемое соединение	Среднее значение (мкг/г)	Среднее значение (мкг/г)	Соотношение	Среднее значение (мкг/г)	Среднее значение (мкг/г)	Соотношение
1 мг/кг	38649	5,6	27,2	0,21			
	Общее количество соединения	31,3	34	0,92			
10 мг/кг	38649	124	148	0,84	283,3	61,2	4,6
	Общее количество соединения	513,5	186,3	2,7			
100 мг/кг	38649	374,1	418,8	0,89	1430	242,3	5,9
	Общее количество соединения	2129,1	547,2	3,9			

После введения соединения 38459 быстро метаболизировалось до неконъюгированного соединения 38649 в печени и почках. Кроме того, в соответствии с данными исследования на мышах, описанными выше, соотношение соединения 38459 в почках и печени существенно ниже, чем таковое для соединения 38649.

На основании концентрации соединения в печени через 24 ч после введения было подсчитано, что приблизительно 6 мкг/г GalNAc-конъюгированного соединения 38459 и приблизительно 30 мкг/г неконъюгированного соединения 38459 приводит к 90% от максимальной активности в день 7 (при измерении депрессии ALDOA). Таким образом, соединение 38459 приводит к большей активности при более низкой концентрации в ткани печени по отношению к неконъюгированному соединению 38649.

Эти данные показывают, что у отличных от человека приматов и мышей конъюгирование с GalNAc-содержащим фрагментом приводит к существенно улучшенной доставке модифицированного олигонуклеотида в печень. Кроме того, низкий показатель ED<sub>50</sub> в сочетании с более низким соотношением в почках и печени свидетельствует, что GalNAc-конъюгированное соединение 38459 может обладать высоким терапевтическим индексом.

Пример 8. Исследования токсичности и безопасности соединения anti-miR-122

Многочисленные исследования проводили у мышей, грызунов и отличных от человека приматов для оценки безопасности и переносимости GalNAc-конъюгированного соединения 38459.

Например, соединение 38459 оценивали в исследовании провоспалительного эффекта у крыс. Самцам крыс Спрэг-Дуули вводили однократную подкожную дозу соединения 38459. На день 14 после введения измеряли экспрессию ALDOA и CXCL13 (интерферон-индуцибельный ген) в печени.

Как показано в табл. O, не было обнаружено повышения экспрессии CXCL13 при дозе вплоть до 100 мг/кг, в то время как уровни ALDOA были повышены, начиная с дозы 1 мг/кг. Также тестировали известное воспалительное соединение anti-miR-122, которое приводило к повышенным уровням CXCL13 в 2-2,5 раза при дозах 10, 30 и 100 мг/кг.

Таблица O.

Соединение 38459 не повышает экспрессию провоспалительного гена

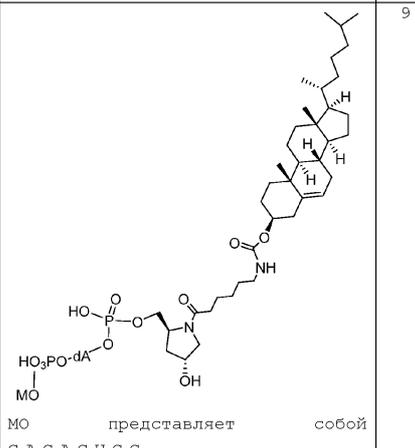
Доза соединения 38459	ALDOA Кратное изменение	CXCL13 Кратное изменение
0,1 мг/кг	1,2	1,4
0,3 мг/кг	1,6	1,6
1 мг/кг	2,5	1,5
3 мг/кг	2,9	0,8
10 мг/кг	2,8	0,6
30 мг/кг	3,2	0,8
100 мг/кг	3,4	0,7

Дополнительные исследования токсичности проводили у мышей и отличных от человека приматов (яванские макаки) и не наблюдали существенных отрицательных воздействий при терапевтически релевантных дозах.

## Пример 9. Конъюгированные более короткие модифицированные олигонуклеотиды

Холестеринсодержащие соединения образовывали путем конъюгирования холестерина с 3'-концом модифицированных олигонуклеотидов, показанных в табл. P. Сахарные фрагменты, межнуклеозидные связи и нуклеотидные основания обозначаются следующим образом: нуклеозиды без последующего нижнего индекса представляют собой  $\beta$ -D-дезоксирибонуклеозиды; нуклеозиды с последующим нижним индексом "S" представляют собой S-cEt-нуклеозиды и каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную межнуклеозидную связь, за исключением межнуклеозидных связей, обозначенных нижним индексом (O), которые представляют собой фосфодиэфирные связи.

Таблица P. Неконъюгированные и конъюгированные модифицированные олигонуклеотиды

	Последовательность и модификации	Структура	SEQ ID NO
38998	C <sub>3</sub> A <sub>3</sub> C <sub>3</sub> A <sub>3</sub> C <sub>3</sub> U <sub>3</sub> C <sub>3</sub> C <sub>3</sub>	Неконъюгированный	9
38070	C <sub>3</sub> A <sub>3</sub> C <sub>3</sub> A <sub>3</sub> C <sub>3</sub> U <sub>3</sub> C <sub>3</sub> C <sub>3</sub>	 <p>MO представляет собой C<sub>3</sub>A<sub>3</sub>C<sub>3</sub>A<sub>3</sub>C<sub>3</sub>U<sub>3</sub>C<sub>3</sub>C<sub>3</sub></p>	9

Для определения активности *in vivo* соединения оценивали в отношении их способности дерепрессировать экспрессию альдолазы A (ALDOA) печени. Соединения вводили мышам и измеряли уровни мРНК ALDOA с помощью количественной ПЦР в РНК, выделенной из печени. Кратное изменение уровня мРНК ALDOA, по отношению к солевому раствору вычисляли для определения активности *in vivo*. ED<sub>50</sub> (концентрацию соединения, при которой дерепрессия ALDOA составляет 50% от максимальной) и ED<sub>90</sub> (концентрацию соединения, при которой дерепрессия ALDOA составляет 90% от максимальной), вычисленные по результатам этих экспериментов, показаны в табл. Q.

Таблица Q. Активность *in vivo* конъюгированных и неконъюгированных соединений anti-miR-122

Соединение	ED <sub>50</sub> (мг/кг)	Кратное изменение	ED <sub>90</sub> (мг/кг)	Кратное изменение
38070	0,08	78,8	1,27	31,6
38998	6,3		40,1	

Как показано в табл. Q, холестерин, конъюгированный в соответствии с настоящим изобретением, улучшал показатели ED<sub>50</sub> и ED<sub>90</sub> 8-мерного соединения anti-miR-122 по меньшей мере в 30 раз.

Также для соединений 38070 и 38998 определяли дерепессию другого целевого гена miR-122, CD320. Результаты были подобны результатам, полученным от ALDOA (данные не показаны).

Конъюгирование холестерина, описанное в данном документе, также улучшает активность понижения холестерина. При большинстве тестируемых концентраций соединения 38070 снижало холестерин в большей степени, чем такая же концентрация соединения 38998 (данные не показаны).

Различные модификации настоящего изобретения, в дополнение к таким, описанным в данном документе, будут очевидны специалистам в данной области техники из приведенного выше описания. Такие модификации также предназначены для попадания в пределы объема приложенной формулы изобретения. Каждая ссылка (включая без ограничения журнальные статьи, патенты США и не США, публикации патентных заявок, публикации международных патентных заявок, номера доступа GENBANK® и т.п.), приведенная в настоящей заявке, в частности, включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид, комплементарный miR-122 (SEQ ID NO: 1) и состоящий из 16-22 связанных нуклеозидов, и который при этом содержит по меньшей мере 16 смежных нуклеозидов согласно структуре



где верхний индекс "Me" обозначает 5-метилцитозин; нуклеозиды без нижнего индекса представляют собой  $\beta$ -D-дезоксирибонуклеозиды; нуклеозиды с нижним индексом "E" представляют собой 2'-МОЕ-нуклеозиды; нуклеозиды с индексом "S" представляют собой S-cEt-нуклеозиды и каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную межнуклеозидную связь.

2. Соединение по п.1, где олигонуклеотид содержит по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21 или 22 смежных нуклеозидов согласно структуре.

3. Соединение по п.1, имеющее структуру:



4. Соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид, комплементарный нуклеотидам 2-9 miR-122 (SEQ ID NO: 1) и состоящий из менее чем 16 связанных нуклеозидов, и который содержит по меньшей мере 8 смежных нуклеозидов следующей структуры:

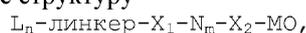


где верхний индекс "Me" обозначает 5-метилцитозин; нуклеозиды без нижнего индекса представляют собой  $\beta$ -D-дезоксирибонуклеозиды; нуклеозиды с нижним индексом "E" представляют собой 2'-МОЕ-нуклеозиды; нуклеозиды с индексом "S" представляют собой S-cEt-нуклеозиды и каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную межнуклеозидную связь.

5. Соединение по любому из пп.1-4, где соединение содержит сопряженный фрагмент, связанный с 5'-концом или 3'-концом модифицированного олигонуклеотида.

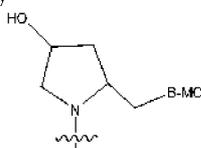
6. Соединение по п.5, где сопряженный фрагмент содержит по меньшей мере один лиганд, выбранный из углевода, холестерина, липида, фосфолипида, антитела, липопротеина, гормона, пептида, витамина, стероида и катионного липида.

7. Соединение по п.5 или 6, имеющее структуру



где каждый L независимо представляет собой лиганд и n равняется от 1 до 10; N представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеозид и m равняется от 1 до 5; X<sub>1</sub> и X<sub>2</sub> представляет собой фосфодиэфирную связь или фосфотиоатную связь и МО представляет собой модифицированный олигонуклеотид.

8. Соединение по п.7, имеющее структуру



где

B выбран из -O-, -S-, -N(R<sup>N</sup>)-, -Z-P(Z')(Z'')O-, -Z-P(Z')(Z'')O-N<sub>m</sub>-X- и -Z-P(Z')(Z'')O-N<sub>m</sub>-Y-;

МО представляет собой модифицированный олигонуклеотид;

R<sup>N</sup> выбран из H, метила, этила, пропила, изопропила, бутила и бензила;

Z, Z' и Z'' независимо выбраны из O и S;

N независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеозид;

m равняется от 1 до 5;

X выбран из фосфодиэфирной связи и фосфотиоатной связи;

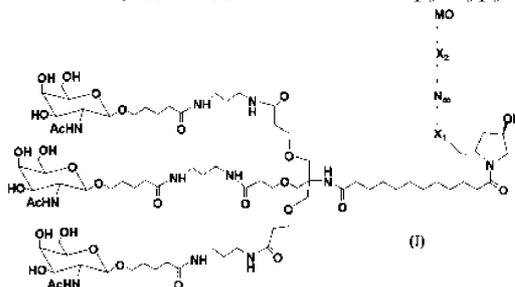
Y представляет собой фосфодиэфирную связь и волнистая линия обозначает связь с остальной частью линкера и лигандом(ами).

9. Соединение по п.7 или 8, где n равняется 3.

10. Соединение по любому из пп.7-9, где по меньшей мере один лиганд представляет собой углевод и где углевод в случае необходимости выбран из N-ацетилгалактозамина, галактозы, галактозамина, N-формилгалактозамина, N-пропионилгалактозамина, N-n-бутаноилгалактозамина и N-изобутаноилгалактозамина.

11. Соединение по любому из пп.7-10, где каждый лиганд представляет собой N-ацетилгалактозамин.

12. Соединение по любому из пп.7-11, где соединение имеет структуру



где каждый N независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеозид и m равняется от 1 до 5; каждый X<sub>1</sub> и X<sub>2</sub> независимо представляет собой фосфодиэфирную связь или фосфотиоатную связь и МО представляет собой модифицированный олигонуклеотид.

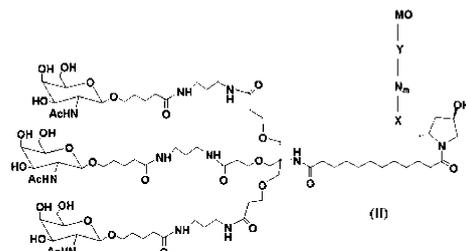
13. Соединение по п.12, где каждый из X<sub>1</sub> и X<sub>2</sub> представляет собой фосфодиэфирную связь.

14. Соединение по любому из пп.7-13, где m равняется 1.

15. Соединение по любому из пп.12-14, где каждый N' содержит немодифицированный сахарный фрагмент, где каждый немодифицированный сахарный фрагмент независимо представляет собой β-D-рибозу или β-D-дезоксирибозу.

16. Соединение по любому из пп.12-15, где по меньшей мере один N' содержит пуриновое нуклеотидное основание, где каждое пуриновое нуклеотидное основание независимо выбрано из аденина, гуанина, гипоксантина, ксантина и 7-метилгуанина.

17. Соединение структуры

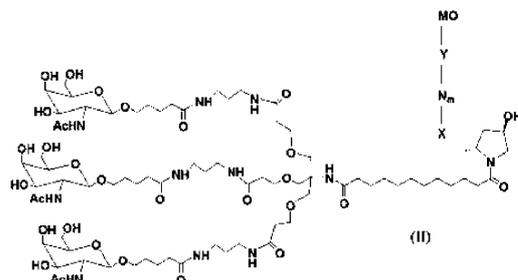


где X представляет собой фосфодиэфирную связь; m равняется 1; N представляет собой β-D-дезоксирибоаденозин; Y представляет собой фосфодиэфирную связь и МО представляет собой модифицированный олигонуклеотид, имеющий структуру



в которой верхний индекс "Me" обозначает 5-метилцитозин, где нуклеозиды без нижнего индекса представляют собой β-D-деоксирибонуклеозиды, нуклеозиды с нижним индексом "E" представляют собой 2'-МОЕ-нуклеозиды, нуклеозиды с индексом "S" представляют собой S-cEt-нуклеозиды и каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную межнуклеозидную связь; и где сопряженный фрагмент связан с 3'-концом модифицированного олигонуклеотида.

18. Соединение структуры



где X представляет собой фосфодиэфирную связь; m равняется 1; N в N<sub>m</sub> представляет собой β-D-дезоксирибоаденозин; Y представляет собой фосфодиэфирную связь и МО представляет собой модифицированный олигонуклеотид, состоящий из менее чем 16 связанных нуклеозидов, где нуклеотидная последовательность модифицированного олигонуклеотида комплементарна нуклеотидам 2-9 miR-122 (SEQ ID NO: 1) и где модифицированный олигонуклеотид содержит по меньшей мере 8 смежных нуклеозидов следующей структуры:



где верхний индекс "Me" обозначает 5-метилцитозин; нуклеозиды без нижнего индекса представляют собой β-D-деоксирибонуклеозиды; нуклеозиды с нижним индексом "E" представляют собой 2'-МОЕ-нуклеозиды; нуклеозиды с индексом "S" представляют собой S-cEt-нуклеозиды и каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфотиоатную межнуклеозидную связь.

19. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп.1-18 и фармацевтически приемлемый носитель, для лечения miR-122-ассоциированного состояния.

20. Способ лечения miR-122-ассоциированного состояния, включающий введение HCV-инфицированному человеку соединения по любому из пп.1-18 или фармацевтической композиции по п.19.

21. Способ по п.20, где введение ослабляет симптомы инфекции HCV, предупреждает восстановление в сыворотке РНК HCV и/или замедляет восстановление в сыворотке РНК HCV.

22. Способ по п.20 или 21, в котором уменьшают уровень РНК HCV.

23. Способ по любому из пп.20-22, в котором достигается устойчивый вирусологический ответ.

24. Способ по любому из пп.20-23, где субъект инфицирован одним или несколькими генотипами

HCV, выбранными из генотипа 1, генотипа 2, генотипа 3, генотипа 4, генотипа 5 и генотипа 6.

25. Способ по п.24, где генотип HCV выбран из генотипа 1a, генотипа 1b, генотипа 2a, генотипа 2b, генотипа 2c, генотипа 2d, генотипа 3a, генотипа 3b, генотипа 3c, генотипа 3d, генотипа 3e, генотипа 3f, генотипа 4a, генотипа 4b, генотипа 4c, генотипа 4d, генотипа 4e, генотипа 4f, генотипа 4g, генотипа 4h, генотипа 4i, генотипа 4j, генотипа 5a и генотипа 6a.

26. Способ по любому из пп.20-25, включающий введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства.

27. Способ по п.26, где по меньшей мере одно терапевтическое средство выбирают из ингибитора протеазы, ингибитора полимеразы, ингибитора кофактора, ингибитора РНК-полимеразы, ингибитора структурного белка, ингибитора неструктурного белка, ингибитора циклофилина, ингибитора входа, агониста TLR7 и интерферона.

28. Способ по п.26, где по меньшей мере одно терапевтическое средство выбирают из ингибитора протеазы, ингибитора NS5A, ингибитора NS3/4A, нуклеозидного ингибитора NS5B, нуклеотидного ингибитора NS5B, ненуклеозидного ингибитора NS5B, ингибитора циклофилина и интерферона.

29. Способ по п.26, где по меньшей мере одно терапевтическое средство выбирают из интерферона альфа-2a, интерферона альфа-2b, интерферона альфакон-1, пегинтерферона альфа-2b, пегинтерферона альфа-2a, интерферона альфа-2b длительного высвобождения, интерферона лямбда, софосбувира, ледипасвира, рибавирина, теллаправира, боцепревира, ванипревира, асунапревира, ритонавира, сетробувира, даклатасвира, симепревира, алиспоривира, мерициитабина, тегобувира, данопревира, совапревира и нецепревира.

30. Способ по п.26, где по меньшей мере одно терапевтическое средство представляет собой софосбувир.

31. Способ по п.26, где по меньшей мере одно терапевтическое средство представляет собой софосбувир и ледипасвир.

32. Способ по п.26, где по меньшей мере одно терапевтическое средство представляет собой даклатасвир.

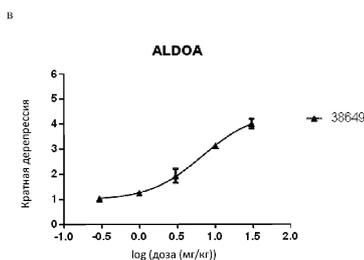
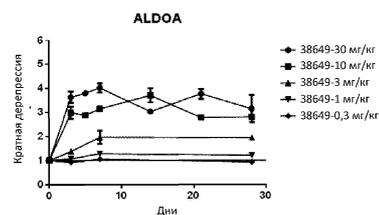
33. Способ по п.26, где по меньшей мере одно терапевтическое средство представляет собой симепревир.

34. Способ по любому из пп.21-33, где субъектом является пациент, не дающий клинического ответа на противовирусное средство прямого действия.

35. Способ по любому из пп.21-34, где субъект имеет HCV-ассоциированное заболевание, выбранное из цирроза, фиброза печени, стеатогепатита, стеатоза или гепатоцеллюлярной карциномы.

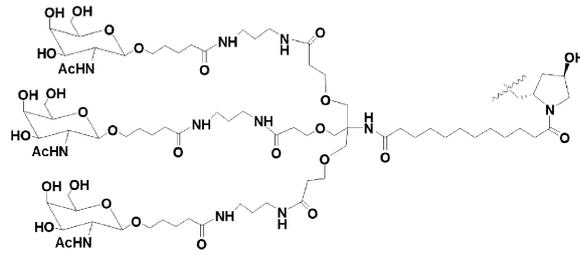
36. Способ по любому из пп.21-35, где соединение, конъюгат или фармацевтическую композицию вводят один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в месяц, один раз в два месяца или один раз в три месяца.

37. Способ по любому из пп.21-36, где доза соединения или конъюгата меньше или равна 10 мг/кг, меньше или равна 7,5 мг/кг, меньше или равна 5 мг/кг в неделю, меньше или равна 4,5 мг/кг, меньше или равна 4,0 мг/кг, меньше или равна 3,5 мг/кг, меньше или равна 3,0 мг/кг, меньше или равна 2,5 мг/кг, меньше или равна 2,0 мг/кг, меньше или равна 1,5 мг/кг или менее чем или равна 1,0 мг/кг.

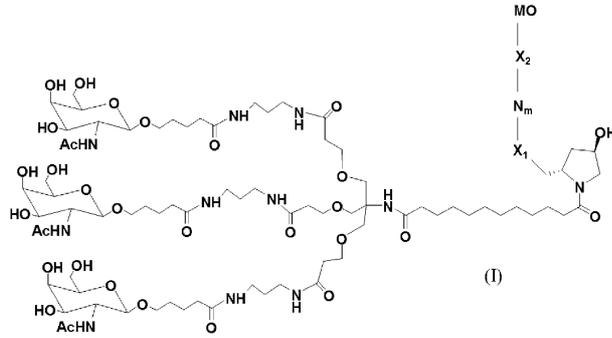


Фиг. 1

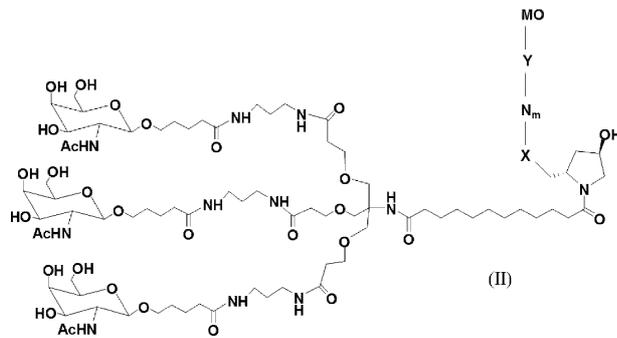
034731



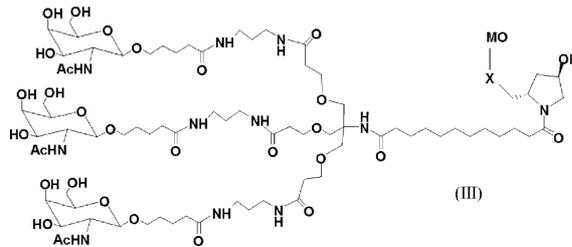
Фиг. 2



Фиг. 3А

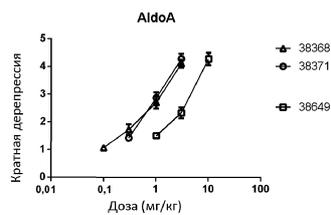


Фиг. 3В

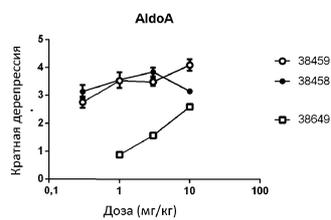


Фиг. 3С

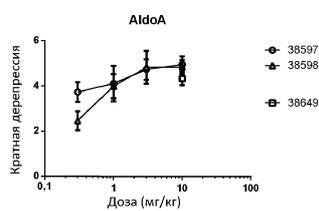
A



B

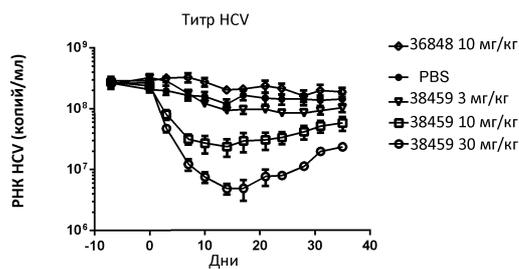


C

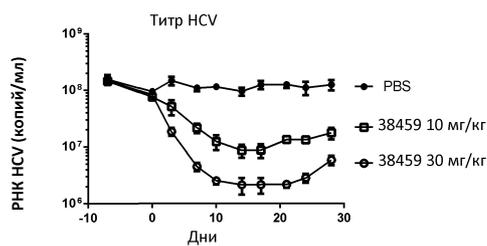


Фиг. 4

A

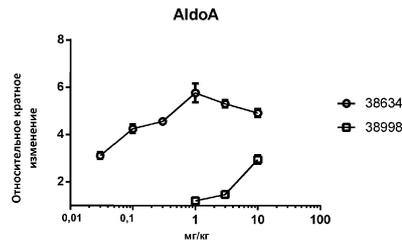


B

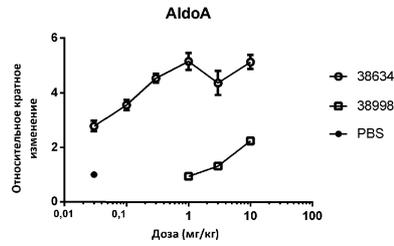


Фиг. 5

A

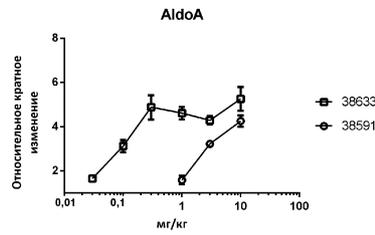


B

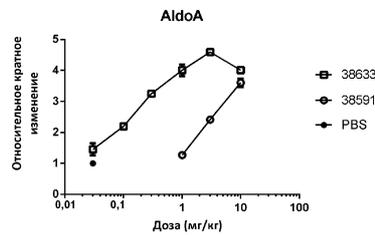


Фиг. 6

A

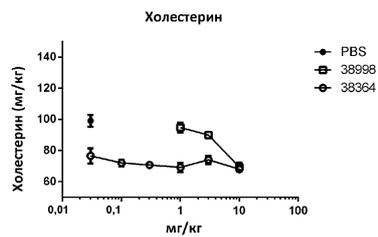


B

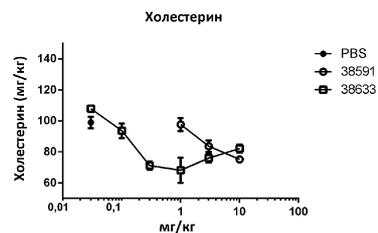


Фиг. 7

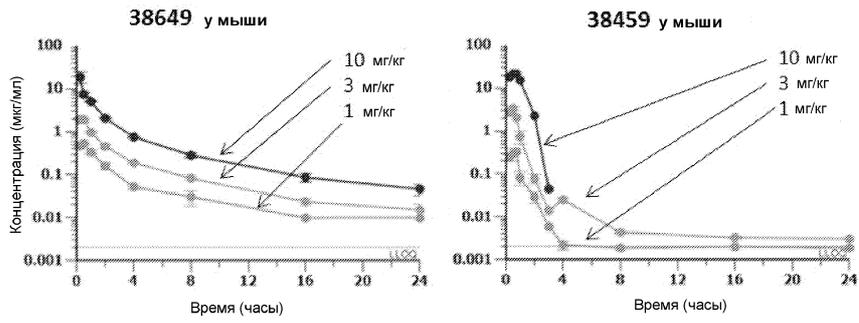
A



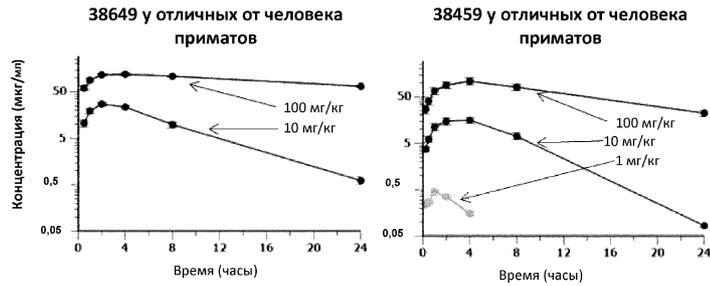
B



Фиг. 8



Фиг. 9А



Фиг. 9В