



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **121017** (13) **C2**
(51) МПК

C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/712 (2006.01)
A61K 31/7115 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

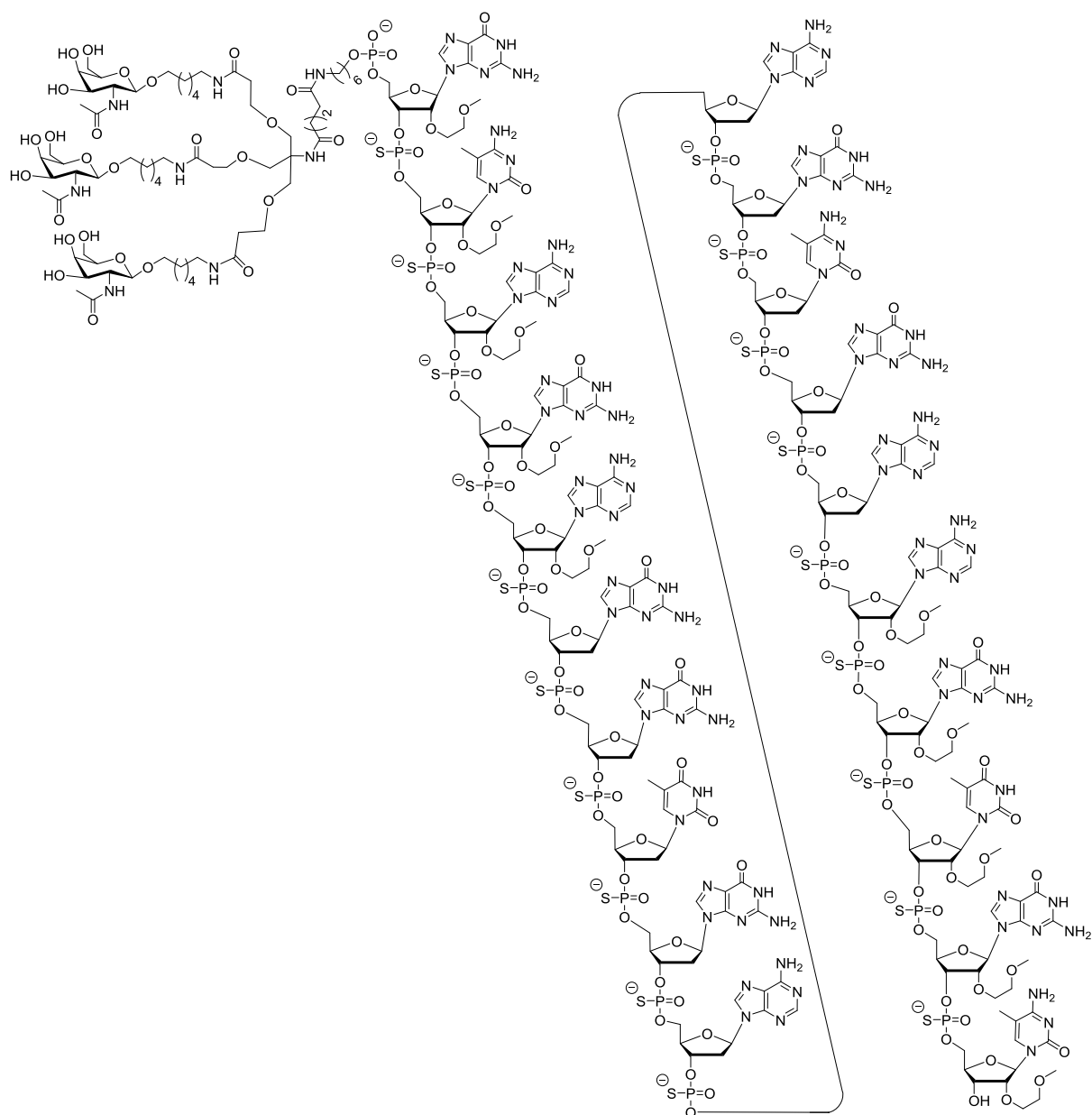
(21) Номер заявки:	а 2015 11840	(72) Винахідник(и):	Пракаш Тхазха П. (US), Сетх Пуніт П. (US), Свайзе Ерік Е. (US)
(22) Дата подання заявки:	01.05.2014	(73) Власник(и):	АЙОНІС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ІНК., 2855 Gazelle Court, Carlsbad, CA 92010, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.03.2020	(74) Представник:	Бочаров Максим Анатолійович
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/818,442, 61/823,826, 61/843,887, 61/871,673, 61/880,790, 61/976,991, 61/986,867	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2011139917 A1, 10.11.2011 WO 2009073809 A2, 11.06.2009 Kurosawa Takayuki et al. Selective silencing of a mutant transthyretin allele by small interfering RNAs. Biochemical and biophysical research communications, 2005, Vol. 337, Issue 3, P. 1012-1018 Machida Kazuko et al. Postmortem findings in a patients with cerebral amyloid angiopathy actively treated with corticosteroid. Amyloid, 2012, Vol. 19, No. 1, P. 47-52 US 2012225927 A1, 08.09.2012 US 20130035366 A1, 07.02.2013 WO 2013033230 A1, 07.03.2013 WO 2012037254 A1, 22.03.2012
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	01.05.2013, 15.05.2013, 08.07.2013, 29.08.2013, 20.09.2013, 08.04.2014, 30.04.2014		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, US, US, US, US, US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.01.2016, Бюл.№ 2		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.03.2020, Бюл.№ 6		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2014/036463, 01.05.2014		

(54) КОМПОЗИЦІЯ І СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ЕКСПРЕСІЇ НВУ

(57) Реферат:

Винахід стосується сполуки, що має формулу:

UA 121017 C2



або її фармацевтично прийнятої солі. Винахід також стосується композиції, що містить дану сполуку, та застосування сполуки при виготовленні лікарського засобу для лікування у суб'єкта захворювання, розладу або патологічного стану, пов'язаного з вірусом гепатиту В (HBV).

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

Цей винахід зареєстрований разом з переліком послідовностей в електронному форматі. Перелік послідовностей представлений у вигляді файлу під назвою BIOL0248WOSEQ_ST25.txt, створеного 1 травня 2014 року, розміром 16 Кб. Інформація про перелік послідовностей в електронному форматі в повному об'ємі включена до даного документу шляхом посилання.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Принцип, що лежить в основі антисмислової технології, полягає у тому, що антисмислова сполука гібридується з цільовою нуклеїною кислотою і модулює кількість, активність та/або функцію цільової нуклеїнової кислоти. Наприклад, у деяких випадках антисмислові сполуки приводять до зміни транскрипції або трансляції мішені. Така модуляція експресії може бути досягнута, наприклад, руйнуванням цільової мРНК або інгібуванням за механізмом заміщення. Прикладом модуляції цільової функції РНК за рахунок руйнування є руйнування за рахунок РНКаз Н цільової РНК при гібридизації з ДНК-подібною антисмисловою сполукою. Іншим прикладом модуляції генної експресії за рахунок спрямованого руйнування є РНК-інтерференція (РНКі). РНКі стосується антисмислового сайленсингу гена за механізмом, у якому застосовується РНК-індукований комплекс сайленсингу (RISC). Додатковим прикладом модуляції цільової функції РНК є механізм заміщення, такий як використовується в природних умовах мікроРНК. МікроРНК являють собою невеликі некодуючі РНК, що регулюють експресію РНК, які кодують білки. Зв'язування антисмислової сполуки з мікроРНК перешкоджає зв'язуванню мікроРНК з її матричними РНК мішенями, і, отже, ускладнює функцію мікроРНК. МікроРНК-міметики можуть підсилювати природну функцію мікроРНК. Деякі антисмислові сполуки модифікують сплайсинг пре-мРНК. Незалежно від конкретного механізму, специфічність відносно послідовностей робить антисмислові сполуки перспективними як засоби для підтвердження наявності мети і функціоналізації генів, а також як терапевтичні засоби для селективної модуляції експресії генів, що залучені до патогенезу захворювань.

Антисмислова технологія є ефективним способом модуляції експресії одного або декількох специфічних генних продуктів і, отже, може бути визнана виключно придатною у ряді терапевтичних, діагностичних і дослідницьких застосувань. Хімічно модифіковані нуклеозиди можуть бути введені до антисмислових сполук для підсилення однієї або декількох властивостей, таких як стійкість до нуклеази, фармакокінетика або афінність до цільової нуклеїнової кислоти. У 1998 році антисмислова сполука Vitravene® (фомівірсен; розроблений компанією Isis Pharmaceuticals Inc., Карлсбад, штат Каліфорнія) стала першими антисмисловими ліками, що одержали дозвіл на продаж від Адміністрації США з харчових продуктів і лікарських речовин (FDA), і на даний час є засобом для лікування спричиненого цитомегаловірусом (CMV) ретиніту у пацієнтів із СНІДом.

Нові хімічні модифікації мають покращену активність і ефективність антисмислових сполук, розкриваючи потенціал для пероральної доставки, а також для удосконалення підшкірного введення, зниження можливих побічних ефектів, і приводять до покращення зручності для пацієнта. Хімічні модифікації, що підсилюють активність антисмислових сполук, дозволяють здійснювати введення нижчих доз, що знижує можливість токсичності, а також зменшує загальну вартість лікування. Модифікації, що збільшують стійкість до руйнування, приводять до повільнішого виведення з організму, забезпечуючи можливість менш частого введення доз. Різні типи хімічних модифікацій можуть бути комбіновані в одній сполуці для подальшої оптимізації ефективності сполуки.

СУТЬ ВІНАХОДУ

У деяких варіантах реалізації даного опису наведені кон'юговані антисмислові сполуки. У деяких варіантах реалізації даного опису наведені кон'юговані антисмислові сполуки, що містять антисмисловий олігонуклеотид, комплементарний транскрипту нуклеїнової кислоти. У деяких варіантах реалізації даного опису наведені способи, що включають контакт клітини з кон'югованою антисмисловою сполукою, що містить антисмисловий олігонуклеотид, комплементарний транскрипту нуклеїнової кислоти. У деяких варіантах реалізації даного опису наведені способи, що включають контакт клітини з кон'югованою антисмисловою сполукою, яка містить антисмисловий олігонуклеотид, і зменшення кількості або активності транскрипту нуклеїнової кислоти в клітині.

Раніше був описаний асіалоглікопротеїновий рецептор (ASGP-R). Див., наприклад, Park et al., PNAS, том 102, № 47, сс. 17125-17129 (2005). Такі рецептори експресуються на клітинах печінки, зокрема, гепатоцитах. Крім того, було показано, що сполуки, які містять кластери трьох N-ацетилгалактозамінових (GalNAc) лігандів, здатні зв'язуватися з ASGP-R, приводячи до захоплення вказаної сполуки в клітину. Див., наприклад, Khorev et al., Bioorganic and Medicinal Chemistry, 16, 9, сс. 5216-5231 (травень, 2008). Відповідно, кон'югати, що містять такі кластери

GalNAc, застосовували для полегшення захоплення деяких сполук в клітини печінки, зокрема, гепатоцити. Наприклад, було показано, що деякі GalNAc-вмісні кон'югати збільшують активність дуплексних міРНК сполук у клітинах печінки *in vivo*. У таких випадках GalNAc-вмісний кон'югат, як правило, прикріплюється до смислової спіралі дуплексу міРНК. Оскільки смислова спіраль відкидається перед остаточною гібридизацією антисмислової спіралі із цільовою нуклеїновою кислотою, то маловірогідно, що такий кон'югат впливатиме на активність. Як правило, кон'югат приєднується до 3'-кінця смислової спіралі міРНК. Див., наприклад, патент США 8106022. Деякі кон'югувальні групи, описані у даному документі, є більш активними та/або синтезуються легше, ніж кон'югувальні групи, описані раніше.

У деяких варіантах реалізації даного винаходу кон'югати приєднуються до одноланцюгових антисмислових сполук, включаючи, але не обмежуючись ними, антисмислові сполуки на основі РНКаз Н і антисмислові сполуки, що змінюють сплайсинг цільової нуклеїнової кислоти пре-мРНК. У таких варіантах реалізації винаходу кон'югат повинен залишатися приєднаним до антисмислової сполуки достатньо довго для забезпечення переваги (покращеного захоплення в клітині), але потім він повинен або розщеплюватися, або іншим чином не перешкоджати подальшим стадіям, необхідним для активності, таким як гібридизація з цільовою нуклеїновою кислотою і взаємодія з РНКазою Н або ферментами, пов'язаними із сплайсингом або модуляцією сплайсинга. Такий баланс властивостей є більш важливим при підготовці одноланцюгових антисмислових сполук, ніж сполук міРНК, де кон'югат може бути просто приєднаний до смислової спіралі. У даному документі описані одноланцюгові антисмислові сполуки, що мають покращену активність в клітинах печінки *in vivo*, порівняно з такою ж антисмисловою сполукою, що не має кон'югату. Враховуючи необхідний баланс властивостей для цих сполук, така покращена активність є несподіваною.

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югувальні групи відповідно до даного документу містять розщеплюваний фрагмент. Як було відмічено, не обмежуючись яким-небудь механізмом, логічно, що кон'югат повинен зберігатися у сполуці достатньо довго для забезпечення підсилення захоплення, але після цього бажаним є, щоб деяка його частина або, в ідеалі, весь кон'югат розщеплювався, виділяючи початкову сполуку (наприклад, антисмислову сполуку) в її найактивнішій формі. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент є розщеплюваним нуклеозидом. Такі варіанти реалізації винаходу використовують ендогенні нуклеази в клітині за рахунок приєднання решти частини кон'югату (кластера) до антисмислового олігонуклеотиду через нуклеозид за допомогою одного або декількох розщеплюваних зв'язків, таких як фосфодіестерні зв'язки. У деяких варіантах реалізації винаходу кластер пов'язаний з розщеплюваним нуклеозидом через фосфодіестерний зв'язок. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний нуклеозид приєднаний до антисмислового олігонуклеотиду (антисмислової сполуки) фосфодіестерним зв'язком. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югувальна група може містити два або три розщеплюваних нуклеозиди. У таких варіантах реалізації винаходу вказані розщеплювані нуклеозиди, пов'язані один з одним, з антисмисловою сполукою та/або з кластером за допомогою розщеплюваних зв'язків (таких як фосфодіестерний зв'язок). Деякі кон'югати за даним документом не містять розщеплюваного нуклеозиду, а натомість містять розщеплюваний зв'язок. Показано, що достатнє розщеплення кон'югату з олігонуклеотиду забезпечується щонайменше за рахунок одного зв'язку, який легко піддається розщепленню в клітині (розщеплюваний зв'язок).

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'юговані антисмислові сполуки є проліками. Такі проліки вводять тварині, і вони зрештою метаболізуються до активнішої форми. Наприклад, кон'юговані антисмислові сполуки розщеплюються з видаленням всього або частини кон'югату, приводячи до активної (або активнішої) форми антисмислової сполуки, що не містить всього або частини кон'югату.

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югати приєднані на 5'-кінці олігонуклеотиду. Деякі такі 5'-кон'югати розщеплюються ефективніше, ніж аналоги, що мають таку ж кон'югувальну групу, приєднану на 3'-кінці. У деяких варіантах реалізації винаходу покращена активність може корелювати з покращеним розщепленням. У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотиди, що містять кон'югат на 5'-кінці, мають вищу ефективність, ніж олігонуклеотиди, що містять кон'югат на 3'-кінці (див., наприклад, Приклади 56, 81, 83 і 84). Крім того, 5'-приєднання забезпечує простіший синтез олігонуклеотиду. Як правило, олігонуклеотиди синтезують на твердій основі в напрямку від 3" до 5". Для одержання 3'-кон'югованого олігонуклеотиду, як правило, приєднують попередньо кон'югований 3'-нуклеозид до твердої основи, а потім звичайним шляхом створюють олігонуклеотид. Однак приєднання такого кон'югованого нуклеозиду до твердої основи ускладнює синтез. Крім того, застосовуючи такий підхід, кон'югат далі присутній в ході всього синтезу олігонуклеотиду і може руйнуватися під час

подальших стадій або може обмежувати типи реакцій і реагентів, які можна застосовувати. Застосовуючи структури і методики, описані в даному документі для 5'-кон'югованих олігонуклеотидів, можна синтезувати олігонуклеотид за допомогою стандартних автоматизованих методик і вводити кон'югат разом з останнім (5'-крайнім) нуклеозидом або після відокремлення олігонуклеотиду від твердої основи.

З урахуванням відомого рівня техніки і даного опису, фахівці в даній галузі техніки можуть з легкістю одержати будь-які з кон'югатів і кон'югованих олігонуклеотидів, описаних в даному документі. Крім того, синтез деяких таких кон'югатів і кон'югованих олігонуклеотидів, описаних в даному документі, простіший та/або вимагає менше стадій і, отже, менш дорогий, ніж синтез раніше описаних кон'югатів, що дає перевагу при виробництві. Наприклад, синтез деяких кон'югувальних груп складається з меншої кількості синтетичних стадій, що приводить до збільшення виходу, порівняно з раніше описаними групами кон'югату. Кон'югувальні групи, такі як GalNAc3-10 в Прикладі 46 і GalNAc3-7 в Прикладі 48, набагато простіше, ніж раніше описані кон'югати, такі як описані в публікаціях U.S. 8106022 або U.S. 7262177, для яких необхідне збирання більшої кількості хімічних проміжних сполук. Відповідно, ці та інші кон'югати, описані в даному документі, мають перевагу порівняно з раніше описаними сполуками для застосування з будь-яким олігонуклеотидом, включаючи одноланцюгові олігонуклеотиди і будь-яку спіраль дволанцюгових олігонуклеотидів (наприклад, міРНК).

Так само в даному документі описані кон'югувальні групи, що мають рівно один або два ліганди GalNAc. Як показано, такі кон'юговані групи підсилюють активність антисмислових сполук. Такі сполуки набагато простіше одержати, ніж кон'югати, що містять три ліганди GalNAc. Кон'югувальні групи, що містять один або два ліганди GalNAc, можуть бути приєднані до будь-яких антисмислових сполук, включаючи одноланцюгові олігонуклеотиди і будь-яку спіраль дволанцюгових олігонуклеотидів (наприклад, міРНК).

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югати, описані в даному документі, істотно не змінюють деякі показники переносимості. Наприклад, у даному документі показано, що кон'юговані антисмислові сполуки є не більш імуногенними, ніж некон'юговані початкові сполуки. Оскільки активність покращується, то варіанти реалізації, у яких переносимість залишається такою ж (або, насправді, якщо навіть переносимість тільки незначно погіршується, порівняно з приростом активності), мають покращені характеристики для терапії.

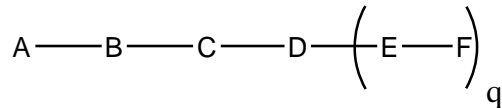
У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югація дозволяє змінювати антисмислові сполуки таким чином, щоб вони мали менш виражені наслідки за відсутності кон'югації. Наприклад, у деяких варіантах реалізації винаходу заміна одного або декількох тіофосфатних зв'язків повністю тіофосфатної антисмислової сполуки на фосфодіестерні зв'язки приводить до покращення деяких показників переносимості. Наприклад, у деяких випадках такі антисмислові сполуки, що мають один або декілька фосфодіестерів, є менш імуногенними, ніж такі ж сполуки, у яких кожен зв'язок є тіофосфатним. Однак у деяких випадках, як показано у Прикладі 26, таке ж заміщення одного або декількох тіофосфатних зв'язків на фосфодіестерні зв'язки приводить також до зниження клітинного захоплення та/або до зниження активності. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'юговані антисмислові сполуки, описані в даному документі, допускають таку зміну зв'язків з невеликим зниженням або без зниження захоплення і активності, порівняно з кон'югованим повністю тіофосфатним аналогом. Насправді, в деяких варіантах реалізації, наприклад, у Прикладах 44, 57, 59 і 86, олігонуклеотиди, що містять кон'югат і щонайменше один фосфодіестерний міжнуклеозидний зв'язок, фактично демонструють підвищену активність *in vivo*, навіть порівняно з повністю тіофосфатним аналогом, що також містить такий же кон'югат. Більше того, оскільки кон'югація приводить до значного збільшення захоплення/активності, то невелике зниження такого істотного приросту може бути прийнятним для досягнення покращеної переносимості. Відповідно, у деяких варіантах реалізації винаходу кон'юговані антисмислові сполуки містять щонайменше один фосфодіестерний зв'язок.

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югація антисмислових сполук за даним документом приводить до покращеної доставки, захоплення і активності в гепатоцитах. Отже, до тканини печінки доставляється більша кількість сполуки. Однак у деяких варіантах реалізації винаходу винаходу така покращена доставка сама по собі не пояснює загального збільшення активності. У деяких таких варіантах реалізації винаходу більша кількість сполуки надходить до гепатоцитів. У деяких варіантах реалізації винаходу навіть таке покращене захоплення гепатоцитами само по собі не пояснює загального збільшення активності. У таких варіантах реалізації винаходу збільшується продуктивне захоплення кон'югованої сполуки. Наприклад, як показано у Прикладі 102, деякі варіанти реалізації GalNAc-вмісних кон'югатів збільшують збагачення антисмислових олігонуклеотидів у гепатоцитах, порівняно з непаренхімальними клітинами. Таке збагачення є переважним для олігонуклеотидів, націлених на гени, що

експресуються у гепатоцитах.

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'юговані антисмислові сполуки за даним документом приводять до зменшення дії на нирки. Наприклад, як показано у Прикладі 20, концентрації антисмислових олігонуклеотидів, що містять деякі варіанти реалізації GalNAc-вмісних кон'югатів, в нирках є нижчими за концентрації антисмислових олігонуклеотидів, що не мають GalNAc-вмісного кон'югату. Це має декілька сприятливих терапевтичних ефектів. Для терапевтичних показань, при яких непотрібний прояв активності у нирках, дія на нирки піддає їх ризику токсичності без відповідної користі. Більше того, висока концентрація в нирках звичайно призводить до виведення сполуки із сечею, забезпечуючи швидше виведення. Відповідно, для позаниркових мішеней накопичення у нирках є небажаним.

У деяких варіантах реалізації даного опису наведені кон'юговані антисмислові сполуки, представлені формулою:



де

A являє собою антисмисловий олігонуклеотид;

B являє собою розщеплюваний фрагмент;

C являє собою лінкер кон'югату;

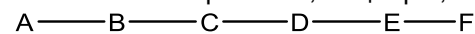
D являє собою групу розгалуження;

кожен E являє собою зв'язку;

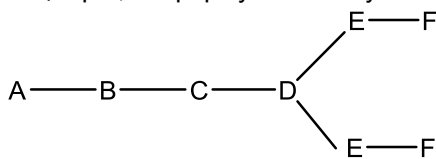
кожен F являє собою ліганд; і

q дорівнює цілому числу від 1 до 5.

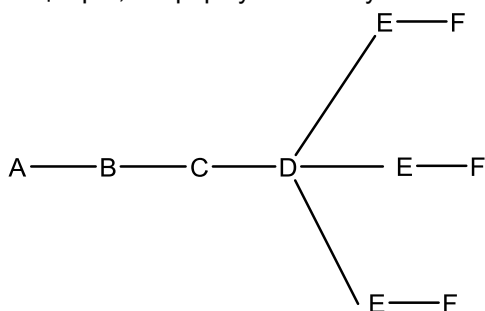
На наведеній вище схемі і в аналогічних схемах у даному документі група розгалуження "D" розгалужується таку кількість разів, яка є необхідною для відповідності кількості груп (E-F) вказаній кількості "q". Тобто, якщо q=1, то формула є наступною:



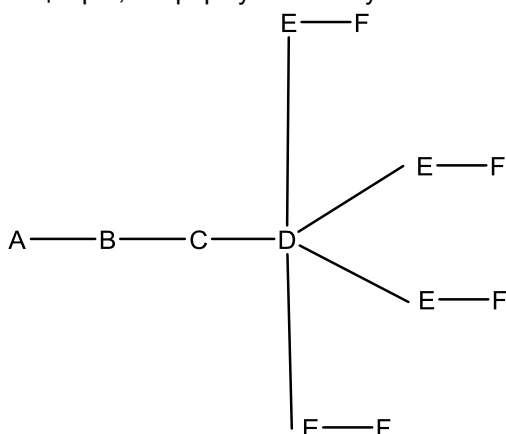
якщо q=2, то формула є наступною:



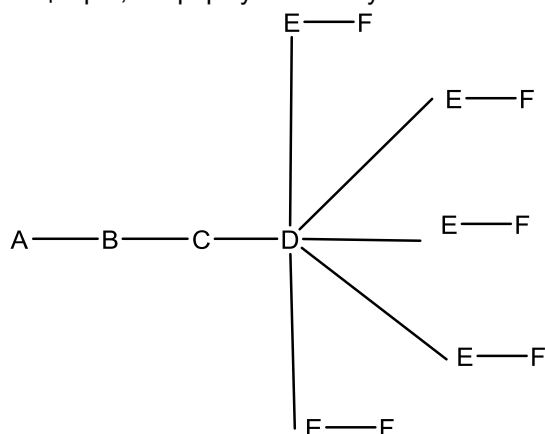
якщо q=3, то формула є наступною:



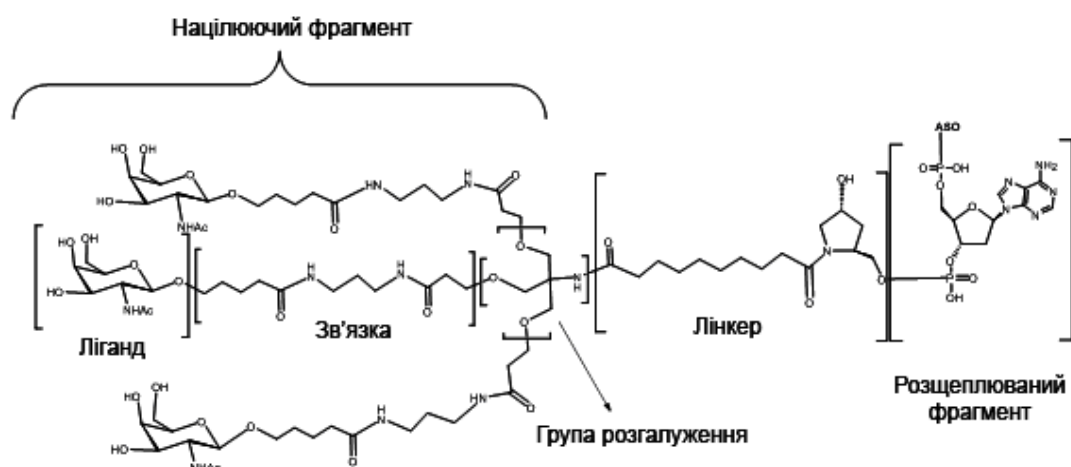
якщо q=4, то формула є наступною:



якщо $q=5$, то формула є наступною:

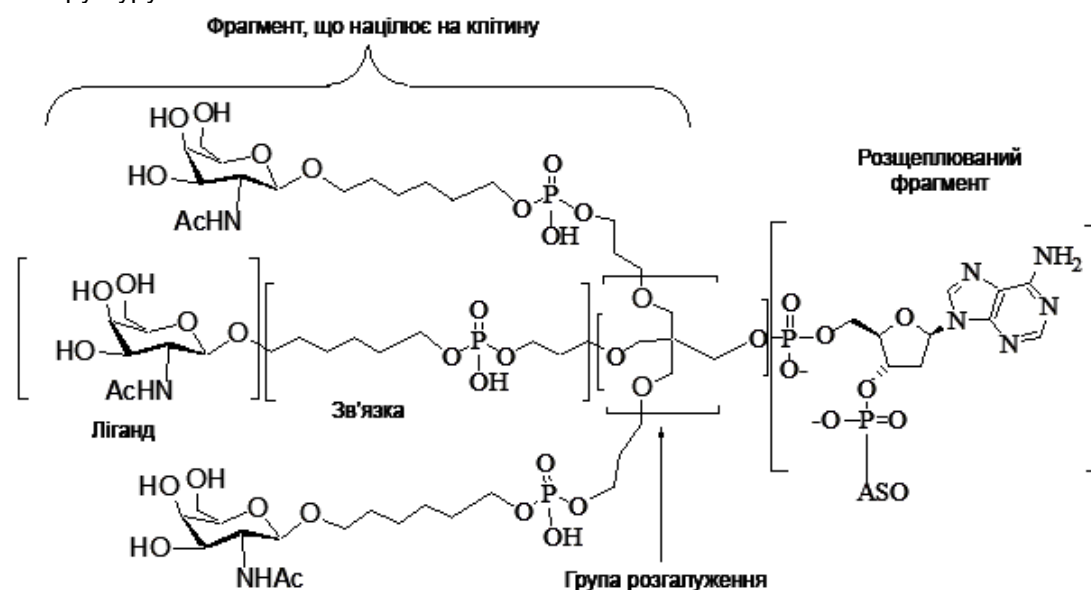


У деяких варіантах реалізації винаходу наведені кон'юговані антисмислові сполуки, що мають структуру:



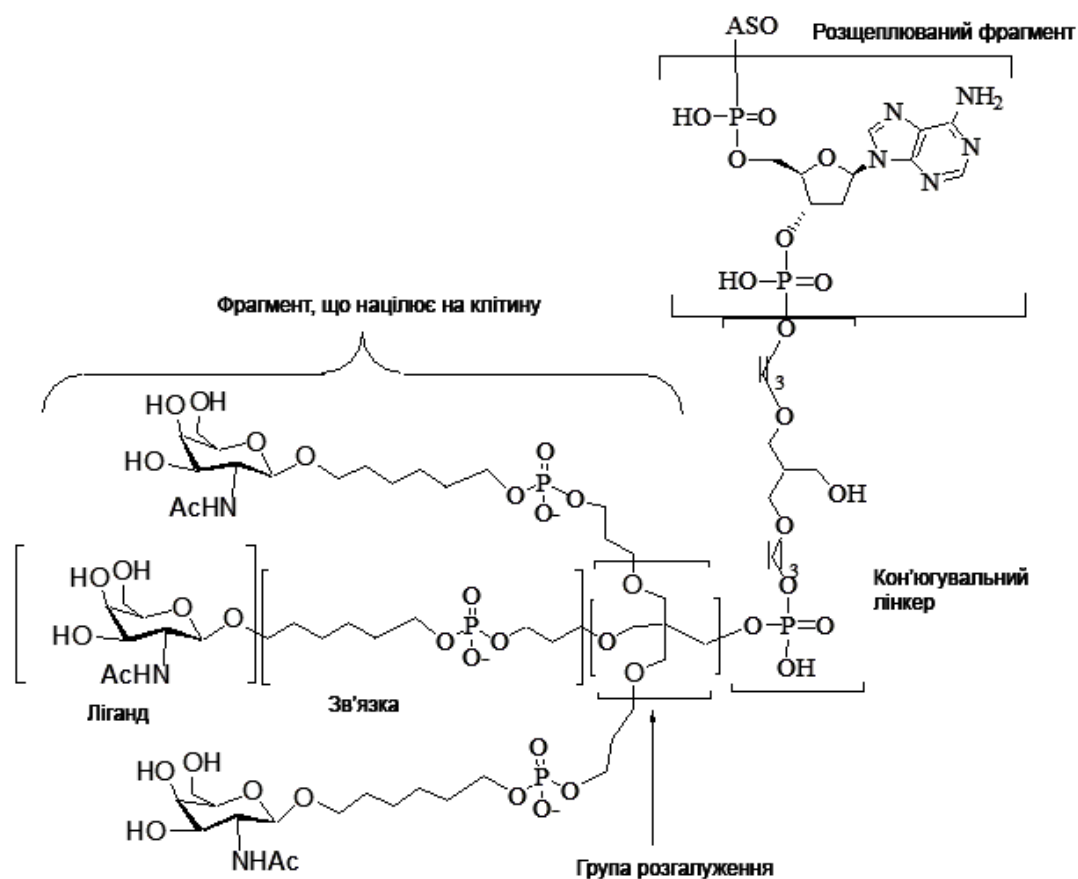
5

У деяких варіантах реалізації винаходу наведені кон'юговані антисмислові сполуки, що мають структуру:

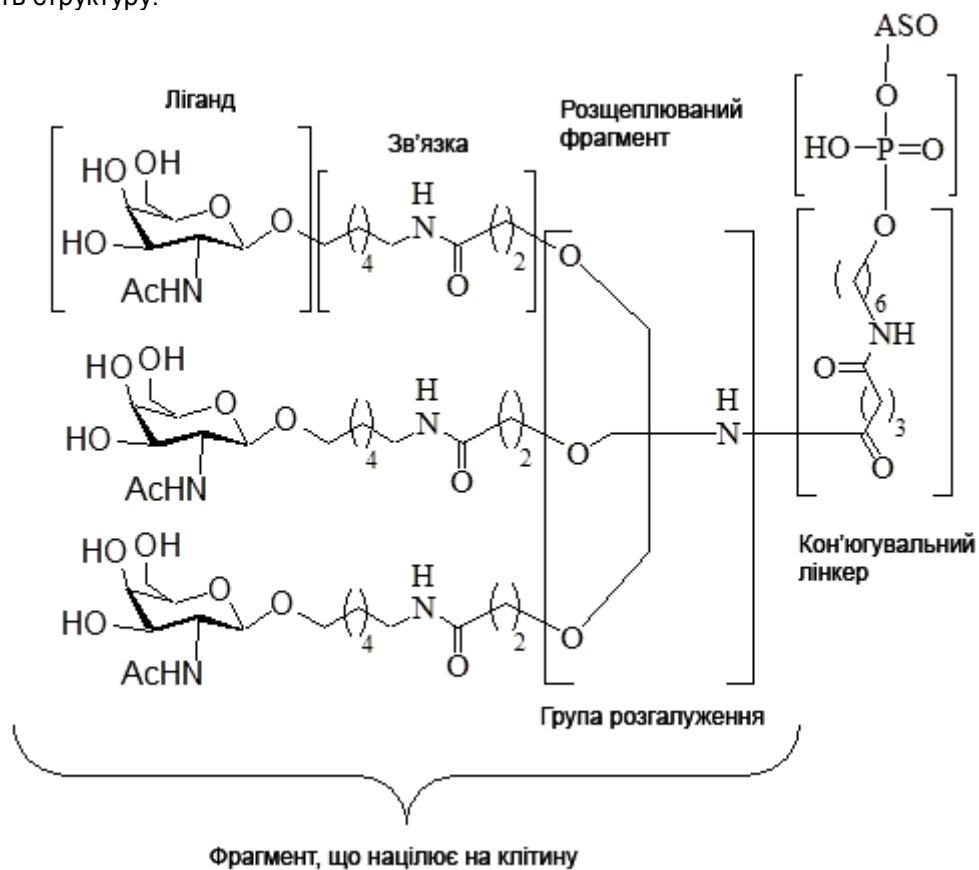


10

У деяких варіантах реалізації винаходу наведені кон'юговані антисмислові сполуки, що мають структуру:



У деяких варіантах реалізації винаходу наведені кон'юговані антисмислові сполуки, що мають структуру:



У варіантах реалізації, що мають більше однієї конкретної змінної (наприклад, більше одного "m" або "n"), якщо не вказано інше, кожна така конкретна змінна вибрана незалежно. Отже, для структури, що має більш одного n, кожен n вибраний незалежно, таким чином, що вони можуть бути або не бути однаковими між собою.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Потрібно розуміти, що наведений вище загальний опис і наступний детальний опис є тільки ілюстративними і пояснючими, вони не обмежують даного опису. У даному документі використання однини включає множину, якщо спеціально не вказано інше. При використанні в даному документі, термін "або" позначає "та/або", якщо не вказано інше. Крім того, використання терміну "включаючи", а також інших форм, таких як "включає" і "включений", не є обмежувачим. Крім того, такі терміни як "елемент" або "компонент" охоплюють елементи і компоненти, що містять одну одиницю, та елементи і компоненти, що містять більше однієї субоддиниці, якщо спеціально не вказано інше.

Назви розділів, використані в даному документі, призначені лише для організаційних цілей, і їх не потрібно тлумачити як обмеження описаного об'єкту винаходу. Всі документи або частини документів, процитовані в даній заявці, включаючи, але не обмежуючись ними, патенти, патентні заявки, статті, книги і монографії, в явній формі включені до даного документу шляхом посилання в повному об'ємі для всіх цілей.

A. Визначення

За відсутності конкретних визначень, номенклатура, використана у зв'язку з ними, а також у зв'язку з прийомами і методиками аналітичної хімії, синтетичної органічної хімії, а також медичної і фармацевтичної хімії, описана у даному документі, є загальновідомою і загальноприйнятою в даній галузі техніки. Для хімічного синтезу і хімічного аналізу можуть бути використані стандартні методики. Деякі такі методики і прийоми наведені, наприклад, у публікаціях "Carbohydrate Modifications in Antisense Research" під редакцією Sangvi і Cook, American Chemical Society, федеральний округ Вашингтон, 1994; "Remington's Pharmaceutical Sciences, " Mack Publishing Co., Істон, штат Пенсильванія, 21^е видання, 2005; і "Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications" під редакцією Stanley T. Crooke, CRC Press, Бока-Ратон, штат Флорида; а також у книзі Sambrook et al., "Molecular Cloning, A laboratory Manual, " 2^е видання, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, які включені до даного документу шляхом посилання для всіх цілей. Якщо це допустимо, всі патенти, заявки, опубліковані заявки та інші публікації, а також інші дані, згадувані в тексті даного опису, включені до даного документу шляхом посилання в повному об'ємі.

Якщо не вказано інше, наступні терміни мають наступні значення:

При використанні в даному документі, "нуклеозид" позначає сполуку, що містить фрагмент азотистої основи і цукровий фрагмент. Нуклеозиди включають, без обмеження, природні нуклеозиди (що знаходяться в ДНК і РНК) і модифіковані нуклеозиди. Нуклеозиди можуть бути зв'язані з фосфатним фрагментом.

При використанні в даному документі, "хімічна модифікація" позначає хімічну відмінність в сполуці, порівняно з природним аналогом. Хімічні модифікації олігонуклеотидів включають нуклеозидні модифікації (включаючи модифікації цукрового фрагмента і модифікації азотистих основ) і модифікації міжнуклеозидних зв'язків. Відносно олігонуклеотиду хімічна модифікація включає не тільки відмінності в послідовності азотистих основ.

При використанні в даному документі, "фуранозил" позначає структуру, що містить 5-членне кільце, яке містить чотири атоми карбону і один атом кисню.

При використанні в даному документі, "природний цукровий фрагмент" позначає рибофуранозил, що зустрічається в природній РНК, або дезоксирибофуранозил, що зустрічається в природній ДНК.

При використанні в даному документі, "цукровий фрагмент" позначає природний цукровий фрагмент або модифікований цукровий фрагмент нуклеозиду.

При використанні в даному документі, "модифікований цукровий фрагмент" позначає заміщений цукровий фрагмент або замітник цукру.

При використанні в даному документі, "заміщений цукровий фрагмент" позначає фуранозил, що не є природним цукровим фрагментом. Заміщені цукрові фрагменти включають, без обмеження, фуранозили, що містять замісники у 2'-положенні, 3'-положенні, 5'-положенні та/або 4'-положенні. Деякі заміщені цукрові фрагменти є біциклічними цукровими фрагментами.

При використанні в даному документі, "2'-заміщений цукровий фрагмент" позначає фуранозил, що містить у 2'-положенні замісник, відмінний від H або OH. Якщо не вказано інше, то 2'-заміщений цукровий фрагмент не є біциклічним цукровим фрагментом (тобто 2'-замісник

2'-заміщеного цукрового фрагмента не утворює місток з іншим атомом радикалу фуранозного кільця).

При використанні в даному документі, "МОЕ" позначає $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$.

При використанні в даному документі, "2'-F нуклеозид" стосується нуклеозиду, що містить цукор, який містить флуор у 2'-положенні. Якщо не вказано інше, то флуор у 2'-F нуклеозиді знаходиться у рибо-положенні (замінюючи OH природної рибози).

При використанні в даному документі, термін "замінник цукру" позначає структуру, яка не містить фуранозилу і здатна замінювати природний цукровий фрагмент нуклеозиду, таким чином, що нуклеозидні субодиниці, які утворюються, можуть зв'язуватися разом та/або зв'язуватися з іншими нуклеозидами з утворенням олігомерної сполуки, яка може гібридизуватися з комплементарною олігомерною сполукою. Такі структури включають кільця, що містять іншу кількість атомів, ніж фуранозил (наприклад, 4, 6 або 7-членні кільця); заміну оксигену фуранозилу неоксигеновим атомом (наприклад, карбоном, сульфуром або нітрогеном); або одночасну зміну кількості атомів і заміну оксигену. Крім того, такі структури можуть містити заміщення, відповідні заміщенням, описаним для заміщених цукрових фрагментів (наприклад, 6-членні карбоциклічні біциклічні замінники цукру, що необов'язково містять додаткові замісники). Замінники цукру включають також складніші цукрові замісники (наприклад, не кільцеві системи пептидної нуклеїнової кислоти). Замінники цукру включають, без обмеження, морфоліно, циклогексеніли і циклогекситоли.

При використанні в даному документі, "біциклічний цукровий фрагмент" позначає модифікований цукровий фрагмент, що містить 4-7-членне кільце (включаючи, без обмеження, фуранозил), яке містить місток, що зв'язує два атоми 4-7-членного кільця з утворенням другого кільця, що приводить до одержання біциклічної структури. В деяких варіантах реалізації винаходу 4-7-членне кільце є цукровим кільцем. У деяких варіантах реалізації винаходу 4-7-членне кільце є фуранозилом. У деяких таких варіантах реалізації винаходу місток сполучає 2'-карбон і 4'-карбон фуранозилу.

При використанні в даному документі, "нуклеотид" позначає нуклеозид, що додатково містить фосфатну зв'язувальну групу. При використанні в даному документі, "зв'язані нуклеозиди" можуть бути або не бути зв'язані фосфатними зв'язками і, отже, включають, без обмеження, "зв'язані нуклеотиди". При використанні в даному документі, "зв'язані нуклеозиди" являють собою нуклеозиди, що зв'язані в безперервну послідовність (тобто між зв'язаними нуклеозидами немає додаткових нуклеозидів).

При використанні в даному документі, "азотиста основа" позначає групу атомів, яка може бути пов'язана із цукровим фрагментом з утворенням нуклеозиду, що може бути введений до олігонуклеотиду, і при цьому вказана група атомів може зв'язуватися з комплементарною природною азотистою основою іншого олігонуклеотиду або нуклеїнової кислоти. Азотисті основи можуть бути природними або можуть бути модифікованими.

При використанні в даному документі, терміни "немодифікована азотиста основа" або "природна азотиста основа" позначають природні гетероциклічні азотисті основи РНК або ДНК: пуринові основи аденін (A) і гуанін (G) і піримідинові основи тимін (T), цитозин (C) (включаючи 5-метил C) і урацил (U).

При використанні в даному документі, "модифікована азотиста основа" позначає будь-яку азотисту основу, що не є природною азотистою основою.

При використанні в даному документі, "модифікований нуклеозид" позначає нуклеозид, який містить щонайменше одну хімічну модифікацію, порівняно з природними нуклеозидами РНК або ДНК. Модифіковані нуклеозиди містять модифікований цукровий фрагмент та/або модифіковану азотисту основу.

При використанні в даному документі, "біциклічний нуклеозид" або "BNA" позначає нуклеозид, що містить біциклічний цукровий фрагмент.

При використанні в даному документі, "стерично ускладнений етил-нуклеозид" або "сEt" позначає нуклеозид, що містить біциклічний цукровий фрагмент, який містить місток 4'-CH(CH₃)-O-2".

При використанні в даному документі, "нуклеозид закритої нуклеїнової кислоти" або "LNA" позначає нуклеозид, що містить біциклічний цукровий фрагмент, який містить місток 4'-CH₂-O-2".

При використанні в даному документі, "2'-заміщений нуклеозид" позначає нуклеозид, що містить замісник в 2'-положенні, відмінний від H або OH. Якщо не вказано інше, то 2'-заміщений нуклеозид не є біциклічним нуклеозидом.

При використанні в даному документі, "дезоксинуклеозид" позначає нуклеозид, що містить 2'-H фуранозний цукровий фрагмент, що знаходиться в природних дезоксирибонуклеозидах

(ДНК). У деяких варіантах реалізації винаходу 2'-дезоксинуклеозид може містити модифіковану азотисту основу або може містити азотисту основу РНК (наприклад, урацил).

При використанні в даному документі, "олігонуклеотид" позначає сполуку, що містить множини зв'язаних нуклеозидів. У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотид містить один або декілька немодифікованих рибонуклеозидів (РНК) та/або немодифікованих дезоксирибонуклеозидів (ДНК) та/або один або декілька модифікованих нуклеозидів.

При використанні в даному документі, "олігонуклеозид" позначає олігонуклеотид, в якому жоден з міжнуклеозидних зв'язків не містить атома фосфору. При використанні в даному документі, олігонуклеотиди включають олігонуклеозиди.

При використанні в даному документі, "модифікований олігонуклеотид" позначає олігонуклеотид, який містить щонайменше один модифікований нуклеозид та/або щонайменше один модифікований міжнуклеозидний зв'язок.

При використанні в даному документі, "зв'язок" або "зв'язувальна група" позначає групу атомів, яка зв'язує разом дві або більше інших груп атомів.

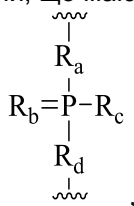
При використанні в даному документі, "міжнуклеозидний зв'язок" позначає ковалентний зв'язок між сусідніми нуклеозидами в олігонуклеотиді.

При використанні в даному документі, "природний міжнуклеозидний зв'язок" позначає фосфодіестерний зв'язок 3' із 5'.

При використанні в даному документі, "модифікований міжнуклеозидний зв'язок" позначає будь-який міжнуклеозидний зв'язок, відмінний від природного міжнуклеозидного зв'язку.

При використанні в даному документі, "кінцевий міжнуклеозидний зв'язок" позначає зв'язок між останніми двома нуклеозидами олігонуклеотиду або його певної ділянки.

При використанні в даному документі, "фосфорна зв'язувальна група" позначає зв'язувальну групу, що містить атом фосфору. Фосфорні зв'язувальні групи включають, без обмеження, групи, що мають формулу:



де:

R_a і R_d , кожен незалежно, являє собою O, S, CH_2 , NH або NJ_1 , де J_1 являє собою C_1 - C_6 алкіл або заміщений C_1 - C_6 алкіл;

R_b являє собою O або S;

R_c являє собою OH, SH, C_1 - C_6 алкіл, заміщений C_1 - C_6 алкіл, C_1 - C_6 алкокси, заміщений C_1 - C_6 алкокси, аміно або заміщений аміно; і

J_1 являє собою R_b являє собою O або S.

Фосфорні зв'язувальні групи включають, без обмеження, фосфодіестер, тіофосфат, дитіофосфат, фосфонат, фосфорамідат, фосфортіоамідат, тіоноалкілфосфонат, фосфотриестери, тіоноалкілфосфотриестери і боранофосфат.

При використанні в даному документі, "міжнуклеозидна фосфорна зв'язувальна група" позначає фосфорну зв'язувальну групу, що напряду зв'язує два нуклеозиди.

При використанні в даному документі, "не міжнуклеозидна фосфорна зв'язувальна група" позначає фосфорну зв'язувальну групу, яка не зв'язує напряду два нуклеозиди. У деяких варіантах реалізації винаходу не міжнуклеозидна фосфорна зв'язувальна група зв'язує нуклеозид із групою, відмінною від нуклеозиду. У деяких варіантах реалізації винаходу не міжнуклеозидна фосфорна зв'язувальна група зв'язує дві групи, жодна з яких не є нуклеозидом.

При використанні в даному документі, "нейтральна зв'язувальна група" означає зв'язувальну групу, що не має заряду. Нейтральні зв'язувальні групи включають, без обмеження, фосфотриестери, метилфосфонати, MMI ($-CH_2-N(CH_3)-O-$), амід-3 ($-CH_2-C(=O)-N(H)-$), амід-4 ($-CH_2-N(H)-C(=O)-$), формацеталь ($-O-CH_2-O-$) і тіоформацеталь ($-S-CH_2-O-$). Додаткові нейтральні зв'язувальні групи включають неіонні зв'язки, що містять силокасан (діалкілсилоксан), карбоксильний естер, карбоксамід, сульфід, сульфононий естер і аміди (див., наприклад: Carbohydrate Modifications in Antisense Research; під ред. Y.S. Sanghvi і P.D. Cook, ACS Symposium, серія 580; розділи 3 і 4, (сс. 40-65)). Додаткові нейтральні зв'язувальні групи включають неіонні зв'язки, що містять змішані складові частини N, O, S і CH_2 .

При використанні в даному документі, "міжнуклеозидна нейтральна зв'язувальна група" позначає нейтральну зв'язувальну групу, яка напряду зв'язує два нуклеозиди.

При використанні в даному документі, "не міжнуклеозидна нейтральна зв'язувальна група"

позначає нейтральну зв'язувальну групу, яка не зв'язує напряду два нуклеозиди. У деяких варіантах реалізації винаходу не міжнуклеозидна нейтральна зв'язувальна група зв'язує нуклеозид із групою, відмінною від нуклеозиду. У деяких варіантах реалізації винаходу не міжнуклеозидна нейтральна зв'язувальна група зв'язує дві групи, жодна з яких не є нуклеозидом.

При використанні в даному документі, "олігомерна сполука" позначає полімерну структуру, що містить дві або більше субструктур. У деяких варіантах реалізації винаходу олігомерна сполука містить олігонуклеотид. У деяких варіантах реалізації винаходу олігомерна сполука містить одну або декілька кон'югованих груп та/або кінцевих груп. У деяких варіантах реалізації винаходу олігомерна сполука складається з олігонуклеотиду. Олігомерні сполуки включають також природні нуклеїнові кислоти. У деяких варіантах реалізації винаходу олігомерна сполука містить скелет однієї або декількох зв'язаних мономерних субодиниць, при цьому кожна зв'язана мономерна субодиниця прямо або непрямо приєднана до гетероциклічного основного фрагмента. У деяких варіантах реалізації винаходу олігомерні сполуки можуть містити також мономерні субодиниці, що не зв'язані з гетероциклічним основним фрагментом, забезпечуючи таким чином сайти з видаленими основами. У деяких варіантах реалізації винаходу зв'язки, що сполучають мономерні субодиниці, цукрові фрагменти або замітники і гетероциклічні основні фрагменти, можуть бути незалежно модифікованими. У деяких варіантах реалізації винаходу одиниця зв'язок-цукор, що може містити або не містити гетероциклічної основи, може бути заміщена міметиком, таким як мономер у пептидних нуклеїнових кислотах.

При використанні в даному документі, "кінцева група" позначає один або декілька атомів, приєднаних до будь-якого або до обох 3'- або 5'-кінців олігонуклеотиду. У деяких варіантах реалізації винаходу кінцева група є кон'югувальною групою. У деяких варіантах реалізації винаходу кінцева група містить один або декілька нуклеозидів кінцевої групи.

При використанні в даному документі, "кон'югат" або "кон'югувальна група" позначає атом або групу атомів, зв'язану з олігонуклеотидом або олігомерною сполукою. Як правило, кон'югувальні групи модифікують одну або декілька властивостей сполуки, до якої вони приєднані, включаючи, без обмеження, властивості фармакодинаміки, фармакокінетики, зв'язування, поглинання, клітинного розподілу, клітинного захоплення, заряду та/або виведення.

При використанні в даному документі, "лінкер кон'югату" або "лінкер" в контексті кон'югувальної групи позначає частину кон'югувальної групи, що містить будь-який атом або групу атомів і ковалентно зв'язує (1) олігонуклеотид з іншою частиною кон'югувальної групи або (2) дві або декілька частин кон'югувальної групи.

Кон'югувальні групи показані в даному документі як радикали, що забезпечують зв'язок для утворення ковалентного приєднання до олігомерної сполуки, такої як антисмисловий олігонуклеотид. У деяких варіантах реалізації винаходу точка приєднання в олігомерній сполуці являє собою 3'-атом оксигену 3'-гідроксильної групи 3'-кінцевого нуклеозиду олігомерної сполуки. У деяких варіантах реалізації винаходу точка приєднання в олігомерній сполуці являє собою 5'-атом оксигену 5'-гідроксильної групи 5'-кінцевого нуклеозиду олігомерної сполуки. У деяких варіантах реалізації винаходу зв'язок для утворення приєднання до олігомерної сполуки є розщеплюваним зв'язком. У деяких таких варіантах реалізації винаходу такий розщеплюваний зв'язок складає весь або частину розщеплюваного фрагмента.

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югувальні групи містять розщеплюваний фрагмент (наприклад, розщеплюваний зв'язок або розщеплюваний нуклеозид) і частину вуглеводного кластера, таку як частина кластера GalNAc. Така частина вуглеводного кластера містить: націлюючий фрагмент і, необов'язково, лінкер кон'югату. У деяких варіантах реалізації винаходу частину вуглеводного кластера визначають за кількістю і природою ліганду. Наприклад, у деяких варіантах реалізації винаходу частина вуглеводного кластера містить три групи GalNAc і позначена як "GalNAc₃". У деяких варіантах реалізації винаходу частина вуглеводного кластера містить 4 групи GalNAc і позначена як "GalNAc₄". Конкретні частини вуглеводних кластерів (що мають конкретну зв'язку, групи розгалуження і лінкера кон'югату) описані в даному документі і позначені римською цифрою з подальшим нижнім індексом "а". Відповідно, "GalNAc3-1_a" стосується конкретної частини вуглеводного кластера кон'югувальної групи, що містить 3 групи GalNAc і конкретно визначену зв'язку, групи розгалуження і лінкера. Такий фрагмент вуглеводного кластера приєднаний до олігомерної сполуки через розщеплюваний фрагмент, такий як розщеплюваний зв'язок або розщеплюваний нуклеозид.

При використанні в даному документі, "розщеплюваний фрагмент" позначає зв'язок або групу, яка може бути розщеплена за фізіологічних умов. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент розщеплюється усередині клітини або у внутрішньоклітинних відділах, таких як лізосома. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент

розщеплюється ендogenousними ферментами, такими як нуклеази. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент містить групу атомів, що має один, два, три, чотири або більше чотирьох розщеплюваних зв'язків.

При використанні в даному документі, "розщеплюваний зв'язок" позначає будь-який хімічний зв'язок, що може бути розщеплений. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний зв'язок вибраний з: амідів, поліамідів, естерів, етерів, одного або обох естерів фосфодіестеру, фосфатного естеру, карбамату, дисульфідів або пептиду.

При використанні в даному документі, "вуглеводний кластер" позначає сполуку, що має один або декілька вуглеводних залишків, приєднаних до скелету або зв'язувальної групи. (див., наприклад, публікацію Maier et al., "Synthesis of Antisense Oligonucleotides Conjugated to a Multivalent Carbohydrate Cluster for Cellular Targeting," Bioconjugate Chemistry, 2003, (14): 18-29, яка включена до даного документу шляхом посилання в повному об'ємі, або Rensen et al., "Design and Synthesis of Novel N-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoproteins to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor," J. Med. Chem. 2004, (47): 5798-5808, де наведені приклади вуглеводних кон'югованих кластерів).

При використанні в даному документі, "похідне вуглеводу" позначає будь-яку сполуку, яка може бути синтезована із застосуванням вуглеводу як початкового матеріалу або проміжної сполуки.

При використанні в даному документі, "вуглевод" позначає природний вуглевод, модифікований вуглевод або похідне вуглеводу.

При використанні в даному документі, "захисна група" позначає будь-яку сполуку або захисну групу, відому фахівцям у даній галузі техніки. Необмежуючі приклади захисних груп наведені в публікації "Protective Groups in Organic Chemistry", T. W. Greene, P. G. M. Wuts, ISBN 0-471-62301-6, John Wiley & Sons, Inc, Нью-Йорк, повний зміст якої включений до даного документу шляхом посилання.

При використанні в даному документі, "одноланцюгова" позначає олігомерну сполуку, що не гібридизована з комплементарною до неї і не має достатню самокомплементарність для утворення стабільного власного дуплексу.

При використанні в даному документі, "дволанцюгова" позначає пару олігомерних сполук, що гібридизовані одна з одною, або одну самокомплементарну олігомерну сполуку, що утворює шпилькову структуру. У деяких варіантах реалізації винаходу дволанцюгова олігомерна сполука містить першу і другу олігомерну сполуку.

При використанні в даному документі, "антисмислова сполука" позначає сполуку, що містить або складається з олігонуклеотиду, щонайменше частина якого є комплементарною цільовій нуклеїновій кислоті, з якою можлива його гібридизація, що приводить до одержання щонайменше однієї антисмислової активності.

При використанні в даному документі, "антисмислова активність" позначає будь-яку зміну, що може бути виявлена та/або виміряна, обумовлену гібридизацією антисмислової сполуки з її цільовою нуклеїновою кислотою. У деяких варіантах реалізації винаходу антисмислова активність включає модуляцію кількості або активності транскрипту цільової нуклеїнової кислоти (наприклад, мРНК). У деяких варіантах реалізації винаходу антисмислова активність включає модуляцію сплайсинга пре-мРНК.

При використанні в даному документі, "антисмислова сполука на базі РНКаз Н" позначає антисмислову сполуку, в якій щонайменше частина антисмислової активності антисмислової сполуки обумовлена гібридизацією антисмислової сполуки із цільовою нуклеїновою кислотою і подальшим розщепленням цільової нуклеїнової кислоти під дією РНКаз Н.

При використанні в даному документі, "антисмислова сполука на базі RISC" позначає антисмислову сполуку, в якій щонайменше частина антисмислової активності антисмислової сполуки обумовлена РНК-індукованим комплексом сайленсинга (RISC).

При використанні в даному документі, "виявлення" або "вимірювання" позначає, що проведено випробування або аналіз для виявлення або вимірювання. Таке виявлення та/або вимірювання може приводити до результату з нульовим значенням. Отже, навіть якщо випробування для виявлення або вимірювання приводить до виявлення відсутності активності (нульової активності), то стадія виявлення або вимірювання активності була проведена.

При використанні в даному документі, "активність, що може бути виявлена та/або виміряна" позначає статистично значущу активність, що не є нульовою.

При використанні в даному документі, "по суті не змінений" позначає невелику або відсутність зміни конкретного параметра, зокрема, порівняно з іншим параметром, що змінився набагато більше. У деяких варіантах реалізації винаходу параметр є по суті не зміненим, якщо його зміна становила менше 5 %. У деяких варіантах реалізації винаходу параметр є по суті не

зміненим, якщо його зміна становила менше двох разів, тоді як зміна іншого параметра становила щонайменше десять разів. Наприклад, у деяких варіантах реалізації винаходу антисмислова активність є зміною кількості цільової нуклеїнової кислоти. У деяких таких варіантах реалізації винаходу кількість нецільової нуклеїнової кислоти є по суті не зміненою, якщо вона змінюється набагато менше, ніж змінюється кількість цільової нуклеїнової кислоти, але ця зміна не обов'язково повинна бути нульовою.

При використанні в даному документі, "експресія" позначає процес, за допомогою якого ген зрештою перетвориться на білок. Експресія включає, без обмеження, транскрипцію, посттранскрипційну модифікацію (наприклад, сплайсинг, поліаденілювання, додавання 5'-кепу) і трансляцію.

При використанні в даному документі, "цільова нуклеїнова кислота" позначає молекулу нуклеїнової кислоти, з якою передбачається гібридизація антисмислової сполуки із забезпеченням бажаної антисмислової активності. Антисмислові олігонуклеотиди мають достатню комплементарність їх цільовим нуклеїновим кислотам для забезпечення гібридизації за фізіологічних умов.

При використанні в даному документі, "комплементарність азотистих основ" або "комплементарність" відносно азотистих основ позначає азотисту основу, що здатна до парування основ з іншою азотистою основою. Наприклад, у ДНК аденін (А) є комплементарним тиміну (Т). Наприклад, у РНК аденін (А) є комплементарним урацилу (У). У деяких варіантах реалізації винаходу комплементарна азотиста основа позначає азотисту основу антисмислової сполуки, що здатна до парування основ з азотистою основою її цільової нуклеїнової кислоти. Наприклад, якщо азотиста основа в певному положенні антисмислової сполуки здатна до утворення гідрогенового зв'язку з азотистою основою в певному положенні цільової нуклеїнової кислоти, то це положення утворення гідрогенового зв'язку між олігонуклеотидом і цільовою нуклеїновою кислотою вважається комплементарним за цією парою азотистих основ. Азотисті основи, що містять певні модифікації, можуть зберігати здатність до парування з протилежною азотистою основою і, отже, все ще можуть мати комплементарність азотистих основ.

При використанні в даному документі, "некомплементарні" відносно азотистих основ позначає пару азотистих основ, що не утворюють гідрогенові зв'язки одна з одною.

При використанні в даному документі, "комплементарні" відносно олігомерних сполук (наприклад, зв'язаних нуклеозидів, олігонуклеотидів або нуклеїнових кислот) позначає здатність таких олігомерних сполук або їх ділянок до гібридизації з іншою олігомерною сполукою або її ділянкою за рахунок комплементарності азотистих основ. Комплементарні олігомерні сполуки не повинні обов'язково мати комплементарність азотистих основ в кожному нуклеозиді. До деякого ступеня є припустимими деякі невідповідності. У деяких варіантах реалізації винаходу комплементарні олігомерні сполуки або ділянки є комплементарними за 70 % азотистих основ (комплементарність 70 %). У деяких варіантах реалізації винаходу комплементарні олігомерні сполуки або ділянки є комплементарними на 80 %. У деяких варіантах реалізації винаходу комплементарні олігомерні сполуки або ділянки є комплементарними на 90 %. У деяких варіантах реалізації винаходу комплементарні олігомерні сполуки або ділянки є комплементарними на 95 %. У деяких варіантах реалізації винаходу комплементарні олігомерні сполуки або ділянки є комплементарними на 100 %.

При використанні в даному документі, "невідповідність" позначає азотисту основу першої олігомерної сполуки, яка не здатна паруватися з азотистою основою у відповідному положенні другої олігомерної сполуки при вирівнюванні першої і другої олігомерної сполуки. Будь-яка або обидві перша і друга олігомерні сполуки можуть бути олігонуклеотидами.

При використанні в даному документі, "гібридизація" позначає парування комплементарних олігомерних сполук (наприклад, антисмислової сполуки та її цільової нуклеїнової кислоти). Не обмежуючись конкретним механізмом, найпоширеніший механізм парування включає утворення гідрогенового зв'язку, який може бути уотсон-криковським, хугстиновським або зворотним хугстиновським гідрогеновим зв'язком між комплементарними азотистими основами.

При використанні в даному документі, "специфічно гібридизується" позначає здатність олігомерної сполуки гібридизуватися з одним сайтом нуклеїнової кислоти з більшою афінністю, ніж вона гібридизується з іншим сайтом нуклеїнової кислоти.

При використанні в даному документі, "повністю комплементарний" відносно олігонуклеотиду або його частини позначає, що кожна азотиста основа олігонуклеотиду або його частини здатна до парування з азотистою основою комплементарної нуклеїнової кислоти або її безперервною частиною. Отже, повністю комплементарна ділянка не містить невідповідностей або негібридизованих азотистих основ в обидвох спіралях.

При використанні в даному документі, "відсоток комплементарності" позначає відсоток

азотистих основ олігомерної сполуки, що є комплементарними рівній за довжиною частині цільової нуклеїнової кислоти. Відсоток комплементарності обчислюють шляхом ділення кількості азотистих основ олігомерної сполуки, що є комплементарними азотистим основам у відповідних положеннях цільової нуклеїнової кислоти, на загальну довжину олігомерної сполуки.

5 При використанні в даному документі, "відсоток ідентичності" позначає кількість азотистих основ у першій нуклеїновій кислоті, що відносяться до того ж типу (незалежно від хімічної модифікації), що і азотисті основи у відповідних положеннях другої нуклеїнової кислоти, розділену на загальну кількість азотистих основ у першій нуклеїновій кислоті.

10 При використанні в даному документі, "модуляція" позначає зміну кількості або якості молекули, функції або активності, порівняно з кількістю або якістю молекули, функції або активності до модуляції. Наприклад, модуляція включає зміну, як збільшення (стимуляцію або індукцію), так і зниження (інгібування або зменшення) генної експресії. Як додатковий приклад, модуляція експресії може включати зміну вибору сайту сплайсингу при процесингу пре-мРНК, що приводить до зміни абсолютної або відносної кількості певного сплайс-варіанту, порівняно з
15 його кількістю за відсутності модуляції.

При використанні в даному документі, "хімічний мотив" позначає характерну ділянку хімічних модифікацій в олігонуклеотиді або його ділянці. Мотиви можуть бути визначені за модифікаціями у певних нуклеозидах та/або у певних зв'язувальних групах олігонуклеотиду.

20 При використанні в даному документі, "нуклеозидний мотив" позначає характерну ділянку нуклеозидних модифікацій в олігонуклеотиді або його ділянці. Зв'язки такого олігонуклеотиду можуть бути модифікованими або немодифікованими. Якщо не вказано інше, мотиви, що описують у даному документі тільки нуклеозиди, є нуклеозидними мотивами. Отже, у таких випадках зв'язки не обмежені.

25 При використанні в даному документі, "цукровий мотив" позначає характерну ділянку цукрових модифікацій в олігонуклеотиді або його ділянці.

При використанні в даному документі, "зв'язувальний мотив" позначає характерну ділянку зв'язувальних модифікацій в олігонуклеотиді або його ділянці. Нуклеозиди такого олігонуклеотиду можуть бути модифікованими або немодифікованими. Якщо не вказано інше, мотиви, що описують в даному документі тільки зв'язки, є зв'язувальними мотивами. Отже, в
30 таких випадках нуклеозиди не обмежені.

При використанні в даному документі, "мотив модифікації азотистих основ" позначає характерну ділянку модифікацій азотистих основ уздовж олігонуклеотиду. Якщо не вказано інше, то мотив модифікації азотистих основ не залежить від послідовності азотистих основ.

35 При використанні в даному документі, "мотив послідовності" позначає характерну ділянку азотистих основ, розташованих уздовж олігонуклеотиду або його частини. Якщо не вказано інше, то мотив послідовності не залежить від хімічних модифікацій і, отже, може мати будь-яку комбінацію хімічних модифікацій, включаючи відсутність хімічних модифікацій.

При використанні в даному документі, "тип модифікації" відносно нуклеозиду або нуклеозиду певного "типу" позначає хімічну модифікацію нуклеозиду і включає модифіковані і
40 немодифіковані нуклеозиди. Відповідно, якщо не вказано інше, "нуклеозид, що має модифікацію першого типу" може бути немодифікованим нуклеозидом.

При використанні в даному документі, "по-різному модифіковані" позначає хімічні модифікації або хімічні замісники, відмінні один від одного, включаючи їх відсутність або модифікації. Таким чином, наприклад, МОЕ нуклеозид і немодифікований нуклеозид ДНК є "по-різному модифікованими", навіть незважаючи на те, що нуклеозид ДНК є немодифікованим. Так
45 само, ДНК і РНК є "по-різному модифікованими", навіть незважаючи на те, що обидві являють собою природні немодифіковані нуклеозиди. Нуклеозиди, що є однаковими, але містять різні азотисті основи, не є по-різному модифікованими. Наприклад, нуклеозид, що містить 2'-ОМЕ модифікований цукор і немодифіковану аденінову нуклеоснову, і нуклеозид, що містить 2'-ОМЕ
50 модифікований цукор і немодифіковану тимінову азотисту основу, не є по-різному модифікованими.

При використанні в даному документі, "модифікації одного типу" стосується модифікацій, що є однаковими одна відносно одної, включаючи відсутність модифікацій. Таким чином, наприклад, два немодифікованих нуклеозиди ДНК мають "модифікацію одного типу", навіть
55 незважаючи на те, що нуклеозид ДНК є немодифікованим. Такі нуклеозиди, що мають модифікацію одного типу, можуть містити різні азотисті основи.

При використанні в даному документі, "окремі ділянки" позначають частини олігонуклеотиду, в яких хімічні модифікації або мотив хімічних модифікацій будь-якої із сусідніх частин містить щонайменше одну відмінність для забезпечення можливості відрізняти ділянки одна від одної.

60 При використанні в даному документі, "фармацевтично прийнятний носій або розріджувач"

позначає будь-яку речовину, придатну для застосування при введенні тварині. У деяких варіантах реалізації винаходу фармацевтично прийнятний носій або розріджувач є стерильним сольовим розчином. У деяких варіантах реалізації винаходу такий стерильний сольовий розчин є сольовим розчином фармацевтичної категорії.

5 При використанні в даному документі, термін "метаболічний розлад" позначає захворювання або патологічний стан, що характеризується, перш за все, порушеною регуляцією метаболізму - складного набору хімічних реакцій, пов'язаних з розщепленням їжі та продукуванням енергії.

При використанні в даному документі, термін "серцево-судинний розлад" позначає захворювання або патологічний стан, що характеризується, перш за все, погіршеною функцією
10 серця або кровоносних судин.

При використанні в даному документі, термін "моно- або поліциклічна кільцева система" включає всі кільцеві системи, вибрані з одиночних або поліциклічних радикальних кільцевих систем, у яких вказані кільця є конденсованими або зв'язаними, і включає одиничні або змішані кільцеві системи, індивідуально вибрані з аліфатичних, аліциклічних, арильних, гетероарильних, аралкільних, арилалкільних, гетероциклічних, гетероарильних, гетероароматичних і гетероарилалкільних. Такі моно- і поліциклічні структури можуть містити кільця, кожне з яких має однаковий ступінь насиченості, або кожне незалежно має змінні ступені насиченості, включаючи повністю насичені, частково насичені або повністю ненасичені. Кожне кільце може містити кільцеві атоми, вибрані з C, N, O і S, з утворенням гетероциклічних кілець, а також кілець, що містять тільки кільцеві атоми C, які можуть бути представлені у змішаному мотиві, як, наприклад, у бензімідазолі, в якому одне кільце має тільки кільцеві атоми карбону, а конденсоване кільце має два атоми нітрогену. Моно- або поліциклічна кільцева система може бути додатково заміщеною групами замісників, як, наприклад, фталімід, який має дві групи =O, приєднані до одного з кілець. Моно- або поліциклічні кільцеві системи можуть бути приєднані до
20 початкових молекул різними способами, наприклад, безпосередньо через кільцевий атом, шляхом конденсації через декілька кільцевих атомів, через групу замісника або через біфункціональний зв'язувальний фрагмент.

При використанні в даному документі, "проліки" позначають неактивну або менш активну форму сполуки, яка при введенні суб'єкту метаболізується з утворенням активної або активнішої сполуки (наприклад, ліків).
30

При використанні в даному документі, "замісник" і "група замісника" позначає атом або групу, що витісняє атом або групу вказаної початкової сполуки. Наприклад, замісник модифікованого нуклеозиду є будь-яким атомом або групою, що є відмінною від атома або групи, яка знаходиться у природному нуклеозиді (наприклад, модифікований 2'-замісник є будь-яким атомом або групою у 2'-положенні нуклеозиду, відмінною від H або OH). Групи замісників можуть бути захищеними або незахищеними. У деяких варіантах реалізації винаходу сполуки відповідно до даного опису мають замісники в одному або більше ніж в одному положенні початкової сполуки. Замісники також можуть бути додатково заміщені іншими групами замісників і можуть бути приєднані напряму або через зв'язувальну групу, таку як алкільна або гідрогенкарбонова група, до початкової сполуки.
40

Так само, при використанні в даному документі, "замісник" відносно хімічної функціональної групи позначає атом або групу атомів, що є відмінною від атома або групи атомів, які звичайно містяться у вказаній функціональній групі. У деяких варіантах реалізації винаходу замісник витісняє атом гідрогену функціональної групи (наприклад, у деяких варіантах реалізації винаходу замісник заміщеної метильної групи є атомом або групою, відмінною від гідрогену, яка витісняє один або декілька атомів гідрогену незаміщеної метильної групи). Якщо не вказано інше, групи, що можуть бути використані як замісники, включають, без обмеження, галоген, гідроксил, алкіл, алкеніл, алкініл, ацил ($-C(O)R_{aa}$), карбоксил ($-C(O)O-R_{aa}$), аліфатичні групи, аліциклічні групи, алкокси, заміщений окси ($-O-R_{aa}$), арил, аралкіл, гетероциклічний радикал, гетероарил, гетероарилалкіл, аміно ($-N(R_{bb})(R_{cc})$), іміно ($=NR_{bb}$), амідно ($-C(O)N(R_{bb})(R_{cc})$ або $-N(R_{bb})C(O)R_{aa}$), азидо ($-N_3$), нітро ($-NO_2$), ціано ($-CN$), карбамідно ($-OC(O)N(R_{bb})(R_{cc})$ або $-N(R_{bb})C(O)OR_{aa}$), уреїдо ($-N(R_{bb})C(O)N(R_{bb})(R_{cc})$), тіоуреїдо ($-N(R_{bb})C(S)N(R_{bb})(R_{cc})$), гуанідиніл ($-N(R_{bb})C(=NR_{bb})N(R_{bb})(R_{cc})$), амідиніл ($-C(=NR_{bb})N(R_{bb})(R_{cc})$ або $-N(R_{bb})C(=NR_{bb})(R_{aa})$), тіол ($-SR_{bb}$), сульфініл ($-S(O)R_{bb}$), сульфоніл ($-S(O)_2R_{bb}$) і сульфонамідил ($-S(O)_2N(R_{bb})(R_{cc})$ або $-N(R_{bb})S(O)_2R_{bb}$). Де кожен R_{aa} , R_{bb} і R_{cc} незалежно являє собою H, необов'язково зв'язану хімічну функціональну групу або додаткову групу замісника, при цьому переважний перелік включає, без обмеження, алкіл, алкеніл, алкініл, аліфатичні, алкокси, ацил, арил, аралкіл, гетероарил, аліциклічні, гетероциклічні і гетероарилалкіл. Вибрані замісники із сполуками, описаними в цьому документі, знаходяться в рекурсивному ступені.
55

60 При використанні в даному документі, "алкіл", використаний в даному документі, позначає

насичений, прямий або розгалужений гідрогенкарбоновий радикал, що містить до двадцяти чотирьох атомів карбону. Приклади алкільних груп включають, без обмеження, метил, етил, пропіл, бутіл, ізопропіл, н-гексил, октил, децил, додецил, тощо. Алкільні групи звичайно містять від 1 до близько 24 атомів карбону, частіше від 1 до близько 12 атомів карбону (C_1 - C_{12} алкіл), при цьому більш переважно від 1 до близько 6 атомів карбону.

При використанні в даному документі, "алкеніл" позначає прямий або розгалужений гідрогенкарбоновий радикал, що містить до двадцяти чотирьох атомів карбону і має щонайменше один подвійний карбон-карбоновий зв'язок. Приклади алкенільних груп включають, без обмеження, етеніл, пропеніл, бутеніл, 1-метил-2-бутен-1-іл, дієни, такі як 1,3-бутадієн, тощо. Алкенільні групи звичайно містять від 2 до близько 24 атомів карбону, частіше від 2 до близько 12 атомів карбону, при цьому більш переважно від 2 до близько 6 атомів карбону. Алкенільні групи, використані в даному документі, можуть необов'язково містити одну або декілька додаткових груп замісників.

При використанні в даному документі, "алкініл" позначає прямий або розгалужений гідрогенкарбоновий радикал, що містить до двадцяти чотирьох атомів карбону і має щонайменше один потрійний карбон-карбоновий зв'язок. Приклади алкінільних груп включають, без обмеження, етиніл, 1-пропініл, 1-бутиніл, тощо. Алкінільні групи звичайно містять від 2 до близько 24 атомів карбону, частіше від 2 до близько 12 атомів карбону, при цьому переважніше від 2 до близько 6 атомів карбону. Алкінільні групи, використані в даному документі, можуть необов'язково містити одну або декілька додаткових груп замісників.

При використанні в даному документі, "ацил" позначає радикал, утворений за рахунок видалення гідроксильної групи із органічної кислоти, і має загальну формулу $-C(O)-X$, де X звичайно є собою аліфатичним, аліциклічним або ароматичним. Приклади включають аліфатичні карбоніли, ароматичні карбоніли, аліфатичні сульфоніли, ароматичні сульфініли, аліфатичні сульфініли, ароматичні фосфати, аліфатичні фосфати, тощо. Ацильні групи, використані в даному документі, можуть необов'язково містити додаткові групи замісників.

При використанні в даному документі, "аліциклічна" позначає циклічну кільцеву систему, у якій кільце є аліфатичним. Кільцева система може містити одне або декілька кілець, при цьому щонайменше одне кільце є аліфатичним. Переважні аліциклічні системи включають кільця, що мають від близько 5 до близько 9 атомів карбону в кільці. Аліциклічні групи, використані в даному документі, можуть необов'язково містити додаткові групи замісників.

При використанні в даному документі, "аліфатичний" позначає прямий або розгалужений гідрогенкарбоновий радикал, що містить до двадцяти чотирьох атомів карбону, у якому ступінь насиченості між будь-якими двома атомами карбону відповідає одинарному, подвійному або потрійному зв'язку. Аліфатична група переважно містить від 1 до близько 24 атомів карбону, частіше від 1 до близько 12 атомів карбону, при цьому переважніше від 1 до близько 6 атомів карбону. Прямий або розгалужений ланцюг аліфатичної групи може перериватися одним або декількома гетероатомами, що включають нітроген, кисень, сульфур і фосфор. Такі аліфатичні групи, що перериваються гетероатомами, включають, без обмеження, поліалкокси, такі як поліалкіленгліколи, поліаміни і полііміни. Аліфатичні групи, використані в даному документі, можуть необов'язково містити додаткові групи замісників.

При використанні в даному документі, "алкокси" позначає радикал, утворений між алкільною групою і атомом кисню, при цьому атом кисню застосовується для приєднання алкоксигрупи до початкової молекули. Приклади алкоксигруп включають, без обмеження, метокси, етокси, пропокси, ізопропокси, н-бутокси, втор-бутокси, трет-бутокси, н-пентокси, неопентокси, н-гексокси, тощо. Алкоксигрупи, використані в даному документі, можуть необов'язково містити додаткові групи замісників.

При використанні в даному документі, "аміноалкіл" позначає амінозаміщений C_1 - C_{12} алкільний радикал. Алкільна частина вказаного радикалу утворює ковалентний зв'язок з початковою молекулою. Аміногрупа може бути розташована в будь-якому положенні, і аміноалкільна група може бути заміщена додатковою групою замісника в алкільній та/або аміночастині.

При використанні в даному документі, "аралкіл" і "арилалкіл" позначає ароматичну групу, ковалентно зв'язану з C_1 - C_{12} алкільним радикалом. Частина алкільного радикалу аралкільної (або арилалкільної) групи, що утворилася, утворює ковалентний зв'язок з початковою молекулою. Приклади включають, без обмеження, бензил, фенетил, тощо. Аралкільні групи, використані в даному документі, можуть необов'язково містити додаткові групи замісників, приєднані до алкільної, арильної або до обох груп, що утворюють вказану радикальну групу.

При використанні в даному документі, "арил" і "ароматичний" позначає радикали моно- або поліциклічної карбоциклічної кільцевої системи, що мають одне або декілька ароматичних

кілець. Приклади арильних груп включають, без обмеження, феніл, нафтил, тетрагідронафтил, інданіл, інденіл, тощо. Переважні арильні кільцеві системи мають від близько 5 до близько 20 атомів карбону в одному або декількох кільцях. Арильні групи, використані в даному документі, можуть необов'язково містити додаткові групи замісників.

5 При використанні в даному документі, "галоген" і "галоген" позначає атом, вибраний з флуору, хлору, бромів і йоду.

При використанні в даному документі, "гетероарил" і "гетероароматичний" позначає радикал, що містить моно- або поліциклічне ароматичне кільце, кільцеву систему або конденсовану кільцеву систему, у якому щонайменше одне з кілець є ароматичним і містить 10 один або декілька гетероатомів. Гетероарил включає також конденсовані кільцеві системи, включаючи системи, у яких одне або декілька з конденсованих кілець не містять гетероатомів. Гетероарильні групи, як правило, містять один кільцевий атом, вибраний із сульфуру, нітрогену або кисню. Приклади гетероарильних груп включають, без обмеження, піридиніл, піразиніл, піримідиніл, піроліл, піразоліл, імідазоліл, тiazоліл, оксазоліл, ізооксазоліл, тіадіазоліл, 15 оксадіазоліл, тіофеніл, фураніл, хінолініл, ізохінолініл, бензімідазоліл, бензоксазоліл, хіноксалініл, тощо. Гетероарильні радикали можуть бути приєднані до початкової молекули напряму або через зв'язувальний фрагмент, такий як аліфатична група або гетероатом. Гетероарильні групи, використані в даному документі, можуть необов'язково містити додаткові групи замісників.

20 При використанні в даному документі, "кон'югована сполука" позначає будь-які атоми, групи атомів або групу зв'язаних атомів, придатну для застосування як кон'югувальна група. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'юговані сполуки можуть мати або впливати на одну або декілька властивостей, включаючи, без обмеження, властивості фармакодинаміки, фармакокінетики, зв'язування, адсорбції, клітинного розподілу, клітинного захоплення, заряду 25 та/або виведення.

При використанні в даному документі, якщо не вказано або не модифіковано іншим чином, "дволанцюгові" стосується двох окремих олігомерних сполук, що гібридизовані одна з одною. Такі дволанцюгові сполуки можуть мати один або декілька негібридизованих нуклеозидів у одного або обох кінців однієї або обох спіралей (виступи) та/або один або декілька внутрішніх 30 негібридизованих нуклеозидів (невідповідностей), за умови, що існує достатня комплементарність для збереження гібридизації за фізіологічно релевантних умов.

В Деякі сполуки

У деяких варіантах реалізації даного винаходу наведені кон'юговані антисмислові сполуки, що містять антисмислові олігонуклеотиди і кон'югат.

35 а. Деякі антисмислові олігонуклеотиди

У деяких варіантах реалізації даного винаходу наведені антисмислові олігонуклеотиди. Такі антисмислові олігонуклеотиди містять зв'язані нуклеозиди, і кожен нуклеозид містить цукровий фрагмент і азотисту основу. Структура таких антисмислових олігонуклеотидів може бути розглянута з точки зору хімічних особливостей (наприклад, модифікацій і характерних ділянок 40 модифікацій) і послідовності азотистих основ (наприклад, послідовність антисмислового олігонуклеотиду, суть і послідовність цільової нуклеїнової кислоти).

і. Деякі хімічні особливості

У деяких варіантах реалізації винаходу антисмисловий олігонуклеотид містить одну або декілька модифікацій. У деяких таких варіантах реалізації винаходу антисмислові 45 олігонуклеотиди містять один або декілька модифікованих нуклеозидів та/або модифікованих міжнуклеозидних зв'язків. У деяких варіантах реалізації винаходу модифіковані нуклеозиди містять модифікований цукровий фрагмент та/або модифіковану азотисту основу.

1. Деякі цукрові фрагменти

У деяких варіантах реалізації винаходу сполуки за даним описом містять один або декілька 50 модифікованих нуклеозидів, що містять модифікований цукровий фрагмент. Такі сполуки, що містять один або декілька модифікованих за цукром нуклеозидів, можуть мати бажані властивості, такі як покращена стійкість до нуклеази або збільшена афінність зв'язування із цільовою нуклеїновою кислотою, порівняно з олігонуклеотидом, що містить тільки нуклеозиди, які містять природні цукрові фрагменти. У деяких варіантах реалізації винаходу модифіковані 55 цукрові фрагменти є заміщеними цукровими фрагментами. У деяких варіантах реалізації винаходу модифіковані цукрові фрагменти є заміниками цукру. Такі замітники цукру можуть містити одне або декілька заміщень, що відповідають заміщенням заміщених цукрових фрагментів.

У деяких варіантах реалізації винаходу модифіковані цукрові фрагменти є заміщеними 60 цукровими фрагментами, що містять один або декілька немісткових цукрових замісників,

включаючи, без обмеження, замісники у 2" та/або 5'-положеннях. Приклади замісників цукру, придатних для 2'-положення, включають, без обмеження: 2'-F, 2'-OCH₃ ("OMe" або "О-метил") і 2'-O(CH₂)₂OCH₃ ("MOE"). У деяких варіантах реалізації винаходу замісник цукру у 2'-положенні
 5 вибраний з алілу, аміно, азидо, тіо, О-алілу, О-С₁-С₁₀ алкілу, О-С₁-С₁₀ заміщеного алкілу; OCF₃, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n) і O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), де кожен R_m і R_n незалежно являє собою Н або заміщений або незаміщений С₁-С₁₀ алкіл. Приклади замісників цукру у 5'-положенні включають, але не обмежуються ними: 5'-метил (R або S), 5'-вініл і 5'-метокси. У деяких варіантах реалізації винаходу заміщені цукри містять більше одного немістового цукрового замісника, наприклад, 2'-F-5'-метил-цукрові фрагменти (див., наприклад, Міжнародну
 10 заявку РСТ WO 2008/101157, де наведені додаткові 5", 2'-біс-заміщені цукрові фрагменти і нуклеозиди).

Нуклеозиди, що містять 2'-заміщені цукрові фрагменти, згадуються як 2'-заміщені нуклеозиди. У деяких варіантах реалізації винаходу 2'-заміщений нуклеозид містить 2'-групу замісника, вибрану з галогену, алілу, аміно, азидо, SH, CN, OCN, CF₃, OCF₃, O, S або N(R_m)-алкілу; O, S або N(R_m)-алкенілу; O, S або N(R_m)-алкінілу; О-алкіленіл-О-алкілу, алкінілу, алкарилу, аралкілу, О-алкарилу, О-аралкілу, O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n) або О-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), де кожен R_m і R_n незалежно являє собою Н, амінозахисну групу або заміщений або незаміщений С₁-С₁₀ алкіл. Ці 2'-групи замісників можуть бути додатково заміщені однією або
 15 декількома групами замісників, незалежно вибраними з гідроксилу, аміно, алкокси, карбокси, бензилу, фенілу, нітро (NO₂), тіолу, тіоалкокси (S-алкілу), галогену, алкілу, арилу, алкенілу і алкінілу.

У деяких варіантах реалізації винаходу 2'-заміщений нуклеозид містить 2'-групу замісника, вибрану з F, NH₂, N₃, OCF₃, O-CH₃, O(CH₂)₃NH₂, CH₂-CH=CH₂, O-CH₂-CH=CH₂, OCH₂CH₂OCH₃, O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n), O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂ і N-заміщеного ацетаміду (O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), де кожен R_m і R_n незалежно являє собою Н, амінозахисну групу або заміщений або незаміщений С₁-С₁₀ алкіл.
 25

У деяких варіантах реалізації винаходу 2'-заміщений нуклеозид містить цукровий фрагмент, що містить 2'-групу замісника, вибрану з F, OCF₃, O-CH₃, OCH₂CH₂OCH₃, O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(CH₃)₂, -O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂ і О-CH₂-C(=O)-N(H)CH₃.

У деяких варіантах реалізації винаходу 2'-заміщений нуклеозид містить цукровий фрагмент, що містить 2'-групу замісника, вибрану з F, О-CH₃ і OCH₂CH₂OCH₃.

Деякі модифіковані цукрові фрагменти містять містовий цукровий замісник, який утворює друге кільце, що приводить до одержання біциклічного цукрового фрагмента. У деяких таких варіантах реалізації винаходу біциклічний цукровий фрагмент містить місток між 4" і 2" атомами фуранозного кільця. Приклади таких 4'-2" цукрових замісників включають, без обмеження:
 35 -[C(R_a)(R_b)]_n-, -[C(R_a)(R_b)]_n-O-, -C(R_aR_b)-N(R)-O- або -C(R_aR_b)-O-N(R)-; 4'-CH₂-2', 4'-(CH₂)₂-2', 4'-(CH₂)₃-2', 4'-(CH₂)₂-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' (cEt) і 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2', та його аналоги (див., наприклад, патент США 7399845, виданий 15 липня 2008 року); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' та його аналоги (див., наприклад, WO2009/006478, опубліковану
 40 8 січня 2009 року); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' та його аналоги (див., наприклад, WO2008/150729, опубліковану 11 грудня 2008 року); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (див., наприклад, US2004/0171570, опубліковану 2 вересня 2004 року); 4'-CH₂-O-N(R)-2' і 4'-CH₂-N(R)-O-2', де кожен R незалежно являє собою Н, захисну групу або С₁-С₁₂ алкіл; 4'-CH₂-N(R)-O-2', де R являє собою Н, С₁-С₁₂ алкіл або захисну групу (див., наприклад, патент США 7427672, виданий 23 вересня 2008 року);
 45 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (див., наприклад, Chattopadhyaya, et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134); і 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' та його аналоги (див. опубліковану Міжнародну заявку РСТ WO 2008/154401, опубліковану 8 грудня 2008 року).

У деяких варіантах реалізації винаходу такі містки 4'-2" незалежно містять від 1 до 4 зв'язаних груп, незалежно вибраних з -[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- і -N(R_a)-;
 50

де:

x дорівнює 0, 1 або 2;

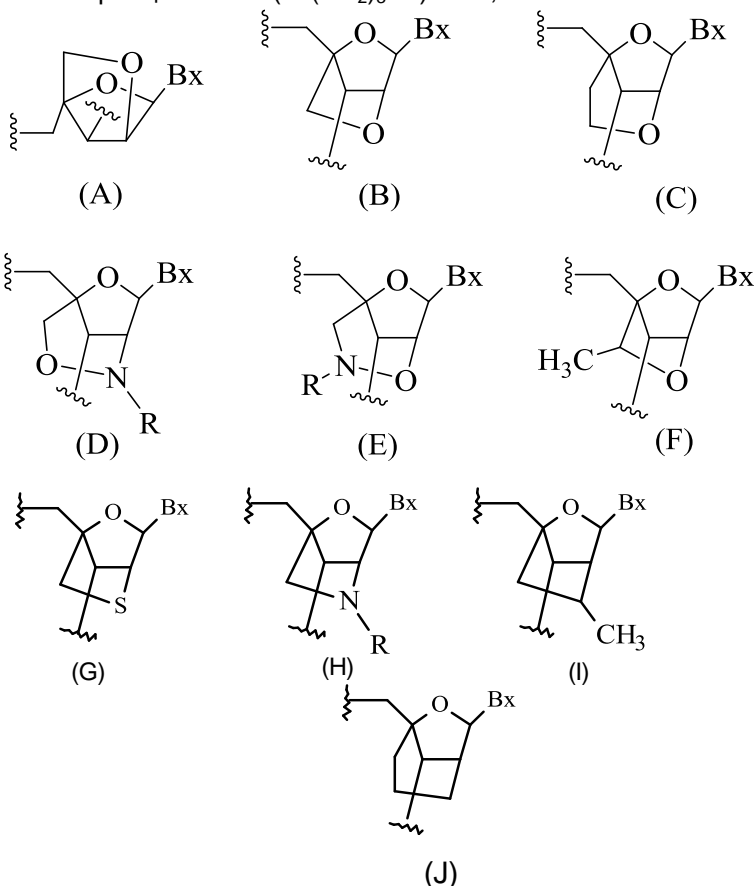
n дорівнює 1, 2, 3 або 4;

кожен R_a і R_b незалежно являє собою Н, захисну групу, гідроксил, С₁-С₁₂ алкіл, заміщений С₁-С₁₂ алкіл, С₂-С₁₂ алкеніл, заміщений С₂-С₁₂ алкеніл, С₂-С₁₂ алкініл, заміщений С₂-С₁₂ алкініл, С₅-С₂₀ арил, заміщений С₅-С₂₀ арил, гетероциклічний радикал, заміщений гетероциклічний радикал, гетероарил, заміщений гетероарил, С₅-С₇ аліциклічний радикал, заміщений С₅-С₇ аліциклічний радикал, галоген, OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, COOJ₁, ацил (C(=O)-H), заміщений ацил, CN, сульфоніл (S(=O)₂-J₁) або сульфоксил (S(=O)-J₁); і
 55

кожен J₁ і J₂ незалежно являє собою Н, С₁-С₁₂ алкіл, заміщений С₁-С₁₂ алкіл, С₂-С₁₂ алкеніл,

заміщений C_2-C_{12} алкеніл, C_2-C_{12} алкініл, заміщений C_2-C_{12} алкініл, C_5-C_{20} арил, заміщений C_5-C_{20} арил, ацил ($C(=O)-H$), заміщений ацил, гетероциклічний радикал, заміщений гетероциклічний радикал, C_1-C_{12} аміноалкіл, заміщений C_1-C_{12} аміноалкіл або захисну групу.

- Нуклеозиди, що містять біциклічні цукрові фрагменти, згадуються як біциклічні нуклеозиди або BNA. Біциклічні нуклеозиди включають, без обмеження, (A) α -L-метиленокси ($4'-CH_2-O-2''$) BNA, (B) β -D-метиленокси ($4'-CH_2-O-2''$) BNA (також згадується як замкнута нуклеїнова кислота або LNA), (C) етиленокси ($4'-(CH_2)_2-O-2''$) BNA, (D) аміноокси ($4'-CH_2-O-N(R)-2''$) BNA, (E) оксіаміно ($4'-CH_2-N(R)-O-2''$) BNA, (F) метил(метиленокси) ($4'-CH(CH_3)-O-2''$) BNA (також згадується як стерично ускладнений етил або sEt), (G) метилен-тіо ($4'-CH_2-S-2''$) BNA, (H) метилен-аміно ($4'-CH_2-N(R)-2''$) BNA, (I) метил-карбоциклічний ($4'-CH_2-CH(CH_3)-2''$) BNA і (J) пропілен-карбоциклічний ($4'-(CH_2)_3-2''$) BNA, як показано нижче.



- де Bx являє собою фрагмент азотистої основи, а R незалежно являє собою H, захисну групу або C_1-C_{12} алкіл.

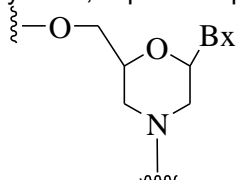
- В даній галузі техніки відомі додаткові біциклічні цукрові фрагменти, наприклад: Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97, 5633-5638; Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 129(26) 8362-8379 (4 липня 2007 року); Elayadi et al., Curr. Opinion Invens. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch et al., Chem. Biol., 2001, 8, 1-7; Orum et al., Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; патенти США № 7053207 6268490 6770748 6794499 7034133 6525191 6670461 і 7399845; WO 2004/106356, WO 1994/14226, WO 2005/021570 і WO 2007/134181; публікації патентів США № US2004/0171570, US2007/0287831 і US2008/0039618; патенти США з серійними номерами 12/129154 60/989574 61/026995 61/026998 61/056564 61/086231 61/097787 і 61/099844; і Міжнародні заявки PCT № PCT/US2008/064591, PCT/US2008/066154 і PCT/US2008/068922.

- У деяких варіантах реалізації винаходу біциклічні цукрові фрагменти і нуклеозиди, що містять такі біциклічні цукрові фрагменти, додатково визначають за ізомерною конфігурацією. Наприклад, нуклеозид, що містить місток $4'-2'$ -метилен-окси, може знаходитися в α -L конфігурації або у β -D конфігурації. Раніше α -L-метиленокси ($4'-CH_2-O-2''$) біциклічні нуклеозиди були введені до антисмислових олігонуклеотидів, що мають антисмислову активність (Frieden et al., Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365-6372).

У деяких варіантах реалізації винаходу заміщені цукрові фрагменти містять один або декілька немістових цукрових замісників і один або декілька містових цукрових замісників (наприклад, 5'-заміщені і 4'-2'-містові цукри). (див., наприклад, Міжнародну заявку РСТ WO 2007/134181, опубліковану 11/22/07, у якій LNA заміщена, наприклад, 5'-метильною або 5'-вініловою групою).

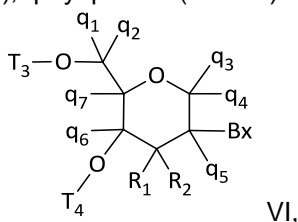
У деяких варіантах реалізації винаходу модифіковані цукрові фрагменти є замісниками цукру. У деяких таких варіантах реалізації винаходу атом кисню природного цукру є заміщеним, наприклад, атомом сульфуру, карбону або нітрогену. У деяких таких варіантах реалізації винаходу такий модифікований цукровий фрагмент містить також містові та/або немістові замісники, як описано вище. Наприклад, деякі замісники цукру містять 4'-атом сульфуру і заміщення у 2'-положенні (див., наприклад, опубліковану патентну заявку США US2005/0130923, опубліковану 16 червня 2005 року) та/або 5'-положенні. Як додатковий приклад, були описані карбоциклічні біциклічні нуклеозиди, що мають місток 4'-2" (див., наприклад, Freier et al., Nucleic Acids Research, 1997, 25(22), 4429-4443 і Albaek et al., J. Org. Chem., 2006, 71, 7731-7740).

У деяких варіантах реалізації винаходу замісники цукру містять кільця, що мають не 5 атомів. Наприклад, в деяких варіантах реалізації винаходу замісник цукру містить морфоліно. Морфоліно-сполуки та їх застосування в олігомерних сполуках було описано у численних патентах і опублікованих статтях (див., наприклад: Braasch et al., Biochemistry, 2002, 41, 4503-4510; і патенти США 5698685; 5166315; 5185444; і 5034506). При використанні в даному документі, термін "морфоліно" позначає замісник цукру, що має наступну структуру:



У деяких варіантах реалізації винаходу морфоліно можуть бути модифікованими, наприклад, додаванням або зміною різних груп замісників у представленій вище структурі морфоліно. Такі замісники цукру згадуються у даному документі як "модифіковані морфоліно".

Як інший приклад, у деяких варіантах реалізації винаходу замісник цукру містить шестичленний тетрагідропіран. Такі тетрагідропірани можуть бути додатково модифікованими або заміщеними. Нуклеозиди, що містять такі модифіковані тетрагідропірани, включають, без обмеження, гекситолову нуклеїнову кислоту (HNA), анітолову нуклеїнову кислоту (ANA), манітолову нуклеїнову кислоту (MNA) (див. Leumann, C.J. Bioorg. & Med. Chem. (2002) 10:841-854), флуор-HNA (F-HNA) і сполуки, що мають Формулу VI:



де незалежно для кожного із вказаного щонайменше одного тетрагідропіранового нуклеозидного аналога Формули VI:

Bx являє собою фрагмент азотистої основи;

T₃ і T₄, кожен незалежно, являє собою міжнуклеозидну зв'язувальну групу, що зв'язує тетрагідропірановий нуклеозидний аналог з антисмисловою сполукою, або один із T₃ і T₄ являє собою міжнуклеозидну зв'язувальну групу, що зв'язує тетрагідропірановий нуклеозидний аналог з антисмисловою сполукою, а інший з T₃ і T₄ являє собою H, гідроксил-захисну групу, зв'язану кон'югуювальну групу або 5" або 3'-кінцеву групу;

q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ і q₇, кожен незалежно, являє собою H, C₁-C₆ алкіл, заміщений C₁-C₆ алкіл, C₂-C₆ алкеніл, заміщений C₂-C₆ алкеніл, C₂-C₆ алкініл або заміщений C₂-C₆ алкініл; і

кожен з R₁ і R₂ незалежно вибраний з: гідрогену, галогену, заміщеного або незаміщеного алкокси, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, °C(=X)J₁, °C(=X)NJ₁J₂, NJ₃C(=X)NJ₁J₂ і CN, де X являє собою O, S або NJ₁, і кожен J₁, J₂ і J₃ незалежно являє собою H або C₁-C₆ алкіл.

У деяких варіантах реалізації винаходу наведені модифіковані THP нуклеозиди Формули VI, у яких кожен q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ і q₇ являє собою H. У деяких варіантах реалізації винаходу щонайменше один з q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ і q₇ відмінний від H. У деяких варіантах реалізації винаходу щонайменше один з q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ і q₇ є метилом. У деяких варіантах реалізації

винаходу наведені ТНР нуклеозиди Формули VI, у яких один з R_1 і R_2 являє собою F. У деяких варіантах реалізації винаходу R_1 являє собою флуор, а R_2 являє собою H, R_1 являє собою метокси, а R_2 являє собою H, і R_1 являє собою метоксіетокси, а R_2 являє собою H.

У даній галузі техніки відомо також багато інших біциклічних і трициклічних кільцевих систем замінників цукру, які можуть бути використані для модифікації нуклеозидів з метою введення до антисмислових сполук (див., наприклад, оглядову статтю: Leumann, J. C, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2002, 10, 841-854).

Без обмеження, наведені також комбінації модифікацій, такі як 2'-F-5'-метил-заміщені нуклеозиди (див. Міжнародну заявку РСТ WO 2008/101157, опубліковану 8/21/08, де описані інші 5', 2'-бис-заміщені нуклеозиди) і заміна атома кисню рибозильного кільця на S і додаткове заміщення у 2'-положенні (див. опубліковану заявку на патент США US2005-0130923, опубліковану 16 червня 2005 року) або, альтернативно, 5'-заміщення біциклічної нуклеїнової кислоти (див. Міжнародну заявку РСТ WO 2007/134181, опубліковану 11/22/07, у якій 4'-CH₂-O-2' біциклічний нуклеозид додатково заміщений у 5'-положенні 5'-метильною або 5'-вініловою групою). Було описано також синтез і одержання карбоциклічних біциклічних нуклеозидів разом з їх олігомеризацією і біохімічними дослідженнями (див., наприклад, Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc. 2007, 129(26), 8362-8379).

У деяких варіантах реалізації даного опису наведені олігонуклеотиди, що містять модифіковані нуклеозиди. Такі модифіковані нуклеотиди можуть містити модифіковані цукри, модифіковані азотисті основи та/або модифіковані зв'язки. Конкретні модифікації вибирають таким чином, щоб одержані олігонуклеотиди мали бажані характеристики. У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотиди містять один або декілька РНК-подібних нуклеозидів. У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотиди містять один або декілька ДНК-подібних нуклеотидів.

2. Деякі модифікації азотистих основ

У деяких варіантах реалізації винаходу нуклеозиди відповідно до даного опису містять одну або декілька немодифікованих азотистих основ. У деяких варіантах реалізації винаходу нуклеозиди відповідно до даного опису містять одну або декілька модифікованих азотистих основ.

У деяких варіантах реалізації винаходу модифіковані азотисті основи вибрані з: універсальних основ, гідрофобних основ, змішаних основ, збільшених у розмірі основ і флуорованих основ, описаних в даному документі. 5-заміщені піримідини, 6-азапіримідини і N-2, N-6 і O-6-заміщені пурини, включаючи 2-амінопропіладенін, 5-пропінілурацил; 5-пропінілцитозин; 5-гідроксиметил-цитозин, ксантин, гіпоксантин, 2-аміноаденін, 6-метил та інші алкільні похідні аденіну і гуаніну, 2-пропіл та інші алкільні похідні аденіну і гуаніну, 2-тіоурацил, 2-тіотимін і 2-тіоцитозин, 5-галогенурацил і цитозин, 5-пропініл (-C≡C-CH₃) урацил і цитозин та інші алкінільні похідні піримідинових основ, 6-азоурацил, цитозин і тимін, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тіоурацил, 8-галоген, 8-аміно, 8-тіол, 8-тіоалкіл, 8-гідроксил та інші 8-заміщені аденіни і гуаніни, 5-галоген, зокрема, 5-бром, 5-трифлуорметил та інші 5-заміщені урацили і цитозини, 7-метилгуанін і 7-метиладенін, 2-F-аденін, 2-аміноаденін, 8-азагуанін і 8-азааденін, 7-деазагуанін і 7-деазааденін, 2-деазагуанін і 3-деазааденін, універсальні основи, гідрофобні основи, змішані основи, збільшені у розмірі основи і флуоровані основи, описані в даному документі. Додаткові модифіковані азотисті основи включають трициклічні піримідини, такі як феноксазину цитидин ([5,4-b][1,4]бензоксазин-2(3H)-он), фенотіазину цитидин (1H-піримідо[5,4-b][1,4]бензотіазин-2(3H)-он), так звані G-clamp, такі як заміщений феноксазину цитидин (наприклад, 9-(2-аміноетокси)-H-піримідо[5,4-b][1,4]бензоксазин-2(3H)-он), карбазолу цитидин (2H-піримідо[4,5-b]індол-2-он), піридоіндолу цитидин (H-піридо[3',2':4,5]піроло[2,3-d]піримідин-2-он). Модифіковані азотисті основи також можуть включати азотисті основи, в яких пуринова або піримідинова основа замінена іншими гетероциклами, наприклад, 7-деаза-аденін, 7-деазагуанозин, 2-амінопіридин і 2-піридон. Додаткові азотисті основи включають азотисті основи, описані в патенті США № 3687808, описані в публікації The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, Kroschwitz, J.I., ред., John Wiley & Sons, 1990, 858-859; описані авторами Englisch et al., Angewandte Chemie, Міжнародне видання, 1991, 30, 613; та описані в публікації Sanghvi, Y.S., розділ 15, Antisense Research and Applications, Crooke, S.T. i Lebleu, B., ред., CRC Press, 1993, 273-288.

Ілюстративні патенти США, в яких описано одержання деяких з вищезазначених модифікованих азотистих основ, а також інших модифікованих азотистих основ, включають, без обмеження, U.S. 3687808; 4845205; 5130302; 5134066; 5175273; 5367066; 5432272; 5457187; 5459255; 5484908; 5502177; 5525711; 5552540; 5587469; 5594121; 5596091; 5614617; 5645985; 5681941; 5750692; 5763588; 5830653 і 6005096, деякі з яких знаходяться в процесі розгляду

одночасно з даною заявкою, і кожен з яких включений до даного документу шляхом посилання в повному об'ємі.

3. Деякі міжнуклеозидні зв'язки

У деяких варіантах реалізації даного опису наведені олігонуклеотиди, що містять зв'язані нуклеозиди. У таких варіантах реалізації винаходу нуклеозиди можуть бути зв'язані разом за допомогою будь-якого міжнуклеозидного зв'язку. Два основних класи міжнуклеозидних зв'язувальних груп визначаються за наявністю або відсутністю атома фосфору. Ілюстративні фосфоровмісні міжнуклеозидні зв'язки включають, без обмеження, фосфодіестери (PO), фосфотриестери, метилфосфонати, фосфорамідати і тіофосфати (PS). Ілюстративні міжнуклеозидні зв'язувальні групи, що не містять фосфору, включають, без обмеження, метиленметиліміно ($-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$), тіодіестер ($-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{S}-$), тіонокарбамат ($-\text{O}-\text{C}(\text{O})(\text{NH})-\text{S}-$); силоксан ($-\text{O}-\text{Si}(\text{H})_2-\text{O}-$); і N, N'-диметилгідазин ($-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-$). Модифіковані зв'язки, порівняно з природними фосфодіестерними зв'язками, можуть бути використані для зміни, звичайно збільшення стійкості олігонуклеотиду до нуклеази. У деяких варіантах реалізації винаходу міжнуклеозидні зв'язки, що мають хіральний атом, можуть бути одержані у вигляді рацемічної суміші або у вигляді окремих енантіомерів. Ілюстративні хіральні зв'язки включають, без обмеження, алкілфосфонати і тіофосфати. Способи одержання фосфоровмісних і міжнуклеозидних зв'язків, що не містять фосфору, добре відомі фахівцям в даній галузі техніки.

Олігонуклеотиди, описані в даному документі, містять один або декілька асиметричних центрів і, отже, можуть утворювати енантіомери, діастереомери та інші стереоізомерні конфігурації, які відповідно до абсолютної стереохімії можуть бути визначені як (R) або (S), або, як для аномерів цукру, або як (D) або (L), як для амінокислот, тощо. До антисмислових сполук, представлених у даному документі, включені всі такі можливі ізомери, а також їх рацемічні і оптично чисті форми.

Нейтральні зв'язувальні лінкери включають, без обмеження, фосфотриестери, метилфосфонати, MMI ($3'-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-5'$), амід-3 ($3'-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{H})-5'$), амід-4 ($3'-\text{CH}_2-\text{N}(\text{H})-\text{C}(=\text{O})-5'$), формацеталь ($3'-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-5'$) і тіоформацеталь ($3'-\text{S}-\text{CH}_2-\text{O}-5'$). Додаткові нейтральні міжнуклеозидні зв'язки включають неіонні зв'язки, що містять силоксан (діалкілсилоксан), карбоксильний естер, карбоксамід, сульфід, сульфоновий естер і амід (див., наприклад: Carbohydrate Modifications in Antisense Research; Y.S. Sanghvi і P.D. Cook, ред., ACS Symposium Series 580; розділи 3 і 4, 40-65). Додаткові нейтральні міжнуклеозидні зв'язки включають неіонні зв'язки, що містять змішані складові частини N, O, S і CH_2 .

4. Деякі мотиви

У деяких варіантах реалізації винаходу антисмислові олігонуклеотиди містять один або декілька модифікованих нуклеозидів (наприклад, нуклеозид, що містить модифікований цукор та/або модифіковану азотисту основу) та/або один або декілька модифікованих міжнуклеозидних зв'язків. Характерна ділянка таких модифікацій в олігонуклеотиді згадується в даному документі як мотив. У деяких варіантах реалізації винаходу мотиви цукру, азотистих основ і лінкера не залежать один від одного.

а. Деякі цукрові мотиви

У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотиди містять один або декілька типів модифікованих цукрових фрагментів та/або природних цукрових фрагментів, розташованих уздовж олігонуклеотиду або його ділянки певним чином або у вигляді мотиву цукрової модифікації. Такі мотиви можуть містити будь-які цукрові модифікації, розглянуті в даному документі, та/або інші відомі модифікації цукру.

У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотиди містять або складаються з ділянки, що має цукровий мотив гепмеру, який містить дві зовнішні ділянки або "крила" і центральну або внутрішню ділянку, або "геп". Ці три ділянки цукрового мотиву гепмеру (5'-крило, геп і 3'-крило) утворюють безперервну послідовність азотистих основ, у якій щонайменше деякі із цукрових фрагментів нуклеозидів у кожному крилі відрізняються щонайменше від деяких цукрових фрагментів нуклеозидів у гепі. Зокрема, щонайменше ті цукрові фрагменти нуклеозидів кожного крила, які розташовані найближче до гепу (3'-найближчий нуклеозид 5'-крила і 5'-найближчий нуклеозид 3'-крила), відрізняються від цукрового фрагмента сусідніх нуклеозидів у гепі, визначаючи таким чином межу між крилами і гепом. У деяких варіантах реалізації винаходу цукрові фрагменти у гепі є однаковими між собою. У деяких варіантах реалізації винаходу геп містить один або декілька нуклеозидів, що мають цукровий фрагмент, який відрізняється від цукрового фрагмента одного або декількох інших нуклеозидів у гепі. У деяких варіантах реалізації винаходу цукрові мотиви двох крил є однаковими між собою (симетричний цукровий гепмер). У деяких варіантах реалізації винаходу цукрові мотиви 5'-крила відрізняються від цукрового мотиву 3'-крила (асиметричний цукровий гепмер).

нуклеозидів. У деяких варіантах реалізації винаходу геп гепмеру складається з 6-10 зв'язаних нуклеозидів. У деяких варіантах реалізації винаходу геп гепмеру складається з 6-9 зв'язаних нуклеозидів. У деяких варіантах реалізації винаходу геп гепмеру складається з 6-8 зв'язаних нуклеозидів. У деяких варіантах реалізації винаходу геп гепмеру складається з 6 або 7 зв'язаних нуклеозидів. У деяких варіантах реалізації винаходу геп гепмеру складається з 7-10 зв'язаних нуклеозидів. У деяких варіантах реалізації винаходу геп гепмеру складається з 7-9 зв'язаних нуклеозидів. У деяких варіантах реалізації винаходу геп гепмеру складається з 7 або 8 зв'язаних нуклеозидів. У деяких варіантах реалізації винаходу геп гепмеру складається з 8-10 зв'язаних нуклеозидів. У деяких варіантах реалізації винаходу геп гепмеру складається з 8 або 9 зв'язаних нуклеозидів. У деяких варіантах реалізації винаходу геп гепмеру складається із 6 зв'язаних нуклеозидів. У деяких варіантах реалізації винаходу геп гепмеру складається із 7 зв'язаних нуклеозидів. У деяких варіантах реалізації винаходу геп гепмеру складається із 8 зв'язаних нуклеозидів. У деяких варіантах реалізації винаходу геп гепмеру складається із 9 зв'язаних нуклеозидів. У деяких варіантах реалізації винаходу геп гепмеру складається із 10 зв'язаних нуклеозидів. У деяких варіантах реалізації винаходу геп гепмеру складається із 11 зв'язаних нуклеозидів. У деяких варіантах реалізації винаходу геп гепмеру складається із 12 зв'язаних нуклеозидів.

У деяких варіантах реалізації винаходу кожен нуклеозид гепа гепмеру являє собою 2'-дезоксинуклеозид. У деяких варіантах реалізації винаходу геп містить один або декілька модифікованих нуклеозидів. У деяких варіантах реалізації винаходу кожен нуклеозид гепа гепмеру являє собою 2'-дезоксинуклеозид або являє собою модифікований "ДНК-подібний" нуклеозид. У таких варіантах реалізації винаходу "ДНК-подібний" означає, що нуклеозид має такі ж характеристики, що і ДНК, тобто що дуплекс, який містить гепмер і молекулу РНК може активувати РНКазу Н. Наприклад, було показано, що за деяких умов 2'-(ara)-F підтримує активацію РНКазу Н і, отже, є ДНК-подібним. У деяких варіантах реалізації винаходу один або декілька нуклеозидів гепа гепмеру не є 2'-дезоксинуклеозидом і не є ДНК-подібним. Однак, у деяких з таких варіантів реалізації винаходу гепмер підтримує активацію РНКазу Н (наприклад, за рахунок кількості або положення не-ДНК нуклеозидів).

У деяких варіантах реалізації винаходу гепи містять ділянку немодифікованого 2'-дезоксинуклеозиду, що переривається одним або декількома модифікованими нуклеозидами, що приводить до утворення трьох субрайонів (двох ділянок одного або декількох 2'-дезоксинуклеозидів і ділянки одного або декількох перериваючих модифікованих нуклеозидів). У деяких варіантах реалізації винаходу жодна ділянка немодифікованих 2'-дезоксинуклеозидів не довша за 5, 6 або 7 нуклеозидів. У деяких варіантах реалізації винаходу такі короткі ділянки утворюються за рахунок застосування коротких геп-доменів. У деяких варіантах реалізації винаходу короткі ділянки утворюються за рахунок переривання довшого геп-домену.

У деяких варіантах реалізації винаходу геп містить один або декілька модифікованих нуклеозидів. У деяких варіантах реалізації винаходу геп містить один або декілька модифікованих нуклеозидів, вибраних з cEt, FHNA, LNA і 2-тіотимідину. У деяких варіантах реалізації винаходу геп містить один модифікований нуклеозид. У деяких варіантах реалізації винаходу геп містить 5'-заміщений цукровий фрагмент, вибраний з 5'-Me і 5'-(R)-Me. У деяких варіантах реалізації винаходу геп містить два модифікованих нуклеозиди. У деяких варіантах реалізації винаходу геп містить три модифікованих нуклеозиди. У деяких варіантах реалізації винаходу геп містить чотири модифікованих нуклеозиди. У деяких варіантах реалізації винаходу геп містить два або більше модифікованих нуклеозидів, і кожен модифікований нуклеозид є таким же. У деяких варіантах реалізації винаходу геп містить два або більше модифікованих нуклеозидів, і кожен модифікований нуклеозид є іншим.

У деяких варіантах реалізації винаходу геп містить один або декілька модифікованих зв'язків. У деяких варіантах реалізації винаходу геп містить один або декілька метилфосфонатних зв'язків. У деяких варіантах реалізації винаходу геп містить один або декілька модифікованих зв'язків і один або декілька модифікованих нуклеозидів. У деяких варіантах реалізації винаходу геп містить один модифікований зв'язок і один модифікований нуклеозид. У деяких варіантах реалізації винаходу геп містить два модифікованих зв'язки і два або більше модифікованих нуклеозидів.

b. Деякі мотиви міжнуклеозидних зв'язків

У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотиди містять модифіковані міжнуклеозидні зв'язки, розташовані вздовж олігонуклеотиду або його ділянки певним чином або у вигляді мотиву модифікованого міжнуклеозидного зв'язку. У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотиди містять область, що має мотив почережних міжнуклеозидних зв'язків.

У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотиди за даним описом містять область однаковою чином модифікованих міжнуклеозидних зв'язків. У деяких таких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотид містить область, яка рівномірно зв'язана тіофосфатними міжнуклеозидними зв'язками. У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотид рівномірно зв'язаний тіофосфатними міжнуклеозидними зв'язками. У деяких варіантах реалізації винаходу кожен міжнуклеозидний зв'язок олігонуклеотиду вибраний з фосфодіестеру і тіофосфату. У деяких варіантах реалізації винаходу кожен міжнуклеозидний зв'язок олігонуклеотиду вибраний з фосфодіестеру і тіофосфату, і щонайменше один міжнуклеозидний зв'язок є тіофосфатним.

У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотид містить щонайменше 6 тіофосфатних міжнуклеозидних зв'язків. У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотид містить щонайменше 7 тіофосфатних міжнуклеозидних зв'язків. У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотид містить щонайменше 8 тіофосфатних міжнуклеозидних зв'язків. У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотид містить щонайменше 9 тіофосфатних міжнуклеозидних зв'язків. У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотид містить щонайменше 10 тіофосфатних міжнуклеозидних зв'язків. У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотид містить щонайменше 11 тіофосфатних міжнуклеозидних зв'язків. У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотид містить щонайменше 12 тіофосфатних міжнуклеозидних зв'язків. У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотид містить щонайменше 13 тіофосфатних міжнуклеозидних зв'язків. У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотид містить щонайменше 14 тіофосфатних міжнуклеозидних зв'язків.

[illegible]

с. Деякі мотиви модифікацій азотистих основ

У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотиди містять хімічні модифікації азотистих основ, розташовані вздовж олігонуклеотиду або його ділянки певним чином або у вигляді мотиву модифікації азотистих основ. У деяких таких варіантах реалізації винаходу модифікації азотистих основ розташовані у розірваному мотиві. У деяких варіантах реалізації винаходу модифікації азотистих основ розташовані у почережному мотиві. У деяких варіантах реалізації винаходу жодна з азотистих основ не є хімічно модифікованою.

У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотиди містять блок модифікованих азотистих основ. У деяких таких варіантах реалізації винаходу блок знаходиться на 3'-кінці олігонуклеотиду. У деяких варіантах реалізації винаходу блок знаходиться в межах 3 нуклеотидів 3'-кінця олігонуклеотиду. У деяких таких варіантах реалізації винаходу блок знаходиться на 5'-кінці олігонуклеотиду. У деяких варіантах реалізації винаходу блок

знаходиться в межах 3 нуклеотидів 5'-кінця олігонуклеотиду.

У деяких варіантах реалізації винаходу модифікації азотистих основ залежать від природної основи в конкретному положенні олігонуклеотиду. Наприклад, у деяких варіантах реалізації винаходу кожен пурин або кожен піримідин в олігонуклеотиді є модифікованим. У деяких варіантах реалізації винаходу модифікованим є кожен аденін. У деяких варіантах реалізації винаходу модифікованим є кожен гуанін. У деяких варіантах реалізації винаходу модифікованим є кожен тимін. У деяких варіантах реалізації винаходу модифікованим є кожен цитозин. У деяких варіантах реалізації винаходу модифікованим є кожен урацил.

У деяких варіантах реалізації винаходу деякі, всі або жодні із цитозинових фрагментів в олігонуклеотиді не є 5-метилцитозиновими фрагментами. У цьому документі 5-метилцитозин не є "модифікованою азотистою основою". Відповідно, якщо не вказано інше, то немодифіковані азотисті основи включають як цитозинові залишки, що містять 5-метил, так і ті, що не містять 5-метилу. У деяких варіантах реалізації винаходу обумовлений стан метилювання всіх або деяких цитозинових азотистих основ.

У деяких варіантах реалізації винаходу хімічні модифікації азотистих основ включають приєднання деяких кон'югувальних груп до азотистих основ. У деяких варіантах реалізації винаходу кожен пурин або кожен піримідин в олігонуклеотиді може бути необов'язково модифікований таким чином, щоб він містив кон'югувальну групу.

d. Деякі загальні довжини

У деяких варіантах реалізації даного опису наведені олігонуклеотиди будь-якого з різноманітних діапазонів довжин. У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотиди містять від X до Y зв'язаних нуклеозидів, де X є найменшою кількістю нуклеозидів у діапазоні, а Y є найбільшою кількістю нуклеозидів у діапазоні. У деяких таких варіантах реалізації винаходу кожен X і Y незалежно вибраний з 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 і 50; за умови, що $X \leq Y$. Наприклад, у деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотид може складатися із 8-9, 8-10, 8-11, 8-12, 8-13, 8-14, 8-15, 8-16, 8-17, 8-18, 8-19, 8-20, 8-21, 8-22, 8-23, 8-24, 8-25, 8-26, 8-27, 8-28, 8-29, 8-30, 9-10, 9-11, 9-12, 9-13, 9-14, 9-15, 9-16, 9-17, 9-18, 9-19, 9-20, 9-21, 9-22, 9-23, 9-24, 9-25, 9-26, 9-27, 9-28, 9-29, 9-30, 10-11, 10-12, 10-13, 10-14, 10-15, 10-16, 10-17, 10-18, 10-19, 10-20, 10-21, 10-22, 10-23, 10-24, 10-25, 10-26, 10-27, 10-28, 10-29, 10-30, 11-12, 11-13, 11-14, 11-15, 11-16, 11-17, 11-18, 11-19, 11-20, 11-21, 11-22, 11-23, 11-24, 11-25, 11-26, 11-27, 11-28, 11-29, 11-30, 12-13, 12-14, 12-15, 12-16, 12-17, 12-18, 12-19, 12-20, 12-21, 12-22, 12-23, 12-24, 12-25, 12-26, 12-27, 12-28, 12-29, 12-30, 13-14, 13-15, 13-16, 13-17, 13-18, 13-19, 13-20, 13-21, 13-22, 13-23, 13-24, 13-25, 13-26, 13-27, 13-28, 13-29, 13-30, 14-15, 14-16, 14-17, 14-18, 14-19, 14-20, 14-21, 14-22, 14-23, 14-24, 14-25, 14-26, 14-27, 14-28, 14-29, 14-30, 15-16, 15-17, 15-18, 15-19, 15-20, 15-21, 15-22, 15-23, 15-24, 15-25, 15-26, 15-27, 15-28, 15-29, 15-30, 16-17, 16-18, 16-19, 16-20, 16-21, 16-22, 16-23, 16-24, 16-25, 16-26, 16-27, 16-28, 16-29, 16-30, 17-18, 17-19, 17-20, 17-21, 17-22, 17-23, 17-24, 17-25, 17-26, 17-27, 17-28, 17-29, 17-30, 18-19, 18-20, 18-21, 18-22, 18-23, 18-24, 18-25, 18-26, 18-27, 18-28, 18-29, 18-30, 19-20, 19-21, 19-22, 19-23, 19-24, 19-25, 19-26, 19-27, 19-28, 19-29, 19-30, 20-21, 20-22, 20-23, 20-24, 20-25, 20-26, 20-27, 20-28, 20-29, 20-30, 21-22, 21-23, 21-24, 21-25, 21-26, 21-27, 21-28, 21-29, 21-30, 22-23, 22-24, 22-25, 22-26, 22-27, 22-28, 22-29, 22-30, 23-24, 23-25, 23-26, 23-27, 23-28, 23-29, 23-30, 24-25, 24-26, 24-27, 24-28, 24-29, 24-30, 25-26, 25-27, 25-28, 25-29, 25-30, 26-27, 26-28, 26-29, 26-30, 27-28, 27-29, 27-30, 28-29, 28-30 або 29-30 зв'язаних нуклеозидів. У тих варіантах реалізації, в яких кількість нуклеозидів в олігонуклеотиді сполуки є обмеженою, до діапазону або до певного числа, така сполука може, однак, додатково містити інші додаткові замісники. Наприклад, олігонуклеотид, що містить 8-30 нуклеозидів, виключає олігонуклеотиди, що мають 31 нуклеозид, але, якщо не вказано інше, такий олігонуклеотид може додатково містити, наприклад, одну або декілька кон'югувальних груп, кінцевих груп або інших замісників.

Більше того, якщо олігонуклеотид описаний загальним діапазоном довжини і областями, що мають певну довжину, і якщо сума вказаних довжин областей є меншою, ніж верхня межа діапазону загальної довжини, то олігонуклеотид може мати додаткові нуклеозиди, крім тих, які знаходяться у вказаних областях, за умови, що загальна кількість нуклеозидів не перевищує верхню межу діапазону загальної довжини.

5. Деякі хімічні мотиви антисмислових олігонуклеотидів

У деяких варіантах реалізації винаходу хімічні структурні особливості антисмислових олігонуклеотидів описуються їх цукровим мотивом, мотивом міжнуклеозидного зв'язку, мотивом модифікації азотистих основ і загальною довжиною. У деяких варіантах реалізації винаходу такі параметри не залежать один від одного. Так, кожен міжнуклеозидний зв'язок олігонуклеотиду, що має цукровий мотив гепмеру, може бути модифікованим або немодифікованим і може

повторювати або не повторювати характер модифікації цукрових модифікацій гепмеру. Отже, міжнуклеозидні зв'язки в областях крил цукру-гепмеру можуть бути однаковими або відмінними один від одного і можуть бути однаковими або відмінними від міжнуклеозидних зв'язків геп-домену. Так само, такі цукор-гепмерні олігонуклеотиди можуть містити одну або декілька модифікованих азотистих основ, незалежно від характеру цукрових модифікацій гепмеру. Фахівцям у даній галузі техніки зрозуміло, що такі мотиви можуть бути комбіновані з одержанням численних олігонуклеотидів.

У деяких варіантах реалізації винаходу вибір міжнуклеозидного зв'язку і модифікації нуклеозиду не залежать один від одного.

і. Деякі послідовності і мішені

У деяких варіантах реалізації даного винаходу наведені антисмислові олігонуклеотиди, що мають послідовність, комплементарну цільовій нуклеїновій кислоті. Такі антисмислові сполуки можуть гібридизуватися з цільовою нуклеїновою кислотою з одержанням щонайменше однієї антисмислової активності. У деяких варіантах реалізації винаходу антисмислові сполуки специфічно гібридизуються з однією або декількома цільовими нуклеїновими кислотами. У деяких варіантах реалізації винаходу антисмислова сполука, що специфічно гібридизується, має послідовність азотистих основ, що містить область з достатньою комплементарністю цільовій нуклеїновій кислоті для забезпечення можливості гібридизації і одержання антисмислової активності, і недостатньою комплементарністю будь-якій нецільовій нуклеїновій кислоті для запобігання або зниження неспецифічної гібридизації з послідовностями нецільових нуклеїнових кислот в умовах, у яких необхідна специфічна гібридизація (наприклад, у фізіологічних умовах для *in vivo* або терапевтичних застосувань і в умовах виконання аналізів - у випадку *in vitro* аналізів). У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотиди є селективними між мішенню і не мішенню, навіть якщо мішень і не мішень містять цільову послідовність. У таких варіантах реалізації винаходу селективність може бути результатом відносної доступності цільової ділянки однієї молекули нуклеїнової кислоти, порівняно з іншою.

У деяких варіантах реалізації даного опису наведені антисмислові сполуки, що містять олігонуклеотиди, які є повністю комплементарними цільовій нуклеїновій кислоті по всій довжині олігонуклеотиду. У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотиди є на 99 % комплементарними цільовій нуклеїновій кислоті. У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотиди є на 95 % комплементарними цільовій нуклеїновій кислоті. У деяких варіантах реалізації винаходу такі олігонуклеотиди є на 90 % комплементарними цільовій нуклеїновій кислоті.

У деяких варіантах реалізації винаходу такі олігонуклеотиди є на 85 % комплементарними цільовій нуклеїновій кислоті. У деяких варіантах реалізації винаходу такі олігонуклеотиди є на 80 % комплементарними цільовій нуклеїновій кислоті. У деяких варіантах реалізації винаходу антисмислова сполука містить область, що є повністю комплементарною цільовій нуклеїновій кислоті, і є щонайменше на 80 % комплементарною цільовій нуклеїновій кислоті по всій довжині олігонуклеотиду. У деяких таких варіантах реалізації винаходу область повної комплементарності має довжину від 6 до 14 нуклеозидів.

У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотиди містять область гібридизації і кінцеву область. У деяких таких варіантах реалізації винаходу область гібридизації складається із 12-30 зв'язаних нуклеозидів і є повністю комплементарною цільовій нуклеїновій кислоті. У деяких варіантах реалізації винаходу область гібридизації містить одну невідповідність порівняно із цільовою нуклеїновою кислотою. У деяких варіантах реалізації винаходу область гібридизації містить дві невідповідності порівняно із цільовою нуклеїновою кислотою. У деяких варіантах реалізації винаходу область гібридизації містить три невідповідності порівняно із цільовою нуклеїновою кислотою. У деяких варіантах реалізації винаходу кінцева область складається з 1-4 кінцевих нуклеозидів. У деяких варіантах реалізації винаходу кінцеві нуклеозиди знаходяться на 3'-кінці. У деяких варіантах реалізації винаходу один або декілька кінцевих нуклеозидів не є комплементарними цільовій нуклеїновій кислоті.

Антисмислові механізми включають будь-який механізм, що зачіпає гібридизацію олігонуклеотиду із цільовою нуклеїновою кислотою, причому гібридизація приводить до біологічного ефекту. У деяких варіантах реалізації винаходу така гібридизація приводить до руйнування або до застосування цільової нуклеїнової кислоти із супутнім пригніченням або стимуляцією клітинного механізму, що зачіпає, наприклад, трансляцію, транскрипцію або сплайсинг цільової нуклеїнової кислоти.

Один із типів антисмислового механізму, що зачіпає руйнування цільової РНК являє собою антисмисл, опосередкований РНКазою Н. РНКазою Н являє собою клітинну ендонуклеазу, яка розщеплює спіраль РНК дуплексу РНК:ДНК. У даній галузі техніки відомо, що одноланцюгові

антисмислові сполуки, що є "ДНК-подібними", викликають активність РНКаз Н у клітинах ссавців. Отже, активація РНКаз Н приводить до розщеплення РНК-мішені, за допомогою чого значною мірою підсилюється ефективність пригнічення генної експресії, опосередкованої ДНК-подібним олігонуклеотидом.

5 У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югувальна група містить розщеплюваний фрагмент. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югувальна група містить один або декілька розщеплюваних зв'язків. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югувальна група містить лінкер. У деяких варіантах реалізації винаходу лінкер містить фрагмент, що зв'язує білки. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югувальна група містить фрагмент, що

10 націлює на клітину (також згадується як група, що націлює на клітину). У деяких варіантах реалізації винаходу фрагмент, що націлює на клітину, містить групу розгалуження. У деяких варіантах реалізації винаходу фрагмент, що націлює на клітину, містить одну або декілька зв'язок. У деяких варіантах реалізації винаходу фрагмент, що націлює на клітину, містить

15 ii. Деякі розщеплювані фрагменти

У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент є розщеплюваним зв'язком. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент містить розщеплюваний зв'язок. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югувальна група містить розщеплюваний фрагмент. У деяких таких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний

20 фрагмент приєднується до антисмислового олігонуклеотиду. У деяких таких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент приєднується безпосередньо до фрагмента, що націлює на клітину. У деяких таких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент приєднується до лінкера кон'югату. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент містить фосфат або фосфодіестер. У деяких варіантах реалізації винаходу

25 розщеплюваний фрагмент являє собою розщеплюваний нуклеозид або нуклеозидний аналог. У деяких варіантах реалізації винаходу нуклеозид або нуклеозидний аналог містить необов'язково захищену гетероциклічну основу, вибрану з пурину, заміщеного пурину, піримідину або заміщеного піримідину. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент являє собою нуклеозид, що містить необов'язково захищену гетероциклічну основу, вибрану з

30 урацилу, тиміну, цитозину, 4-N-бензоїлцитозину, 5-метилцитозину, 4-N-бензоїл-5-метилцитозину, аденіну, 6-N-бензоїладеніну, гуаніну і 2-N-ізобутирилгуаніну. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент являє собою 2'-дезоксинуклеозид, що приєднаний до 3'-положення антисмислового олігонуклеотиду фосфодіестерним зв'язком і приєднаний до лінкера фосфодіестерним або тіофосфатним зв'язком. У деяких варіантах

35 реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент являє собою 2'-дезоксіденозин, що приєднаний до 3'-положення антисмислового олігонуклеотиду фосфодіестерним зв'язком і приєднаний до лінкера фосфодіестерним або тіофосфатним зв'язком. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент являє собою 2'-дезоксіденозин, що приєднаний до 3'-положення антисмислового олігонуклеотиду фосфодіестерним зв'язком і приєднаний до лінкера

40 фосфодіестерним зв'язком.

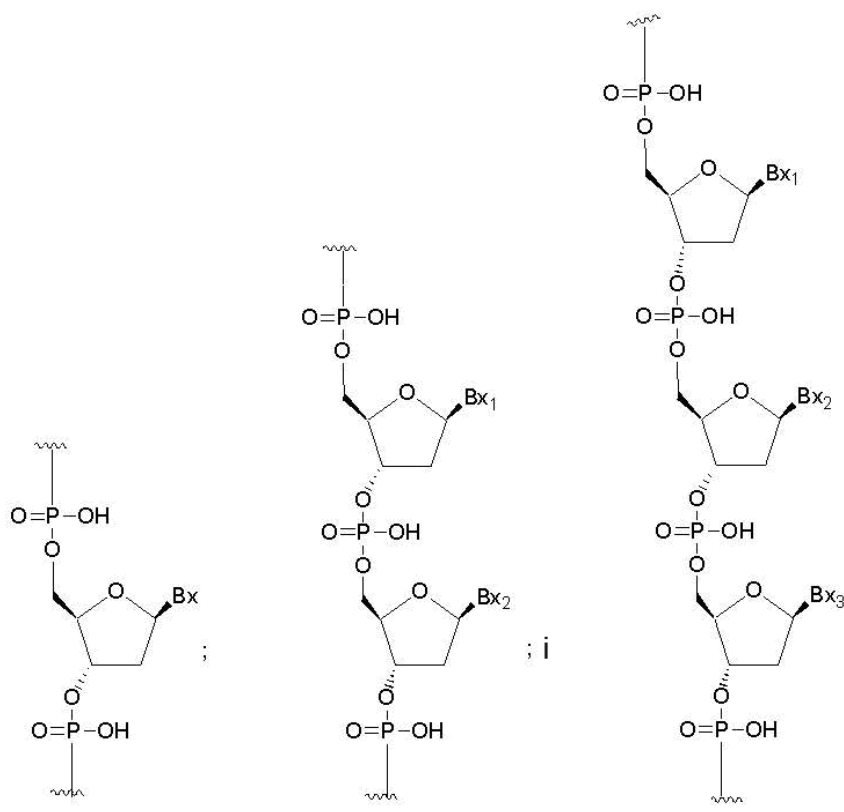
У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент приєднаний до 3'-положення антисмислового олігонуклеотиду. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент приєднаний до 5'-положення антисмислового олігонуклеотиду. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент приєднаний до 2'-положення

45 антисмислового олігонуклеотиду. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент приєднаний до антисмислового олігонуклеотиду фосфодіестерним зв'язком. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент приєднаний до вказаного лінкера фосфодіестерним або тіофосфатним зв'язком. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент приєднаний до вказаного лінкера фосфодіестерним зв'язком. У

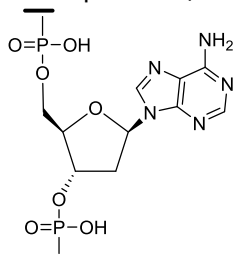
50 деяких варіантах реалізації винаходу кон'югувальна група не містить розщеплюваного фрагменту.

У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент розщеплюється після введення вказаного комплексу в організм тварини тільки після його поглинання цільовою клітиною. Всередині клітини розщеплюваний фрагмент розщеплюється, вивільняючи таким

55 чином активний антисмисловий олігонуклеотид. Не обмежуючись теорією, передбачається, що розщеплюваний фрагмент розщеплюється під дією однієї або декількох нуклеаз усередині клітини. У деяких варіантах реалізації винаходу одна або декілька нуклеаз розщеплюють фосфодіестерний зв'язок між розщеплюваним фрагментом і лінкером. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент має структуру, вибрану з наступних:



де кожний з Bx , Bx_1 , Bx_2 і Bx_3 незалежно є гетероциклічним основним фрагментом. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент має структуру, вибрану з наступних:



5 iii. Деякі лінкери

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югувальні групи містять лінкер. У деяких таких варіантах реалізації винаходу лінкер ковалентно зв'язаний із розщеплюваним фрагментом. У деяких таких варіантах реалізації винаходу лінкер ковалентно зв'язаний з антисмисловим олігонуклеотидом. У деяких варіантах реалізації винаходу лінкер ковалентно зв'язаний із фрагментом, що націлює на клітину. У деяких варіантах реалізації винаходу лінкер додатково містить ковалентне приєднання до твердої основи. У деяких варіантах реалізації винаходу лінкер додатково містить ковалентне приєднання до білкового зв'язувального фрагмента. У деяких варіантах реалізації винаходу лінкер додатково містить ковалентне приєднання до твердої основи і додатково містить ковалентне приєднання до білкового зв'язувального фрагмента. У деяких варіантах реалізації винаходу лінкер містить декілька положень для приєднання зв'язаних лігандів. У деяких варіантах реалізації винаходу лінкер містить декілька положень для приєднання зв'язаних лігандів і не приєднаний до групи розгалуження. У деяких варіантах реалізації винаходу лінкер додатково містить один або декілька розщеплюваних зв'язків. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югувальна група не містить лінкера.

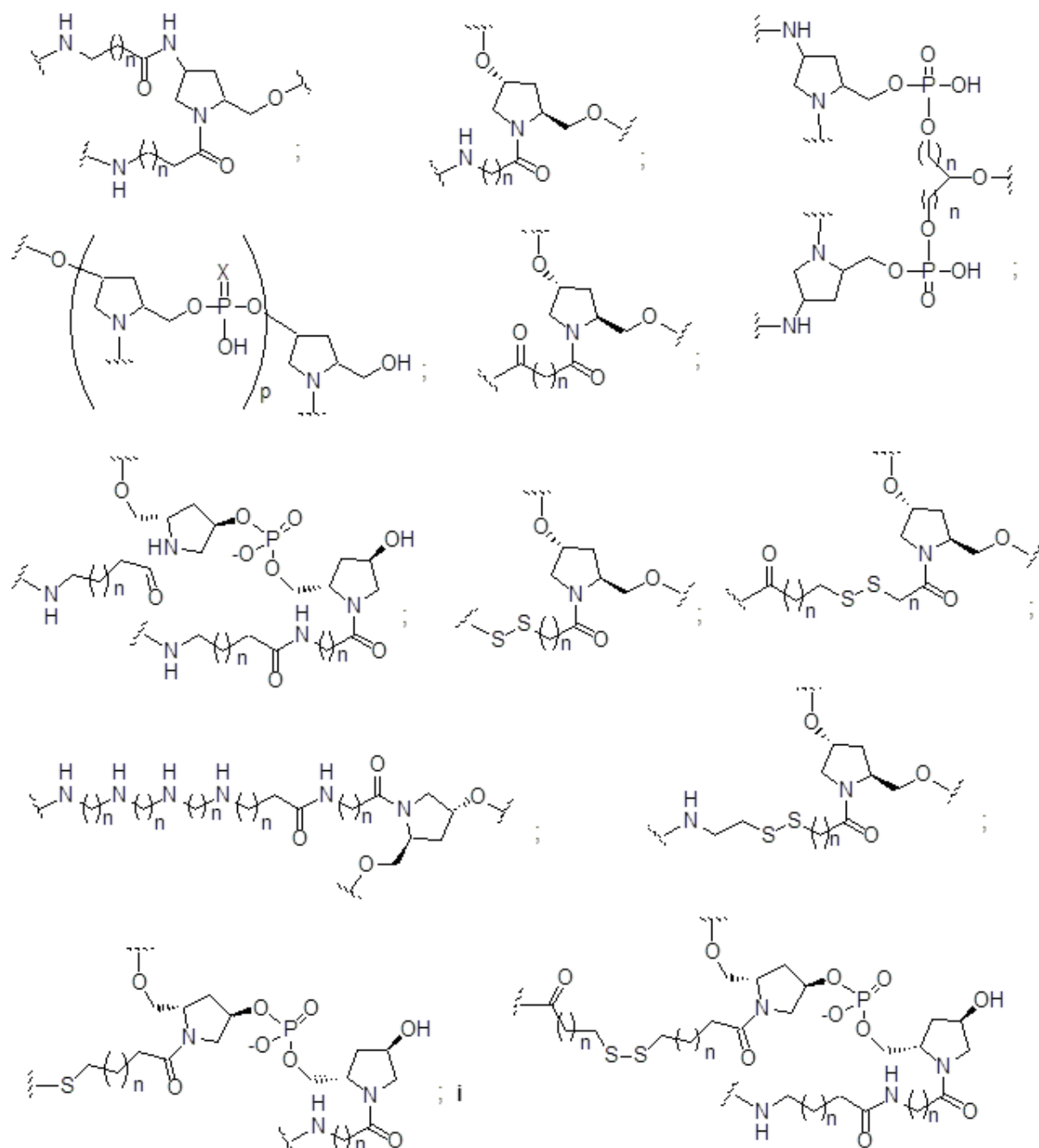
У деяких варіантах реалізації винаходу лінкер містить щонайменше одну лінійну групу, що містить групи, вибрані з алкільних, амідних, дисульфідних, поліетиленгліколевих, тіоетерних (-S-) і гідроксиламіно (-O-N(H)-) груп. У деяких варіантах реалізації винаходу лінійна група містить групи, вибрані з алкільних, амідних і етерних груп. У деяких варіантах реалізації винаходу лінійна група містить групи, вибрані з алкільних і етерних груп. У деяких варіантах реалізації винаходу лінійна група містить щонайменше одну фосфорну зв'язувальну групу. У деяких

варіантах реалізації винаходу лінійна група містить щонайменше одну фосфодіестерну групу. У деяких варіантах реалізації винаходу лінійна група містить щонайменше одну нейтральну зв'язувальну групу. У деяких варіантах реалізації винаходу лінійна група ковалентно приєднана до фрагмента, що націлює на клітину, і до розщеплюваного фрагмента. У деяких варіантах реалізації винаходу лінійна група ковалентно приєднана до фрагмента, що націлює на клітину, і до антисмислового олігонуклеотиду. У деяких варіантах реалізації винаходу лінійна група ковалентно приєднана до фрагмента, що націлює на клітину, до розщеплюваного фрагмента і до твердої основи. У деяких варіантах реалізації винаходу лінійна група ковалентно приєднана до фрагмента, що націлює на клітину, до розщеплюваного фрагмента, до твердої основи і до білкового зв'язувального фрагмента. У деяких варіантах реалізації винаходу лінійна група містить один або декілька розщеплюваних зв'язків.

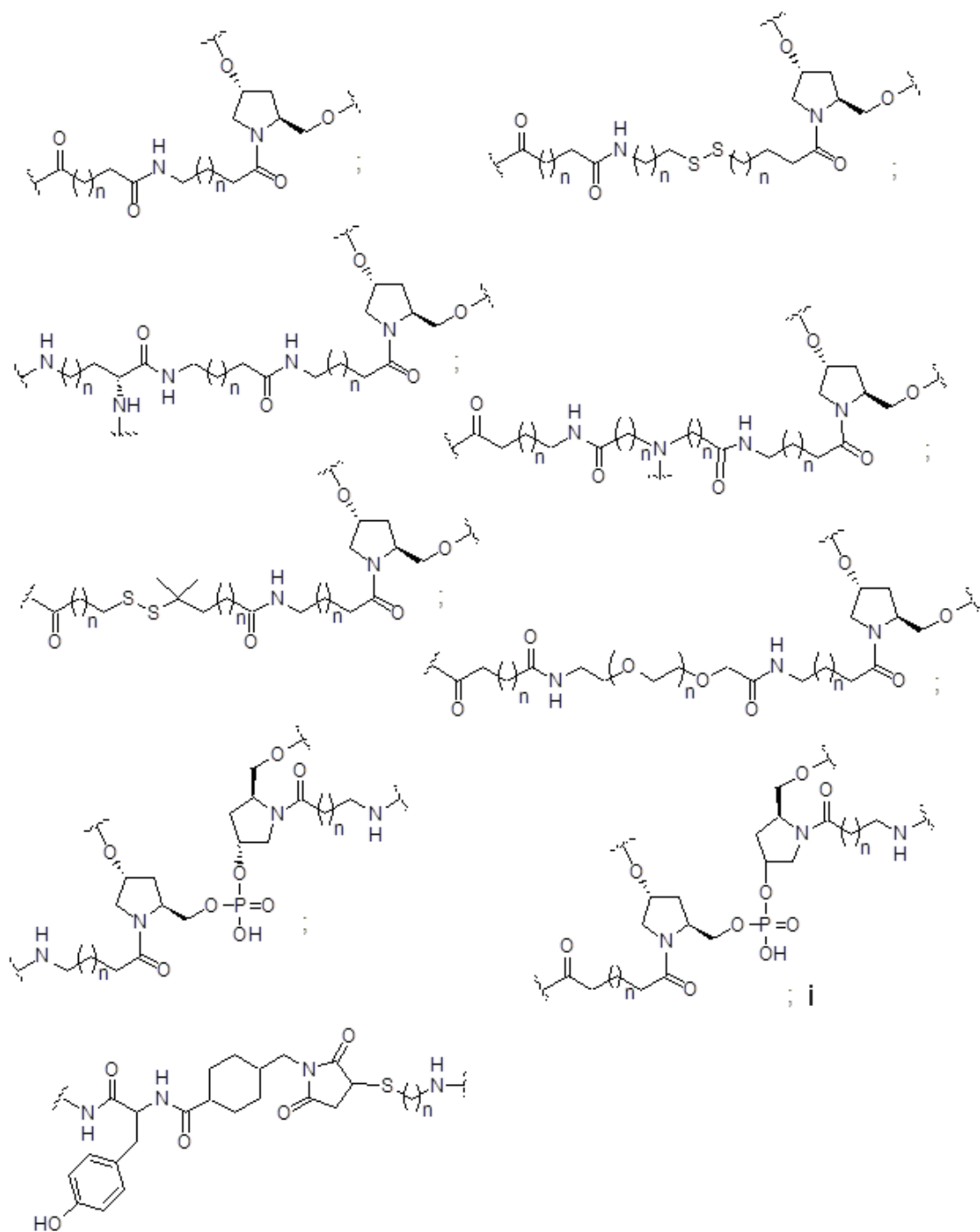
У деяких варіантах реалізації винаходу лінкер містить лінійну групу, ковалентно приєднану до групи скелета. У деяких варіантах реалізації винаходу скелет містить розгалужену аліфатичну групу, що містить групи, вибрані з алкільних, амідних, дисульфідних, поліетиленгліколевих, етерних, тіоетерних і гідроксиламіногруп. У деяких варіантах реалізації винаходу скелет містить розгалужену аліфатичну групу, що містить групи, вибрані з алкільних, амідних і естерних груп. У деяких варіантах реалізації винаходу скелет містить щонайменше одну моно- або поліциклічну кільцеву систему. У деяких варіантах реалізації винаходу скелет містить щонайменше дві моно- або поліциклічні кільцеві системи. У деяких варіантах реалізації винаходу лінійна група ковалентно приєднана до групи скелета, а група скелета ковалентно приєднана до розщеплюваного фрагмента і лінкера. У деяких варіантах реалізації винаходу лінійна група ковалентно приєднана до групи скелета, а група скелета ковалентно приєднана до розщеплюваного фрагмента, лінкера і твердої основи. У деяких варіантах реалізації винаходу лінійна група ковалентно приєднана до групи скелета, а група скелета ковалентно приєднана до розщеплюваного фрагмента, лінкера і білкового зв'язувального фрагмента. У деяких варіантах реалізації винаходу лінійна група ковалентно приєднана до групи скелета, а група скелета ковалентно приєднана до розщеплюваного фрагмента, лінкера, білкового зв'язувального фрагмента і твердої основи. У деяких варіантах реалізації винаходу група скелета містить один або декілька розщеплюваних зв'язків.

У деяких варіантах реалізації винаходу лінкер містить фрагмент, що зв'язує білки. У деяких варіантах реалізації винаходу фрагмент, що зв'язує білки, є ліпідом, таким як, наприклад, включаючи, без обмеження, холестерин, холева кислота, адамантан-оцтова кислота, 1-пірен-масляна кислота, дигідротестостерон, 1,3-біс-О(гексадецил)гліцерин, геранілоксигексилова група, гексадецилгліцерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандіол, гептадецилова група, пальмітинова кислота, міристинова кислота, ОЗ-(олеоїл)літохолева кислота, ОЗ-(олеоїл)холенова кислота, диметокситритил або феноксазин, вітамін (наприклад, фолат, вітамін А, вітамін Е, біотин, піридоксаль), пептид, вуглевод (наприклад, моносахарид, дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олігосахарид, полісахарид), ендосомолітичний компонент, стероїд (наприклад, уваол, гецигенін, діосгенін), терпен (наприклад, тритерпен, наприклад, сарсасапогенін, фриделін, літохолева кислота, дериватизована епіфриделанолом) або катіонний ліпід. У деяких варіантах реалізації винаходу фрагмент, що зв'язує білки, є насиченою або ненасиченою жирною кислотою із довжиною ланцюга від C16 до C22, холестерином, холевою кислотою, вітаміном Е, адамантаном або 1-пентафлуорпропілом.

У деяких варіантах реалізації винаходу лінкер має структуру, вибрану з:

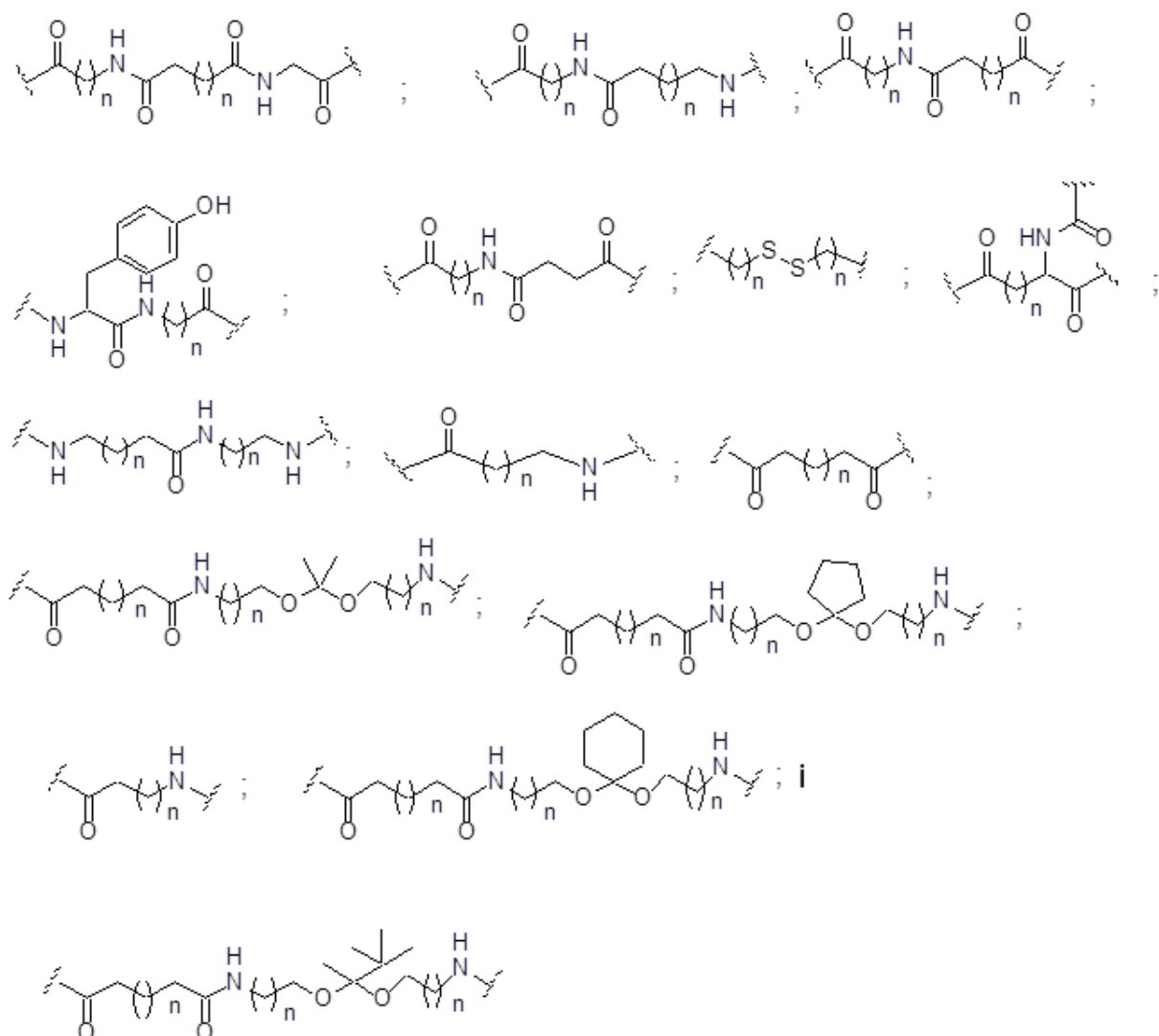


де кожне n незалежно дорівнює від 1 до 20; i p дорівнює від 1 до 6.
 У деяких варіантах реалізації винаходу лінкер має структуру, вибрану з:



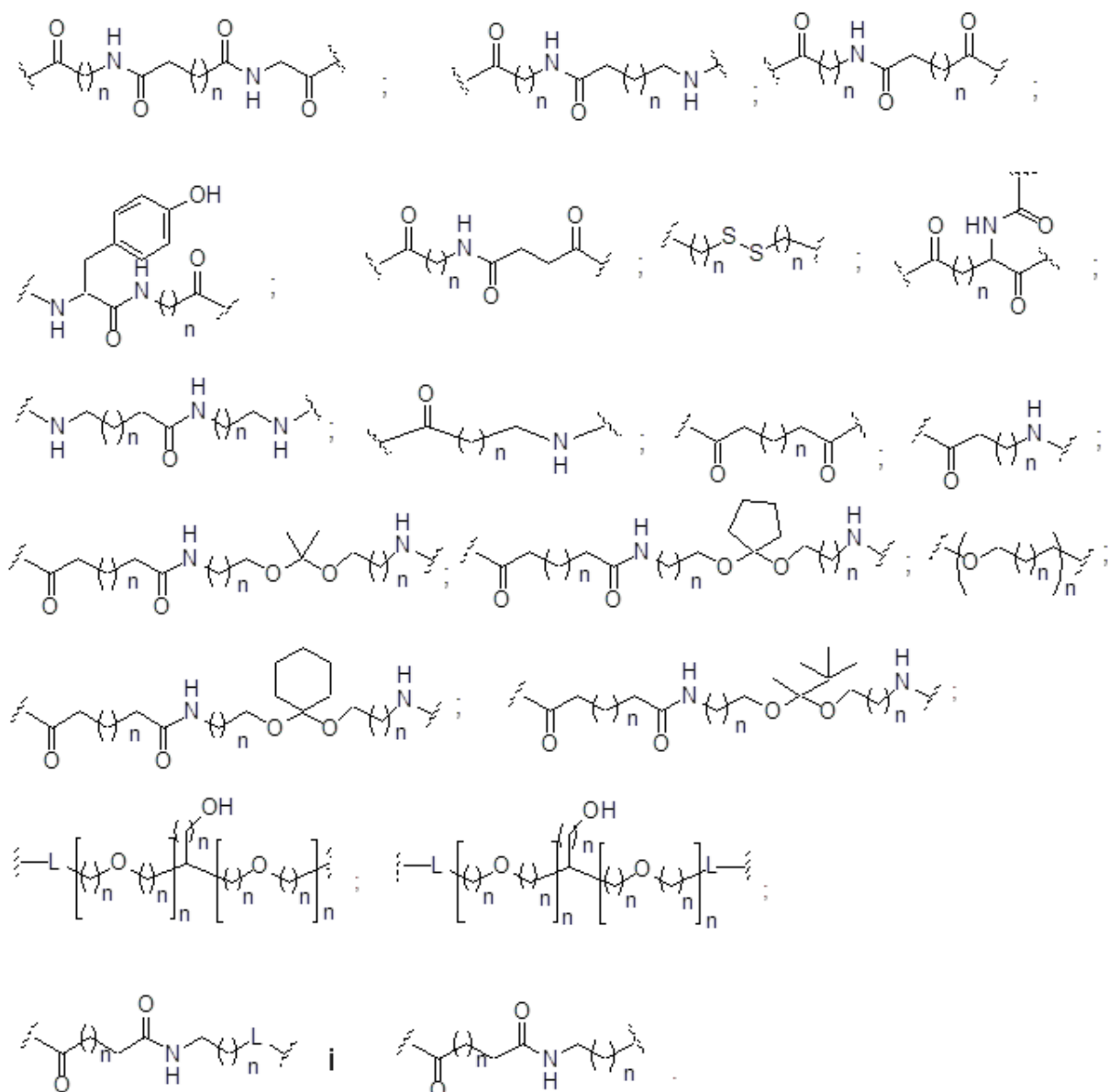
де кожне n незалежно дорівнює від 1 до 20.

У деяких варіантах реалізації винаходу лінкер має структуру, вибрану з:



де n дорівнює від 1 до 20.

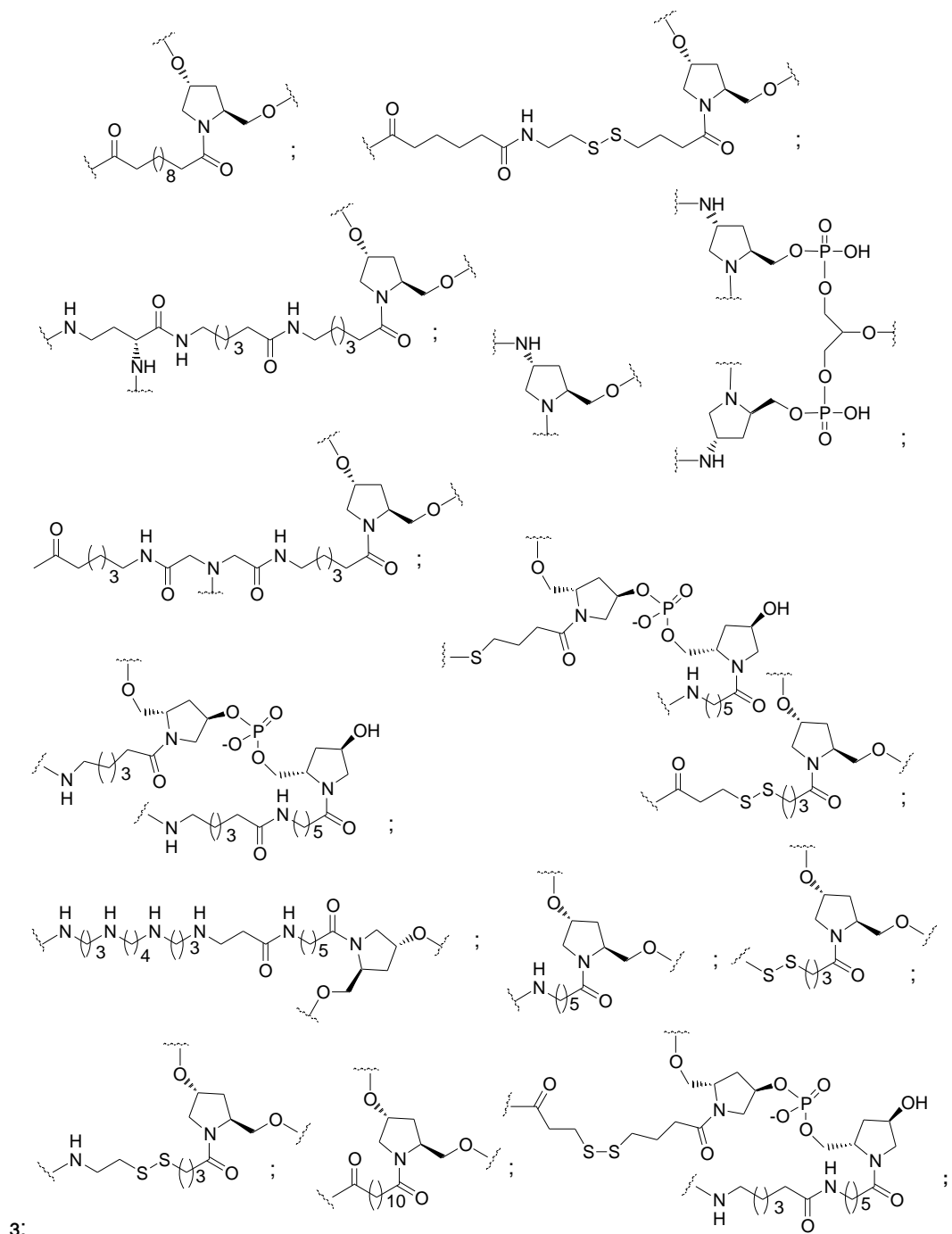
У деяких варіантах реалізації винаходу лінкер має структуру, вибрану з:

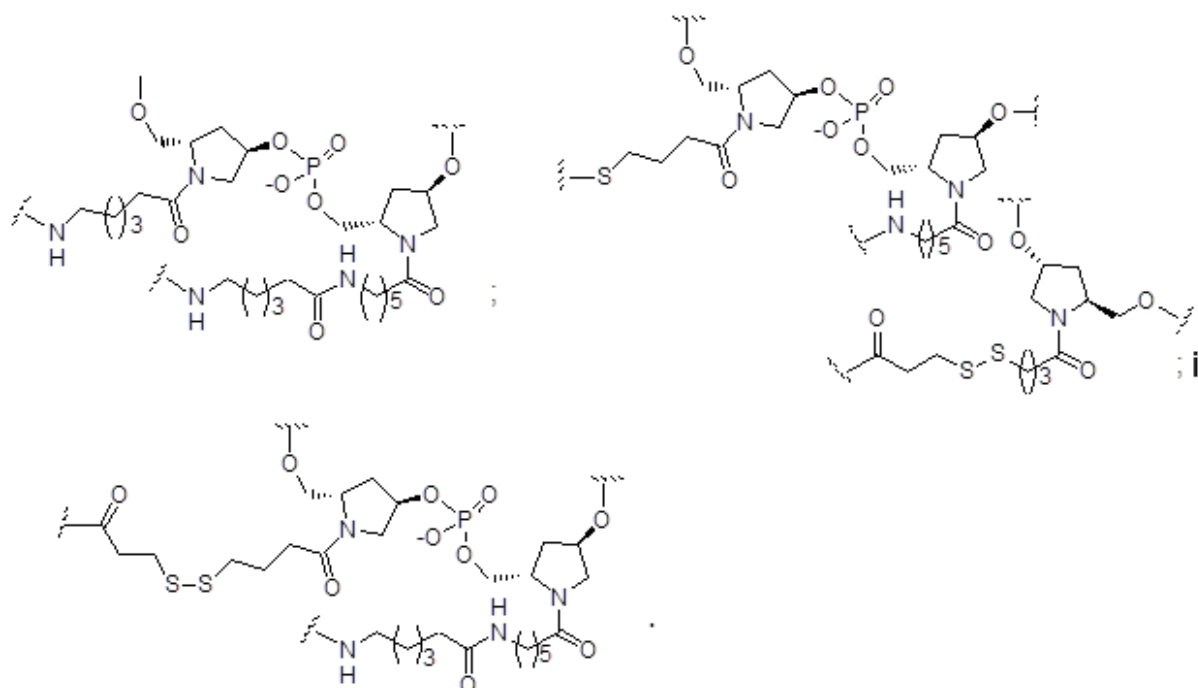


де кожен L незалежно є фосфорною зв'язувальною групою або нейтральною зв'язувальною групою; і

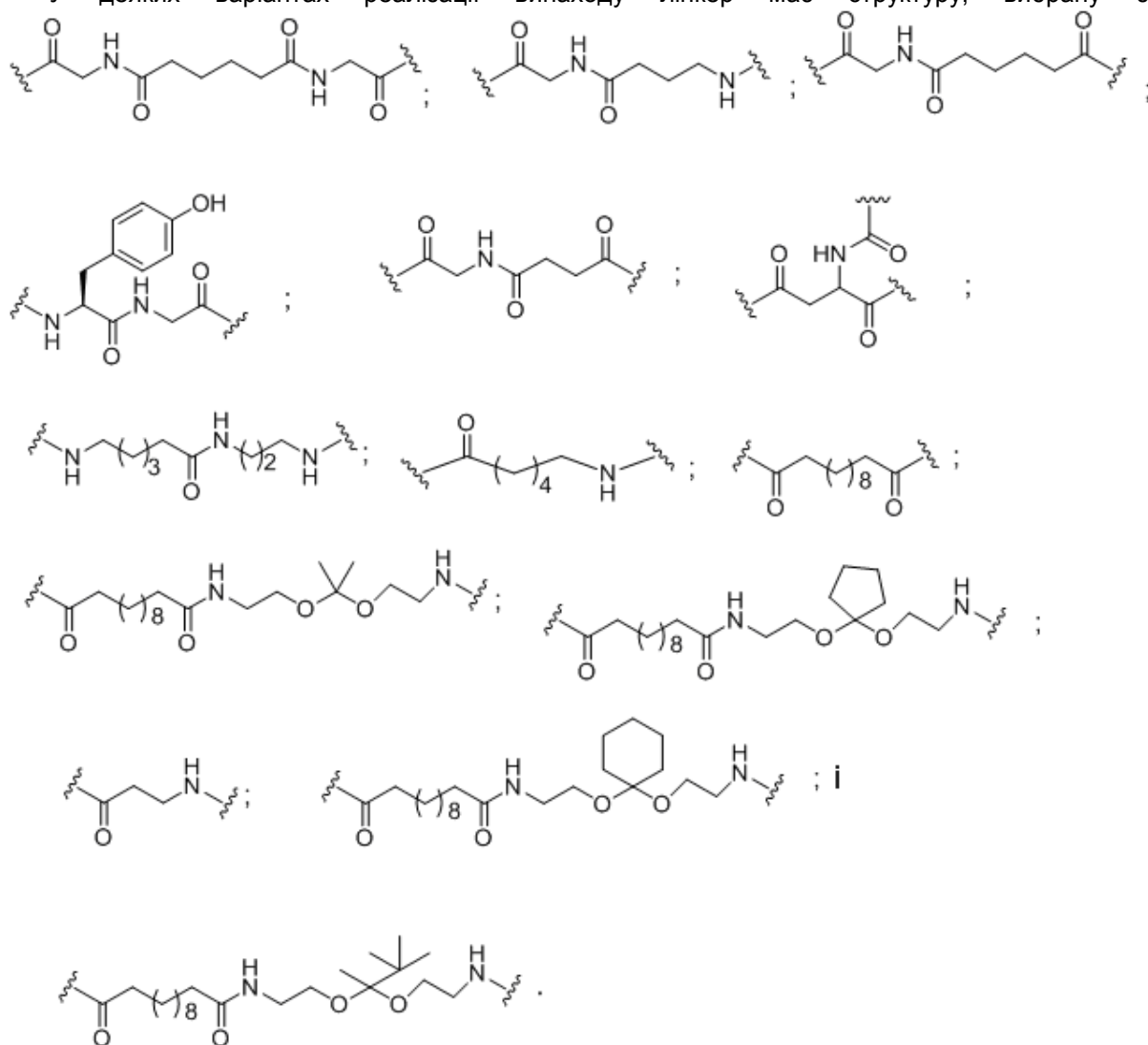
кожне n незалежно дорівнює від 1 до 20.

5 У деяких варіантах реалізації винаходу лінкер має структуру, вибрану з:

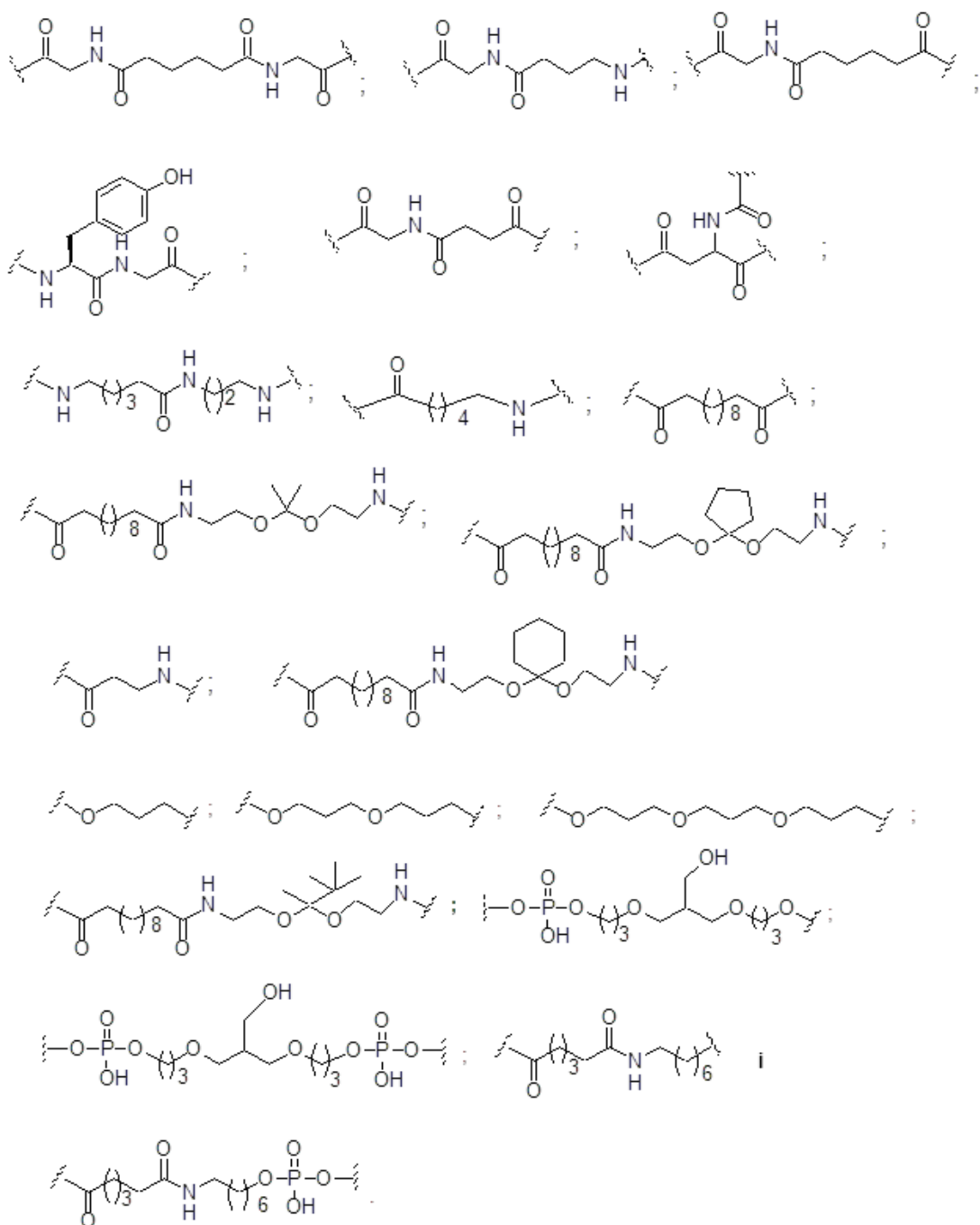




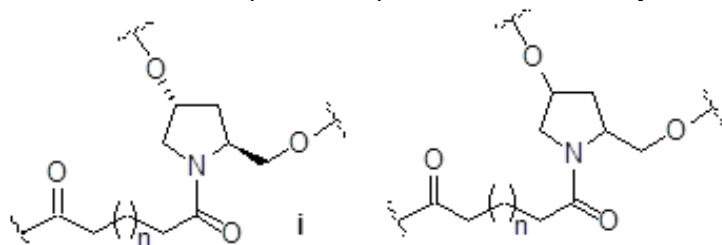
У деяких варіантах реалізації винаходу лінкер має структуру, вибрану з:



У деяких варіантах реалізації винаходу лінкер має структуру, вибрану з:

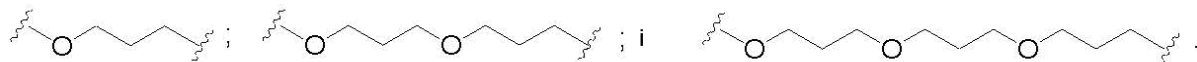


У деяких варіантах реалізації винаходу лінкер має структуру, вибрану з:

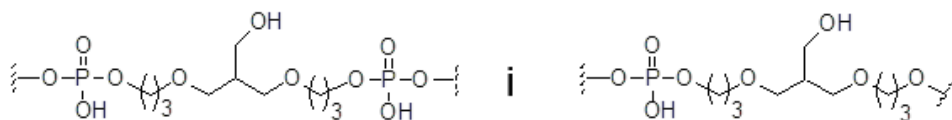


де n дорівнює від 1 до 20.

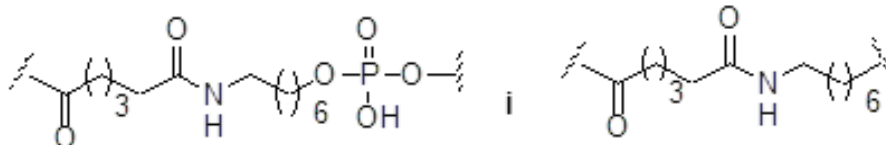
5 У деяких варіантах реалізації винаходу лінкер має структуру, вибрану з:



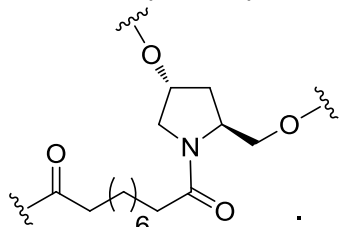
У деяких варіантах реалізації винаходу лінкер має структуру, вибрану з:



У деяких варіантах реалізації винаходу лінкер має структуру, вибрану з:

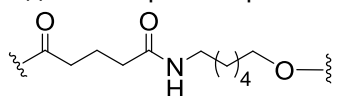


У деяких варіантах реалізації винаходу лінкер кон'югату має структуру:

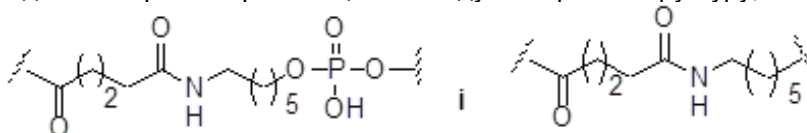


5

У деяких варіантах реалізації винаходу лінкер кон'югату має структуру:

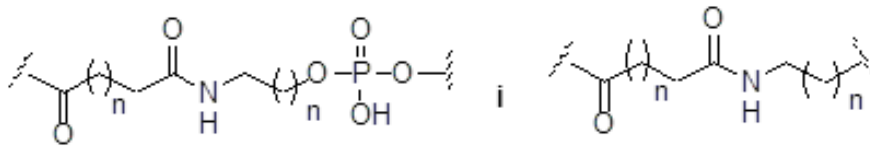


У деяких варіантах реалізації винаходу лінкер має структуру, вибрану з:



10

У деяких варіантах реалізації винаходу лінкер має структуру, вибрану з:



де кожне n незалежно дорівнює 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 або 7.

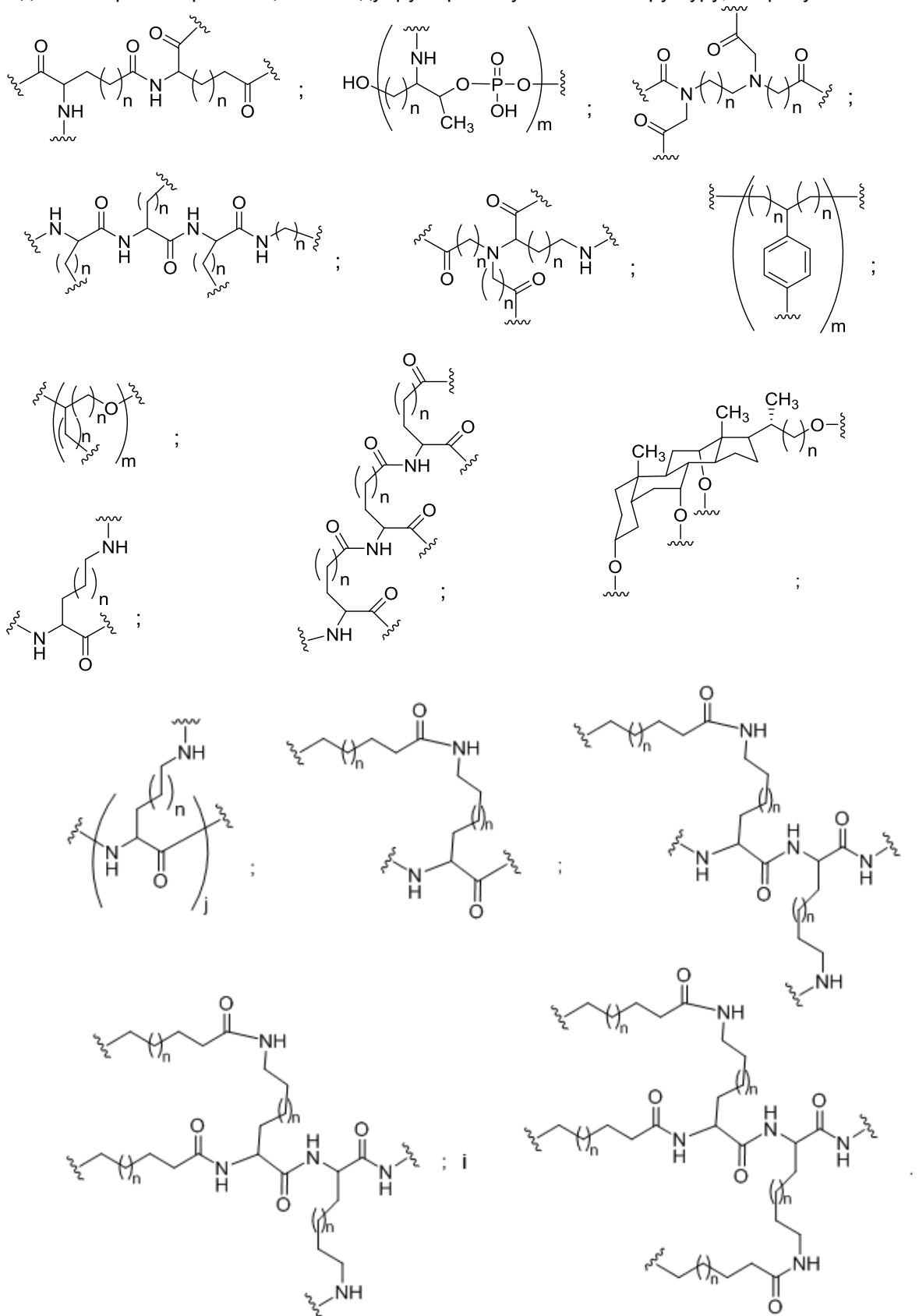
iv. Деякі фрагменти, що націлюють на клітину

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югувальні групи містять фрагменти, що націлюють на клітину. Деякі з таких фрагментів, що націлюють на клітину, збільшують клітинне захоплення антисмислових сполук. У деяких варіантах реалізації винаходу фрагменти, що націлюють на клітину, містять групу розгалуження, одну або декілька зв'язок і один або декілька лігандів. У деяких варіантах реалізації винаходу фрагменти, що націлюють на клітину, містять групу розгалуження, одну або декілька зв'язок, один або декілька лігандів і один або декілька розщеплюваних зв'язків.

1. Деякі групи розгалуження

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югувальні групи містять націлюючий фрагмент, що містить групу розгалуження і щонайменше два зв'язаних ліганди. У деяких варіантах реалізації винаходу група розгалуження приєднує лінкер кон'югату. У деяких варіантах реалізації винаходу група розгалуження приєднує розщеплюваний фрагмент. У деяких варіантах реалізації винаходу група розгалуження приєднує антисмисловий олігонуклеотид. У деяких варіантах реалізації винаходу група розгалуження ковалентно приєднана до лінкера і кожного із зв'язаних лігандів. У деяких варіантах реалізації винаходу група розгалуження містить розгалужену аліфатичну групу, яка містить групи, вибрані з алкільних, амідних, дисульфідних, поліетиленгліколевих, етерних, тіоетерних і гідроксиламіногруп. У деяких варіантах реалізації винаходу група розгалуження містить групи, вибрані з алкільних, амідних і етерних груп. У деяких варіантах реалізації винаходу група розгалуження містить моно- або поліциклічну кільцеву систему. У деяких варіантах реалізації винаходу група розгалуження містить один або декілька розщеплюваних зв'язків. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югувальна група не містить групи розгалуження.

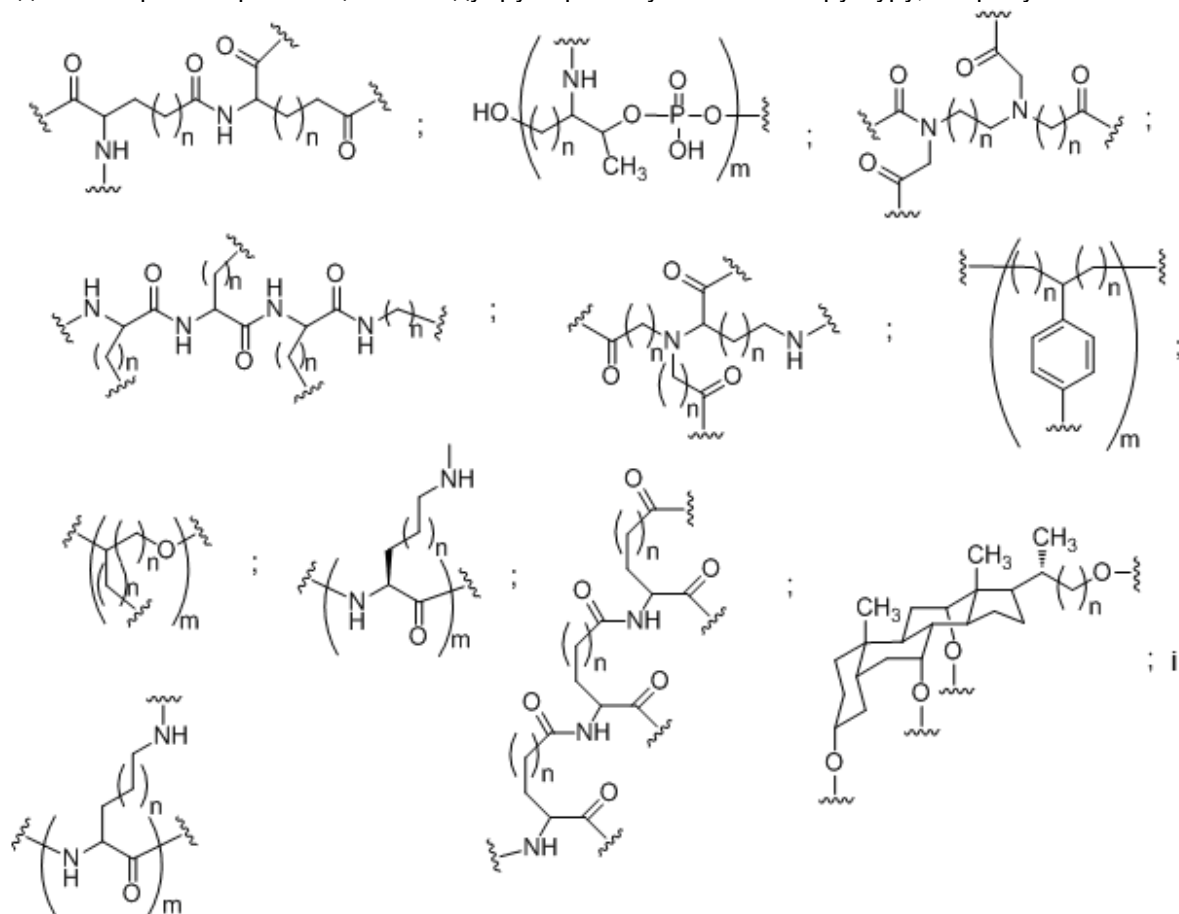
У деяких варіантах реалізації винаходу група розгалуження має структуру, вибрану з:



5 , де кожне n незалежно дорівнює від 1 до 20;
j дорівнює від 1 до 3; i

m дорівнює від 2 до 6.

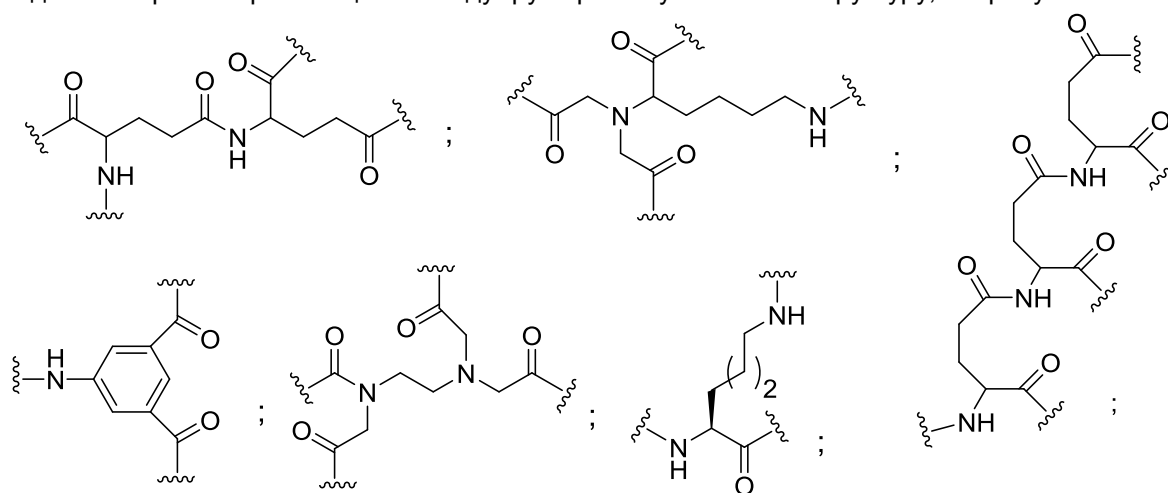
У деяких варіантах реалізації винаходу група розгалуження має структуру, вибрану з:

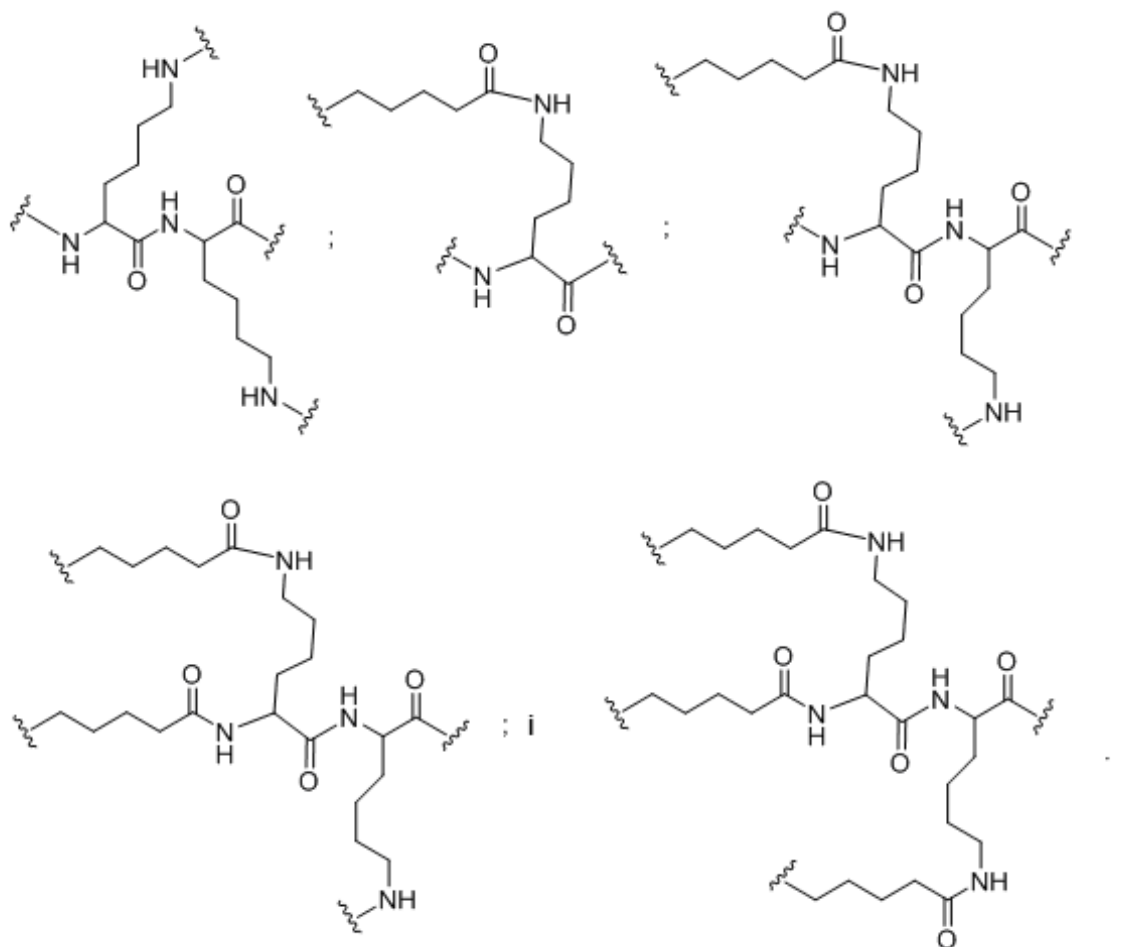


де кожне n незалежно дорівнює від 1 до 20; i

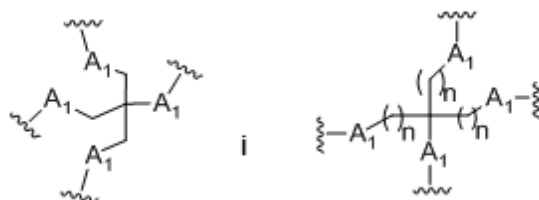
m дорівнює від 2 до 6.

У деяких варіантах реалізації винаходу група розгалуження має структуру, вибрану з:



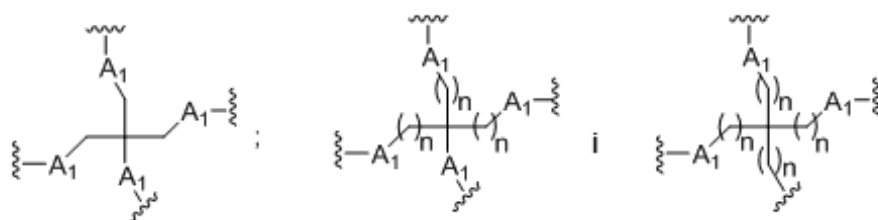


У деяких варіантах реалізації винаходу група розгалуження має структуру, вибрану з:



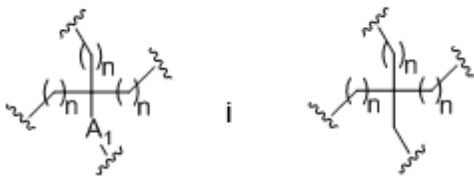
5 де кожен A_1 незалежно являє собою O, S, C=O або NH; і кожне n незалежно дорівнює від 1 до 20.

У деяких варіантах реалізації винаходу група розгалуження має структуру, вибрану з:



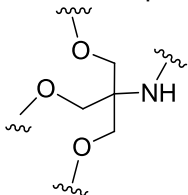
10 де кожен A_1 незалежно являє собою O, S, C=O або NH; і кожне n незалежно дорівнює від 1 до 20.

У деяких варіантах реалізації винаходу група розгалуження має структуру, вибрану з:



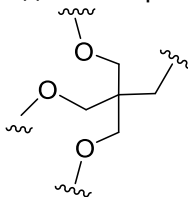
де A_1 являє собою O, S, C=O або NH; i кожне n незалежно дорівнює від 1 до 20.

У деяких варіантах реалізації винаходу група розгалуження має структуру, вибрану з:

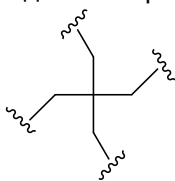


5

У деяких варіантах реалізації винаходу група розгалуження має структуру, вибрану з:



У деяких варіантах реалізації винаходу група розгалуження має структуру, вибрану з:



10

2. Деякі зв'язки

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югувальні групи містять одну або декілька зв'язок, ковалентно приєднаних до групи розгалуження. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югувальні групи містять одну або декілька зв'язок, ковалентно приєднаних до зв'язувальної групи. У деяких варіантах реалізації винаходу кожна зв'язка є лінійною аліфатичною групою, що містить одну або декілька груп, вибраних з алкільних, етерних, тіоетерних, дисульфідних, амідних і поліетиленгліколевих груп в будь-якій комбінації. У деяких варіантах реалізації винаходу кожна зв'язка є лінійною аліфатичною групою, що містить одну або декілька груп, вибраних з алкільних, заміщених алкільних, етерних, тіоетерних, дисульфідних, амідних, фосфодіестерних і поліетиленгліколевих груп в будь-якій комбінації. У деяких варіантах реалізації винаходу кожна зв'язка є лінійною аліфатичною групою, що містить одну або декілька груп, вибраних з алкільних, етерних і амідних груп в будь-якій комбінації. У деяких варіантах реалізації винаходу кожна зв'язка є лінійною аліфатичною групою, що містить одну або декілька груп, вибраних з алкільних, заміщених алкільних, фосфодіестерних, етерних і амідних груп в будь-якій комбінації. У деяких варіантах реалізації винаходу кожна зв'язка є лінійною аліфатичною групою, що містить одну або декілька груп, вибраних з алкілу і фосфодіестеру в будь-якій комбінації. У деяких варіантах реалізації винаходу кожна зв'язка містить щонайменше одну фосфорну зв'язувальну групу або нейтральну зв'язувальну групу.

15

20

25

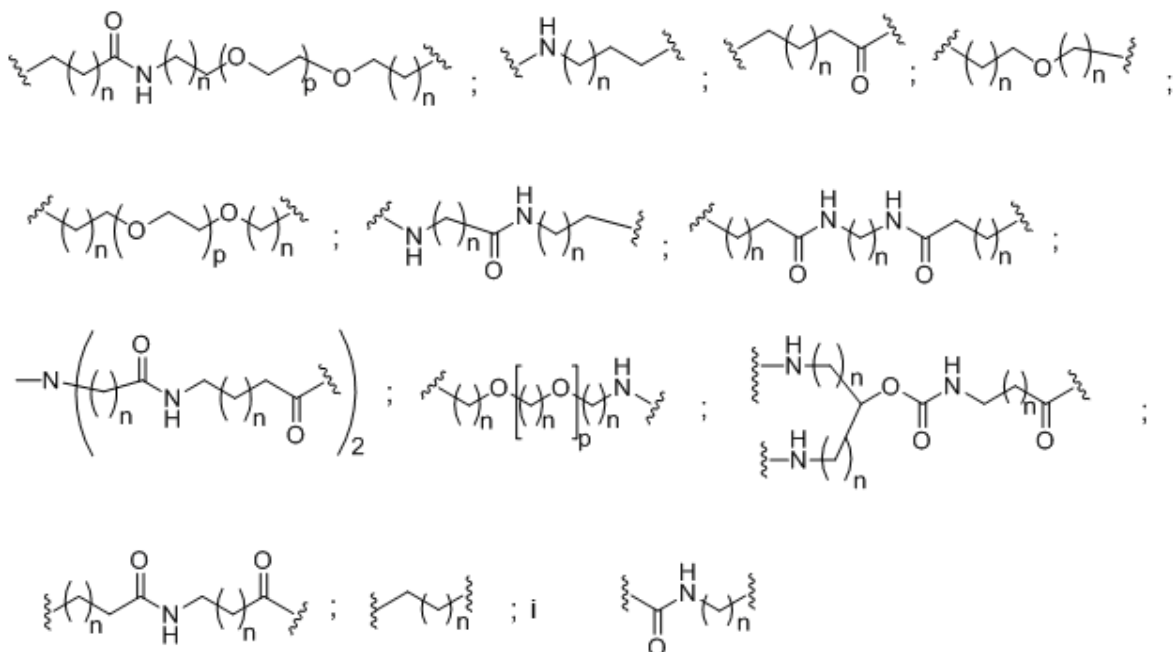
30

35

У деяких варіантах реалізації винаходу зв'язка містить один або декілька розщеплюваних зв'язків. У деяких варіантах реалізації винаходу зв'язка приєднана до групи розгалуження через амідну або етерну групу. У деяких варіантах реалізації винаходу зв'язка приєднана до групи розгалуження через фосфодіестерну групу. У деяких варіантах реалізації винаходу зв'язка приєднана до групи розгалуження через фосфорну зв'язувальну групу або через нейтральну зв'язувальну групу. У деяких варіантах реалізації винаходу зв'язка приєднана до групи розгалуження через етерну групу. У деяких варіантах реалізації винаходу зв'язка приєднана до ліганду або через амідну, або через етерну групу. У деяких варіантах реалізації винаходу зв'язка приєднана до ліганду через етерну групу. У деяких варіантах реалізації винаходу зв'язка приєднана до ліганду або через амідну, або через етерну групу. У деяких варіантах реалізації винаходу зв'язка приєднана до ліганду через етерну групу.

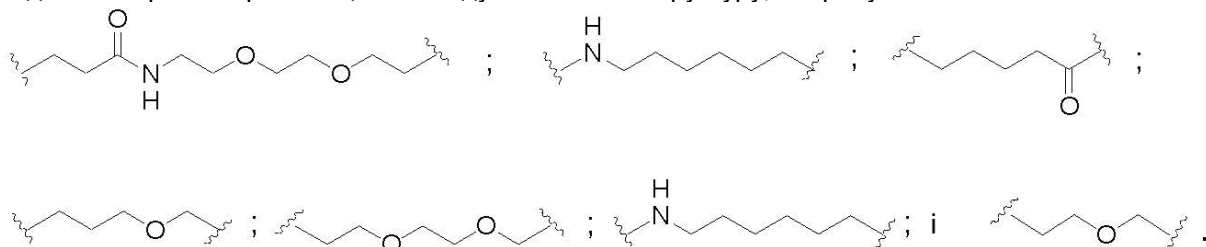
У деяких варіантах реалізації винаходу кожна зв'язка має довжину від близько 8 до близько 20 атомів в ланцюгу між лігандом і групою розгалуження. У деяких варіантах реалізації винаходу кожна зв'язка має довжину від близько 10 до близько 18 атомів в ланцюгу між лігандом і групою розгалуження. У деяких варіантах реалізації винаходу кожна зв'язка має довжину близько 13 атомів в ланцюгу.

У деяких варіантах реалізації винаходу зв'язка має структуру, вибрану з:

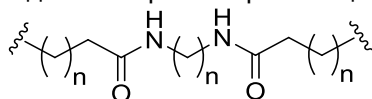


де кожне n незалежно дорівнює від 1 до 20; і кожне p дорівнює від 1 до близько 6.

У деяких варіантах реалізації винаходу зв'язка має структуру, вибрану з:

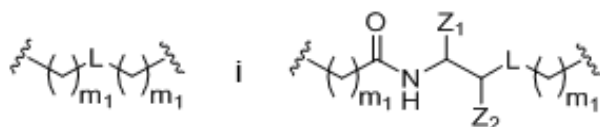


У деяких варіантах реалізації винаходу зв'язка має структуру, вибрану з:



де кожне n незалежно дорівнює від 1 до 20.

У деяких варіантах реалізації винаходу зв'язка має структуру, вибрану з:



де L являє собою або фосфорну зв'язувальну групу, або нейтральну зв'язувальну групу;

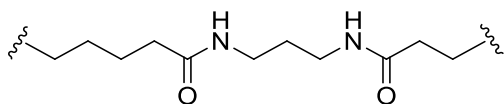
Z_1 являє собою $C(=O)O-R_2$.

Z₂ являє собою H, C₁-C₆ алкіл або заміщений C₁-C₆ алкіл;

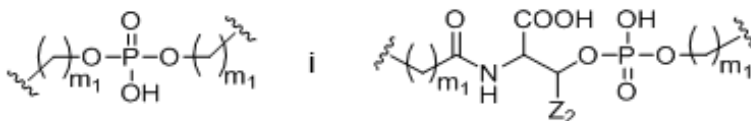
R_2 являє собою H, C_1 - C_6 алкіл або заміщений C_1 - C_6 алкіл; і

кожне m_1 незалежно дорівнює від 0 до 20, при цьому щонайменше одне m_1 більше 0 для кожної зв'язки.

У деяких варіантах реалізації винаходу зв'язка має структуру, вибрану з:



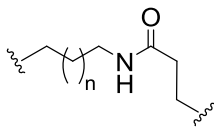
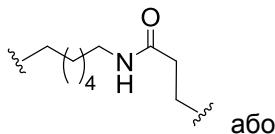
У деяких варіантах реалізації винаходу зв'язка має структуру, вибрану з:



де Z_2 являє собою H або CH_3 ; і

- 5 кожне m_1 незалежно дорівнює від 0 до 20, при цьому щонайменше одне m_1 більше 0 для кожної зв'язки.

У деяких варіантах реалізації винаходу зв'язка має структуру, вибрану з:



або 7. ; де кожне n незалежно дорівнює 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6

- 10 У деяких варіантах реалізації винаходу зв'язка містить фосфорну зв'язувальну групу. У деяких варіантах реалізації винаходу зв'язка не містить жодного амідного зв'язку. У деяких варіантах реалізації винаходу зв'язка містить фосфорну зв'язувальну групу і не містить жодного амідного зв'язку.

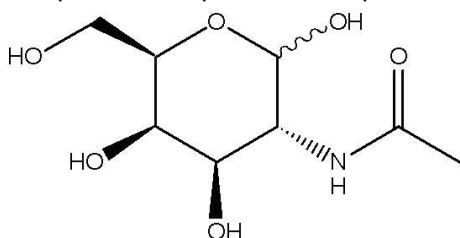
3. Деякі ліганди

- 15 У деяких варіантах реалізації даного опису наведені ліганди, при цьому кожен ліганд ковалентно приєднаний до зв'язки. У деяких варіантах реалізації винаходу кожен ліганд вибраний таким чином, щоб він мав афінність щонайменше до одного типу рецептора на клітині-мішені. У деяких варіантах реалізації винаходу ліганди вибрані таким чином, щоб вони мали афінність щонайменше до одного типу рецептора на поверхні клітини печінки ссавця. У деяких варіантах реалізації винаходу ліганди вибрані таким чином, щоб вони мали афінність до печінкового асіалоглікопротеїнового рецептора (ASGP-R). У деяких варіантах реалізації винаходу кожен ліганд є вуглеводом. У деяких варіантах реалізації винаходу кожен ліганд незалежно вибраний з галактози, N-ацетилгалактозаміну, манози, глюкози, глюкозаміну і фукози. У деяких варіантах реалізації винаходу кожен ліганд є N-ацетилгалактозаміном (GalNAc). У деяких варіантах реалізації винаходу націлюючий фрагмент містить 2-6 лігандів. У деяких варіантах реалізації винаходу націлюючий фрагмент містить 3 ліганди. У деяких варіантах реалізації винаходу націлюючий фрагмент містить 3 N-ацетилгалактозамінових ліганди.

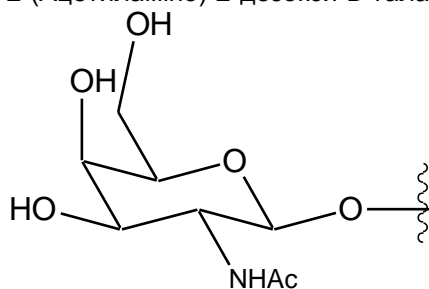
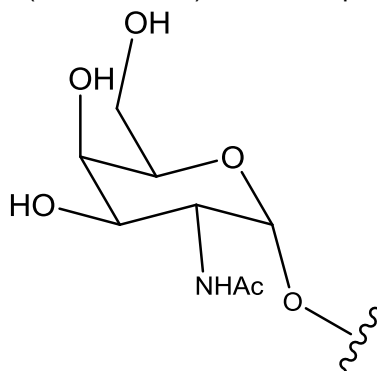
- У деяких варіантах реалізації винаходу ліганд є вуглеводом, похідним вуглеводу, модифікованим вуглеводом, полівалентним вуглеводним кластером, полісахаридом, модифікованим полісахаридом або похідним полісахариду. У деяких варіантах реалізації винаходу ліганд є аміноцукром або тіоцукром. Наприклад, аміноцукри можуть бути вибрані з будь-якої кількості сполук, відомих у даній галузі техніки, наприклад, глюкозаміну, сілової кислоти, α -D-галактозаміну, N-ацетилгалактозаміну, 2-ацетамідо-2-дезоксид-галактопіранози (GalNAc), 2-аміно-3-O-[(R)-1-карбоксіетил]-2-дезоксид- β -D-глюкопіранози (β -мурамової кислоти), 2-дезоксид-2-метиламіно-L-глюкопіранози, 4,6-дидезокси-4-формаїдо-2,3-ди-O-метил-D-манопіранози, 2-дезоксид-2-сульфоаміно-D-глюкопіранози і N-сульфо-D-глюкозаміну і N-гліколоїл- α -нейрамінової кислоти. Наприклад, тіоцукри можуть бути вибрані з групи, що складається з 5-тіо- β -D-глюкопіранози, метил-2,3,4-три-O-ацетил-1-тіо-6-O-третил- α -D-глюкопіранозиду, 4-тіо- β -D-галактопіранози і етил-3,4,6,7-тетра-O-ацетил-2-дезоксид-1,5-дитіо- α -D-глюко-гептопіранозиду.

- У деяких варіантах реалізації винаходу "GalNAc" або "Gal-NAc" стосується 2-(ацетиламіно)-2-дезоксид-D-галактопіранози, звичайно згадуваної в літературі як N-ацетилгалактозамін. У деяких варіантах реалізації винаходу "N-ацетилгалактозамін" стосується 2-(ацетиламіно)-2-дезоксид-D-галактопіранози. У деяких варіантах реалізації винаходу "GalNAc" або "Gal-NAc" стосується 2-(ацетиламіно)-2-дезоксид-D-галактопіранози. У деяких варіантах реалізації винаходу "GalNAc" або "Gal-NAc" стосується 2-(ацетиламіно)-2-дезоксид-D-галактопіранози, яка включає і β -форму: 2-(ацетиламіно)-2-дезоксид- β -D-галактопіранозу, і α -форму: 2-(ацетиламіно)-2-дезоксид-D-галактопіранозу. У деяких варіантах реалізації винаходу обидві форми, β -форма: 2-(ацетиламіно)-2-дезоксид- β -D-галактопіраноза, і α -форма: 2-(ацетиламіно)-2-дезоксид-D-

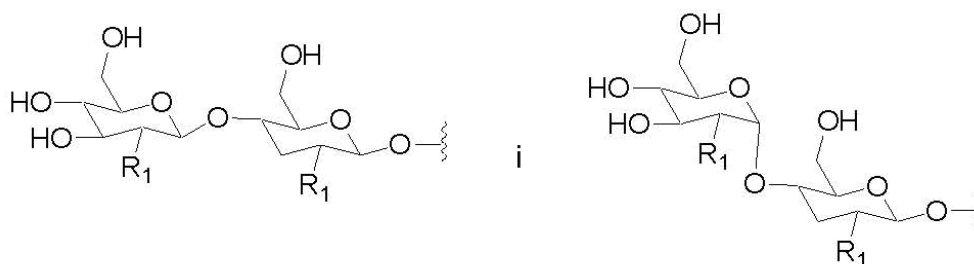
- 5 галактопіраноза, можуть бути застосовані взаємозамінним чином. Відповідно, в структурах, у яких зображена одна форма, мається на увазі, що ці структури включають також іншу форму. Наприклад, якщо показана структура для α -форми: 2-(ацетиламіно)-2-дезоксид-галактопіранози, то мається на увазі, що ця структура включає також іншу форму. У деяких переважних варіантах реалізації винаходу β -форма 2-(ацетиламіно)-2-дезоксид-галактопіранози є переважним варіантом реалізації винаходу.



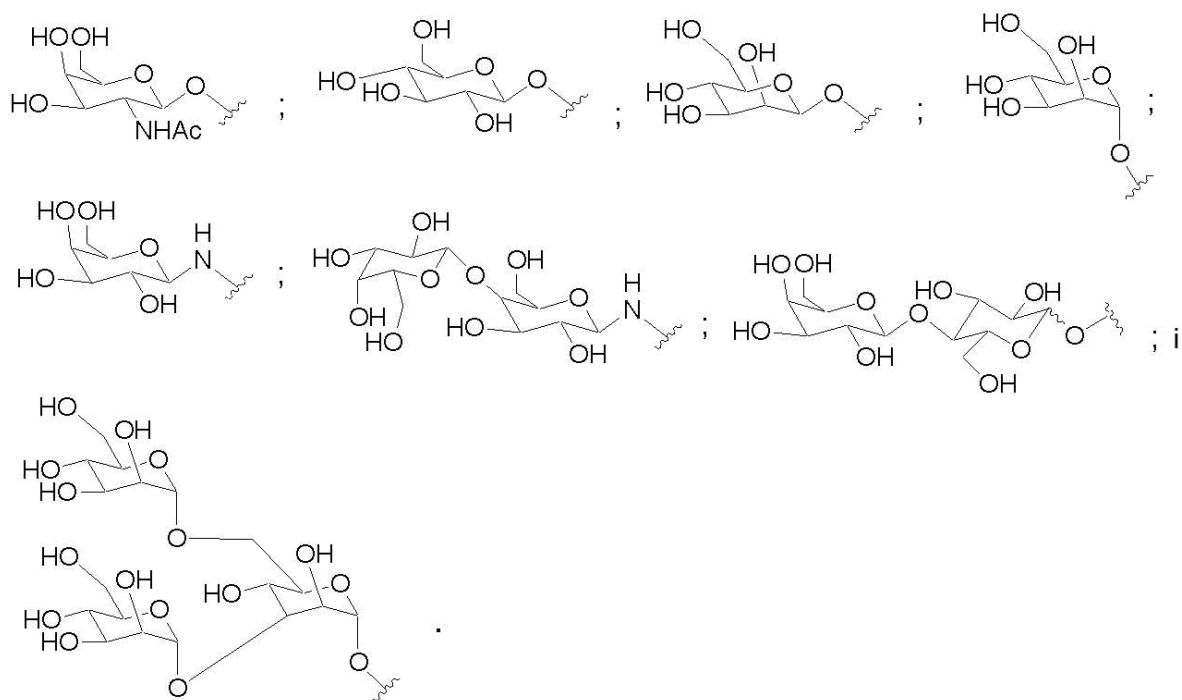
2-(Ацетиламіно)-2-дезоксид-D-галактопіраноза

10 2-(Ацетиламіно)-2-дезоксид- β -D-галактопіраноза2-(Ацетиламіно)-2-дезоксид- α -D-галактопіраноза

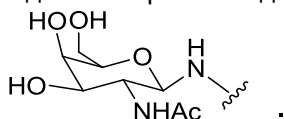
У деяких варіантах один або декілька лігандів мають структуру, вибрану з:

15 де кожен R_1 вибраний з OH і NHCOOH .

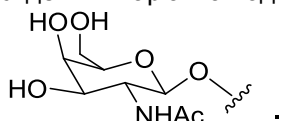
У деяких варіантах один або декілька лігандів мають структуру, вибрану з



У деяких варіантах один або декілька лігандів мають структуру, вибрану з:



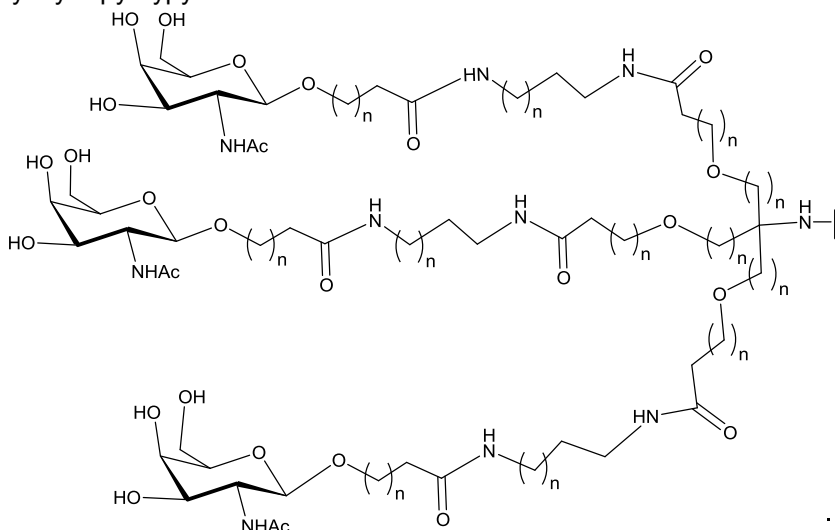
У деяких варіантах один або декілька лігандів мають структуру, вибрану з:



5

i. Деякі кон'югати

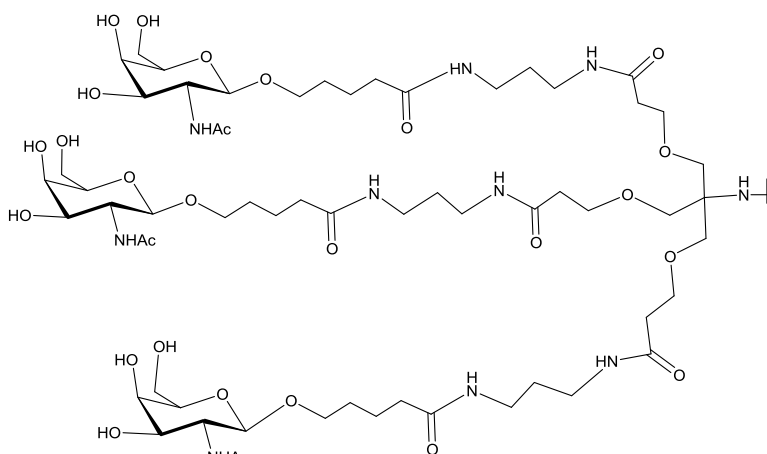
У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югувальні групи містять структурні особливості, представлені вище. У деяких таких варіантах реалізації винаходу кон'югувальні групи мають наступну структуру:



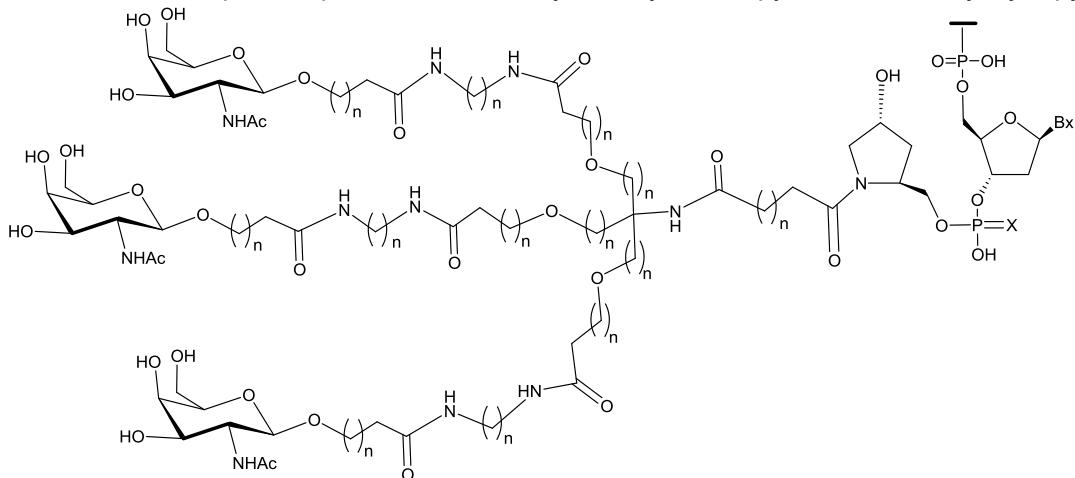
10

де кожне n незалежно дорівнює від 1 до 20.

У деяких таких варіантах реалізації винаходу кон'югувальні групи мають наступну структуру:



У деяких таких варіантах реалізації винаходу кон'югувальні групи мають наступну структуру:



де кожне n незалежно дорівнює від 1 до 20;

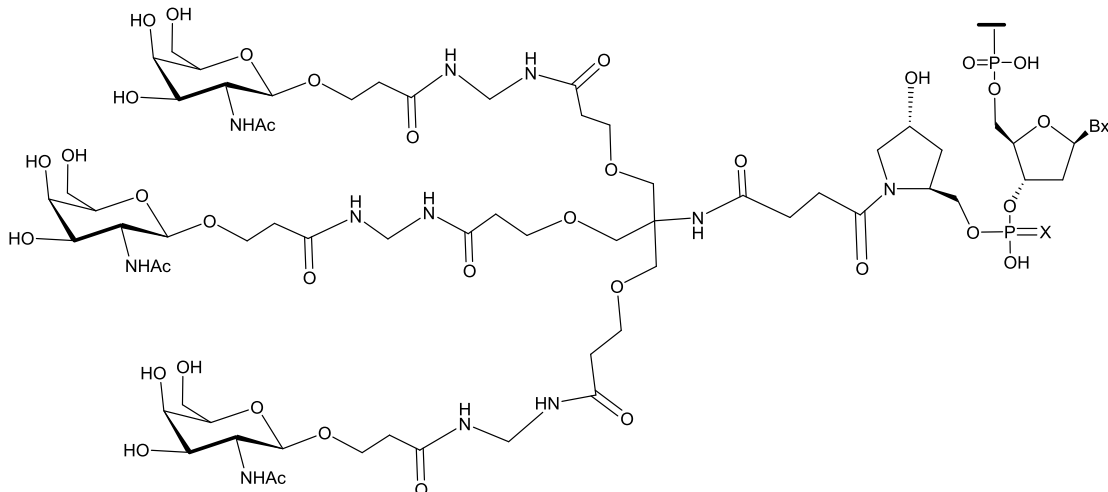
Z являє собою H або зв'язану тверду основу;

Q являє собою антисмислову сполуку;

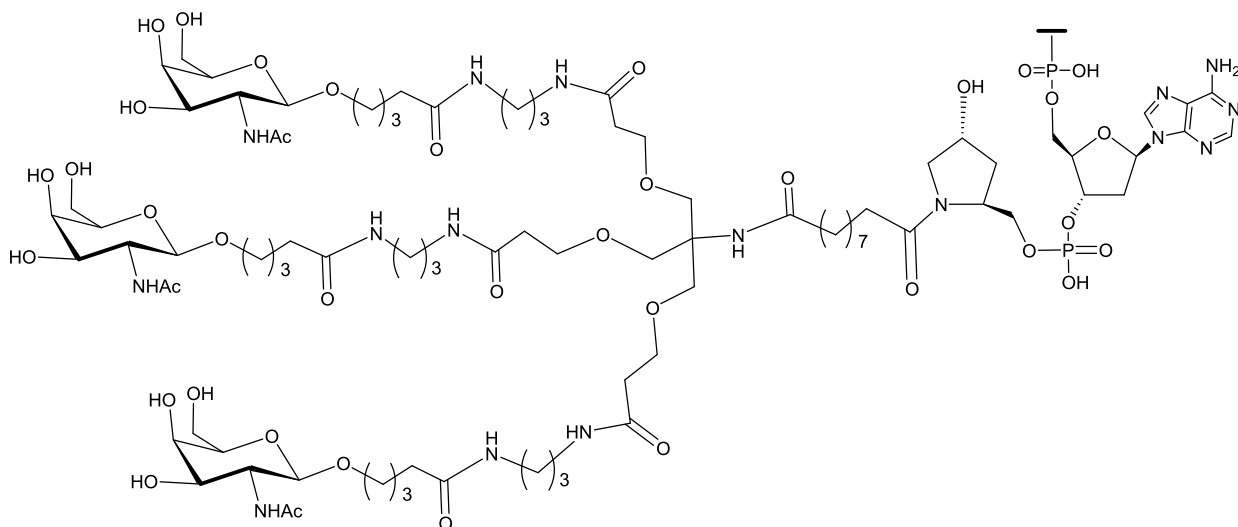
X являє собою O або S ; i

Bx являє собою гетероциклічний основний фрагмент.

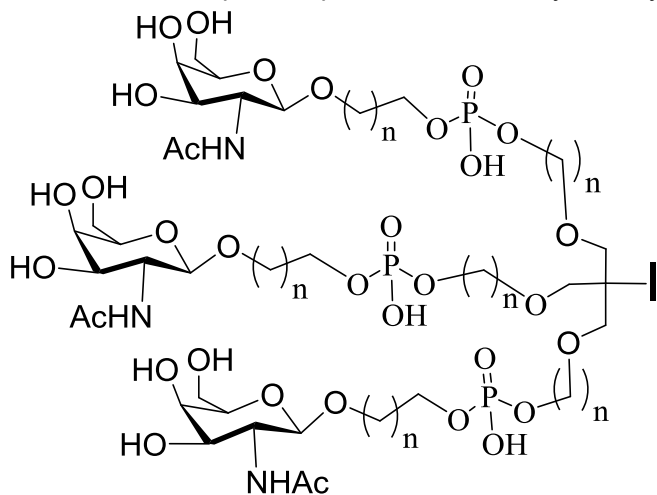
У деяких таких варіантах реалізації винаходу кон'югувальні групи мають наступну структуру:



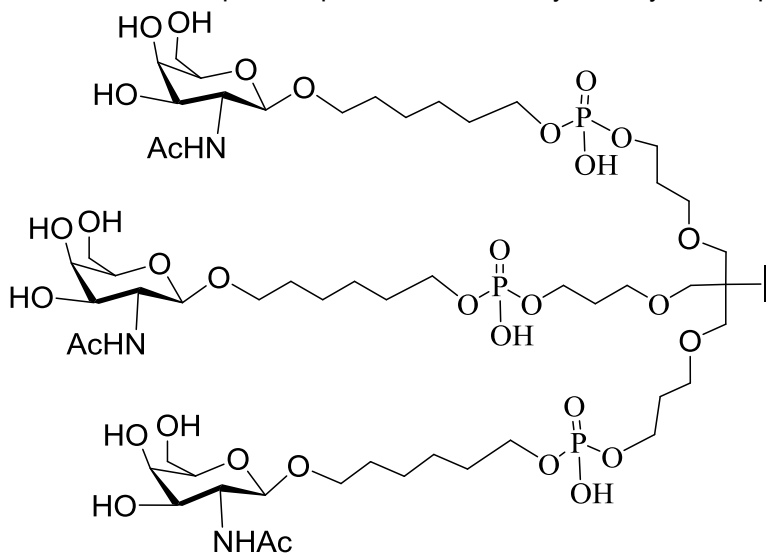
У деяких таких варіантах реалізації винаходу кон'югувальні групи мають наступну структуру:



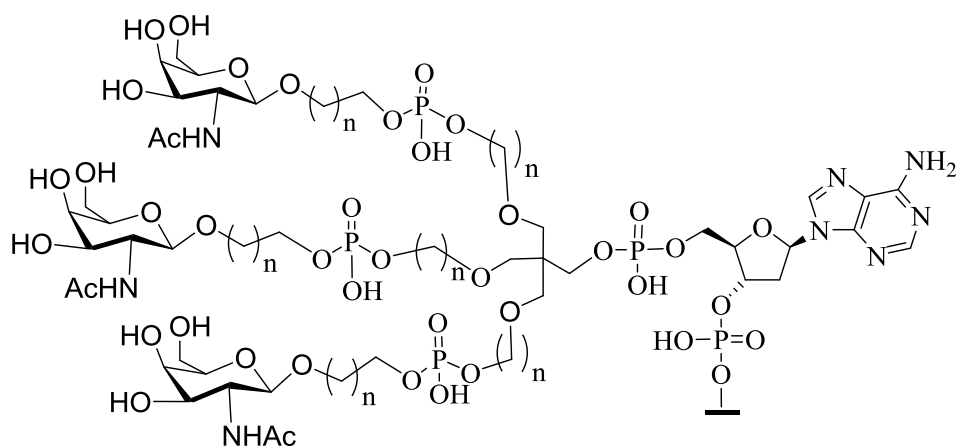
У деяких таких варіантах реалізації винаходу кон'югвальні групи мають наступну структуру:



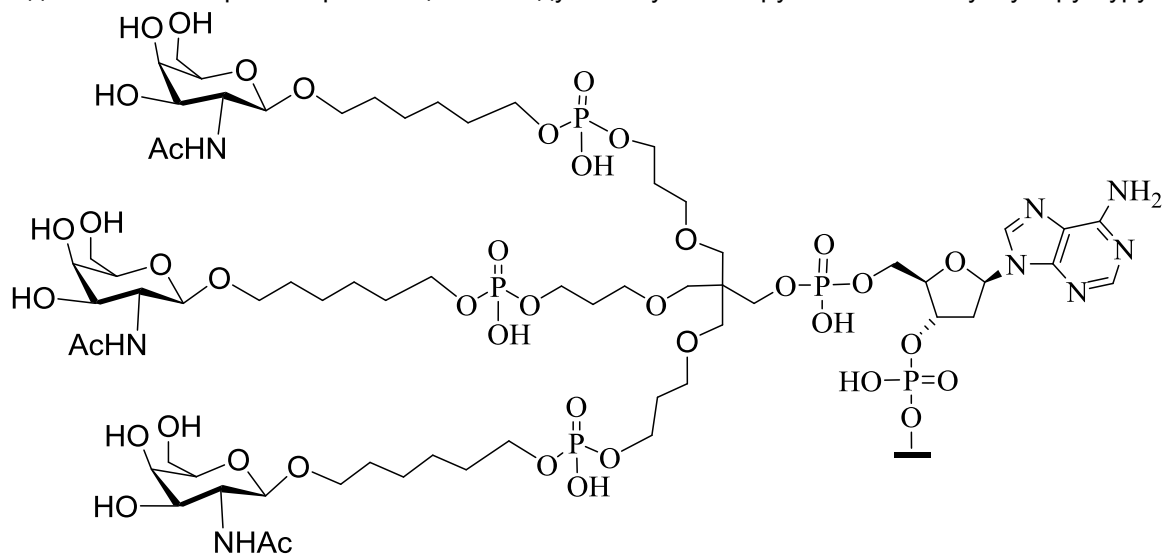
5 У деяких таких варіантах реалізації винаходу кон'югвальні групи мають наступну структуру:



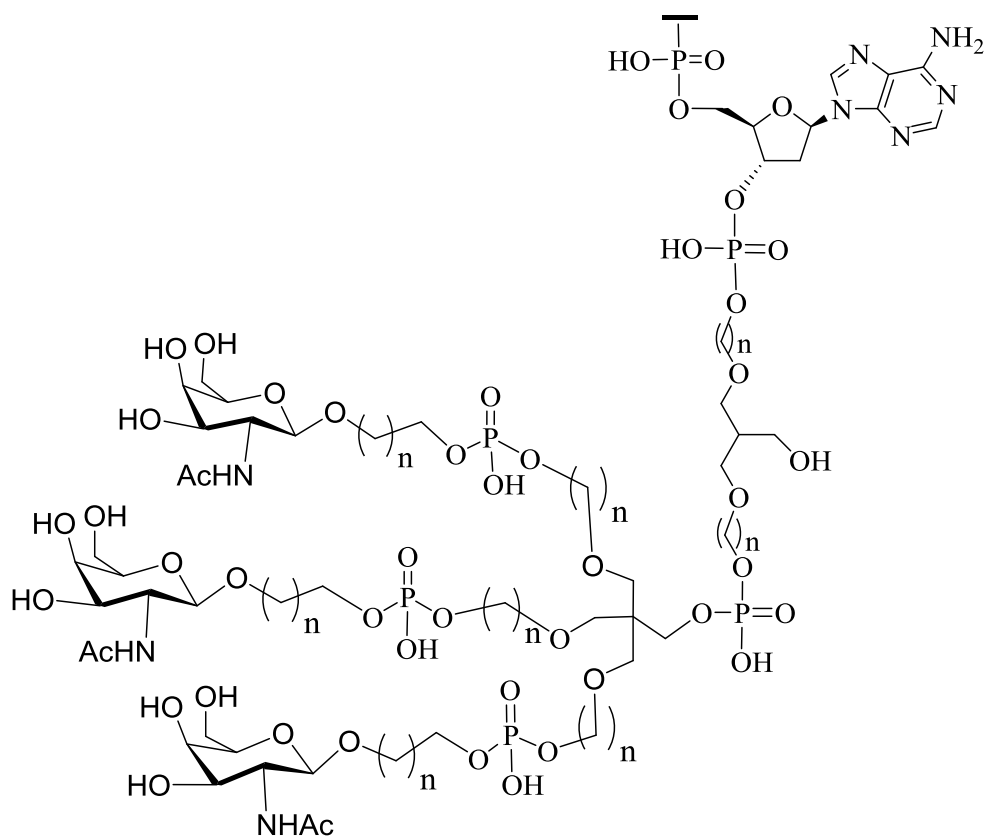
У деяких таких варіантах реалізації винаходу кон'югвальні групи мають наступну структуру:



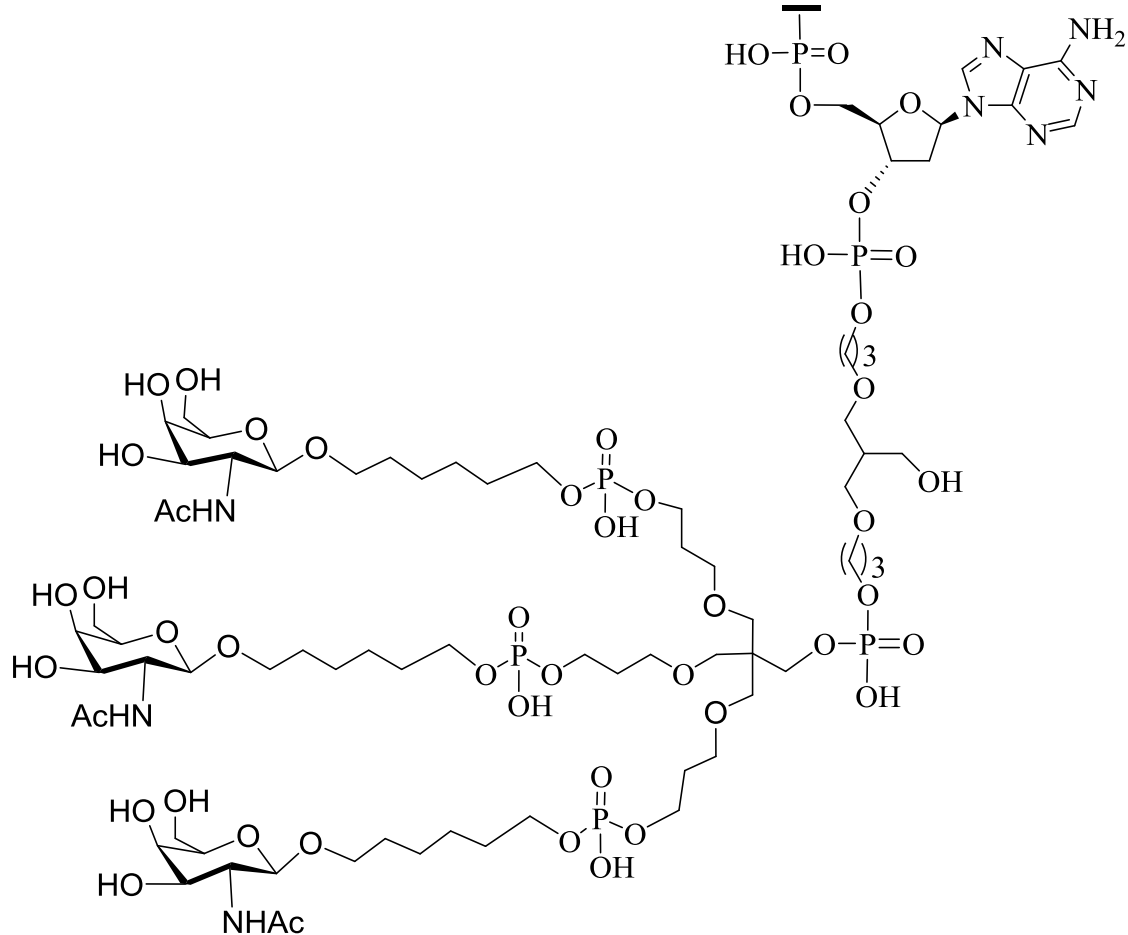
У деяких таких варіантах реалізації винаходу кон'югувальні групи мають наступну структуру:



5 У деяких таких варіантах реалізації винаходу кон'югувальні групи мають наступну структуру:

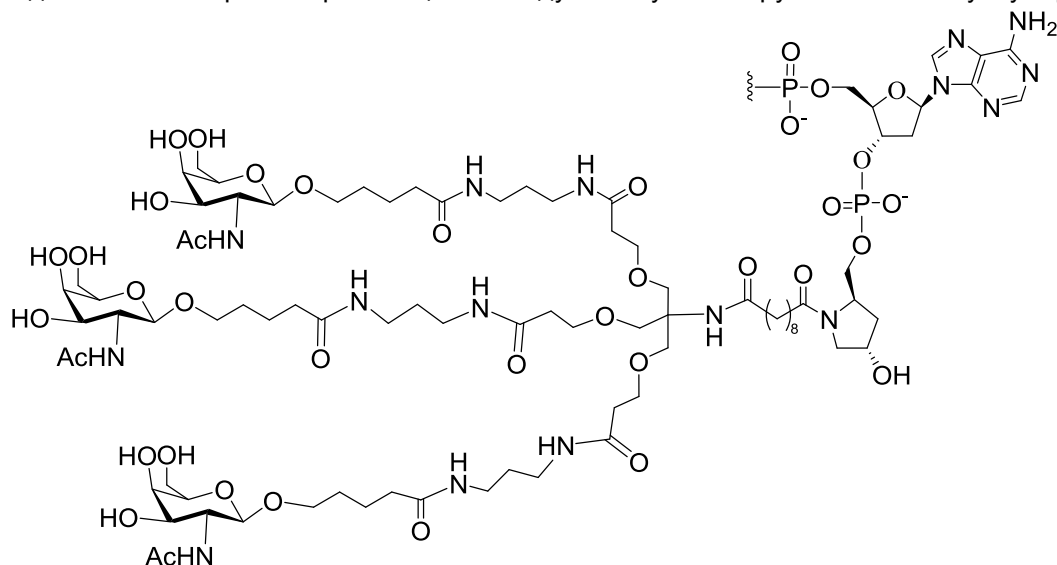


У деяких таких варіантах реалізації винаходу кон'югувальні групи мають наступну структуру:

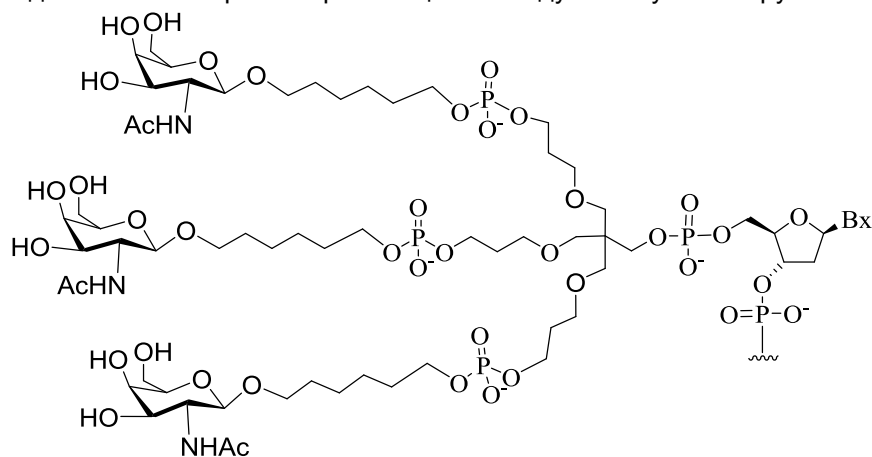


У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югати не містять піролідину.

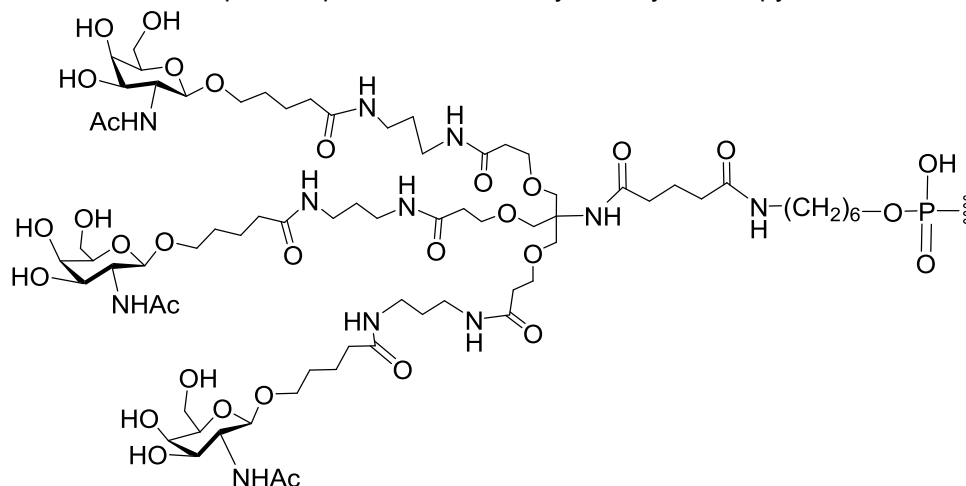
У деяких таких варіантах реалізації винаходу кон'югувальні групи мають наступну структуру:



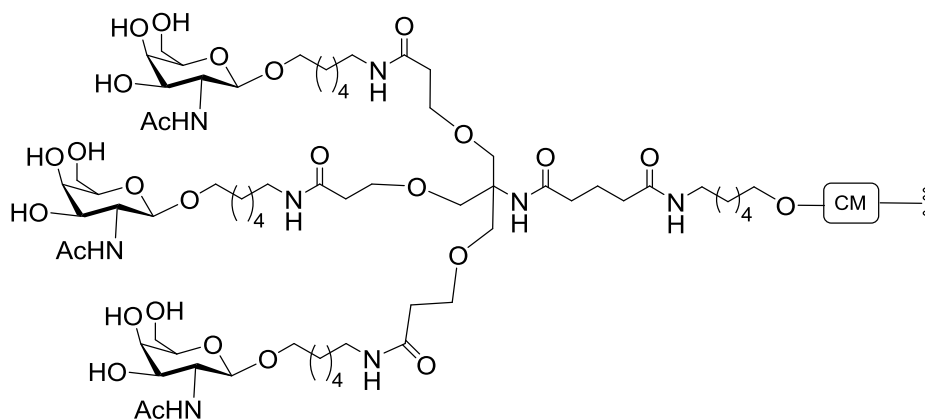
У деяких таких варіантах реалізації винаходу кон'югувальні групи мають наступну структуру:



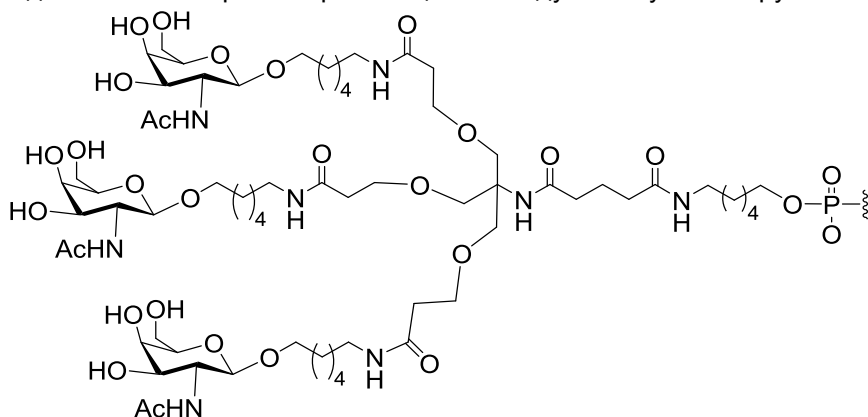
5 У деяких таких варіантах реалізації винаходу кон'югувальні групи мають наступну структуру:



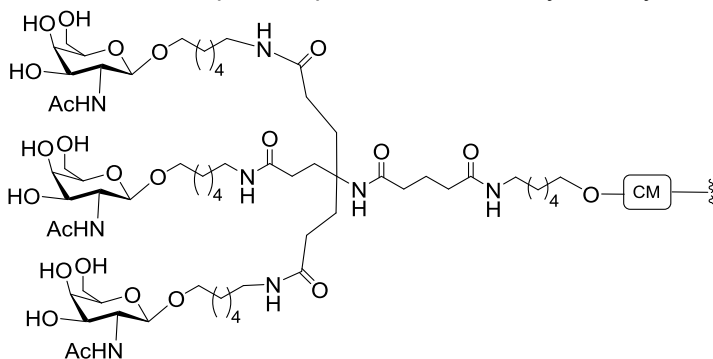
У деяких таких варіантах реалізації винаходу кон'югувальні групи мають наступну структуру:



У деяких таких варіантах реалізації винаходу кон'югвальні групи мають наступну структуру:

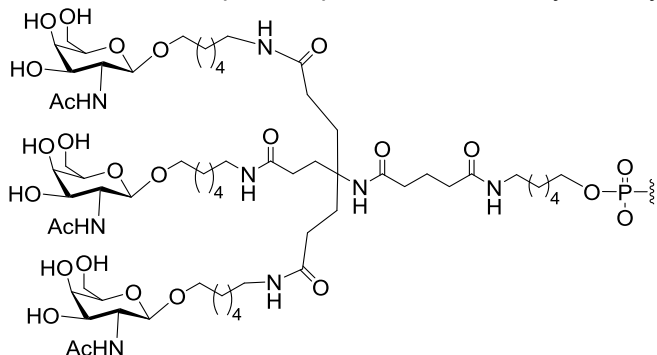


У деяких таких варіантах реалізації винаходу кон'югвальні групи мають наступну структуру:

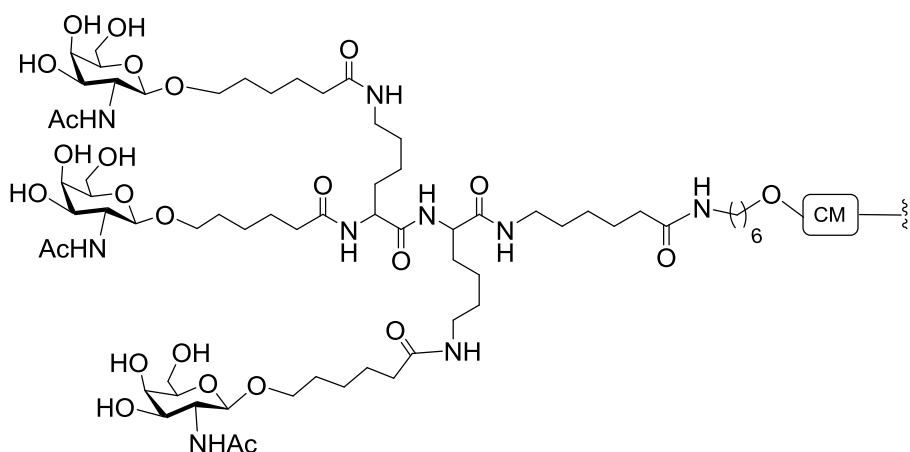


5

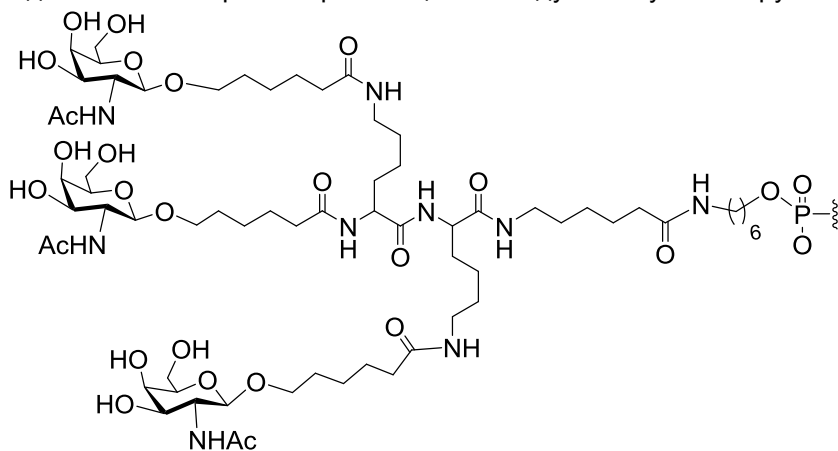
У деяких таких варіантах реалізації винаходу кон'югвальні групи мають наступну структуру:



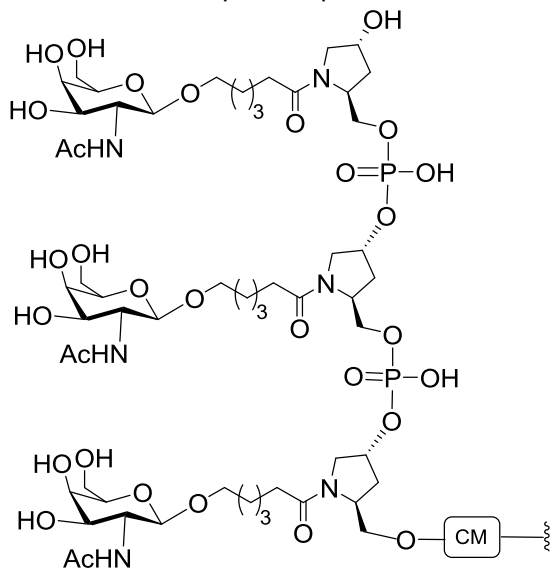
У деяких таких варіантах реалізації винаходу кон'югвальні групи мають наступну структуру:



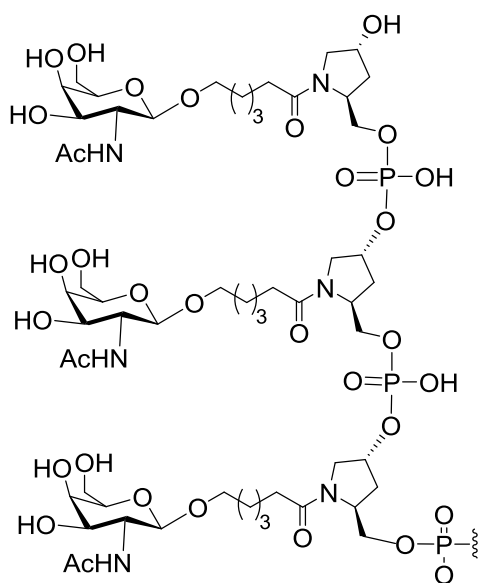
У деяких таких варіантах реалізації винаходу кон'югувальні групи мають наступну структуру:



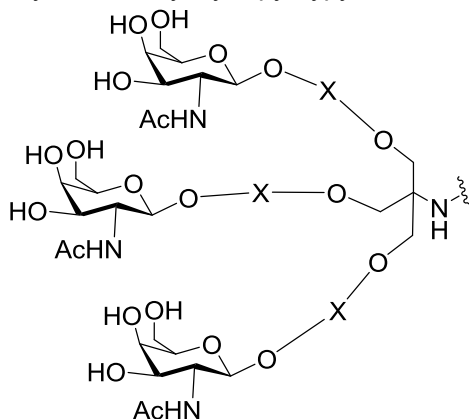
У деяких таких варіантах реалізації винаходу кон'югувальні групи мають наступну структуру:



У деяких таких варіантах реалізації винаходу кон'югувальні групи мають наступну структуру:

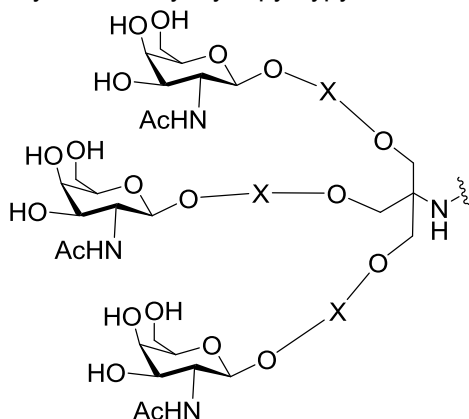


У деяких варіантах реалізації винаходу фрагмент кон'югуювальної групи, що націлює на клітину, має наступну структуру:



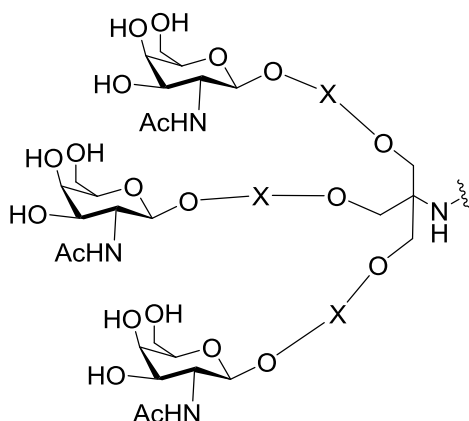
5 де X являє собою заміщену або незаміщену зв'язку із шести-одинадцяти послідовно зв'язаних атомів.

У деяких варіантах реалізації винаходу фрагмент кон'югуювальної групи, що націлює на клітину, має наступну структуру:



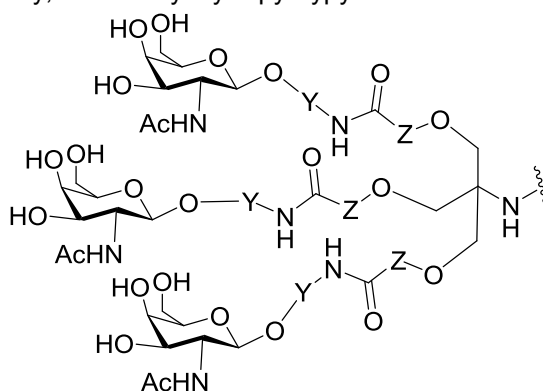
10 де X являє собою заміщену або незаміщену зв'язку із десяти послідовно зв'язаних атомів.

У деяких варіантах реалізації винаходу фрагмент кон'югуювальної групи, що націлює на клітину, має наступну структуру:



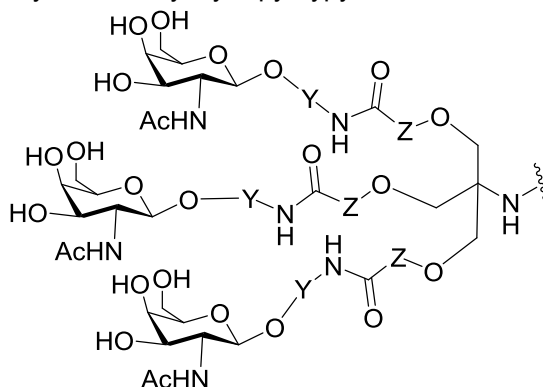
де X являє собою заміщену або незаміщену зв'язку з чотирьох-одинадцяти послідовно зв'язаних атомів, причому вказана зв'язка містить тільки один амідний зв'язок.

- У деяких варіантах реалізації винаходу фрагмент кон'югувальної групи, що націлює на клітину, має наступну структуру:



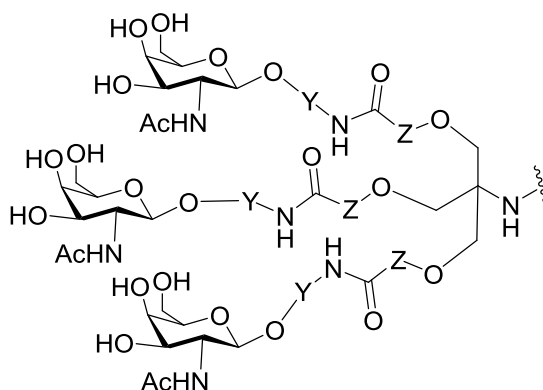
де Y і Z незалежно вибрані з C_1 - C_{12} заміщеної або незаміщеної алкільної, алкенільної або алкінільної групи або групи, що містить етер, кетон, амід, естер, карбамат, амін, піперидин, фосфат, фосфодіестер, тіофосфат, триазол, піролідін, дисульфід або тіоестер.

- У деяких таких варіантах реалізації винаходу фрагмент кон'югувальної групи, що націлює на клітину, має наступну структуру:



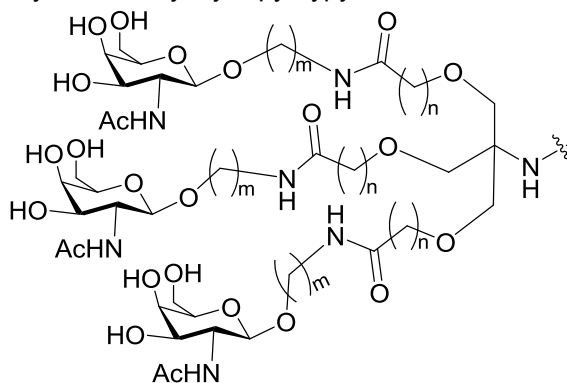
де Y і Z незалежно вибрані з C_1 - C_{12} заміщеної або незаміщеної алкільної групи або групи, що містить рівно один естер або рівно два естери, амід, амін, піперидин, фосфат, фосфодіестер або тіофосфат.

У деяких таких варіантах реалізації винаходу фрагмент кон'югувальної групи, що націлює на клітину, має наступну структуру:



де Y і Z незалежно вибрані з C_1 - C_{12} заміщеної або незаміщеної алкільної групи.

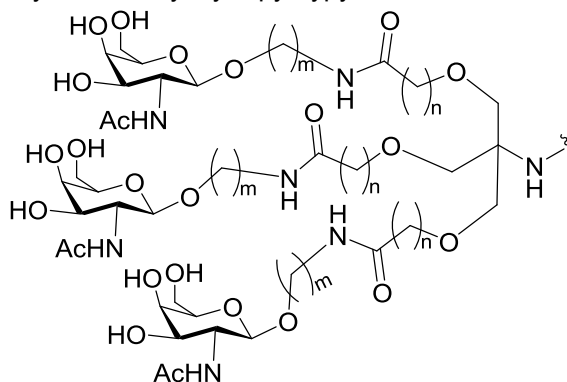
У деяких таких варіантах реалізації винаходу фрагмент кон'югувальної групи, що націлює на клітину, має наступну структуру:



5

де m і n незалежно вибрані з 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 і 12.

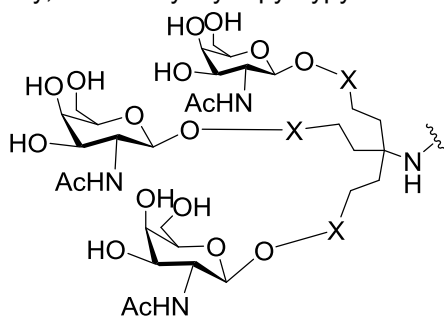
У деяких таких варіантах реалізації винаходу фрагмент кон'югувальної групи, що націлює на клітину, має наступну структуру:



10

де m дорівнює 4, 5, 6, 7 або 8, і n дорівнює 1, 2, 3 або 4.

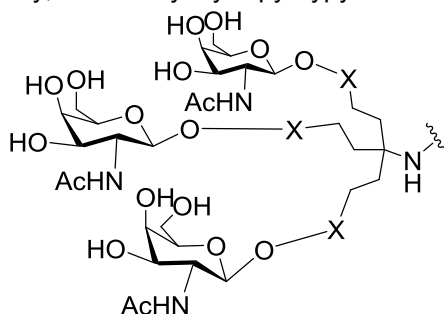
У деяких варіантах реалізації винаходу фрагмент кон'югувальної групи, що націлює на клітину, має наступну структуру:



15

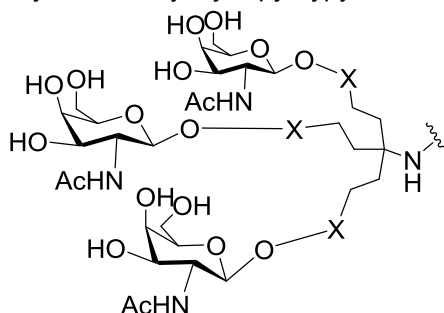
де X являє собою заміщену або незаміщену зв'язку з чотирьох-тринадцяти послідовно зв'язаних атомів, і при цьому X не містить естерної групи.

У деяких варіантах реалізації винаходу фрагмент кон'югувальної групи, що націлює на клітину, має наступну структуру:



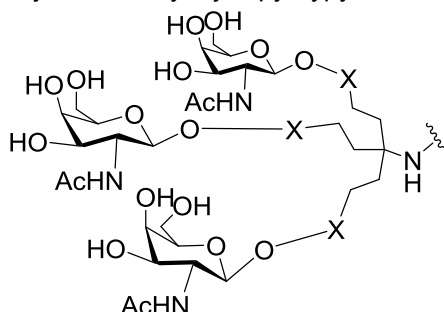
- 5 де X являє собою заміщену або незаміщену зв'язку із восьми послідовно зв'язаних атомів, причому X не містить естерної групи.

У деяких варіантах реалізації винаходу фрагмент кон'югувальної групи, що націлює на клітину, має наступну структуру:



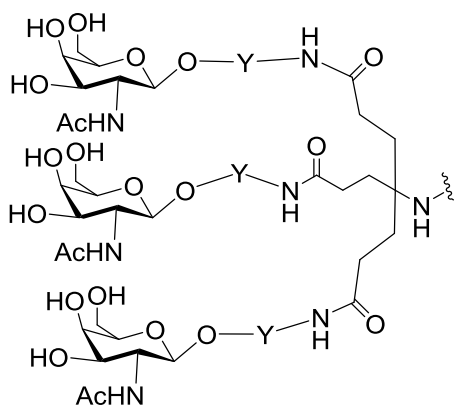
- 10 де X являє собою заміщену або незаміщену зв'язку з чотирьох-тринадцяти послідовно зв'язаних атомів, і при цьому вказана зв'язка містить тільки один амідний зв'язок, а X не містить естерної групи.

У деяких варіантах реалізації винаходу фрагмент кон'югувальної групи, що націлює на клітину, має наступну структуру:



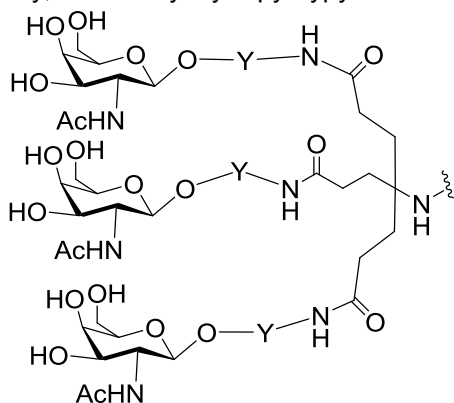
- 15 де X являє собою заміщену або незаміщену зв'язку з чотирьох-тринадцяти послідовно зв'язаних атомів, і при цьому вказана зв'язка складається з амідного зв'язку і заміщеної або незаміщеної C₂-C₁₁ алкільної групи.

У деяких варіантах реалізації винаходу фрагмент кон'югувальної групи, що націлює на клітину, має наступну структуру:



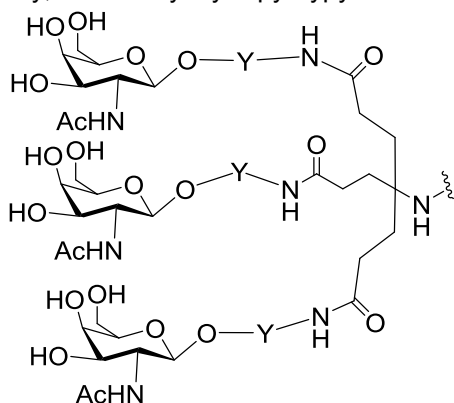
де Y вибраний з C_1-C_{12} заміщеної або незаміщеної алкільної, алкенільної або алкінільної групи або групи, що містить етер, кетон, амід, естер, карбамат, амін, піперидин, фосфат, фосфодіестер, тіофосфат, триазол, піролідин, дисульфід або тіоестер.

- 5 У деяких таких варіантах реалізації винаходу фрагмент кон'югуювальної групи, що націлює на клітину, має наступну структуру:



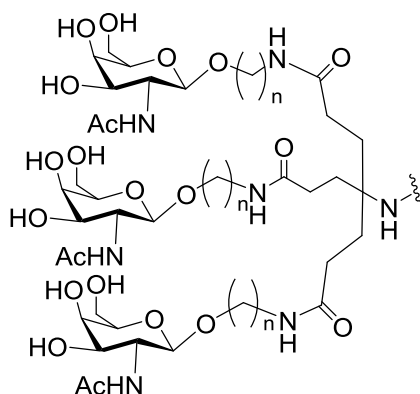
де Y вибраний з C_1-C_{12} заміщеної або незаміщеної алкільної групи або групи, що містить естер, амін, піперидин, фосфат, фосфодіестер або тіофосфат.

- 10 У деяких таких варіантах реалізації винаходу фрагмент кон'югуювальної групи, що націлює на клітину, має наступну структуру:



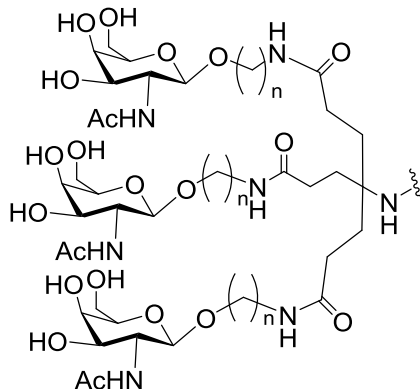
де Y вибраний з C_1-C_{12} заміщеної або незаміщеної алкільної групи.

- 15 У деяких таких варіантах реалізації винаходу фрагмент кон'югуювальної групи, що націлює на клітину, має наступну структуру:



де n дорівнює 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 або 12.

У деяких таких варіантах реалізації винаходу фрагмент кон'югуювальної групи, що націлює на клітину, має наступну структуру:



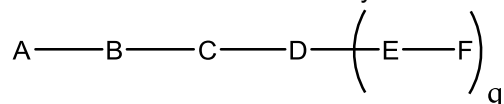
5

де n дорівнює 4, 5, 6, 7 або 8.

b. Деякі кон'юговані антисмислові сполуки

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югати зв'язані з нуклеозидом антисмислового олігонуклеотиду в 2", 3" або 5" положенні нуклеозиду. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука має наступну структуру:

10



де

A являє собою антисмисловий олігонуклеотид;

B являє собою розщеплюваний фрагмент

15

C являє собою лінкер кон'югату

D являє собою групу розгалуження

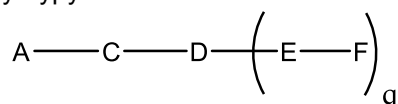
кожен E являє собою зв'язку;

кожен F являє собою ліганд; і

q дорівнює цілому числу від 1 до 5.

20

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука має наступну структуру:



де

A являє собою антисмисловий олігонуклеотид;

25

C являє собою лінкер кон'югату

D являє собою групу розгалуження

кожен E являє собою зв'язку;

кожен F являє собою ліганд; і

q дорівнює цілому числу від 1 до 5.

30

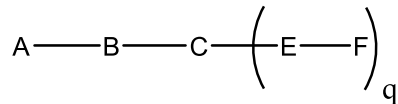
У деяких таких варіантах реалізації винаходу лінкер кон'югату містить щонайменше один розщеплюваний зв'язок.

У деяких таких варіантах реалізації винаходу група розгалуження містить щонайменше один розщеплюваний зв'язок.

У деяких варіантах реалізації винаходу кожна зв'язка містить щонайменше один розщеплюваний зв'язок.

5 У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югати зв'язані з нуклеозидом антисмислового олігонуклеотиду в 2", 3" або 5" положенні нуклеозиду.

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука має наступну структуру:



10

де

A являє собою антисмисловий олігонуклеотид;

B являє собою розщеплюваний фрагмент

C являє собою лінкер кон'югату

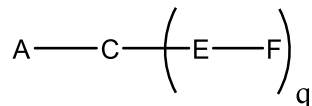
кожен E являє собою зв'язку;

15

кожен F являє собою ліганд; і

q дорівнює цілому числу від 1 до 5.

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югати зв'язані із нуклеозидом антисмислового олігонуклеотиду в 2", 3" або 5" положенні нуклеозиду. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука має наступну структуру:



20

де

A являє собою антисмисловий олігонуклеотид;

C являє собою лінкер кон'югату

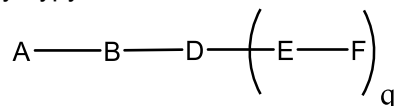
кожен E являє собою зв'язку;

25

кожен F являє собою ліганд; і

q дорівнює цілому числу від 1 до 5.

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука має наступну структуру:



30

де

A являє собою антисмисловий олігонуклеотид;

B являє собою розщеплюваний фрагмент

D являє собою групу розгалуження

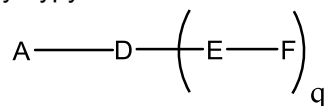
кожен E являє собою зв'язку;

35

кожен F являє собою ліганд; і

q дорівнює цілому числу від 1 до 5.

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука має наступну структуру:



40

де

A являє собою антисмисловий олігонуклеотид;

D являє собою групу розгалуження

кожен E являє собою зв'язку;

кожен F являє собою ліганд; і

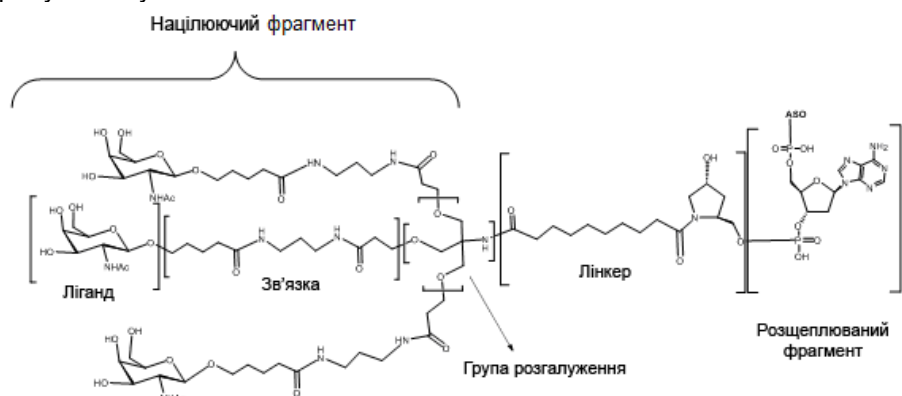
45

q дорівнює цілому числу від 1 до 5.

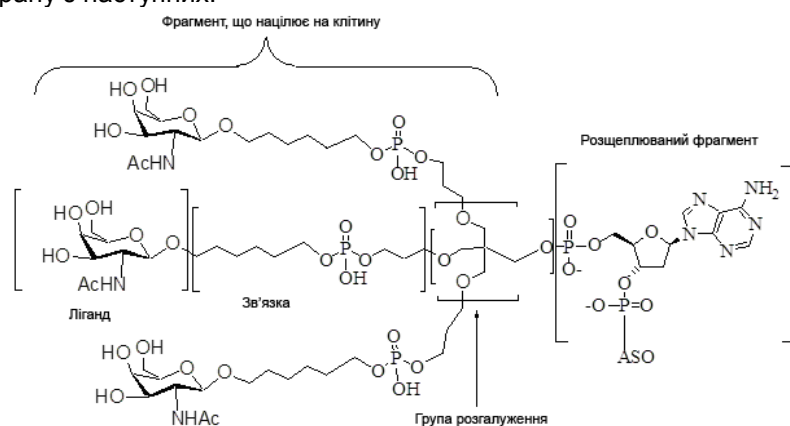
У деяких таких варіантах реалізації винаходу лінкер кон'югату містить щонайменше один розщеплюваний зв'язок.

У деяких варіантах реалізації винаходу кожна зв'язка містить щонайменше один розщеплюваний зв'язок.

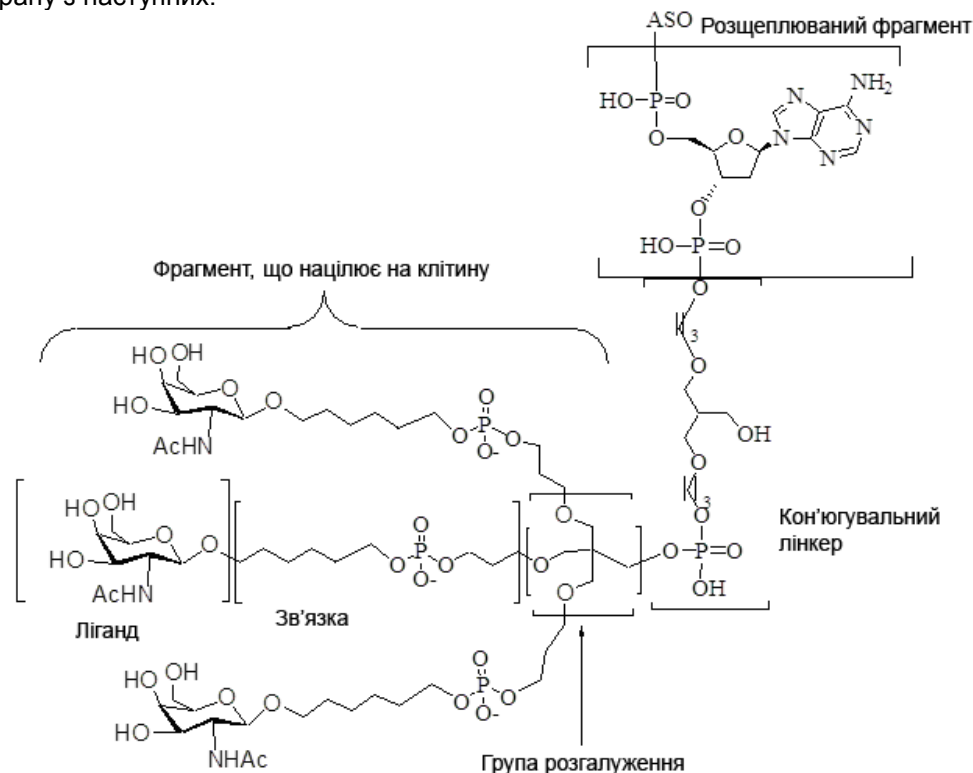
У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука має структуру, вибрану з наступних:



5 У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука має структуру, вибрану з наступних:



У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука має структуру, вибрану з наступних:



Штатів Америки і публікації міжнародних патентних заявок, у яких розкрито одержання деяких із вказаних вище кон'югатів, кон'югованих антисмислових сполук, зв'язок, лінкерів, груп розгалуження, лігандів, розщеплюваних фрагментів, а також інших модифікацій, включають, без обмеження, US 5994517, US 6300319, US 6660720, US 6906182, US 7262177, US 7491805, US 8106022, US 7723509, US 2006/0148740, US 2011/0123520, WO 2013/033230 і WO 2012/037254, кожна з яких включена до даного документу шляхом посилання в повному об'ємі.

Ілюстративні публікації, в яких описано одержання деяких із вказаних вище кон'югатів, кон'югованих антисмислових сполук, зв'язок, лінкерів, груп розгалуження, лігандів, розщеплюваних фрагментів, а також інших модифікацій, включають, без обмеження, BIESSEN et al., "The Cholesterol Derivative of a Triantennary Galactoside with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor: a Potent Cholesterol Lowering Agent" J. Med. Chem. (1995) 38:1846-1852, BIESSEN et al., "Synthesis of Cluster Galactosides with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" J. Med. Chem. (1995) 38:1538-1546, LEE et al., "New and more efficient multivalent glyco-ligands for asialoglycoprotein receptor of mammalian hepatocytes" Bioorganic & Medicinal Chemistry (2011) 19:2494-2500, RENSEN et al., "Determination of the Upper Size Limit for Uptake and Processing of Ligands by the Asialoglycoprotein Receptor on Hepatocytes in Vitro and in Vivo" J. Biol. Chem. (2001) 276(40):37577-37584, RENSEN et al., "Design and Synthesis of Novel N-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoproteins to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" J. Med. Chem. (2004) 47:5798-5808, SLIEDREGT et al., "Design and Synthesis of Novel Amphiphilic Dendritic Galactosides for Selective Targeting of Liposomes to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" J. Med. Chem. (1999) 42:609-618 і Valentijn et al., "Solid-phase synthesis of lysine-based cluster galactosides with high affinity for the Asialoglycoprotein Receptor" Tetrahedron, 1997, 53(2), 759-770, кожна з яких включена до даного документу шляхом посилання в повному об'ємі.

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'юговані антисмислові сполуки містять олігонуклеотид на базі РНКазиди Н (такий як гепмер) або сплайс-модулюючий олігонуклеотид (такий як повністю модифікований олігонуклеотид) і будь-яку кон'югувальну групу, яка містить щонайменше одну, дві або три групи GalNAc. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука містить будь-яку кон'югувальну групу, наведену у наступних посиланнях: Lee, Carbohydr Res, 1978, 67, 509-514; Connolly et al., J Biol Chem, 1982, 257, 939-945; Pavia et al., Int J Pep Protein Res, 1983, 22, 539-548; Lee et al., Biochem, 1984, 23, 4255-4261; Lee et al., Glycoconjugate J, 1987, 4, 317-328; Toyokuni et al., Tetrahedron Lett, 1990, 31, 2673-2676; Biessen et al., J Med Chem, 1995, 38, 1538-1546; Valentijn et al., Tetrahedron, 1997, 53, 759-770; Kim et al., Tetrahedron Lett, 1997, 38, 3487-3490; Lee et al., Bioconjug Chem, 1997, 8, 762-765; Kato et al., Glycobiol, 2001, 11, 821-829; Rensen et al., J Biol Chem, 2001, 276, 37577-37584; Lee et al., Methods Enzymol, 2003, 362, 38-43; Westerlind et al., Glycoconj J, 2004, 21, 227-241; Lee et al., Bioorg Med Chem Lett, 2006, 16(19), 5132-5135; Maierhofer et al., Bioorg Med Chem, 2007, 15, 7661-7676; Khorev et al., Bioorg Med Chem, 2008, 16, 5216-5231; Lee et al., Bioorg Med Chem, 2011, 19, 2494-2500; Kornilova et al., Analyt Biochem, 2012, 425, 43-46; Pujol et al., Angew Chemie Int Ed Engl, 2012, 51, 7445-7448; Biessen et al., J Med Chem, 1995, 38, 1846-1852; Slidregt et al., J Med Chem, 1999, 42, 609-618; Rensen et al., J Med Chem, 2004, 47, 5798-5808; Rensen et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26, 169-175; van Rossenberg et al., Gene Ther, 2004, 11, 457-464; Sato et al., J Am Chem Soc, 2004, 126, 14013-14022; Lee et al., J Org Chem, 2012, 77, 7564-7571; Biessen et al., FASEB J, 2000, 14, 1784-1792; Rajur et al., Bioconjug Chem, 1997, 8, 935-940; Duff et al., Methods Enzymol, 2000, 313, 297-321; Maier et al., Bioconjug Chem, 2003, 14, 18-29; Jayaprakash et al., Org Lett, 2010, 12, 5410-5413; Manoharan, Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 2002, 12, 103-128; Merwin et al., Bioconjug Chem, 1994, 5, 612-620; Tomiya et al., Bioorg Med Chem, 2013, 21, 5275-5281; Міжнародні заявки WO1998/013381; WO2011/038356; WO1997/046098; WO2008/098788; WO2004/101619; WO2012/037254; WO2011/120053; WO2011/100131; WO2011/163121; WO2012/177947; WO2013/033230; WO2013/075035; WO2012/083185; WO2012/083046; WO2009/082607; WO2009/134487; WO2010/144740; WO2010/148013; WO1997/020563; WO2010/088537; WO2002/043771; WO2010/129709; WO2012/068187; WO2009/126933; WO2004/024757; WO2010/054406; WO2012/089352; WO2012/089602; WO2013/166121; WO2013/165816; патенти США 4751219; 8552163; 6908903; 7262177; 5994517; 6300319; 8106022; 7491805; 7491805; 7582744; 8137695; 6383812; 6525031; 6660720; 7723509; 8541548; 8344125; 8313772; 8349308; 8450467; 8501930; 8158601; 7262177; 6906182; 6620916; 8435491; 8404862; 7851615; опубліковані заявки на патент США US2011/0097264; US2011/0097265; US2013/0004427; US2005/0164235; US2006/0148740; US2008/0281044; US2010/0240730; US2003/0119724; US2006/0183886; US2008/0206869; US2011/0269814; US2009/0286973; US2011/0207799; US2012/0136042; US2012/0165393;

US2008/0281041; US2009/0203135; US2012/0035115; US2012/0095075; US2012/0101148; US2012/0128760; US2012/0157509; US2012/0230938; US2013/0109817; US2013/0121954; US2013/0178512; US2013/0236968; US2011/0123520; US2003/0077829; US2008/0108801; і US2009/0203132; кожна з яких включена до даного документу шляхом посилання в повному об'ємі.

С Деякі застосування і особливості

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'юговані антисмислові сполуки демонструють ефективне зниження цільової РНК *in vivo*. У деяких варіантах реалізації винаходу некон'юговані антисмислові сполуки накопичуються в нирках. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'юговані антисмислові сполуки накопичуються в печінці. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'юговані антисмислові сполуки є добре переносимими. Такі властивості роблять кон'юговані антисмислові сполуки особливо придатними для інгібування багатьох цільових РНК, включаючи, але без обмеження, ті, які приймають участь в метаболічних, серцево-судинних та інших захворюваннях, розладах або патологічних станах. Таким чином, в даному документі наведені способи лікування таких захворювань, розладів або патологічних станів приведенням тканин печінки в контакт з кон'югованими антисмисловими сполуками, націленими на РНК, пов'язані з такими захворюваннями, розладами або патологічними станами. Отже, наведені також способи покращення будь-яких з численних метаболічних, серцево-судинних та інших захворювань, розладів або патологічних станів за допомогою кон'югованих антисмислових сполук за даним винаходом.

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'юговані антисмислові сполуки є ефективнішими, ніж некон'юговані аналоги при певній концентрації в тканині. Не обмежуючись будь-якою теорією або механізмом, у деяких варіантах реалізації винаходу кон'югат може забезпечувати можливість ефективнішого входження кон'югованої антисмислової сполуки у клітину або можливість продуктивнішого входження у клітину. Наприклад, у деяких варіантах реалізації винаходу кон'юговані антисмислові сполуки можуть демонструвати більш значне зниження мішені, порівняно з некон'югованим аналогом, при цьому і кон'югована антисмислова сполука, і її некон'югований аналог знаходяться у тканині в однакових концентраціях. Наприклад, у деяких варіантах реалізації винаходу кон'юговані антисмислові сполуки можуть демонструвати більш значне зниження мішені, порівняно з їх некон'югованими аналогами, при цьому і кон'югована антисмислова сполука, і її некон'югований аналог знаходяться у печінці в однакових концентраціях.

Раніше було розглянуте продуктивне і непродуктивне захоплення олігонуклеотидів (див., наприклад, Geary, R. S., E. Wanciewicz, et al. (2009). "Effect of Dose and Plasma Concentration on Liver Uptake and Pharmacologic Activity of a 2'-Methoxyethyl Modified Chimeric Antisense Oligonucleotide Targeting PTEN." *Biochem. Pharmacol.* 78(3): 284-91; і Koller, E., T. M. Vincent, et al. (2011). "Mechanisms of single-stranded phosphorothioate modified antisense oligonucleotide accumulation in hepatocytes." *Nucleic Acids Res.* 39(11): 4795-807). Кон'югувальні групи, описані в даному документі, можуть покращувати продуктивне захоплення.

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югувальні групи, описані в даному документі, можуть додатково підсилювати ефективність за рахунок збільшення афінності кон'югованої антисмислової сполуки до конкретного типу клітини або тканини. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югувальні групи, описані в даному документі, можуть додатково підсилювати ефективність за рахунок збільшення розпізнавання кон'югованої антисмислової сполуки одним або декількома рецепторами клітинної поверхні. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югувальні групи, описані в даному документі, можуть додатково підсилювати ефективність за рахунок полегшення ендоцитозу кон'югованої антисмислової сполуки.

У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент може додатково підсилювати ефективність за рахунок забезпечення можливості розщеплення кон'югату з антисмислового олігонуклеотиду після надходження кон'югованої антисмислової сполуки в клітину. Відповідно, у деяких варіантах реалізації винаходу кон'юговані антисмислові сполуки можуть бути введені у нижчих дозах, ніж необхідні для некон'югованих антисмислових олігонуклеотидів.

Раніше до антисмислових олігонуклеотидів уже були введені тіофосфатні зв'язки. Такі тіофосфатні зв'язки є стійкими до нуклеаз і за рахунок цього покращують стабільність олігонуклеотиду. Крім того, тіофосфатні зв'язки зв'язують також деякі білки, що приводить до накопичення антисмислового олігонуклеотиду в печінці. Олігонуклеотиди з меншою кількістю тіофосфатних зв'язків меншою мірою накопичуються в печінці і більшою - в нирках (див., наприклад, Geary, R., "Pharmacokinetic Properties of 2'-O-(2-Methoxyethyl)-Modified Oligonucleotide Analogs in Rats," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, том 296, № 3, 890-897; і

Pharmacological Properties of 2'-O-Methoxyethyl Modified Oligonucleotides in Antisense a Drug Technology, розділ 10, Crooke, S.T., ред., 2008). У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотиди з меншою кількістю тіофосфатних міжнуклеозидних зв'язків і з великою кількістю фосфодіестерних міжнуклеозидних зв'язків меншою мірою накопичуються в печінці і
 5 більшою - в нирках. При лікуванні захворювань печінки це є небажаним з декількох причин: (1) менша кількість лікарського засобу надходить до центру бажаної дії (печінка); (2) лікарський засіб виводиться із сечею; (3) нирки піддаються впливу відносно високої концентрації лікарського засобу, що може призводити до токсичності в нирках. Отже, при захворюваннях печінки тіофосфатні зв'язки забезпечують суттєву перевагу.

10 Однак у деяких варіантах реалізації винаходу введення олігонуклеотидів, рівномірно зв'язаних тіофосфатними міжнуклеозидними зв'язками, спричиняє одну або декілька прозапальних реакцій. (Див., наприклад: J Lab Clin Med. 1996 Sep;128(3):329-38. "Amplification of antibody production by phosphorothioate oligodeoxynucleotides". Branda et al.; і див. також, наприклад: Toxicologic Properties in Antisense a Drug Technology, розділ 12, сторінки 342-351,
 15 Crooke, S.T., ред., 2008). У деяких варіантах реалізації винаходу введення олігонуклеотидів, у яких велика частина міжнуклеозидних зв'язків містить тіофосфатні міжнуклеозидні зв'язки, спричиняє одну або декілька прозапальних реакцій.

У деяких варіантах реалізації винаходу ступінь прозапального ефекту може залежати від декількох змінних (наприклад, модифікація скелету, нецільова дія, модифікації азотистих основ
 20 та/або модифікації нуклеозиду), див., наприклад: Toxicologic Properties in Antisense a Drug Technology, розділ 12, сторінки 342-351, Crooke, S.T., ред., 2008). У деяких варіантах реалізації винаходу ступінь прозапального ефекту може бути послаблений за рахунок підбору однієї або декількох змінних. Наприклад, ступінь прозапального ефекту даного олігонуклеотиду може бути послаблений за рахунок заміни будь-якої кількості тіофосфатних міжнуклеозидних зв'язків
 25 фосфодіестерними міжнуклеозидними зв'язками із зменшенням за допомогою цього загальної кількості тіофосфатних міжнуклеозидних зв'язків.

У деяких варіантах реалізації винаходу може бути бажаним зменшити кількість тіофосфатних зв'язків, якщо це може бути здійснено без втрати стабільності і без зсуву розподілу із печінки в нирки. Наприклад, у деяких варіантах реалізації винаходу кількість
 30 тіофосфатних зв'язків може бути зменшена за рахунок заміни тіофосфатних зв'язків на фосфодіестерні зв'язки. У такому варіанті реалізації винаходу антисмислова сполука, що має меншу кількість тіофосфатних зв'язків і більшу кількість фосфодіестерних зв'язків, може спричинити меншу кількість прозапальних реакцій або не спричинити прозапальних реакцій. Хоча антисмислова сполука, що має меншу кількість тіофосфатних зв'язків і більшу кількість
 35 фосфодіестерних зв'язків, може спричинити меншу кількість прозапальних реакцій, антисмислова сполука, що має меншу кількість тіофосфатних зв'язків і більшу кількість фосфодіестерних зв'язків, може не накопичуватися в печінці і може бути менш ефективною в такій же або аналогічній дозі, порівняно з антисмисловою сполукою, що має більшу кількість тіофосфатних зв'язків. Тому в деяких варіантах реалізації винаходу бажано розробити
 40 антисмислову сполуку, яка має численні фосфодіестерні зв'язки і численні тіофосфатні зв'язки, але яка при цьому має також стабільність і хороший розподіл в печінці.

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'юговані антисмислові сполуки більшою мірою накопичуються в печінці і меншою мірою - в нирках, ніж некон'юговані аналоги, навіть якщо деякі
 45 тіофосфатні зв'язки замінені менш прозапальними фосфодіестерними міжнуклеозидними зв'язками. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'юговані антисмислові сполуки більшою мірою накопичуються в печінці і не так сильно виводяться із сечею, як їх некон'юговані аналоги, навіть якщо деякі тіофосфатні зв'язки замінені менш прозапальними фосфодіестерними міжнуклеозидними зв'язками. У деяких варіантах реалізації винаходу застосування кон'югату забезпечує можливість розробки ефективніших і краще переносимих антисмислових ліків.
 50 Дійсно, у деяких варіантах реалізації винаходу кон'юговані антисмислові сполуки мають ширший терапевтичний індекс, ніж некон'юговані аналоги. Це дозволяє вводити кон'юговану антисмислову сполуку у вищій абсолютній дозі завдяки меншому ризику прозапальної реакції і меншому ризику токсичності для нирок. Така вища доза дає можливість вводити дозу рідше, оскільки очікується такий же коефіцієнт очищення (метаболізм). Крім того, оскільки сполука є
 55 ефективнішою, як описано вище, то можна допускати зниження концентрації перед введенням наступної дози, без втрати терапевтичної активності, що забезпечує ще триваліші періоди між введенням доз.

У деяких варіантах реалізації винаходу зберігається необхідність у впровадженні деякої кількості тіофосфатних зв'язків. Наприклад, кінцеві зв'язки легко піддаються дії екзонуклеаз, і
 60 тому в деяких варіантах реалізації винаходу ці зв'язки являють собою тіофосфатні або інші

модифіковані зв'язки. Міжнуклеозидні зв'язки, що сполучають два дезоксинуклеозиди, легко піддаються дії ендонуклеаз, і тому в деяких варіантах реалізації винаходу ці зв'язки являють собою тіофосфатні або інші модифіковані зв'язки. Міжнуклеозидні зв'язки між модифікованим нуклеозидом і дезоксинуклеозидом, де дезоксинуклеозид розташований на 5'-стороні зв'язувального дезоксинуклеозиду, легко піддаються дії ендонуклеаз, і тому в деяких варіантах реалізації винаходу ці зв'язки являють собою тіофосфатні або інші модифіковані зв'язки. Міжнуклеозидні зв'язки між двома модифікованими нуклеозидами певних типів і між дезоксинуклеозидом і модифікованим нуклеозидом певного типу, де модифікований нуклеозид розташований на 5'-стороні лінкера, є достатньо стійкими до нуклеазного розщеплення, тому зв'язок може бути фосфодіестером.

У деяких варіантах реалізації винаходу антисмисловий олігонуклеотид кон'югованої антисмислової сполуки містить менш, ніж 16 тіофосфатних зв'язків. У деяких варіантах реалізації винаходу антисмисловий олігонуклеотид кон'югованої антисмислової сполуки містить менш, ніж 15 тіофосфатних зв'язків. У деяких варіантах реалізації винаходу антисмисловий олігонуклеотид кон'югованої антисмислової сполуки містить менш, ніж 14 тіофосфатних зв'язків. У деяких варіантах реалізації винаходу антисмисловий олігонуклеотид кон'югованої антисмислової сполуки містить менш, ніж 13 тіофосфатних зв'язків. У деяких варіантах реалізації винаходу антисмисловий олігонуклеотид кон'югованої антисмислової сполуки містить менш, ніж 12 тіофосфатних зв'язків. У деяких варіантах реалізації винаходу антисмисловий олігонуклеотид кон'югованої антисмислової сполуки містить менш, ніж 11 тіофосфатних зв'язків. У деяких варіантах реалізації винаходу антисмисловий олігонуклеотид кон'югованої антисмислової сполуки містить менш, ніж 10 тіофосфатних зв'язків. У деяких варіантах реалізації винаходу антисмисловий олігонуклеотид кон'югованої антисмислової сполуки містить менш, ніж 9 тіофосфатних зв'язків. У деяких варіантах реалізації винаходу антисмисловий олігонуклеотид кон'югованої антисмислової сполуки містить менш, ніж 8 тіофосфатних зв'язків.

У деяких варіантах реалізації винаходу антисмислові сполуки, що містять одну або декілька кон'югувальних груп, описаних в даному документі, мають підвищену активність та/або ефективність, та/або переносимість, порівняно з початковою антисмисловою сполукою, що не має такої однієї або декількох кон'югувальних груп. Відповідно, у деяких варіантах реалізації винаходу приєднання таких кон'югувальних груп до олігонуклеотиду є бажаним. Такі кон'югувальні групи можуть бути приєднані при 5'- та/або 3'-кінці олігонуклеотиду. В деяких випадках синтетично бажаним є приєднання на 5'-кінці. Як правило, олігонуклеотиди синтезують приєднанням 3'-кінцевого нуклеозиду до твердої основи з подальшим з'єднанням нуклеозидів від 3" до 5" за допомогою методик, загальновідомих з рівня техніки. Відповідно, якщо кон'югувальна група є необхідною на 3'-кінці, то можна (1) приєднати кон'югувальну групу до 3'-кінцевого нуклеозиду і приєднати цей кон'югований нуклеозид до твердої основи для подальшого одержання олігонуклеотиду або (2) приєднати кон'югувальну групу до 3'-кінцевого нуклеозиду готового олігонуклеотиду після синтезу. Жоден з цих підходів не є особливо ефективним, і тому обидва вони є затратними. Зокрема, приєднання кон'югованого нуклеозиду до твердої основи, хоча і наведено в даному документі у розділі "Приклади", не є ефективним способом. У деяких варіантах реалізації винаходу приєднання кон'югувальної групи до 5'-кінцевого нуклеозиду є синтетично простішим, ніж приєднання до 3'-кінця. Можна приєднати некон'югований 3'-кінцевий нуклеозид до твердої основи і одержати олігонуклеотид за стандартними і добре описаними реакціями. Далі потрібно тільки приєднати 5'-нуклеозид, що має кон'югувальну групу, на останній стадії з'єднання. У деяких варіантах реалізації винаходу це більш ефективно, ніж приєднання кон'югованого нуклеозиду безпосередньо до твердої основи, як це звичайно роблять для отримання 3'-кон'югованого олігонуклеотиду. У представлених в даному документі Прикладах показане приєднання до 5'-кінця. Крім того, деякі кон'югувальні групи мають синтетичні переваги. Наприклад, деякі кон'югувальні групи, що містять фосфорні зв'язувальні групи, одержують синтетично простіше і більш ефективно, ніж інші кон'югувальні групи, включаючи кон'югувальні групи, описані раніше (наприклад, WO/2012/037254).

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югувальні антисмислові сполуки вводять суб'єкту. У таких варіантах реалізації винаходу антисмислові сполуки, що містять одну або декілька кон'югувальних груп, описаних у даному документі, мають підвищену активність та/або ефективність, та/або переносимість, порівняно з початковою антисмисловою сполукою, що не має такої однієї або декількох кон'югувальних груп. Не обмежуючись механізмом, передбачається, що кон'югувальна група сприяє розподілу, доставці та/або поглинанню у цільовій клітині або тканині. У деяких варіантах реалізації, після надходження у цільову клітину або тканину бажано, щоб вся або частина кон'югувальної групи розщеплювалася з вивільненням активного олігонуклеотиду. У деяких варіантах реалізації винаходу необов'язково,

щоб з олігонуклеотиду розщеплювалася вся кон'югувальна група. Наприклад, у Прикладі 20 кон'югований олігонуклеотид вводили мишам і знаходили численні різноманітні хімічні частинки, кожна з яких містила різні частини кон'югувальної групи, що залишилися на олігонуклеотиді (Табл. 10а). Ця кон'югована антисмислова сполука показала хорошу ефективність (Табл. 10).

Так, у деяких варіантах реалізації винаходу такий метаболітний профіль багаторазового часткового розщеплення кон'югувальної групи не впливає на активність/ефективність. Однак, у деяких варіантах реалізації винаходу бажаним є, щоб проліки (кон'югований олігонуклеотид) давали одну активну сполуку. У деяких випадках, при виявленні численних форм активної сполуки, може бути необхідним визначити відносні кількості і дію для кожної з них. У деяких варіантах реалізації, при необхідності тестування регуляції (наприклад, FDA США або іншим органом), бажано мати одну (або переважно одну) активну частинку. У деяких таких варіантах реалізації винаходу бажано, щоб така одна активна частинка була антисмисловим олігонуклеотидом, що не містить жодних частин кон'югувальної групи. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югувальні групи на 5'-кінці ймовірніше приводять до повного метаболізму кон'югувальної групи. Не обмежуючись механізмом, можливо, ендегенні ферменти, які відповідають за метаболізм на 5'-кінці (наприклад, 5'-нуклеази), є більш активними/ефективними, ніж 3'-аналоги. У деяких варіантах реалізації винаходу певні кон'югувальні групи більш схильні до метаболізму до однієї активної частинки. У деяких варіантах реалізації винаходу деякі кон'югувальні групи більш схильні до метаболізму до олігонуклеотиду.

D. Антисмисл

У деяких варіантах реалізації винаходу олігомерні сполуки за даним винаходом є антисмисловими сполуками. У таких варіантах реалізації винаходу олігомерна сполука є комплементарною цільовій нуклеїновій кислоті. У деяких варіантах реалізації винаходу цільова нуклеїнова кислота являє собою РНК. У деяких варіантах реалізації винаходу цільова нуклеїнова кислота являє собою некодуючу РНК. У деяких варіантах реалізації винаходу цільова нуклеїнова кислота кодує білок. У деяких варіантах реалізації винаходу цільова нуклеїнова кислота вибрана з мРНК, пре-мРНК, мікроРНК, некодуючої РНК, включаючи малу некодуючу РНК, і промотор-націлюваної РНК. У деяких варіантах реалізації винаходу олігомерні сполуки є щонайменше частково комплементарними більш ніж одній цільовій нуклеїновій кислоті. Наприклад, олігомерні сполуки за даним винаходом можуть бути міметиками мікроРНК, що звичайно зв'язуються з декількома мішенями.

У деяких варіантах реалізації винаходу антисмислові сполуки містять частину, що має послідовність азотистих основ, яка є щонайменше на 70 % комплементарною послідовності азотистих основ цільової нуклеїнової кислоти. У деяких варіантах реалізації винаходу антисмислові сполуки містять частину, що має послідовність азотистих основ, яка є щонайменше на 80 % комплементарною послідовності азотистих основ цільової нуклеїнової кислоти. У деяких варіантах реалізації винаходу антисмислові сполуки містять частину, що має послідовність азотистих основ, яка є щонайменше на 90 % комплементарною послідовності азотистих основ цільової нуклеїнової кислоти. У деяких варіантах реалізації винаходу антисмислові сполуки містять частину, що має послідовність азотистих основ, яка є щонайменше на 95 % комплементарною послідовності азотистих основ цільової нуклеїнової кислоти. У деяких варіантах реалізації винаходу антисмислові сполуки містять частину, що має послідовність азотистих основ, яка є щонайменше на 98 % комплементарною послідовності азотистих основ цільової нуклеїнової кислоти. У деяких варіантах реалізації винаходу антисмислові сполуки є щонайменше на 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % або 100 % комплементарними послідовності азотистих основ цільової нуклеїнової кислоти по всій довжині антисмислової сполуки.

Антисмислові механізми включають будь-який механізм, що зачіпає гібридизацію олігомерної сполуки з цільовою нуклеїновою кислотою, при цьому гібридизація приводить до біологічного ефекту. У деяких варіантах реалізації винаходу така гібридизація приводить або до руйнування, або до застосування цільової нуклеїнової кислоти із супутнім пригніченням або стимуляцією клітинного механізму, що зачіпає, наприклад, трансляцію, транскрипцію або поліаденілювання цільової нуклеїнової кислоти або нуклеїнової кислоти, з якою цільова кислота може взаємодіяти в інший спосіб.

Один із типів антисмислового механізму, що зачіпає руйнування цільової РНК являє собою антисмисл, опосередкований РНКазою Н. РНКаза Н є клітинною ендонуклеазою, що розщеплює спіраль РНК дуплексу РНК:ДНК. З рівня техніки відомо, що одноланцюгові антисмислові

сполуки, що є "ДНК-подібними", спричиняють активність РНКаз Н у клітинах ссавців. Отже, активація РНКаз Н приводить до розщеплення РНК-мішені, за допомогою чого значною мірою підсилюється ефективність пригнічення генної експресії, опосередкованої ДНК-подібним олігонуклеотидом.

5 Антисмислові механізми також включають, без обмеження, РНКі механізми, у яких застосовується шлях RISC. Такі РНКі механізми включають, без обмеження, міРНК, олРНК і мікроРНК механізми. Такі механізми включають створення міметики мікроРНК та/або анти-мікро РНК.

10 Антисмислові механізми також включають, без обмеження, механізми, які гібридизують або імітують некодуючу РНК, відмінну від мікроРНК або мРНК. Такі некодуючі РНК включають, без обмеження, промотор-націлену РНК та малу і довгу РНК, яка впливає на транскрипцію або трансляцію однієї або декількох нуклеїнових кислот.

У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотиди, що містять описані в даному документі кон'югати, є РНКі сполуками. У деяких варіантах реалізації винаходу олігомерні олігонуклеотиди, що містять описані в даному документі кон'югати, є олРНК сполуками. У 15 деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотиди, що містять описані в даному документі кон'югати, спарені з іншою олігомерною сполукою з утворенням міРНК. У деяких таких варіантах реалізації винаходу друга олігомерна сполука також містить кон'югат. У деяких варіантах реалізації винаходу друга олігомерна сполука є будь-якою модифікованою або 20 немодифікованою нуклеїною кислотою. У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотиди, що містять описані в даному документі кон'югати, є антисмисловим ланцюгом в міРНК сполуці. У деяких варіантах реалізації винаходу олігонуклеотиди, що містять описані в даному документі кон'югати, є смисловим ланцюгом в міРНК сполуці. У тих варіантах реалізації, в яких кон'югована олігомерна сполука є дволанцюговою міРНК, кон'югат може знаходитися на 25 смисловому ланцюгу, антисмисловому ланцюгу або і на смисловому ланцюгу, і на антисмисловому ланцюгу.

Д Цільові нуклеїнові кислоти, ділянки і сегменти

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'юговані антисмислові сполуки націлені на будь-яку нуклеїнову кислоту. У деяких варіантах реалізації винаходу цільова нуклеїнова кислота 30 кодує білок-мішень, що є клінічно значущим. У таких варіантах реалізації винаходу модуляція цільової нуклеїнової кислоти приводить до сприятливого клінічного ефекту. Деякі цільові нуклеїнові кислоти включають, без обмеження, цільові нуклеїнові кислоти, представлені в Табл. 1.

Таблиця 1

Деякі цільові нуклеїнові кислоти

Мішень	Види	Номер доступу GENBANK®	SEQ ID NO
HBV	Людина	U95551.1	1
Транстиретин (TTR)	Людина	NM_000371.3	2

35

Процес таргетингу звичайно включає визначення щонайменше однієї цільової ділянки, сегменту або сайту на цільовій нуклеїновій кислоті для антисмислової взаємодії, з виникненням в результаті такого бажаного ефекту.

40 У деяких варіантах реалізації винаходу цільова область являє собою структурно визначену область нуклеїнової кислоти. Наприклад, у деяких таких варіантах реалізації винаходу цільова область може охоплювати 3' UTR, 5' UTR, екзон, інтрон, кодуючу область, область ініціації трансляції, область термінації трансляції або іншу визначену область або цільовий сегмент нуклеїнової кислоти.

45 У деяких варіантах реалізації винаходу цільовий сегмент є частиною цільової ділянки щонайменше з близько 8 азотистих основ, на яку націлена кон'югована антисмислова сполука. Цільові сегменти можуть містити послідовності ДНК або РНК, які містять щонайменше 8 суміжних азотистих основ від 5'-кінця одного з цільових сегментів (решта азотистих основ простягається одна за одною з тієї ж ДНК або РНК, починаючись відразу перед 5'-кінцем цільового сегменту і триваючи до моменту, коли ДНК або РНК буде містити від близько 8 до 50 близько 30 азотистих основ). Цільові сегменти представлені також послідовностями ДНК або РНК, які містять щонайменше 8 суміжних азотистих основ від 3'-кінця одного з цільових сегментів (решта азотистих основ простягається одна за одною з тієї ж ДНК або РНК, починаючись відразу після 3'-кінця цільового сегменту і триваючи до моменту, коли ДНК або

РНК буде містити від близько 8 до близько 30 азотистих основ). Цільові сегменти також можуть бути представлені послідовностями ДНК або РНК, які містять щонайменше 8 суміжних азотистих основ з внутрішньої частини послідовності цільового сегменту, і можуть простягатися в будь-якому або обох напрямках до моменту, коли кон'югована антисмислова сполука

5 міститиме від близько 8 до близько 30 азотистих основ.

У деяких варіантах реалізації винаходу антисмислові сполуки, націлені на нуклеїнові кислоти, що наведені в Табл. 1, можуть бути модифіковані таким чином, як описано в даному документі. У деяких варіантах реалізації винаходу антисмислові сполуки можуть мати модифікований цукровий фрагмент, немодифікований цукровий фрагмент або суміш

10 модифікованих і немодифікованих цукрових фрагментів, як описано в даному документі. У деяких варіантах реалізації винаходу антисмислові сполуки можуть мати модифікований міжнуклеозидний зв'язок, немодифікований міжнуклеозидний зв'язок або суміш модифікованих і немодифікованих міжнуклеозидних зв'язків, як описано в даному документі. У деяких варіантах реалізації винаходу антисмислові сполуки можуть мати модифіковану азотисту основу,

15 немодифіковану азотисту основу або суміш модифікованих і немодифікованих азотистих основ, як описано в даному документі. У деяких варіантах реалізації винаходу антисмислові сполуки можуть мати мотив, описаний в даному документі.

У деяких варіантах реалізації винаходу антисмислові сполуки, націлені на нуклеїнові кислоти, що наведені в Табл. 1, можуть бути кон'югованими таким чином, як описано в даному документі.

1. Гепатит В (HBV)

Гепатит В являє собою вірусне захворювання, що передається парентеральним шляхом через заражений матеріал, такий як кров і продукти крові, забруднені голки, статевим шляхом і вертикально від інфікованої або несучої вірус матері до її потомства. За оцінками Всесвітньої організації охорони здоров'я, у всьому світі інфіковано більше 2 мільярдів людей, при цьому щорічно відбувається близько 4 мільйонів гострих випадків, 1 мільйон смертельних випадків на рік і 350-400 мільйонів хронічних носіїв (Всесвітня організація охорони здоров'я: Geographic Prevalence of Hepatitis B Prevalence, 2004. <http://www.who.int/vaccines-surveillance/graphics/htmls/hepbprev.htm>).

Вірус HBV являє собою дволанцюговий гепатотропний вірус, що інфікує тільки людину і людиноподібних приматів. Вірусна реплікація відбувається переважно в печінці і, меншою мірою, в нирках, підшлунковій залозі, кістковому мозку і селезінці (Hepatitis B virus biology. Microbiol Mol Biol Rev. 64: 2000; 51-68.). Вірусні та імунні маркери можуть бути знайдені в крові і є характерними профілями антигенів-антитіл, що розвиваються з часом. Першим вірусним маркером, що виявляється, є HBsAg, за ним слідує антиген е гепатиту В (HBeAg) і ДНК HBV. У інкубаційному періоді титри можуть бути високими, але рівні ДНК і HBeAg HBV починають різко знижуватися на початку захворювання і можуть не піддаватися виявленню на піку клінічної хвороби (Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. N Engl J Med. 350: 2004; 1118-1129). HBeAg є вірусним маркером, який виявляють у крові, що корелює з активною вірусною реплікацією і, отже, високим вірусним навантаженням та інфекційністю (Hepatitis B e antigen-the dangerous end game of hepatitis B. N Engl J Med. 347: 2002; 208-210). Наявність анти-HBsAb і анти-HBcAb (IgG) вказує на одужання і імунітет у раніше інфікованого індивідуума.

На даний час засоби терапії хронічної інфекції HBV, рекомендовані Американською асоціацією з вивчення захворювань печінки (AASLD) і Європейською асоціацією з вивчення печінки (EASL), включають інтерферон-альфа (IFN α), пегільований інтерферон-альфа-2а (Peg-IFN2a), ентекавір і тенофовір. Терапія нуклеозидами і азотистими основами, ентекавіром і тенофовіром, є успішною для зниження вірусного навантаження, але швидкість сероконверсії HBeAg і зниження HBsAg є навіть нижчою, ніж швидкість, що може бути досягнута за допомогою IFN α терапії. Застосовують також інші аналогічні терапевтичні засоби, зокрема ламівудин (ЗТС), телбівудин (LdT) і адефовір, але терапевтична ефективність терапевтичних засобів з нуклеозидами/азотистими основами в цілому обмежена появою резистентності.

Отже, в даній галузі техніки існує необхідність у відкритті і розробці нових противірусних терапевтичних засобів. Крім того, існує необхідність у нових анти-HBV терапевтичних засобах, здатних збільшувати швидкість сероконверсії HBeAg і HBsAg. У нещодавніх клінічних дослідженнях була знайдена кореляція між сероконверсією і зниженням HBeAg (Fried et al (2008) Hepatology 47:428) та зниженням HBsAg (Moucari et al (2009) Hepatology 49:1151). Зниження рівнів антигенів може забезпечувати можливість імунологічного контролю інфекції HBV, оскільки передбачається, що високі рівні антигенів спричиняють імунологічну толерантність. Існуючі нуклеозидні терапевтичні засоби проти HBV можуть значно знижувати

60 рівні HBV у сироватці, але мало впливають на рівні HBeAg і HBsAg.

Антисмислові сполуки, націлені на HBV, були описані раніше у WO2011/047312, WO2012/145674 і WO2012/145697, повний зміст кожної з яких включений до даного документу шляхом посилання. Заплановані клінічні дослідження для оцінки впливу антисмислових сполук, націлених на HBV, на пацієнтів. Однак все ще існує необхідність у забезпеченні пацієнтів

5 додатковими і ефективнішими можливостями лікування.

Деякі кон'юговані антисмислові сполуки, націлені на нуклеїнову кислоту HBV

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'юговані антисмислові сполуки націлені на нуклеїнову кислоту HBV, що має послідовність з номером доступу GENBANK® U95551.1, яка включена до даного документу як SEQ ID NO: 1. У деяких таких варіантах реалізації винаходу

10 кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 1, є щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 % або на 100 % комплементарною SEQ ID NO: 1.

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 1, містить щонайменше 8 суміжних азотистих основ послідовності SEQ ID NO: 3. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID

15 NO: 1, містить послідовність азотистих основ SEQ ID NO: 3.

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 1, містить щонайменше 8 суміжних азотистих основ послідовності SEQ ID NO: 4. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID

20 NO: 1, містить послідовність азотистих основ SEQ ID NO: 4.

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 1, містить щонайменше 8 суміжних азотистих основ послідовності SEQ ID NO: 5. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID

25 NO: 1, містить послідовність азотистих основ SEQ ID NO: 5.

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 1, містить щонайменше 8 суміжних азотистих основ послідовності SEQ ID NO: 6. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID

30 NO: 1, містить послідовність азотистих основ SEQ ID NO: 6.

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 1, містить щонайменше 8 суміжних азотистих основ послідовності SEQ ID NO: 7. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID

35 NO: 1, містить послідовність азотистих основ SEQ ID NO: 7.

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 1, містить щонайменше 8 суміжних азотистих основ послідовності SEQ ID NO: 8. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID

40 NO: 1, містить послідовність азотистих основ SEQ ID NO: 8.

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 1, містить щонайменше 8 суміжних азотистих основ послідовності SEQ ID NO: 9. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID

45 NO: 1, містить послідовність азотистих основ SEQ ID NO: 9.

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 1, містить щонайменше 8 суміжних азотистих основ послідовності SEQ ID NO: 10. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID

50 NO: 1, містить послідовність азотистих основ SEQ ID NO: 10.

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 1, містить щонайменше 8 суміжних азотистих основ послідовності SEQ ID NO: 11. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID

55 NO: 1, містить послідовність азотистих основ SEQ ID NO: 11.

Таблиця 2

Антисмислові сполуки, націлені на HBV SEQ ID NO: 1

ISIS №	Сайт-мішень ініціації	Послідовність (5'-3")	Мотив	SEQ ID NO
505358	1583	GCAGAGGTGAAGCGAAGTGC	eeeeeddddddddeeeee	3
509934	1780	CCAATTTATGCCTACAGCCT	eeeeeddddddddeeeee	4
510100	411	GGCATAGCAGCAGGATG	Eeeddddddddeeeee	5
552023	1266	AGGAGTTCGCGAGTATGGAT	eeeeeeddddddddeeeee	6
552024	1577	GTGAAGCGAAGTGCACACGG	eeeeeeddddddddeeeee	7

Антисмислові сполуки, націлені на HBV SEQ ID NO: 1

ISIS №	Сайт-мішень ініціації	Послідовність (5'-3")	Мотив	SEQ ID NO
552032	1585	GTGCAGAGGTGAAGCGAAGT	eeeeeeeddddddddeeeee	8
552859	1583	AGGTGAAGCGAAGTGC	Ekkdddddddddkke	9
552925	1264	TCCGCAGTATGGATCG	Ekdddddddddkeke	10
577119	1780	AATTTATGCCTACAGCCT	kdkdkdddddddeeeee	11

У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить або складається з ISIS 505358 і кон'югувальної групи. ISIS 505358 являє собою модифікований олігонуклеотид, що має формулу: Ges mCes Aes Ges Aes Gds Gds Tds Gds Ads Ads Gds mCds Gds Ads Aes Ges Tes Ges mCe, де

A=аденін,

mC=5'-метилцитозин

G=гуанін,

T=тимін,

e=2'-О-метоксіетил-модифікований нуклеозид,

d=2'-дезоксинуклеозид і

s=тіофосфатний міжнуклеозидний зв'язок.

У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить або складається з ISIS 509934 і кон'югувальної групи. ISIS 509934 являє собою модифікований олігонуклеотид, що має формулу: mCes mCes Aes Aes Tes Tds Tds Ads Tds Gds mCds mCds Tds Ads mCds Aes Ges mCes mCes Te, де

A=аденін,

mC=5'-метилцитозин

G=гуанін,

T=тимін,

e=2'-О-метоксіетил-модифікований нуклеозид,

d=2'-дезоксинуклеозид і

s=тіофосфатний міжнуклеозидний зв'язок.

У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить або складається з ISIS 510100 і кон'югувальної групи. ISIS 510100 являє собою модифікований олігонуклеотид, що має формулу: Ges Ges mCes Ads Tds Ads Gds mCds Ads Gds mCds Ads Gds Ges Aes Tes Ge, де

A=аденін,

mC=5'-метилцитозин

G=гуанін,

T=тимін,

e=2'-О-метоксіетил-модифікований нуклеозид,

d=2'-дезоксинуклеозид і

s=тіофосфатний міжнуклеозидний зв'язок.

У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить або складається з ISIS 552023 і кон'югувальної групи. ISIS 552023 являє собою модифікований олігонуклеотид, що має формулу: Aes Ges Ges Aes Ges Tes Tds mCds mCds Gds mCds Ads Gds Tds Ads Tds Ges Ges Aes Te, де

A=аденін,

mC=5'-метилцитозин

G=гуанін,

T=тимін,

e=2'-О-метоксіетил-модифікований нуклеозид,

d=2'-дезоксинуклеозид і

s=тіофосфатний міжнуклеозидний зв'язок.

У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить або складається з ISIS 552024 і кон'югувальної групи. ISIS 552024 являє собою модифікований олігонуклеотид, що має формулу: Ges Tes Ges Aes Aes Ges mCds Gds Ads Ads Gds Tds Gds mCds Ads mCds Aes mCes Ges Ge, де

A=аденін,

mC=5'-метилцитозин

G=гуанін,

T=тимін,

e=2'-О-метоксіетил-модифікований нуклеозид,

5 d=2'-дезоксинуклеозид і

s=тіофосфатний міжнуклеозидний зв'язок.

У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить або складається з ISIS 552032 і кон'югувальної групи. ISIS 552032 являє собою модифікований олігонуклеотид, що має формулу: Ges Tes Ges mCes Aes Ges Ads Gds Gds Tds Gds Ads Ads Gds mCds Gds Aes Aes Ges

10 Те, де

A=аденін,

mC=5'-метилцитозин

G=гуанін,

T=тимін,

15 e=2'-О-метоксіетил-модифікований нуклеозид,

d=2'-дезоксинуклеозид і

s=тіофосфатний міжнуклеозидний зв'язок.

У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить або складається з ISIS 552859 і кон'югувальної групи. ISIS 552859 являє собою модифікований олігонуклеотид, що має формулу: Aes Gks Gks Tds Gds Ads Ads Gds mCds Gds Ads Ads Gds Tks Gks mCe, де

20

A=аденін,

mC=5'-метилцитозин

G=гуанін,

T=тимін,

25 e=2'-О-метоксіетил-модифікований нуклеозид,

k=cEt-модифікований нуклеозид,

d=2'-дезоксинуклеозид і

s=тіофосфатний міжнуклеозидний зв'язок.

У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить або складається з ISIS 552925 і кон'югувальної групи. ISIS 552925 являє собою модифікований олігонуклеотид, що має формулу: Tes mCks mCds Gds mCds Ads Gds Tds Ads Tds Gds Gds Aks Tes mCks Ge, де

30

A=аденін,

mC=5'-метилцитозин

G=гуанін,

35 T=тимін,

e=2'-О-метоксіетил-модифікований нуклеозид,

k=cEt-модифікований нуклеозид,

d=2'-дезоксинуклеозид і

s=тіофосфатний міжнуклеозидний зв'язок.

40

s=тіофосфатний міжнуклеозидний зв'язок.

У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить або складається з ISIS 577119 і кон'югувальної групи. ISIS 577119 являє собою модифікований олігонуклеотид, що має формулу: Aks Ads Tks Tds Tks Ads Tds Gds mCds mCds Tds Ads mCds Aes Ges mCes mCes Te, де

45

A=аденін,

mC=5'-метилцитозин

G=гуанін,

T=тимін,

e=2'-О-метоксіетил-модифікований нуклеозид,

50

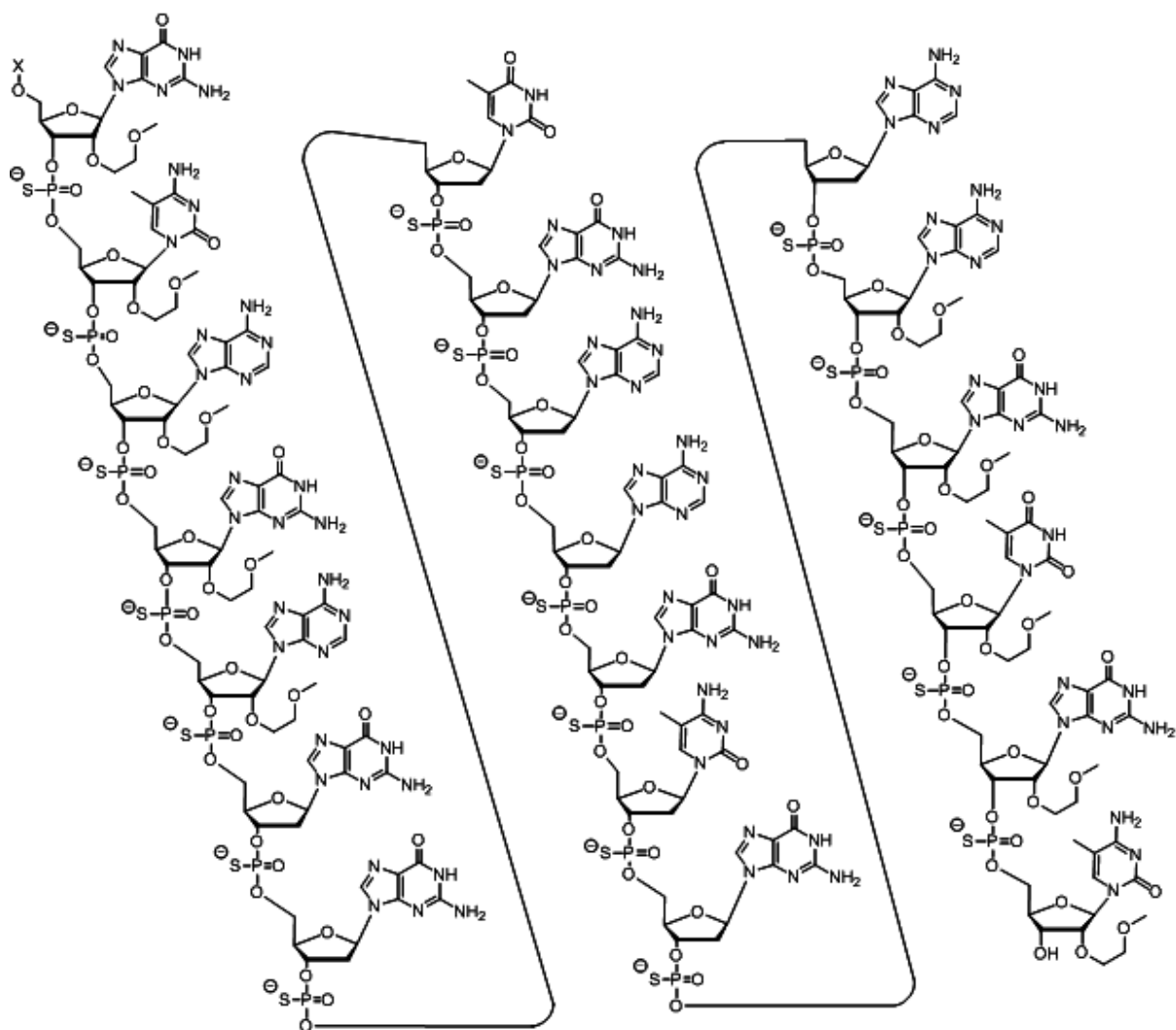
k=cEt-модифікований нуклеозид,

d=2'-дезоксинуклеозид і

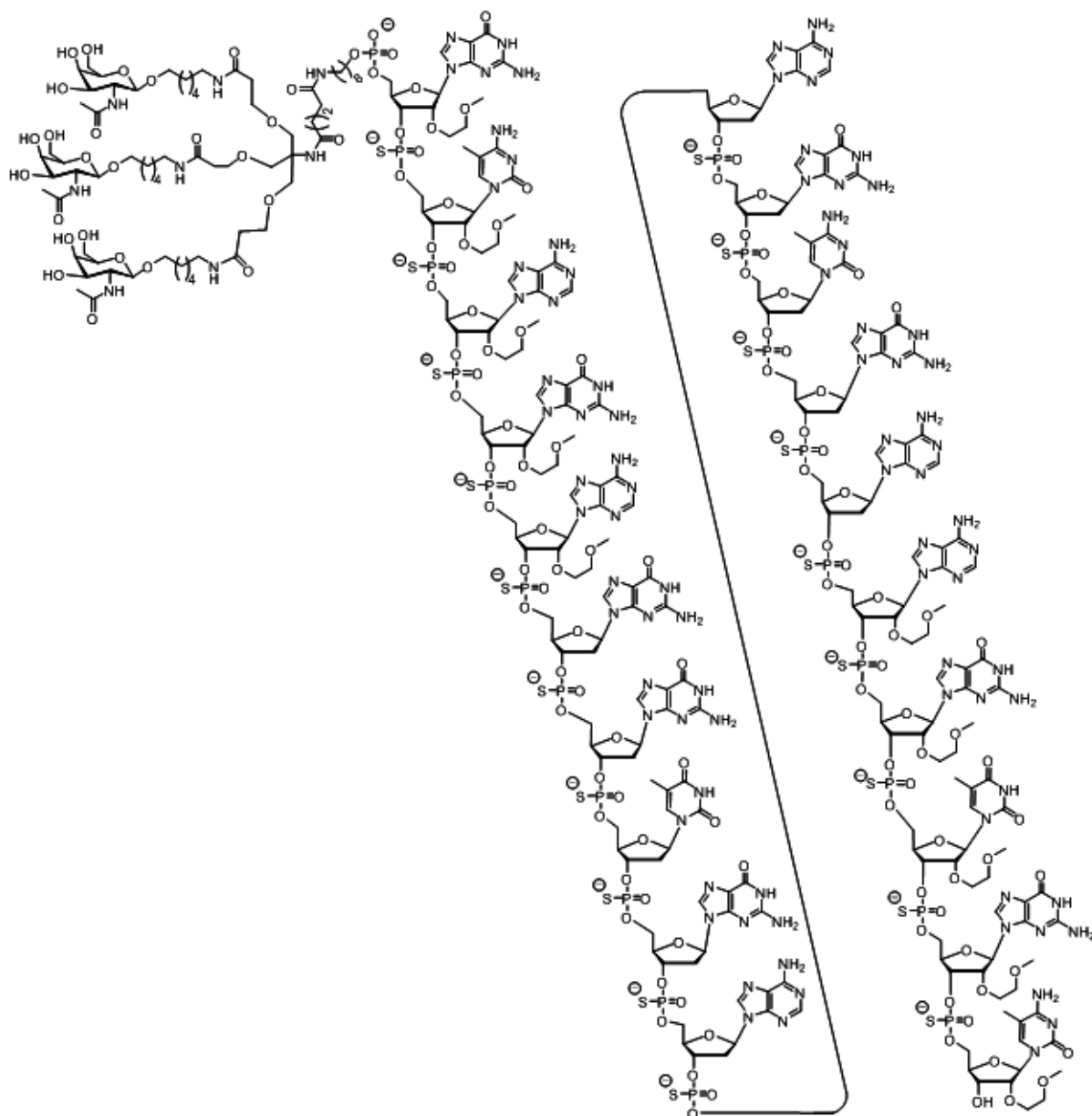
s=тіофосфатний міжнуклеозидний зв'язок.

У деяких варіантах реалізації винаходу сполука, що має наступну хімічну структуру, містить або складається з ISIS 505358 із 5'-X, де X являє собою кон'югувальну групу, описану в даному документі:

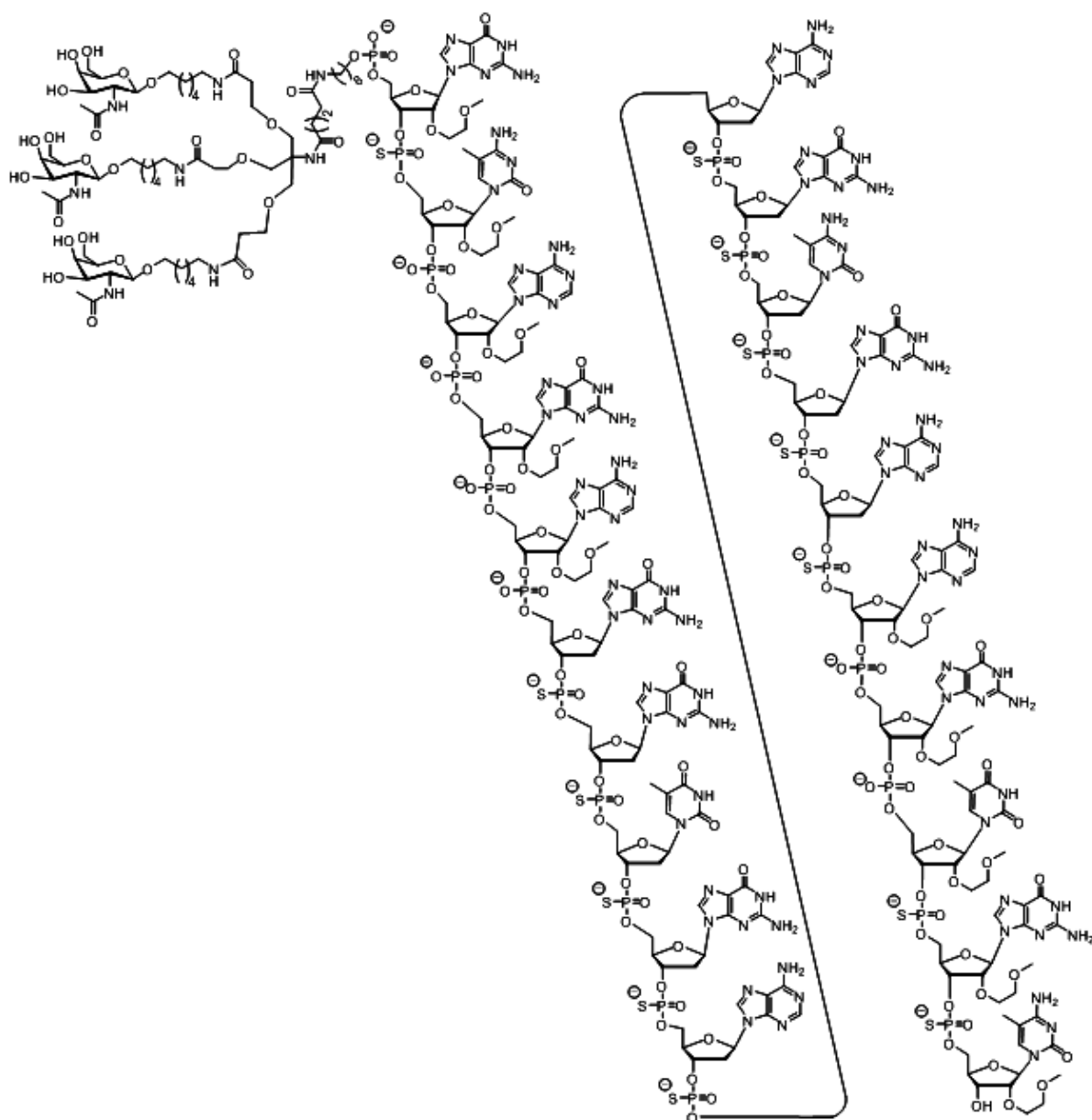
55



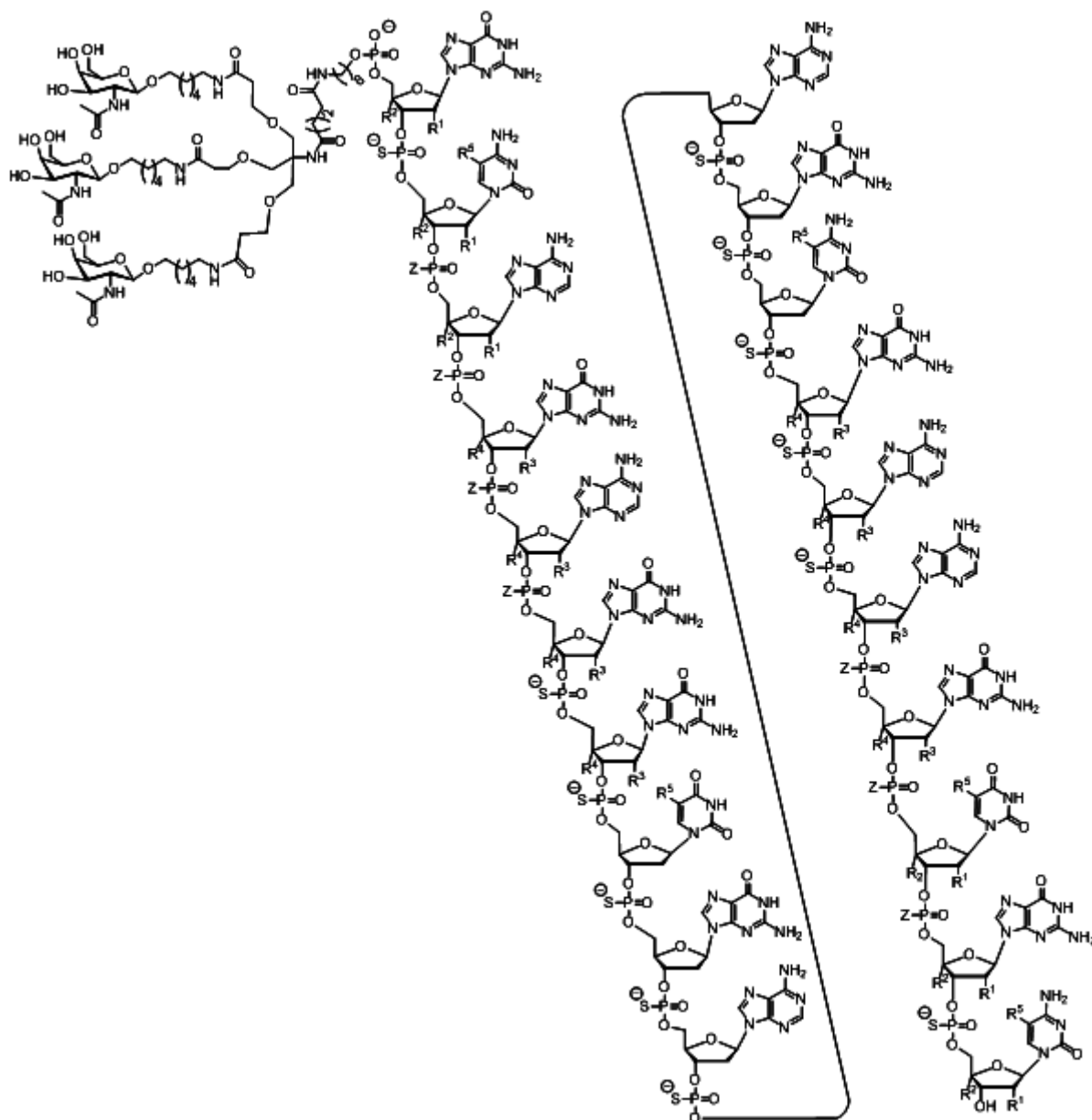
У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить або складається з ISIS 712408, що має наступну хімічну структуру:



У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить або складається з ISIS 695324, що має наступну хімічну структуру:



У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить або складається з SEQ ID NO: 3, 5'-GalNAc і хімічних модифікацій і представлена наступною хімічною структурою:



де будь-який R^1 являє собою $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ (MOE), а R^2 являє собою H; або R^1 і R^2 разом утворюють місток, причому R^1 являє собою $-\text{O}-$, а R^2 являє собою $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ або $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, і R^1 і R^2 з'єднані напряму таким чином, що місток, який утворюється, вибраний з: $-\text{O}-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ і $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$;

і для кожної пари з R^3 і R^4 у одного кільця, для кожного кільця незалежно: будь-який R^3 вибраний з H і $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, а R^4 являє собою H; або R^3 і R^4 разом утворюють місток, причому R^3 являє собою $-\text{O}-$, а R^4 являє собою $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ або $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, і R^3 і R^4 з'єднані напряму таким чином, що місток, який утворюється, вибраний з: $-\text{O}-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ і $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$;

і R^5 вибраний з H і $-\text{CH}_3$;

а Z вибраний з S- і O-.

У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить антисмисловий олігонуклеотид, описаний в публікації WO 2012/145697, повний зміст якої включений до даного документу шляхом посилання, і кон'югвальну групу, описану в даному документі. У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить антисмисловий олігонуклеотид, що має послідовність азотистих основ будь-якої із SEQ ID NO 5-310, 321-802, 804-1272, 1288-1350, 1364-1372, 1375, 1376 і 1379, описаних у WO 2012/145697, і кон'югвальну групу, описану в даному документі. У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить антисмисловий олігонуклеотид, описаний

в публікації WO 2011/047312, повний зміст якої включений до даного документу шляхом посилання, і кон'югвальну групу, описану в даному документі. У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить антисмисловий олігонуклеотид, що має послідовність азотистих основ будь-якої із SEQ ID NO 14-22, описаних у WO 2011/047312, і кон'югвальну групу, описану в даному документі. У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить антисмисловий олігонуклеотид, описаний в публікації WO 2012/145674, повний зміст якої включений до даного документу шляхом посилання, і кон'югвальну групу, описану в даному документі. У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить антисмисловий олігонуклеотид, що має послідовність азотистих основ будь-якої із SEQ ID NO 18-35, описаних у WO 2012/145674. У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить дволанцюговий олігонуклеотид, описаний в публікації WO 2013/159109, повний зміст якої включений до даного документу шляхом посилання, і кон'югвальну групу, описану в даному документі. У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить дволанцюговий олігонуклеотид, в якому одна спіраль має послідовність азотистих основ будь-якої із SEQ ID NO 30-125, описаних у WO 2013/159109. Послідовності азотистих основ всіх вищезгаданих референтних SEQ ID NO включені до даного документу шляхом посилання.

Терапевтичні показання для HBV

У деяких варіантах реалізації даного винаходу наведені способи застосування кон'югованої антисмислової сполуки, націленої на нуклеїнову кислоту HBV, для модуляції експресії HBV у суб'єкта. У деяких варіантах реалізації винаходу експресія HBV знижується.

У деяких варіантах реалізації даного винаходу наведені способи застосування кон'югованої антисмислової сполуки, націленої на нуклеїнову кислоту HBV, у фармацевтичній композиції для лікування суб'єкта. У деяких варіантах реалізації винаходу суб'єкт страждає на патологічний стан, пов'язаний з HBV. У деяких варіантах реалізації винаходу патологічний стан, пов'язаний з HBV, включає, але без обмеження, хронічну HBV інфекцію, запалення, фіброз, цироз, рак печінки, сироватковий гепатит, розлиття жовчі, рак печінки, запалення печінки, фіброз печінки, цироз печінки, печінкову недостатність, дифузне гепатоцелюлярне запальне захворювання, гемофагоцитарний синдром, сироватковий гепатит і HBV віремію. У деяких варіантах реалізації винаходу патологічний стан, пов'язаний з HBV, може характеризуватися симптомами, які можуть включати будь-яку або всі з наступних ознак: грипозне захворювання, слабкість, біль, головний біль, гарячка, втрата апетиту, діарея, розлиття жовчі, нудота і блювання, біль у ділянці печінки, випорожнення глинистого або сірого кольору, загальний свербіж і сеча темного кольору, в поєднанні з позитивним тестом на наявність вірусу гепатиту В, вірусного антигену гепатиту В або позитивним тестом на наявність антитіла, специфічного до вірусного антигену гепатиту В. У деяких варіантах реалізації винаходу суб'єкт має ризик патологічного стану, пов'язаного з HBV. Сюди входять суб'єкти, що мають один або декілька факторів ризику розвинути патологічного стану, пов'язаного з HBV, включаючи статевий контакт з індивідом, інфікованим вірусом гепатиту В, проживання в одному будинку з індивідом з довічною інфекцією вірусом гепатиту В, контакт із кров'ю людини, інфікованої вірусом гепатиту В, ін'єкція заборонених речовин суб'єктом з гемофілією і відвідування місць розповсюдження гепатиту В. У деяких варіантах реалізації винаходу у суб'єкта ідентифікована необхідність лікування патологічного стану, пов'язаного з HBV.

У деяких варіантах реалізації винаходу запропонований спосіб зниження рівнів ДНК HBV та/або антигенів HBV у тварини, інфікованої HBV, який включає введення вказаній тварині кон'югованої антисмислової сполуки, націленої на нуклеїнову кислоту HBV. У деяких варіантах реалізації винаходу антиген являє собою HBsAG або HBeAG. У деяких варіантах реалізації винаходу кількість антигену HBV може істотно знижуватися, що приводить до сероконверсії.

У деяких варіантах реалізації даного винаходу наведені способи застосування кон'югованої антисмислової сполуки, націленої на нуклеїнову кислоту HBV, для виробництва лікарського засобу.

У деяких варіантах реалізації даного винаходу запропонована кон'югована антисмислова сполука, націлена на нуклеїнову кислоту HBV, або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування в терапії.

У деяких варіантах реалізації винаходу запропонована кон'югована антисмислова сполука, націлена на нуклеїнову кислоту HBV, для застосування при лікуванні патологічного стану, пов'язаного з HBV. Патологічний стан, пов'язаний з HBV, включає, але без обмеження, хронічну HBV інфекцію, запалення, фіброз, цироз, рак печінки, сироватковий гепатит, розлиття жовчі, рак печінки, запалення печінки, фіброз печінки, цироз печінки, печінкову недостатність, дифузне гепатоцелюлярне запальне захворювання, гемофагоцитарний синдром, сироватковий гепатит і HBV віремію.

У деяких варіантах реалізації винаходу запропонована кон'югована антисмислова сполука, націлена на нуклеїнову кислоту HBV, для застосування з метою зниження рівнів ДНК HBV та/або антигену HBV у тварини, інфікованої HBV, що включає введення вказаній тварині кон'югованої антисмислової сполуки, націленої на нуклеїнову кислоту HBV. У деяких варіантах реалізації винаходу антиген являє собою HBsAG або HBeAG. У деяких варіантах реалізації винаходу кількість антигену HBV може істотно знижуватися, що приводить до сероконверсії.

Потрібно розуміти, що будь-яку з описаних в даному документі сполук можна застосовувати у вищезазначених способах і видах застосування. Наприклад, у деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на нуклеїнову кислоту HBV, у вищезазначених способах і видах застосування може включати, але без обмеження, кон'юговану антисмислову сполуку, націлену на SEQ ID NO: 1, яка містить щонайменше 8 суміжних азотистих основ послідовності SEQ ID NO: 3-11; кон'юговану антисмислову сполуку, націлену на SEQ ID NO: 1, яка містить послідовність азотистих основ будь-якої із SEQ ID NO: 3-11; сполуку, що містить або складається з ISIS 505358, ISIS 509934, ISIS 510100, ISIS 552023, ISIS 552024, ISIS 552032, ISIS 552859, ISIS 552925, або ISIS 577119 і кон'югувальної групи; сполуку, що містить антисмисловий олігонуклеотид, описаний в публікації WO 2012/145697, повний опис якої включений до даного документу шляхом посилання, і кон'югувальну групу; сполуку, що містить антисмисловий олігонуклеотид, який має послідовність азотистих основ будь-якої із SEQ ID NO 5-310, 321-802, 804-1272, 1288-1350, 1364-1372, 1375, 1376 і 1379, описаних у WO 2012/145697, і кон'югувальну групу, описану в даному документі; сполуку, що містить антисмисловий олігонуклеотид, який має послідовність азотистих основ будь-якої із SEQ ID NO 14-22, описаних у WO 2011/047312, і кон'югувальну групу, описану в даному документі; сполуку, що містить антисмисловий олігонуклеотид, який має послідовність азотистих основ будь-якої із SEQ ID NO 18-35, описаних у WO 2012/145674; або сполуку, що містить дволанцюговий олігонуклеотид, в якому одна спіраль має послідовність азотистих основ будь-якої із SEQ ID NO 30-125, описаних у WO 2013/159109.

2. Транстиретин (TTR)

TTR (також відомий як преальбумін, гіпертироксинемія, диспреальбумінемія, тироксин; старечий системний амілоїдоз, амілоїдна поліневропатія, амілоїдоз I, PALB; дистранстиретинемія, HST2651; TBPA; диспреальбумінемія еутиреоїдна гіпертироксинемія) являє собою білок сироватки/плазми і спинномозкової рідини, що відповідає за транспорт тироксину і ретинолу (Sakaki et al, Mol Biol Med. 1989, 6:161-8). Структурно TTR являє собою гомотетрамер; точкові мутації і неправильне згортання білка призводять до відкладення амілоїдних фібрил і супроводжуються такими розладами як старечий системний амілоїдоз (SSA), родинна амілоїдна поліневропатія (FAP) і родинна амілоїдна кардіопатія (FAC).

У людини TTR синтезується, в основному, печінкою і хоріоїдним сплетінням головного мозку, а також, меншою мірою, сітківкою ока (Palha, Clin Chem Lab Med, 2002, 40, 1292-1300). Транстиретин, синтезований в печінці, секритується в кров, тоді як транстиретин з хоріоїдного сплетіння призначений для спинномозкової рідини (CSF). Синтез транстиретину в хоріоїдному сплетінні складає близько 20 % від загального локального синтезу білка і аж 25 % від загального білка CSF (Dickson et al., J Biol Chem, 1986, 261, 3475-3478).

Завдяки можливості виконання генетичних та імуногістохімічних діагностичних тестів, були знайдені пацієнти з TTR амілоїдозом у багатьох народів світу. Нещодавні дослідження показали, що TTR амілоїдоз не є рідкісним ендемічним захворюванням, як вважалося раніше, і може вражати не менше 25 % дорослого населення (Tanskanen et al, Ann Med. 2008;40(3):232-9).

На біохімічному рівні TTR було визначено як основний білковий компонент в амілоїдних відкладеннях пацієнтів з FAP (Costa et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1978, 75:4499-4503), а пізніше було знайдено, що заміна метіоніну на валін в положенні 30 цього білка є найпоширенішим молекулярним дефектом, що спричиняє дане захворювання (Saraiva et al, J. Clin. Invest. 1984, 74: 104-119). При FAP відбувається повсюдне системне позаклітинне відкладення скупчень TTR, і амілоїдні волокнини виникають по всій сполучній тканині, особливо у периферичній нервовій системі (Sousa and Saraiva, Prog. Neurobiol. 2003, 71: 385-400). Після відкладення TTR відбувається аксонна дегенерація, що бере початок в немієлінізованих і мієлінізованих волокнах малого діаметру і зрештою призводить до втрати нейронів у гангліонарних центрах.

Антисмислові сполуки, націлені на TTR, були описані раніше в US2005/0244869, WO2010/017509 і WO2011/139917, повний зміст кожного з яких включений до даного документу шляхом посилання. Антисмислова олігоазотиста основа, націлена на TTR, ISIS-TTR_{Rx}, на даний час проходить 2/3 фазу клінічних випробувань для дослідження її ефективності при лікуванні

суб'єктів, які страждають на родинну амілоїдну поліневропатію. Однак, все ще існує необхідність в забезпеченні пацієнтів додатковими, більш ефективними можливостями лікування.

Деякі кон'юговані антисмислові сполуки, націлені на нуклеїнову кислоту TTR

5 У деяких варіантах реалізації винаходу кон'юговані антисмислові сполуки націлені на нуклеїнову кислоту TTR, що має послідовність з номером доступу GENBANK® NM_000371.3, яка включена до даного документу як SEQ ID NO: 2. У деяких таких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 2, є щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 % або на 100 % комплементарною SEQ ID NO: 2.

10 У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 2, містить щонайменше 8 суміжних азотистих основ будь-якої із SEQ ID NO: 12-19. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 2, містить послідовність азотистих основ будь-якої із SEQ ID NO: 12-19.

15 У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 2, містить щонайменше 8 суміжних азотистих основ послідовності SEQ ID NO: 12. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 2, містить послідовність азотистих основ SEQ ID NO: 12.

20 У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 2, містить щонайменше 8 суміжних азотистих основ послідовності SEQ ID NO: 13. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 2, містить послідовність азотистих основ SEQ ID NO: 13.

25 У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 2, містить щонайменше 8 суміжних азотистих основ послідовності SEQ ID NO: 14. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 2, містить послідовність азотистих основ SEQ ID NO: 14.

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 2, містить щонайменше 8 суміжних азотистих основ послідовності SEQ ID NO: 15. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 2, містить послідовність азотистих основ SEQ ID NO: 15.

30 У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 16, містить щонайменше 8 суміжних азотистих основ послідовності SEQ ID NO: 78. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 16, містить послідовність азотистих основ SEQ ID NO: 78.

35 У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 2, містить щонайменше 8 суміжних азотистих основ послідовності SEQ ID NO: 17. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 2, містить послідовність азотистих основ SEQ ID NO: 17.

40 У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 2, містить щонайменше 8 суміжних азотистих основ послідовності SEQ ID NO: 18. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 2, містить послідовність азотистих основ SEQ ID NO: 18.

45 У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 2, містить щонайменше 8 суміжних азотистих основ послідовності SEQ ID NO: 19. У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на SEQ ID NO: 2, містить послідовність азотистих основ SEQ ID NO: 19.

Таблиця 3

Антисмислові сполуки, націлені на TTR SEQ ID NO: 2

ISIS №	Сайт-мішень ініціації	Послідовність (5'-3")	Мотив	SEQ ID NO
420915	508	TCTTGGTTACATGAAATCCC	eeeeeddddddddeeeee	12
304299	507	CTTGGTTACATGAAATCCCA	eeeeeddddddddeeeee	13
420921	515	GGAATACTCTTGGTTACATG	eeeeeddddddddeeeee	14
420922	516	TGGAATACTCTTGGTTACAT	eeeeeddddddddeeeee	15
420950	580	TTTTATTGTCTCTGCCTGGA	eeeeeddddddddeeeee	16
420955	585	GAATGTTTTATTGTCTCTGC	eeeeeddddddddeeeee	17
420957	587	AGGAATGTTTTATTGTCTCT	eeeeeddddddddeeeee	18
420959	589	ACAGGAATGTTTTATTGTCT	eeeeeddddddddeeeee	19

У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить або складається з ISIS 420915 і кон'югувальної групи. ISIS 420915 являє собою модифікований олігонуклеотид, що має формулу: Tes mCes Tes Tes Ges Gds Tds Tds Ads mCds Ads Tds Gds Ads Ads Aes Tes mCes mCes mCe, де

- 5 A=аденін,
mC=5'-метилцитозин
G=гуанін,
T=тимін,
e=2'-О-метоксіетил-модифікований нуклеозид,
10 d=2'-дезоксинуклеозид і
s=тіофосфатний міжнуклеозидний зв'язок.

У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить або складається з ISIS 304299 і кон'югувальної групи. ISIS 304299 являє собою модифікований олігонуклеотид, що має формулу: mCes Tes Tes Ges Ges Tds Tds Ads mCds Ads Tds Gds Ads Ads Ads Tes mCes mCes

- 15 mCes Ae, де
A=аденін,
mC=5'-метилцитозин
G=гуанін,
T=тимін,
20 e=2'-О-метоксіетил-модифікований нуклеозид,
d=2'-дезоксинуклеозид і
s=тіофосфатний міжнуклеозидний зв'язок.

У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить або складається з ISIS 420921 і кон'югувальної групи. ISIS 420921 являє собою модифікований олігонуклеотид, що має формулу: Ges Ges Aes Aes Tes Ads mCds Tds mCds Tds Tds Gds Gds Tds Tds Aes mCes Aes Tes Ge, де

- A=аденін,
mC=5'-метилцитозин
G=гуанін,
T=тимін,
30 e=2'-О-метоксіетил-модифікований нуклеозид,
d=2'-дезоксинуклеозид і
s=тіофосфатний міжнуклеозидний зв'язок.

У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить або складається з ISIS 420922 і кон'югувальної групи. ISIS 420922 являє собою модифікований олігонуклеотид, що має формулу: Tes Ges Ges Aes Aes Tds Ads mCds Tds mCds Tds Tds Gds Gds Tds Tes Aes mCes Aes Te, де

- A=аденін,
mC=5'-метилцитозин
40 G=гуанін,
T=тимін,
e=2'-О-метоксіетил-модифікований нуклеозид,
d=2'-дезоксинуклеозид і
s=тіофосфатний міжнуклеозидний зв'язок.

У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить або складається з ISIS 420950 і кон'югувальної групи. ISIS 420950 являє собою модифікований олігонуклеотид, що має формулу: Tes Tes Tes Tes Aes Tds Tds Gds Tds mCds Tds mCds Tds Gds mCds mCes Tes Ges Ges Ae, де

- A=аденін,
50 mC=5'-метилцитозин
G=гуанін,
T=тимін,
e=2'-О-метоксіетил-модифікований нуклеозид,
d=2'-дезоксинуклеозид і
55 s=тіофосфатний міжнуклеозидний зв'язок.

У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить або складається з ISIS 420955 і кон'югувальної групи. ISIS 420955 являє собою модифікований олігонуклеотид, що має формулу: Ges Aes Aes Tes Ges Tds Tds Tds Tds Ads Tds Tds Gds Tds mCds Tes mCes Tes Ges mCe, де

- 60 A=аденін,

mC=5'-метилцитозин

G=гуанін,

T=тимін,

e=2'-О-метоксіетил-модифікований нуклеозид,

5 d=2'-дезоксинуклеозид і

s=тіофосфатний міжнуклеозидний зв'язок.

У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить або складається з ISIS 420957 і кон'югувальної групи. ISIS 420957 являє собою модифікований олігонуклеотид, що має формулу: Aes Ges Ges Aes Aes Tds Gds Tds Tds Tds Tds Ads Tds Tds Gds Tes mCes Tes mCes

10 Те, де

A=аденін,

mC=5'-метилцитозин

G=гуанін,

T=тимін,

15 e=2'-О-метоксіетил-модифікований нуклеозид,

d=2'-дезоксинуклеозид і

s=тіофосфатний міжнуклеозидний зв'язок.

У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить або складається з ISIS 420959 і кон'югувальної групи. ISIS 420959 являє собою модифікований олігонуклеотид, що має формулу: Aes mCes Aes Ges Ges Ads Ads Tds Gds Tds Tds Tds Tds Ads Tds Tes Ges Tes mCes

20 Те, де

A=аденін,

mC=5'-метилцитозин

G=гуанін,

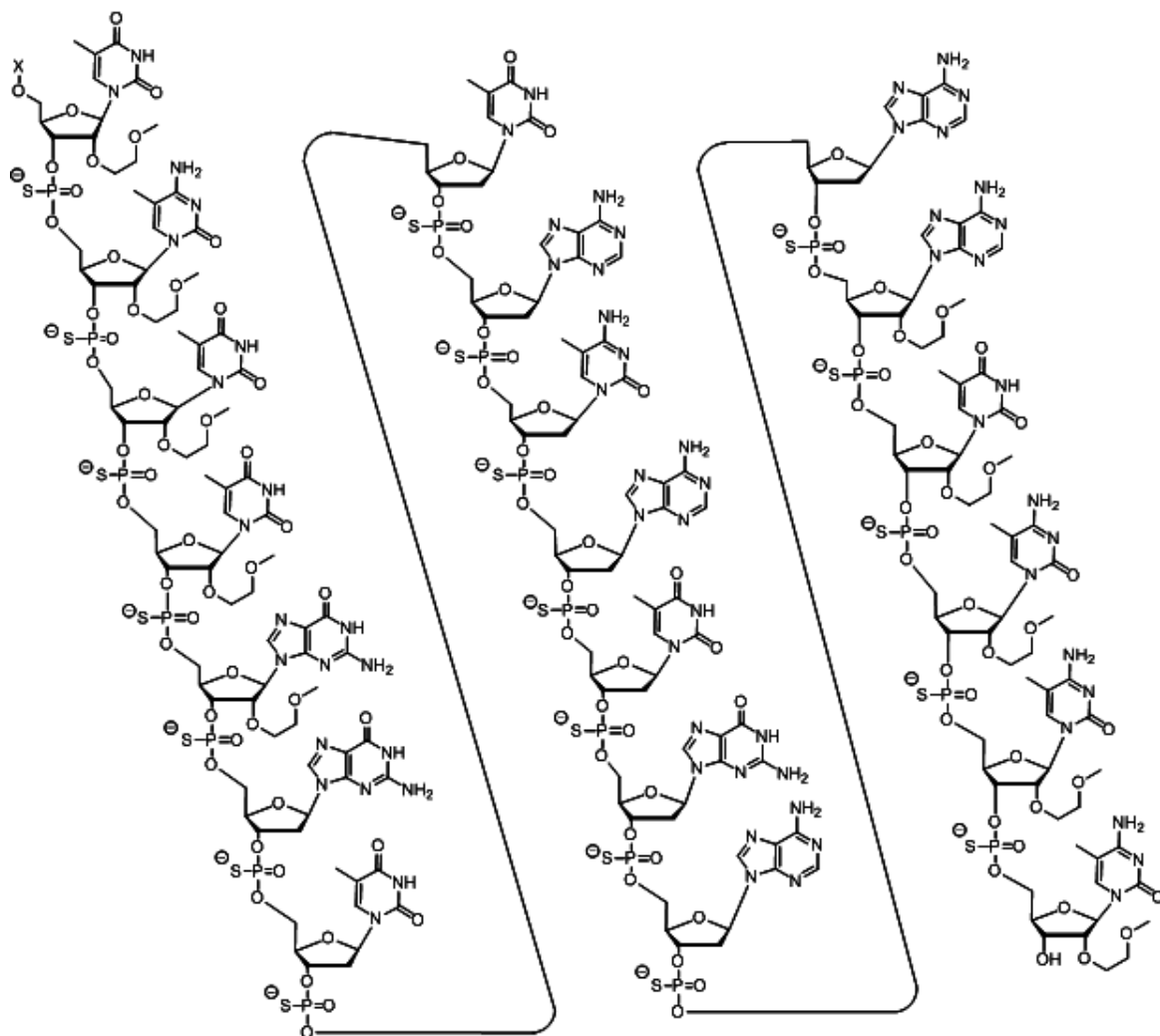
25 T=тимін,

e=2'-О-метоксіетил-модифікований нуклеозид,

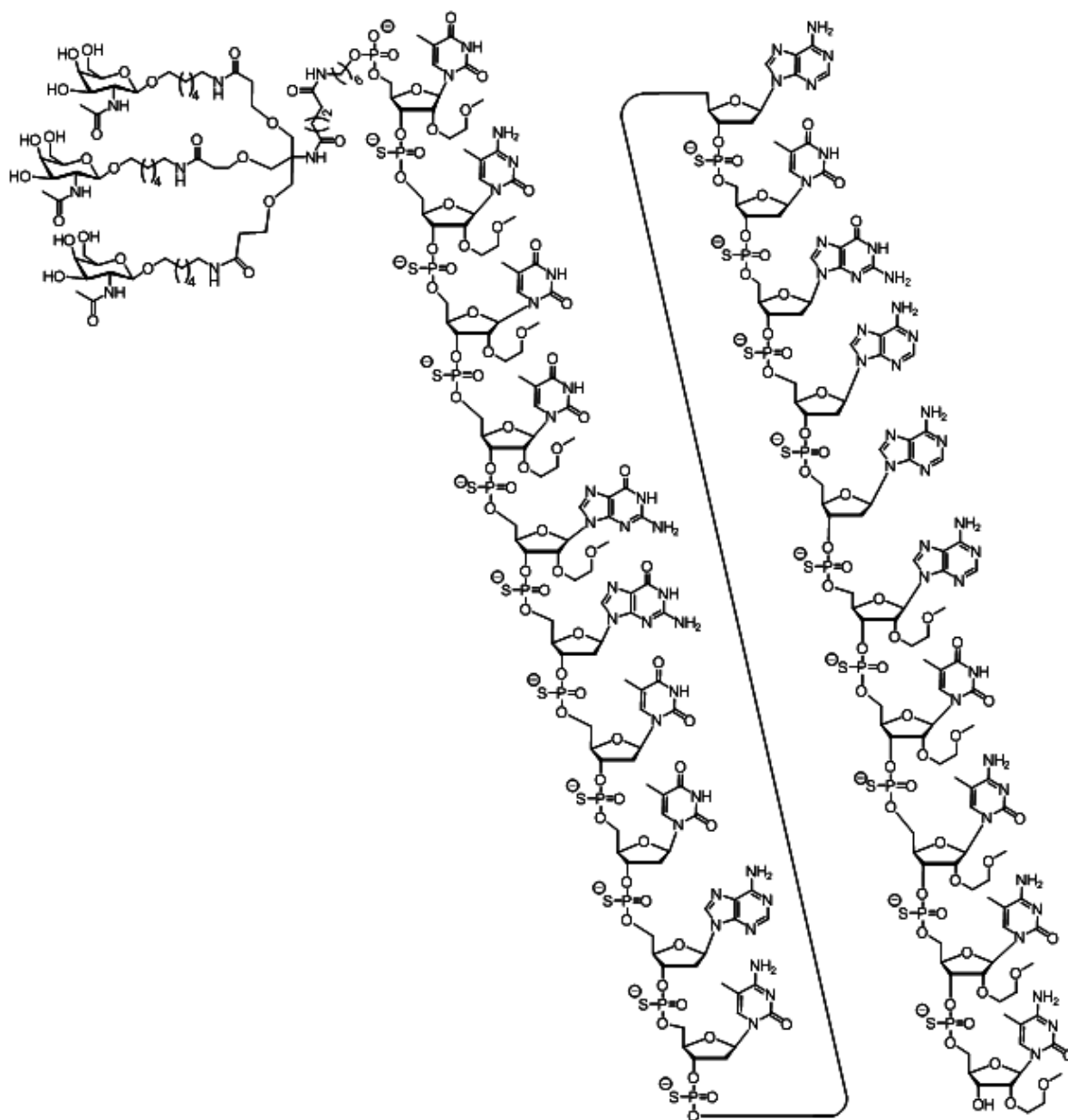
d=2'-дезоксинуклеозид і

s=тіофосфатний міжнуклеозидний зв'язок.

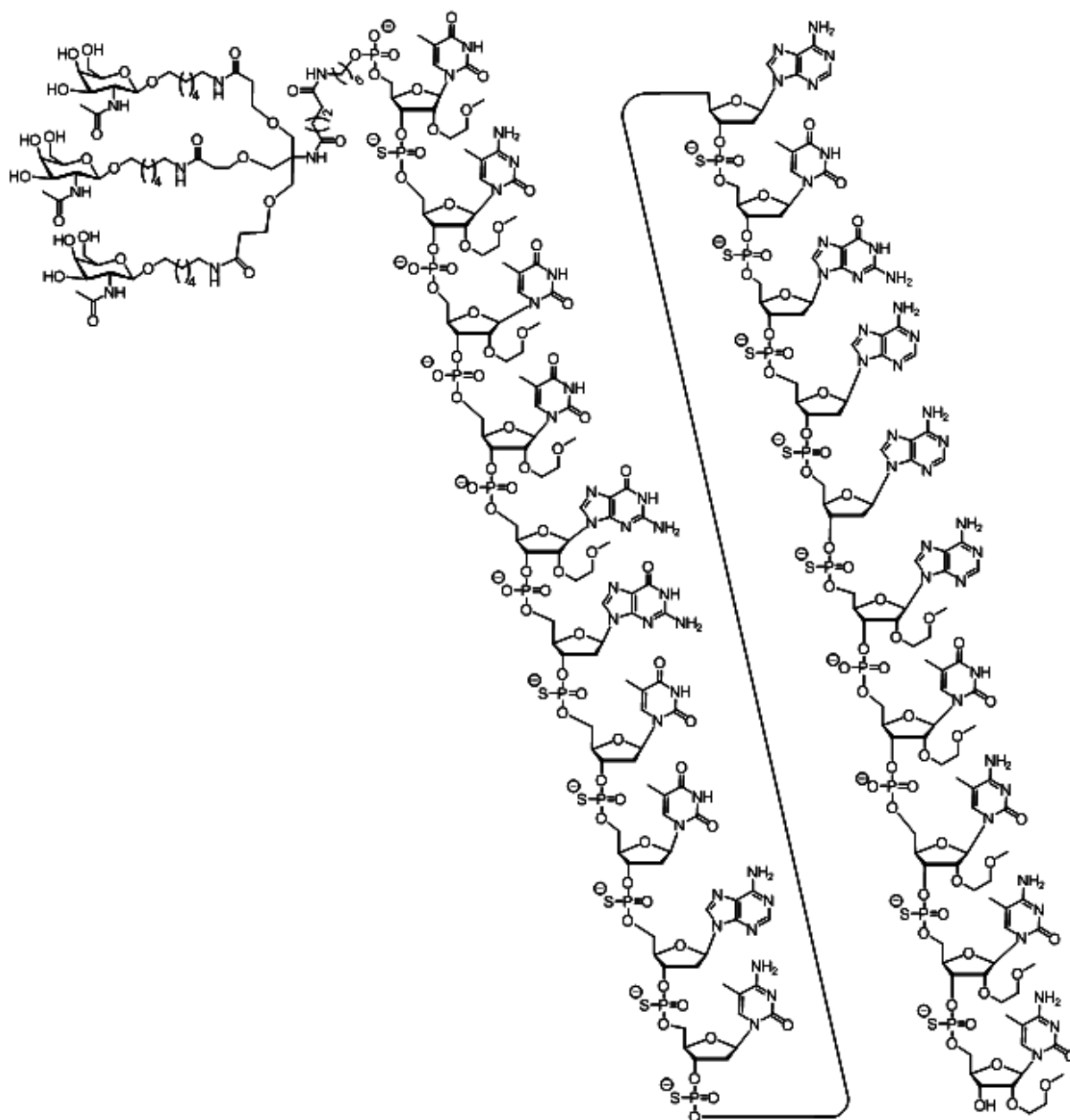
30 У деяких варіантах реалізації винаходу сполука, що має наступну хімічну структуру, містить або складається з ISIS 420915 із 5'-X, де X являє собою кон'югувальну групу, описану в даному документі:



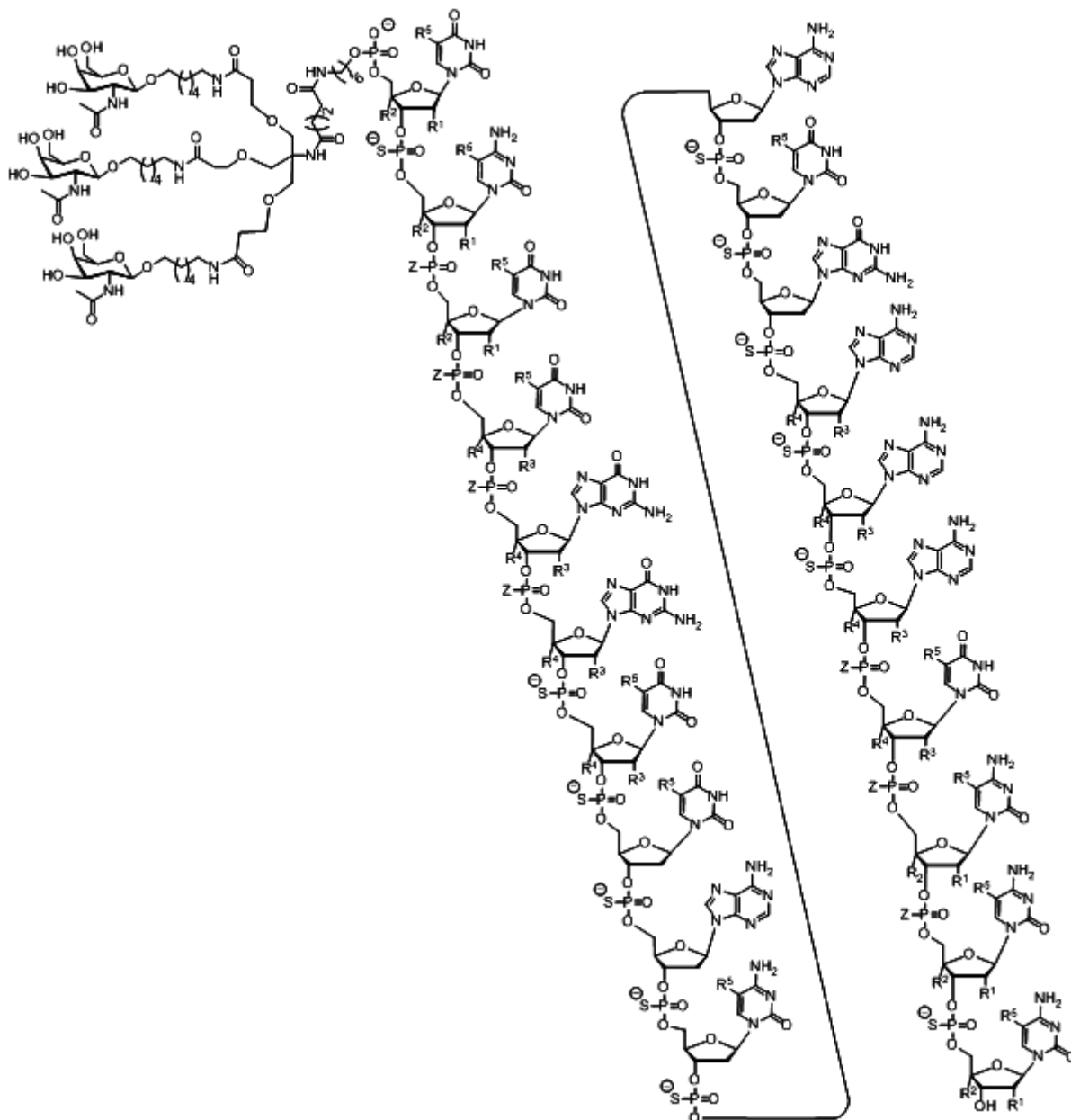
У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить або складається з ISIS 682877, що має наступну хімічну структуру:



У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить або складається з ISIS 682884, що має наступну хімічну структуру:



У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить або складається з SEQ ID NO: 12, 5'-GalNAc і хімічних модифікацій, і представлена наступною хімічною структурою:



де будь-який R^1 являє собою $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ (MOE), а R^2 являє собою H; або R^1 і R^2 разом утворюють місток, причому R^1 являє собою $-\text{O}-$, а R^2 являє собою $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ або $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, і R^1 і R^2 з'єднані напряму таким чином, що місток, який утворюється, вибраний з: $-\text{O}-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ і $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$;

і для кожної пари з R^3 і R^4 у одного кільця, для кожного кільця незалежно: будь-який R^3 вибраний з H і $-OCH_2CH_2OCH_3$, а R^4 являє собою H ; або R^3 і R^4 разом утворюють місток, причому R^3 являє собою $-O-$, а R^4 являє собою $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$ або $-CH_2CH_2-$, і R^3 і R^4 з'єднані напряму таким чином, що місток, який утворюється, вибраний з: $-O-CH_2-$, $-O-CH(CH_3)-$ і $-O-CH_2CH_2-$;

і R^5 вибраний з H і $-CH_3$;

а Z вибраний з S- і O-.

У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить антисмисловий олігонуклеотид, описаний в публікації WO 2011/139917 або US 8101743, повний зміст яких включений до даного документу шляхом посилання, і кон'югувальну групу. У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить антисмисловий олігонуклеотид, що має послідовність азотистих основ будь-якої із SEQ ID NO 8-160, 170-177, описаних у WO 2011/139917, і кон'югувальну групу, описану в даному документі. У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить антисмисловий олігонуклеотид, що має послідовність азотистих основ будь-якої із SEQ ID NO 12-89, описаних в

US 8 101 743, і кон'югвальну групу, описану в даному документі. У деяких варіантах реалізації винаходу сполука містить антисмисловий олігонуклеотид, що має послідовність азотистих основ, комплементарну переважному цільовому сегменту будь-якої із SEQ ID NO 90-133, описаних в US 8101743, і кон'югвальну групу, описану в даному документі. Послідовності азотистих основ всіх вищезгаданих довідкових SEQ ID NO включені до даного документу шляхом посилання.

Терапевтичні показання для TTR

У деяких варіантах реалізації даного винаходу наведені способи застосування кон'югованої антисмислової сполуки, націленої на нуклеїнову кислоту TTR, для модуляції експресії TTR у суб'єкта. У деяких варіантах реалізації винаходу експресія TTR знижується.

У деяких варіантах реалізації даного винаходу наведені способи застосування кон'югованої антисмислової сполуки, націленої на нуклеїнову кислоту TTR, у фармацевтичній композиції для лікування суб'єкта. У деяких варіантах реалізації винаходу суб'єкт страждає на захворювання, розлад або патологічний стан, пов'язаний з транстиретином, або його симптом. У деяких варіантах реалізації винаходу захворювання, розлад або патологічний стан, пов'язані з транстиретином, являють собою транстиретиновий амілоїдоз. "Амілоїдоз, пов'язаний з транстиретином" або "транстиретиновий амілоїдоз", або "транстиретинове амілоїдне захворювання", при використанні в даному документі, є будь-якою патологією або захворюванням, пов'язаним з дисфункцією або дисрегуляцією транстиретину, яка приводить до утворення амілоїдних фібрил, що містять транстиретин. Транстиретиновий амілоїдоз включає, але без обмеження, спадковий TTR амілоїдоз, лептоменінгеальний амілоїдоз, родинну амілоїдну поліневропатію (FAP), родинну амілоїдну кардіоміопатію, родинний окулолептоменінгеальний амілоїдоз, старечий амілоїдоз серця або старечий системний амілоїдоз.

У деяких варіантах реалізації даного винаходу наведені способи застосування кон'югованої антисмислової сполуки, націленої на нуклеїнову кислоту TTR, для виробництва лікарського засобу.

У деяких варіантах реалізації даного винаходу запропонована кон'югована антисмислова сполука, націлена на нуклеїнову кислоту TTR, або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування в терапії.

У деяких варіантах реалізації винаходу запропонована кон'югована антисмислова сполука, націлена на нуклеїнову кислоту TTR, для застосування при лікуванні захворювання, розладу, патологічного стану або його симптому, пов'язаного з транстиретином. У деяких варіантах реалізації винаходу захворювання, розлад або патологічний стан, пов'язаний з транстиретином, є транстиретиновим амілоїдозом.

Потрібно розуміти, що будь-яку з описаних в даному документі сполук можна застосовувати у вищезазначених способах і видах застосування. Наприклад, у деяких варіантах реалізації винаходу кон'югована антисмислова сполука, націлена на нуклеїнову кислоту TTR, у вищезазначених способах і видах застосування може включати, але без обмеження, кон'юговану антисмислову сполуку, націлену на SEQ ID NO: 2, яка містить щонайменше 8 суміжних азотистих основ будь-якої із SEQ ID NO: 12-19; кон'юговану антисмислову сполуку, націлену на SEQ ID NO: 2, яка містить послідовність азотистих основ будь-якої із SEQ ID NO: 12-19; сполуку, що містить або складається з ISIS 420915, ISIS 304299, ISIS 420921, ISIS 420922, ISIS 420950, ISIS 420955, ISIS 420957 або ISIS 420959 і кон'югвальної групи; сполуку, що містить антисмисловий олігонуклеотид, описаний у WO 2011/139917 або US 8101743, повний зміст кожної з яких включений до даного документу шляхом посилання, і кон'югвальну групу; сполуку, що містить антисмисловий олігонуклеотид, який має послідовність азотистих основ будь-якої із SEQ ID NO 8-160, 170-177, описаних у WO 2011/139917, і кон'югвальну групу, описану в даному документі; антисмисловий олігонуклеотид, що має послідовність азотистих основ будь-якої із SEQ ID NO 12-89, описаних в US 8101743, і кон'югвальну групу, описану в даному документі; або сполуку, що містить антисмисловий олігонуклеотид, що має послідовність азотистих основ, комплементарну переважному цільовому сегменту будь-якої із SEQ ID NO 90-133, описаних в US 8101743, і кон'югвальну групу, описану в даному документі. Послідовності азотистих основ всіх вищезгаданих довідкових SEQ ID NO включені до даного документу шляхом посилання.

Е Деякі фармацевтичні композиції

У деяких варіантах реалізації даного опису наведені фармацевтичні композиції, що містять одну або декілька антисмислових сполук. У деяких варіантах реалізації винаходу така фармацевтична композиція містить відповідний фармацевтично прийнятний розріджувач або носій. У деяких варіантах реалізації винаходу фармацевтична композиція містить стерильний

сольовий розчин і одну або декілька антисмислових сполук. У деяких варіантах реалізації винаходу така фармацевтична композиція складається із стерильного сольового розчину і однієї або декількох антисмислових сполук. У деяких варіантах реалізації винаходу стерильний сольовий розчин є сольовим розчином фармацевтичної категорії. У деяких варіантах реалізації винаходу фармацевтична композиція містить одну або декілька антисмислових сполук і стерильну воду. У деяких варіантах реалізації винаходу фармацевтична композиція складається з однієї або декількох антисмислових сполук і стерильної води. У деяких варіантах реалізації винаходу стерильний сольовий розчин є водою фармацевтичної категорії. У деяких варіантах реалізації винаходу фармацевтична композиція містить одну або декілька антисмислових сполук і фосфатно-сольовий буферний розчин (PBS). У деяких варіантах реалізації винаходу фармацевтична композиція складається з однієї або декількох антисмислових сполук і фосфатно-сольового буферного розчину (PBS). У деяких варіантах реалізації винаходу стерильний сольовий розчин являє собою PBS фармацевтичної категорії.

У деяких варіантах реалізації винаходу антисмислові сполуки можуть бути змішані з фармацевтично прийнятними активними та/або інертними речовинами для одержання фармацевтичних композицій або складів. Композиції і способи складання фармацевтичних композицій залежать від численних критеріїв, включаючи, але без обмеження, спосіб введення, тяжкість захворювання або дозу, що підлягає введенню.

Фармацевтичні композиції, що містять антисмислові сполуки, охоплюють будь-які фармацевтично прийнятні солі, естери або солі таких естерів. У деяких варіантах реалізації винаходу фармацевтичні композиції, що містять антисмислові сполуки, містять один або декілька олігонуклеотидів, які при введенні ссавцю, включаючи людину, можуть забезпечувати (прямо або непрямо) її біологічно активний метаболіт або залишок. Відповідно, наприклад, даний опис стосується також фармацевтично прийнятних солей антисмислових сполук, проліків, фармацевтично прийнятних солей таких проліків та до інших біоеквівалентів. Відповідні фармацевтично прийнятні солі включають, без обмеження, солі натрію і калію.

Проліки можуть включати введення додаткових нуклеозидів на одному або обох кінцях олігонуклеотиду, які розщеплюються в організмі під дією ендогенних нуклеаз з утворенням активного антисмислового олігонуклеотиду.

У численних способах у терапевтичних засобах з нуклеїновими кислотами були застосовані ліпідні фрагменти. У деяких із таких способів нуклеїнову кислоту вводять до попередньо сформованих ліпосом або ліпоплексів, одержаних із сумішей катіонних ліпідів і нейтральних ліпідів. У деяких способах одержують ДНК комплекси з моно- або полікатіонними ліпідами без участі нейтрального ліпиду. У деяких варіантах реалізації винаходу ліпідний фрагмент вибраний для покращення розподілу фармацевтичного агента у певній клітині або тканині. У деяких варіантах реалізації винаходу ліпідний фрагмент вибраний для покращення розподілу фармацевтичного агента у жировій тканині. У деяких варіантах реалізації винаходу ліпідний фрагмент вибраний для покращення розподілу фармацевтичного агента у м'язовій тканині.

У деяких варіантах реалізації винаходу фармацевтичні композиції, представлені в даному документі, містять один або декілька модифікованих олігонуклеотидів і одну або декілька допоміжних речовин. У деяких таких варіантах реалізації винаходу допоміжні речовини вибрані з води, сольових розчинів, спирту, поліетиленгліколей, желатину, лактози, амілази, стеарату магнію, тальку, кремнієвої кислоти, в'язкого парафіну, гідроксиметилцелюлози і полівінілпіролідону.

У деяких варіантах реалізації винаходу фармацевтична композиція, представлена в даному документі, містить систему доставки. Приклади систем доставки включають, без обмеження, ліпосоми і емульсії. Деякі системи доставки підходять для одержання деяких фармацевтичних композицій, включаючи композиції, що містять гідрофобні сполуки. У деяких варіантах реалізації винаходу застосовують деякі органічні розчинники, такі як диметилсульфоксид.

У деяких варіантах реалізації винаходу фармацевтична композиція, представлена в даному документі, містить одну або декілька тканинспецифічних молекул доставки, призначених для доставки одного або декількох фармацевтичних агентів даного опису в певну тканину або типи клітин. Наприклад, у деяких варіантах реалізації винаходу фармацевтичні композиції включають ліпосоми, вкриті тканинспецифічним антитілом.

У деяких варіантах реалізації винаходу фармацевтична композиція, представлена в даному документі, містить систему сумісного розчинника. Деякі такі системи сумісних розчинників містять, наприклад, бензиловий спирт, неполярну поверхнево-активну речовину, змішуваний з водою органічний полімер і водну фазу. У деяких варіантах реалізації винаходу такі системи сумісних розчинників застосовують для гідрофобних сполук. Необмежуваним прикладом такої системи сумісних розчинників є система сумісних розчинників VPD, що є розчином абсолютного

етанолу, який містить 3 мас./об. % бензилового спирту, 8 мас./об. % неполярної поверхнево-активної речовини Polysorbate 80™ і 65 мас./об. % поліетиленгліколю 300. Пропорції таких систем сумісних розчинників можуть істотно варіювати без значної зміни їх характеристик розчинності і токсичності. Крім того, може варіювати суть компонентів сумісних розчинників:

5 наприклад, замість Polysorbate 80™ можуть бути застосовані інші поверхнево-активні речовини; може варіювати розмір фракції поліетиленгліколю; замість поліетиленгліколю можуть бути застосовані інші біосумісні полімери, наприклад, полівінілпіролідон; і замість декстрази можуть бути застосовані інші цукри або полісахариди.

10 У деяких варіантах реалізації винаходу фармацевтичну композицію, представлену в даному документі, одержують для перорального введення. У деяких варіантах реалізації винаходу фармацевтичні композиції одержують для букального введення.

15 У деяких варіантах реалізації винаходу фармацевтичну композицію одержують для введення ін'єкцією (наприклад, внутрішньовенною, підшкірною, внутрішньом'язовою, тощо). У деяких таких варіантах реалізації винаходу фармацевтична композиція містить носій і складена у водному розчині, такому як вода або фізіологічно сумісні буфери, такі як розчин Хенкса, розчин Рінгера або фізіологічний сольовий буфер. У деяких варіантах реалізації винаходу включені інші інгредієнти (наприклад, інгредієнти, що покращують розчинність або слугують консервантами). У деяких варіантах реалізації винаходу суспензії для ін'єкцій одержують за допомогою відповідних рідких носіїв, суспендувальних агентів, тощо. Деякі фармацевтичні композиції для ін'єкцій представлені у формі разової дози, наприклад, в ампулах або багатодозових контейнерах. Деякі фармацевтичні композиції для ін'єкцій є суспензіями, розчинами або емульсіями в масляних або водних рідких носіях, і вони можуть містити допоміжні агенти, такі як суспендувальні, стабілізувальні та/або диспергувальні агенти. Деякі розчинники, придатні для застосування у фармацевтичних композиціях для ін'єкцій, включають,

20 без обмеження, ліпофільні розчинники і жирні масла, такі як кунжутне масло, синтетичні естери жирних кислот, такі як етилолеат або тригліцериди, і ліпосоми. Водні суспензії для ін'єкцій можуть містити речовини, які збільшують в'язкість суспензії, такі як карбоксиметилцелюлоза натрію, сорбіт або декстран. Такі суспензії можуть також необов'язково містити придатні стабілізатори або агенти, що збільшують розчинність фармацевтичних агентів із забезпеченням

25 можливості одержання висококонцентрованих розчинів.

30 У деяких варіантах реалізації винаходу фармацевтичну композицію одержують для трансмукозального введення. У деяких таких варіантах реалізації винаходу в складі застосовують пенетранти, відповідні до бар'єру, крізь який необхідно проникнути. Такі пенетранти є загальновідомими в даній галузі техніки.

35 У деяких варіантах реалізації винаходу фармацевтична композиція, представлена в даному документі, містить олігонуклеотид у терапевтично ефективній кількості. У деяких варіантах реалізації винаходу терапевтично ефективна кількість є достатньою для запобігання, пом'якшення або полегшення симптомів захворювання або для збільшення тривалості життя суб'єкта, що підлягає лікуванню. Визначення терапевтично ефективної кількості знаходиться в

40 межах можливостей фахівців у даній галузі техніки.

45 У деяких варіантах реалізації винаходу один або декілька модифікованих олігонуклеотидів, представлених в даному документі, складають у вигляді проліків. У деяких варіантах реалізації винаходу при введенні in vivo проліки хімічно перетворюються на біологічно, фармацевтично або терапевтично більш активну форму олігонуклеотиду. У деяких варіантах реалізації винаходу проліки є придатними завдяки тому, що їх простіше вводити, ніж відповідну активну форму. Наприклад, у деяких випадках проліки можуть мати більшу біодоступність (наприклад, при пероральному введенні), ніж відповідна активна форма. В деяких випадках проліки можуть мати покращену розчинність, порівняно з відповідною активною формою. У деяких варіантах реалізації винаходу проліки є менш розчинними у воді, ніж відповідна активна форма. В деяких випадках такі проліки чудово переносяться через клітинні мембрани, причому розчинність у воді погіршує їх рухливість. У деяких варіантах реалізації винаходу проліки являють собою естер. У деяких таких варіантах реалізації винаходу естер при введенні метаболічно гідролізується до карбоксильної кислоти. В деяких випадках сполука, що містить карбоксильну кислоту, є відповідною активною формою. У деяких варіантах реалізації винаходу проліки містять короткий пептид (поліамінокислоту), з'єднаний з кислотною групою. У деяких таких варіантах реалізації

50 винаходу пептид розщеплюється при введенні з утворенням відповідної активної форми.

55 У деяких варіантах реалізації даного опису наведені композиції і способи зниження кількості або активності цільової нуклеїнової кислоти в клітині. У деяких варіантах реалізації винаходу клітина знаходиться в організмі тварини. У деяких варіантах реалізації винаходу тварина є ссавцем. У деяких варіантах реалізації винаходу тварина є гризуном. У деяких варіантах

60

реалізації винаходу тварина є приматом. У деяких варіантах реалізації винаходу тварина є приматом, що не є людиною. У деяких варіантах реалізації винаходу тварина є людиною.

У деяких варіантах реалізації даного опису наведені способи введення тварині фармацевтичної композиції, що містить олігонуклеотид відповідно до даного опису. Придатні способи введення включають, без обмеження, пероральний, ректальний, трансмукозальний, інтестинальний, ентеральний, місцевий, у вигляді супозиторіїв, інгаляційний, інтратекальний, інтрацеребровентрикулярний, внутрішньоочеревинний, інтраназальний, інтраокулярний, внутрішньопухлинний і парентеральний (наприклад, внутрішньовенний, внутрішньом'язовий, інтрамедулярний і підшкірний). У деяких варіантах реалізації винаходу фармацевтичні засоби вводять інтратекально для забезпечення місцевої, а не системної дії. Наприклад, фармацевтичні композиції можуть бути введені ін'єкцією безпосередньо в ділянку бажаного ефекту (наприклад, у печінку).

Необмежуючий опис і включення шляхом посилання

Незважаючи на те, що деякі сполуки, композиції і способи, описані в даному документі, були детально описані відповідно до деяких варіантів реалізації винаходу, наступні приклади служать тільки для ілюстрації сполук, описаних у даному документі, і їх не потрібно інтерпретувати як обмеження. Кожне з посилань, номери доступу GenBank і подібні посилання, згадані в даній заявці, включені до даного документу шляхом посилання в повному об'ємі.

Деякі сполуки, композиції і способи в даному документі описані як такі, що "містять точно" або "містять тільки" певну кількість конкретних елементів або характеристик. Такий опис використаний для позначення того, що, хоча сполука, композиція або спосіб може включати інші додаткові елементи, кількість конкретного елементу або характеристики є конкретним числом. Наприклад, "кон'югат, що містить рівно один GalNAc" являє собою кон'югат, що містить один і рівно один GalNAc, хоча він може містити інші елементи, крім вказаного одного GalNAc.

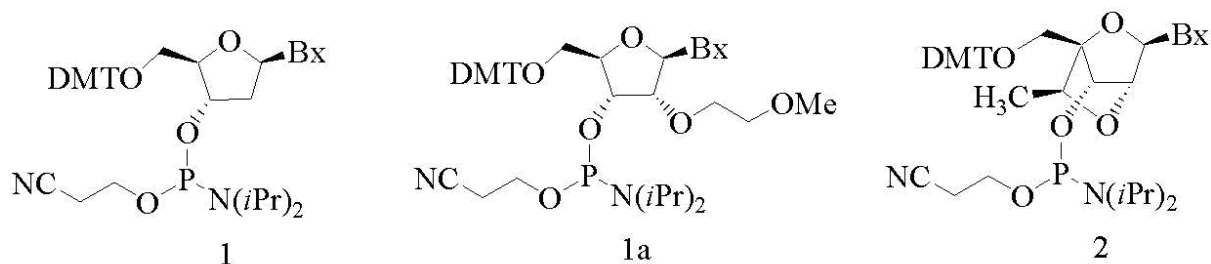
Незважаючи на те, що перелік послідовностей, який супроводжує даний файл, вказує кожен послідовність як "РНК" або як "ДНК", по необхідності, насправді ці послідовності можуть бути модифіковані будь-якою комбінацією хімічних модифікацій. Фахівцям в даній галузі техніки буде зрозуміло, що таке позначення як "РНК" або "ДНК" для опису модифікованих олігонуклеотидів, у деяких випадках є довільним. Наприклад, олігонуклеотид, що містить нуклеозид, який містить цукровий фрагмент 2'-ОН і тимінову основу, може бути описаний як ДНК, що має модифікований цукор (2'-ОН замість природного 2'-Н у ДНК) або як РНК, що має модифіковану основу (тимін (метильований урацил) замість природного урацилу в РНК).

Відповідно, послідовності нуклеїнових кислот, представлені в даному документі, включаючи, але без обмеження, послідовності в переліку послідовностей, призначені для охоплення нуклеїнових кислот, що містять будь-яку комбінацію природних або модифікованих РНК та/або ДНК, зокрема, але без обмеження, такі нуклеїнові кислоти, що містять модифіковані азотисті основи. Як додатковий приклад і без обмеження, олігонуклеотид, що містить послідовність азотистих основ "ATCGATCG", охоплює будь-які олігонуклеотиди, що мають таку послідовність азотистих основ, модифікованих або немодифікованих, включаючи, але без обмеження, такі сполуки, які містять РНК основи, наприклад, ті, що мають послідовність "AUCGAUCG", і ті, що мають деякі ДНК основи і деякі РНК основи, такі як "AUCGATCG", а також олігонуклеотиди, що мають інші модифіковані основи, такі як "AT^{me}CGAUCG", де ^{me}C позначає цитозинову основу, яка містить метильну групу в положенні 5.

ПРИКЛАДИ

Наступні приклади ілюструють деякі варіанти реалізації даного опису і не є обмежуючими. Більше того, якщо наведені конкретні варіанти реалізації, автори винаходу мають на увазі загальне застосування вказаних конкретних варіантів реалізації. Наприклад, опис олігонуклеотиду, що містить конкретний мотив, дає обґрунтовану базу для додаткових олігонуклеотидів, що містять такий же або подібний мотив. І, наприклад, якщо конкретна високоафінна модифікація виникає в певному положенні, то в цьому ж положенні вважаються придатними інші високоафінні модифікації, якщо не вказано інше.

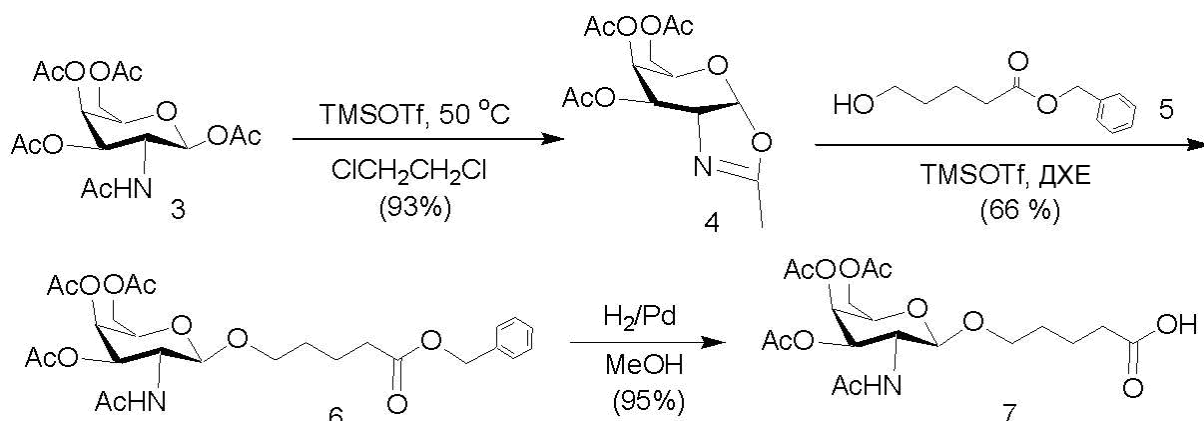
Приклад 1. Загальний спосіб одержання фосфорамідитів, Сполук 1, 1a і 2



Вх являє собою гетероциклічну основу

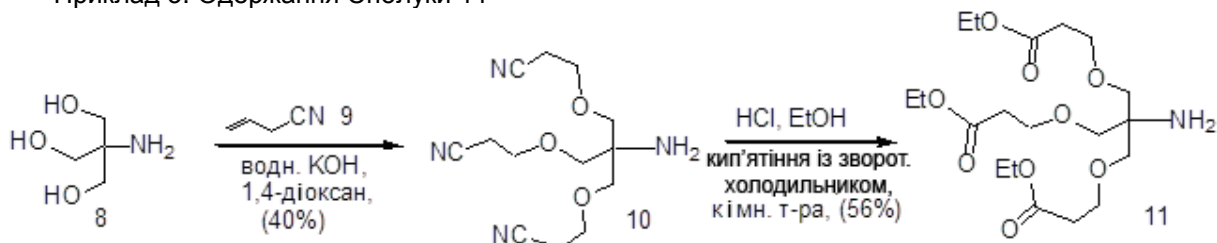
5 Сполуки 1, 1a і 2 одержали за методиками, загальновідомими у даній галузі техніки, що описані в даному описі (див. Seth et al., Bioorg. Med. Chem., 2011, 21(4), 1122-1125, J. Org. Chem., 2010, 75(5), 1569-1581, Nucleic Acids Symposium Series, 2008, 52(1), 553-554); див. також опубліковані Міжнародні заявки РСТ (WO 2011/115818, WO 2010/077578, WO2010/036698, WO2009/143369, WO 2009/006478 і WO 2007/090071) і патент США 7569686).

Приклад 2. Одержання Сполуки 7



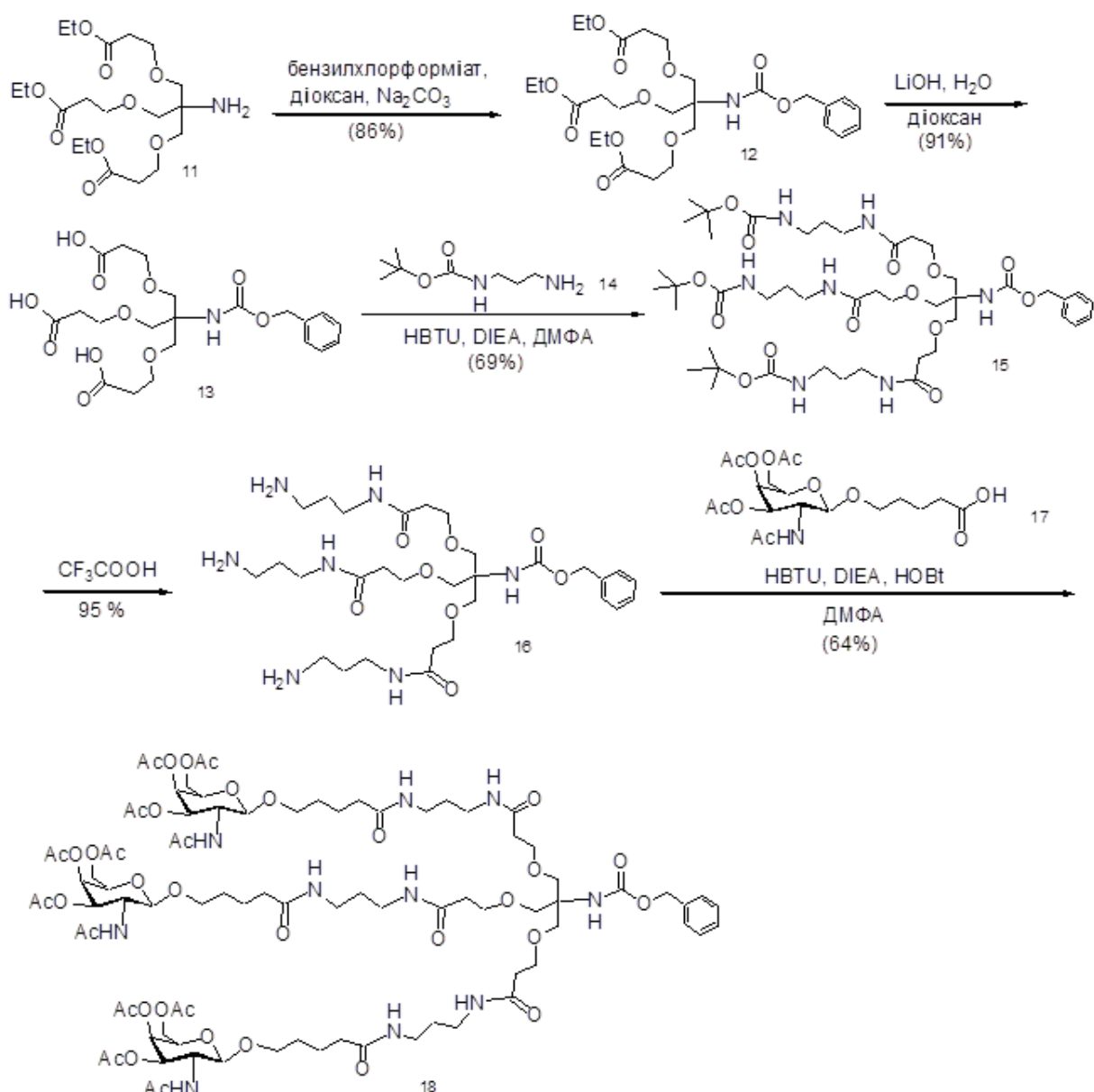
10 Сполука 3 (2-ацетамідо-1,3,4,6-тетра-О-ацетил-2-дезоксi-β-D-галактопіраноза або галактозаміну пентаацетат) є в продажу. Сполуку 5 одержали за опублікованими методиками (Weber et al., J. Med. Chem., 1991, 34, 2692).

Приклад 3. Одержання Сполуки 11



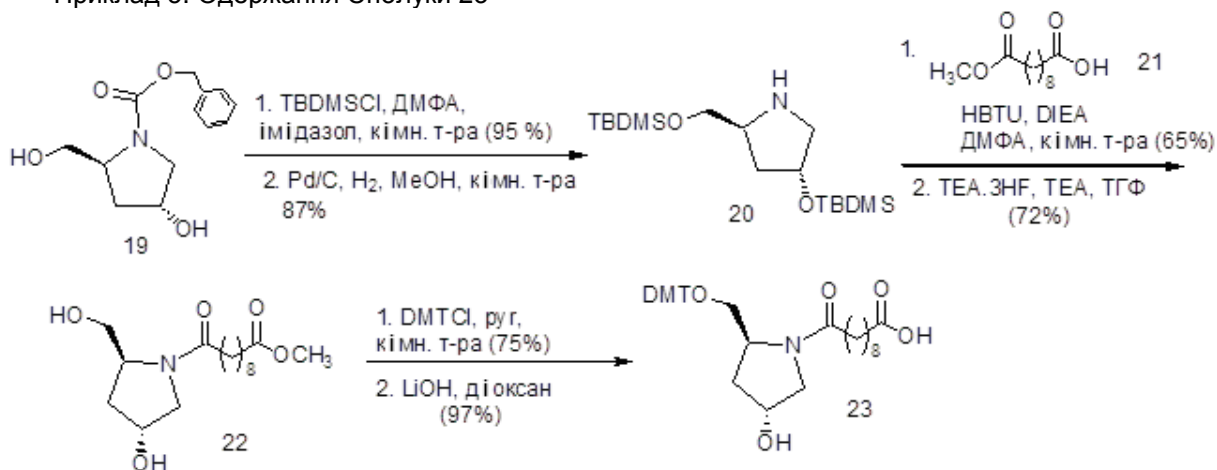
15 Сполуки 8 і 9 є в продажу.

Приклад 4. Одержання Сполуки 18

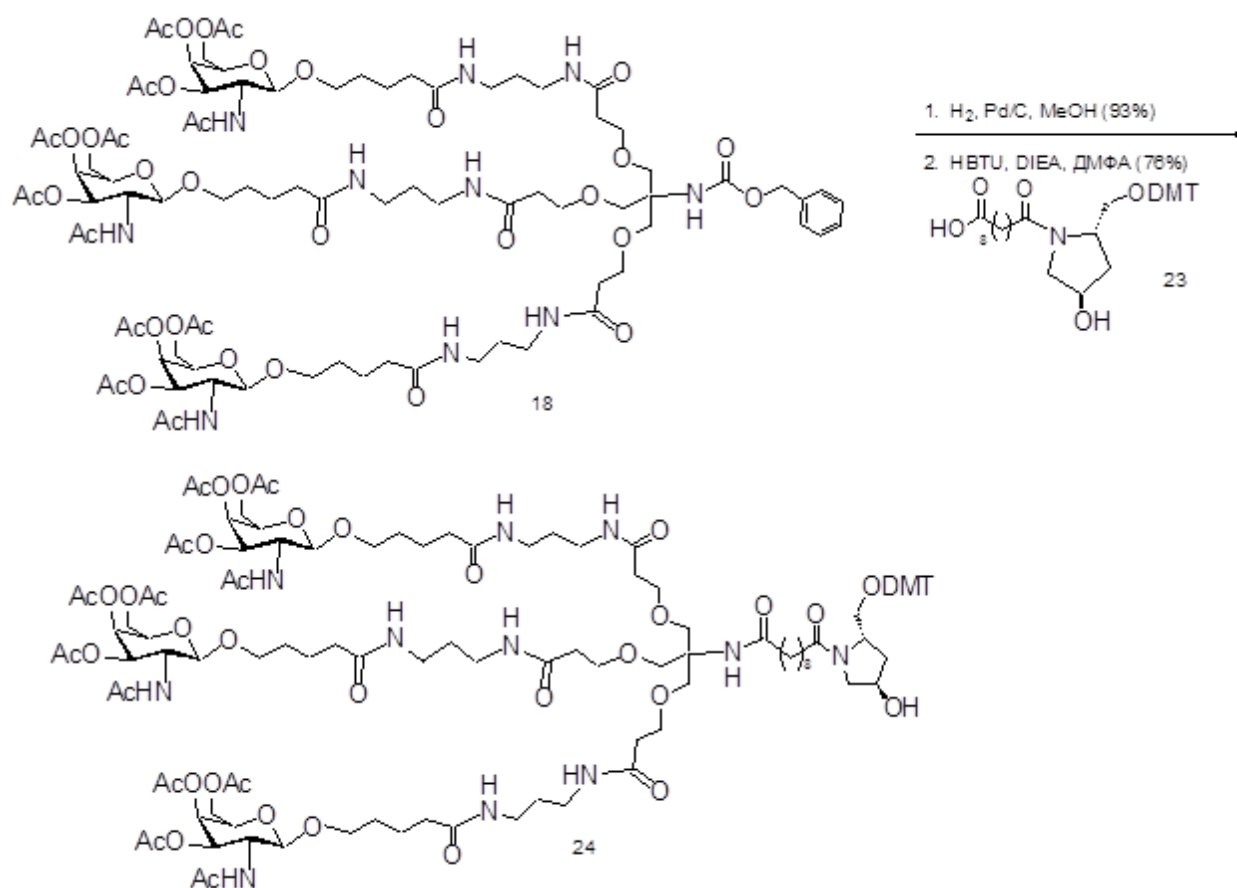


Сполуку 11 одержали за способами, описаними у Прикладі 3. Сполука 14 є в продажу. Сполуку 17 одержали за таким же способом, як описаний в публікації Rensen et al., J. Med. Chem., 2004, 47, 5798-5808.

5 Приклад 5. Одержання Сполуки 23

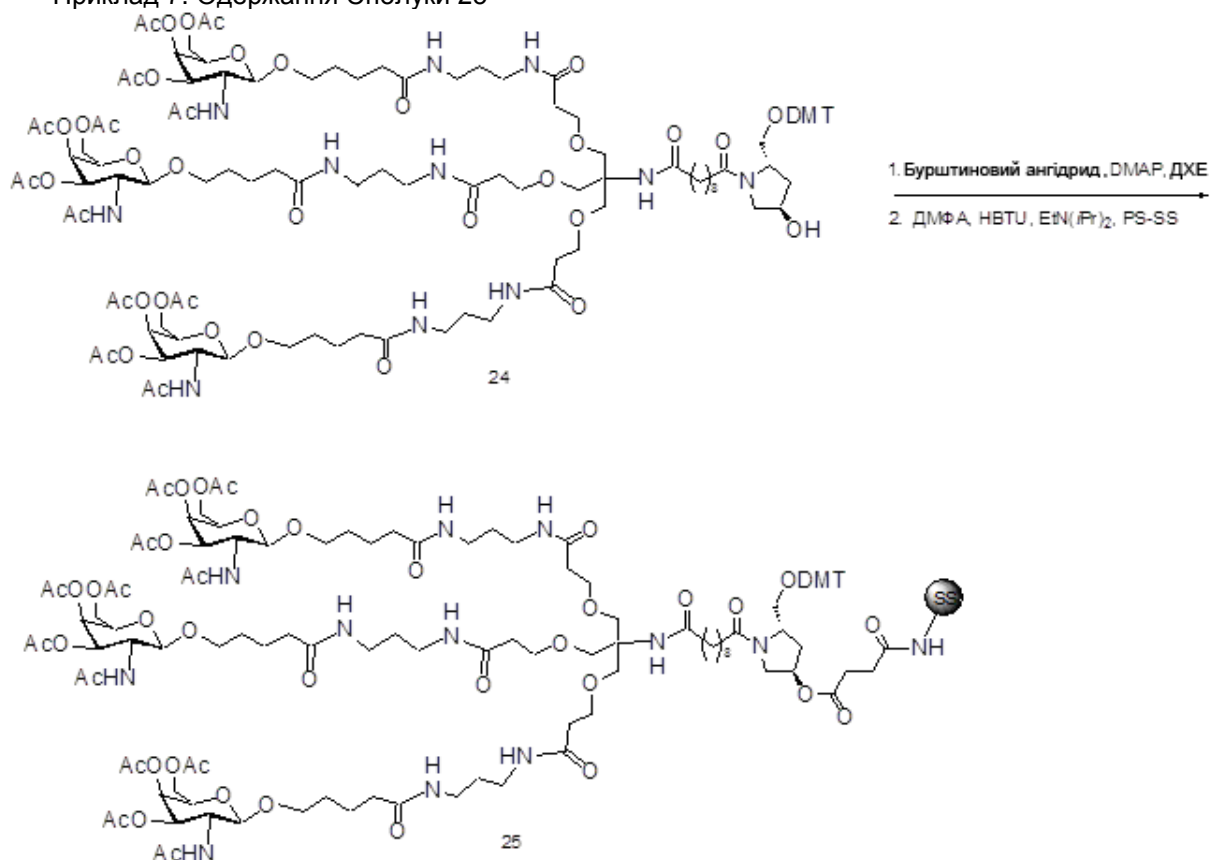


Сполуки 19 і 21 є в продажу.
Приклад 6. Одержання Сполуки 24

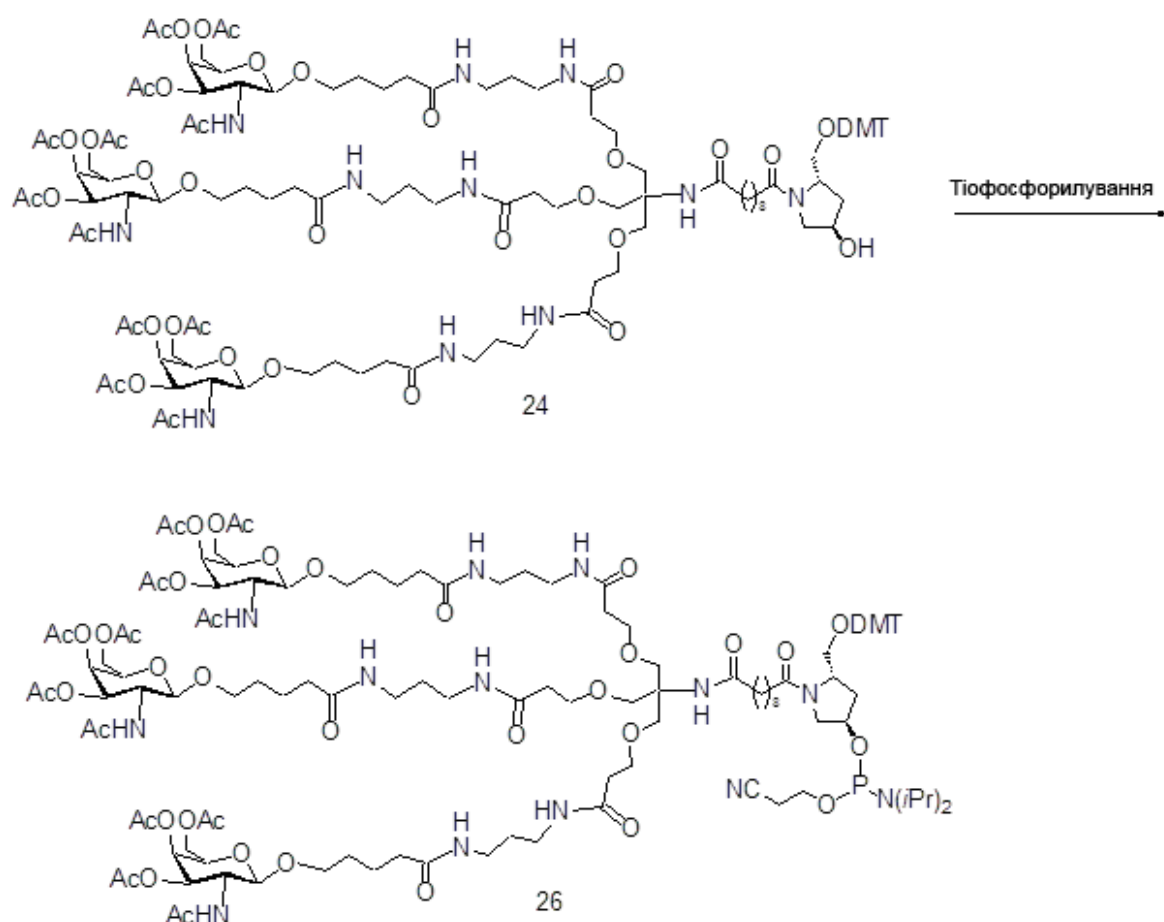


Сполуки 18 і 23 одержали таким чином, як описано в способах у Прикладах 4 і 5.

Приклад 7. Одержання Сполуки 25

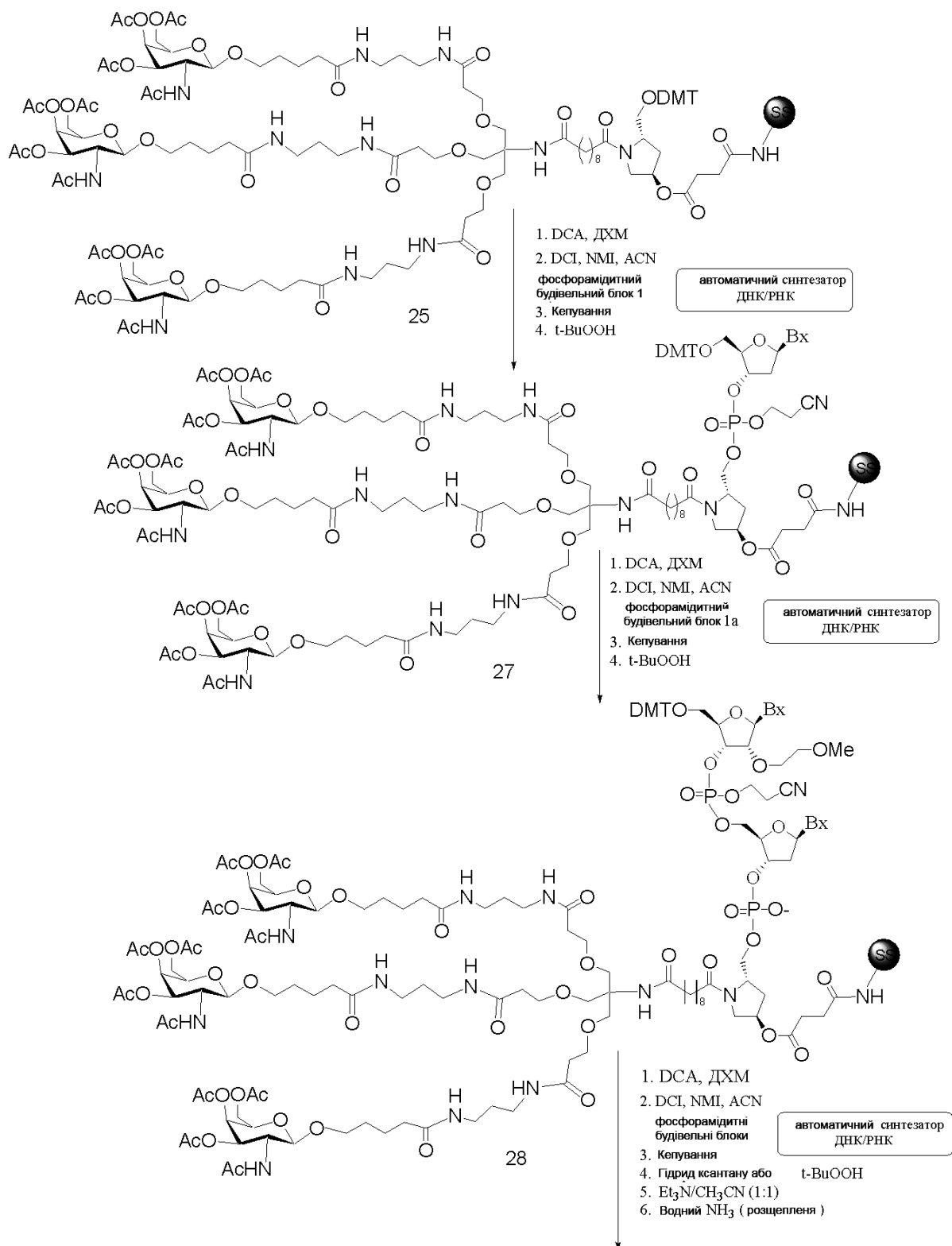


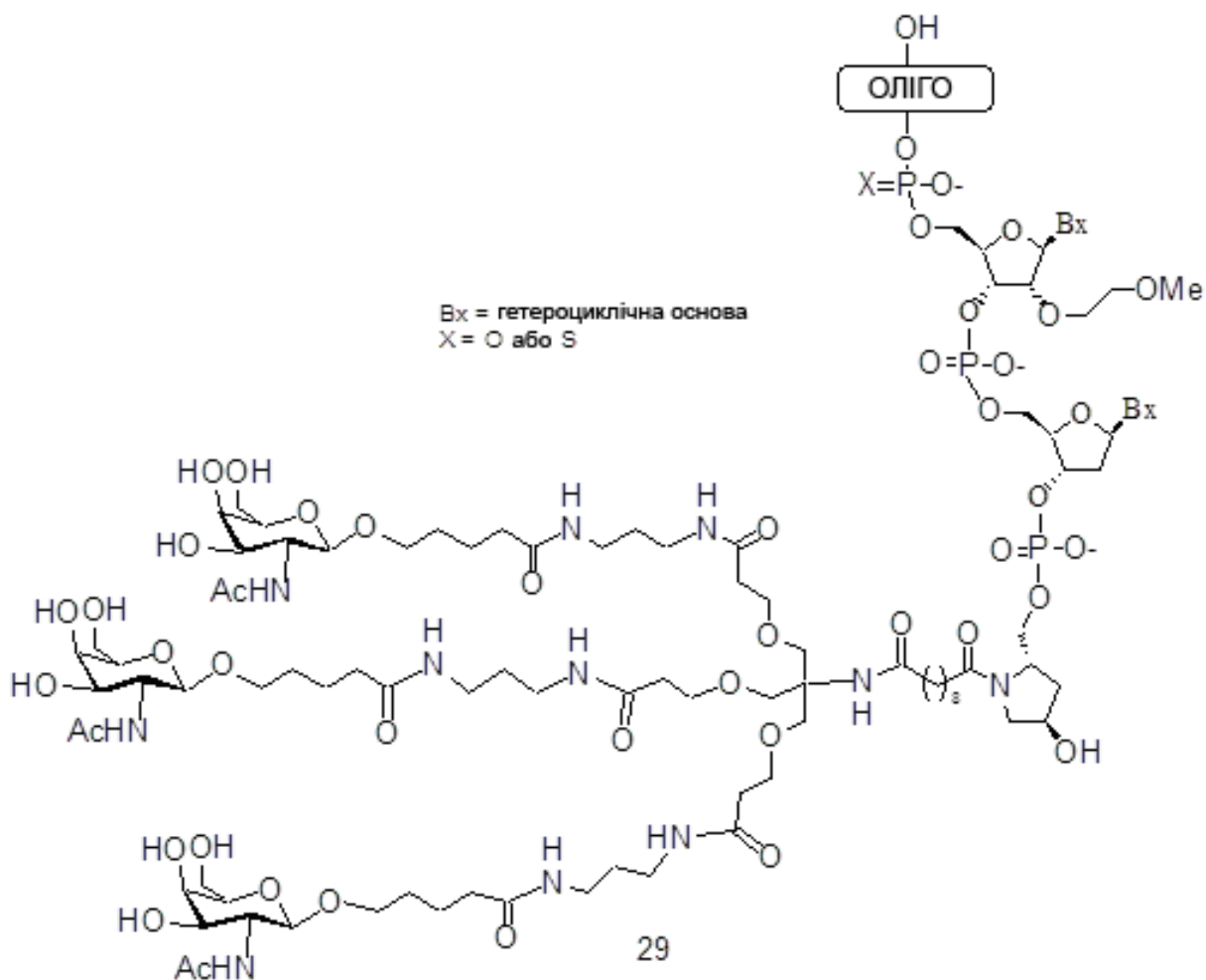
5 Сполуку 24 одержали за способами, представленими у Прикладі 6.
 Приклад 8. Одержання Сполуки 26



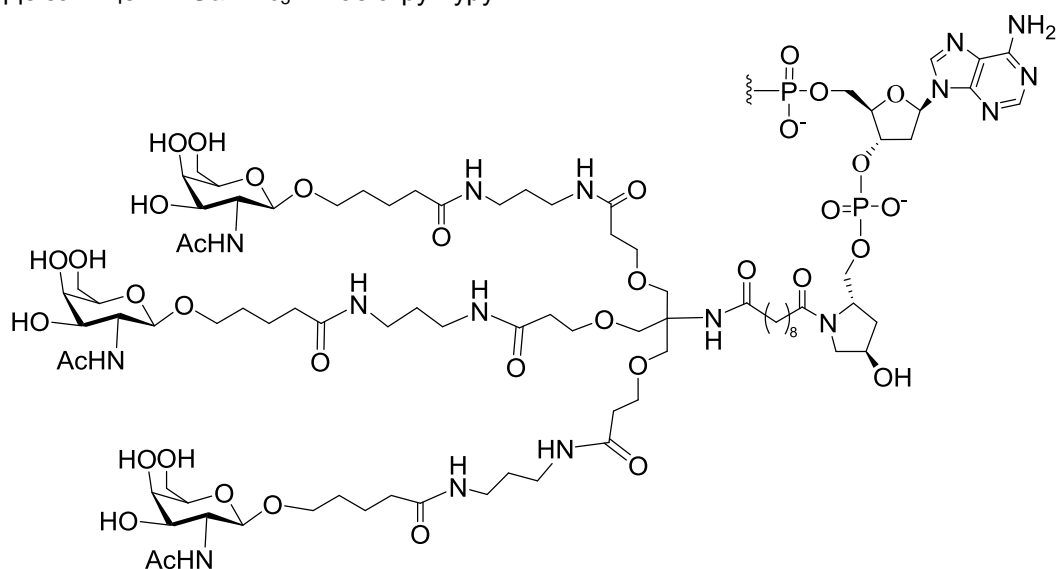
Сполуку 24 одержали за способами, представленими у Прикладі 6.

Приклад 9. Загальне одержання кон'югованих ASO, що містять GalNAc₃-1 на 3'-кінці, Сполуки 29

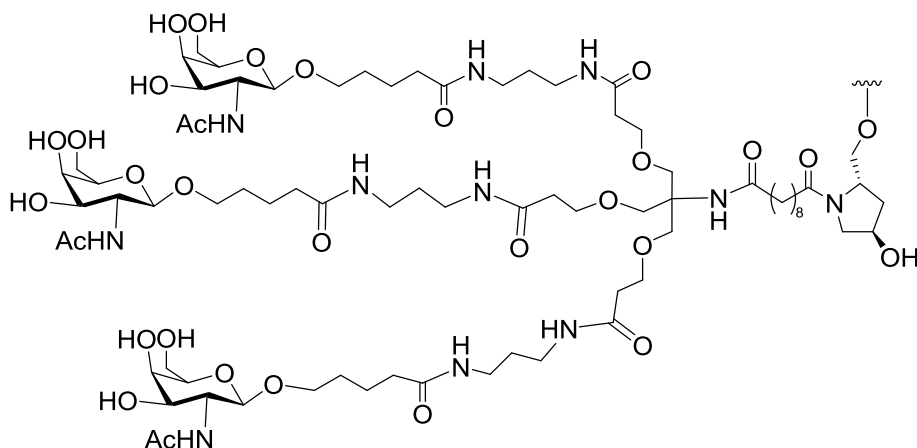




Де захищений GalNAc₃-1 має структуру:

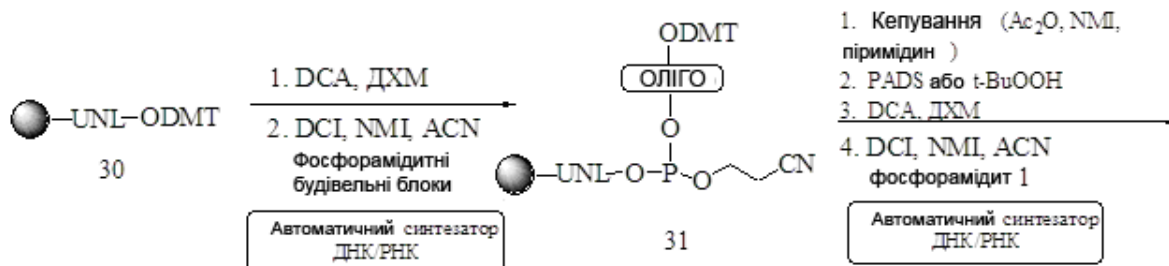


5 Кластерна частина GalNAc₃ кон'югальної групи GalNAc₃-1 (GalNAc₃-1_a) може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом з одержанням різноманітних кон'югувальних груп. При цьому GalNAc₃-1_a має формулу:



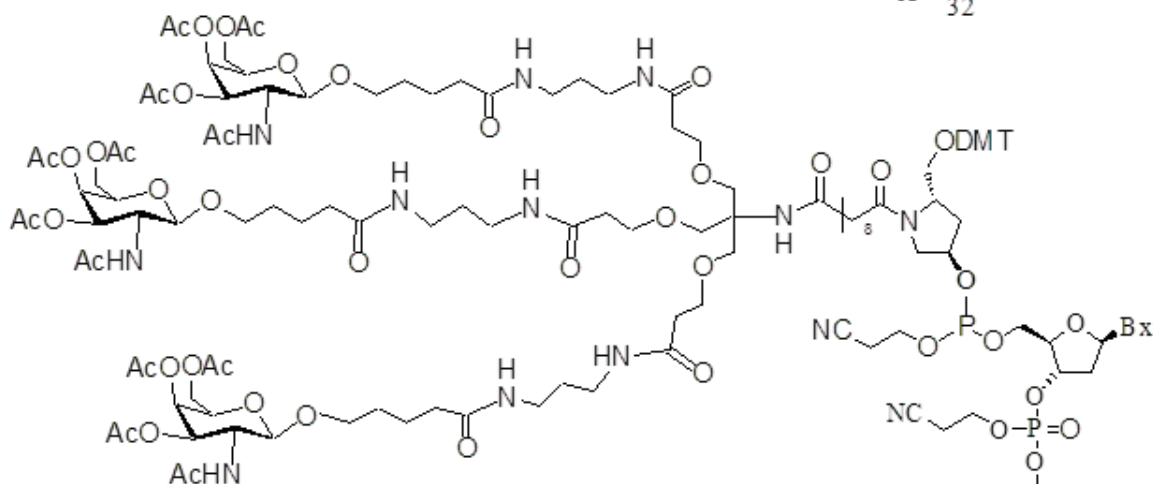
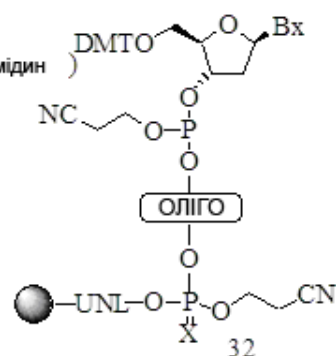
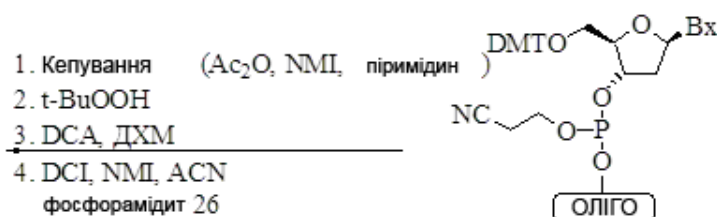
Тверду основу, що зв'язує захищений GalNAc₃-1, Сполуку 25, одержали за способами, представленими у Прикладі 7. Олігомерну Сполуку 29, що містить GalNAc₃-1 на 3'-кінці, одержали за стандартними методиками у автоматичному синтезаторі ДНК/РНК (див. Dupouy et al., Angew. Chem. Int. ред., 2006, 45, 3623-3627). Фосфорамідитні будівельні блоки, Сполуки 1 і 1а, одержали за способами, представленими у Прикладі 1. Зображені фосфорамідити є ілюстративними і не призначені для обмеження, оскільки можуть бути застосовані інші фосфорамідитні будівельні блоки для одержання олігомерних сполук, що мають бажану послідовність і склад. Порядок і кількість фосфорамідитів, що додаються до твердої основи, можуть бути підібрані для одержання розірваних олігомерних сполук, описаних у даному документі. Такі розірвані олігомерні сполуки можуть мати бажаний склад і послідовність основ, продиктовану будь-якою заданою мішенню.

Приклад 10. Загальне одержання кон'югованих ASO, що містять GalNAc₃-1 на 5'-кінці, Сполуки 34

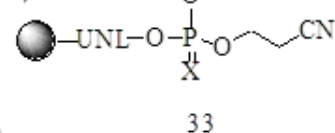


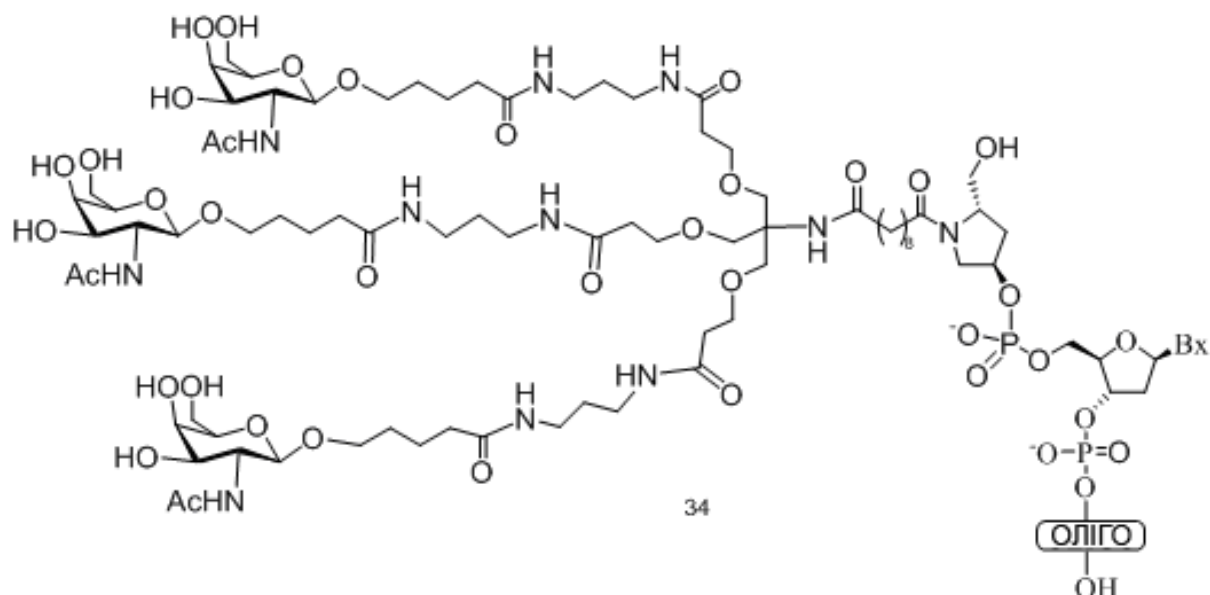
X = O або S

Bx = гетероциклічна основа



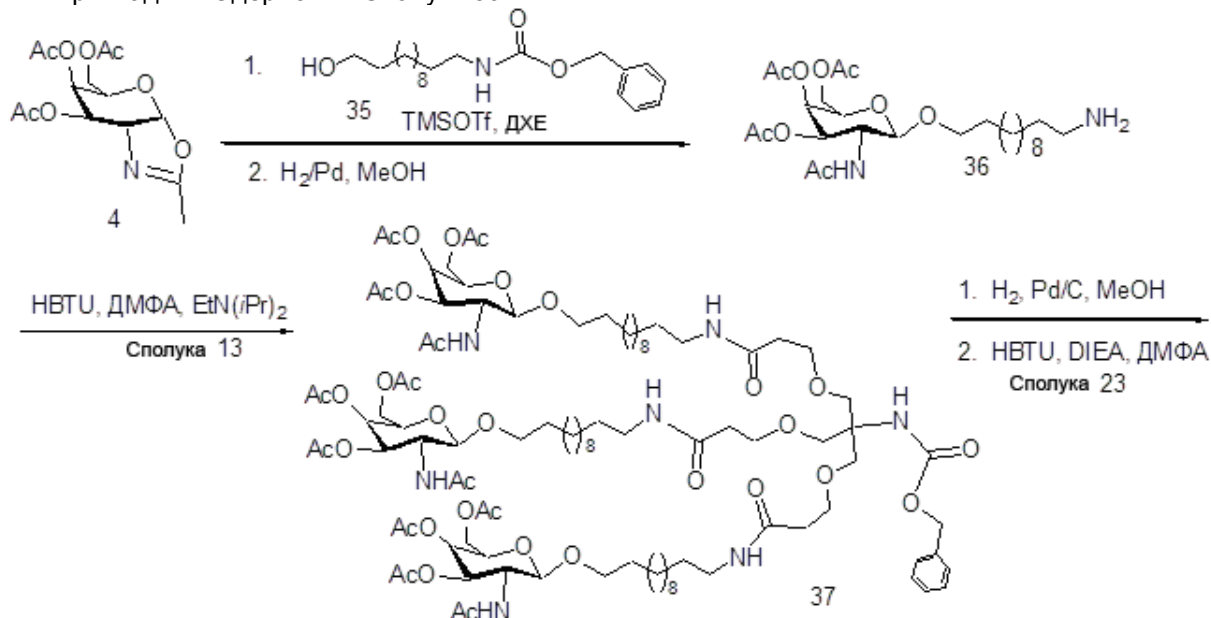
1. Кепування (Ac_2O , NMI, піримідин)
2. t-BuOOH
3. $\text{Et}_3\text{N}:\text{CH}_3\text{CN}$ (1:1 об./об.)
4. DCA, ДХМ
5. NH_4 , кімн. т-ра (розщеплення)

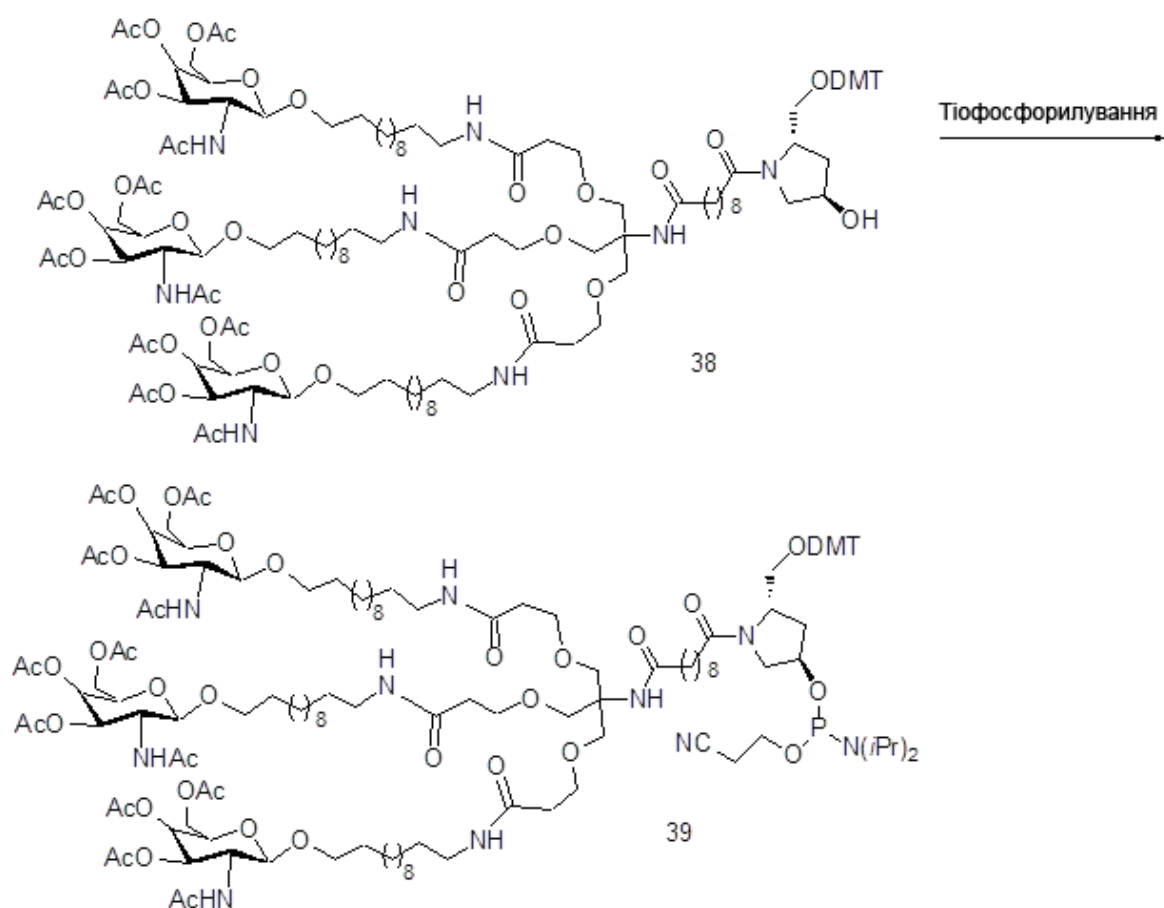




Unylinker™ 30 є в продажу. Олігомерну сполуку 34, що містить кластер GalNAc₃-1 на 5'-кінці, одержали за стандартними способами в автоматичному синтезаторі ДНК/РНК (див. Dupouy et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2006, 45, 3623-3627). Фосфорамідитні будівельні блоки, Сполуки 1 і 1a, одержали за способами, представленими у Прикладі 1. Зображені фосфорамідити є ілюстративними і не призначені для обмеження, оскільки можуть бути застосовані інші фосфорамідитні будівельні блоки для одержання олігомерної сполуки, що має бажану послідовність і склад. Порядок і кількість фосфорамідитів, що додаються до твердої основи, можуть бути підібрані для одержання розірваних олігомерних сполук, описаних у даному документі. Такі розірвані олігомерні сполуки можуть мати бажаний склад і послідовність основ, продиктовану будь-якою заданою мішенню.

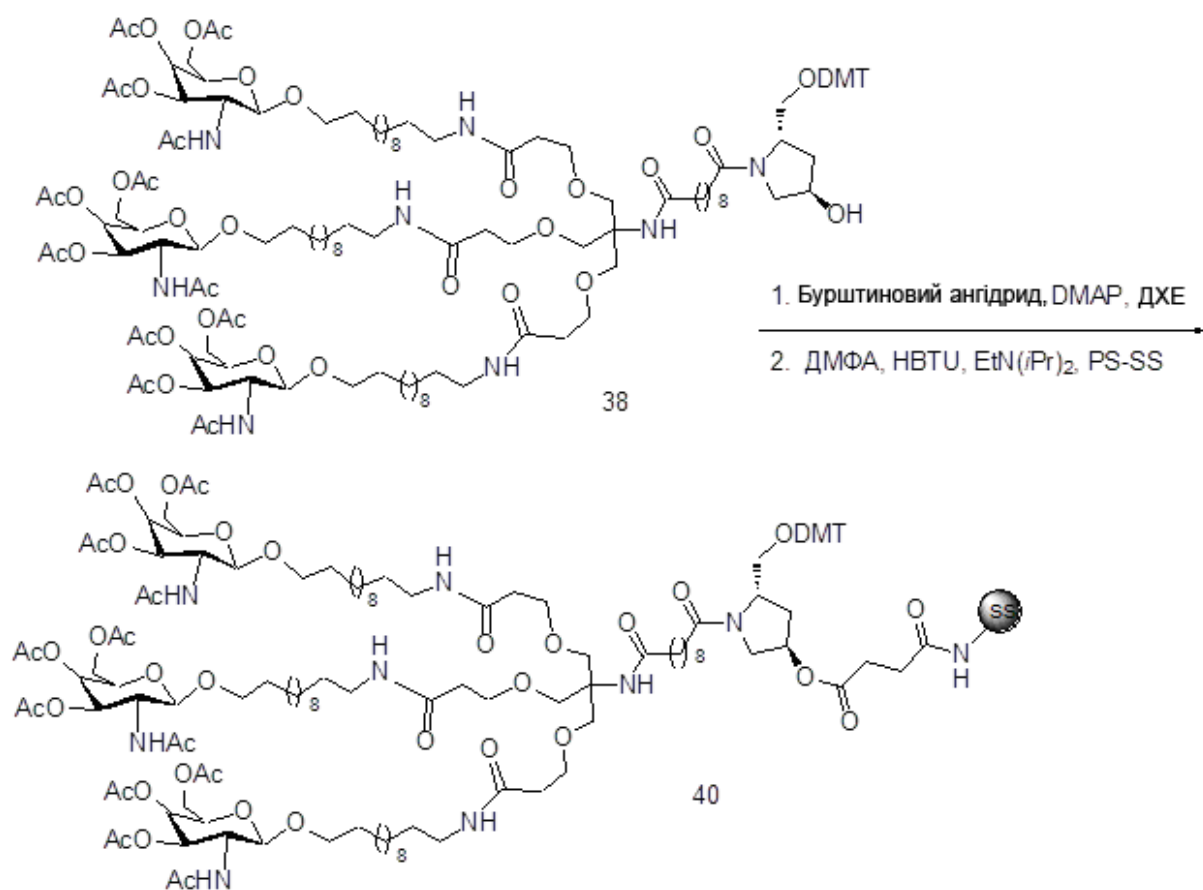
Приклад 11. Одержання Сполуки 39



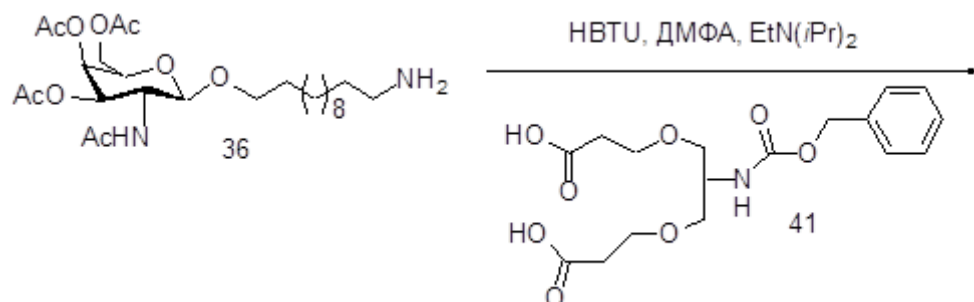


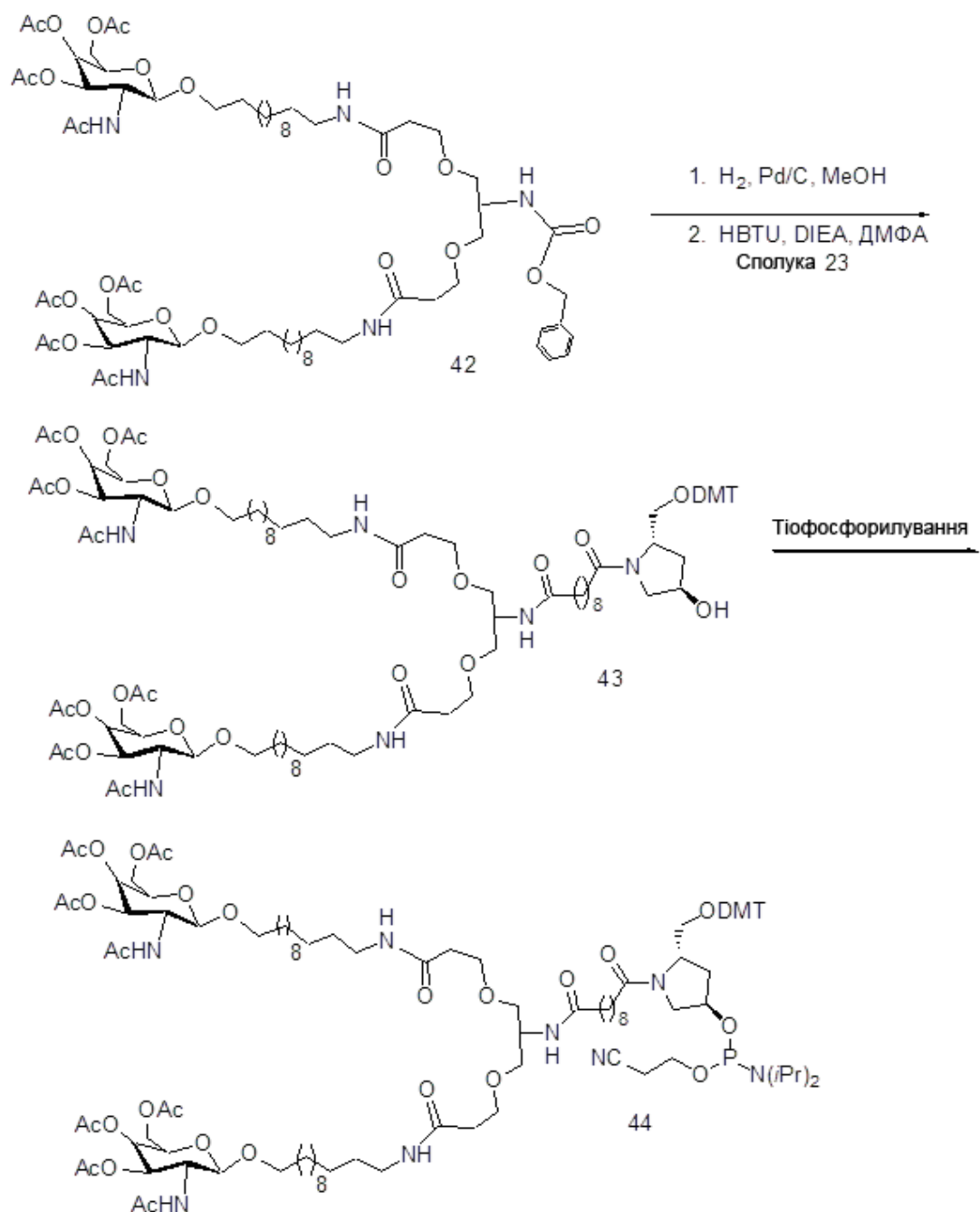
Сполуки 4, 13 і 23 одержали за способами, описаними у Прикладах 2, 4 і 5. Сполуку 35 одержали за такими ж способами, як описані в публікації Rouchaud et al., Eur. J. Org. Chem., 2011, 12, 2346-2353.

5 Приклад 12. Одержання Сполуки 40



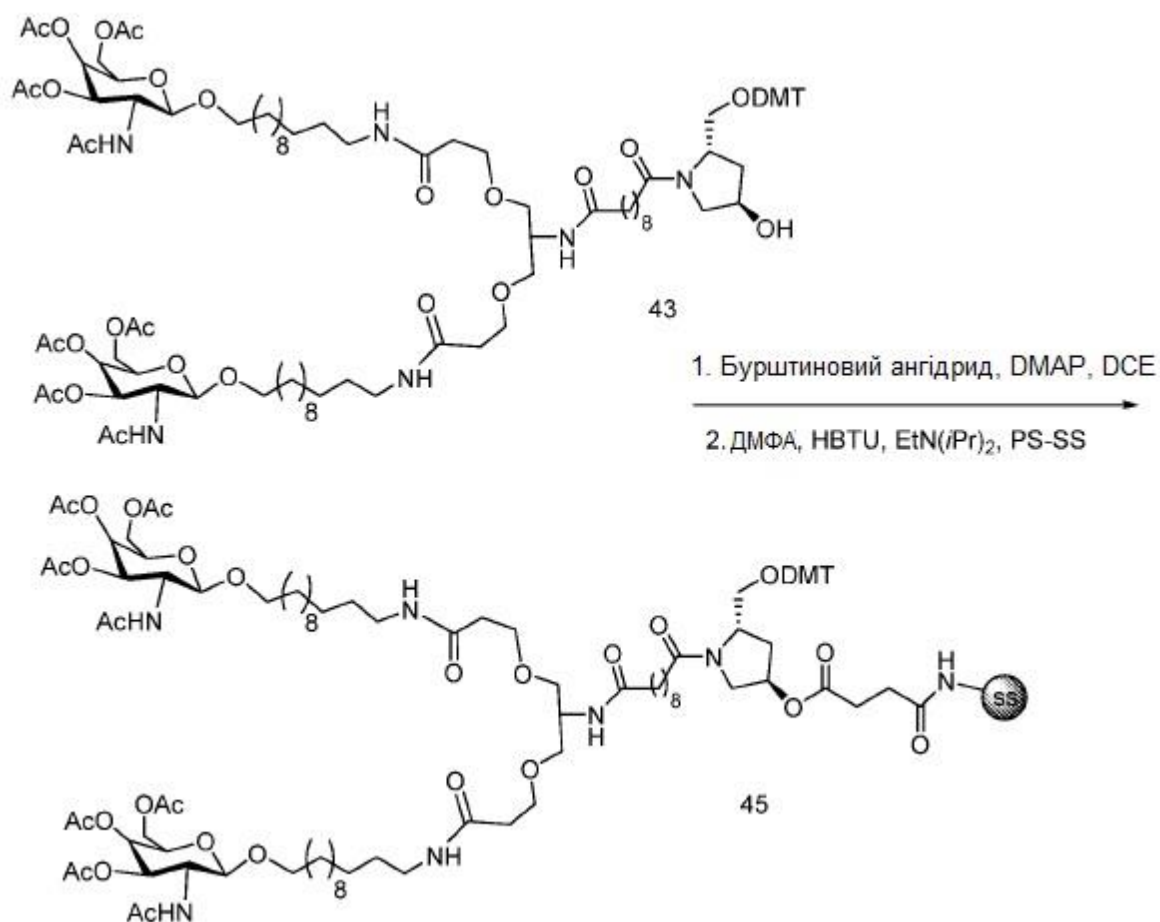
Сполуку 38 одержали за способами, представленими у Прикладі 11.
Приклад 13. Одержання Сполуки 44



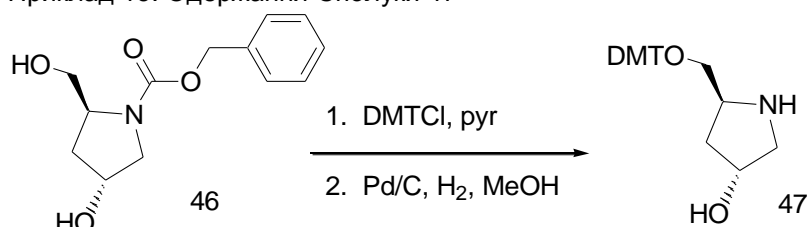


Сполуки 23 і 36 одержали за способами, представленими в Прикладах 5 і 11. Сполуку 41 одержали за такими ж способами, як описані в публікації WO 2009082607.

5 Приклад 14. Одержання Сполуки 45

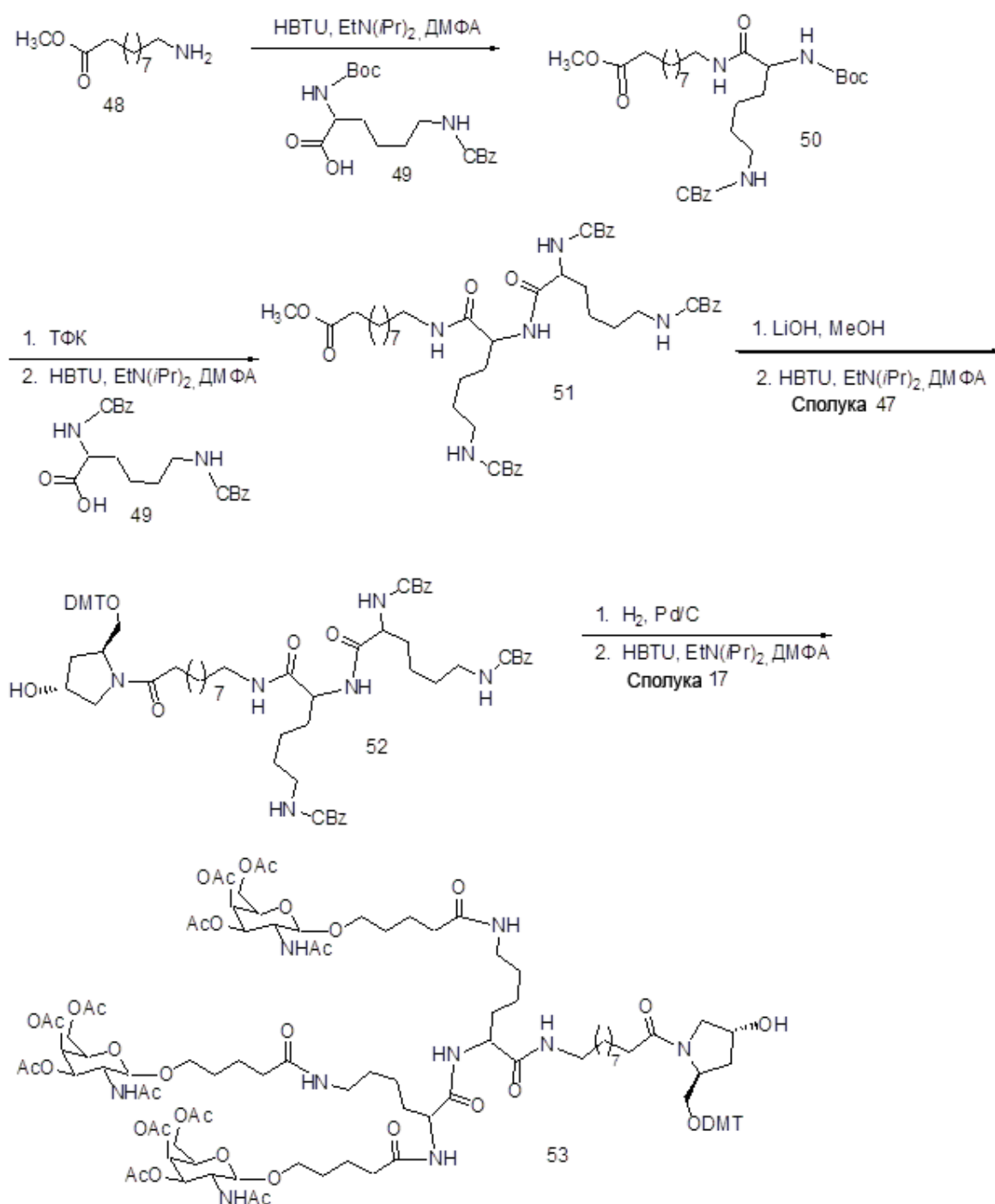


Сполуку 43 одержали за способами, представленими у Прикладі 13.
Приклад 15. Одержання Сполуки 47



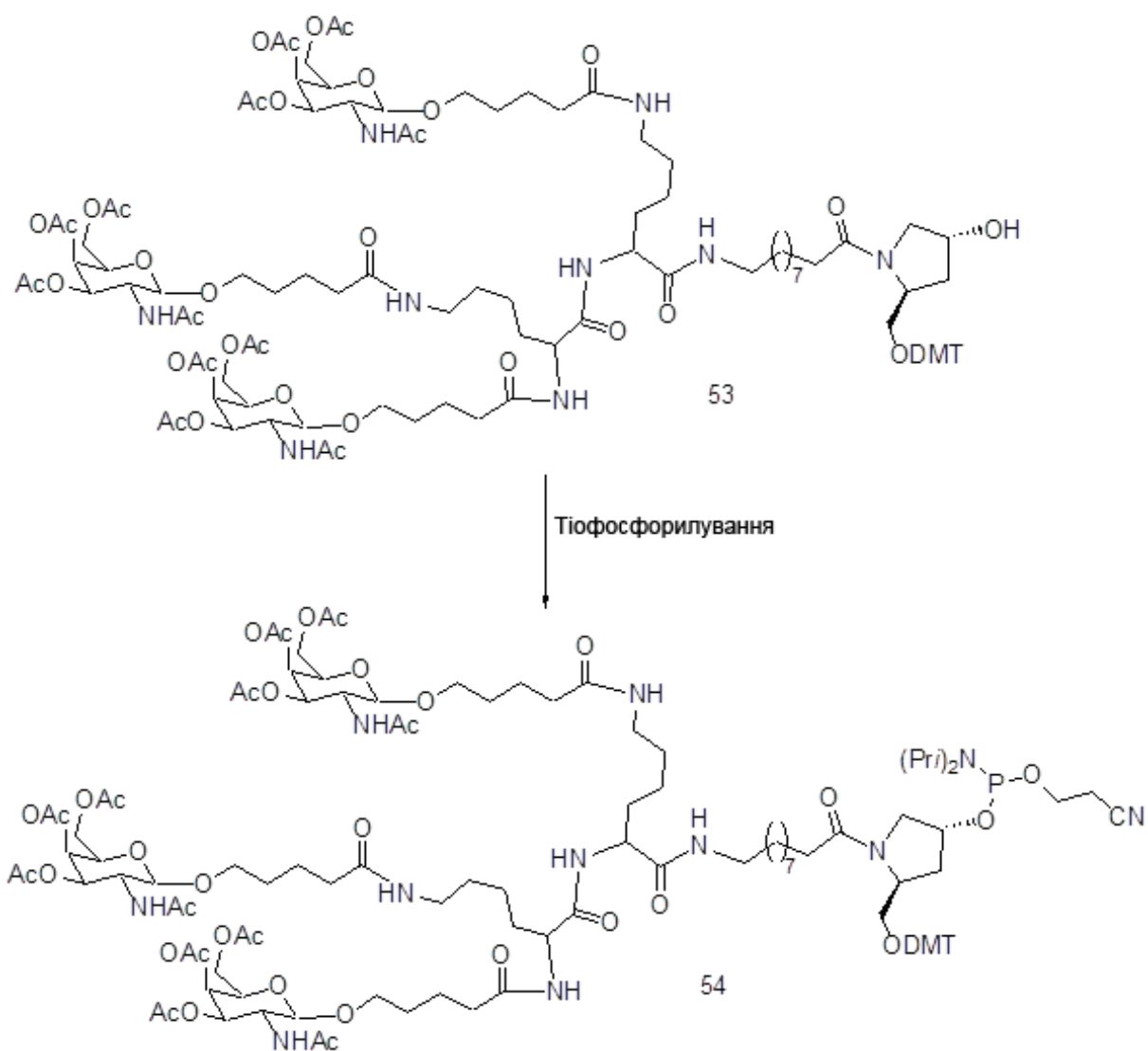
5

Сполука 46 є в продажу.
Приклад 16. Одержання Сполуки 53

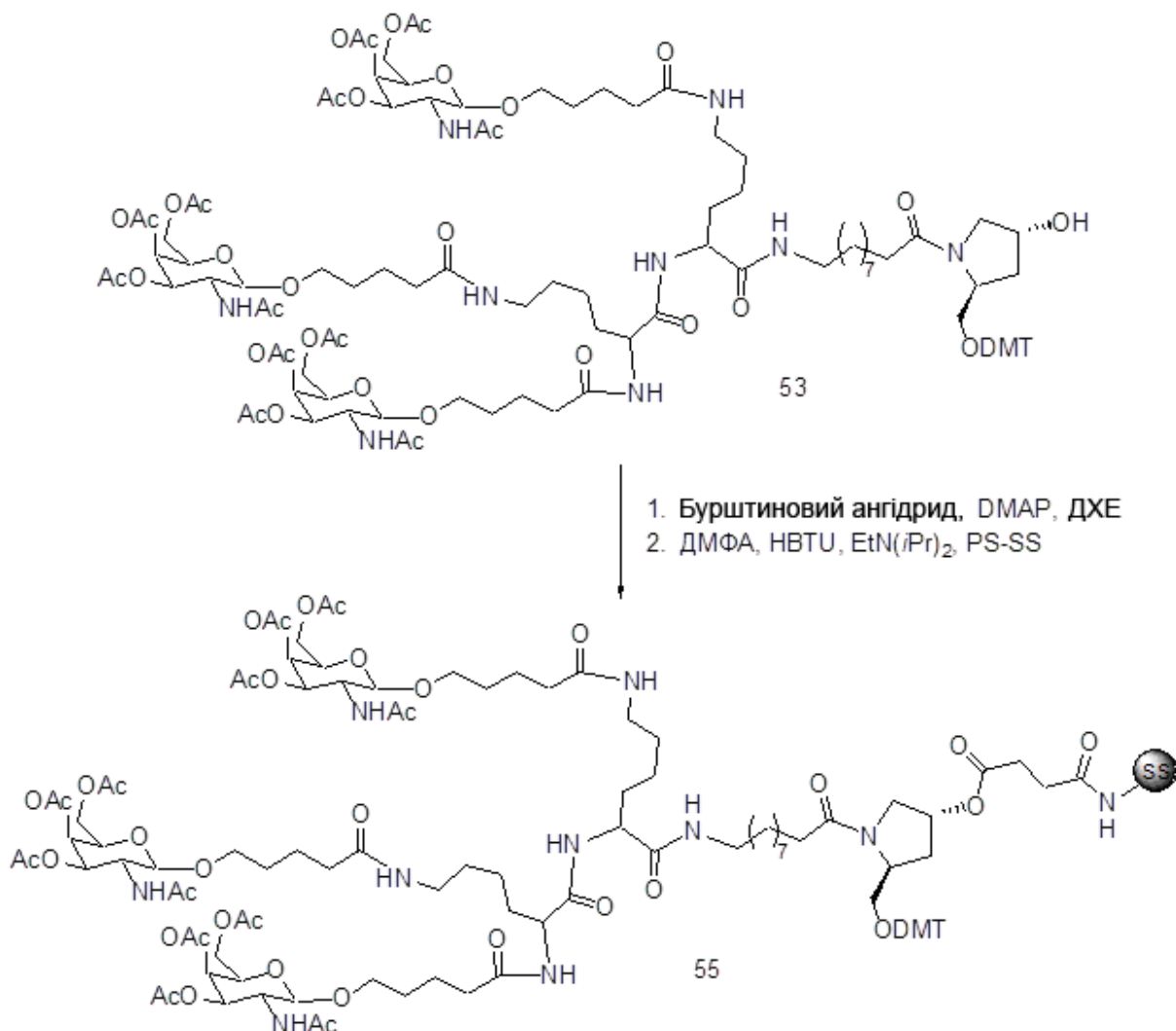


Сполуки 48 і 49 є в продажу. Сполуки 17 і 47 одержали так, як описано в способах у Прикладах 4 і 15.

5 Приклад 17. Одержання Сполуки 54



Сполуку 53 одержали за способами, представленими у Прикладі 16.
Приклад 18. Одержання Сполуки 55



Сполуку 53 одержали за способами, представленими у Прикладі 16.

Приклад 19. Загальний спосіб одержання кон'югованих ASO, що містять GalNAc₃-1 в 3'-положенні, за допомогою твердофазних методик (одержання ISIS 647535, 647536 і 651900)

5 Якщо не вказано інше, всі реагенти і розчини, використовувані для синтезу олігомерних сполук, придбані у комерційних постачальників. Стандартні фосфорамідитні будівельні блоки і тверду основу застосували для введення нуклеозидних залишків, які включають, наприклад, залишки T, A, G і ^mC. 0,1 М розчин фосфорамідиту в безводному ацетонітрилі застосували для β-D-2'-дезоксирибонуклеозиду і 2'-МОЕ.

10 Синтез антисмислових олігонуклеотидів (ASO) виконали на синтезаторі ABI 394 (у масштабі 1-2 мкмоль) або на синтезаторі ДКТА Oligopilot виробництва GE Healthcare Bioscience (у масштабі 40-200 мкмоль) за способом фосфорамідитного зв'язування на твердій основі VIMAD, наповнений GalNAc₃-1 (110 мкмоль/г, Guzaev et al., 2003), упакований в колонку. Для стадії зв'язування фосфорамідити вводили у 4-разовому надлишку, порівняно із завантаженням на
15 твердій основі, а конденсацію фосфорамідиту виконували протягом 10 хвилин. Всю решту стадій виконували за протоколами, наданими виробником. Для видалення диметокситрипильної (DMT) групи з 5'-гідроксильної групи нуклеотиду застосували 6 % розчин дихлороцтової кислоти в толуені. На стадії зв'язування як активатор застосували 4,5-диціаноімідазол (0,7 М) в безводному CH₃CN. Тіофосфатні зв'язки вводили сульфидуванням за допомогою 0,1 М розчину гідриду ксантану в суміші пиридину/CH₃CN 1:1 протягом 3 хвилин часу контакту. Як окиснювальний агент для забезпечення фосфодіестерних міжнуклеозидних зв'язків застосували
20 20 % розчин трет-бутилгідропероксиду в CH₃CN, що містить 6 % води, протягом 12 хвилин часу контакту.

Після збирання бажаної послідовності ціаноетил-фосфатні захисні групи видаляли за допомогою суміші триетиламіну і ацетонітрилу 1:1 (об./об.) протягом 45 хвилин часу контакту. Зв'язані з твердою основою ASO суспендували у водному розчині аміаку (28-30 мас. %) і нагрівали при 55 °C протягом 6 годин.

Потім відфільтровували незв'язані ASO і випаровували аміак кип'ятінням. Залишок очищували рідинною хроматографією високого тиску на потужній аніонообмінній колонці (GE Healthcare Bioscience, Source 30Q, 30 мкм, 2,54 × 8 см, A=100 мМ ацетату амонію у 30 % водному CH₃CN, B=1,5 М NaBr в A, 0-40 % B за 60 хвилин, швидкість потоку 14 мл.хв⁻¹, λ=260

5

нм). Залишок знесолювали за допомогою ВЕРХ на обернено-фазовій колонці з одержанням бажаних ASO з виділеним виходом 15-30 % відносно первинного завантаження на тверду основу. ASO характеризували за допомогою іон-парної ВЕРХ, суміщеної з МС-аналізом на системі Agilent 1100 MSD.

10

Антисмислові олігонуклеотиди, що не містять кон'югату, синтезували за стандартними способами синтезу олігонуклеотидів, загальновідомими у даній галузі техніки.

Застосовуючи ці способи, одержали три окремі антисмислові сполуки, націлені на ApoC III. Як показано в Табл. 4 нижче, кожна з трьох антисмислових сполук, націлених на ApoC III, має одну і ту ж послідовність азотистих основ. ISIS 304801 являє собою 5-10-5 MOE гепмер, що містить тільки тіофосфатні зв'язки; ISIS 647535 є таким же, як ISIS 304801, за винятком того, що він містить GalNAc₃-1, кон'югований на його 3'-кінці; і ISIS 647536 є таким же, як ISIS 647535, за винятком того, що деякі міжнуклеозидні зв'язки цієї сполуки є фосфодіестерними зв'язками. Як додатково показано в Табл. 4, були синтезовані дві окремі антисмислові сполуки, націлені на SRB-1. ISIS 440762 являє собою 2-10-2 cEt гепмер, що містить тільки тіофосфатні міжнуклеозидні зв'язки; ISIS 651900 є таким же, як ISIS 440762, за винятком того, що він містить GalNAc₃-1 на його 3'-кінці.

15

20

Таблиця 4

Модифіковані ASO, націлені на ApoC III і SRB-1

ASO	Послідовність (від 5' до 3')	Мішень	Розрахункова маса	Спостережувана маса	SEQ ID No.
ISIS 304801	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	ApoC III	7165,4	7164,4	20
ISIS 647535	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} esA _{es} T _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -1 _a	ApoC III	9239,5	9237,8	21
ISIS 647536	A _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{eo} T _{eo} T _{es} A _{es} T _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -1 _a	ApoC III	9142,9	9140,8	21
ISIS 440762	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	SRB-1	4647,0	4646,4	22
ISIS 651900	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ko} A _{do} '- GalNAc ₃ -1 _a	SRB-1	6721,1	6719,4	23

Нижні індекси: "e" позначає 2'-MOE модифікований нуклеозид; "d" позначає β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "k" позначає 6'-(S)-CH₃ біциклічний нуклеозид (наприклад, cEt); "s" позначає тіофосфатні міжнуклеозидні зв'язки (PS); "o" позначає фосфодіестерні міжнуклеозидні зв'язки (PO); і "o'" позначає -O-P(=O)(OH)-. Верхній індекс "m" позначає 5-метилцитозини. "GalNAc₃-1" позначає кон'югуювальну групу, що має структуру, зображену раніше у Прикладі 9. Потрібно зазначити, що GalNAc₃-1 містить розщеплюваний аденозин, який з'єднує ASO з рештою частини кон'югату, що позначений як "GalNAc₃-1_a". Номенклатура, використана у представлений вище таблиці, ілюструє повну послідовність азотистих основ, включаючи аденозин, що є частиною кон'югату. Отже, у представлений вище таблиці послідовності також можуть бути наведені із закінченням "GalNAc₃-1", без "A_{do}". Таке умовне застосування нижнього індексу "a" для позначення частини кон'югуювальної групи, що не містить розщеплюваного нуклеозиду або розщеплюваного фрагмента, застосовується у всіх представлених Прикладах. Частина кон'югуювальної групи, що не містить розщеплюваного фрагмента, згадується у даному документі як "кластер" або "кластер кон'югату" або "кластер GalNAc₃". У деяких випадках кон'югуювальна група для зручності описана шляхом окремого представлення її кластера та її розщеплюваного фрагмента.

25

30

35

40

Приклад 20. Дозозалежне антисмислове інгібування ApoC III людини у huApoC III трансгенних мишей

ISIS 304801 і ISIS 647535, кожен з яких націлений на ApoC III людини і описаний вище, окремо випробовували і оцінювали в дозозалежному дослідженні відносно їх здатності

інгібувати АроС III людини у трансгенних мишей з АроС III людини.

Лікування

5 Трансгенних мишей з АроСIII людини витримували при 12-годинному циклі освітлення/темряви і забезпечували вільний доступ до корму Teklad lab. До початку експерименту тварин акліматизували щонайменше протягом 7 днів у дослідницькій лабораторії. Приготували ASO в PBS і стерилізували фільтрацією крізь фільтр з розміром отворів 0,2 мкм. ASO розчинили в 0,9 % PBS для ін'єкцій.

10 Трансгенним мишам з АроС III людини один раз на тиждень протягом двох тижнів внутрішньочеревинно вводили ін'єкції ISIS 304801 або 647535 в дозі 0,08, 0,25, 0,75, 2,25 або 6,75 мкмоль/кг або PBS як контрольний зразок. Кожна експериментальна група складалася із 4 тварин. Через сорок вісім годин після введення останньої дози кожен мишу знекровили і умертвили, і збирали тканини.

Аналіз мРНК АроС III

15 Рівні мРНК АроС III в печінці мишей визначили за допомогою ПЛР у реальному часі і реагенту для кількісного визначення РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) за стандартними протоколами. Рівні мРНК АроС III визначали відносно загальної РНК (за допомогою Ribogreen), потім нормалізували до контрольного зразка, обробленого PBS. Результати, наведені нижче, представлені як середній відсоток рівнів мРНК АроС III для кожної експериментальної групи, нормалізованих до контрольного зразка, обробленого PBS, і позначені як «% PBS». В Табл. 5 нижче представлена також напівмаксимальна ефективна доза (ED₅₀) для кожного ASO.

20 Показано, що обидві антисмислові сполуки знижують РНК АроС III, порівняно з контрольним зразком, обробленим PBS. Крім того, антисмислова сполука, кон'югована з GalNAc₃-1 (ISIS 647535), була значно ефективнішою, ніж антисмислова сполука, що не містить кон'югату GalNAc₃-1 (ISIS 304801).

Таблиця 5

Вплив ASO лікування на рівні мРНК АроС III у трансгенних мишей з АроС III людини

ASO	Доза (мкмоль/кг)	% PBS	ED ₅₀ (мкмоль/кг)	3'-кон'югат	Міжнуклеозидний зв'язок/довжина	SEQ ID NO.
PBS	0	100	--	-	--	
ISIS 304801	0,08	95	0,77	Немає	PS/20	20
	0,75	42				
	2,25	32				
	6,75	19				
ISIS 647535	0,08	50	0,074	GalNAc ₃ -1	PS/20	21
	0,75	15				
	2,25	17				
	6,75	8				

Аналіз білка АроС III (турбідиметричний аналіз)

30 Аналіз білка АроС III в плазмі виконали за способами, описаними в роботі Graham et al, Circulation Research, до друку, опублікованій онлайн 29 березня 2013 року.

Близько 100 мкл плазми, виділеної від мишей, аналізували без розбавлення, застосовуючи клінічний аналізатор Olympus і турбідиметричний аналітичний набір АроС III, що є в продажу (Kamiya, кат. № KAI-006, Kamiya Biomedical, Сіетл, штат Вашингтон). Протокол аналізу виконували за описом постачальника.

35 Як показано нижче у Табл. 6, обидві антисмислові сполуки знижують білок АроС III, порівняно з PBS контрольним зразком. Крім того, антисмислова сполука, кон'югована з GalNAc₃-1 (ISIS 647535), була значно ефективнішою, ніж антисмислова сполука, що не містить кон'югату GalNAc₃-1 (ISIS 304801).

Таблиця 6

Вплив ASO лікування на рівні білка ApoC III в плазмі трансгенних мишей з людським ApoC III

ASO	Доза (мкмоль/кг)	% PBS	ED ₅₀ (мкмоль/кг)	3'-кон'югат	Міжнуклеозидний зв'язок/довжина	SEQ ID NO.
PBS	0	100	--	--	--	
ISIS 304801	0,08	86	0,73	Немає	PS/20	20
	0,75	51				
	2,25	23				
	6,75	13				
ISIS 647535	0,08	72	0,19	GalNAc ₃ -1	PS/20	21
	0,75	14				
	2,25	12				
	6,75	11				

Тригліцериди і холестерин плазми виділили за способом Bligh і Dyer (Bligh, E.G. and Dyer, W.J. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917, 1959) (Bligh, E and Dyer, W, Can J Biochem Physiol, 37, 911-917, 1959) (Bligh, E and Dyer, W, Can J Biochem Physiol, 37, 911-917, 1959) і виміряли за допомогою клінічного аналізатора Beckmann Coulter і реагентів, що є у продажу.

Рівні тригліцеридів виміряли відносно мишей, ін'єктованих PBS, і виразили як «% PBS». Результати представлені у Табл. 7. Показано, що обидві антисмислові сполуки знижують рівні тригліцеридів. Крім того, антисмислова сполука, кон'югована з GalNAc₃-1 (ISIS 647535), була значно ефективнішою, ніж антисмислова сполука, що не містить кон'югату GalNAc₃-1 (ISIS 304801).

Таблиця 7

Вплив ASO лікування на рівні тригліцеридів у трансгенних мишей

ASO	Доза (мкмоль/кг)	% PBS	ED ₅₀ (мкмоль/кг)	3'-кон'югат	Міжнуклеозидний зв'язок/довжина	SEQ ID NO.
PBS	0	100	--	--	--	
ISIS 304801	0,08	87	0,63	Немає	PS/20	20
	0,75	46				
	2,25	21				
	6,75	12				
ISIS 647535	0,08	65	0,13	GalNAc ₃ -1	PS/20	21
	0,75	9				
	2,25	8				
	6,75	9				

Зразки плазми аналізували за допомогою ВЕРХ для визначення кількості загального холестерину і різних фракцій холестерину (HDL і LDL). Результати представлені в Табл. 8 і 9. Показано, що обидві антисмислові сполуки знижують загальні рівні холестерину; обидві знижують LDL; і обидві підвищують HDL. Крім того, антисмислова сполука, кон'югована з GalNAc₃-1 (ISIS 647535), була значно ефективнішою, ніж антисмислова сполука, що не містить кон'югату GalNAc₃-1 (ISIS 304801). Збільшення рівнів HDL і зниження рівнів LDL є сприятливим серцево-судинним ефектом антисмислового інгібування ApoC III.

Таблиця 8

Вплив ASO лікування на рівні загального холестерину у трансгенних мишей

ASO	Доза (мкмоль/кг)	Загальний холестерин (мг/дл)	3'-кон'югат	Міжнуклеозидний зв'язок/довжина	SEQ ID NO.
PBS	0	257	--	--	
ISIS 304801	0,08	226	Немає	PS/20	20
	0,75	164			
	2,25	110			
	6,75	82			
ISIS 647535	0,08	230	GalNAc ₃ -1	PS/20	21
	0,75	82			
	2,25	86			
	6,75	99			

Таблиця 9

Вплив ASO лікування на рівні HDL і LDL холестерину у трансгенних мишей

ASO	Доза (мкмоль/кг)	HDL (мг/дл)	LDL (мг/дл)	3'-кон'югат	Міжнуклеозидний зв'язок/довжина	SEQ ID NO.
PBS	0	17	28	--	--	
ISIS 304801	0,08	17	23	Немає	PS/20	32
	0,75	27	12			
	2,25	50	4			
	6,75	45	2			
ISIS 647535	0,08	21	21	GalNAc ₃ -1	PS/20	111
	0,75	44	2			
	2,25	50	2			
	6,75	58	2			

Фармакокінетичний аналіз (ФК)

- 5 Оцінили також ФК ASO. Зразки печінки і нирок подрібнили і екстрагували за стандартними протоколами. Зразки аналізували на MSD1 за допомогою ІП-ВЕРХ-МС. Визначили вміст (мкг/г) в тканині ISIS 304801 і 647535 повної довжини, і результати представлені у Табл. 10. Показано, що концентрації в печінці антисмислових сполук повної довжини були подібними для двох антисмислових сполук. Отже, навіть незважаючи на те, що GalNAc₃-1-кон'югована
- 10 антисмислова сполука є активнішою в печінці (як показано за даними РНК і білка, представленими вище), її вміст у печінці не набагато вищий. Дійсно, обчислене значення EC₅₀ (представлене у Табл. 10) підтверджує, що спостережуване збільшення ефективності кон'югованої сполуки не може бути віднесене виключно на рахунок підвищеного накопичення. Такий результат дозволяє припустити, що кон'югат покращує ефективність за іншим
- 15 механізмом, ніж просте накопичення у печінці, можливо за рахунок збільшення продуктивного захоплення антисмислової сполуки у клітини.

Ці результати показують також, що концентрація GalNAc₃-1-кон'югованої антисмислової сполуки у нирках є нижчою, ніж концентрація антисмислової сполуки, що не містить кон'югату GalNAc. Це має декілька сприятливих терапевтичних ефектів. Для терапевтичних показань, при

20 яких не потрібен прояв активності в нирках, вплив на нирки піддає їх ризику токсичності без відповідної користі. Більше того, висока концентрація в нирках звичайно приводить до виведення сполуки із сечею, забезпечуючи швидше виведення. Відповідно, для позаниркових мішеней накопичення в нирках є небажаним. Ці дані дозволяють припустити, що кон'югація з GalNAc₃-1 знижує накопичення в нирках.

25

Таблиця 10

ФК аналіз ASO лікування у трансгенних мишей

ASO	Доза (мкмоль/кг)	Печінка (мкг/г)	Нирки (мкг/г)	EC ₅₀ в печінці (мкг/г)	3'- кон'югат	Міжнуклеозидний зв'язок/довжина	SEQ ID NO.
ISIS 304801	0,1	5,2	2,1	53	Немає	PS/20	20
	0,8	62,8	119,6				
	2,3	142,3	191,5				
	6,8	202,3	337,7				
ISIS 647535	0,1	3,8	0,7	3,8	GalNAc ₃ -1	PS/20	21
	0,8	72,7	34,3				
	2,3	106,8	111,4				
	6,8	237,2	179,3				

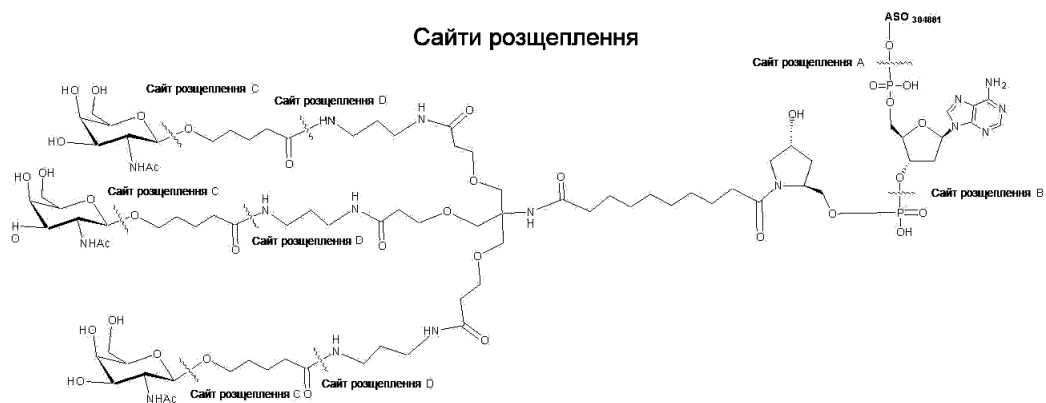
Ідентифікували також метаболіти ISIS 647535 і підтвердили їх маси за допомогою мас-спектрометричного аналізу з високим розрізненням. Сайти розщеплення і структури спостережуваних метаболітів представлені нижче. Відносний % від загальної довжини ASO обчислили за стандартними прийомами, а результати представлені в Табл. 10а. Основний метаболіт ISIS 647535 є ASO повної довжини без всього кон'югату (тобто ISIS 304801), який утворюється в результаті розщеплення за сайтом розщеплення А, представленим нижче. Крім того, спостерігали також додаткові метаболіти, що утворюються з інших сайтів розщеплення. Ці результати дозволяють припустити, що може бути придатним також введення інших розщеплюваних зв'язків, таких як естери, пептиди, дисульфідиди, фосфорамідати або ацил-гідразони, між цукром GalNAc₃-1 і ASO, які можуть розщеплюватися під дією ферментів усередині клітини або які можуть розщеплюватися у відновному середовищі цитозолу, або які є лабільними при кислотному рН усередині ендосом і лізосом.

Таблиця 10а

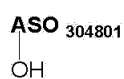
Спостережувані метаболіти повної довжини ISIS 647535

Метаболіт	ASO	Сайт розщеплення	Відносний %
1	ISIS 304801	A	36,1
2	ISIS 304801+dA	B	10,5
3	ISIS 647535 мінус [3 GalNAc]	C	16,1
4	ISIS 647535 мінус [3 GalNAc+1 зв'язка 5-гідрокси-пентанової кислоти]	D	17,6
5	ISIS 647535 мінус [2 GalNAc+2 зв'язки 5-гідрокси-пентанової кислоти]	D	9,9
6	ISIS 647535 мінус [3 GalNAc+3 зв'язки 5-гідрокси-пентанової кислоти]	D	9,8

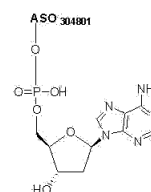
Сайти розщеплення



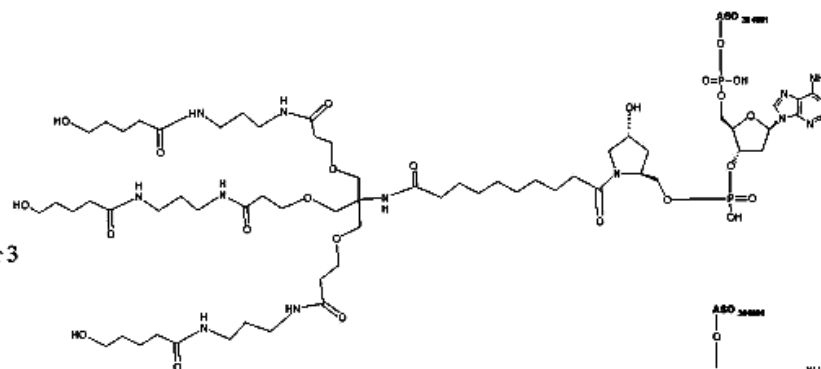
Метаболіт 1



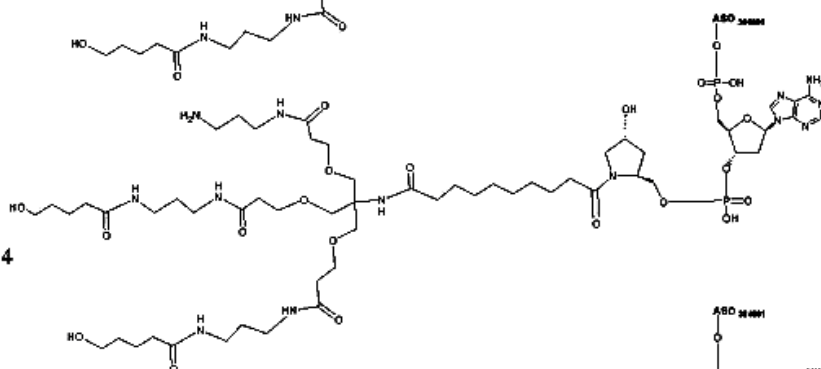
Метаболіт 2



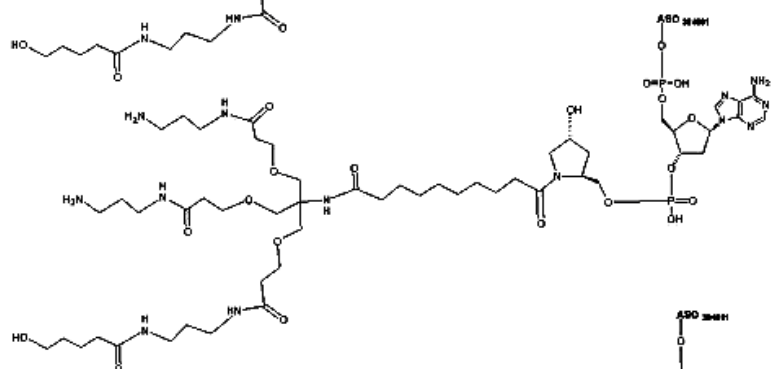
Метаболіт 3



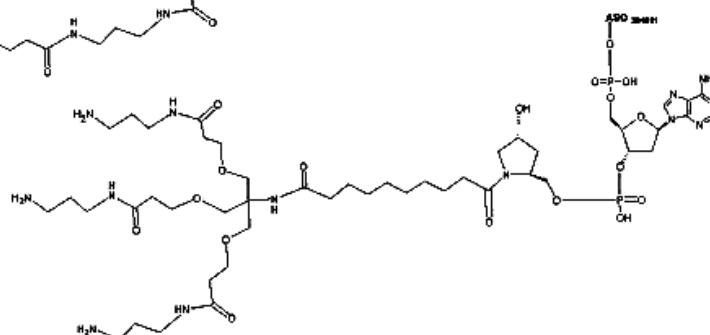
Метаболіт 4



Метаболіт 5



Метаболіт 6



Приклад 21. Антисмислове інгібування людського АроС III у трансгенних мишей з АроС III у дослідженні з одним введенням

ISIS 304801, 647535 і 647536, кожний з яких націлений на людський АроС III і описаний у Табл. 4, додатково оцінювали в дослідженні одноразового введення відносно їх здатності інгібувати людський АроС III у трансгенних мишей з людським АроС III.

Лікування

Трансгенних мишей з людським АроСIII витримували при 12-годинному циклі освітлення/темряви і забезпечували вільний доступ до їжі Teklad lab. До початку експерименту тварин акліматизували щонайменше протягом 7 днів у дослідницькій лабораторії. Приготували ASO у PBS і стерилізували фільтрацією крізь фільтр 0,2 мікрони. ASO розчинили в 0,9 % PBS для ін'єкцій.

Трансгенним мишам з людським АроС III внутрішньочеревинно ввели одноразову ін'єкцію дози, представленої нижче, сполуки ISIS 304801, 647535 або 647536 (описаних вище) або PBS як контрольний зразок. Експериментальна група складалася із 3 тварин, а контрольна група складалася із 4 тварин. Перед лікуванням, а також після останньої дози у кожної миші брали кров і аналізували зразки плазми. Мишей умертвили через 72 години після останнього введення.

Зразки зібрали і аналізували для визначення рівнів мРНК АроС III і білка в печінці; тригліцеридів у плазмі; і холестерину, включаючи фракції HDL і LDL, які аналізували так, як описано вище (Приклад 20). Дані цих аналізів представлені нижче у Табл. 11-15. Рівні трансамінази в печінці, аланін-амінотрансферази (ALT) і аспартат-амінотрансферази (AST) у сироватці вимірювали відносно мишей, ін'єктованих сольовим розчином, застосовуючи стандартні протоколи. Рівні ALT і AST показали, що антисмислові сполуки добре переносяться при усіх введених дозах.

Ці результати демонструють підсилення ефективності антисмислових сполук, що містять кон'югат GalNAc₃-1 на 3'-кінці (ISIS 647535 і 647536), порівняно з антисмисловою сполукою, що не містить кон'югату GalNAc₃-1 (ISIS 304801). Крім того, ISIS 647536, що містить кон'югат GalNAc₃-1 і декілька фосфодіестерних зв'язків, був таким же ефективним, як ISIS 647535, що містить такий же кон'югат, і всі міжнуклеозидні зв'язки в цьому ASO є тіофосфатними.

Таблиця 11

Вплив ASO лікування на рівні мРНК АроС III у трансгенних мишей з людським АроС III

ASO	Доза (мг/кг)	% PBS	ED ₅₀ (мг/кг)	3'-кон'югат	Міжнуклео-зидний зв'язок/дов-жина	SEQ ID NO.
PBS	0	99	--	-	--	
ISIS 304801	1	104	13,2	Немає	PS/20	20
	3	92				
	10	71				
	30	40				
ISIS 647535	0,3	98	1,9	GalNAc ₃ -1	PS/20	21
	1	70				
	3	33				
	10	20				
ISIS 647536	0,3	103	1,7	GalNAc ₃ -1	PS/PO/20	21
	1	60				
	3	31				
	10	21				

Таблиця 12

Вплив ASO лікування на рівні білка ApoC III в плазмі трансгенних мишей з людським ApoC III

ASO	Доза (мг/кг)	% PBS	ED ₅₀ (мг/кг)	3'-кон'югат	Міжнуклеозидний зв'язок/довжина	SEQ ID NO.
PBS	0	99	--	--	--	
ISIS 304801	1	104	23,2	Немає	PS/20	20
	3	92				
	10	71				
	30	40				
ISIS 647535	0,3	98	2,1	GalNAc ₃ -1	PS/20	21
	1	70				
	3	33				
	10	20				
ISIS 647536	0,3	103	1,8	GalNAc ₃ -1	PS/PO/20	21
	1	60				
	3	31				
	10	21				

Таблиця 13

Вплив ASO лікування на рівні тригліцеридів у трансгенних мишей

ASO	Доза (мг/кг)	% PBS	ED ₅₀ (мг/кг)	3'-кон'югат	Міжнуклеозидний зв'язок/довжина	SEQ ID NO.
PBS	0	98	--	--	--	
ISIS 304801	1	80	29,1	Немає	PS/20	20
	3	92				
	10	70				
	30	47				
ISIS 647535	0,3	100	2,2	GalNAc ₃ -1	PS/20	21
	1	70				
	3	34				
	10	23				
ISIS 647536	0,3	95	1,9	GalNAc ₃ -1	PS/PO/20	21
	1	66				
	3	31				
	10	23				

Таблиця 14

Вплив ASO лікування на рівні загального холестерину у трансгенних мишей

ASO	Доза (мг/кг)	% PBS	3'-кон'югат	Міжнуклеозидний зв'язок/довжина	SEQ ID NO.
PBS	0	96	--	--	
ISIS 304801	1	104	Немає	PS/20	20
	3	96			
	10	86			
	30	72			
	0,3	93			
ISIS 647535	1	85	GalNAc ₃ -1	PS/20	21
	3	61			
	10	53			
	0,3	115			
ISIS 647536	1	79	GalNAc ₃ -1	PS/PO/20	21
	3	51			
	10	54			
	0,3	115			

Таблиця 15

Вплив ASO лікування на рівні HDL і LDL холестерину у трансгенних мишей

ASO	Доза (мг/кг)	HDL % PBS	LDL % PBS	3'-кон'югат	Міжнуклеозидний зв'язок/довжина	SEQ ID NO.
PBS	0	131	90	--	--	
ISIS 304801	1	130	72	Немає	PS/20	20
	3	186	79			
	10	226	63			
	30	240	46			
ISIS 647535	0,3	98	86	GalNAc ₃ -1	PS/20	21
	1	214	67			
	3	212	39			
	10	218	35			
ISIS 647536	0,3	143	89	GalNAc ₃ -1	PS/PO/20	21
	1	187	56			
	3	213	33			
	10	221	34			

Ці результати підтверджують, що кон'югат GalNAc₃-1 покращує ефективність антисмислової сполуки. Ці результати показують також однакову ефективність GalNAc₃-1-кон'югованих антисмислових сполук, у яких антисмислові олігонуклеотиди мають змішані зв'язки (ISIS 647536, який має шість фосфодіестерних зв'язків), і повністю тіофосфатної версії тієї ж антисмислової сполуки (ISIS 647535).

Тіофосфатні зв'язки забезпечують декілька властивостей антисмислових сполук. Наприклад, вони є стійкими до нуклеазного розщеплення і зв'язуються з білками, що приводить до накопичення сполуки у печінці, а не в нирках/сечі. Ці властивості є бажаними, особливо при лікуванні показань у печінці. Однак тіофосфатні зв'язки пов'язані також із запальною реакцією. Відповідно, зменшення кількості тіофосфатних зв'язків у сполуці імовірно знижує ризик запалення, але знижує також концентрацію сполуки у печінці, підвищує концентрацію в нирках і сечі, знижує стабільність у присутності нуклеаз і зменшує загальну ефективність. Представлені результати демонструють, що GalNAc₃-1-кон'югована антисмислова сполука, у якій деякі тіофосфатні зв'язки замінені фосфодіестерними зв'язками, є настільки ж ефективною проти мішені у печінці, як і аналог, що містить тільки тіофосфатні зв'язки. Такі сполуки ймовірно є меншою мірою прозапальними (див. Приклад 24, у якому описаний експеримент, який демонструє, що зменшення тіофосфатів (PS) приводить до зниження запальної дії).

Приклад 22. Вплив модифікованого GalNAc₃-1-кон'югованого ASO, націленого на SRB-1, in

vivo

ISIS 440762 і 651900, кожен з яких націлений на SRB-1 і описаний у Табл. 4, оцінили в дозозалежному дослідженні відносно їх здатності інгібувати SRB-1 у мишей Balb/c.

Лікування

- 5 Шеститижневим самцям мишей Balb/c (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мен) ввели одноразову підшкірну ін'єкцію дози, представленої нижче, сполуки ISIS 440762, 651900 або PBS як контрольний зразок. Кожна експериментальна група складалася із 4 тварин. Мишей умертвили через 48 годин після останнього введення для визначення рівнів мРНК SRB-1 у печінці за допомогою ПЛР у реальному часі і реагенту для кількісного визначення РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) за стандартними протоколами.
- 10 Рівні мРНК SRB-1 визначали відносно загальної РНК (за допомогою Ribogreen), потім нормалізували до контрольного зразка, обробленого PBS. Результати, наведені нижче, представлені як середній відсоток рівнів мРНК SRB-1 для кожної експериментальної групи, нормалізованих до контрольного зразка, обробленого PBS, і позначені як «% PBS».
- 15 Як показано у Табл. 16, обидві антисмислові сполуки знижують рівні мРНК SRB-1. Крім того, антисмислова сполука, що містить кон'югат GalNAc₃-1 (ISIS 651900), була значно ефективнішою, ніж антисмислова сполука, що не містить кон'югату GalNAc₃-1 (ISIS 440762). Ці результати демонструють, що перевага ефективності кон'югатів GalNAc₃-1 спостерігається при застосуванні антисмислових олігонуклеотидів, що є комплементарними різним мішеням і мають
- 20 різні хімічно модифіковані нуклеозиди, в цьому випадку модифіковані нуклеозиди містять стерично ускладнені етил-цукрові фрагменти (біциклічний цукровий фрагмент).

Таблиця 16

Вплив ASO лікування на рівні мРНК SRB-1 у мишей Balb/c

ASO	Доза (мг/кг)	Печінка % PBS	ED ₅₀ (мг/кг)	3'-кон'югат		Міжнуклеозид-ний зв'язок/довжина	SEQ ID NO.
PBS	0	100		-		--	
ISIS 440762	0,7	85	2,2	Немає		PS/14	22
	2	55					
	7	12					
	20	3					
ISIS 651900	0,07	98	0,3	GalNAc ₃ -1		PS/14	23
	0,2	63					
	0,7	20					
	2	6					
	7	5					

- 25 Приклад 23. Протокол аналізу людських мононуклеарних клітин периферичної крові (hPBMC)

Аналіз hPBMC виконали за допомогою пробірного способу BD Vacutainer CPT. Одержали зразок цільної крові, одержаної від донорів-добровольців, що дали поінформовану згоду у Медичній клініці США (Faraday & El Camino Real, Карлсбад), і зібрали його в 4-15 пробірок BD Vacutainer CPT по 8 мл (VWR, кат. № BD362753). Приблизний початковий загальний об'єм

- 30 цільної крові у пробірках CPT для кожного донора записали у формулярі аналізу PBMC.
- Перед центрифугуванням зразок крові негайно повторно перемішали, обережно перевертаючи пробірки 8-10 разів. Пробірки CPT центрифугували при кімнатній температурі (18-25 °C) в горизонтальному (з надмірним повертанням) роторі протягом 30 хвилин з фактором розділення (RCF) 1500-1800 із загальмовуванням (2700 об/хв Beckman Allegra 6R). Клітини
- 35 зняли з лейкоцитарної поверхні розділу (між шарами фіколу і полімерного гелю); перенесли до стерильної 50 мл конічної пробірки і згрупували по 5 CPT пробірок/50 мл конічна пробірка/донор. Далі клітини двічі промили PBS (без Ca⁺⁺, Mg⁺⁺; GIBCO). Пробірки поповнили до 50 мл і перемішали, перевертаючи декілька разів. Далі зразок центрифугували при 330 x g протягом 15 при кімнатній температурі (1215 об/хв у Beckman Allegra 6R) і аспірували
- 40 максимальну кількість супернатанту, не порушуючи осаду. Клітинний осад зняли, обережно повертаючи пробірку, і ресуспендували клітини в RPMI+10 % FBS+пеніцилін/стрептоміцин (~1 мл/10 мл початкового об'єму цільної крові). Піпеткою відібрали 60 мкл зразка і вмістили до флакону з пробою (Beckman Coulter), що містить 600 мкл реагенту VersaLyse (Beckman Coulter, кат. № A09777), та обережно перемішували вихровим перемішуванням протягом 10-15 секунд.

Зразок залишили інкубуватися протягом 10 хвилин при кімнатній температурі, і знову перемішали перед підрахунком. Суспензію клітин зчитували на аналізаторі життєздатності клітин Vicell XR (Beckman Coulter), використовуючи клітини типу PBMC (зберегли фактор розведення 1:11 з іншими параметрами). Записали кількість живих клітин/мл і життєздатність.

Клітинну суспензію розбавили до 1×10^7 живих PBMC/мл RPMI+10 % FBS+пеніцилін/стрептоміцин.

Клітини вмістили на планшет при 5×10^5 в 50 мкл/ямку 96-лункового тканинного культурального планшета (Falcon Microtest). 50 мкл/ямку 2х концентрації олігомерів/контролю, розбавлених RPMI+10 % FBS+пеніцилін/стрептоміцин, додали відповідно до експериментальної матриці (в цілому 100 мкл/ямку). Планшети вмістили на шейкер і залишили перемішуватися приблизно на 1 хвилину. Після інкубації протягом 24 годин при 37 °C; 5 % CO₂, планшети центрифугували при 400 x g протягом 10 хвилин, потім видалили супернатант для аналізу цитокінів MSD (тобто людських IL-6, IL-10, IL-8 і MCP-1).

Приклад 24. Оцінка прозапальних ефектів в аналізі hPBMC для GalNAc₃-1-кон'югованих ASO. Антисмислові олігонуклеотиди (ASO), наведені у Табл. 17, оцінили відносно прозапальної дії в аналізі hPBMC, використовуючи протокол, описаний у Прикладі 23. ISIS 353512 є внутрішнім стандартом, що, як відомо, має високу відповідь на вивільнення IL-6 в цьому аналізі. hPBMC виділили із свіжих зразків, одержаних від донорів-добровольців, і обробили ASO у концентраціях 0, 0,0128, 0,064, 0,32, 1,6, 8, 40 і 200 мкМ. Через 24 години обробки виміряли рівні цитокінів.

Рівні IL-6 застосували як первинне показання. EC₅₀ і E_{max} обчислили стандартними способами. Результати виразили як середнє співвідношення E_{max}/EC₅₀ для двох донорів і позначили як "E_{max}/EC₅₀". Нижче співвідношення означає відносне зниження прозапальної відповіді, а вище співвідношення означає відносне збільшення прозапальної відповіді.

Відносно досліджуваних сполук, найменш прозапальною сполукою був ASO, з'єднаний за допомогою PS/PO (ISIS 616468). GalNAc₃-1-кон'югований ASO, ISIS 647535, був небагато менш прозапальним, ніж його некон'югований аналог, ISIS 304801. Ці результати показують, що введення декількох PO зв'язків знижує прозапальну реакцію, а додавання кон'югату GalNAc₃-1 не робить сполуку більш прозапальною, і може знижувати прозапальну реакцію. Відповідно, можна очікувати, що антисмислова сполука, яка містить змішані PS/PO зв'язки і кон'югат GalNAc₃-1, може спричиняти слабші прозапальні реакції, порівняно з антисмисловою сполукою, з'єднаною тільки за допомогою PS, з кон'югатом GalNAc₃-1 або без нього. Ці результати показують, що GalNAc₃-1-кон'юговані антисмислові сполуки, зокрема, сполуки, що мають менший вміст PS, є менш прозапальними.

В цілому, ці результати дозволяють припустити, що GalNAc₃-1-кон'югована сполука, зокрема, сполука із зниженим вмістом PS, може бути введена у вищій дозі, ніж аналогічна повністю PS антисмислова сполука без кон'югату GalNAc₃-1. Оскільки не очікується, що період напіввиведення для цих сполук істотно відрізнятиметься, то таке введення у вищій дозі зумовить менш часте введення доз. Насправді, таке введення може бути ще рідшим, оскільки GalNAc₃-1-кон'юговані сполуки є ефективнішими (див. Приклади 20-22), а повторне введення дози необхідне тільки при зниженні концентрації сполуки нижче за бажаний рівень, при цьому такий бажаний рівень обумовлений ефективністю.

Таблиця 17

Модифіковані ASO

ASO	Послідовність (від 5' до 3')	Мішень	SEQ ID NO.
ISIS 104838	G _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} A _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	TNFα	24
ISIS 353512	T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} T _{es} G _{es} G _e	CRP	25
ISIS 304801	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	ApoC III	20
ISIS 647535	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _{eo} A _{do} -GalNAc ₃ -1 _a	ApoC III	21
ISIS 616468	A _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{eo} T _{eo} T _{es} A _{es} T _e	ApoC III	20

Нижні індекси: "e" позначає 2'-MOE модифікований нуклеозид; "d" позначає β-D-2'-

- 5 дезоксирибонуклеозид; "k" позначає 6'-(S)-CH₃ біциклічний нуклеозид (наприклад, cEt); "s" позначає тіофосфатні міжнуклеозидні зв'язки (PS); "o" позначає фосфодіестерні міжнуклеозидні зв'язки (PO); і "o'" позначає -O-P(=O)(OH)-. Верхній індекс "m" позначає 5-метилцитозини. "A_{do}'-GalNAc₃-1_a" позначає кон'югат, що має структуру GalNAc₃-1, представлену у Прикладі 9, приєднаний до 3'-кінця вказаного антисмислового олігонуклеотиду.

Таблиця 18

Прозапальна дія ASO, націлених на ApoC III, в аналізі hPBMC

ASO	EC ₅₀ (мкМ)	E _{max} (мкМ)	E _{max} /EC ₅₀	3'-кон'югат	Міжнуклеозидний зв'язок/довжина	SEQ ID No.
ISIS 353512 (з високою відповіддю)	0,01	265,9	26,590	Немає	PS/20	25
ISIS 304801	0,07	106,55	1,522	Немає	PS/20	20
ISIS 647535	0,12	138	1,150	GalNAc ₃ -1	PS/20	21
ISIS 616468	0,32	71,52	224	Немає	PS/PO/20	20

Приклад 25. Вплив модифікованого GalNAc₃-1-кон'югованого ASO, націленого на людський ApoC III, in vitro

- 10 ISIS 304801 і 647535, описані вище, випробували in vitro. Первинні гепатоцитарні клітини трансгенних мишей при густині 25000 клітин на ямку обробили концентраціями 0,03, 0,08, 0,24, 0,74, 2,22, 6,67 і 20 мкМ модифікованих олігонуклеотидів. Після обробки протягом близько 16 годин, з клітин виділили РНК і виміряли рівні мРНК за допомогою кількісної ПЛР у реальному часі, а рівні мРНК hApoC III скоректували відповідно до загального вмісту РНК, виміряного за допомогою RIBOGREEN.

15 IC₅₀ обчислили стандартними способами, і результати представлені у Табл. 19. Показано, що спостерігали порівнянну ефективність у клітинах, оброблених ISIS 647535, порівняно з контрольним зразком, ISIS 304801.

Таблиця 19

Модифіковані ASO, націлені на людські ApoC III, у первинних гепатоцитах

ASO	IC ₅₀ (мкМ)	3'-кон'югат	Міжнуклеозидний зв'язок/довжина	SEQ ID NO.
ISIS 304801	0,44	Немає	PS/20	20
ISIS 647535	0,31	GalNAc ₃ -1	PS/20	21

- 20 У цьому експерименті in vitro не спостерігали такої великої переваги в ефективності для кон'югації з GalNAc₃-1, як спостерігали in vivo. Подальші експерименти з вільним захопленням у первинних гепатоцитах in vitro не показали підвищеної ефективності олігонуклеотидів, що містять різні кон'югати GalNAc, порівняно з олігонуклеотидами, що не містять кон'югатів GalNAc (див. Приклади 60, 82 і 92).

25 Приклад 26. Вплив зв'язків PO/PS на активність ASO відносно ApoC III

- 30 Трансгенним мишам з людським ApoC III внутрішньоочеревинною ін'єкцією вводили 25 мг/кг ISIS 304801 або ISIS 616468 (обидва описані вище) або PBS як контрольний зразок, один раз на тиждень протягом двох тижнів. Експериментальна група складалася із 3 тварин, а контрольна група складалася із 4 тварин. Перед лікуванням, а також після введення останньої дози у кожної миші брали кров і аналізували зразки плазми. Мишей умертвили через 72 години після останнього введення.

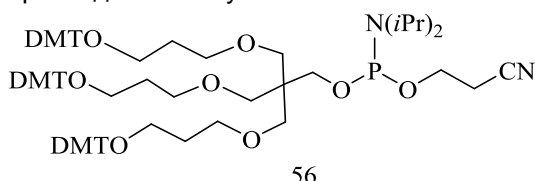
Зразки зібрали і аналізували для визначення рівнів білка ApoC III у печінці, як описано вище (Приклад 20). Дані цих аналізів представлені нижче у Табл. 20.

- 35 Ці результати демонструють зниження ефективності антисмислових сполук з PO/PS (ISIS 616468) у крилах, порівняно із сполуками, що містять тільки PS (ISIS 304801).

Вплив ASO лікування на рівні білка ApoC III у трансгенних мишей з людським ApoC III

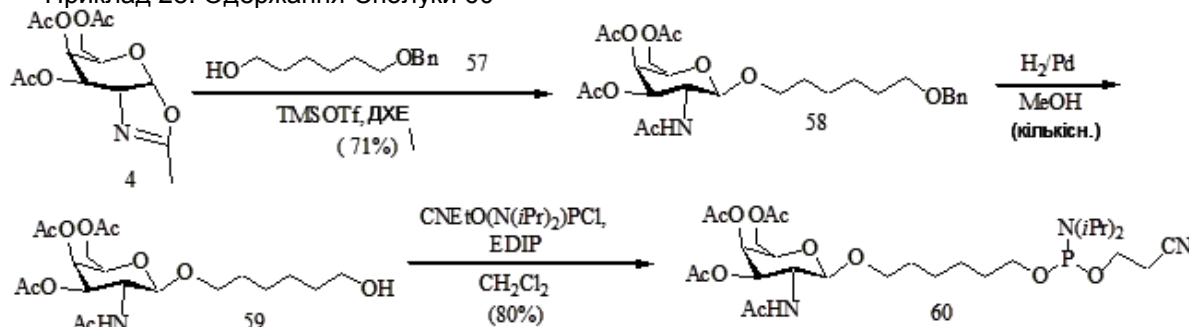
ASO	Доза (мг/кг)	% PBS	3'-кон'югат	Міжнуклеозидний зв'язок/довжина	SEQ ID NO.
PBS	0	99	-	--	
ISIS 304801	25 мг/кг/тиждень протягом 2 тижнів	24	Немає	Повністю PS	20
ISIS 616468	25 мг/кг/тиждень протягом 2 тижнів	40	Немає	14 PS/6 PO	20

Приклад 27. Сполука 56



- 5 Сполука 56 є в продажу у компанії Glen Research або може бути одержана за опублікованими методиками, описаними авторами Shchepinov et al., Nucleic Acids Research, 1997, 25(22), 4447-4454.

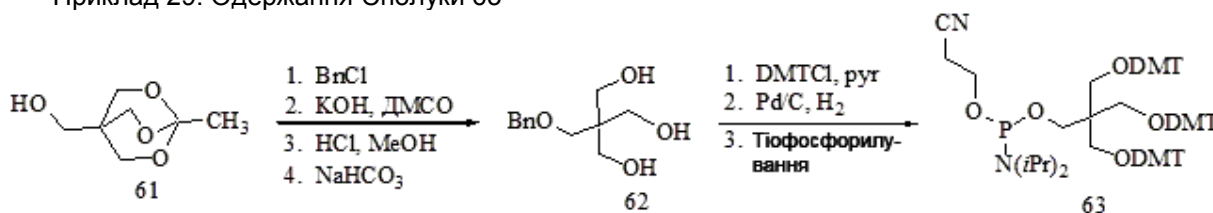
Приклад 28. Одержання Сполуки 60



- 10 Сполуку 4 одержали за способами, описаними у Прикладі 2. Сполука 57 є в продажу. Сполуку 60 підтвердили структурним аналізом.

- 15 Сполука 57 є ілюстративною, та її не потрібно вважати обмежуючою, оскільки можуть бути застосовані інші монозахищені заміщені або незахищені алкілдіоли, включаючи, але без обмеження, ті, які представлені в даному описі, для одержання фосфорамідитів, що мають бажаний склад.

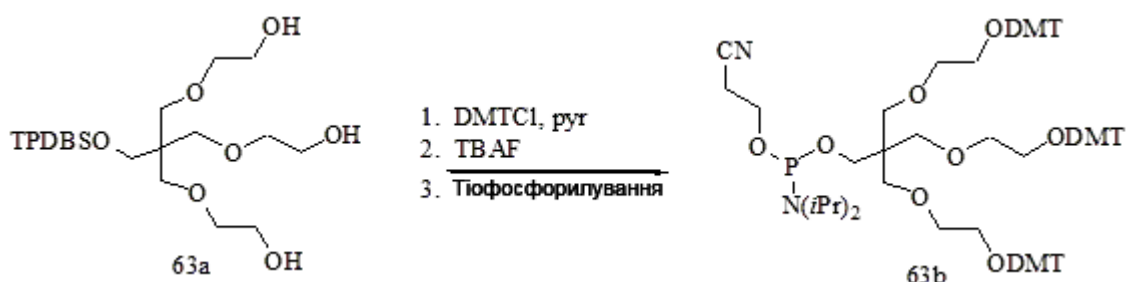
Приклад 29. Одержання Сполуки 63



Сполуки 61 і 62 одержали за такими ж способами, як описані авторами Tober et al., Eur. J. Org. Chem., 2013, 3, 566-577; і Jiang et al., Tetrahedron, 2007, 63(19), 3982-3988.

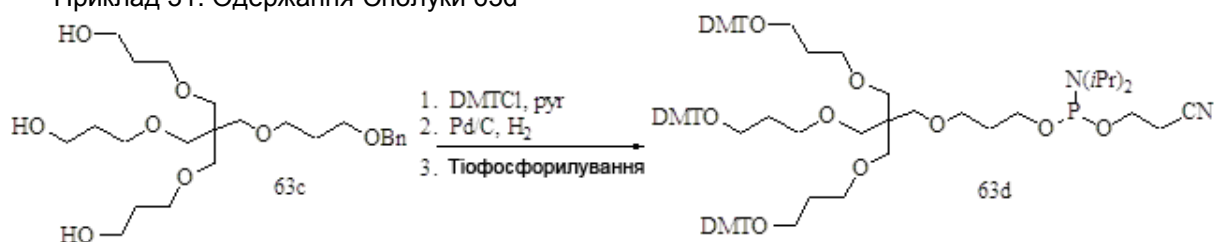
- 20 Альтернативно, Сполуку 63 одержали за такими ж способами, як описані в науковій і патентній літературі авторами Kim et al., Synlett, 2003, 12, 1838-1840; і Kim et al., в опублікованій Міжнародній заявці РСТ WO 2004063208.

Приклад 30. Одержання Сполуки 63b



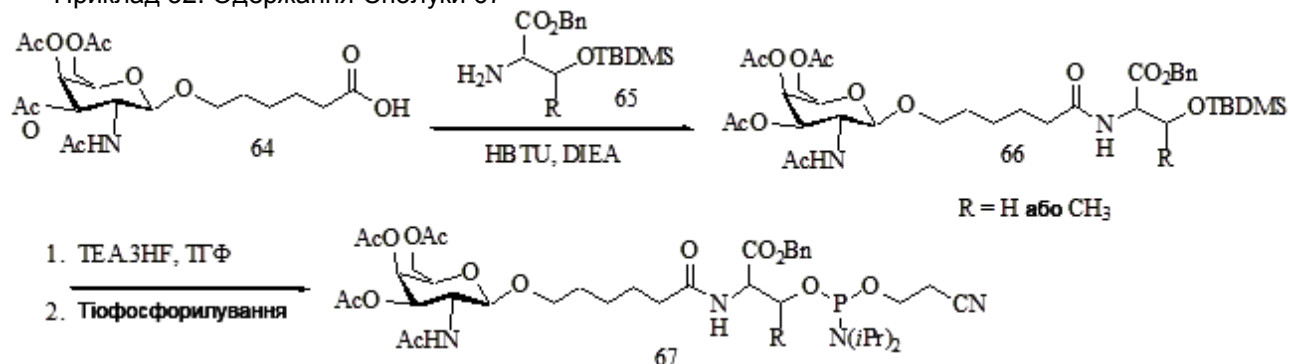
Сполуку 63а одержали за такими ж способами, як описані авторами Hanessian et al., Canadian Journal of Chemistry, 1996, 74(9), 1731-1737.

Приклад 31. Одержання Сполуки 63d



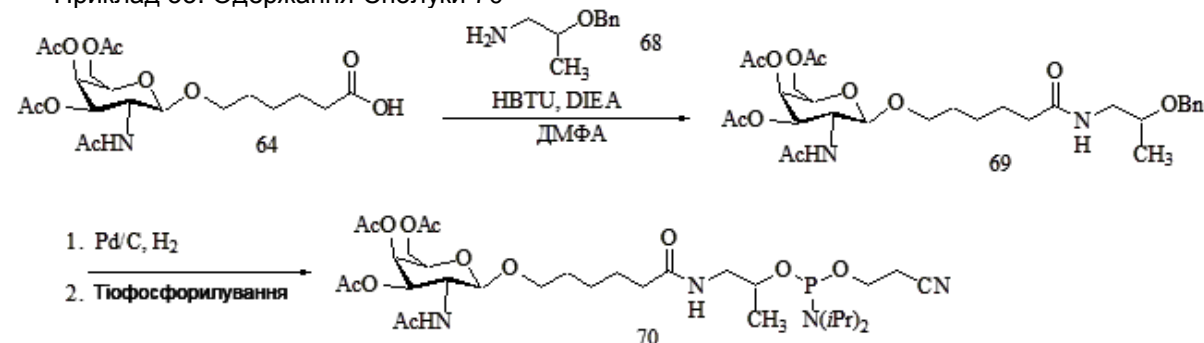
Сполуку 63с одержали за такими ж способами, як описані авторами Chen et al., Chinese Chemical Letters, 1998, 9(5), 451-453.

Приклад 32. Одержання Сполуки 67



Сполуку 64 одержали за способами, представленими у Прикладі 2. Сполуку 65 одержали за такими ж способами, як описані авторами Or et al., в опублікованій Міжнародній заявці PCT WO 2009003009. Захисні групи, застосовані для Сполуки 65, є ілюстративними, і їх не потрібно вважати обмеженням, оскільки можуть бути застосовані інші захисні групи, включаючи, але без обмеження, ті, які представлені в даному описі.

Приклад 33. Одержання Сполуки 70



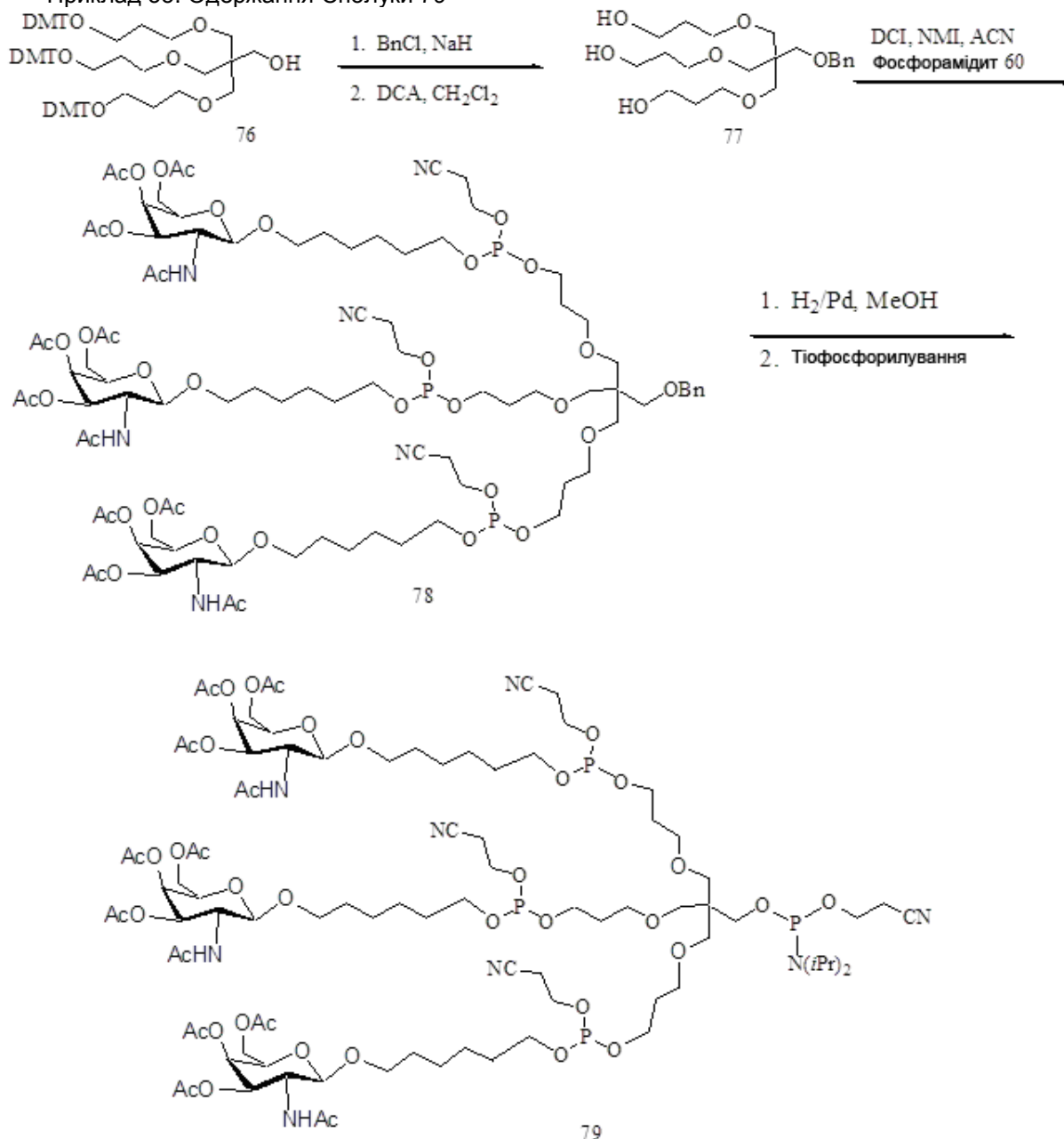
Сполуку 64 одержали за способами, описаними у Прикладі 2. Сполука 68 є в продажу. Захисна група, застосована для Сполуки 68, є ілюстративною, і її не потрібно вважати обмеженням, оскільки можуть бути застосовані інші захисні групи, включаючи, але без обмеження, ті, які представлені в даному описі.

Приклад 34. Одержання Сполуки 75a



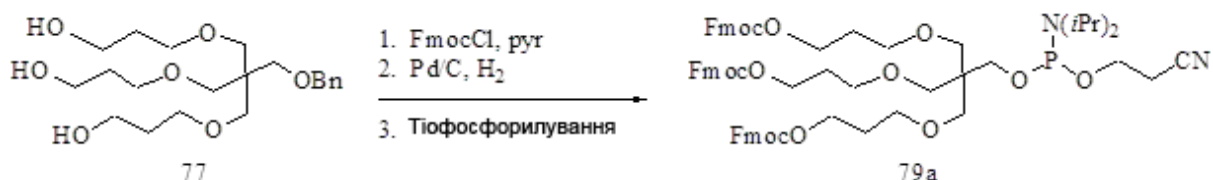
Сполуку 75 одержали за опублікованими методиками, описаними авторами Shchepinov et al., Nucleic Acids Research, 1997, 25(22), 4447-4454.

5 Приклад 35. Одержання Сполуки 79



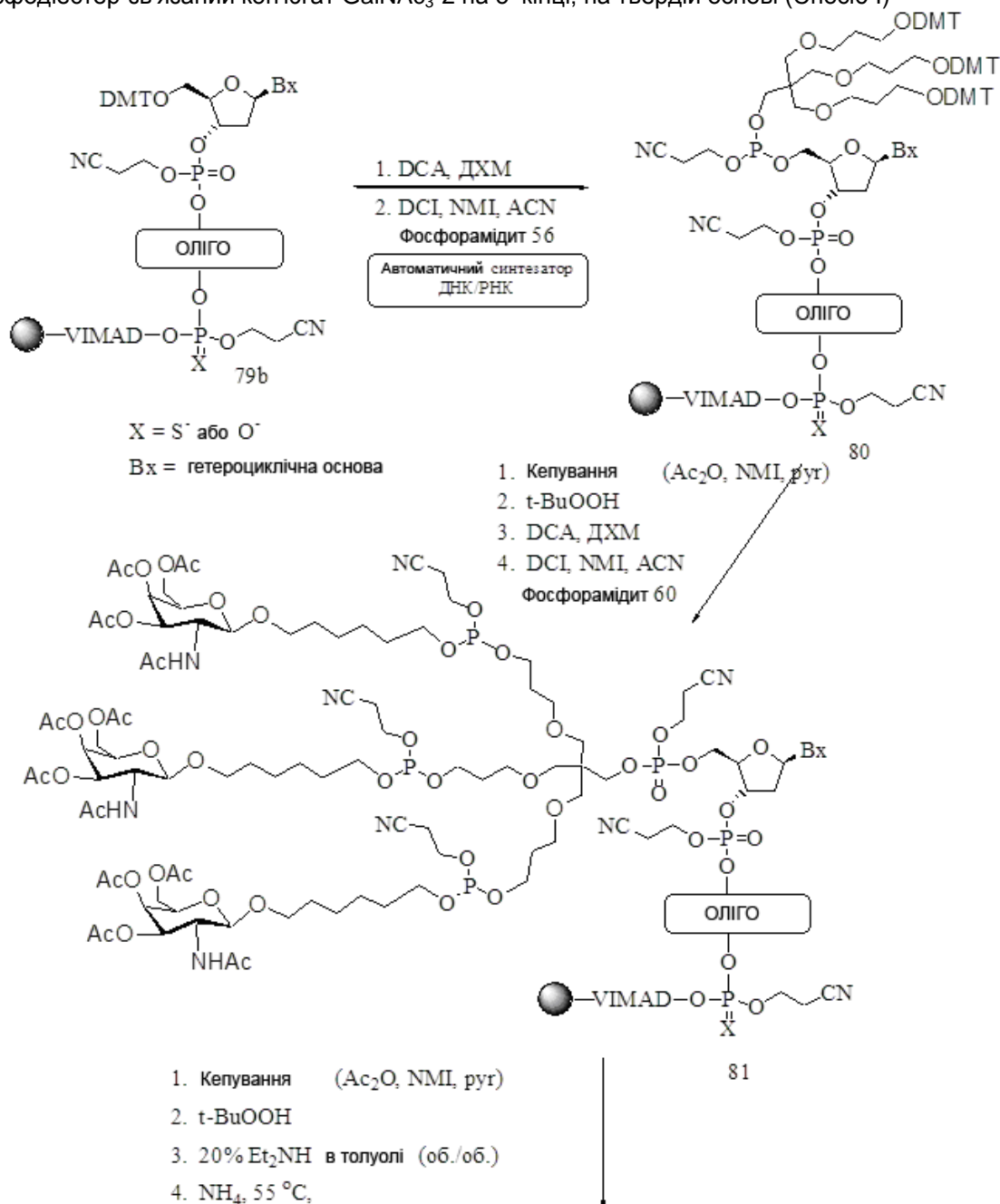
Сполуку 76 одержали за опублікованими методиками, описаними авторами Shchepinov et al., Nucleic Acids Research, 1997, 25(22), 4447-4454.

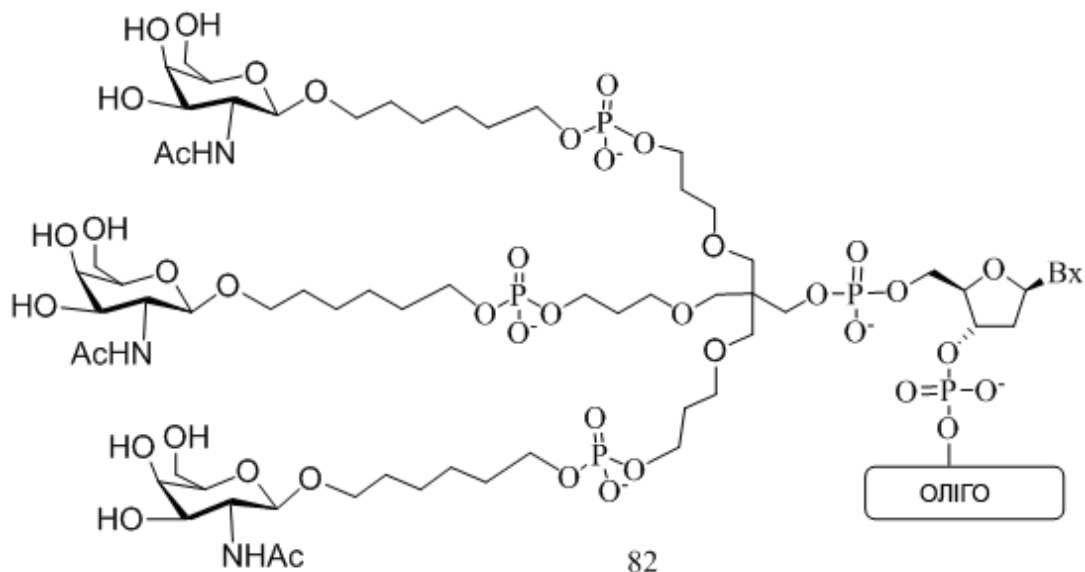
Приклад 36. Одержання Сполуки 79a



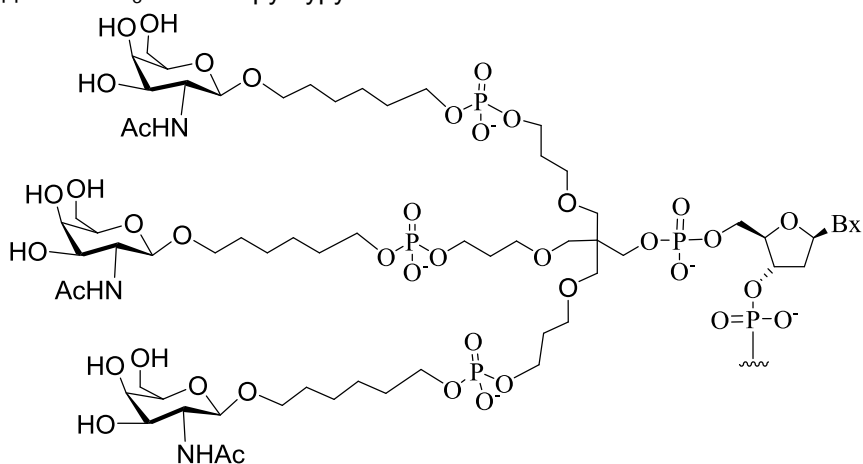
Сполуку 77 одержали за способами, представленими у Прикладі 35.

Приклад 37. Загальний спосіб одержання кон'югованої олігомерної сполуки 82, що містить фосфодіестер-зв'язаний кон'югат GalNAc₃-2 на 5'-кінці, на твердій основі (Спосіб I)

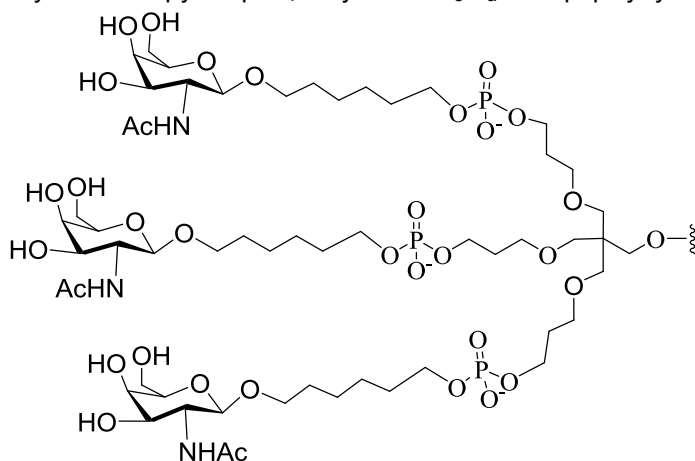




де GalNAc₃-2 має структуру:



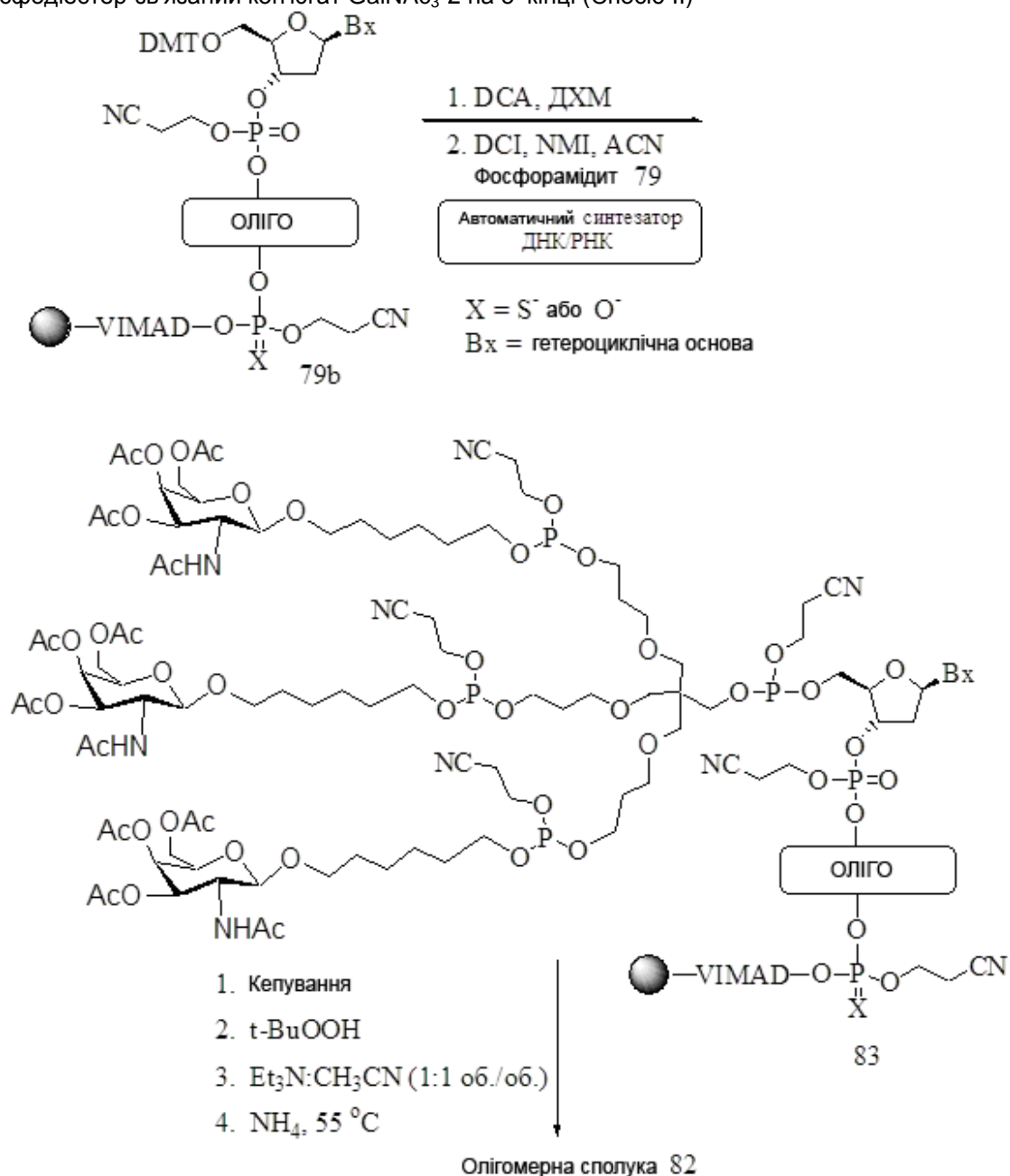
Кластерна частина GalNAc₃ кон'югуювальної групи GalNAc₃-2 (GalNAc₃-2_a) може бути
 5 комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом з одержанням різноманітних кон'югуювальних груп. При цьому GalNAc₃-2_a має формулу:



10 VIMAD-зв'язану олігомерну сполуку 79b одержали стандартними способами в автоматичному синтезаторі ДНК/РНК (див. Dupouy et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2006, 45, 3623-3627). Фосфорамідитні Сполуки 56 і 60 одержали так, як описано в способах у Прикладах 27 і 28, відповідно. Зображені фосфорамідити є ілюстративними, і їх не потрібно вважати обмеженням, оскільки можуть бути застосовані інші фосфорамідитні будівельні блоки, включаючи, але без обмеження, ті, які представлені в даному описі, для одержання олігомерної сполуки, що містить фосфодіестер-зв'язану кон'югуювальну групу на 5'-кінці. Порядок і кількість

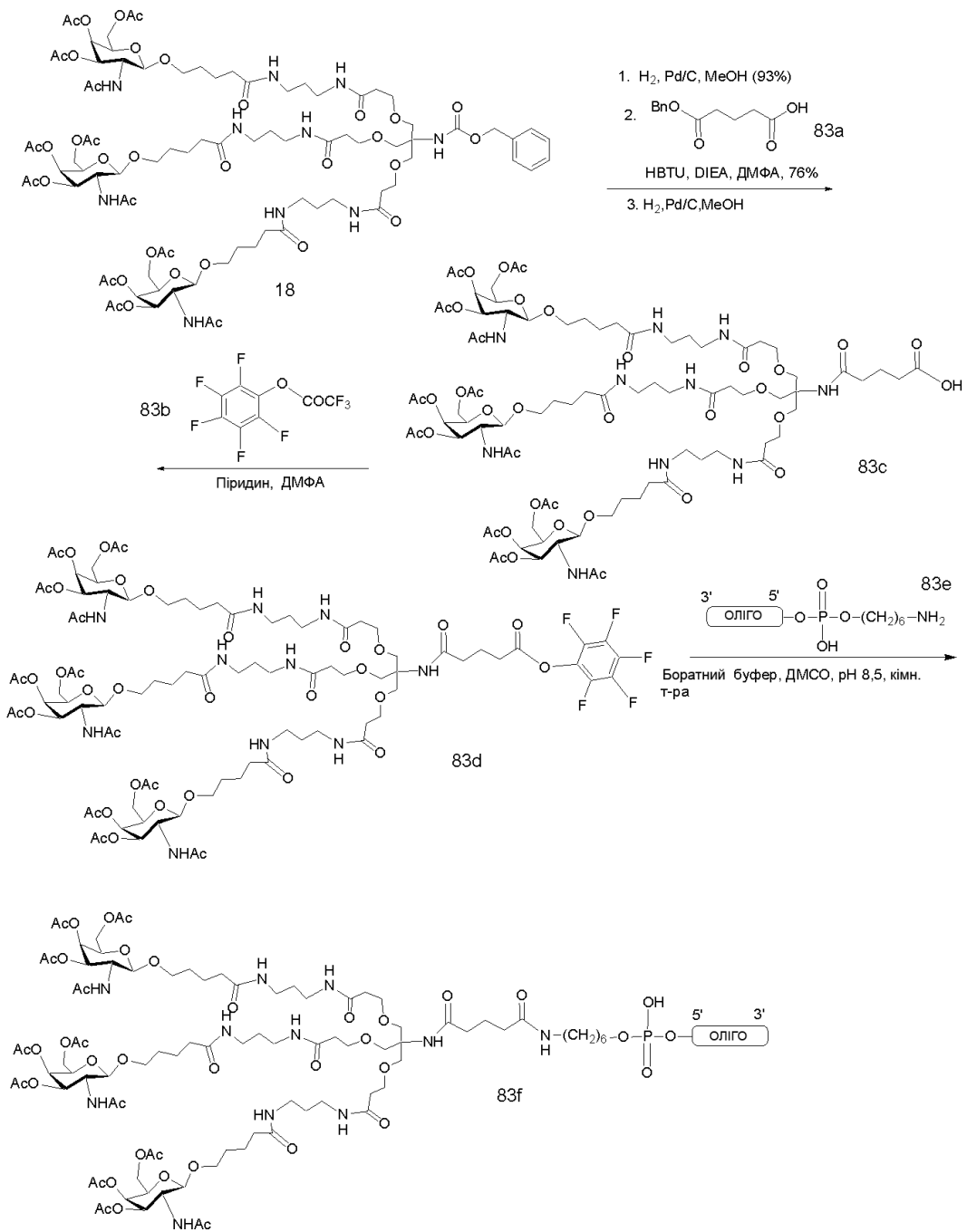
фосфорамідитів, що додаються до твердої основи, можуть бути підібрані для одержання олігомерних сполук, описаних у даному документі, що мають будь-яку бажану послідовність і склад.

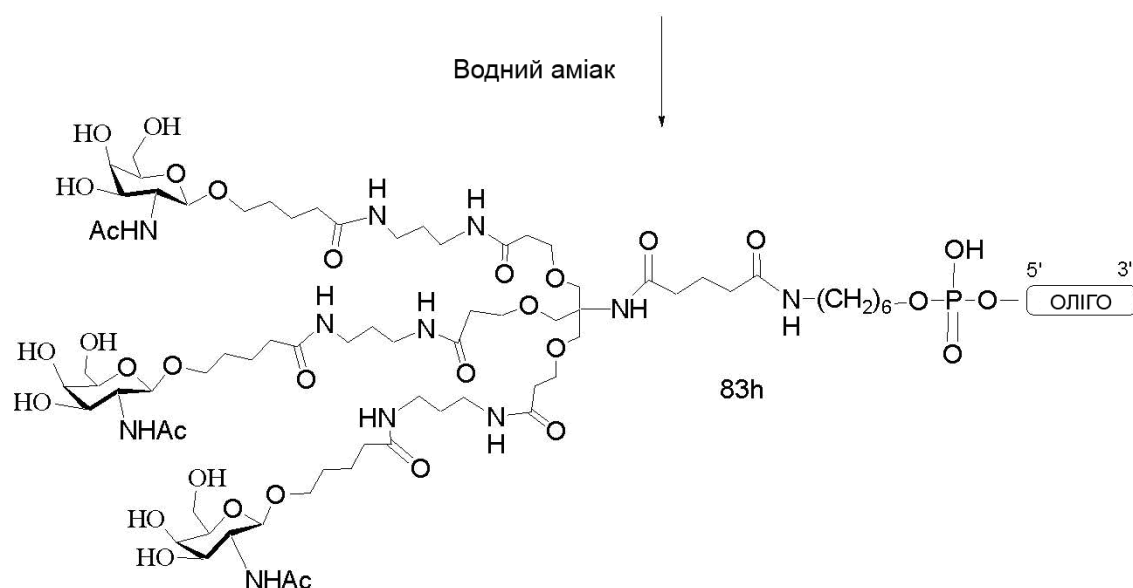
Приклад 38. Альтернативний спосіб одержання олігомерної сполуки 82, що містить фосфодіестер-зв'язаний кон'югат GalNAc₃-2 на 5'-кінці (Спосіб II)



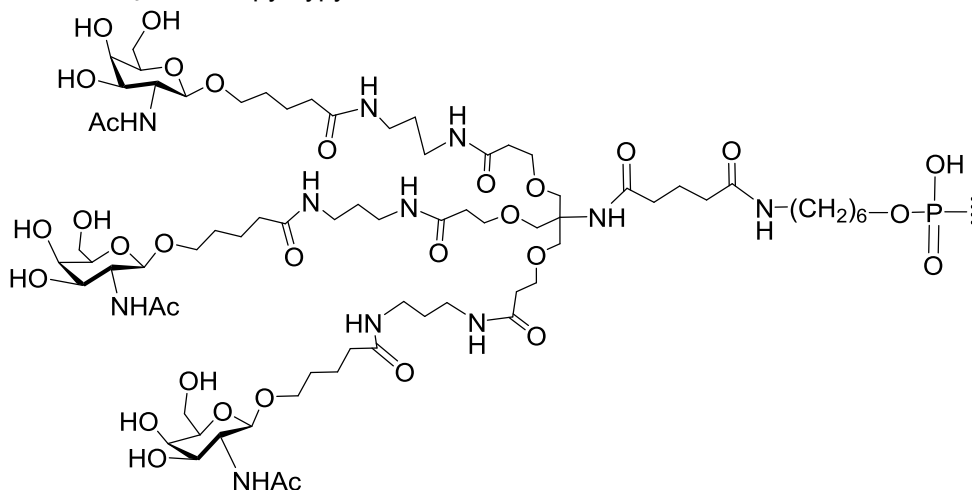
VIMAD-зв'язану олігомерну сполуку 79b одержали стандартними способами в автоматичному синтезаторі ДНК/РНК (див. Dupouy et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2006, 45, 3623-3627). GalNAc₃-2-кластерний фосфорамідит, Сполуку 79, одержали за способами, представленими у Прикладі 35. Альтернативний спосіб забезпечує можливість одностадійної установки фосфодіестер-зв'язаного GalNAc₃-2 кон'югату на олігомерну сполуку на останній стадії синтезу. Зображені фосфорамідити є ілюстративними, і їх не потрібно вважати обмеженням, оскільки можуть бути застосовані інші фосфорамідитні будівельні блоки, включаючи, але без обмеження, ті, які представлені в даному описі, для одержання олігомерних сполук, що містять фосфодіестерний кон'югат на 5'-кінці. Порядок і кількість фосфорамідитів, що додаються до твердої основи, можуть бути підібрані для одержання олігомерних сполук, описаних у даному документі, які мають будь-яку бажану послідовність і склад.

Приклад 39. Загальний спосіб одержання олігомерної сполуки 83h, що містить кон'югат GalNAc₃-3 на 5'-кінці (GalNAc₃-1, модифікований для 5'-кінцевого приєднання), на твердій основі

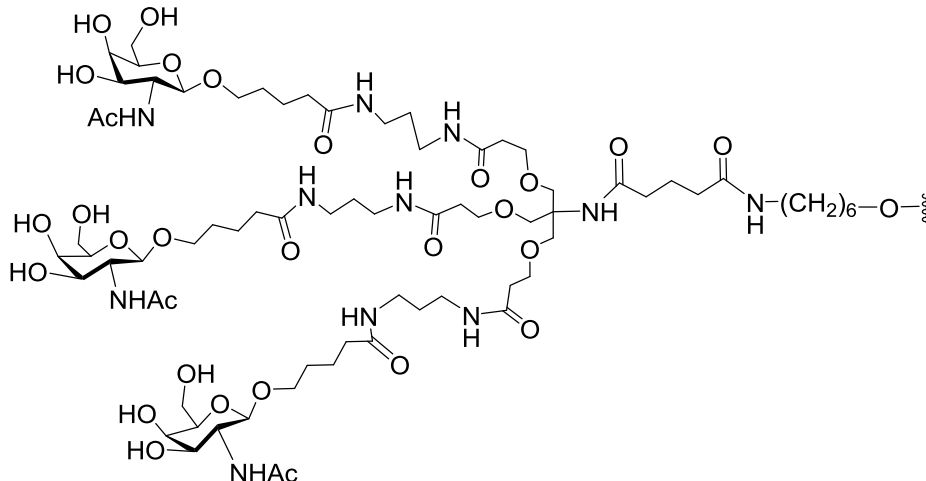




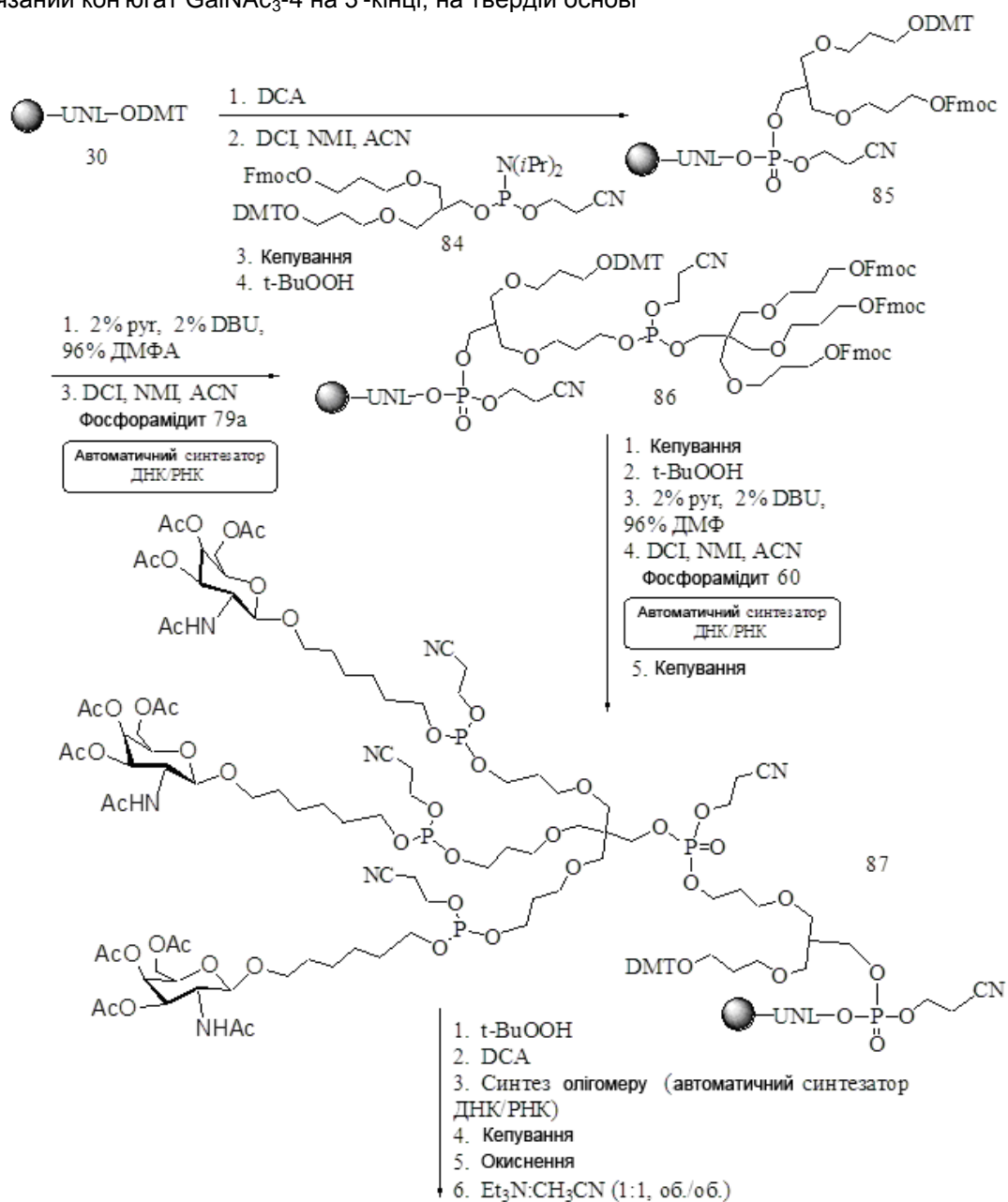
- Сполуку 18 одержали за способами, описаними у Прикладі 4. Сполуки 83a і 83b є в продажу. Олігомерну Сполуку 83e, що містить з'єднаний через фосфодіестер гексиламін, одержали стандартними способами синтезу олігонуклеотидів. В результаті обробки захищеної олігомерної сполуки водним розчином аміаку одержали 5'-GalNAc₃-3 кон'юговану олігомерну сполуку (83h), де GalNAc₃-3 має структуру:

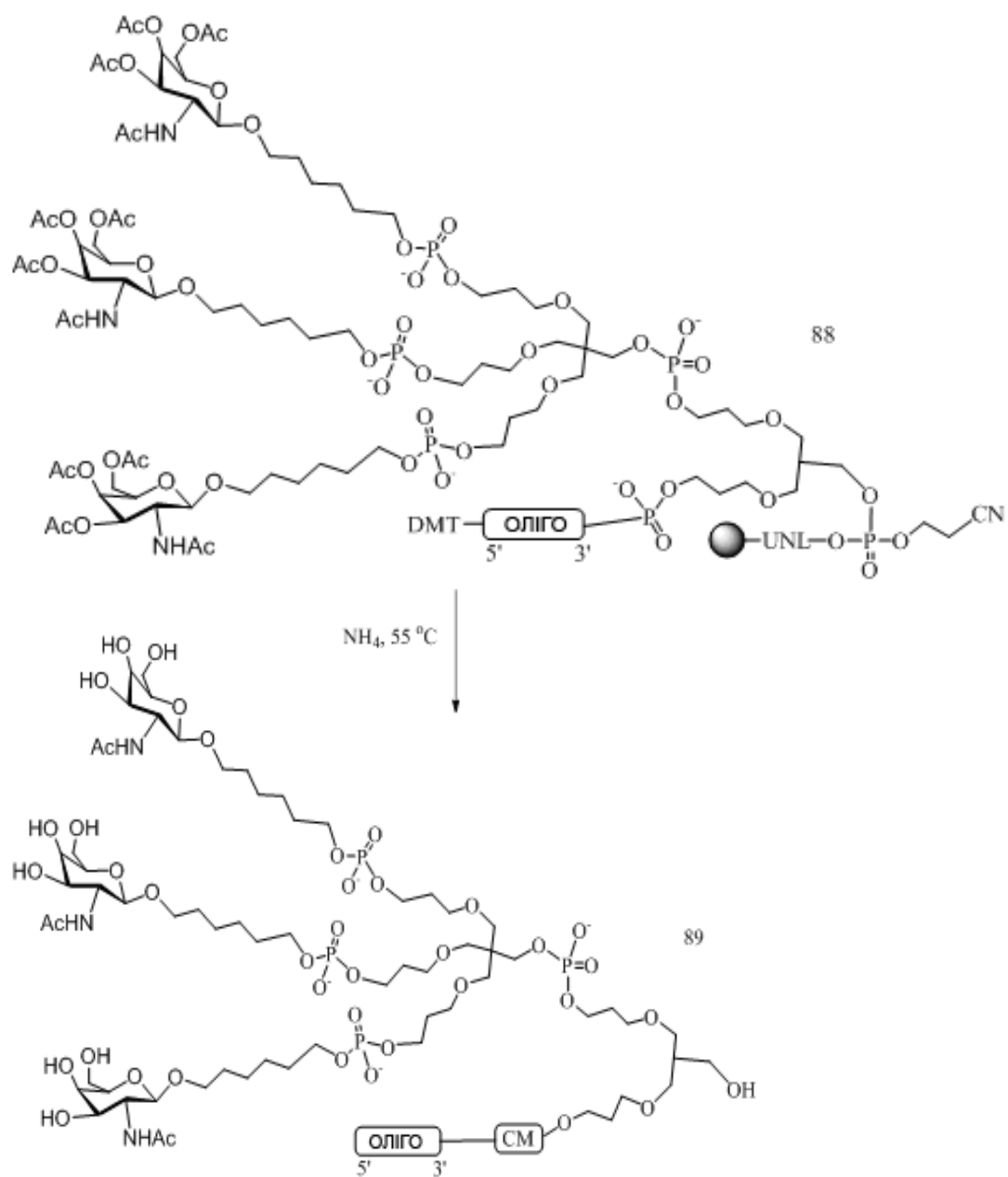


- Кластерна частина GalNAc₃ кон'югуювальної групи GalNAc₃-3 (GalNAc₃-3_a) може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом з одержанням різноманітних кон'югуювальних груп. При цьому GalNAc₃-3_a має формулу:

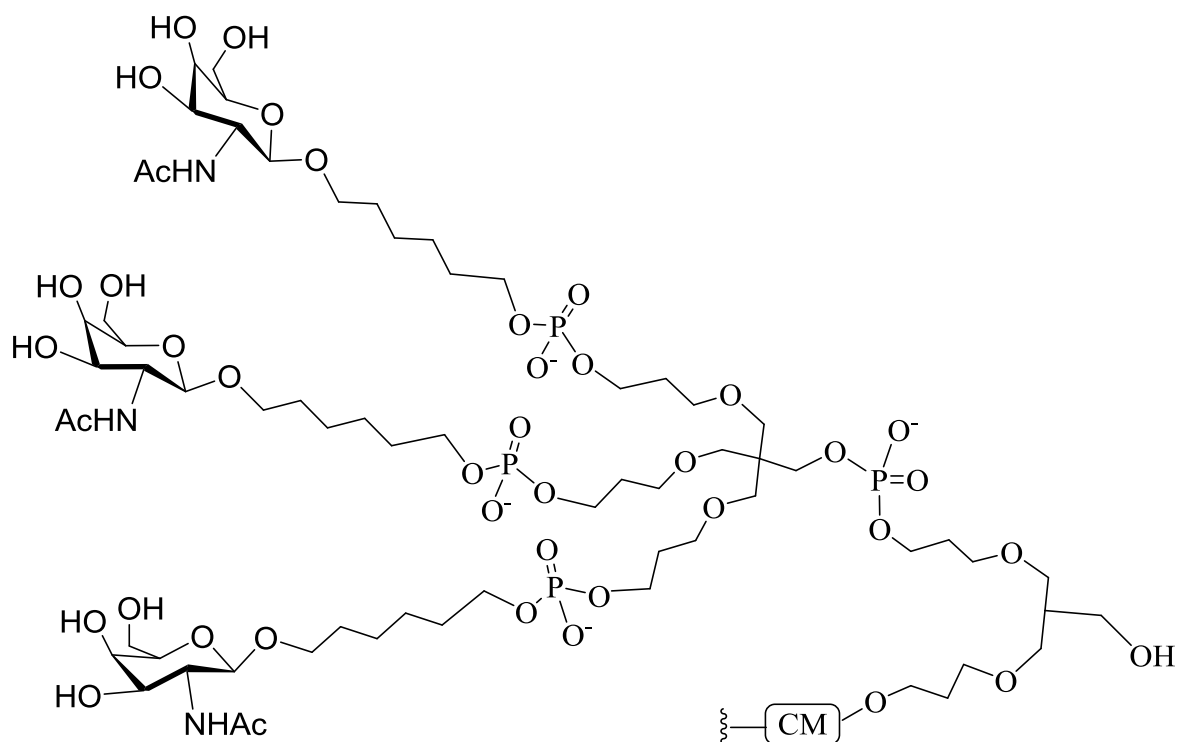


Приклад 40. Загальний спосіб одержання олігомерної сполуки 89, що містить фосфодіестер-зв'язаний кон'югат GalNAc₃-4 на 3'-кінці, на твердій основі

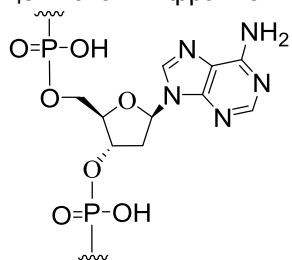




де $\text{GalNAc}_3\text{-4}$ має структуру:

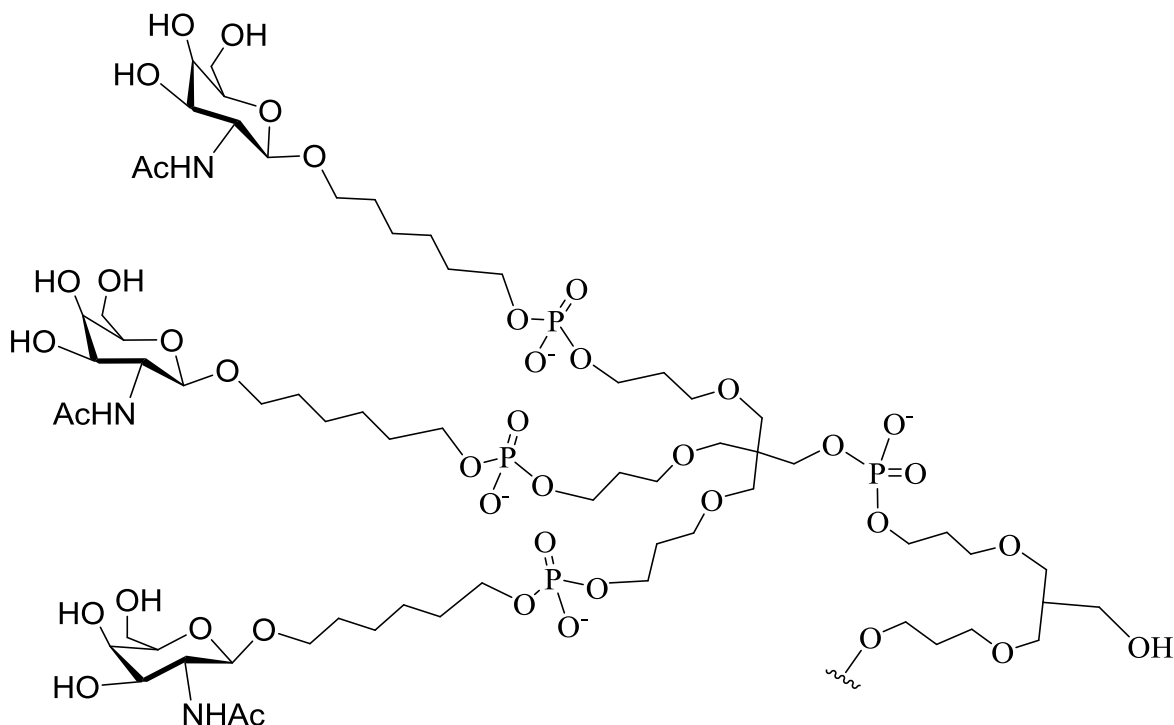


де CM являє собою розщеплюваний фрагмент. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент являє собою:



5

Кластерна частина GalNAc_3 кон'югальної групи $\text{GalNAc}_3\text{-4}$ ($\text{GalNAc}_3\text{-4}_a$) може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом з одержанням різноманітних кон'югувальних груп. При цьому $\text{GalNAc}_3\text{-4}_a$ має формулу:



Захищена Сполука 30 на функціоналізованій твердій основі Unylinker є в продажу. Сполуку 84 одержали за такими ж способами, як описані в літературі (див. Shchepinov et al., *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22), 4447-4454; Shchepinov et al., *Nucleic Acids Research*, 1999, 27, 3035-3041; і Horner et al., *Nucleic Acids Research*, 1997, 25, 4842-4849).

Фосфорамідитні будівельні блоки, Сполуки 60 і 79а, одержали за способами, представленими у Прикладах 28 і 36. Зображені фосфорамідити є ілюстративними і не призначені для обмеження, оскільки можуть бути застосовані інші фосфорамідитні будівельні блоки для одержання олігомерної сполуки, що має фосфодіестер-зв'язаний кон'югат на 3'-кінці, яка має бажану послідовність і склад. Порядок і кількість фосфорамідитів, що додаються до твердої основи, можуть бути підібрані для одержання олігомерних сполук, описаних у даному документі, які мають будь-яку бажану послідовність і склад.

Приклад 41. Загальний спосіб одержання ASO, що містять фосфодіестер-зв'язаний кон'югат $\text{GalNAc}_3\text{-2}$ (див. Приклад 37, Вх являє собою аденін) у 5'-положенні, твердофазним способом (одержання ISIS 661134)

Якщо не вказано інше, всі реагенти і розчини, застосовані для синтезу олігомерних сполук, придбані у комерційних постачальників. Стандартні фосфорамідитні будівельні блоки і тверду основу застосували для введення нуклеозидних залишків, які включають, наприклад, залишки T, A, G і ^mC . Фосфорамідитні сполуки 56 і 60 застосували для синтезу фосфодіестер-зв'язаного кон'югату $\text{GalNAc}_3\text{-2}$ на 5'-кінці. 0,1 М розчин фосфорамідиту у безводному ацетонітрилі застосували для $\beta\text{-D-2'-дезоксирибонуклеозиду}$ і 2'-MOE.

Синтез антисмислових олігонуклеотидів (ASO) виконали на синтезаторі ABI 394 (у масштабі 1-2 мкмоль) або на синтезаторі ДКТА Oligopilot виробництва GE Healthcare Bioscience (у масштабі 40-200 мкмоль) за способом фосфорамідитного зв'язування на твердій основі VIMAD (110 мкмоль/г, Guzaev et al., 2003), упакований в колонку. Для стадії зв'язування фосфорамідити вводили у 4-разовому надлишку порівняно з первинним завантаженням на твердій основі, а зв'язування фосфорамідиту виконували протягом 10 хвилин. Всю решту стадій виконували за протоколами, наданими виробником. Для видалення диметокситритильних (DMT) груп з 5'-гідроксильних груп нуклеотиду застосували 6 % розчин дихлороцтової кислоти у толуені. На стадії зв'язування як активатор застосували 4,5-диціаномідазол (0,7 М) у безводному CH_3CN . Тіофосфатні зв'язки вводили сульфидуванням за допомогою 0,1 М розчину гідриду ксантану в суміші піридину/ CH_3CN 1:1 протягом часу контакту 3 хвилини. Як окиснювальний агент для забезпечення фосфодіестерних міжнуклеозидних зв'язків застосували 20 % розчин трет-бутилгідропероксиду в CH_3CN , що містить 6 % води, протягом часу контакту 12 хвилин.

Після збирання бажаної послідовності ціаноетил-фосфатні захисні групи знімали за допомогою 20 об./об. % діетиламіну в толуені протягом часу контакту 45 хвилин. Зв'язані з твердою основою ASO суспендували у водному розчині аміаку (28-30 мас. %) і нагрівали при

55 °C протягом 6 годин.

Потім відфільтровували незв'язані ASO і випаровували аміак кип'ятінням. Залишок очищували рідинною хроматографією з високим тиском на високоактивній аніонообмінній колонці (GE Healthcare Bioscience, Source 30Q, 30 мкм, 2,54 × 8 см, A=100 mM ацетату амонію в 30 % водному CH₃CN, B=1,5 M NaBr в A, 0-40 % B за 60 хвилин, швидкість потоку 14 мл.хв⁻¹, λ=260 нм). Залишок знесолювали за допомогою ВЕРХ на обернено-фазовій колонці з одержанням бажаних ASO з виділенням виходом 15-30 % відносно первинного завантаження на тверду основу. ASO характеризували за допомогою іон-парної ВЕРХ, сполученої з МС-аналізом на системі Agilent 1100 MSD.

Таблиця 21

ASO, що містять фосфодіестер-зв'язаний кон'югат GalNAc₃-2 у 5'-положенні, націлені на SRB-1

ISIS №	Послідовність (від 5' до 3')	Розрахункова маса	Спостережувана маса	SEQ ID NO.
661134	GalNAc ₃ -2 _{a-o} A _{do} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	6482,2	6481,6	26

Нижні індекси: "e" позначає 2'-MOE модифікований нуклеозид; "d" позначає β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "k" позначає 6'-(S)-CH₃ біциклічний нуклеозид (наприклад, cEt); "s" позначає тіофосфатні міжнуклеозидні зв'язки (PS); "o" позначає фосфодіестерні міжнуклеозидні зв'язки (PO); і "o'" позначає -O-P(=O)(OH)-. Верхній індекс "m" позначає 5-метилцитозини. Структура GalNAc₃-2_a, представлена у Прикладі 37.

Приклад 42. Загальний спосіб одержання ASO, що містять кон'югат GalNAc₃-3 у 5'-положенні, за твердофазними методиками (одержання ISIS 661166)

Синтез ISIS 661166 виконали за такими ж способами, як представлені у Прикладах 39 і 41.

ISIS 661166 являє собою 5-10-5 MOE гепмер, у якому 5'-положення містить кон'югат GalNAc₃-3. Це ASO характеризували за допомогою іон-парної ВЕРХ, сполученої з МС-аналізом на системі Agilent 1100 MSD.

Таблиця 21а

ASO, що містить кон'югат GalNAc₃-3 у 5'-положенні через гексиламіно-фосфодіестерний зв'язок, націлений на Malat-1

ISIS №	Послідовність (від 5' до 3')	Кон'югат	Розрахункова маса	Спостережувана маса	SEQ ID NO.
661166	5'-GalNAc ₃ -3 _{a-o} ^m C _{es} G _{es} G _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{es} A _{es} A _{es} T _{es} T _e	5'-GalNAc ₃ -3	8992,16	8990,51	27

Нижні індекси: "e" позначає 2'-MOE модифікований нуклеозид; "d" позначає β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "s" позначає тіофосфатні міжнуклеозидні зв'язки (PS); "o" позначає фосфодіестерні міжнуклеозидні зв'язки (PO); і "o'" позначає -O-P(=O)(OH)-. Верхній індекс "m" позначає 5-метилцитозини. Структура "5'-GalNAc₃-3_a" представлена у Прикладі 39.

Приклад 43 Дозозалежне дослідження фосфодіестер-зв'язаного GalNAc₃-2 (див. Приклади 37 і 41, Вх являє собою аденін) на 5'-кінці, націленого на SRB-1, in vivo

ISIS 661134 (див. Приклад 41), що містить фосфодіестер-зв'язаний кон'югат GalNAc₃-2 на 5'-кінці, випробовували в дозозалежному дослідженні на антисмислове інгібування SRB-1 у мишей. Некон'юговані ISIS 440762 і 651900 (кон'югат GalNAc₃-1 у 3'-кінця, див. Приклад 9) включені в дослідження для порівняння і описані раніше у Табл. 4.

Лікування

Шеститижневим самцям мишей Balb/c (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мен) ввели одноразову підшкірну ін'єкцію дози, представлені нижче, сполуки ISIS 440762, 651900, 661134 або PBS як контрольний зразок. Кожна експериментальна група складалася із 4 тварин. Мишей умертвили через 72 години після останнього введення для визначення рівнів мРНК SRB-1 в печінці за допомогою ПЛР у реальному часі і реагенту для кількісного визначення РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) за стандартними протоколами.

Рівні мРНК SRB-1 визначали відносно загальної РНК (за допомогою Ribogreen), потім нормалізували до контрольного зразка, обробленого PBS. Результати, наведені нижче, представлені як середній відсоток рівнів мРНК SRB-1 для кожної експериментальної групи, нормалізованих до контрольного зразка, обробленого PBS, і позначені як «% PBS». ED₅₀ вимірювали такими ж способами, як описані раніше, і вони представлені нижче.

Як показано в Табл. 22, лікування антисмисловими олігонуклеотидами знижує рівні мРНК SRB-1 дозозалежним чином. Дійсно, антисмислові олігонуклеотиди, що містять фосфодіестер-зв'язаний кон'югат GalNAc₃-2 на 5'-кінці (ISIS 661134) або кон'югат GalNAc₃-1, зв'язаний на 3'-кінці (ISIS 651900), демонструють значне покращення ефективності, порівняно з некон'югованим антисмисловим олігонуклеотидом (ISIS 440762). Крім того, ISIS 661134, який містить фосфодіестер-зв'язаний кон'югат GalNAc₃-2 на 5'-кінці, був настільки ж ефективним, як і ISIS 651900, що містить кон'югат GalNAc₃-1 на 3'-кінці.

Таблиця 22

ASO, що містять GalNAc₃-1 або GalNAc₃-2, націлені на SRB-1

ISIS №	Доза (мг/кг)	Рівні мРНК SRB-1 (% PBS)	ED ₅₀ (мг/кг)	Кон'югат	SEQ ID NO.
PBS	0	100	--	--	
440762	0,2	116	2,58	Без кон'югату	22
	0,7	91			
	2	69			
	7	22			
	20	5			
651900	0,07	95	0,26	3" GalNAc ₃ -1	23
	0,2	77			
	0,7	28			
	2	11			
	7	8			
661134	0,07	107	0,25	5" GalNAc ₃ -2	26
	0,2	86			
	0,7	28			
	2	10			
	7	6			

Структури 3" GalNAc₃-1 і 5" GalNAc₃-2 описані раніше у Прикладах 9 і 37. Фармакокінетичний аналіз (ФК)

ФК для ASO з групи високої дози (7 мг/кг) дослідили і оцінили в такий же спосіб, як описано у Прикладі 20. Зразки печінки подрібнили і екстрагували за стандартними протоколами. Ідентифікували метаболіти повної довжини 661134 (5" GalNAc₃-2) і ISIS 651900 (3" GalNAc₃-1) і підтвердили їх маси за допомогою мас-спектрометричного аналізу з високим розрізненням. Результати показали, що основним метаболітом, знайденим для ASO, що містить фосфодіестер-зв'язаний кон'югат GalNAc₃-2 на 5'-кінці (ISIS 661134), був ISIS 440762 (дані не показані). Не спостерігали жодних додаткових метаболітів у придатній для виявлення кількості. На відміну від нього, для ASO, що містить кон'югат GalNAc₃-1 на 3'-кінці (ISIS 651900), спостерігали додаткові метаболіти, аналогічні описаним раніше у Табл. 10a. Ці результати дозволяють припустити, що наявність фосфодіестер-зв'язаного кон'югату GalNAc₃-1 або GalNAc₃-2 може покращувати ФК профіль ASO без погіршення їх ефективності.

Приклад 44. Вплив PO/PS зв'язків на антисмислове інгібування ASO, що містять кон'югат GalNAc₃-1 (див. Приклад 9) на 3'-кінці, націлених на SRB-1

ISIS 655861 і 655862, що містять кон'югат GalNAc₃-1 на 3'-кінці, кожен з яких націлений на SRB-1, випробували в дослідженні одноразового введення відносно їх здатності інгібувати SRB-1 у мишей. Початкову некон'юговану сполуку, ISIS 353382, включили в дослідження для порівняння.

Ці ASO являють собою 5-10-5 MOE гепмери, у яких геп-ділянка містить десять 2'-дезоксирибонуклеозидів, і кожна ділянка крил містить п'ять 2'-MOE модифікованих нуклеозидів. Ці ASO одержали за такими ж способами, як показані раніше у Прикладі 19, і вони описані нижче у Табл. 23.

Модифіковані ASO, що містять кон'югат GalNAc₃-1 на 3'-кінці, націлені на SRB-1

ISIS №	Послідовність (від 5' до 3')	Хімізм	SEQ ID NO.
353382 (початкова)	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m$ $C_{es} T_{es} T_{es}$	Тільки PS, без кон'югату	28
655861	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m$ $C_{es} T_{es} T_{eo} A_{do} - GalNAc_3-1_a$	Тільки PS з кон'югатом GalNAc ₃ -1	29
655862	$G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} T_{ds} T_{eo}^m C_{eo} C_{es} T_{es} T_{eo} A_{do} - GalNAc_3-1_a$	Змішані PS/PO з кон'югатом GalNAc ₃ -1	29

Нижні індекси: "e" позначає 2'-МОЕ модифікований нуклеозид; "d" позначає β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "s" позначає тіофосфатні міжнуклеозидні зв'язки (PS); "o" позначає фосфодіестерні міжнуклеозидні зв'язки (PO); і "o'" позначає -O-P(=O)(OH)-. Верхній індекс "m" позначає 5-метилцитозини. Структура "GalNAc₃-1" представлена у Прикладі 9.

Лікування

Шеститижневим самцям мишей Balb/c (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мен) ввели одноразову підшкірну ін'єкцію дози, представленої нижче, сполуки ISIS 353382, 655861, 655862 або PBS як контрольний зразок. Кожна експериментальна група складалася із 4 тварин. Перед лікуванням, а також після останньої дози у кожній миші брали кров і аналізували зразки плазми. Мишей умертвили через 72 години після останнього введення для визначення рівнів мРНК SRB-1 в печінці за допомогою ПЛР у реальному часі і реагенту для кількісного визначення РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) за стандартними протоколами. Рівні мРНК SRB-1 визначали відносно загальної РНК (за допомогою Ribogreen), потім нормалізували до контрольного зразка, обробленого PBS. Результати, наведені нижче, представлені як середній відсоток рівнів мРНК SRB-1 для кожної експериментальної групи, нормалізованих до контрольного зразка, обробленого PBS, і позначені як «% PBS». ED₅₀ вимірювали за такими ж способами, як описані раніше, і вони представлені нижче.

Як показано в Табл. 24, лікування антисмисловими олігонуклеотидами знижує рівні мРНК SRB-1 дозозалежним чином, порівняно з контрольним зразком, обробленим PBS. Дійсно, антисмислові олігонуклеотиди, що містять кон'югат GalNAc₃-1 на 3'-кінці (ISIS 655861 і 655862), демонструють значне підсилення ефективності, порівняно з некон'югованим антисмисловим олігонуклеотидом (ISIS 353382). Крім того, ISIS 655862 із змішаними PS/PO зв'язками демонструє підсилення ефективності, порівняно із сполукою, що містить тільки PS (ISIS 655861).

Таблиця 24

Вплив PO/PS зв'язків на антисмислове інгібування ASO, що містять кон'югат GalNAc₃-1 на 3'-кінці, націлених на SRB-1

ISIS №	Доза (мг/кг)	Рівні мРНК SRB-1 (% PBS)	ED ₅₀ (мг/кг)	Хімізм	SEQ ID NO.
PBS	0	100	--	--	
353382 (початкова)	3	76,65	10,4	Тільки PS, без кон'югату	28
	10	52,40			
	30	24,95			
655861	0,5	81,22	2,2	Тільки PS з кон'югатом GalNAc ₃ -1	29
	1,5	63,51			
	5	24,61			
	15	14,80			
655862	0,5	69,57	1,3	Змішані PS/PO з кон'югатом GalNAc ₃ -1	29
	1,5	45,78			
	5	19,70			
	15	12,90			

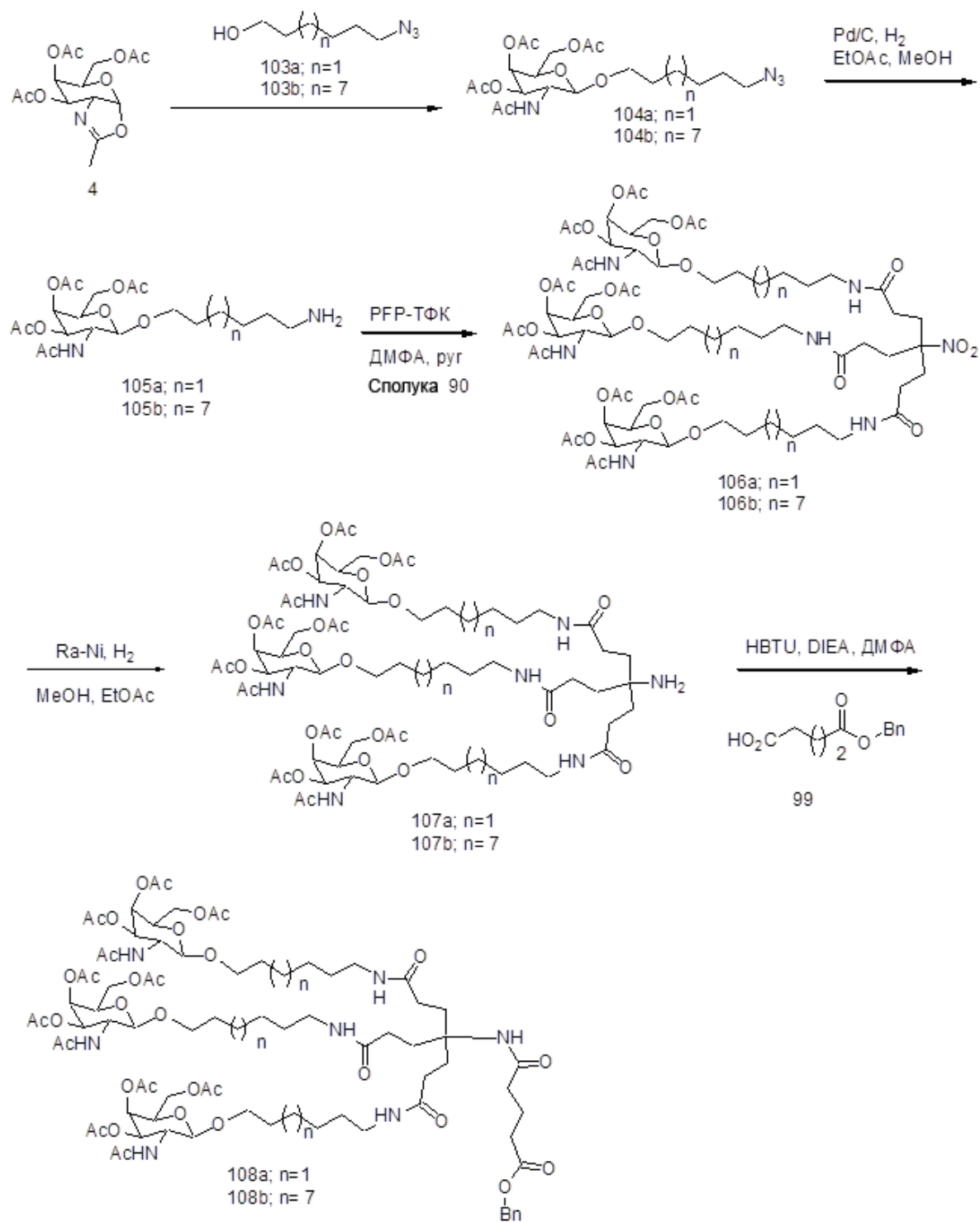
- Рівні трансамінази в печінці, аланін-амінотрансферази (ALT) і аспартат-амінотрансферази (AST) в сироватці вимірювали відносно мишей, ін'єктованих сольовим розчином, застосовуючи стандартні протоколи. Оцінили також масу органів. Результати показують, що не спостерігали жодного збільшення рівнів трансамінази (Таблиця 25) або маси органів (дані не показані) у мишей, оброблених ASO, порівняно з PBS контролем. Крім того, ASO із змішаними PS/PO зв'язками (ISIS 655862) демонструє подібні рівні трансамінази, порівняно із сполукою, що містить тільки PS (ISIS 655861).

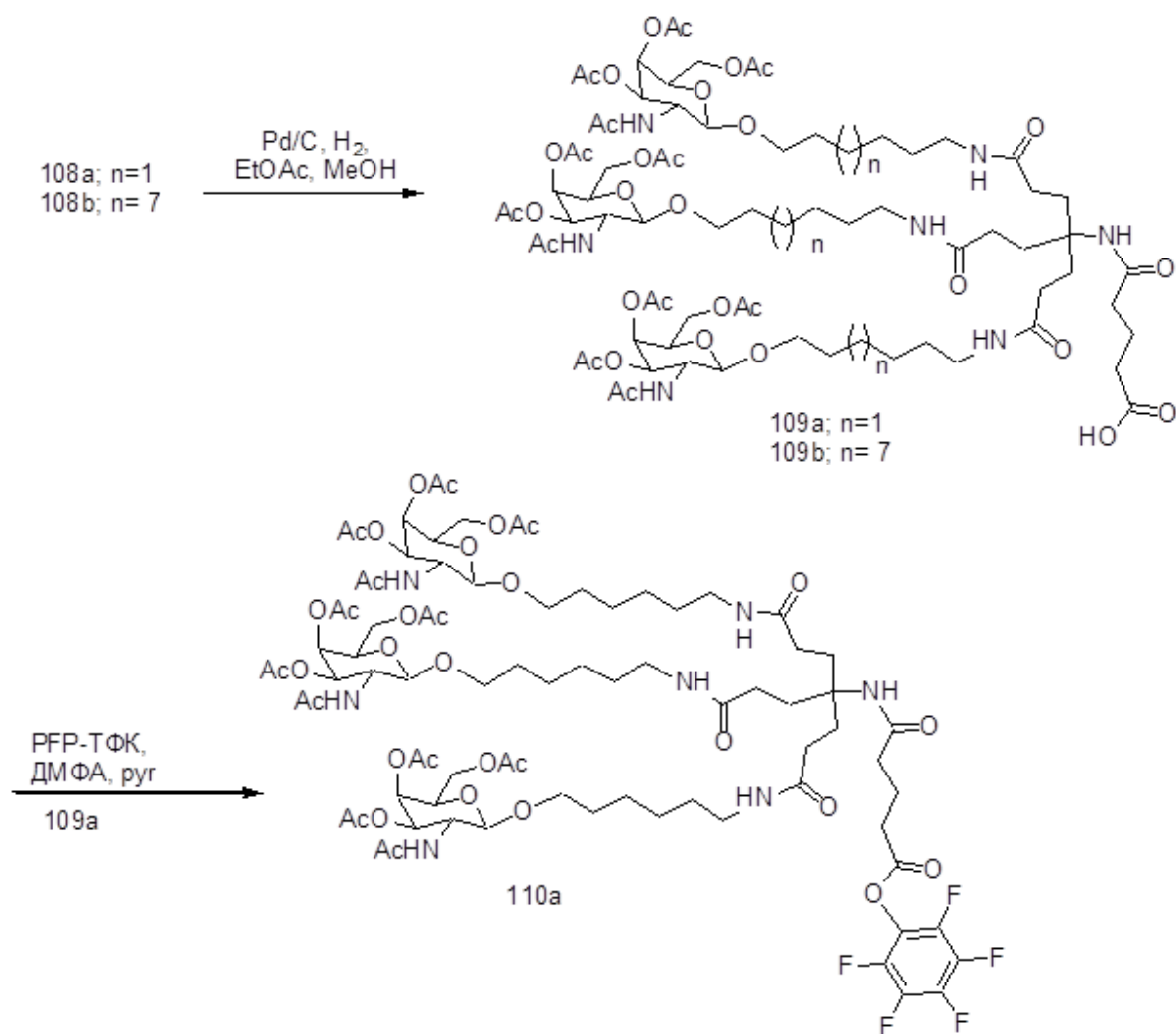
Таблиця 25

Вплив PO/PS зв'язків на рівні трансамінази ASO, що містять кон'югат
GalNAc₃-1 на 3'-кінці, націлених на SRB-1

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (Од/л)	AST (Од/л)	Хімізм	SEQ ID NO
PBS	0	28,5	65	--	
353382 (початкова)	3	50,25	89	Тільки PS, без кон'югату	28
	10	27,5	79,3		
	30	27,3	97		
655861	0,5	28	55,7	Тільки PS з GalNAc ₃ -1	29
	1,5	30	78		
	5	29	63,5		
	15	28,8	67,8		
655862	0,5	50	75,5	Змішані PS/PO з GalNAc ₃ -1	29
	1,5	21,7	58,5		
	5	29,3	69		
	15	22	61		

- 10 Приклад 45. Одержання PFP естеру, Сполуки 110a





Сполуку 4 (9,5 г, 28,8 ммоль) обробили окремо сполукою 103a або 103b (38 ммоль) і TMSOTf (0,5 екв.), і молекулярними ситами в дихлорметані (200 мл), і перемішували протягом 16 годин при кімнатній температурі. Потім органічний шар відфільтрували крізь целіт, далі промили бікарбонатом натрію, водою і насиченим сольовим розчином. Потім відокремили органічний шар і висушили над сульфатом натрію, відфільтрували і упарили при зниженому тиску. Одержану маслянисту речовину очистили хроматографією на силікагелі (2 %→10 % метанолу/дихлорметану) з одержанням сполук 104a і 104b із виходом >80 %. Дані РХМС і протонного ЯМР узгоджувалися із вказаною структурою.

Сполуки 104a і 104b обробили в тих же умовах, що і сполуки 100a-d (Приклад 47), з одержанням сполук 105a і 105b з виходом >90 %. Дані РХМС і протонного ЯМР узгоджувалися із вказаною структурою.

Сполуки 105a і 105b окремо обробили сполукою 90 за тих же умов, що і сполуки 901a-d, з одержанням сполук 106a (80 %) і 106b (20 %). Дані РХМС і протонного ЯМР узгоджувалися із вказаною структурою.

Сполуки 106a і 106b обробили в тих же умовах, що і сполуки 96a-d (Приклад 47), з одержанням сполук 107a (60 %) і 107b (20 %). Дані РХМС і протонного ЯМР узгоджувалися із вказаною структурою.

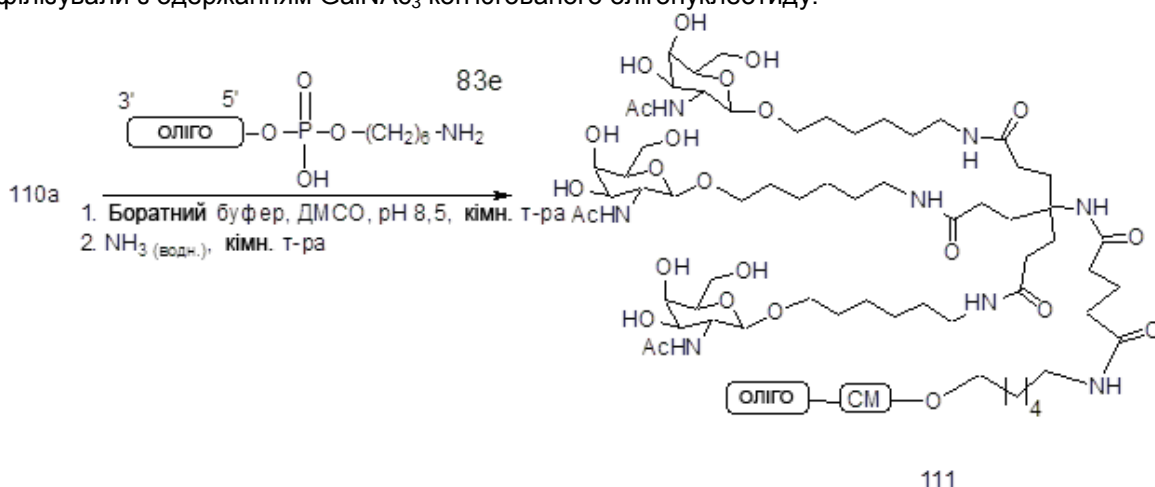
Сполуки 107a і 107b обробили в тих же умовах, що і сполуки 97a-d (Приклад 47), з одержанням сполук 108a і 108b з виходом 40-60 %. Дані РХМС і протонного ЯМР узгоджувалися із вказаною структурою.

Сполуки 108a (60 %) і 108b (40 %) обробили в тих же умовах, що і сполуки 100a-d (Приклад 47), з одержанням сполук 109a і 109b з виходом >80 %. Дані РХМС і протонного ЯМР узгоджувалися із вказаною структурою.

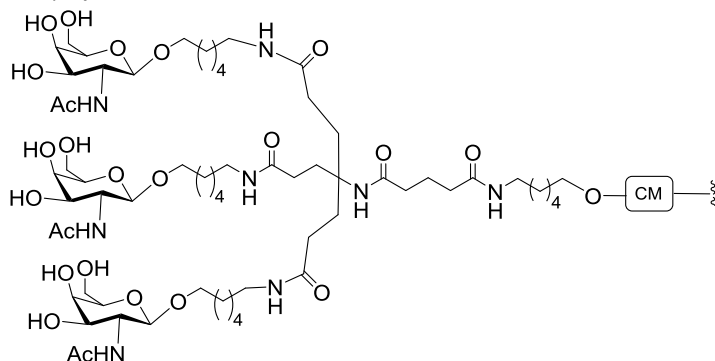
Сполуку 109a обробили в тих же умовах, що і сполуки 101a-d (Приклад 47), з одержанням сполуки 110a з виходом 30-60 %. Дані РХМС і протонного ЯМР узгоджувалися із вказаною структурою. Альтернативно, Сполука 110b може бути одержана в такий же спосіб, виходячи із Сполуки 109b.

Приклад 46. Загальний спосіб кон'югації з PFP естерами (олігонуклеотид 111); одержання ISIS 666881 (GalNAc₃-10)

Синтезували і очистили 5'-гексиламіно-модифікований олігонуклеотид за стандартними способами твердофазного одержання олігонуклеотидів. 5'-Гексиламіно-модифікований олігонуклеотид розчинили в 0,1 М розчині тетраборату натрію, pH 8,5 (200 мкл) і додали 3 екв. вибраного PFP-естерифікованого кластера GalNAc₃, розчиненого в ДМСО (50 мкл). Якщо при додаванні розчину ASO естер PFP осаджувався, то додавали ДМСО до переходу всього естеру PFP у розчин. Реакція була завершена через близько 16 годин перемішування при кімнатній температурі. Одержаний розчин розбавили водою до 12 мл, а потім центрифугували при 3000 об/хв. у відцентровому фільтрі з відсіканням по масі 3000 Да. Цей прийом повторили двічі для видалення низькомолекулярних домішок. Потім розчин ліофілізували до сухого стану, повторно розчинили в концентрованому водному розчині аміаку, і перемішували при кімнатній температурі протягом 2,5 годин, після чого концентрували під вакуумом для видалення більшої частини аміаку. Кон'югований олігонуклеотид очистили і знесолили за допомогою ОФ-ВЕРХ, та ліофілізували з одержанням GalNAc₃ кон'югованого олігонуклеотиду.



Олігонуклеотид 111 кон'югований із GalNAc₃-10. Кластерна частина GalNAc₃ кон'югуювальної групи GalNAc₃-10 (GalNAc₃-10_a) може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом з одержанням різноманітних кон'югуювальних груп. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент являє собою -P(=O)(OH)-A_n-P(=O)(OH)-, як показано нижче в олігонуклеотиді (ISIS 666881), синтезованому з GalNAc₃-10. Структура GalNAc₃-10 (GalNAc₃-10_a-CM-) представлена нижче:



За вказаним загальним способом одержали ISIS 666881. Синтезували і очистили 5'-гексиламіно-модифікований олігонуклеотид, ISIS 660254, за стандартними способами твердофазного одержання олігонуклеотидів. ISIS 660254 (40 мг, 5,2 мкмоль) розчинили в 0,1 М розчині тетраборату натрію, pH 8,5 (200 мкл) і додали 3 еквіваленти PFP естеру (Сполука 110а), розчиненого в ДМСО (50 мкл). Ефір PFP осаджувався при додаванні розчину ASO, тому необхідно додати додаткову кількість ДМСО (600 мкл) для повного розчинення PFP естеру. Реакція була завершена через 16 годин перемішування при кімнатній температурі. Розчин розбавили водою до загального об'єму 12 мл, а потім центрифугували при 3000 об/хв. у відцентровому фільтрі з відсіканням по масі 3000 Да. Цей прийом повторили двічі для видалення низькомолекулярних домішок. Розчин ліофілізували до сухого стану і повторно розчинили в концентрованому водному розчині аміаку, перемішуючи при кімнатній температурі протягом 2,5 годин, і далі концентрували під вакуумом для видалення більшої частини аміаку.

Кон'югований олігонуклеотид очистили і знесолили за допомогою ОФ-ВЕРХ, та ліофілізували з одержанням ISIS 666881 з виходом 90 мас. % (42 мг, 4,7 мкмоль).

GalNAc₃-10-кон'югований олігонуклеотид

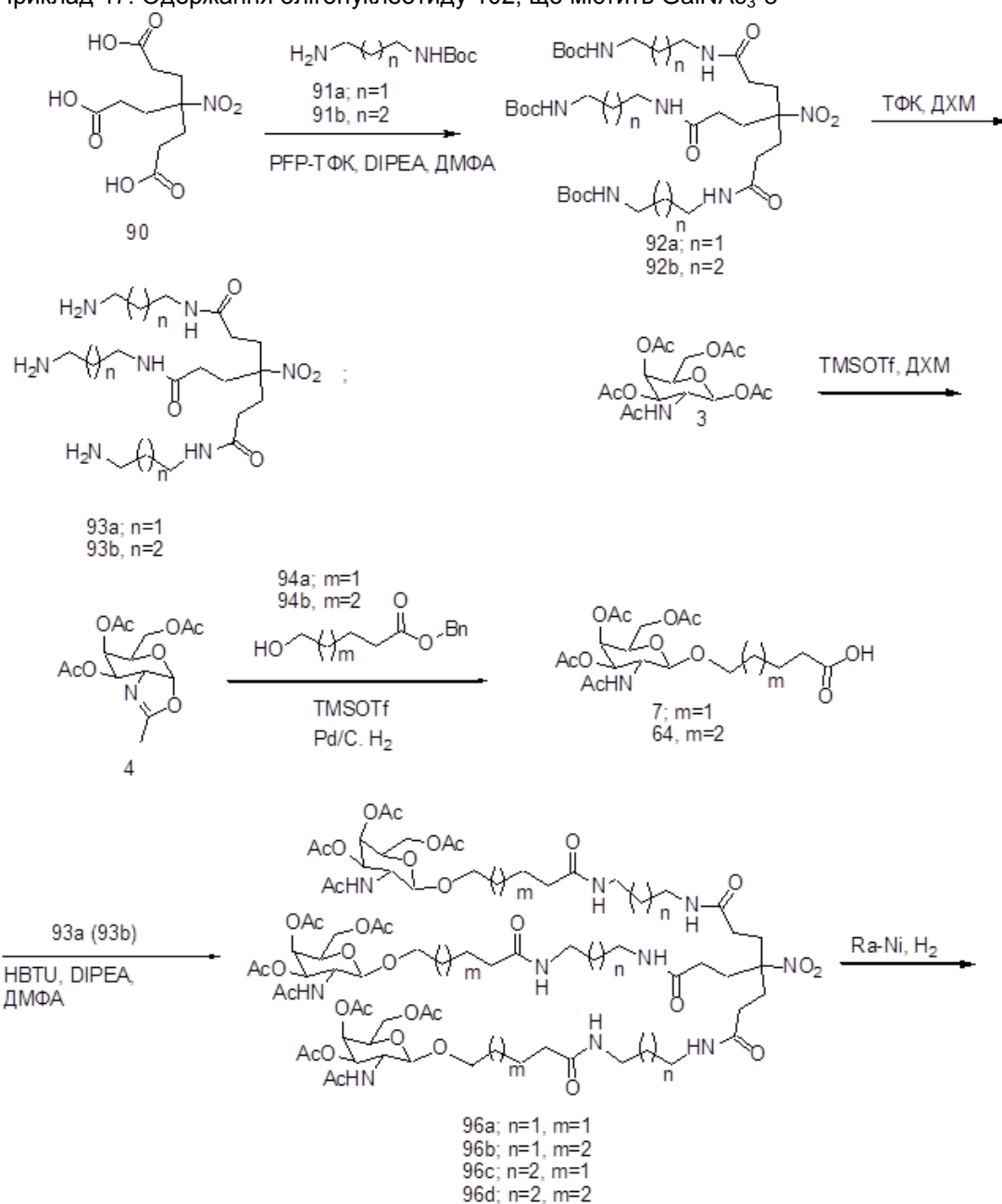
ASO	Послідовність (від 5' до 3')	5'-група	SSEQ ID No.
ISIS 660254	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6\text{-o-A}_{\text{do}}\text{G}_{\text{es}}^{\text{m}}\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}^{\text{m}}\text{C}_{\text{es}}\text{A}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}^{\text{m}}\text{C}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}^{\text{m}}\text{C}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{es}}^{\text{m}}\text{C}_{\text{es}}^{\text{m}}\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{e}}$	Гексиламін	30
ISIS 666881	$\text{GalNAc}_3\text{-10-a-o-A}_{\text{do}}\text{G}_{\text{es}}^{\text{m}}\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}^{\text{m}}\text{C}_{\text{es}}\text{A}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}^{\text{m}}\text{C}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}^{\text{m}}\text{C}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{es}}^{\text{m}}\text{C}_{\text{es}}^{\text{m}}\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{e}}$	GalNAc ₃ -10	30

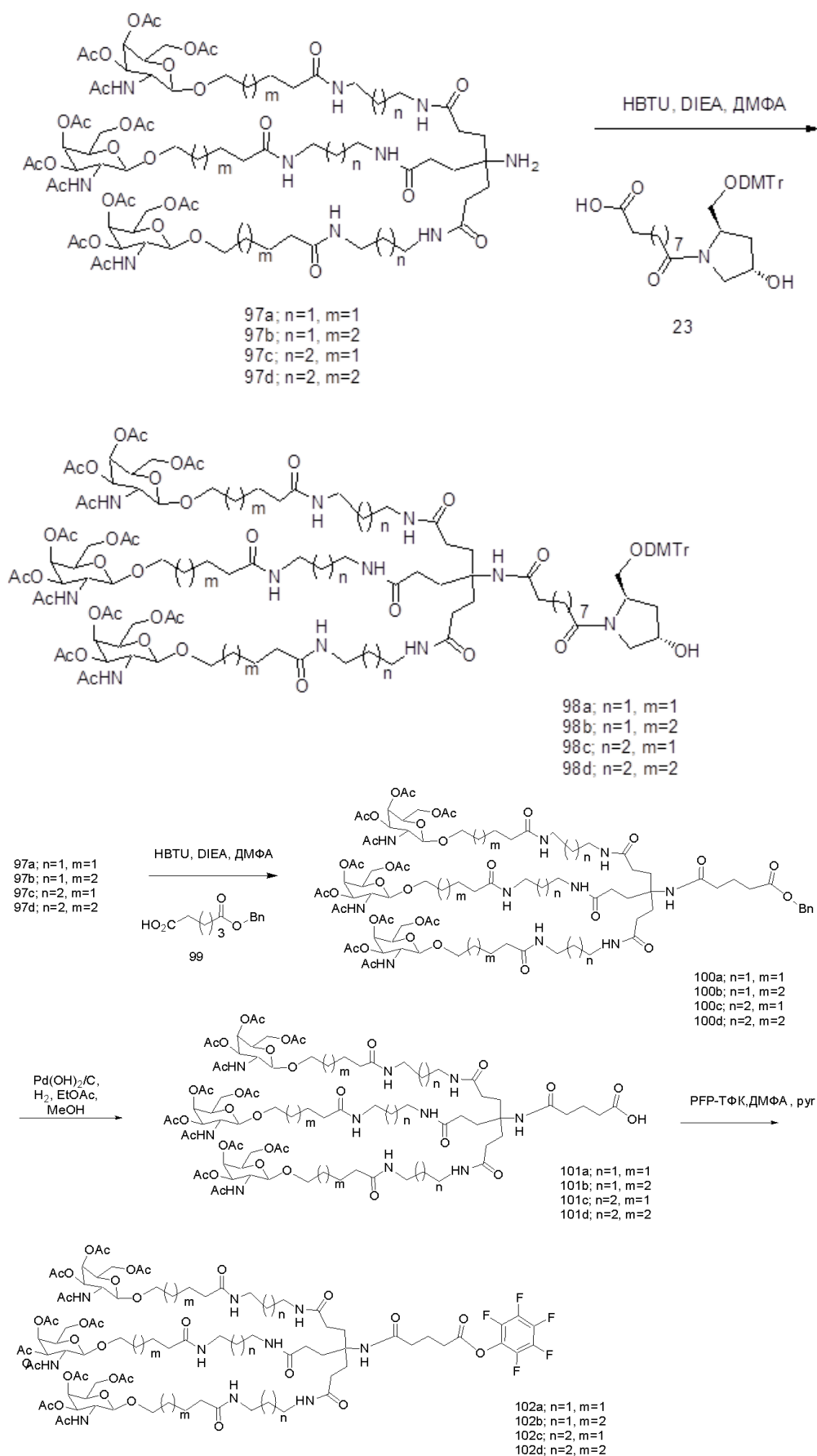
5

Заголовні букви вказують на азотисту основу для кожного нуклеозиду, а ^mC позначає 5-метилцитозин. Нижні індекси: "e" позначає 2'-МОЕ модифікований нуклеозид; "d" позначає β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "s" позначає тіофосфатний міжнуклеозидний зв'язок (PS); "o" позначає фосфодіестерний міжнуклеозидний зв'язок (PO); і "o'" позначає -O-P(=O)(OH)-. Кон'югувальні групи виділені напівжирним шрифтом.

10

Приклад 47. Одержання олігонуклеотиду 102, що містить GalNAc₃-8





Трикислотну сполуку 90 (4 г, 14,43 ммоль) розчинили в ДМФА (120 мл) і N, N-

діізопропілетиламіні (12,35 мл, 72 ммоль). По краплях додали пентафлуорфенілу трифлуорацетат (8,9 мл, 52 ммоль) в атмосфері аргону і залишили реакційну суміш перемішуватися при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Додали Вос-діамін 91a або 91b (68,87 ммоль) разом з N, N-діізопропілетиламіном (12,35 мл, 72 ммоль) і залишили реакційну суміш перемішуватися при кімнатній температурі протягом 16 годин. Потім упарили ДМФА на >75 % при зниженому тиску, і далі розчинили суміш в дихлорметані. Органічний шар промили бікарбонатом натрію, водою і насиченим сольовим розчином. Потім відокремили органічний шар і висушили над сульфатом натрію, відфільтрували і упарили при зниженому тиску до маслянистого залишку. Одержану маслянисту речовину очистили хроматографією на силікагелі (2 %→10 % метанолу/дихлорметану) з одержанням сполук 92a і 92b з приблизним виходом 80 %. Дані РХМС і протонного ЯМР узгоджувалися із вказаною структурою.

Сполуку 92a або 92b (6,7 ммоль) обробляли 20 мл дихлорметану і 20 мл трифлуороцтової кислоти при кімнатній температурі протягом 16 годин. Одержаний розчин випарували, а потім розчинили в метанолі і обробляли смолою DOWEX-OH протягом 30 хвилин. Одержаний розчин відфільтрували і упарили до маслянистої речовини при зниженому тиску з одержанням 85-90 % виходу сполук 93a і 93b.

Сполуку 7 або 64 (9,6 ммоль) обробляли НВТУ (3,7 г, 9,6 ммоль) і N, N-діізопропілетиламіном (5 мл) в ДМФА (20 мл) протягом 15 хвилин. До суміші додали сполуку 93a або 93b (3 ммоль) і залишили перемішуватися при кімнатній температурі на 16 годин. Потім упарили ДМФА на >75 % при зниженому тиску, і далі розчинили суміш в дихлорметані. Органічний шар промили бікарбонатом натрію, водою і насиченим сольовим розчином. Потім відокремили органічний шар і висушили над сульфатом натрію, відфільтрували і упарили при зниженому тиску до маслянистого залишку. Одержану маслянисту речовину очистили хроматографією на силікагелі (5 %→20 % метанолу/дихлорметанолу) з одержанням сполук 96a-d з виходом 20-40 %. Дані РХМС і протонного ЯМР узгоджувалися із вказаною структурою.

Сполуки 96a-d (0,75 ммоль) окремо гідрогенізували на нікелі Ренею протягом 3 годин в етанолі (75 мл). Потім каталізатор видалили фільтруванням крізь целіт, а етанол видалили при зниженому тиску з одержанням сполук 97a-d з виходом 80-90 %. Дані РХМС і протонного ЯМР узгоджувалися із вказаною структурою.

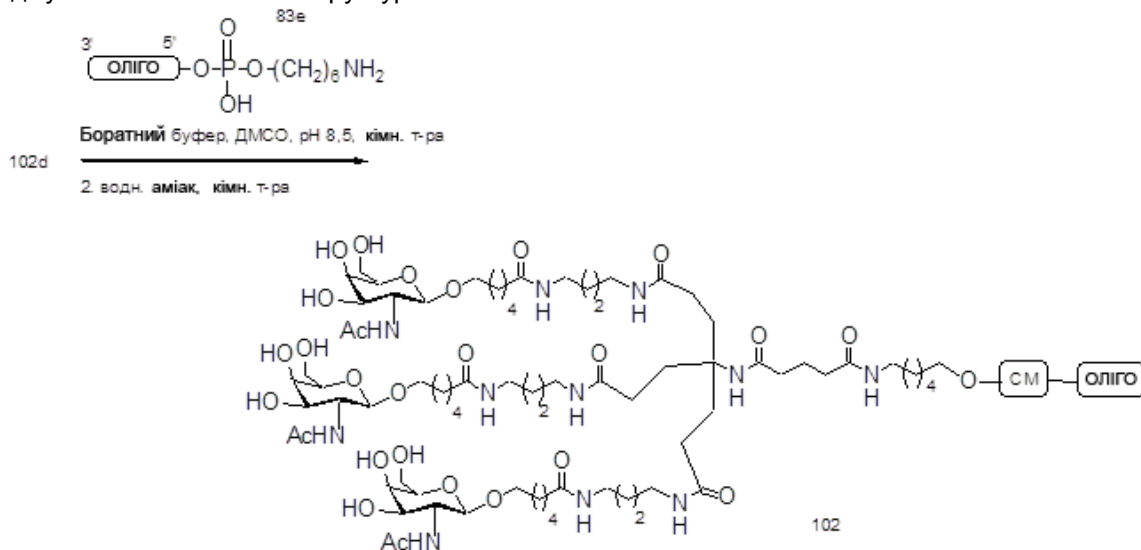
Сполуку 23 (0,32 г, 0,53 ммоль) обробляли НВТУ (0,2 г, 0,53 ммоль) і N, N-діізопропілетиламіном (0,19 мл, 1,14 ммоль) в ДМФА (30 мл) протягом 15 хвилин. До суміші окремо додали сполуки 97a-d (0,38 ммоль) і залишили перемішуватися при кімнатній температурі на 16 годин. Потім упарили ДМФА на >75 % при зниженому тиску, і далі розчинили суміш в дихлорметані. Органічний шар промили бікарбонатом натрію, водою і насиченим сольовим розчином. Потім відокремили органічний шар і висушили над сульфатом натрію, відфільтрували і упарили при зниженому тиску до маслянистого залишку. Одержану маслянисту речовину очистили хроматографією на силікагелі (2 %→20 % метанолу/дихлорметану) з одержанням сполук 98a-d з виходом 30-40 %. Дані РХМС і протонного ЯМР узгоджувалися із вказаною структурою.

Сполуку 99 (0,17 г, 0,76 ммоль) обробляли НВТУ (0,29 г, 0,76 ммоль) і N, N-діізопропілетиламіном (0,35 мл, 2,0 ммоль) в ДМФА (50 мл) протягом 15 хвилин. До суміші окремо додали сполуки 97a-d (0,51 ммоль) і залишили перемішуватися при кімнатній температурі на 16 годин. Потім упарили ДМФА на >75 % при зниженому тиску, і далі розчинили суміш в дихлорметані. Органічний шар промили бікарбонатом натрію, водою і насиченим сольовим розчином. Потім відокремили органічний шар і висушили над сульфатом натрію, відфільтрували і упарили при зниженому тиску до маслянистого залишку. Одержану маслянисту речовину очистили хроматографією на силікагелі (5 %→20 % метанолу/дихлорметану) з одержанням сполук 100a-d з виходом 40-60 %. Дані РХМС і протонного ЯМР узгоджувалися із вказаною структурою.

Сполуки 100a-d (0,16 ммоль) окремо гідрогенізували на 10 % Pd(OH)₂/C протягом 3 годин в метанолі/етилацетаті (1:1, 50 мл). Потім каталізатор видалили фільтруванням крізь целіт, а органічні розчинники видалили при зниженому тиску з одержанням сполук 101a-d з виходом 80-90 %. Дані РХМС і протонного ЯМР узгоджувалися із вказаною структурою.

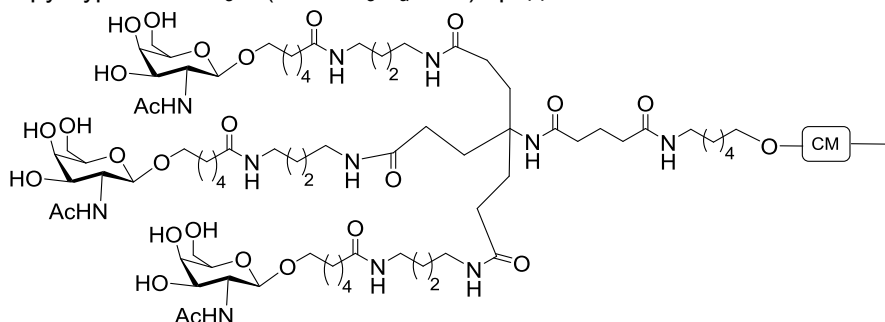
Сполуки 101a-d (0,15 ммоль) окремо розчинили в ДМФА (15 мл) і піридині (0,016 мл, 0,2 ммоль). По краплях додали пентафлуорфенілу трифлуорацетат (0,034 мл, 0,2 ммоль) в атмосфері аргону і залишили реакційну суміш перемішуватися при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Потім упарили ДМФА на >75 % при зниженому тиску, і далі розчинили суміш в дихлорметані. Органічний шар промили бікарбонатом натрію, водою і насиченим сольовим розчином. Потім відокремили органічний шар і висушили над сульфатом натрію, відфільтрували і упарили при зниженому тиску до маслянистого залишку. Одержану маслянисту

речовину очистили хроматографією на силікагелі (2 %→5 % метанолу/дихлорметану) з одержанням сполук 102a-d із приблизним виходом 80 %. Дані РХМС і протонного ЯМР узгоджувалися із вказаною структурою.

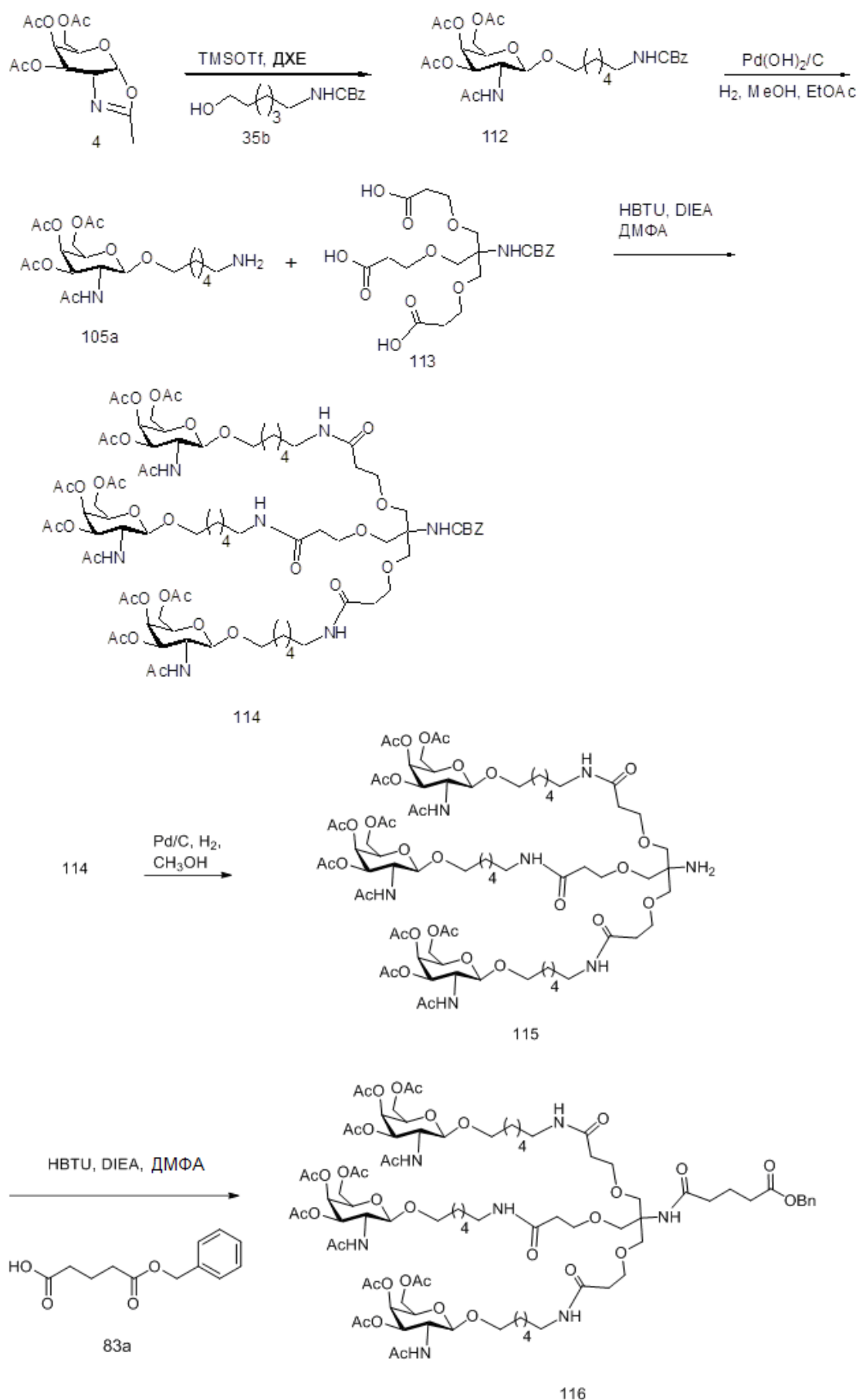


- 5 Олігомерну Сполуку 102, що містить кон'югувальну групу GalNAc₃-8, одержали за загальними способами, представленими у Прикладі 46. Кластерна частина GalNAc₃ кон'югувальної групи GalNAc₃-8 (GalNAc₃-8_a) може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом для одержання різноманітних кон'югувальних груп. У переважному варіанті реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент являє собою - P(=O)(OH) - A_d-P(=O)(OH)-.
- 10

Структура GalNAc₃-8 (GalNAc₃-8_a-CM-) представлена нижче:



Приклад 48. Одержання олігонуклеотиду 119, що містить GalNAc₃-7



Сполуку 112 синтезували за способом, описаним в літературі (J. Med. Chem. 2004, 47, 5798-

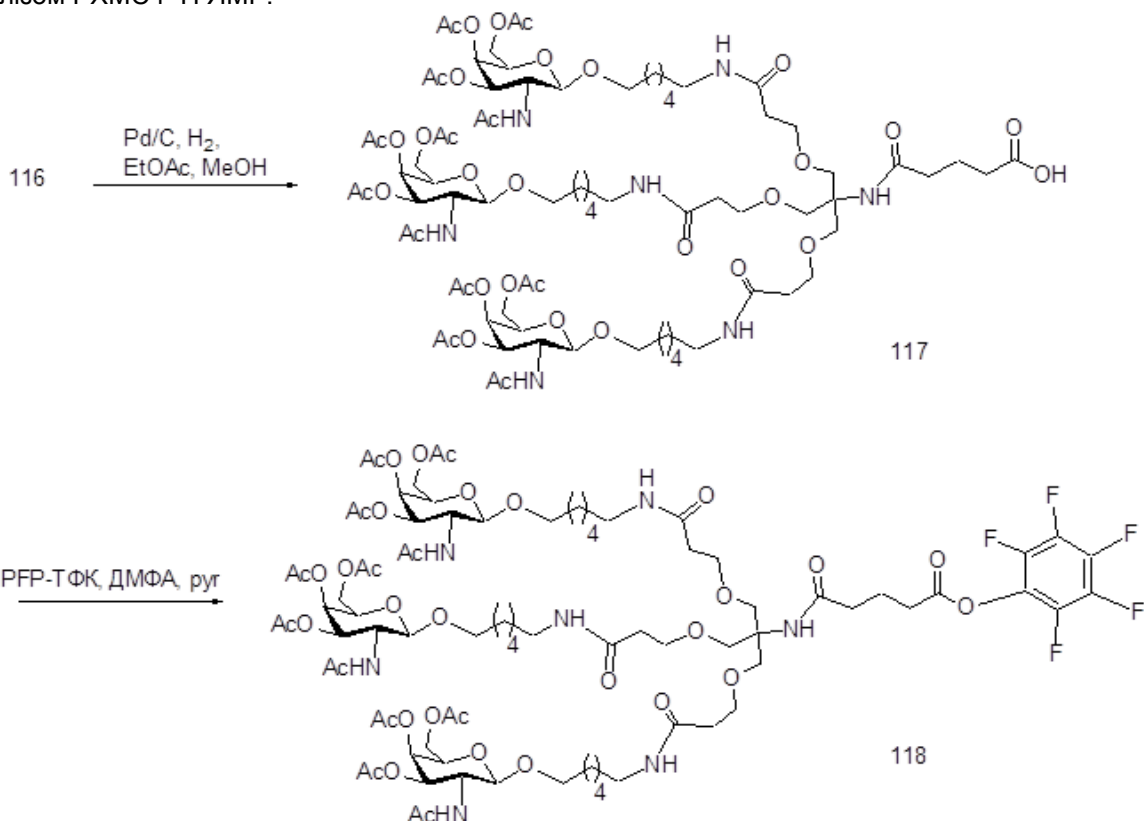
5808).

Сполуку 112 (5 г, 8,6 ммоль) розчинили в суміші метанолу/етилацетату 1:1 (22 мл/22 мл). Додали гідроксид паладію на вугіллі (0,5 г). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі в атмосфері водню протягом 12 годин. Реакційну суміш відфільтрували крізь шар целіту, і промили цей шар сумішшю метанолу/етилацетату 1:1. Фільтрат і промивні розчини об'єднали і концентрували до сухого стану з одержанням Сполуки 105а (кількісно). Структуру підтвердили методом РХМС.

Сполуку 113 (1,25 г, 2,7 ммоль), НВТУ (3,2 г, 8,4 ммоль) і DIEA (2,8 мл, 16,2 ммоль) розчинили в безводному ДМФА (17 мл), і перемішували реакційну суміш при кімнатній температурі протягом 5 хвилин. До цієї суміші додали розчин Сполуки 105а (3,77 г, 8,4 ммоль) в безводному ДМФА (20 мл). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 6 годин. Розчинник видалили при зниженому тиску з одержанням маслянистої речовини. Залишок розчинили в CH_2Cl_2 (100 мл) і промили насиченим водним розчином NaHCO_3 (100 мл) і насиченим сольовим розчином (100 мл). Органічну фазу відокремили, висушили (Na_2SO_4), відфільтрували і випарували. Залишок очистили колонковою хроматографією на силікагелі та елюювали від 10 до 20 % MeOH в дихлорметані з одержанням Сполуки 114 (1,45 г, 30 %). Структуру підтвердили аналізом РХМС і ^1H ЯМР.

Сполуку 114 (1,43 г, 0,8 ммоль) розчинили в суміші метанолу/етилацетату 1:1 (4 мл/4 мл). Додали паладій на вугіллі (вологий, 0,14 г). Реакційну суміш продували воднем і перемішували при кімнатній температурі в атмосфері водню протягом 12 годин. Реакційну суміш відфільтрували крізь шар целіту. Шар целіту промили метанолом/етилацетатом (1:1). Фільтрат і промивні розчини об'єднали і випарували при зниженому тиску з одержанням Сполуки 115 (кількісно). Структуру підтвердили аналізом РХМС і ^1H ЯМР.

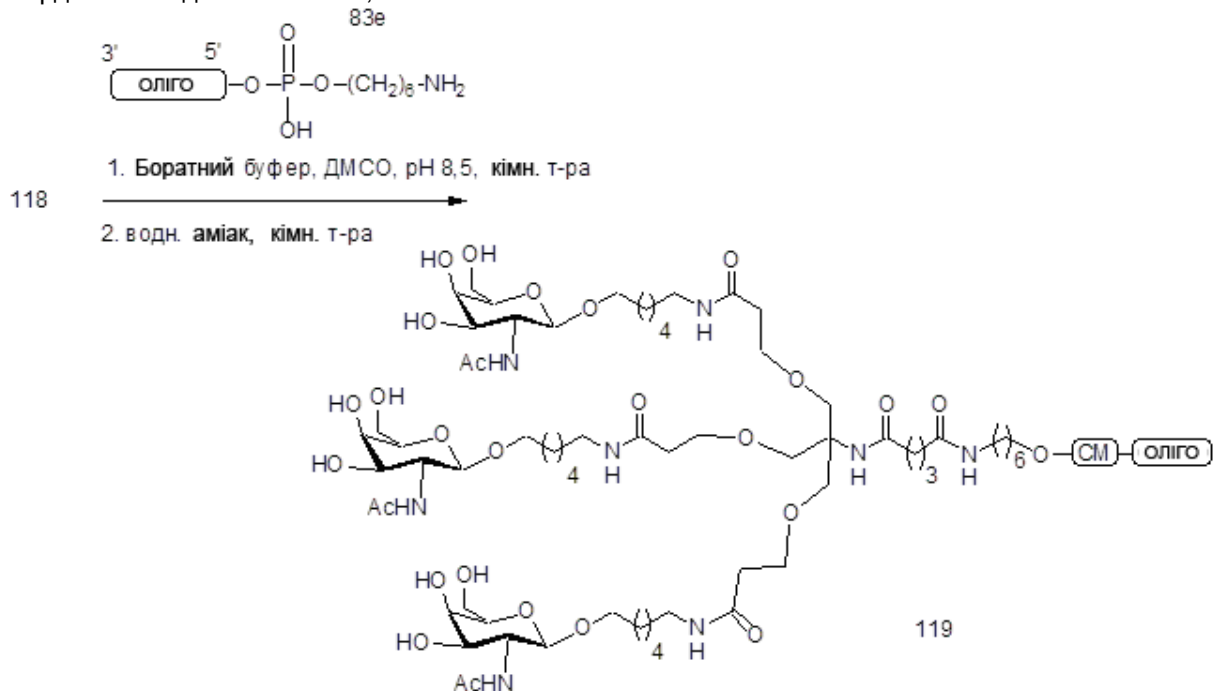
Сполуку 83а (0,17 г, 0,75 ммоль), НВТУ (0,31 г, 0,83 ммоль) і DIEA (0,26 мл, 1,5 ммоль) розчинили в безводному ДМФА (5 мл) і перемішували реакційну суміш при кімнатній температурі протягом 5 хвилин. До цієї суміші додали розчин Сполуки 115 (1,22 г, 0,75 ммоль) в безводному ДМФА і перемішували реакційну суміш при кімнатній температурі протягом 6 годин. Розчинник видалили при зниженому тиску, а залишок розчинили в CH_2Cl_2 . Органічний шар промили насиченим водним розчином NaHCO_3 і насиченим сольовим розчином, висушили над безводним Na_2SO_4 і відфільтрували. Органічний шар концентрували до сухого стану, та одержаний залишок очистили колонковою хроматографією на силікагелі з елюацією від 3 до 15 % MeOH в дихлорметані, з одержанням Сполуки 116 (0,84 г, 61 %). Структуру підтвердили аналізом РХМС і ^1H ЯМР.



Сполуку 116 (0,74 г, 0,4 ммоль) розчинили в суміші метанолу/етилацетату 1:1 (5 мл/5 мл).

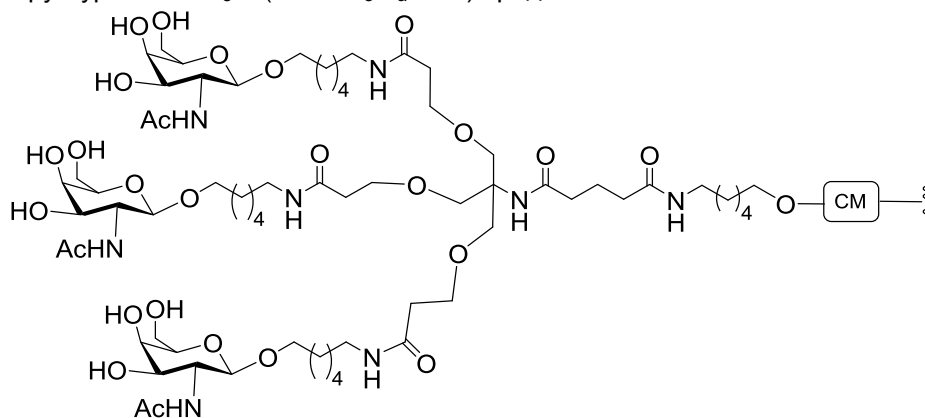
Додали паладій на вугіллі (вологий, 0,074 г). Реакційну суміш продували воднем і перемішували при кімнатній температурі в атмосфері водню протягом 12 годин. Реакційну суміш відфільтрували крізь шар целіту. Шар целіту промили метанолом/етилацетатом (1:1). Фільтрат і промивні розчини об'єднали і випарували при зниженому тиску з одержанням сполуки 117 (0,73 г, 98 %). Структуру підтвердили аналізом РХМС і ^1H ЯМР.

Сполуку 117 (0,63 г, 0,36 ммоль) розчинили в безводному ДМФА (3 мл). До цього розчину додали N, N-діізопропілетиламін (70 мкл, 0,4 ммоль) і пентафлуорбеніл трифлуорацетат (72 мкл, 0,42 ммоль). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 12 годин і вилили в насичений водний розчин NaHCO_3 . Суміш екстрагували дихлорметаном, промили насиченим сольовим розчином і висушили над безводним Na_2SO_4 . Дихлорметановий розчин концентрували до сухого стану і очистили колонковою хроматографією на силікагелі, елюючи від 5 до 10 % MeOH в дихлорметані з одержанням сполуки 118 (0,51 г, 79 %). Структуру підтвердили методом РХМС і ^1H , а також ^1H і ^{19}F ЯМР.

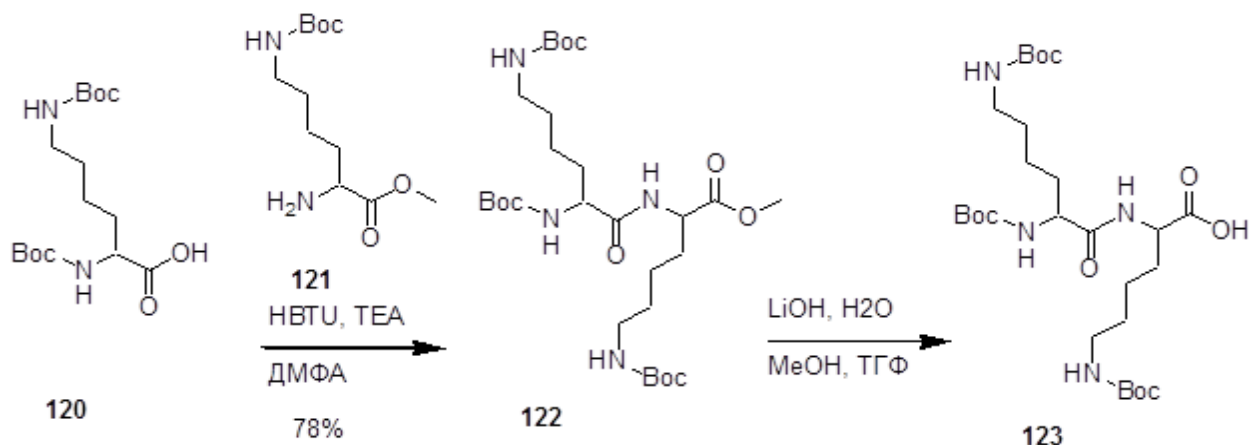


Олігомерну Сполуку 119, що містить кон'югуювальну групу $\text{GalNAc}_3\text{-7}$, одержали за загальними способами, представленими у Прикладі 46. Кластерна частина GalNAc_3 кон'югуювальної групи $\text{GalNAc}_3\text{-7}$ ($\text{GalNAc}_3\text{-7}_a$) може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом для одержання різноманітних кон'югуювальних груп. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент являє собою $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{A}_d-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-$.

Структура $\text{GalNAc}_3\text{-7}$ ($\text{GalNAc}_3\text{-7}_a\text{-CM-}$) представлена нижче:

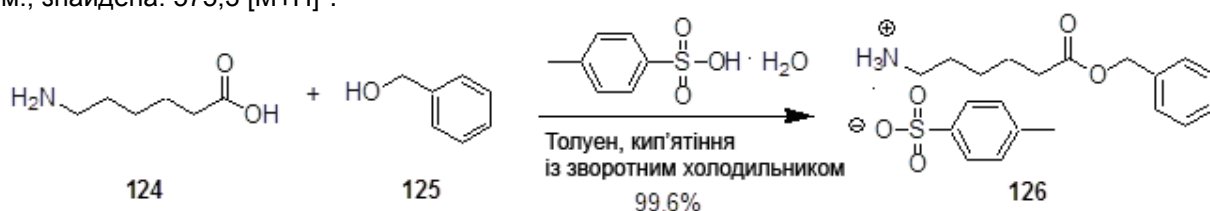


Приклад 49. Одержання олігонуклеотиду 132, що містить $\text{GalNAc}_3\text{-5}$

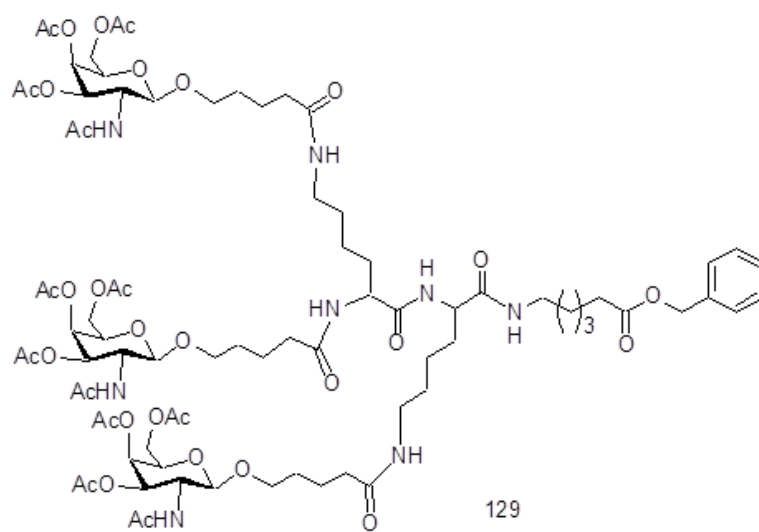
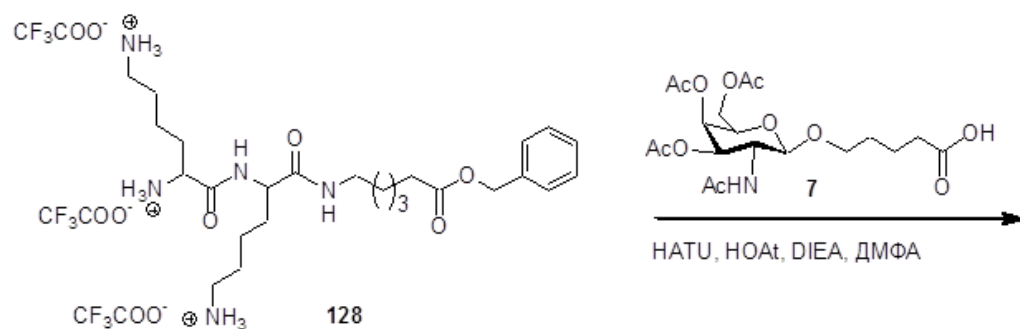
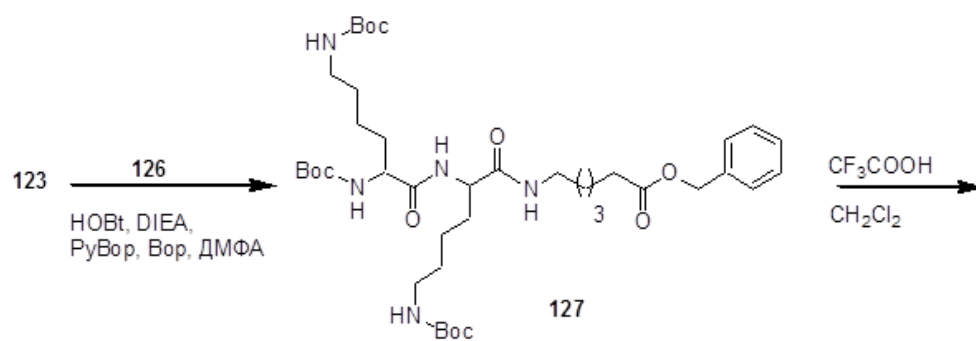


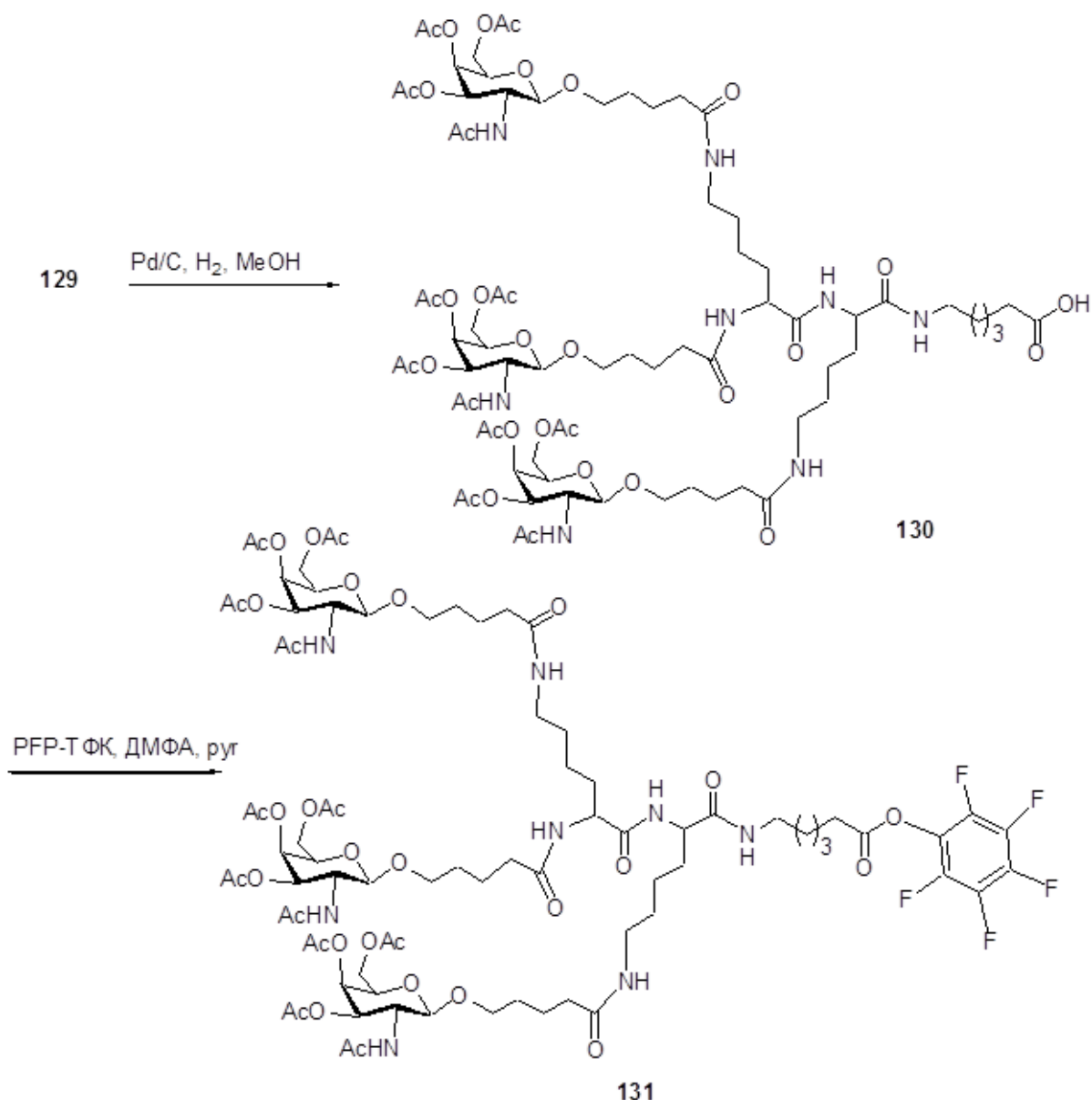
Сполуку 120 (14,01 г, 40 ммоль) і HBTU (14,06 г, 37 ммоль) розчинили в безводному ДМФА (80 мл). Додали триетиламін (11,2 мл, 80,35 ммоль) і перемішували протягом 5 хвилин. Реакційну суміш охолодили на льодяній бані і додали розчин сполуки 121 (10 г, ммоль) в безводному ДМФА (20 мл). Додали додаткову кількість триетиламіну (4,5 мл, 32,28 ммоль) і перемішували реакційну суміш протягом 18 годин в атмосфері аргону. Реакцію контролювали методом ТШХ (етилацетат:гексан; 1:1; Rf=0,47). Розчинник видалили при зниженому тиску. Залишок розчинили в EtOAc (300 мл) і промили 1 М розчином NaHSO₄ (3 × 150 мл), насиченим водним розчином NaHCO₃ (3 × 150 мл) і насиченим сольовим розчином (2 × 100 мл). Органічний шар висушили за допомогою Na₂SO₄. Висушуючий агент видалили фільтруванням, а органічний шар концентрували на ротаційному випарнику. Неочищену суміш очистили колонковою хроматографією на силікагелі, елюючи за допомогою 35-50 % EtOAc в гексані, з одержанням сполуки 122 (15,50 г, 78,13 %). Структуру підтвердили аналізом РХМС і ¹H ЯМР. Маса m/z 589,3 [M+H]⁺.

До охолодженого розчину сполуки 122 (7,75 г, 13,16 ммоль), розчиненої в метанолі (15 мл) додали розчин LiOH (92,15 ммоль) у воді (20 мл) і ТГФ (10 мл). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 45 хвилин і контролювали методом ТШХ (EtOAc:гексан; 1:1). Реакційну суміш концентрували до половини об'єму при зниженому тиску. Розчин, що залишився, охолодили на льодяній бані і нейтралізували додаванням концентрованої HCl. Реакційну суміш розбавили, екстрагували EtOAc (120 мл) і промили насиченим сольовим розчином (100 мл). При стоянні протягом ночі утворилася і освітлилася емульсія. Органічний шар відокремили, висушили (Na₂SO₄), відфільтрували і випарували з одержанням Сполуки 123 (8,42 г). Надмірну масу ймовірно обумовлює залишкова сіль. РХМС узгоджувався із структурою. Продукт застосували без якого-небудь додаткового очищення. М. м., розрахункова: 574,36 %; М. м., знайдена: 575,3 [M+H]⁺.



Сполуку 126 синтезували за способом, описаним в літературі (J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 958-963).





Сполуку 123 (7,419 г, 12,91 ммоль), НОВт (3,49 г, 25,82 ммоль) і сполуку 126 (6,33 г, 16,14 ммоль) розчинили в ДМФА (40 мл), та одержану реакційну суміш охолодили на льодяній бані. До цієї суміші додали N, N-діізопропілетиламін (4,42 мл, 25,82 ммоль), РvВор (8,7 г, 16,7 ммоль), потім зв'язувальний агент Вор (1,17 г, 2,66 ммоль) в атмосфері аргону. Льодяну баню прибрали, і розчин залишили нагріватися до кімнатної температури. Реакція завершилася через 1 годину, що визначили за методом ТШХ (ДХМ:MeOH:AA; 89:10:1). Реакційну суміш концентрували при зниженому тиску. Залишок розчинили в EtOAc (200 мл) і промили 1 М розчином NaHSO₄ (3 × 100 мл), насиченим водним розчином NaHCO₃ (3 × 100 мл) і насиченим сольовим розчином (2 × 100 мл). Органічну фазу відокремили, висушили (Na₂SO₄), відфільтрували і концентрували. Залишок очистили колонковою хроматографією на силікагелі з градієнтом від 50 % гексанів в EtOAc до 100 % EtOAc з одержанням Сполуки 127 (9,4 г) у вигляді білої пінистої речовини. РХМС і ¹H ЯМР узгоджувалися із структурою. Маса м/з 778,4 [M+H]⁺.

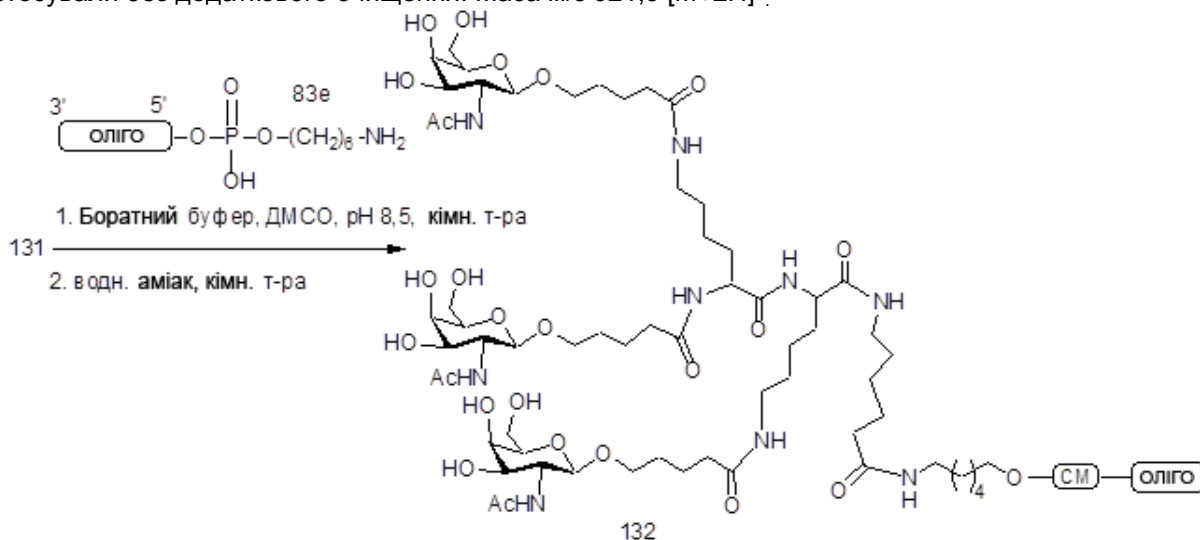
Трифлуороцтову кислоту (12 мл) додали до розчину сполуки 127 (1,57 г, 2,02 ммоль) в дихлорметані (12 мл) і перемішували при кімнатній температурі протягом 1 години. Реакційну суміш випарували спільно з толуеном (30 мл) при зниженому тиску до сухого стану. Одержаний залишок двічі спільно випарували з ацетонітрилом (30 мл) і толуеном (40 мл) з одержанням Сполуки 128 (1,67 г) у вигляді трифлуорацетатної солі, і застосували його на наступній стадії без додаткового очищення. РХМС і ¹H ЯМР узгоджувалися із структурою. Маса м/з 478,2 [M+H]⁺.

Сполуку 7 (0,43 г, 0,963 ммоль), НАТУ (0,35 г, 0,91 ммоль) і НОAt (0,035 г, 0,26 ммоль) змішали і висушували протягом 4 годин над Р₂О₅ при зниженому тиску в круглодонній колбі, і

далі розчинили в безводному ДМФА (1 мл) і перемішували протягом 5 хвилин. До цієї суміші додали розчин сполуки 128 (0,20 г, 0,26 ммоль) в безводному ДМФА (0,2 мл) і додали N, N-діізопропілетиламін (0,2 мл). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі в атмосфері аргону. Реакція завершилася через 30 хвилин, що визначили за допомогою РХМС і ТШХ (7 % MeOH/ДХМ). Реакційну суміш концентрували при зниженому тиску. Залишок розчинили в ДХМ (30 мл) і промили 1 М розчином NaHSO_4 (3×20 мл), насиченим водним розчином NaHCO_3 (3×20 мл) і насиченим сольовим розчином (3×20 мл). Органічну фазу відокремили, висушили над Na_2SO_4 , відфільтрували і концентрували. Залишок очистили колонковою хроматографією на силікагелі, застосувавши 5-15 % MeOH в дихлорметані, з одержанням Сполуки 129 (96,6 мг). РХМС і ^1H ЯМР узгоджувалися із структурою. Маса m/z 883,4 $[\text{M}+2\text{H}]^+$.

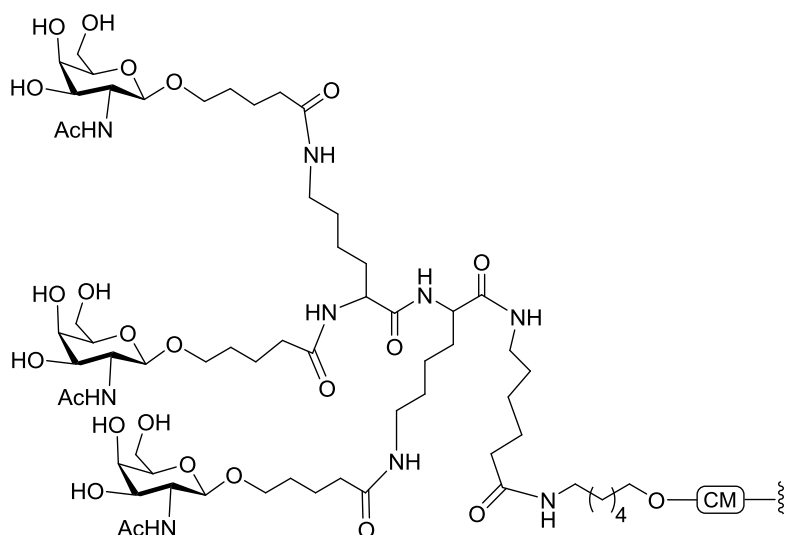
Сполуку 129 (0,09 г, 0,051 ммоль) розчинили в метанолі (5 мл) у 20 мл сцинтиляційній пробірці. До неї додали невелику кількість 10 % Pd/C (0,015 мг) і продували реакційну ємність газоподібним H_2 . Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі в атмосфері H_2 протягом 18 годин. Реакційну суміш відфільтрували крізь шар Целіту, а шар Целіту промили метанолом. Фільтрат і промивні розчини злили разом і концентрували при зниженому тиску з одержанням Сполуки 130 (0,08 г). РХМС і ^1H ЯМР узгоджувалися із структурою. Продукт застосували без додаткового очищення. Маса m/z 838,3 $[\text{M}+2\text{H}]^+$.

У 10 мл мірну круглодонну колбу додали сполуку 130 (75,8 мг, 0,046 ммоль), 0,37 М розчин піридину в ДМФА (200 мкл) і встановили мішалку. До цього розчину по краплях додали 0,7 М розчин пентафлуорфенілу трифлуорацетату в ДМФА (100 мкл) при перемішуванні. Реакція завершилася через 1 годину, що визначили за допомогою РХМС. Розчинник видалили при зниженому тиску, і залишок розчинили в CHCl_3 (~ 10 мл). Органічний шар обробили NaHSO_4 (1 М, 10 мл), насиченим водним розчином NaHCO_3 (10 мл) і насиченим сольовим розчином (10 мл), тричі кожним. Органічну фазу відокремили і висушили над Na_2SO_4 , відфільтрували і концентрували з одержанням Сполуки 131 (77,7 мг). Дані РХМС узгоджувалися із структурою. Застосували без додаткового очищення. Маса m/z 921,3 $[\text{M}+2\text{H}]^+$.

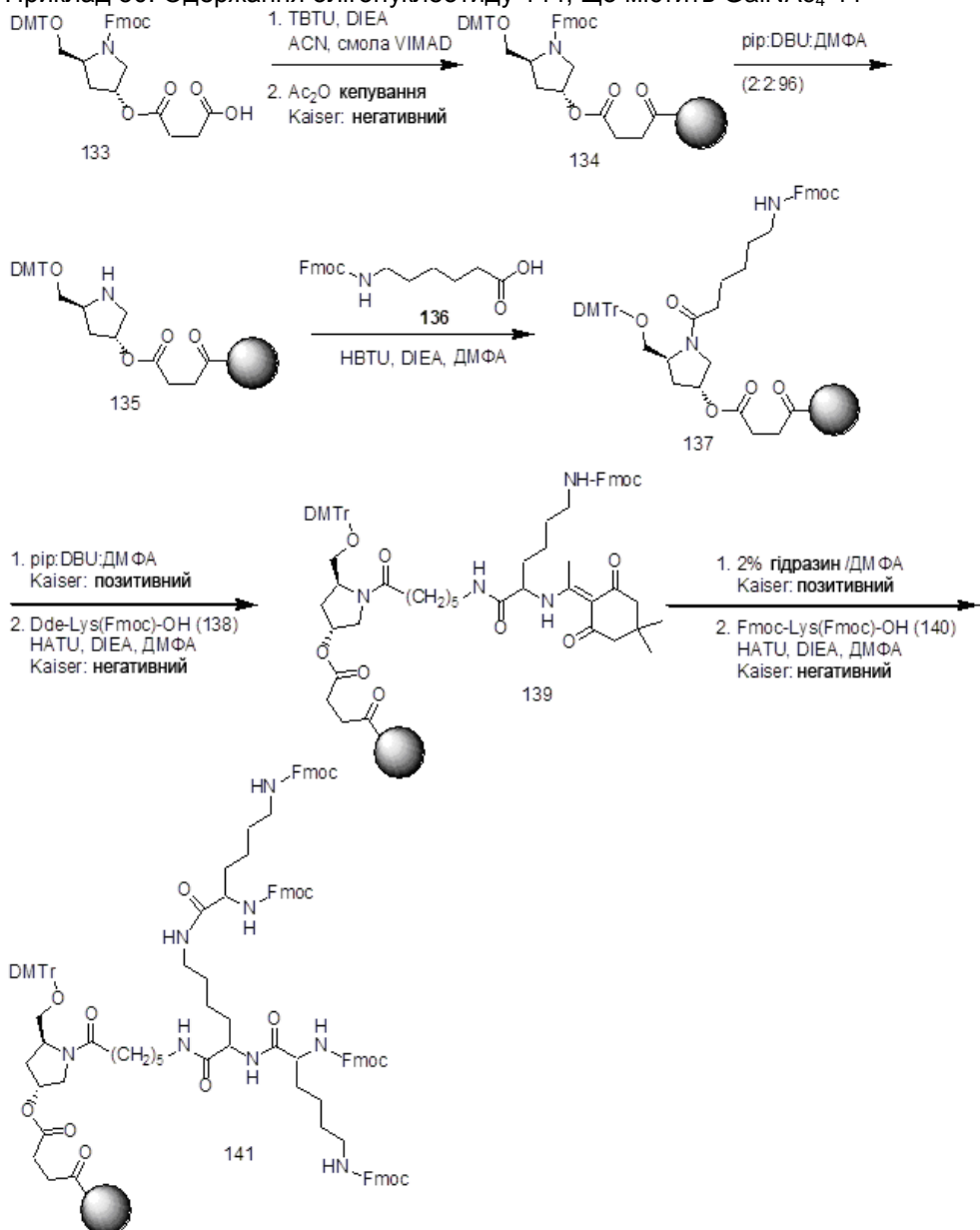


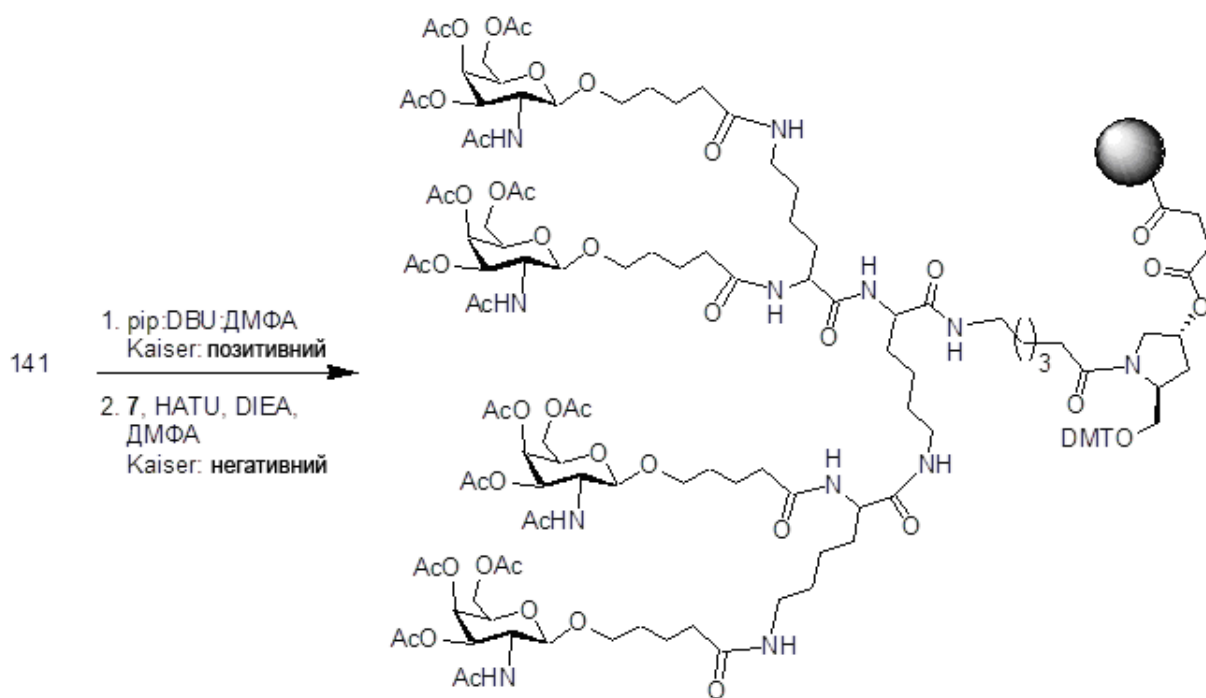
Олігомерну Сполуку 132, що містить кон'югуювальну групу $\text{GalNAc}_3\text{-5}$, одержали за загальними способами, представленими у Прикладі 46. Кластерна частина GalNAc_3 кон'югуювальної групи $\text{GalNAc}_3\text{-5}$ ($\text{GalNAc}_3\text{-5}_a$) може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом для одержання різноманітних кон'югуювальних груп. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент являє собою $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{A}_n-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-$.

Структура $\text{GalNAc}_3\text{-5}$ ($\text{GalNAc}_3\text{-5}_a\text{-CM-}$) представлена нижче:



Приклад 50. Одержання олігонуклеотиду 144, що містить GalNAc₄-11

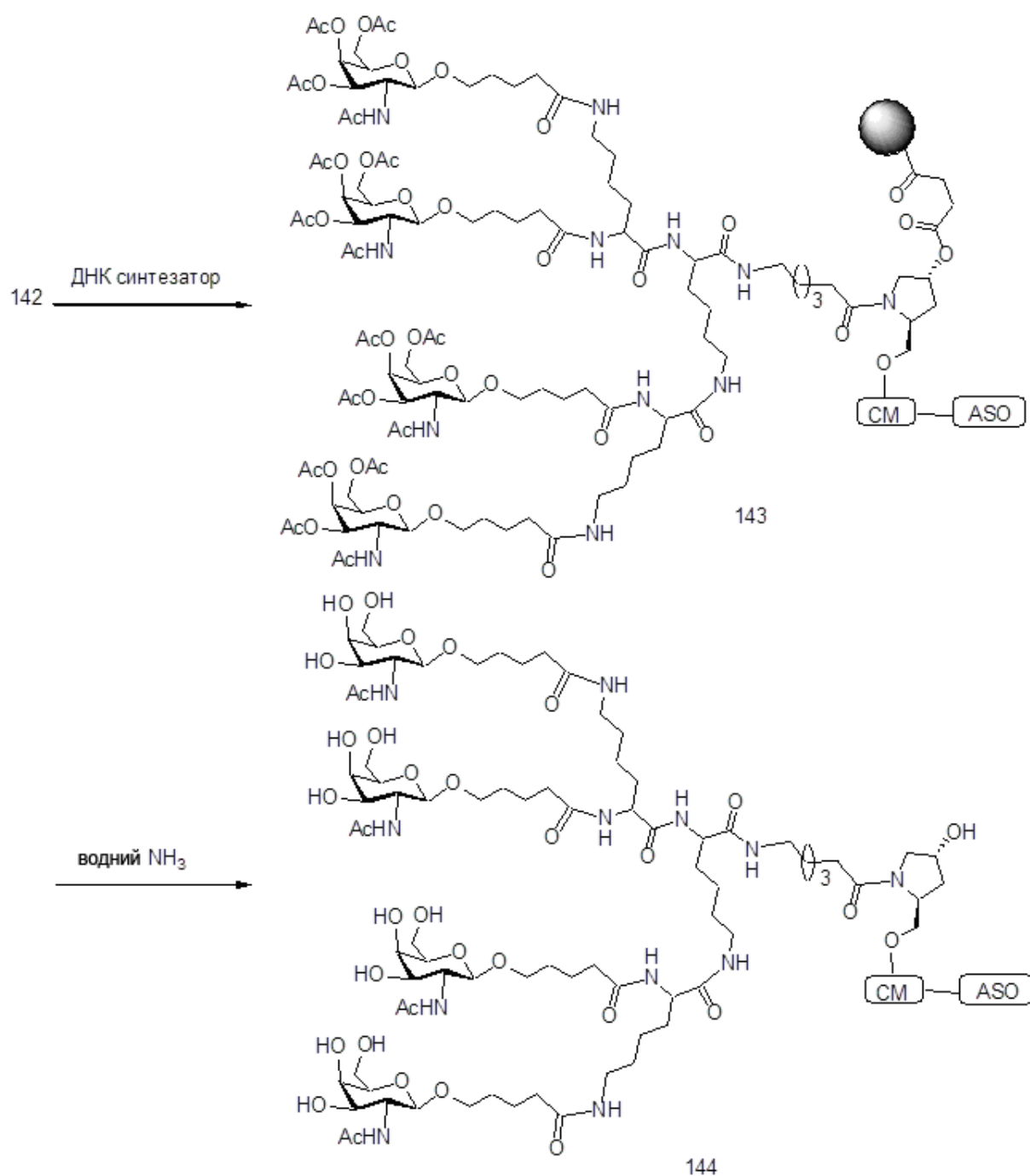




Синтез Сполуки 134. У колбу Меріфілда додали амінометилкову смолу VIMAD (2,5 г, 450 мкмоль/г), яку промили ацетонітрилом, диметилформаїдом, дихлорметаном і ацетонітрилом. Смола залишили набухати в ацетонітрилі (4 мл). Сполуку 133 попередньо активували в 100 мл круглодонній колбі шляхом додавання 20 (1,0 ммоль, 0,747 г), TBTU (1,0 ммоль, 0,321 г), ацетонітрилу (5 мл) і DIEA (3,0 ммоль, 0,5 мл). Цей розчин залишили перемішуватися на 5 хвилин, і далі додали в колбу Меріфілда при струшуванні. Суспензію залишили струшуватися на 3 години. Реакційну суміш злили, а смолу промили ацетонітрилом, ДМФА і ДХМ. Заповнення нової смоли кількісно визначили за вимірюванням абсорбції DMT катіону при 500 нм (коефіцієнт екстинції=76000) у ДХМ, яке склало 238 мкмоль/г. Смола кепували триразовим суспендуванням в розчині оцтового ангідриду протягом десяти хвилин.

Сполуку 141, зв'язану із твердою основою, синтезували багаторазовим повторенням способів твердофазного синтезу пептидів за допомогою Fmoc. Узяли невелику кількість твердої основи і суспендували у водному розчині аміаку (28-30 мас. %) протягом 6 годин. Розщеплену сполуку аналізували методом РХ-МС і спостерігали, що маса узгоджується із структурою. Маса m/z 1063,8 $[M+2H]^+$.

Сполуку 142, зв'язану із твердою основою, синтезували за способами твердофазного синтезу пептидів.

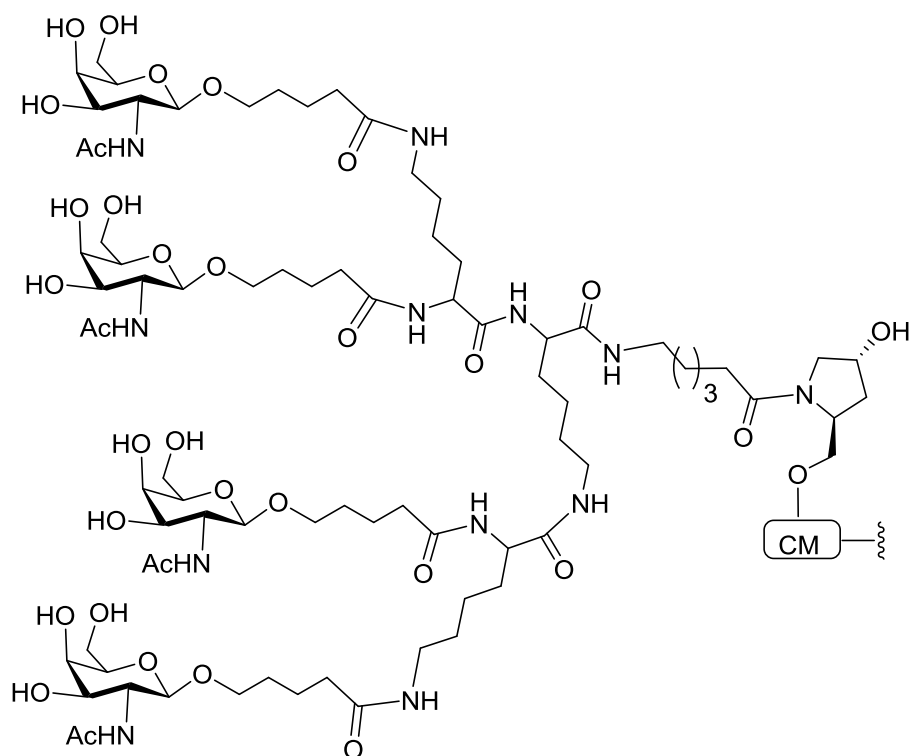


Сполуку 143, зв'язану із твердою основою, синтезували за допомогою стандартного твердофазного синтезу на ДНК синтезаторі.

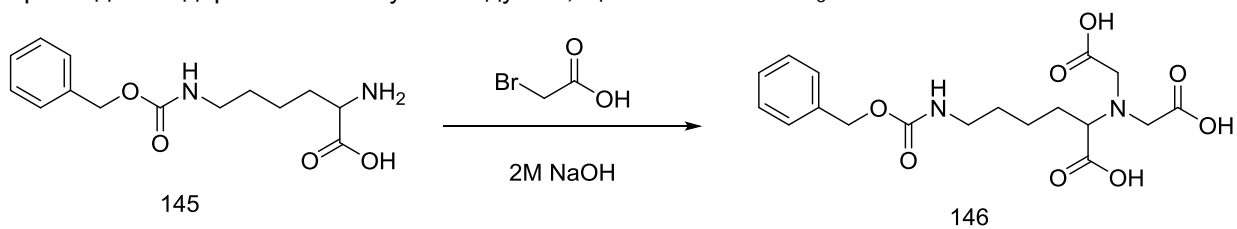
Сполуку 143, зв'язану із твердою основою, суспендували у водному аміаку (28-30 мас. %) і нагрівали при 55 °С протягом 16 годин. Розчин охолодили, і тверду основу відфільтрували. Фільтрат концентрували, залишок розчинили у воді і очистили за допомогою ВЕРХ на високоактивній аніонообмінній колонці. Фракції, що містять сполуку 144 повної довжини, злили разом і знесолили. Одержану GalNAc_4 -11-кон'юговану олігомерну сполуку аналізували за допомогою РХ-МС і спостерігали, що маса узгоджується із структурою.

Кластерна частина GalNAc_4 кон'югуювальної групи GalNAc_4 -11 (GalNAc_4 -11_a) може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом з одержанням різноманітних кон'югуювальних груп. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент являє собою $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{A}_n-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-$.

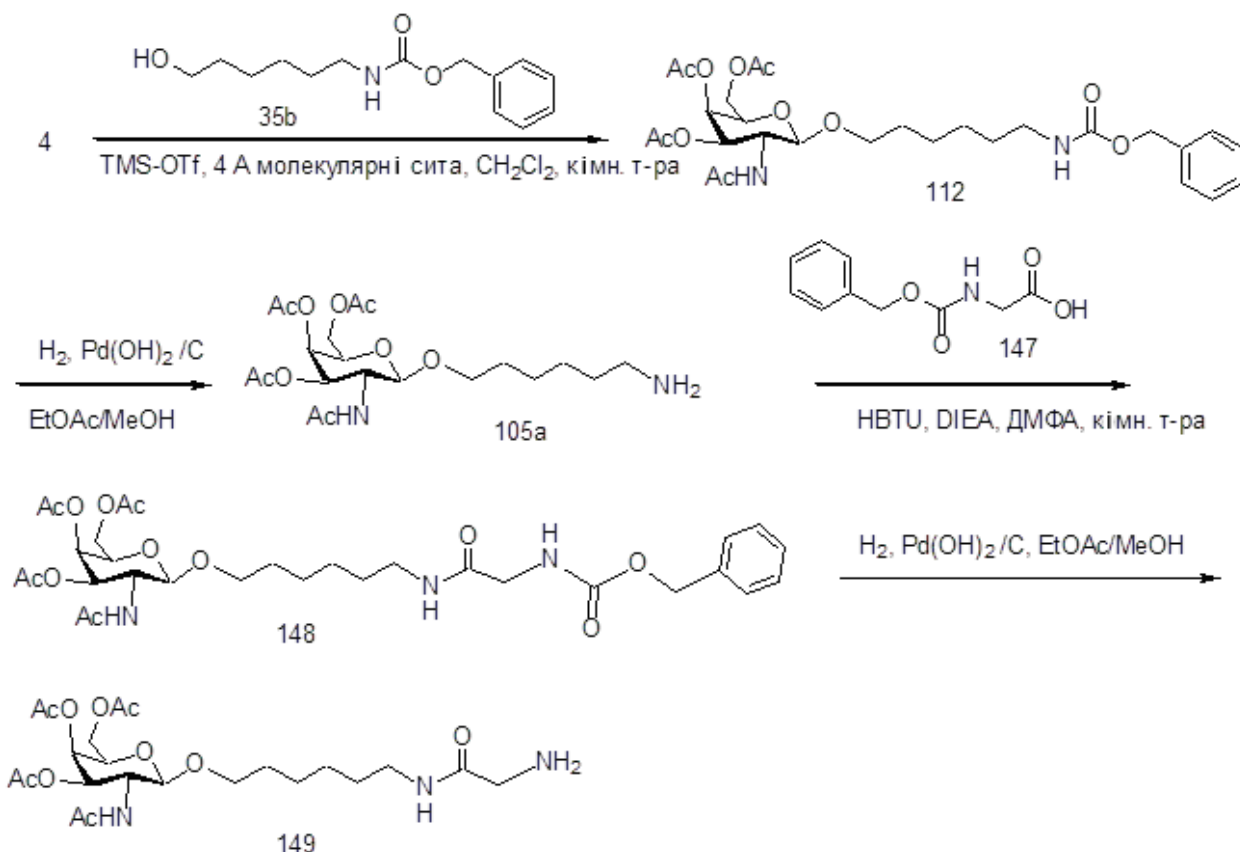
Структура GalNAc_4 -11 (GalNAc_4 -11_a-CM) представлена нижче:



Приклад 51. Одержання олігонуклеотиду 155, що містить GalNAc₃-6



- 5 Сполуку 146 синтезували таким чином, як описано в літературі (Analytical Biochemistry 1995, 229, 54-60).



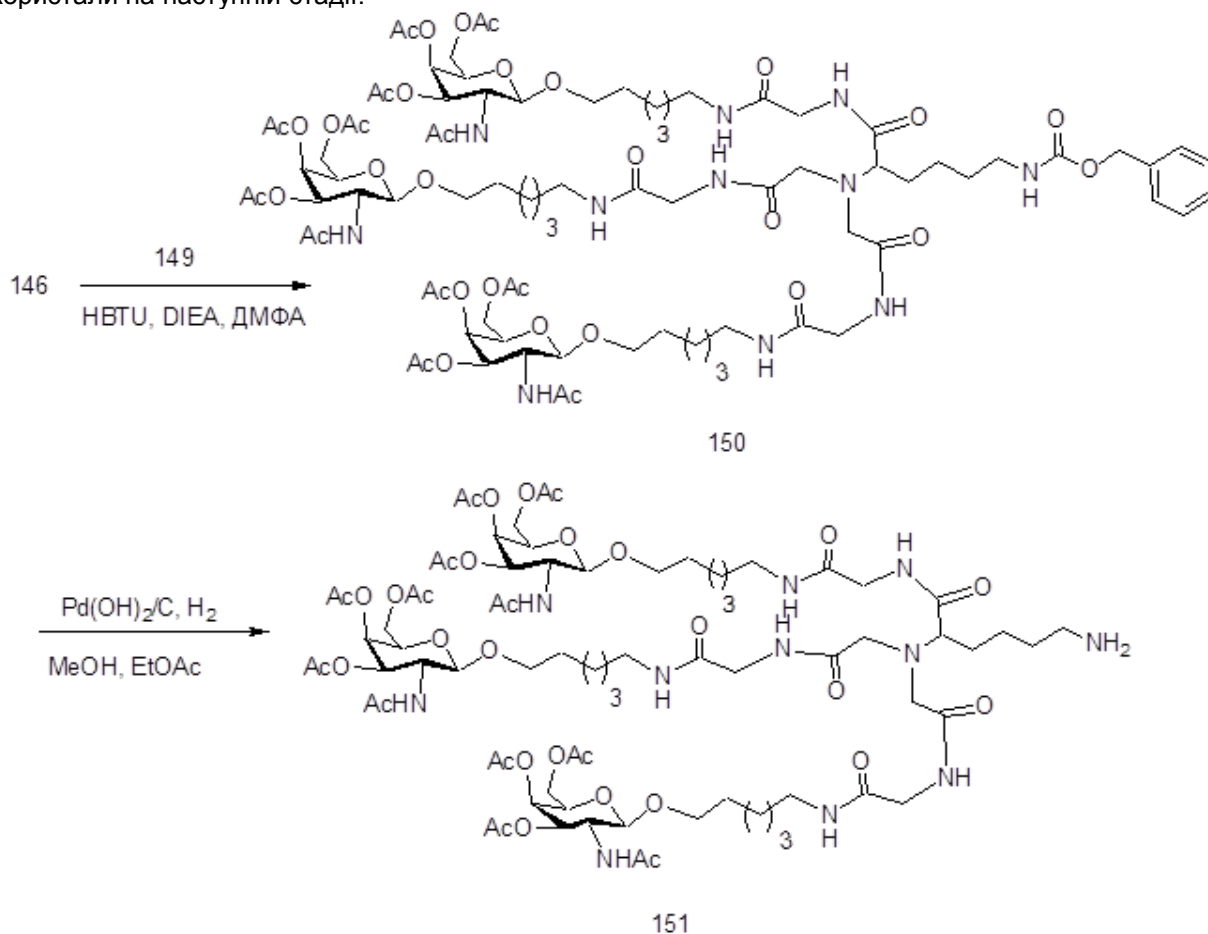
Сполуку 4 (15 г, 45,55 ммоль) і сполуку 35b (14,3 грам, 57 ммоль) розчинили в CH₂Cl₂ (200 мл). Додали активовані молекулярні сита (4 Å, 2 г, порошкоподібні) і залишили реакційну суміш перемішуватися протягом 30 хвилин в атмосфері нітрогену. Додали TMS-OTf (4,1 мл, 22,77 ммоль) і залишили реакційну суміш перемішуватися при кімнатній температурі протягом ночі. Після завершення реакції суміш погасили, виливши у насичений водний розчин NaHCO₃ (500 мл) з подрібненим льодом (~ 150 г). Органічний шар відокремили, промили насиченим сольовим розчином, висушили над MgSO₄, відфільтрували і концентрували до оранжевої маслянистої речовини при зниженому тиску. Неочищений матеріал очистили колонковою хроматографією на силікагелі і елюювали 2-10 % MeOH в CH₂Cl₂ з одержанням Сполуки 112 (16,53 г, 63 %). Дані РХМС і ¹H ЯМР узгоджувалися з передбачуваною сполукою.

Сполуку 112 (4,27 г, 7,35 ммоль) розчинили в MeOH/EtOAc 1:1 (40 мл). Реакційну суміш очистили пропусканням потоку аргону через розчин протягом 15 хвилин. Додали каталізатор Перлмана (гідроксид паладію на вугіллі, 400 мг) і пропускали через розчин газоподібний гідроген протягом 30 хвилин. Після завершення (ТШХ, 10 % MeOH в CH₂Cl₂, і РХМС), каталізатор видалили фільтрацією крізь шар целіту. Фільтрат концентрували на ротаційному випарнику і швидко висушили під високим вакуумом з одержанням Сполуки 105a (3,28 г). Дані РХМС і ¹H ЯМР узгоджувалися з бажаним продуктом.

Сполуку 147 (2,31 г, 11 ммоль) розчинили в безводному ДМФА (100 мл). Додали N, N-діізопропілетиламін (DIEA, 3,9 мл, 22 ммоль), потім HBTU (4 г, 10,5 ммоль). Реакційну суміш залишили перемішуватися протягом ~15 хвилин в атмосфері нітрогену. До цієї суміші додали розчин сполуки 105a (3,3 г, 7,4 ммоль) в сухому ДМФА і перемішували протягом 2 годин в атмосфері нітрогену. Реакційну суміш розбавили EtOAc і промили насиченим водним розчином NaHCO₃ і насиченим сольовим розчином. Органічну фазу відокремили, висушили (MgSO₄), відфільтрували і концентрували до оранжевої сиропоподібної речовини. Неочищений матеріал очистили колонковою хроматографією з 2-5 % MeOH в CH₂Cl₂ з одержанням Сполуки 148 (3,44 г, 73 %). Дані РХМС і ¹H ЯМР узгоджувалися з передбачуваним продуктом.

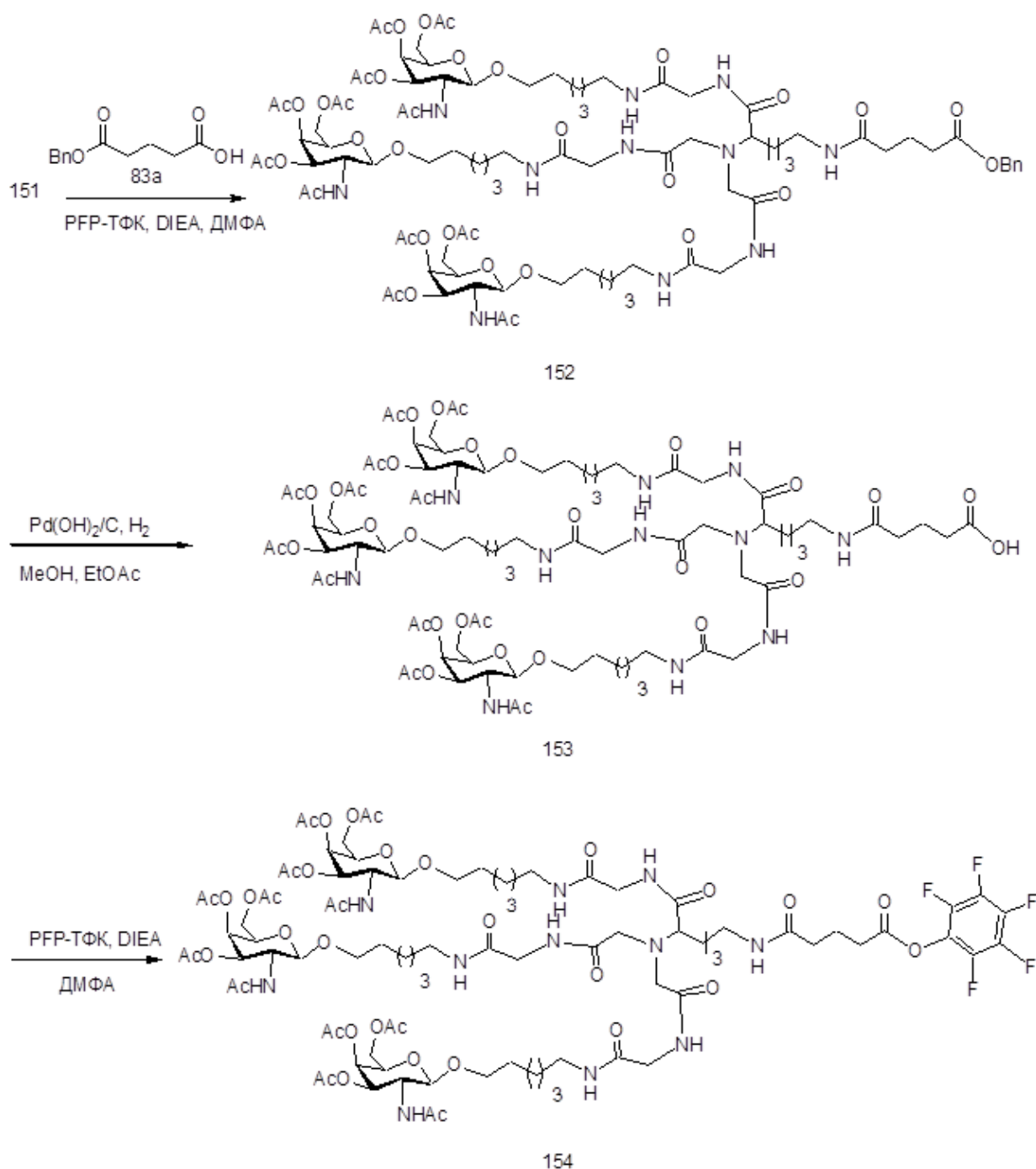
Сполуку 148 (3,3 г, 5,2 ммоль) розчинили в MeOH/EtOAc 1:1 (75 мл). Реакційну суміш очистили пропусканням потоку аргону через розчин протягом 15 хвилин. Додали каталізатор Перлмана (гідроксид паладію на вугіллі (350 мг). Через розчин продували газоподібний гідроген протягом 30 хвилин. Після завершення (ТШХ, 10 % MeOH в ДХМ, і РХМС), каталізатор видалили фільтрацією крізь шар целіту. Фільтрат концентрували на ротаційному випарнику і швидко висушили під високим вакуумом з одержанням Сполуки 149 (2,6 г). Дані РХМС узгоджувалися з бажаним продуктом. Залишок розчинили в сухому ДМФА (10 мл) і негайно

використали на наступній стадії.



Сполуку 146 (0,68 г, 1,73 ммоль) розчинили в сухому ДМФА (20 мл). До неї додали DIEA (450 мкл, 2,6 ммоль, 1,5 екв.) і HBTU (1,96 г, 0,52 ммоль). Реакційну суміш залишили перемішуватися протягом 15 хвилин при кімнатній температурі в атмосфері нітрогену. Додали розчин сполуки 149 (2,6 г) в безводному ДМФА (10 мл). рН реакційної суміші довели до рН=9-10 додаванням DIEA (при необхідності). Реакційну суміш залишили перемішуватися при кімнатній температурі в атмосфері нітрогену протягом 2 годин. Після завершення реакції суміш розбавили EtOAc (100 мл) і промили насиченим водним розчином NaHCO_3 , потім насиченим сольовим розчином. Органічну фазу відокремили, висушили над MgSO_4 , відфільтрували і концентрували. Залишок очистили колонковою хроматографією на силікагелі і елюювали 2-10 % MeOH в CH_2Cl_2 з одержанням Сполуки 150 (0,62 г, 20 %). Дані РХМС і ^1H ЯМР узгоджувалися з бажаним продуктом.

Сполуку 150 (0,62 г) розчинили в MeOH/EtOAc 1:1 (5 л). Реакційну суміш очистили пропусканням потоку аргону через розчин протягом 15 хвилин. Додали каталізатор Перлмана (гідроксид паладію на вугіллі (60 мг). Через розчин продували газоподібний водень протягом 30 хвилин. Після завершення (ТШХ, 10 % MeOH в ДХМ, і РХМС), каталізатор видалили фільтрацією (тефлоновий фільтр з перехідною канюлею шприца, 0,45 мкм). Фільтрат концентрували на ротаційному випарнику і швидко висушили під високим вакуумом з одержанням Сполуки 151 (0,57 г). Дані РХМС узгоджувалися з бажаним продуктом. Продукт розчинили в 4 мл сухого ДМФА і негайно використали на наступній стадії.

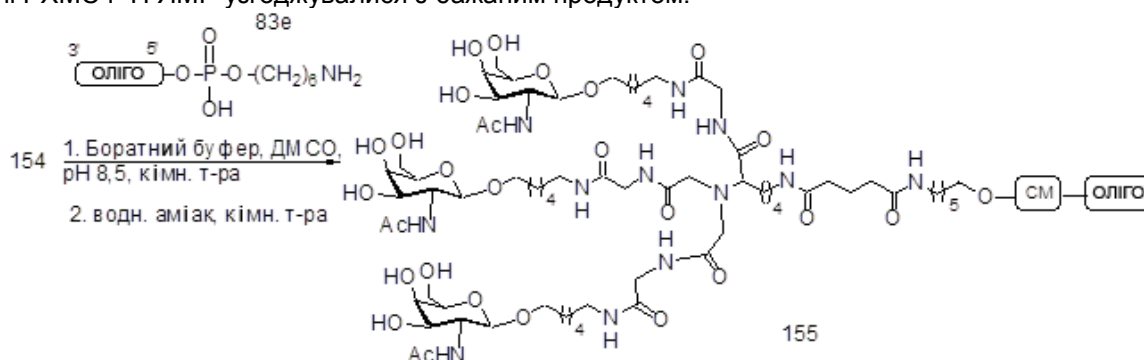


Сполуку 83a (0,11 г, 0,33 ммоль) розчинили в безводному ДМФА (5 мл) і додали N, N-діізопропілетиламін (75 мкл, 1 ммоль) і PFP-TФК (90 мкл, 0,76 ммоль). При дотику реакційна суміш стала пурпурною і поступово змінила колір на оранжевий протягом наступних 30 хвилин. Перебіг реакції контролювали за допомогою ТШХ і РХМС. Після завершення (утворення естеру PFP) додали розчин сполуки 151 (0,57 г, 0,33 ммоль) в ДМФА. рН реакційної суміші довели до рН=9-10 додаванням N, N-діізопропілетиламіну (при необхідності). Реакційну суміш перемішували в атмосфері нітрогену протягом ~30 хвилин. Після завершення реакції більшу частину розчинника видалили при зниженому тиску. Залишок розбавили CH_2Cl_2 і промили насиченим водним розчином NaHCO_3 , потім насиченим сольовим розчином. Органічну фазу відокремили, висушили над MgSO_4 , відфільтрували і концентрували до оранжевої сиропоподібної речовини. Залишок очистили колонковою хроматографією на силікагелі (2-10 % MeOH в CH_2Cl_2) з одержанням Сполуки 152 (0,35 г, 55 %). Дані РХМС і ^1H ЯМР узгоджувалися з бажаним продуктом.

Сполуку 152 (0,35 г, 0,182 ммоль) розчинили в MeOH/EtOAc 1:1 (10 мл). Реакційну суміш очистили пропусканням потоку аргону через розчин протягом 15 хвилин. Додали каталізатор

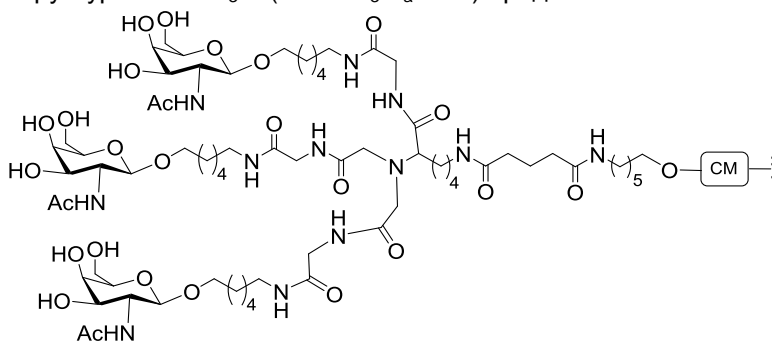
Перлмана (гідроксид паладію на вугіллі (35 мг). Через розчин продували газоподібний гідроген протягом 30 хвилин. Після завершення (ТШХ, 10 % MeOH в ДХМ, і РХМС), каталізатор видалили фільтрацією (тефлоновий фільтр з перехідною канюлею шприца, 0,45 мкм). Фільтрат концентрували на ротаційному випарнику і швидко висушили під високим вакуумом з одержанням Сполуки 153 (0,33 г, кількісно). Дані РХМС узгоджувалися з бажаним продуктом.

Сполуку 153 (0,33 г, 0,18 ммоль) розчинили в безводному ДМФА (5 мл) при перемішуванні в атмосфері нітрогену. До неї додали N, N-діізопропілетиламін (65 мкл, 0,37 ммоль) і PFP-ТФК (35 мкл, 0,28 ммоль). Реакційну суміш перемішували в атмосфері нітрогену протягом ~30 хвилин. При дотику реакційна суміш стала пурпурною і поступово змінила колір на оранжевий. рН реакційної суміші підтримували при рН=9-10 додаванням додаткової кількості N, N-діізопропілетиламіну. Перебіг реакції контролювали за допомогою ТШХ і РХМС. Після завершення реакції більшу частину розчинника видалили при зниженому тиску. Залишок розбавили CH₂Cl₂ (50 мл) і промили насиченим водним розчином NaHCO₃, потім насиченим сольовим розчином. Органічний шар відокремили, висушили над MgSO₄, відфільтрували і концентрували до оранжевої сиропоподібної речовини. Залишок очистили колонковою хроматографією і елюювали 2-10 % MeOH в CH₂Cl₂ з одержанням Сполуки 154 (0,29 г, 79 %). Дані РХМС і ¹H ЯМР узгоджувалися з бажаним продуктом.

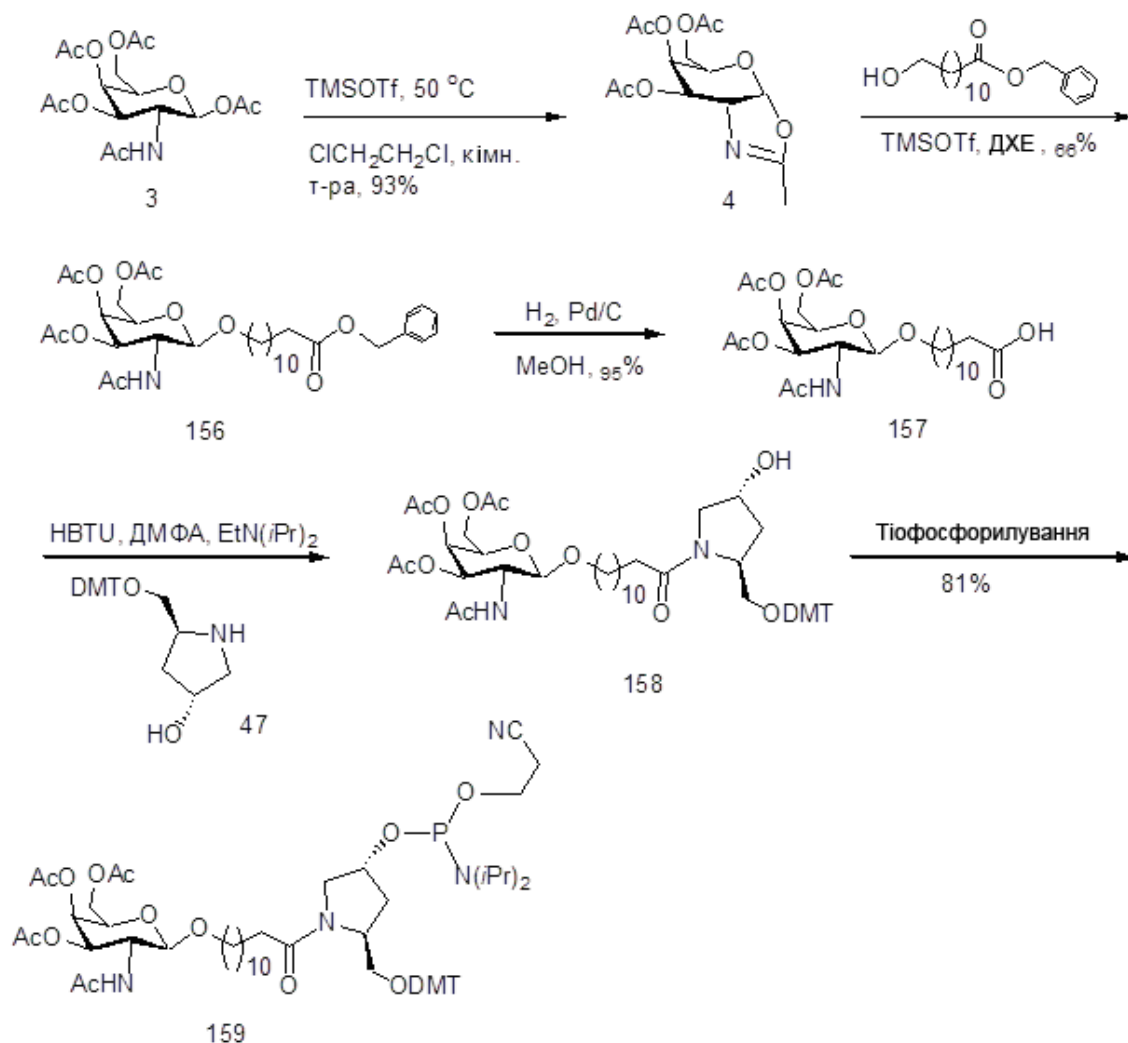


Олігомерну Сполуку 155, що містить кон'югувальну групу GalNAc₃-6, одержали за загальними способами, представленими у Прикладі 46. Кластерна частина GalNAc₃ кон'югувальної групи GalNAc₃-6 (GalNAc₃-6_a) може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом для одержання різноманітних кон'югувальних груп. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент являє собою -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-

Структура GalNAc₃-6 (GalNAc₃-6_a-CM-) представлена нижче:



Приклад 52. Одержання олігонуклеотиду 160, що містить GalNAc₃-9

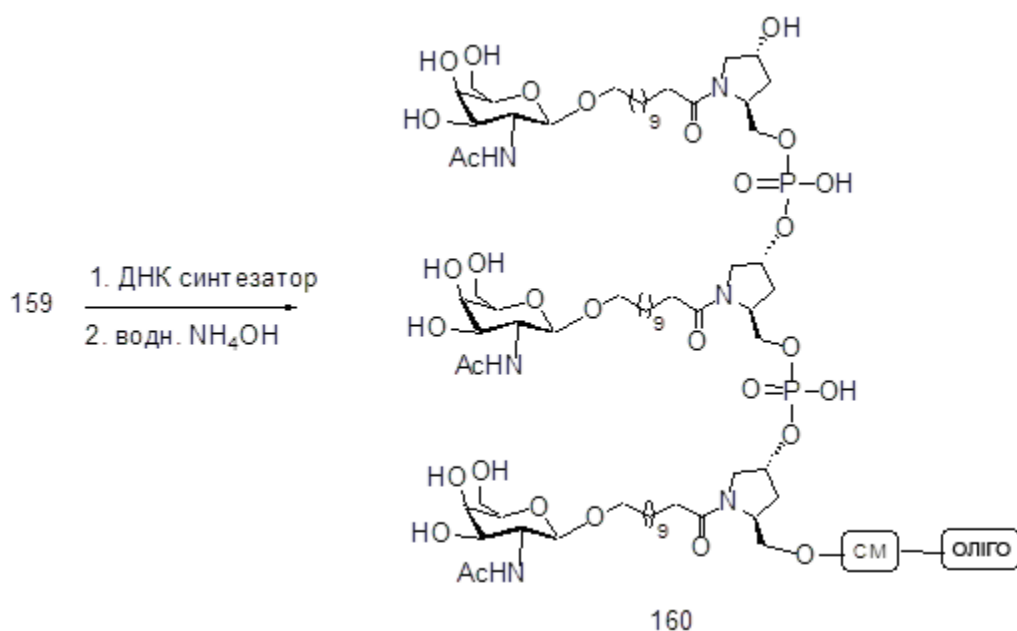


Сполуку 156 синтезували за способом, описаним в літературі (J. Med. Chem. 2004, 47, 5798-5808).

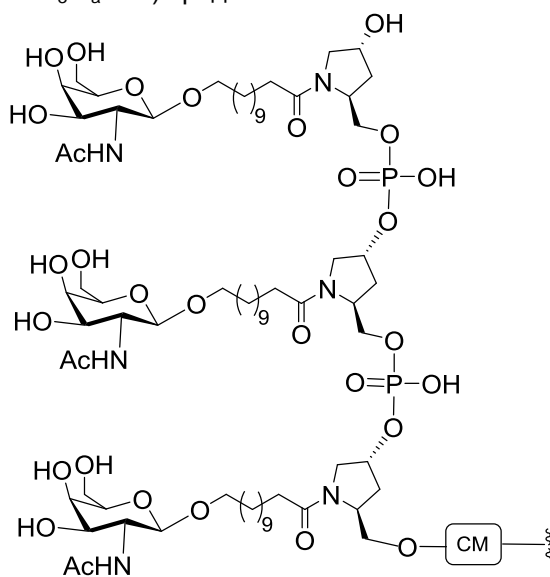
Сполуку 156 (18,60 г, 29,28 ммоль) розчинили в метанолі (200 мл). Додали паладій на вугіллі (6,15 г, завантаження 10 мас. % (у перерахунку на суху речовину), матриця з порошкоподібного вугілля, вологий). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі в атмосфері гідрогену протягом 18 годин. Реакційну суміш відфільтрували крізь шар целіту і ретельно промили шар целіту метанолом. Об'єднаний фільтрат промили і концентрували до сухого стану. Залишок очистили колонковою хроматографією на силікагелі і елюювали 5-10 % метанолу в дихлорметані з одержанням Сполуки 157 (14,26 г, 89 %). Маса м/з 544,1 [M-H].

Сполуку 157 (5 г, 9,17 ммоль) розчинили в безводному ДМФА (30 мл). Додали HBTU (3,65 г, 9,61 ммоль) і N, N-діізопропілетиламін (13,73 мл, 78,81 ммоль) і перемішували реакційну суміш при кімнатній температурі протягом 5 хвилин. До неї додали розчин сполуки 47 (2,96 г, 7,04 ммоль). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 8 годин. Реакційну суміш вилили в насичений водний розчин NaHCO₃. Суміш екстрагували етилацетатом, органічний шар промили насиченим сольовим розчином і висушили (Na₂SO₄), відфільтрували і випарували. Одержаний залишок очистили колонковою хроматографією на силікагелі і елюювали 50 % етилацетатом в гексані з одержанням Сполуки 158 (8,25 г, 73,3 %). Структуру підтвердили аналізом МС і ¹H ЯМР.

Сполуку 158 (7,2 г, 7,61 ммоль) висушили над P₂O₅ при зниженому тиску. Висушену сполуку розчинили в безводному ДМФА (50 мл). До неї додали 1H-тетразол (0,43 г, 6,09 ммоль) і N-метилімідазол (0,3 мл, 3,81 ммоль), і 2-ціаноетил-N, N,N',N'-тетраізопропіл-фосфородіамідит (3,65 мл, 11,50 ммоль). Реакційну суміш перемішували в атмосфері аргону протягом 4 годин. Реакційну суміш розбавили етилацетатом (200 мл). Реакційну суміш промили насиченим розчином NaHCO₃ і насиченим сольовим розчином. Органічну фазу відокремили, висушили (Na₂SO₄), відфільтрували і випарували. Залишок очистили колонковою хроматографією на силікагелі і елюювали 50-90 % етилацетатом в гексані з одержанням Сполуки 159 (7,82 г, 80,5 %). Структуру підтвердили аналізом РХМС і ³¹P ЯМР.

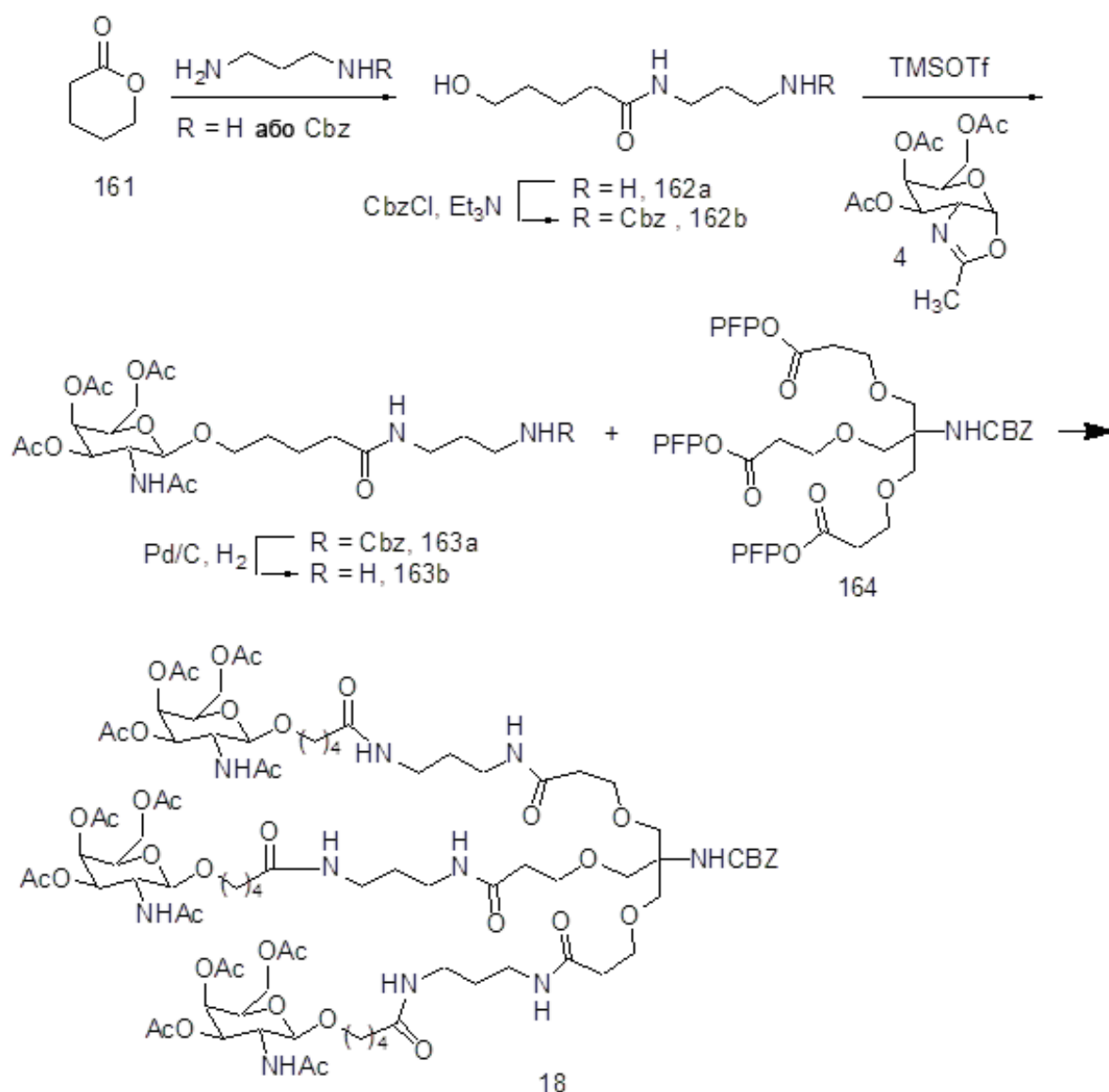


- 5 Олігомерну сполуку 160, що містить кон'югуювальну групу $\text{GalNAc}_3\text{-9}$, одержали за стандартними способами синтезу олігонуклеотидів. Три одиниці сполуки 159 зв'язали з твердою основою, потім з фосфорамідитами нуклеотидів. В результаті обробки захищеної олігомерної сполуки водним аміаком одержали сполуку 160. Кластерна частина GalNAc_3 кон'югуювальної групи $\text{GalNAc}_3\text{-9}$ ($\text{GalNAc}_3\text{-9}_a$) може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом для одержання різноманітних кон'югуювальних груп. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент являє собою $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})\text{-A}_d\text{-P}(=\text{O})(\text{OH})-$. Структура $\text{GalNAc}_3\text{-9}$ ($\text{GalNAc}_3\text{-9}_a\text{-CM}$) представлена нижче:



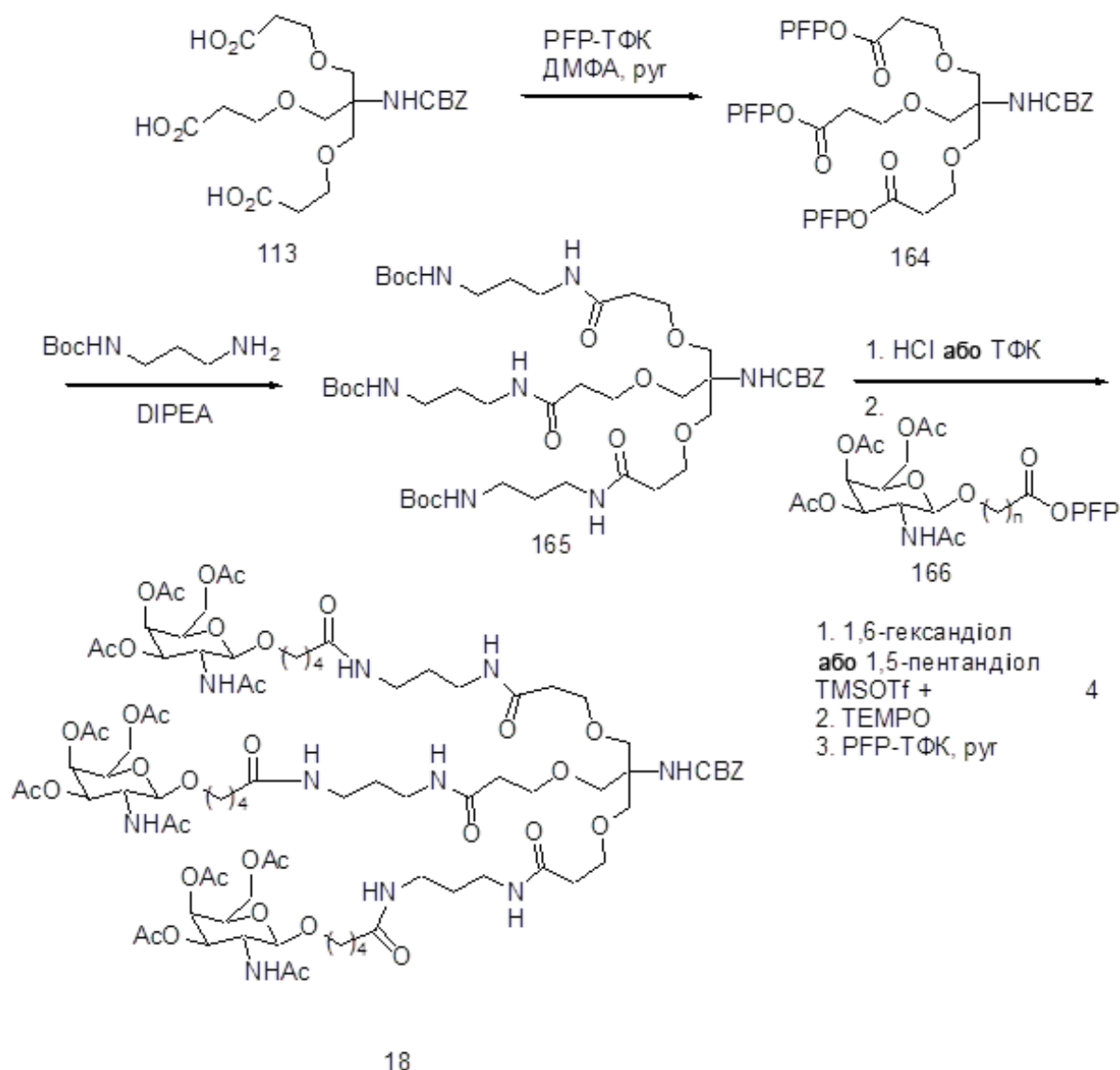
10

Приклад 53. Альтернативний спосіб одержання Сполуки 18 ($\text{GalNAc}_3\text{-1a}$ і $\text{GalNAc}_3\text{-3a}$)



Виконали реакцію лактону 161 з діамінопропаном (3-5 екв.) або моно-Вос-захисним діамінопропаном (1 екв.) з одержанням спирту 162a або 162b. При застосуванні для описаної вище реакції незахищеного пропандіаміну, надлишок діаміну видалили випаровуванням під високим вакуумом, а вільну аміногрупу в 162a захистили за допомогою CbzCl з одержанням 162b у вигляді білої твердої речовини після очищення колонковою хроматографією. Спирт 162b далі ввели в реакцію із сполукою 4 у присутності TMSOTf з одержанням 163a, яку перетворили на 163b шляхом зняття Cbz групи за допомогою каталітичного гідронування. Пентафлуорфеніловий (PFP) естер 164 одержали взаємодією трикислотної сполуки 113 (див. Приклад 48) з PFP-ТФК (3,5 екв.) і піридином (3,5 екв.) в ДМФА (від 0,1 до 0,5 М). Триестер 164 безпосередньо взаємодіяв з аміном 163b (3-4 екв.) і DIPEA (3-4 екв.) з одержанням Сполуки 18. Представлений вище спосіб значно полегшує очищення проміжних сполук і мінімізує утворення побічних продуктів, які утворюються при застосуванні способу, описаного у Прикладі 4.

Приклад 54. Альтернативний спосіб одержання Сполуки 18 (GalNAC₃-1a і GalNAC₃-3a)



Три-PFP естер 164 одержали з кислоти 113 за способом, наведеним вище у Прикладі 53, виконали реакцію цього естеру з моно-Вос-захищеним діаміном з одержанням 165 практично з кількісним виходом. Вос групи видалили хлористоводневою кислотою або трифлуороцтовою кислотою з одержанням триаміну, який взаємодіяв з активованою кислотою PFP 166 у присутності відповідної основи, такої як DIPEA, з одержанням Сполуки 18.

PFP-захищену кислоту Gal-NAc 166 одержали з відповідної кислоти обробкою PFP-TФК (1-1,2 екв.) і піридином (1-1,2 екв.) в ДМФА. Кислоту-прекурсор, в свою чергу, одержали з відповідного спирту окисненням із застосуванням TEMPO (0,2 екв.) і BAIB в ацетонітрилі і воді. Спирт-прекурсор одержали із цукрової проміжної сполуки 4 взаємодією з 1,6-гександіолом (або 1,5-гександіолом або іншим діолом для інших значень n) (2-4 екв.) і TMSOTf, застосувавши умови, описані раніше у Прикладі 47.

Приклад 55. Дозозалежне дослідження олігонуклеотидів, що містять 3' або 5'-кон'югувальну групу (порівняння GalNAc₃-1, 3, 8 і 9), націлених на SRB-1, in vivo

Олігонуклеотиди, наведені нижче, випробували в дозозалежному дослідженні антисмислового інгібування SRB-1 у мишей. Некон'югований ISIS 353382 включили як стандарт. Кожна з різних кон'югувальних груп GalNAc₃ була приєднана або до 3', або до 5'-кінця відповідного олігонуклеотиду за допомогою фосфодіестер-зв'язаного 2'-дезоксиденозинового нуклеозиду (розщеплюваний фрагмент).

Модифіковані ASO, націлені на SRB-1

ASO	Послідовність (від 5' до 3')	Мотив	Кон'югат	SEQ ID NO.
ISIS 353382 (початкова)	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds}$ $T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	немає	28
ISIS 655861	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds}$ $T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{eo} A_{do} \text{'-GalNAc}_3\text{'-}1_a$	5/10/5	GalNAc ₃ -1	29
ISIS 664078	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{eo} A_{do} \text{'-GalNAc}_3\text{'-}9_a$	5/10/5	GalNAc ₃ -9	29
ISIS 661161	$GalNAc_3\text{'-}3_a \text{'-} A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds}$ $T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	GalNAc ₃ -3	30
ISIS 665001	$GalNAc_3\text{'-}8_a \text{'-} A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds}$ $T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	GalNAc ₃ -8	30

Заголовні букви вказують азотисту основу для кожного нуклеозиду, а ^mC позначає 5-метилцитозин. Нижні індекси: "e" позначає 2'-МОЕ модифікований нуклеозид; "d" позначає в-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "s" позначає тіофосфатний міжнуклеозидний зв'язок (PS); "o" позначає фосфодіестерний міжнуклеозидний зв'язок (PO); і "o'" позначає -O-P(=O)(OH)-. Кон'югувальні групи виділені напівжирним шрифтом.

Структура GalNAc₃-1_a показана раніше у Прикладі 9. Структура GalNAc₃-9 показана раніше у Прикладі 52. Структура GalNAc₃-3 показана раніше у Прикладі 39. Структура GalNAc₃-8 показана раніше у Прикладі 47.

Лікування

Шеститижневим самцям мишей Balb/c (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мен) ввели одноразову підшкірну ін'єкцію дози, представленої нижче, сполуки ISIS 353382, 655861, 664078, 661161, 665001 або сольового розчину. Кожна експериментальна група складалася із 4 тварин. Мишей умертвили через 72 години після останнього введення для визначення рівнів мРНК SRB-1 у печінці за допомогою ПЛР у реальному часі і реагенту для кількісного визначення РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) за стандартними протоколами. Результати, наведені нижче, представлені як середній відсоток рівнів мРНК SRB-1 для кожної експериментальної групи, нормалізованих до контрольного зразка, обробленого сольовим розчином.

Як показано в Табл. 27, лікування антисмисловими олігонуклеотидами знижує рівні мРНК SRB-1 дозозалежним чином. Дійсно, антисмислові олігонуклеотиди, що містять фосфодіестер-зв'язані кон'югати GalNAc₃-1 і GalNAc₃-9 на 3'-кінці (ISIS 655861 і ISIS 664078), а також кон'югати GalNAc₃-3 і GalNAc₃-8, зв'язані на 5'-кінці (ISIS 661161 і ISIS 665001) демонструють істотне покращення ефективності, порівняно з некон'югованим антисмисловим олігонуклеотидом (ISIS 353382). Крім того, ISIS 664078, що містить кон'югат GalNAc₃-9 на 3'-кінці, був по суті настільки ж ефективним, як ISIS 655861, який містить кон'югат GalNAc₃-1 на 3'-кінці. 5'-кон'юговані антисмислові олігонуклеотиди, ISIS 661161 і ISIS 665001, що містять GalNAc₃-3 або GalNAc₃-9, відповідно, мають підвищену ефективність, порівняно з 3'-кон'югованими антисмисловими сполуками (ISIS 655861 і ISIS 664078).

Таблиця 27

ASO, що містять GalNac₃-1, 3, 8 або 9, націлені на SRB-1

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% від сольового розчину)	Кон'югат
Сольовий розчин	н.д.	100	
353382	3	88	немає
	10	68	
	30	36	
655861	0,5	98	GalNac ₃ -1 (3')
	1,5	76	
	5	31	
	15	20	
664078	0,5	88	GalNac ₃ -9 (3')
	1,5	85	
	5	46	
	15	20	
661161	0,5	92	GalNac ₃ -3 (5')
	1,5	59	
	5	19	
	15	11	
665001	0,5	100	GalNac ₃ -8 (5')
	1,5	73	
	5	29	
	15	13	

Рівні трансамінази в печінці, аланін-амінотрансферази (ALT) і аспартат-амінотрансферази (AST) в сироватці вимірювали відносно мишей, ін'єктованих сольовим розчином, застосовуючи стандартні протоколи. Оцінили також загальний білірубін і нітроген сечовини в крові (НСК). Перевірили зміну маси тіла, яка істотно не відрізнялася від групи сольового розчину. Значення ALT, AST, загального білірубину і НСК представлені нижче в таблиці.

Таблиця 28

ISIS №	Доза мг/кг	ALT	AST	Загальний білірубін	НСК	Кон'югат
Сольовий розчин		24	59	0,1	37,52	
353382	3	21	66	0,2	34,65	немає
	10	22	54	0,2	34,2	
	30	22	49	0,2	33,72	
655861	0,5	25	62	0,2	30,65	GalNac ₃ -1 (3')
	1,5	23	48	0,2	30,97	
	5	28	49	0,1	32,92	
	15	40	97	0,1	31,62	
664078	0,5	40	74	0,1	35,3	GalNac ₃ -9 (3')
	1,5	47	104	0,1	32,75	
	5	20	43	0,1	30,62	
	15	38	92	0,1	26,2	
661161	0,5	101	162	0,1	34,17	GalNac ₃ -3 (5')
	1,5 г	42	100	0,1	33,37	
	5 г	23	99	0,1	34,97	
	15	53	83	0,1	34,8	
665001	0,5	28	54	0,1	31,32	GalNac ₃ -8 (5')
	1,5	42	75	0,1	32,32	
	5	24	42	0,1	31,85	
	15	32	67	0,1	31,	

Приклад 56. Дозозалежне дослідження олігонуклеотидів, що містять 3' або 5'-кон'югувальну групу (порівняння GalNac₃-1, 2, 3, 5, 6, 7 і 10), націлених на SRB-1, in vivo

- Олігонуклеотиди, наведені нижче, випробували в дозозалежному дослідженні антисмислового інгібування SRB-1 у мишей. Некон'югований ISIS 353382 включили як стандарт.
- 5 Кожна з різних кон'югувальних груп GalNac₃ була приєднана до 5'-кінця відповідного олігонуклеотиду фосфодіестер-зв'язаним 2'-дезоксіденозиним нуклеозидом (розщеплюваний фрагмент), за винятком ISIS 655861, в якому кон'югувальна група GalNac₃ приєднана до 3'-кінця.

Таблиця 29

Модифіковані ASO, націлені на SRB-1

ASO	Послідовність (від 5' до 3')	Мотив	Кон'югат	SEQ ID NO.
ISIS 353382 (початкова)	G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es}	5/10/5	Без кон'югату	28
ISIS 655861	G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} A ^m _{do} -GalNac ₃ -1 _a	5/10/5	GalNac ₃ -1	29
ISIS 664507	GalNac ₃ -2 _a -o _a A ^m _{do} G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es}	5/10/5	GalNac ₃ -2	30
ISIS 661161	GalNac ₃ -3 _a -o _a A ^m _{do} G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es}	5/10/5	GalNac ₃ -3	30
ISIS 666224	GalNac ₃ -5 _a -o _a A ^m _{do} G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es}	5/10/5	GalNac ₃ -5	30
ISIS 666961	GalNac ₃ -6 _a -o _a A ^m _{do} G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es}	5/10/5	GalNac ₃ -6	30
ISIS 666981	GalNac ₃ -7 _a -o _a A ^m _{do} G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es}	5/10/5	GalNac ₃ -7	30
ISIS 666881	GalNac ₃ -10 _a -o _a A ^m _{do} G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es}	5/10/5	GalNac ₃ -10	30

Заголовні букви вказують азотисту основу для кожного нуклеозиду, а ^mC позначає 5-метилцитозин. Нижні індекси: "e" позначає 2'-МОЕ модифікований нуклеозид; "d" позначає β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "s" позначає тіофосфатний міжнуклеозидний зв'язок (PS); "o" позначає фосфодіестерний міжнуклеозидний зв'язок (PO); і "o'" позначає -O-P(=O)(OH)-.

10 Кон'югувальні групи виділені напівжирним шрифтом.

Структура GalNac₃-1_a показана раніше у Прикладі 9. Структура GalNac₃-2_a показана раніше у Прикладі 37. Структура GalNac₃-3_a показана раніше у Прикладі 39. Структура GalNac₃-5_a показана раніше у Прикладі 49. Структура GalNac₃-6_a показана раніше у Прикладі 51. Структура GalNac₃-7_a показана раніше у Прикладі 48. Структура GalNac₃-10_a показана раніше у Прикладі 46.

Лікування

Шеститижневим самцям мишей Balb/c (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мен) ввели одноразову підшкірну ін'єкцію дози, представленої нижче, сполуки ISIS 353382, 655861, 664507, 661161, 666224, 666961, 666981, 666881 або сольового розчину. Кожна експериментальна група складалася із 4 тварин. Мишей умертвили через 72 години після останнього введення для визначення рівнів мРНК SRB-1 у печінці за допомогою ПЛР у реальному часі і реагенту для кількісного визначення РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) за стандартними протоколами. Результати, наведені нижче, представлені як середній відсоток рівнів мРНК SRB-1 для кожної експериментальної групи, нормалізованих до контрольного зразка, обробленого сольовим розчином.

Як показано в Табл. 30, лікування антисмисловими олігонуклеотидами знижує рівні мРНК SRB-1 дозозалежним чином. Дійсно, кон'юговані антисмислові олігонуклеотиди демонструють значне підсилення ефективності, порівняно з некон'югованим антисмисловим олігонуклеотидом (ISIS 353382). 5'-кон'юговані антисмислові олігонуклеотиди демонструють невелике підсилення ефективності, порівняно з 3'-кон'югованим антисмисловим олігонуклеотидом.

Таблиця 30

ISIS №	Доза (мг/кг)	МРНК SRB-1 (% від сольового розчину)	Кон'югат
Сольовий розчин	н.д.	100,0	
353382	3	96,0	Немає
	10	73,1	
	30	36,1	
655861	0,5	99,4	GalNac ₃ -1 (3')
	1,5	81,2	
	5	33,9	
	15	15,2	
664507	0,5	102,0	GalNac ₃ -2 (5')
	1,5	73,2	
	5	31,3	
	15	10,8	
661161	0,5	90,7	GalNac ₃ -3 (5')
	1,5	67,6	
	5	24,3	
	15	11,5	
666224	0,5	96,1	GalNac ₃ -5 (5')
	1,5	61,6	
	5	25,6	
	15	11,7	
666961	0,5	85,5	GalNac ₃ -6 (5')
	1,5	56,3	
	5	34,2	
	15	13,1	
666981	0,5	84,7	GalNac ₃ -7 (5')
	1,5	59,9	
	5	24,9	
	15	8,5	
666881	0,5	100,0	GalNac ₃ -10 (5')
	1,5	65,8	
	5	26,0	
	15	13,0	

5 Рівні трансамінази в печінці, аланін-амінотрансферази (ALT) і аспартат-амінотрансферази (AST) в сироватці вимірювали відносно мишей, ін'єктованих сольовим розчином, застосовуючи стандартні протоколи. Оцінили також загальний білірубін і нітроген сечовини в крові (НСК). Перевірили зміну маси тіла, яка істотно не відрізнялася від групи сольового розчину. Значення ALT, AST, загального білірубину і НСК представлені нижче у Табл. 31.

Таблиця 31

ISIS №	Доза мг/кг	ALT	AST	Загальний білірубін	НСК	Кон'югат
Сольовий розчин		26	57	0,2	27	
353382	3	25	92	0,2	27	Немає
	10	23	40	0,2	25	
	30	29	54	0,1	28	
655861	0,5	25	71	0,2	34	GalNac ₃ -1 (3')
	1,5	28	60	0,2	26	
	5	26	63	0,2	28	
	15	25	61	0,2	28	

Таблиця 31

ISIS №	Доза мг/кг	ALT	AST	Загальний білірубін	НСК	Кон'югат
664507	0,5	25	62	0,2	25	GalNac ₃ -2 (5')
	1,5	24	49	0,2	26	
	5	21	50	0,2	26	
	15	59	84	0,1	22	
661161	0,5	20	42	0,2	29	GalNac ₃ -3 (5')
	1,5 г	37	74	0,2	25	
	5 г	28	61	0,2	29	
	15	21	41	0,2	25	
666224	0,5	34	48	0,2	21	GalNac ₃ -5 (5')
	1,5	23	46	0,2	26	
	5	24	47	0,2	23	
	15	32	49	0,1	26	
666961	0,5	17	63	0,2	26	GalNac ₃ -6 (5')
	1,5	23	68	0,2	26	
	5	25	66	0,2	26	
	15	29	107	0,2	28	
666981	0,5	24	48	0,2	26	GalNac ₃ -7 (5')
	1,5	30	55	0,2	24	
	5	46	74	0,1	24	
	15	29	58	0,1	26	
666881	0,5	20	65	0,2	27	GalNac ₃ -10 (5')
	1,5	23	59	0,2	24	
	5	45	70	0,2	26	
	15	21	57	0,2	24	

Приклад 57. Дослідження тривалості дії олігонуклеотидів, що містять 3'-кон'югувальну групу, націлених на ApoC III, *in vivo*

- 5 Мишам одноразово ввели ін'єкцію дози, вказаної нижче, і протягом 42 днів спостерігали рівні ApoC-III і тригліцеридів в плазмі (TG в плазмі). Дослідження виконали, використовуючи в кожній групі 3 трансгенних мишей, які експресують людський APOC-III.

Таблиця 32

Модифіковані ASO, націлені на ApoC III

ASO	Послідовність (від 5' до 3')	Зв'язки	SEQ ID NO.
ISIS 304801	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	PS	20
ISIS 647535	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e oA _{do} '-GalNac ₃ -1 _a	PS	21
ISIS 647536	A _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{eo} T _{eo} T _{es} A _{es} T _e eoA _{do} '-GalNac ₃ -1 _a	PO/PS	21

- 10 Заголовні букви вказують азотисту основу для кожного нуклеозиду, а ^mC позначає 5-метилцитозин. Нижні індекси: "e" позначає 2'-МОЕ модифікований нуклеозид; "d" позначає β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "s" позначає тіофосфатний міжнуклеозидний зв'язок (PS); "o" позначає фосфодіестерний міжнуклеозидний зв'язок (PO); і "o'" позначає -O-P(=O)(OH)-. Кон'югувальні групи виділені напівжирним шрифтом.

- 15 Структура GalNac₃-1_a показана раніше у Прикладі 9.

Таблиця 33

мРНК ApoC III (% від сольового розчину на 1-й день) і рівні TG в плазмі (% від сольового розчину на 1-й день)

ASO	Доза	Мішень	3-й день	7-й день	14-й день	35-й день	42-й день
Сольовий розчин	0 мг/кг	ApoC-III	98	100	100	95	116
ISIS 304801	30 мг/кг	ApoC-III	28	30	41	65	74
ISIS 647535	10 мг/кг	ApoC-III	16	19	25	74	94
ISIS 647536	10 мг/кг	ApoC-III	18	16	17	35	51
Сольовий розчин	0 мг/кг	TG в плазмі	121	130	123	105	109
ISIS 304801	30 мг/кг	TG в плазмі	34	37	50	69	69
ISIS 647535	10 мг/кг	TG в плазмі	18	14	24	18	71
ISIS 647536	10 мг/кг	TG в плазмі	21	19	15	32	35

Як можна бачити у представленій вище таблиці, тривалість дії збільшується при додаванні 3'-кон'югуювальної групи, порівняно з некон'югованим олігонуклеотидом. Додаткове збільшення тривалості дії спостерігали для змішаного кон'югованого PO/PS олігонуклеотиду 647536, порівняно з кон'югованим олігонуклеотидом 647535, що містить тільки PS.

Приклад 58. Дозозалежне дослідження олігонуклеотидів, що містять 3'-кон'югуювальну групу (порівняння GalNAc₃-1 і GalNAc₄-11), націлених на SRB-1, in vivo

Олігонуклеотиди, наведені нижче, випробували в дозозалежному дослідженні антисмислового інгібування SRB-1 у мишей. Некон'югований ISIS 440762 включили як некон'югований стандарт. Кожна з кон'югуювальних груп була приєднана до 3'-кінця відповідного олігонуклеотиду за допомогою розщеплюваного фрагмента фосфодіестер-зв'язаного 2'-дезоксіденозинового нуклеозиду.

Структура GalNAc₃-1_a показана раніше у Прикладі 9. Структура GalNAc₃-11_a показана раніше у Прикладі 50.

Лікування

Шеститижневим самцям мишей Balb/c (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мен) ввели одноразову підшкірну ін'єкцію дози, представленої нижче, сполуки ISIS 440762, 651900, 663748 або сольового розчину. Кожна експериментальна група складалася із 4 тварин. Мишей умертвили через 72 години після останнього введення для визначення рівнів мРНК SRB-1 у печінці за допомогою ПЛП у реальному часі і реагенту для кількісного визначення РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) за стандартними протоколами. Результати, наведені нижче, представлені як середній відсоток рівнів мРНК SRB-1 для кожної експериментальної групи, нормалізованих до контрольного зразка, обробленого сольовим розчином.

Як показано в Табл. 34, лікування антисмисловими олігонуклеотидами знижує рівні мРНК SRB-1 дозозалежним чином. Антисмислові олігонуклеотиди, що містять фосфодіестер-зв'язані кон'югати GalNAc₃-1 і GalNAc₄-11 на 3'-кінці (ISIS 651900 і ISIS 663748), демонструють значне підсилення ефективності, порівняно з некон'югованим антисмисловим олігонуклеотидом (ISIS 440762). Ці два кон'югованих олігонуклеотиди, GalNAc₃-1 і GalNAc₄-11, були однаково ефективними.

Таблиця 34

Модифіковані ASO, націлені на SRB-1

ASO	Послідовність (від 5' до 3')	Доза, мг/кг	% від контролю з сольовим розчином	SEQ ID NO.
Сольовий розчин			100	
ISIS 440762	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	0,6	73,45	22
		2	59,66	
		6	23,50	

Таблиця 34

Модифіковані ASO, націлені на SRB-1

ASO	Послідовність (від 5' до 3')	Доза, мг/кг	% від контролю з сольовим розчином	SEQ ID NO.
ISIS 651900	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ko} A _{do} -GalNAc ₃ -1 _a	0,2	62,75	23
		0,6	29,14	
		2	8,61	
		6	5,62	
ISIS 663748	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ko} A _{do} -GalNAc ₄ -11 _a	0,2	63,99	23
		0,6	33,53	
		2	7,58	
		6	5,52	

Заголовні букви указують азотисту основу для кожного нуклеозиду, а ^mC позначає 5-метилцитозин. Нижні індекси: "e" позначає 2'-МОЕ модифікований нуклеозид; "k" позначає 6'-(S)-CH₃ біциклічний нуклеозид; "d" позначає β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "s" позначає тіофосфатні міжнуклеозидні зв'язки (PS); "o" позначає фосфодіестерні міжнуклеозидні зв'язки (PO); і "o'" позначає -O-P(=O)(OH)-. Кон'югальні групи виділені напівжирним шрифтом.

Рівні трансамінази в печінці, аланін-амінотрансферази (ALT) і аспартат-амінотрансферази (AST) в сироватці вимірювали відносно мишей, ін'єктованих сольовим розчином, застосовуючи стандартні протоколи. Оцінили також загальний білірубін і нітроген сечовини в крові (HCK). Перевірили зміну маси тіла, яка істотно не відрізнялася від групи сольового розчину. Значення ALT, AST, загального білірубину і HCK представлені нижче у Табл. 35.

Таблиця 35

ISIS №	Доза мг/кг	ALT	AST	Загальний білірубін	HCK	Кон'югат
Сольовий розчин		30	76	0,2	40	
440762	0,60	32	70	0,1	35	Немає
	2	26	57	0,1	35	
	6	31	48	0,1	39	
651900	0,2	32	115	0,2	39	GalNAc ₃ -1 (3')
	0,6	33	61	0,1	35	
	2	30	50	0,1	37	
	6	34	52	0,1	36	
663748	0,2	28	56	0,2	36	GalNAc ₄ -11 (3')
	0,6	34	60	0,1	35	
	2	44	62	0,1	36	
	6	38	71	0,1	33	

Приклад 59. Вплив GalNAc₃-1-кон'югованих ASO, націлених на FXI, in vivo

Олігонуклеотиди, наведені нижче, випробували в дослідженні впливу множинних наростаючих доз на антисмислове інгібування FXI у мишей. ISIS 404071 включили як некон'югований стандарт. Кожна з кон'югальних груп була приєднана до 3'-кінця відповідного олігонуклеотиду за допомогою розщеплюваного фрагмента фосфодіестер-зв'язаного 2'-дезоксіденозинового нуклеозиду.

Таблиця 36

Модифіковані ASO, націлені на FXI

ASO	Послідовність (від 5' до 3')	Зв'язки	SEQ ID NO.
ISIS 404071	$T_{ds}G_{es}G_{es}T_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}A_{ds}^mC_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}T_{ds}^mC_{ds}A_{es}G_{es}A_{es}G_{es}G_e$	PS	31
ISIS 656172	$T_{ds}G_{es}G_{es}T_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}A_{ds}^mC_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}T_{ds}^mC_{ds}A_{es}G_{es}A_{es}G_{es}G_{eo}A_{do}'-GalNAc_3-1_a$	PS	32
ISIS 656173	$T_{ds}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}A_{ds}^mC_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}T_{ds}^mC_{ds}A_{eo}G_{eo}A_{es}G_{es}G_{eo}A_{do}'-GalNAc_3-1_a$	PO/PS	32

Заголовні букви указують азотисту основу для кожного нуклеозиду, а ^mC позначає 5-метилцитозин. Нижні індекси: "e" позначає 2'-МОЕ модифікований нуклеозид; "d" позначає β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "s" позначає тіофосфатний міжнуклеозидний зв'язок (PS); "o" позначає фосфодіестерний міжнуклеозидний зв'язок (PO); і "o'" позначає -O-P(=O)(OH)-. Кон'югувальні групи виділені напівжирним шрифтом.

Структура GalNAc₃-1_a показана раніше у Прикладі 9.

Лікування

Шеститижневим самцям мишей Balb/c (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мен) двічі на тиждень протягом 3 тижнів вводили підшкірну ін'єкцію дози, представленої нижче, сполуки ISIS 404071, 656172, 656173 або PBS як контрольного зразка. Кожна експериментальна група складалася із 4 тварин. Мишей умертвили через 72 години після останнього введення для визначення рівнів мРНК FXI в печінці за допомогою ПЛР у реальному часі і реагенту для кількісного визначення РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) за стандартними протоколами. Виміряли також рівні білка FXI в плазмі за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу. Рівні мРНК FXI визначали відносно загальної РНК (за допомогою RIBOGREEN®), потім нормалізували до контрольного зразка, обробленого PBS. Результати, наведені нижче, представлені як середній відсоток рівнів мРНК FXI для кожної експериментальної групи. Дані нормалізували до контрольного зразка, обробленого PBS, і позначили як «% PBS». ED₅₀s вимірювали такими ж способами, як описані раніше, і вони представлені нижче.

Таблиця 37

мРНК фактора XI (% від сольового розчину)

ASO	Доза, мг/кг	% від контрольного зразка	Кон'югат	Зв'язки
Сольовий розчин		100	Немає	
ISIS 404071	3	92	Немає	PS
	10	40		
	30	15		
ISIS 656172	0,7	74	GalNAc ₃ -1	PS
	2	33		
	6	9		
ISIS 656173	0,7	49	GalNAc ₃ -1	PO/PS
	2	22		
	6	1		

Як показано в Табл. 37, лікування антисмисловими олігонуклеотидами знижує рівні мРНК FXI дозозалежним чином. Олігонуклеотидами, що містять кон'югувальну групу 3'-GalNAc₃-1, демонструють значне підсилення ефективності, порівняно з некон'югованим антисмисловим олігонуклеотидом (ISIS 404071). Між цими двома кон'югованими олігонуклеотидами додаткове підсилення ефективності було забезпечене за рахунок заміни деяких PS зв'язків на PO (ISIS 656173).

Як показано в Табл. 37а, лікування антисмисловими олігонуклеотидами знижує рівні білка FXI дозозалежним чином. Олігонуклеотидами, що містять кон'югувальну групу 3'-GalNAc₃-1,

демонструють значне підсилення ефективності, порівняно з некон'югованим антисмисловим олігонуклеотидом (ISIS 404071). Між цими двома кон'югованими олігонуклеотидами додаткове підсилення ефективності було забезпечене за рахунок заміни деяких PS зв'язків на PO (ISIS 656173).

5

Таблиця 37а

Білок фактора XI (% від сольового розчину)

ASO	Доза, мг/кг	Білок (% від контрольного зразка)	Кон'югат	Зв'язки
Сольовий розчин		100	Немає	
ISIS 404071	3	127	Немає	PS
	10	32		
	30	3		
ISIS 656172	0,7	70	GalNAc ₃ -1	PS
	2	23		
	6	1		
ISIS 656173	0,7	45	GalNAc ₃ -1	PO/PS
	2	6		
	6	0		

Рівні трансамінази в печінці, аланін-амінотрансферази (ALT) і аспартат-амінотрансферази (AST) в сироватці вимірювали відносно мишей, ін'єктованих сольовим розчином, застосовуючи стандартні протоколи. Оцінили також загальний білірубін, загальний альбумін, CRE і нітроген сечовини в крові (HCK). Перевірили зміну маси тіла, яка істотно не відрізнялася від групи сольового розчину. Значення ALT, AST, загального білірубіну і HCK представлені нижче в таблиці.

10

Таблиця 38

ISIS №	Доза мг/кг	ALT	AST	Загальний альбумін	Загальний білірубін	CRE	HCK	Кон'югат
Сольовий розчин		71,8	84,0	3,1	0,2	0,2	22,9	
404071	3	152,8	176,0	3,1	0,3	0,2	23,0	немає
	10	73,3	121,5	3,0	0,2	0,2	21,4	
	30	82,5	92,3	3,0	0,2	0,2	23,0	
656172	0,7	62,5	111,5	3,1	0,2	0,2	23,8	GalNAc ₃ -1 (3')
	2	33,0	51,8	2,9	0,2	0,2	22,0	
	6	65,0	71,5	3,2	0,2	0,2	23,9	
656173	0,7	54,8	90,5	3,0	0,2	0,2	24,9	GalNAc ₃ -1 (3')
	2	85,8	71,5	3,2	0,2	0,2	21,0	
	6	114,0	101,8	3,3	0,2	0,2	22,7	

Приклад 60. Вплив кон'югованих ASO, націлених на SRB-1, in vitro

Олігонуклеотиди, наведені нижче, випробували в дослідженні впливу множинних наростаючих доз на антисмислове інгібування SRB-1 у первинних гепатоцитах мишей. ISIS 353382 включили як некон'югований стандарт. Кожна з кон'югуювальних груп була приєднана до 3' або 5'-кінця відповідного олігонуклеотиду за допомогою розщеплюваного фрагмента фосфодіестер-зв'язаного 2'-дезоксіденозинового нуклеозиду.

15

20

Модифіковані ASO, націлені на SRB-1

ASO	Послідовність (від 5' до 3')	Мотив	Кон'югат	SEQ ID NO.
ISIS 353382	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	немає	28
ISIS 655861	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{eo} A_{do} - GalNAc_3-1_a$	5/10/5	GalNAc ₃ -1	29
ISIS 655862	$G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $m C_{ds} T_{ds} T_{eo}^m C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_{eo} A_{do} - GalNAc_3-1_a$	5/10/5	GalNAc ₃ -1	29
ISIS 661161	$GalNAc_3-3_{a-o} A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds}$ $T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	GalNAc ₃ -3	30
ISIS 665001	$GalNAc_3-8_{a-o} A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds}$ $T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	GalNAc ₃ -8	30
ISIS 664078	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{eo} A_{do} - GalNAc_3-9_a$	5/10/5	GalNAc ₃ -9	29
ISIS 666961	$GalNAc_3-6_{a-o} A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds}$ $T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	GalNAc ₃ -6	30
ISIS 664507	$GalNAc_3-2_{a-o} A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	GalNAc ₃ -2	30
ISIS 666881	$GalNAc_3-10_{a-o} A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	GalNAc ₃ -10	30
ISIS 666224	$GalNAc_3-5_{a-o} A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	GalNAc ₃ -5	30
ISIS 666981	$GalNAc_3-7_{a-o} A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	GalNAc ₃ -7	30

Заголовні букви указують азотисту основу для кожного нуклеозиду, а ^mC позначає 5-метилцитозин. Нижні індекси: "e" позначає 2'-МОЕ модифікований нуклеозид; "d" позначає β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "s" позначає тіофосфатний міжнуклеозидний зв'язок (PS); "o" позначає фосфодіестерний міжнуклеозидний зв'язок (PO); і "o'" позначає -O-P(=O)(OH)-. Кон'югувальні групи виділені напівжирним шрифтом.

Структура GalNAc₃-1_a показана раніше у Прикладі 9. Структура GalNAc₃-3_a показана раніше у Прикладі 39. Структура GalNAc₃-8_a показана раніше у Прикладі 47. Структура GalNAc₃-9_a показана раніше у Прикладі 52. Структура GalNAc₃-6_a показана раніше у Прикладі 51. Структура GalNAc₃-2_a показана раніше у Прикладі 37. Структура GalNAc₃-10_a показана раніше у Прикладі 46. Структура GalNAc₃-5_a показана раніше у Прикладі 49. Структура GalNAc₃-7_a показана раніше у Прикладі 48.

Лікування

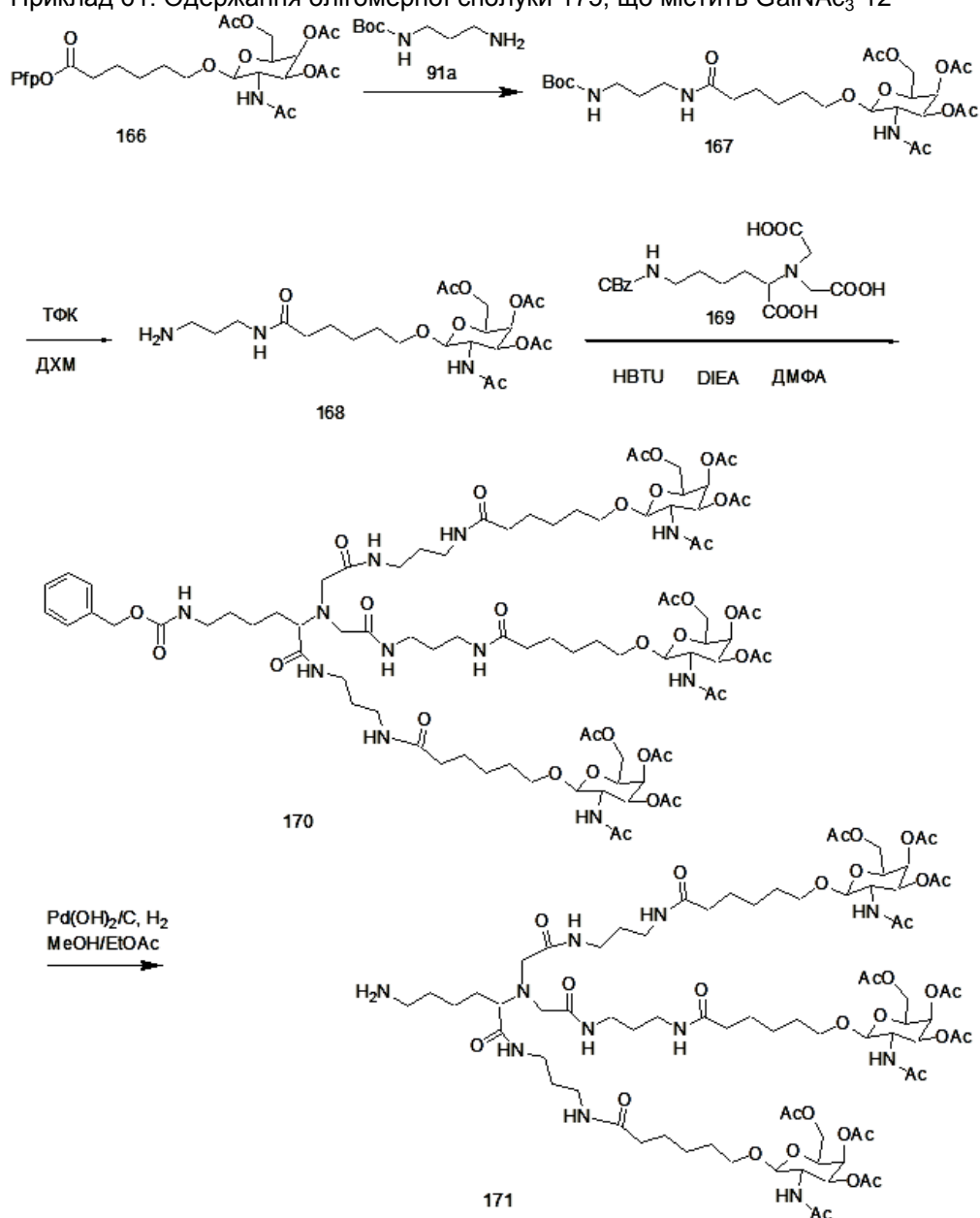
Олігонуклеотиди, наведені вище, випробовували in vitro у первинних гепатоцитарних клітинах мишей, вміщених на планшети із густиною 25000 клітин на ямку і оброблених 0,03, 0,08, 0,24, 0,74, 2,22, 6,67 або 20 нМ модифікованого олігонуклеотиду. Після обробки протягом близько 16 годин, з клітин виділили РНК і виміряли рівні мРНК за допомогою кількісної ПЛР у реальному часі, а рівні мРНК SRB-1 III скоректували відповідно до загального вмісту РНК, виміряного за допомогою RIBOGREEN®.

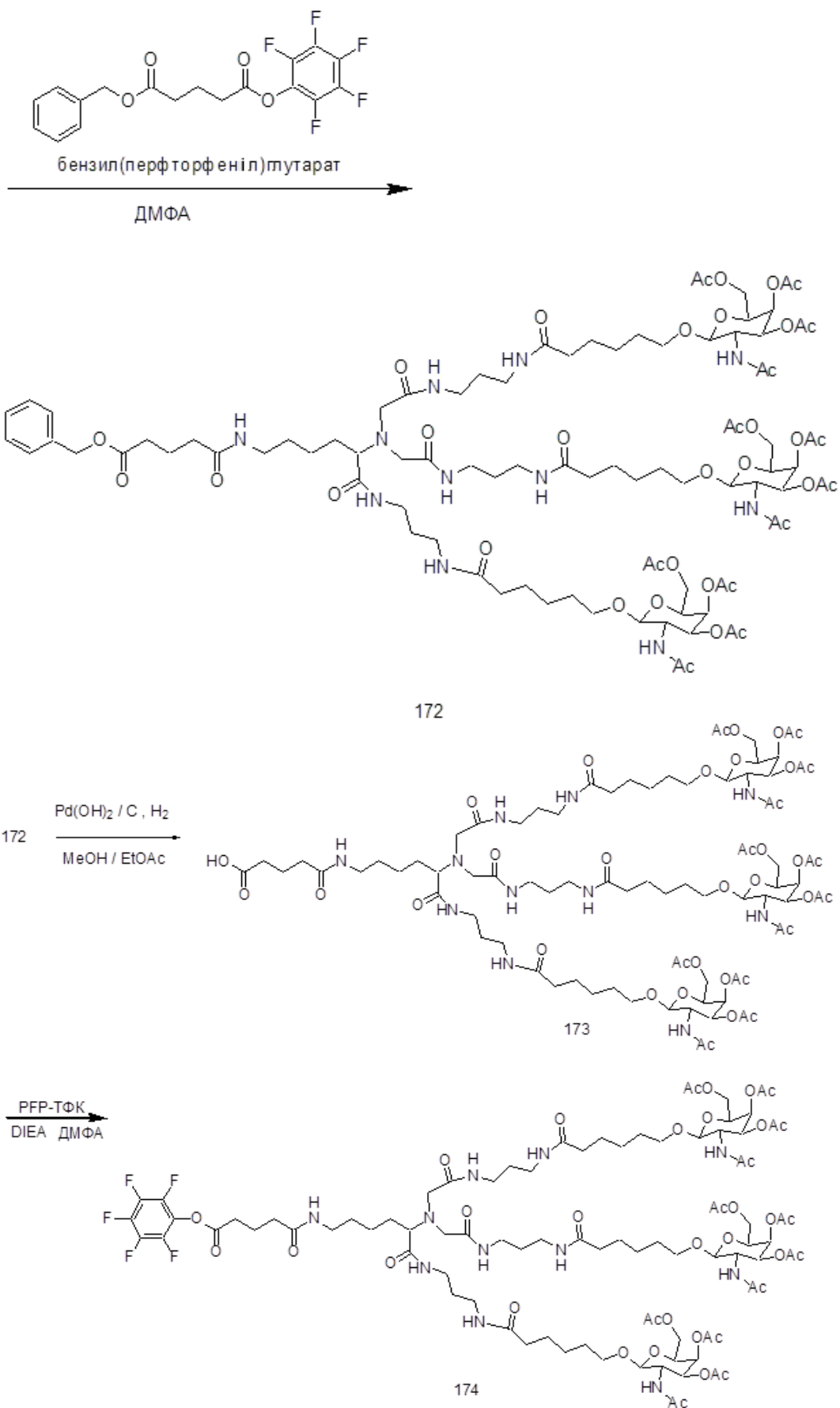
IC₅₀ обчислили за стандартними способами, а результати представлені у Табл. 40. Результати показують, що за умов вільного поглинання, при яких не застосовували ніяких реагентів або електроімпульсних прийомів для штучного прискорення входження олігонуклеотидів у клітини, олігонуклеотиди, що містять кон'югат GalNAc, були значно ефективнішими у гепатоцитах, ніж початковий олігонуклеотид (ISIS 353382), який не містить кон'югату GalNAc.

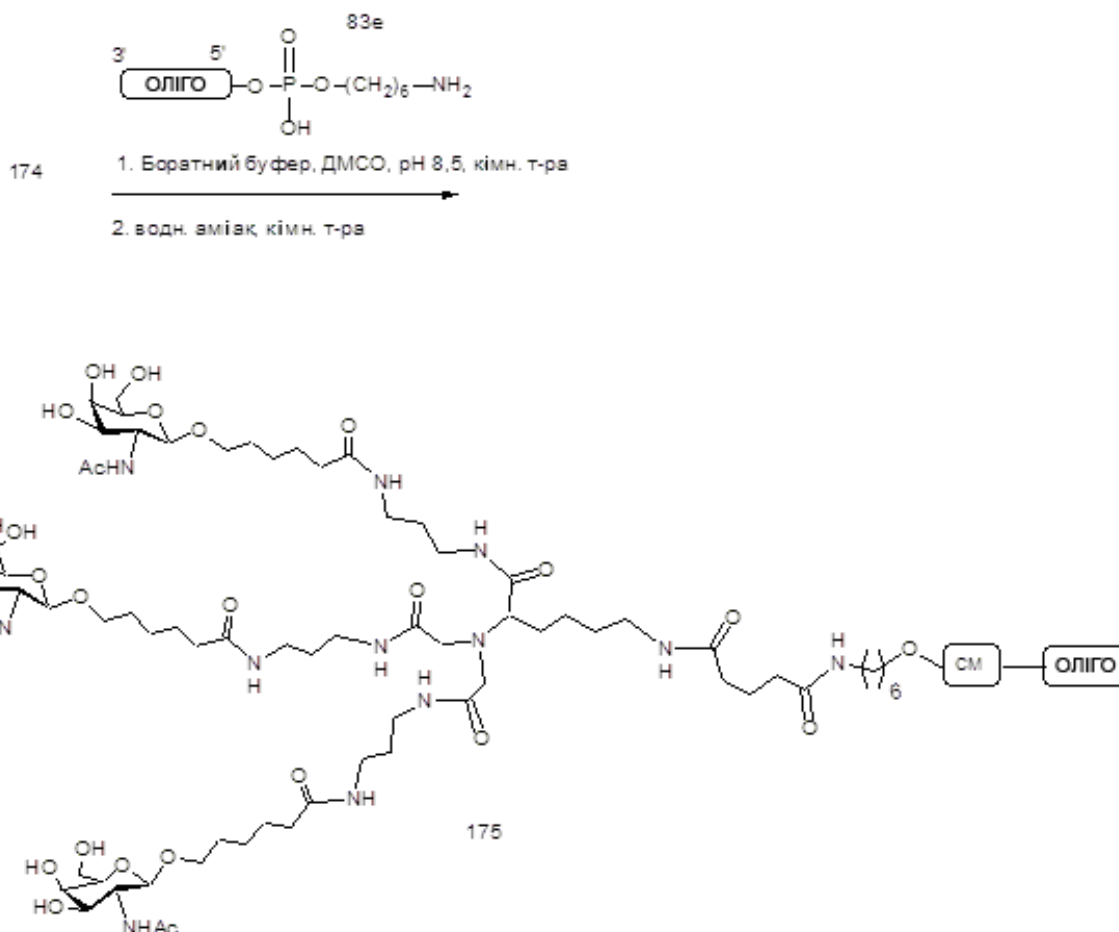
ASO	IC ₅₀ (нМ)	Міжнуклеозидні зв'язки	Кон'югат	SEQ ID NO.
ISIS 353382	190 ^a	PS	немає	28
ISIS 655861	11 ^a	PS	GalNac ₃ -1	29
ISIS 655862	3	PO/PS	GalNac ₃ -1	29
ISIS 661161	15 ^a	PS	GalNac ₃ -3	30
ISIS 665001	20	PS	GalNac ₃ -8	30
ISIS 664078	55	PS	GalNac ₃ -9	29
ISIS 666961	22 ^a	PS	GalNac ₃ -6	30
ISIS 664507	30	PS	GalNac ₃ -2	30
ISIS 666881	30	PS	GalNac ₃ -10	30
ISIS 666224	30 ^a	PS	GalNac ₃ -5	30
ISIS 666981	40	PS	GalNac ₃ -7	30

^aСереднє для декількох паралельних експериментів.

Приклад 61. Одержання олігомерної сполуки 175, що містить GalNAc₃-12



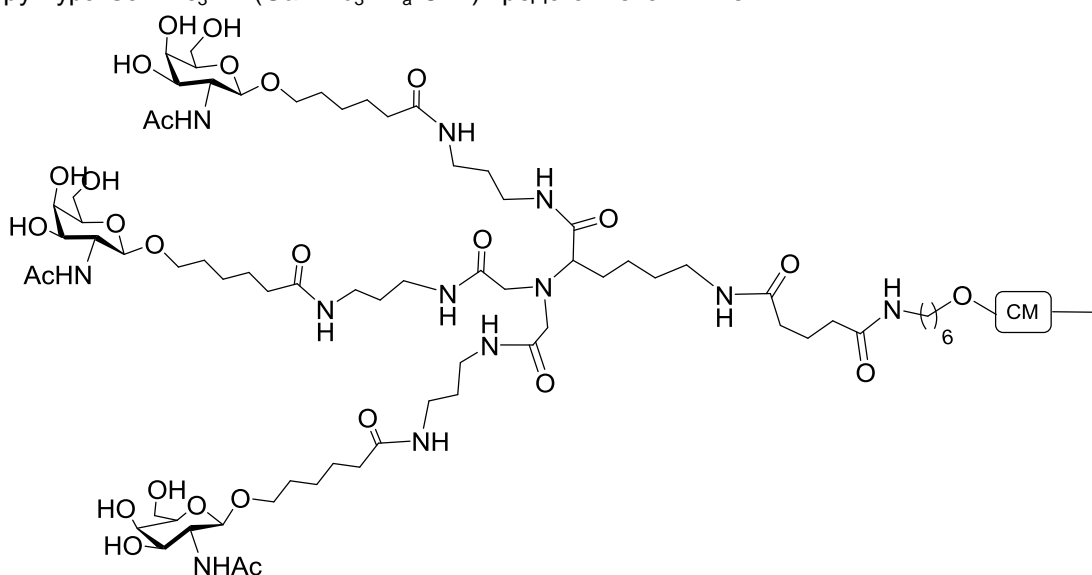




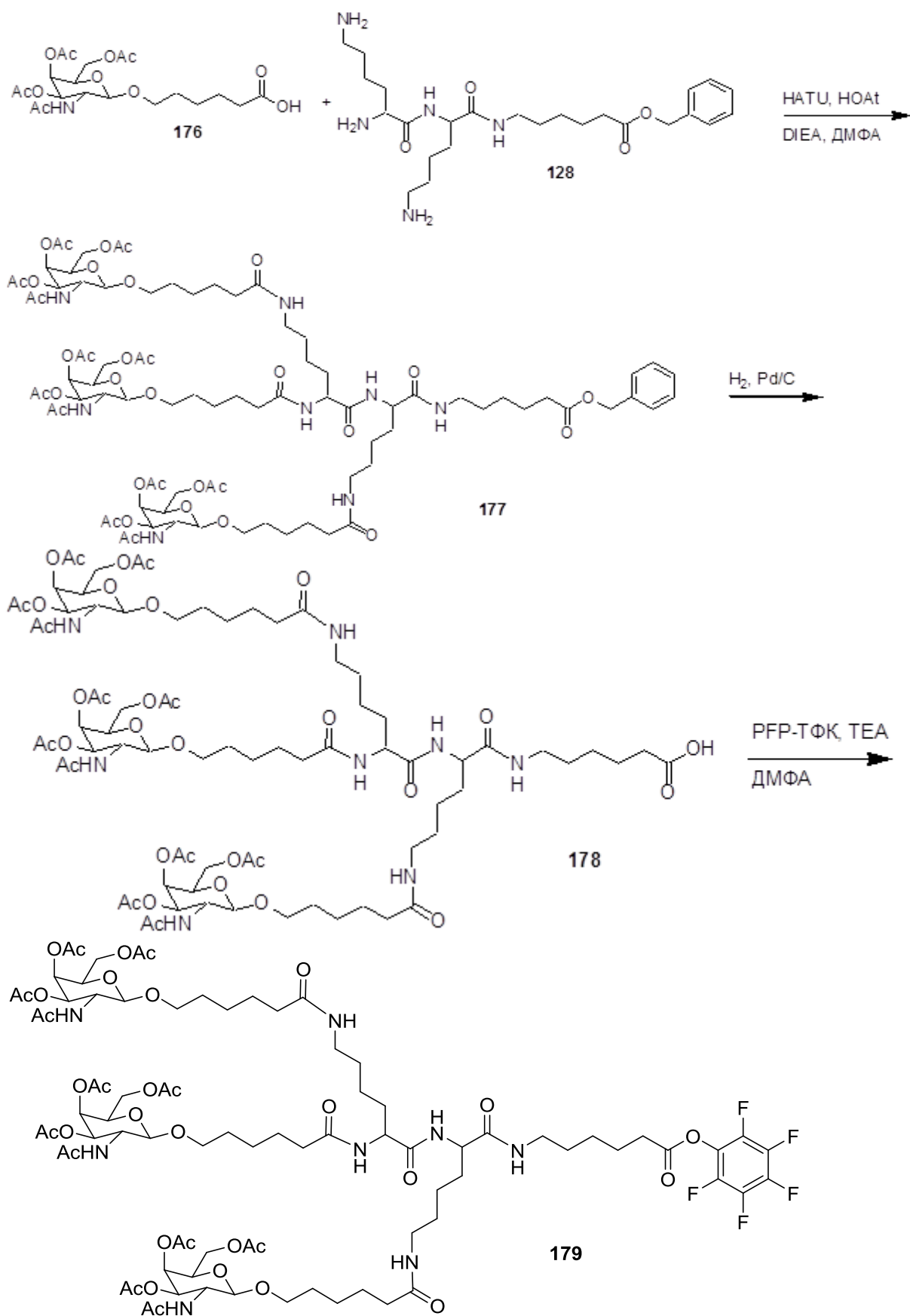
Сполука 169 є в продажу. Сполуку 172 одержали додаванням бензил(перфлуорфеніл)глутарату до сполуки 171. Бензил(перфлуорфеніл)глутарат одержали додаванням PFP-ТФК і DIEA до 5-(бензилокси)-5-оксопентанової кислоти в ДМФА. Олігомерну

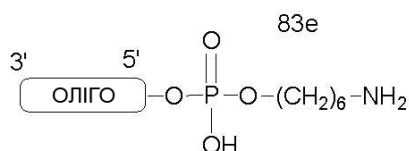
5 Сполуку 175, що містить кон'югувальну групу GalNAc₃-12, одержали із сполуки 174 за загальними способами, представленими у Прикладі 46. Кластерна частина GalNAc₃ кон'югувальної групи GalNAc₃-12 (GalNAc₃-12_a) може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом для одержання різноманітних кон'югувальних груп. У деяких

10 варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент являє собою -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-. Структура GalNAc₃-12 (GalNAc₃-12_a-CM-) представлена нижче:



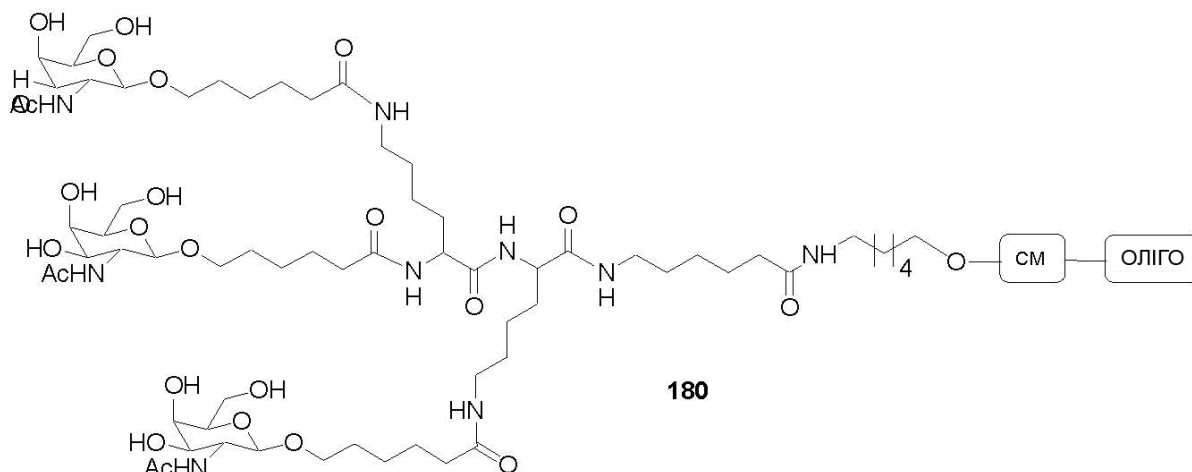
Приклад 62. Одержання олігомерної сполуки 180, що містить GalNAc₃-13



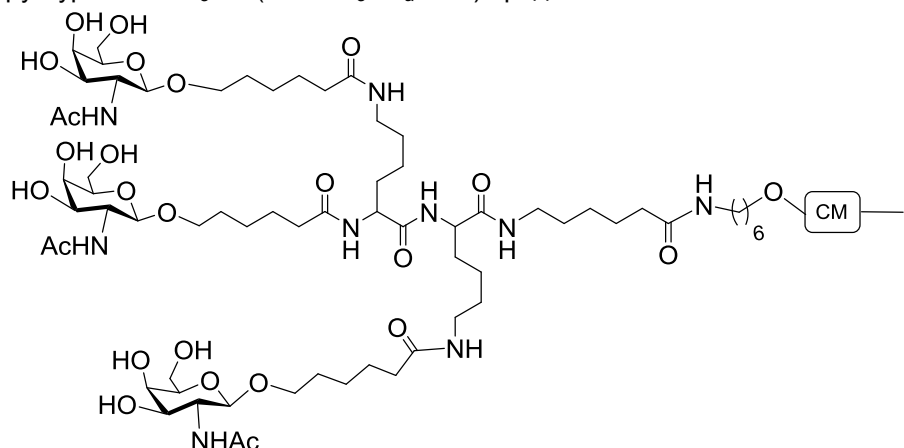


1. Боратний буфер, ДМСО, рН 8,5, кімн. т-ра

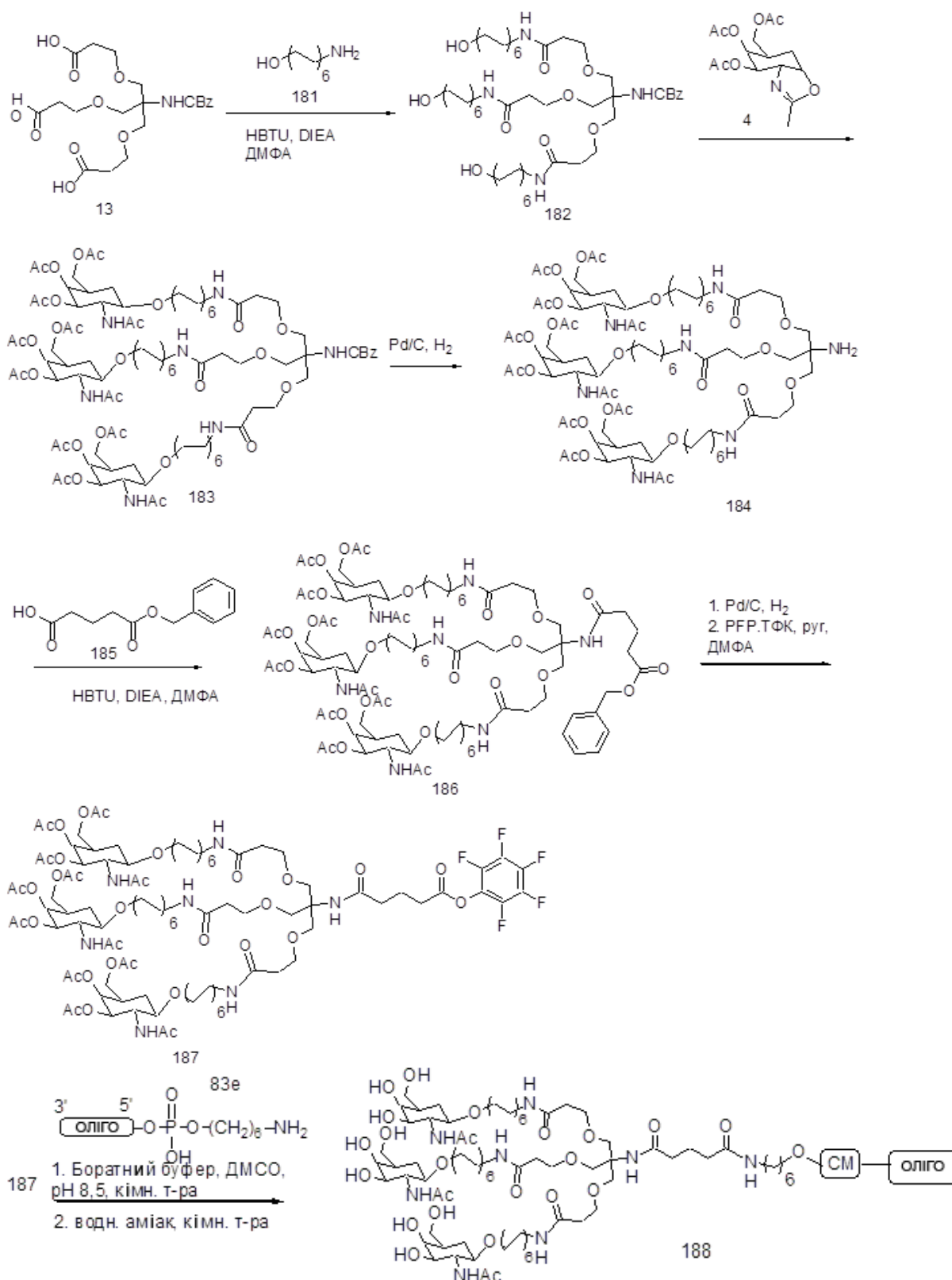
2. водн. аміак, кімн. т-ра



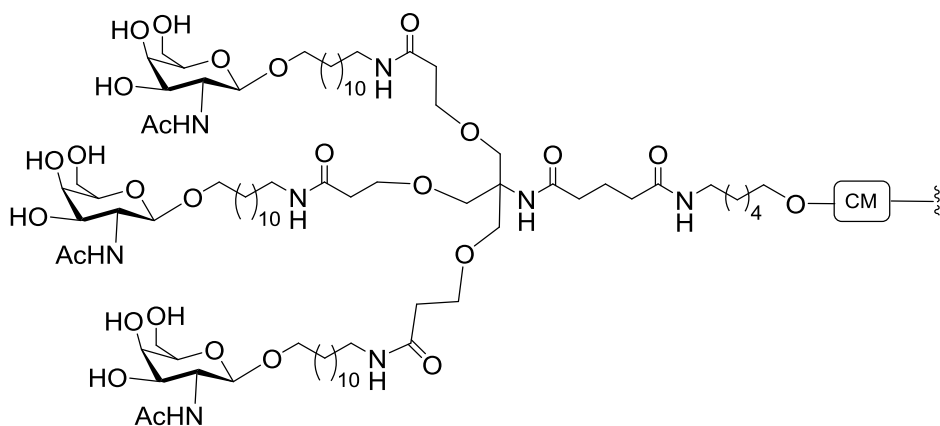
Сполуку 176 одержали за загальним способом, представленим у Прикладі 2. Олігомерну сполуку 180, що містить кон'югуювальну групу GalNAc₃-13, одержали із сполуки 177 за загальними способами, представленими у Прикладі 49. Кластерна частина GalNAc₃ кон'югуювальної групи GalNAc₃-13 (GalNAc₃-13_a) може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом для одержання різноманітних кон'югуювальних груп. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент являє собою -P(=O)(OH)-A_n-P(=O)(OH)-. Структура GalNAc₃-13 (GalNAc₃-13_a-CM-) представлена нижче:



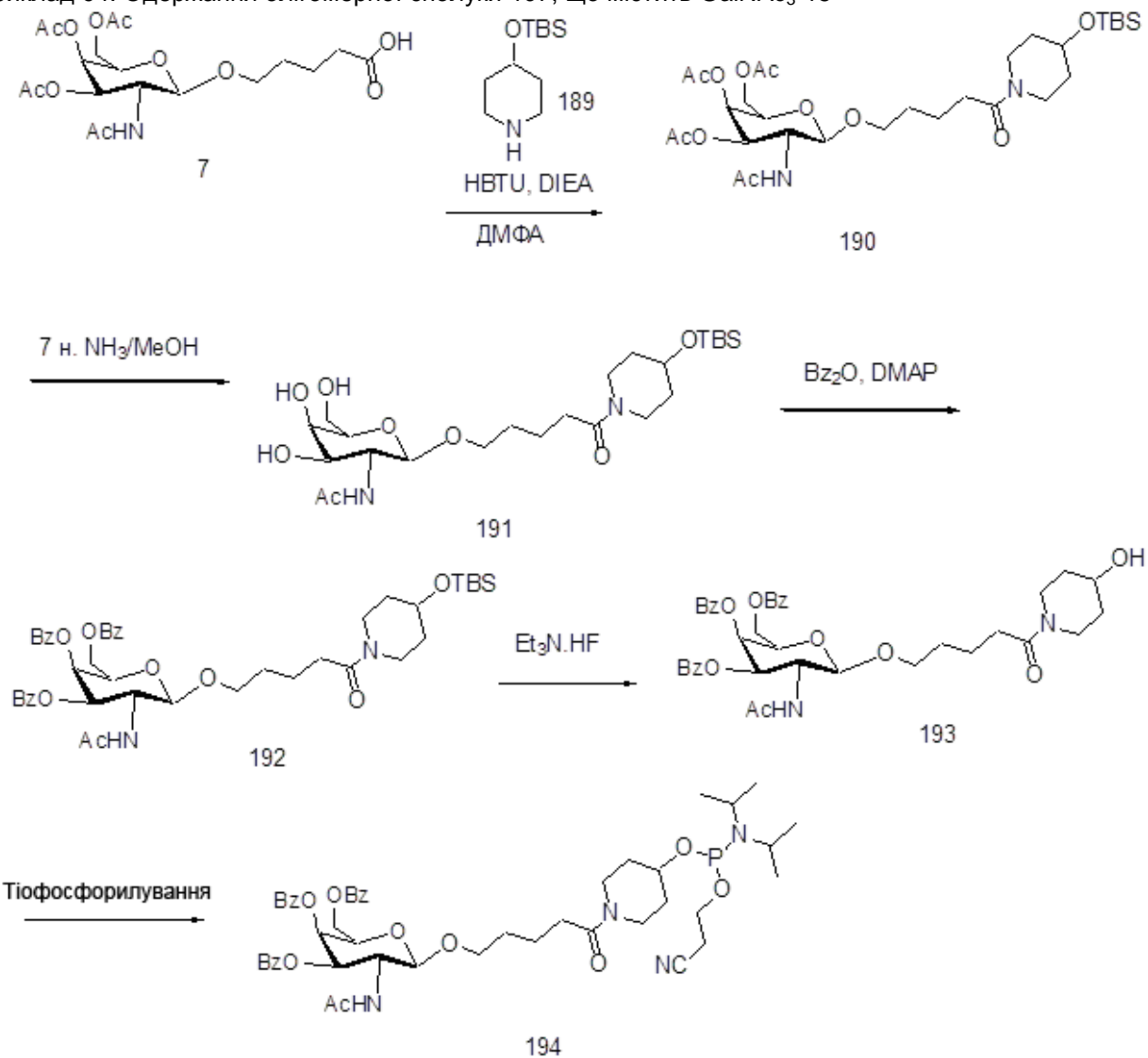
Приклад 63. Одержання олігомерної сполуки 188, що містить GalNAc₃-14

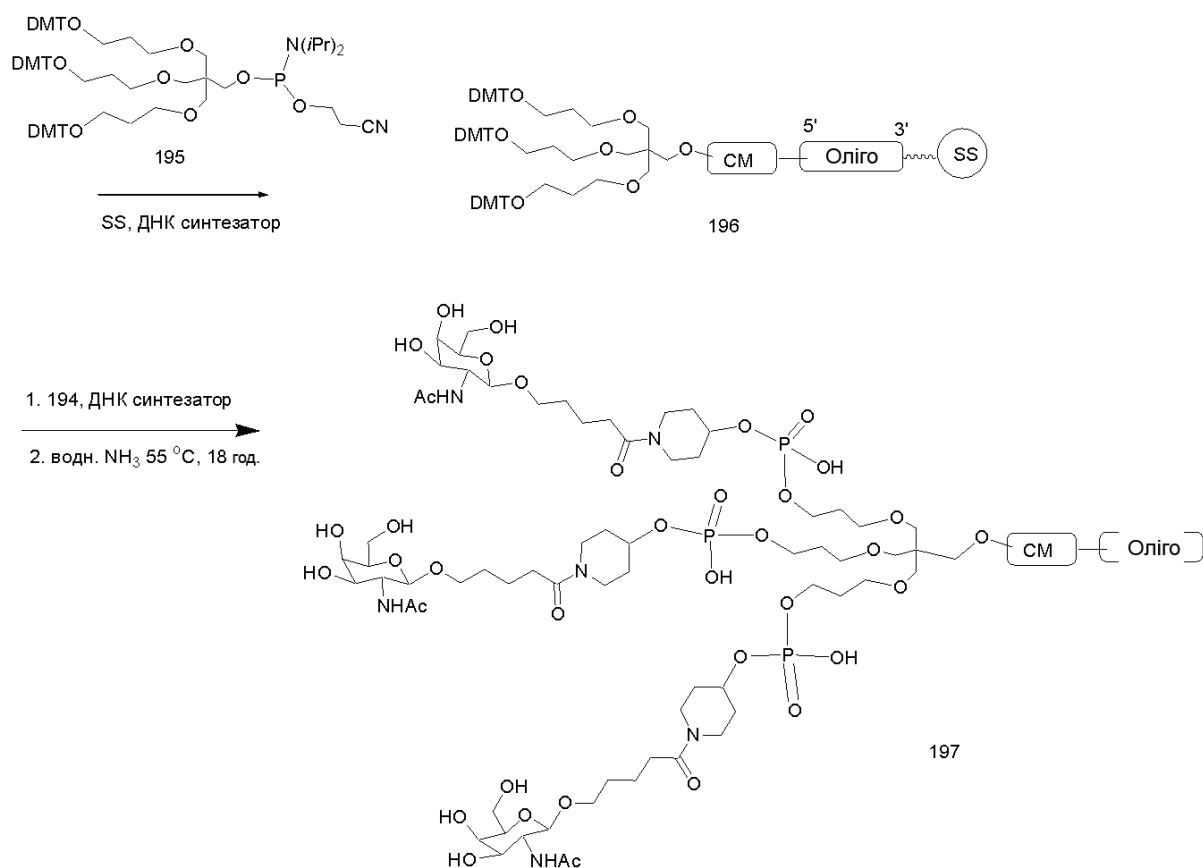


5. Сполуки 181 і 185 є в продажу. Олігомерну Сполуку 188, що містить кон'югувальну групу GalNAc₃-14, одержали із сполуки 187 за загальними способами, представленими у Прикладі 46. Кластерна частина GalNAc₃ кон'югувальної групи GalNAc₃-14 (GalNAc₃-14_a) може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом для одержання різноманітних кон'югувальних груп. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент являє собою -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-. Структура GalNAc₃-14 (GalNAc₃-14_a-CM-) представлена нижче:

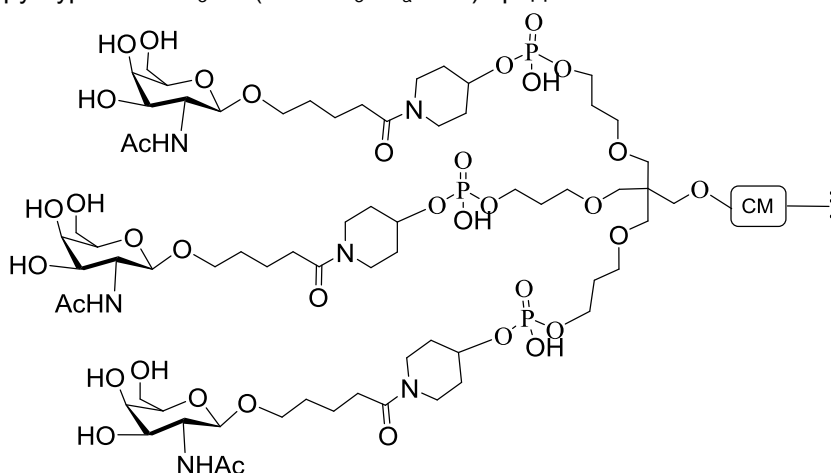


Приклад 64. Одержання олігомерної сполуки 197, що містить GalNAc₃-15





Сполука 189 є в продажу. Сполуку 195 одержали за загальним способом, представленим у Прикладі 31. Олігомерну сполуку 197, що містить кон'югуювальну групу $\text{GalNAc}_3\text{-15}$, одержали із сполук 194 і 195, застосовували стандартні способи синтезу олігонуклеотидів. Кластерна частина GalNAc_3 кон'югуювальної групи $\text{GalNAc}_3\text{-15}$ ($\text{GalNAc}_3\text{-15}_a$) може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом з одержанням різних кон'югуювальних груп. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент являє собою $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{A}_d-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-$. Структура $\text{GalNAc}_3\text{-15}$ ($\text{GalNAc}_3\text{-15}_a\text{-CM-}$) представлена нижче:



Приклад 65. Дозозалежне дослідження олігонуклеотидів, що містять 5'-кон'югуювальну групу (порівняння $\text{GalNAc}_3\text{-3}$, 12, 13, 14 і 15), націлених на SRB-1, *in vivo*. Олігонуклеотиди, наведені нижче, випробували в дозозалежному дослідженні антисмислового інгібування SRB-1 у мишей. Некон'югований ISIS 353382 включили як стандарт. Кожна з кон'югуювальних груп GalNAc_3 була приєднана до 5'-кінця відповідного олігонуклеотиду за допомогою розщеплюваного фрагмента фосфодіестер-зв'язаного 2'-дезоксиденозинового нуклеозиду.

Модифіковані ASO, націлені на SRB-1

ISIS №	Послідовність (від 5" до 3")	Кон'югат	SEQ ID NO.
353382	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	немає	28
661161	$GalNAc_3-3a-oA_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAc ₃ -3	30
671144	$GalNAc_3-12a-oA_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAc ₃ -12	30
670061	$GalNAc_3-13a-oA_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAc ₃ -13	30
671261	$GalNAc_3-14a-oA_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAc ₃ -14	30
671262	$GalNAc_3-15a-oA_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAc ₃ -15	30

Заголовні букви вказують азотисту основу для кожного нуклеозиду, а ^mC позначає 5-метилцитозин. Нижні індекси: "e" позначає 2'-МОЕ модифікований нуклеозид; "d" позначає β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "s" позначає тіофосфатний міжнуклеозидний зв'язок (PS); "o" позначає фосфодіестерний міжнуклеозидний зв'язок (PO); і "o'" позначає -O-P(=O)(OH)-. Кон'югувальні групи виділені напівжирним шрифтом.

Структура GalNAc₃-3_a показана раніше у Прикладі 39. Структура GalNAc₃-12_a показана раніше у Прикладі 61. Структура GalNAc₃-13_a показана раніше у Прикладі 62. Структура GalNAc₃-14_a показана раніше у Прикладі 63. Структура GalNAc₃-15_a показана раніше у Прикладі 64.

Лікування

Шести-восьмитижневим мишам C57b16 (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мен) один раз або двічі ввели підшкірну ін'єкцію дози, представленої нижче, сполуки ISIS 353382, 661161, 671144, 670061, 671261, 671262 або сольового розчину. Мишам, яким вводили дозу двічі, другу дозу вводили через три дні після першої дози. Кожна експериментальна група складалася із 4 тварин. Мишей умертвили через 72 години після останнього введення для визначення рівнів мРНК SRB-1 у печінці за допомогою ПЛР у реальному часі і реагенту для кількісного визначення РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) за стандартними протоколами. Результати, наведені нижче, представлені як середній відсоток рівнів мРНК SRB-1 для кожної експериментальної групи, нормалізованих до контрольного зразка, обробленого сольовим розчином.

Як показано в Табл. 42, лікування антисмисловими олігонуклеотидами знижує рівні мРНК SRB-1 дозозалежним чином. Не спостерігали значної різниці нокдауну мішені між тваринами, що одержували одну дозу, і тваринними, що одержували дві дози (див. ISIS 353382 в дозах 30 і 2 × 15 мг/кг; та ISIS 661161 в дозах 5 і 2 × 2,5 мг/кг). Антисмислові олігонуклеотидами, що містять фосфодіестер-зв'язані кон'югати GalNAc₃-3, 12, 13, 14 і 15, демонструють значне підсилення ефективності, порівняно з некон'югованим антисмисловим олігонуклеотидом (ISIS 335382).

Таблиця 42

мРНК SRB-1 (% від сольового розчину)

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% від сольового розчину)	ED ₅₀ (мг/кг)	Кон'югат
Сольовий розчин	н.д.	100,0	н.д.	н.д.
353382	3	85,0	22,4	немає
	10	69,2		
	30	34,2		
	2 × 15	36,0		
661161	0,5	87,4	2,2	GalNAc ₃ -3
	1,5	59,0		
	5	25,6		
	2 × 2,5	27,5		
	15	17,4		
671144	0,5	101,2	3,4	GalNAc ₃ -12
	1,5	76,1		
	5	32,0		
	15	17,6		
670061	0,5	94,8	2,1	GalNAc ₃ -13
	1,5	57,8		
	5	20,7		
	15	13,3		
671261	0,5	110,7	4,1	GalNAc ₃ -14
	1,5	81,9		
	5	39,8		
	15	14,1		
671262	0,5	109,4	9,8	GalNAc ₃ -15
	1,5	99,5		
	5	69,2		
	15	36,1		

Рівні трансамінази в печінці, аланін-амінотрансферази (ALT) і аспартат-амінотрансферази (AST) в сироватці вимірювали відносно мишей, ін'єктованих сольовим розчином, застосовуючи стандартні протоколи. Оцінили також загальний білірубін і нітроген сечовини в крові (НСК). Перевірили зміну маси тіла, яка істотно не відрізнялася від групи сольового розчину (дані не показані). Значення ALT, AST, загального білірубину і НСК представлені нижче у Табл. 43.

Таблиця 43

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (Од/л)	AST (Од/л)	Загальний білірубін (мг/дл)	НСК (мг/дл)	Кон'югат
Сольовий розчин	н.д.	28	60	0,1	39	н.д.
353382	3	30	77	0,2	36	Немає
	10	25	78	0,2	36	
	30	28	62	0,2	35	
	2 × 15	22	59	0,2	33	
661161	0,5	39	72	0,2	34	GalNAc ₃ -3
	1,5	26	50	0,2	33	
	5	41	80	0,2	32	
	2 × 2,5	24	72	0,2	28	
	15	32	69	0,2	36	
671144	0,5	25	39	0,2	34	GalNAc ₃ -12
	1,5	26	55	0,2	28	
	5	48	82	0,2	34	

Таблиця 43

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (Од/л)	AST (Од/л)	Загальний білірубін (мг/дл)	НСК (мг/дл)	Кон'югат
	15	23	46	0,2	32	
670061	0,5	27	53	0,2	33	GalNAc ₃ -13
	1,5	24	45	0,2	35	
	5	23	58	0,1	34	
	15	24	72	0,1	31	
671261	0,5	69	99	0,1	33	GalNAc ₃ -14
	1,5	34	62	0,1	33	
	5	43	73	0,1	32	
	15	32	53	0,2	30	
671262	0,5	24	51	0,2	29	GalNAc ₃ -15
	1,5	32	62	0,1	31	
	5	30	76	0,2	32	
	15	31	64	0,1	32	

Приклад 66. Вплив різних розщеплюваних фрагментів на антисмислове інгібування *in vivo* під дією олігонуклеотидів, націлених на SRB-1, що містять кластер 5'-GalNAc₃

- 5 Олігонуклеотиди, наведені нижче, випробували в дозозалежному дослідженні антисмислового інгібування SRB-1 у мишей. Кожна з кон'югуювальних груп GalNAc₃ була приєднана до 5'-кінця відповідного олігонуклеотиду за допомогою фосфодіестер-зв'язаного нуклеозиду (розщеплюваний фрагмент (CM)).

Таблиця 44

Модифіковані ASO, націлені на SRB-1

ISIS №	Послідовність (від 5' до 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO.
661161	GalNAc ₃ -3a-o'A _{do} G ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A _{ds} G _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	A _d	30
670699	GalNAc ₃ -3a-o'T _{do} G ^m _{es} C ^m _{eo} T ^m _{eo} T ^m _{eo} C ^m _{eo} A _{ds} G _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T _{ds} T ^m _{eo} C ^m _{eo} T ^m _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	T _d	33
670700	GalNAc ₃ -3a-o'A _{eo} G ^m _{es} C ^m _{eo} T ^m _{eo} T ^m _{eo} C ^m _{eo} A _{ds} G _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T _{ds} T ^m _{eo} C ^m _{eo} T ^m _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	A _e	30
670701	GalNAc ₃ -3a-o'T _{eo} G ^m _{es} C ^m _{eo} T ^m _{eo} T ^m _{eo} C ^m _{eo} A _{ds} G _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T _{ds} T ^m _{eo} C ^m _{eo} T ^m _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	T _e	33
671165	GalNAc ₃ -13a-o'A _{do} G ^m _{es} C ^m _{eo} T ^m _{eo} T ^m _{eo} C ^m _{eo} A _{ds} G _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T _{ds} T ^m _{eo} C ^m _{eo} T ^m _{es} T _e	GalNAc ₃ -13a	A _d	30

- 10 Заголовні букви вказують азотисту основу для кожного нуклеозиду, а ^mC позначає 5-метилцитозин. Нижні індекси: "e" позначає 2'-МОЕ модифікований нуклеозид; "d" позначає β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "s" позначає тіофосфатний міжнуклеозидний зв'язок (PS); "o" позначає фосфодіестерний міжнуклеозидний зв'язок (PO); і "o'" позначає -O-P(=O)(OH)-. Кон'югуювальні групи виділені напівжирним шрифтом.

- 15 Структура GalNAc₃-3a показана раніше у Прикладі 39. Структура GalNAc₃-13a показана раніше у Прикладі 62.

Лікування

- Шести-восьмитижневим мишам C57bl6 (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мен) ввели одноразову підшкірну ін'єкцію дози, представленої нижче, сполуки ISIS 661161, 670699, 670700, 670701, 671165 або сольового розчину. Кожна експериментальна група складалася із 4 тварин.
- 20 Мишей умертвили через 72 години після останнього введення для визначення рівнів мРНК

SRB-1 у печінці за допомогою ПЛР у реальному часі і реагенту для кількісного визначення РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) за стандартними протоколами. Результати, наведені нижче, представлені як середній відсоток рівнів мРНК SRB-1 для кожної експериментальної групи, нормалізованих до контрольного зразка, обробленого сольовим розчином.

5

Як показано в Табл. 45, лікування антисмисловими олігонуклеотидами знижує рівні мРНК SRB-1 дозозалежним чином. Всі антисмислові олігонуклеотиди, що містять різні розщеплювані фрагменти, демонструють однакову ефективність.

Таблиця 45

мРНК SRB-1 (% від сольового розчину)

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% від сольового розчину)	Кластер GalNAc ₃	СМ
Сольовий розчин	н.д.	100,0	н.д.	н.д.
661161	0,5	87,8	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1,5	61,3		
	5	33,8		
	15	14,0		
670699	0,5	89,4	GalNAc ₃ -3a	T _d
	1,5	59,4		
	5	31,3		
	15	17,1		
670700	0,5	79,0	GalNAc ₃ -3a	A _e
	1,5	63,3		
	5	32,8		
	15	17,9		
670701	0,5	79,1	GalNAc ₃ -3a	T _e
	1,5	59,2		
	5	35,8		
	15	17,7		
671165	0,5	76,4	GalNAc ₃ -13a	A _d
	1,5	43,2		
	5	22,6		
	15	10,0		

10

Рівні трансамінази в печінці, аланін-аміотрансферази (ALT) і аспартат-аміотрансферази (AST) в сироватці вимірювали відносно мишей, ін'єктованих сольовим розчином, застосовуючи стандартні протоколи. Оцінили також загальний білірубін і нітроген сечовини в крові (НСК). Перевірили зміну маси тіла, яка істотно не відрізнялася від групи сольового розчину (дані не показані). Значення ALT, AST, загального білірубину і НСК представлені нижче у Табл. 46.

15

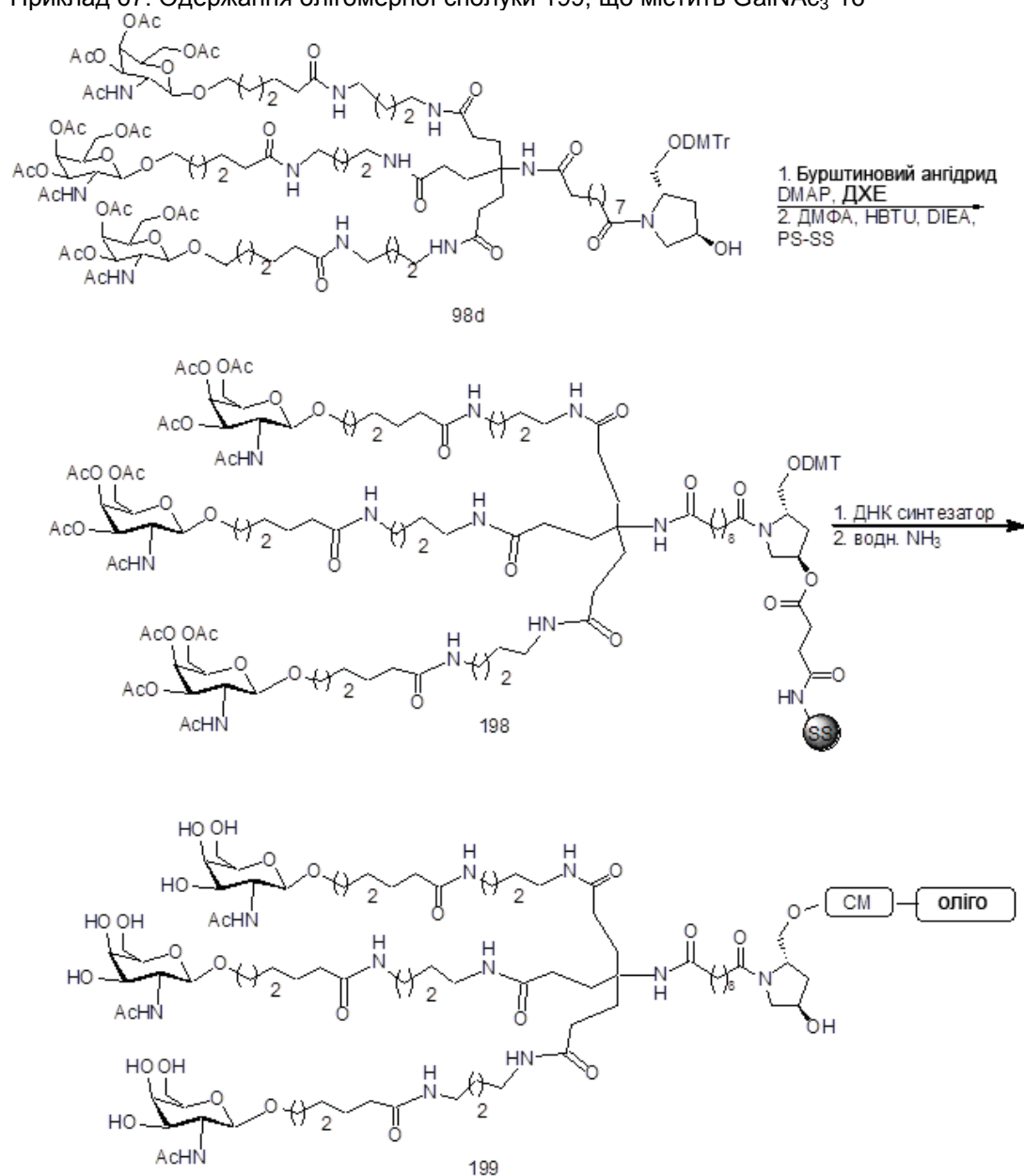
Таблиця 46

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (Од/л)	AST (Од/л)	Загальний білірубін (мг/дл)	НСК (мг/дл)	Кластер GalNAc ₃	СМ
Сольовий розчин	н.д.	24	64	0,2	31	н.д.	н.д.
661161	0,5	25	64	0,2	31	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1,5	24	50	0,2	32		
	5	26	55	0,2	28		
	15	27	52	0,2	31		
670699	0,5	42	83	0,2	31	GalNAc ₃ -3a	T _d
	1,5	33	58	0,2	32		
	5	26	70	0,2	29		
	15	25	67	0,2	29		

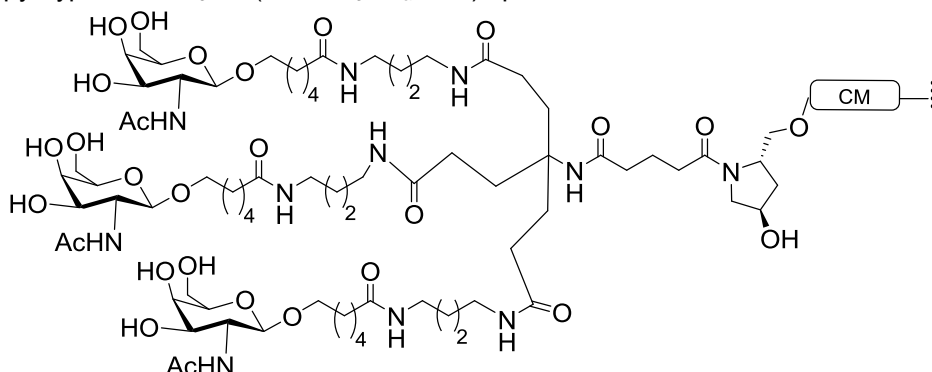
Таблиця 46

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (Од/л)	AST (Од/л)	Загальний білірубін (мг/дл)	НСК (мг/дл)	Кластер GalNAc ₃	CM
670700	0,5	40	74	0,2	27	GalNAc ₃ -3a	A _e
	1,5	23	62	0,2	27		
	5	24	49	0,2	29		
	15	25	87	0,1	25		
670701	0,5	30	77	0,2	27	GalNAc ₃ -3a	T _e
	1,5	22	55	0,2	30		
	5	81	101	0,2	25		
	15	31	82	0,2	24		
671165	0,5	44	84	0,2	26	GalNAc ₃ -13a	A _d
	1,5	47	71	0,1	24		
	5	33	91	0,2	26		
	15	33	56	0,2	29		

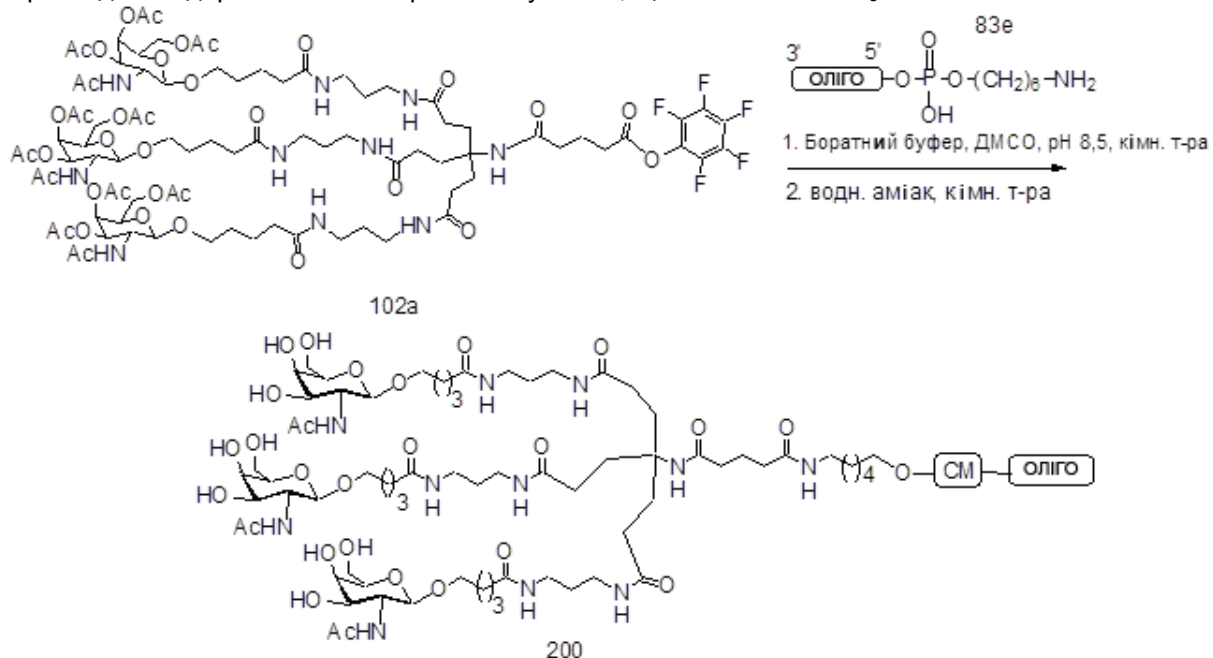
Приклад 67. Одержання олігомерної сполуки 199, що містить GalNAc₃-16



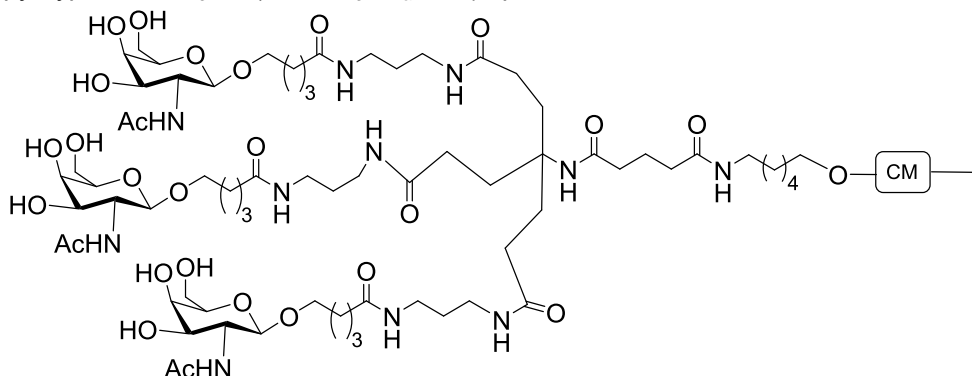
- Олігомерну сполуку 199, що містить кон'югуювальну групу GalNAc₃-16, одержали за загальними способами, представленими у Прикладах 7 і 9. Кластерна частина GalNAc₃ кон'югуювальної групи GalNAc₃-16 (GalNAc₃-16_a) може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом для одержання різноманітних кон'югуювальних груп. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент являє собою -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-.
- 5 . Структура GalNAc₃-16 (GalNAc₃-16_a-CM-) представлена нижче:



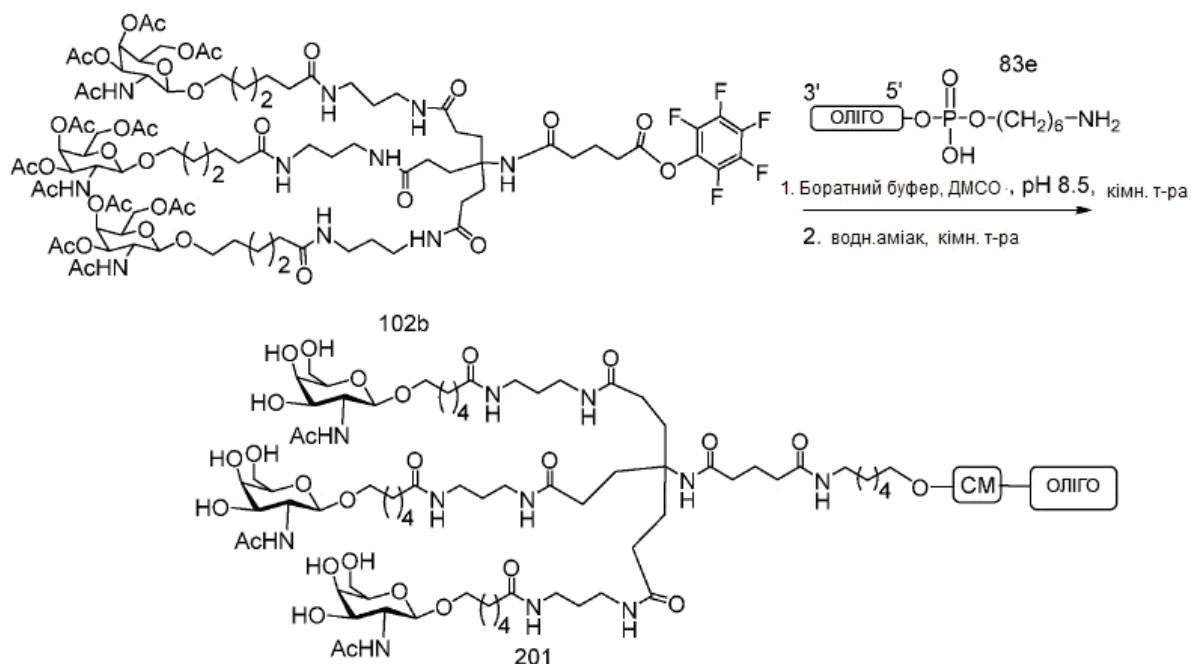
Приклад 68. Одержання олігомерної сполуки 200, що містить GalNAc₃-17



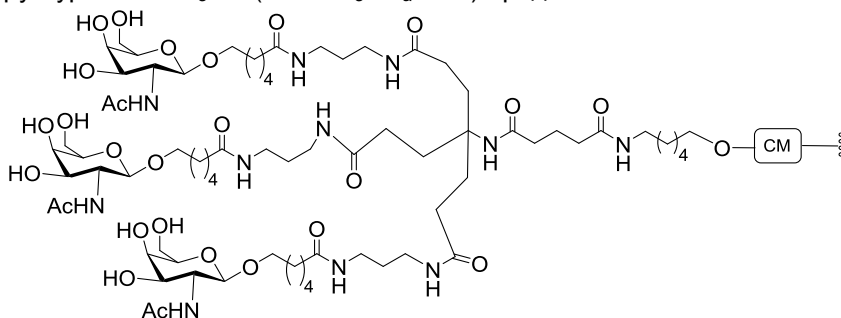
- Олігомерну сполуку 200, що містить кон'югуювальну групу GalNAc₃-17, одержали за загальними способами, представленими у Прикладі 46. Кластерна частина GalNAc₃ кон'югуювальної групи GalNAc₃-17 (GalNAc₃-17_a) може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом для одержання різноманітних кон'югуювальних груп. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент являє собою -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-.
- 15 . Структура GalNAc₃-17 (GalNAc₃-17_a-CM-) представлена нижче:



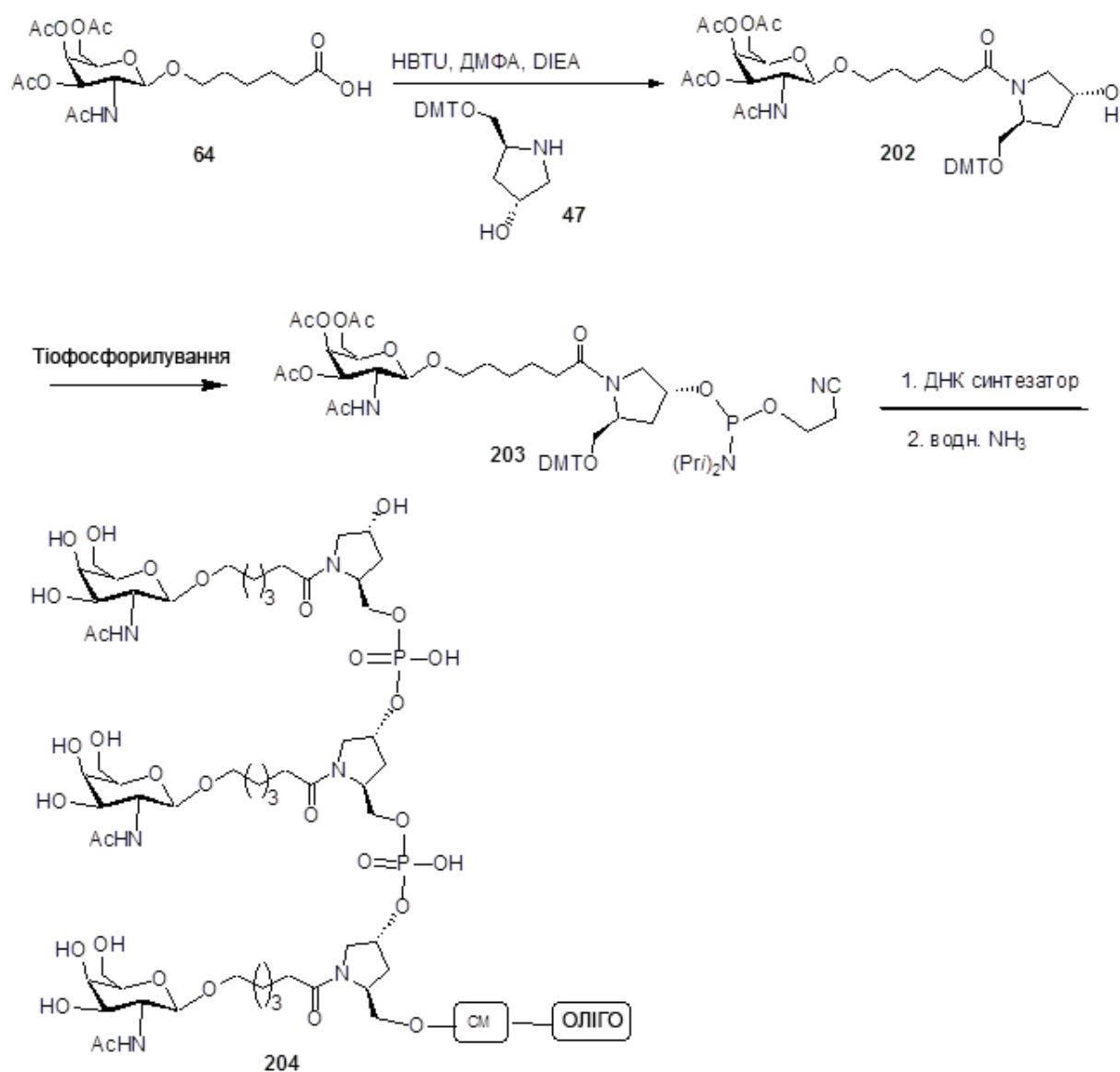
Приклад 69. Одержання олігомерної сполуки 201, що містить GalNAc₃-18



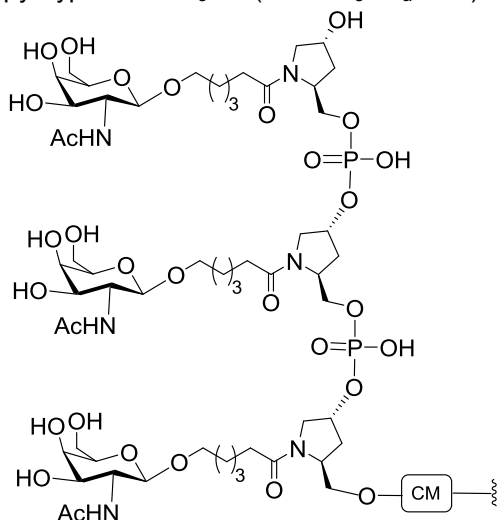
- Олігомерну сполуку 201, що містить кон'югуювальну групу GalNAc₃-18, одержали за загальними способами, представленими у Прикладі 46. Кластерна частина GalNAc₃ кон'югуювальної групи GalNAc₃-18 (GalNAc₃-18_a) може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом для одержання різноманітних кон'югуювальних груп. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент являє собою -P(=O)(OH)-A_n-P(=O)(OH)-. Структура GalNAc₃-18 (GalNAc₃-18_a-CM-) представлена нижче:

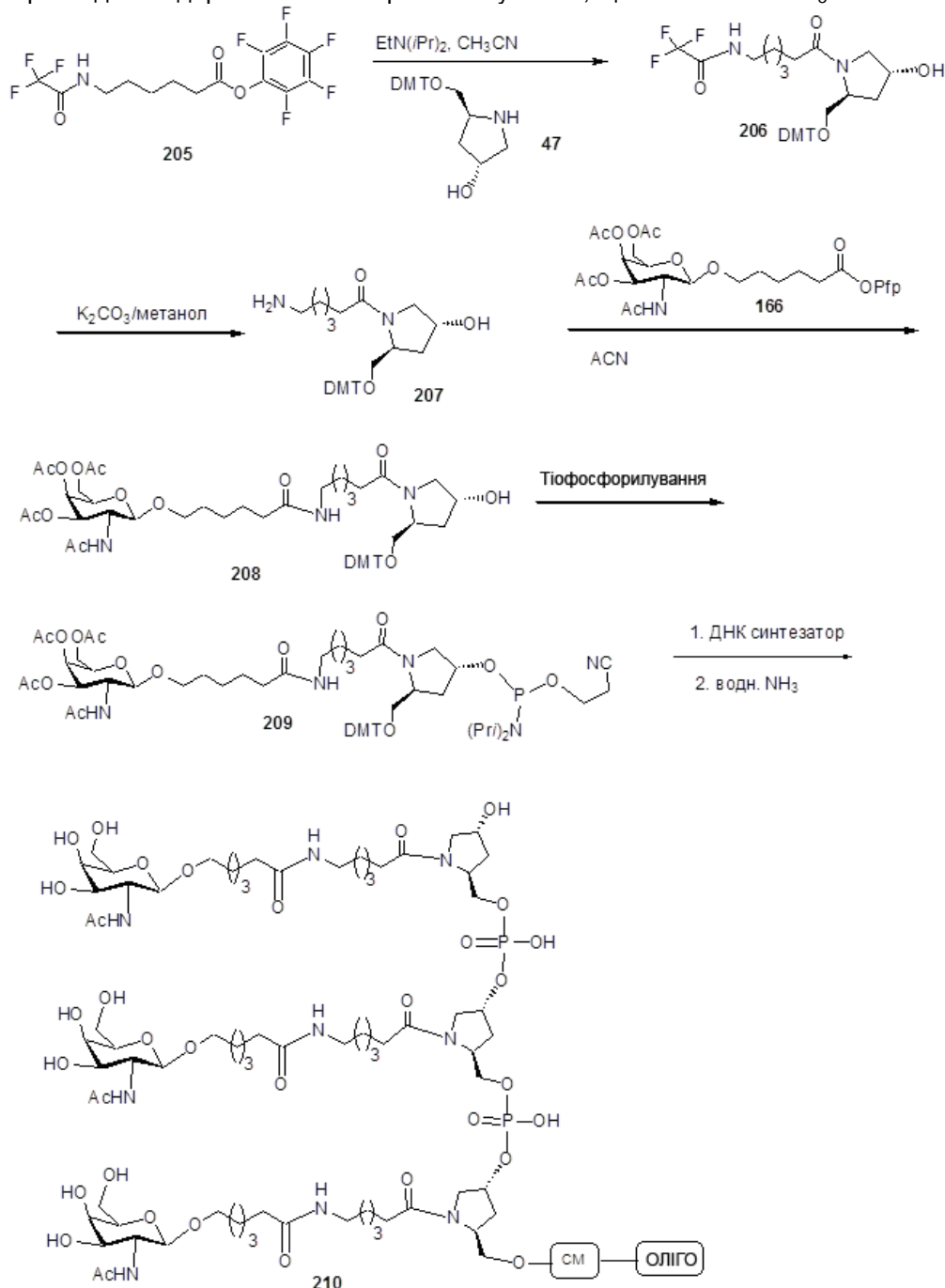


Приклад 70. Одержання олігомерної сполуки 204, що містить GalNAc₃-19



- 5 Олігомерну Сполуку 204, що містить кон'югуювальну групу GalNAc₃-19, одержали із сполуки 64 за загальними способами, представленими у Прикладі 52. Кластерна частина GalNAc₃ кон'югуювальної групи GalNAc₃-19 (GalNAc₃-19_a) може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом для одержання різноманітних кон'югуювальних груп. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент являє собою -P(=O)(OH)-A_n-P(=O)(OH)-. Структура GalNAc₃-19 (GalNAc₃-19_a-CM-) представлена нижче:

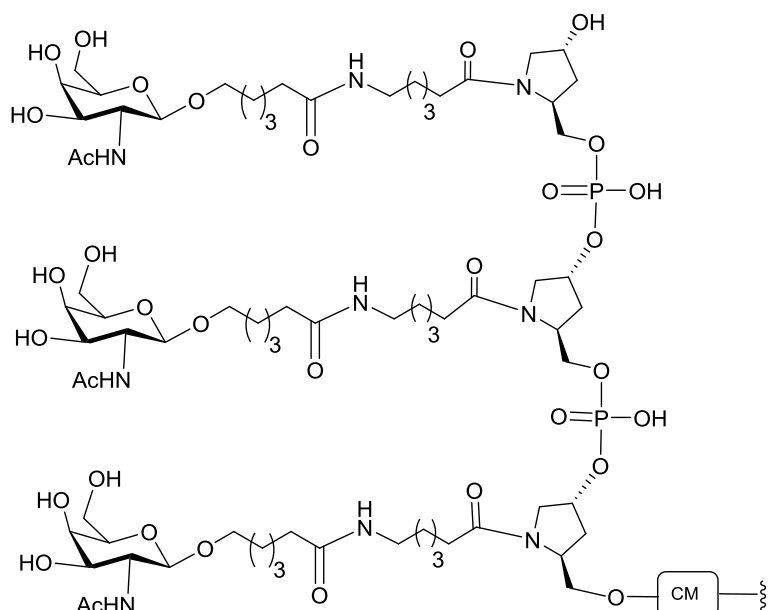


Приклад 71. Одержання олігомерної сполуки 210, що містить GalNAc₃-20

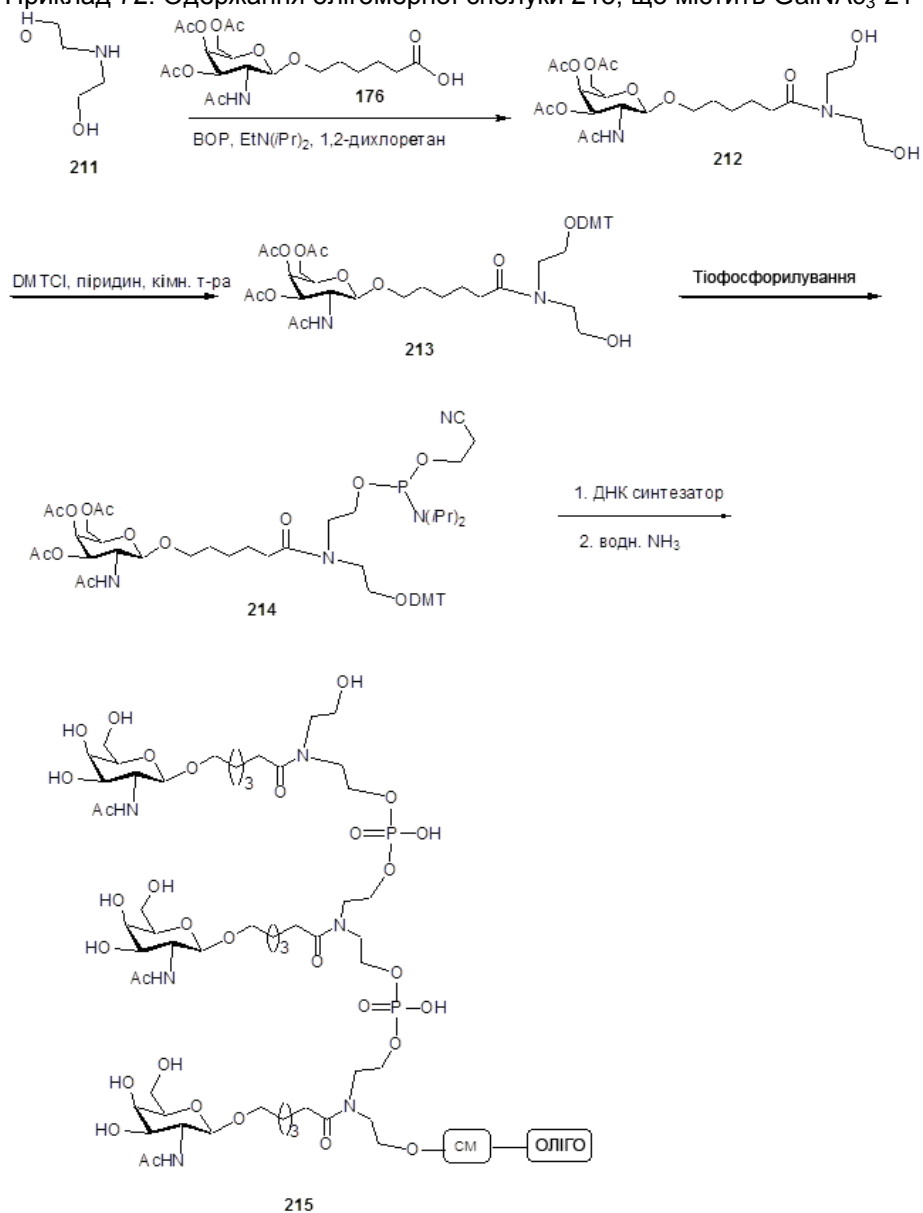
Сполуку 205 одержали додаванням PFP-ТФК і DIEA до 6-(2,2,2-трифлуороцетамідо)гексанової кислоти в ацетонітрилі, яку одержали додаванням

5 трифлуороцетового ангідриду до 6-аміногексанової кислоти. Реакційну суміш нагріли до 80 °С, потім охолодили до кімнатної температури. Олігомерну Сполуку 210, що містить кон'югувальну групу GalNAc₃-20, одержали із сполуки 208 загальними способами, представленими у Прикладі 52. Кластерна частина GalNAc₃ кон'югувальної групи GalNAc₃-20 (GalNAc₃-20_a) може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом для одержання різноманітних

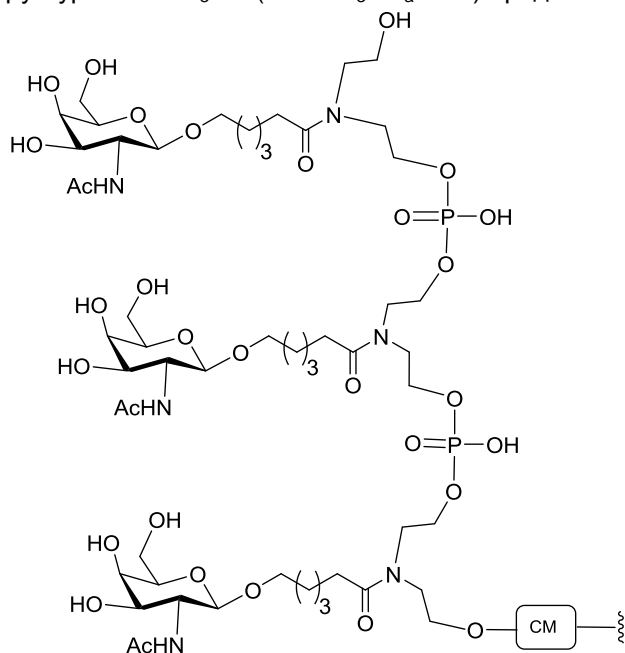
10 кон'югувальних груп. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент являє собою -P(=O)(OH)-A_n-P(=O)(OH)-. Структура GalNAc₃-20 (GalNAc₃-20_a-CM-) представлена нижче:



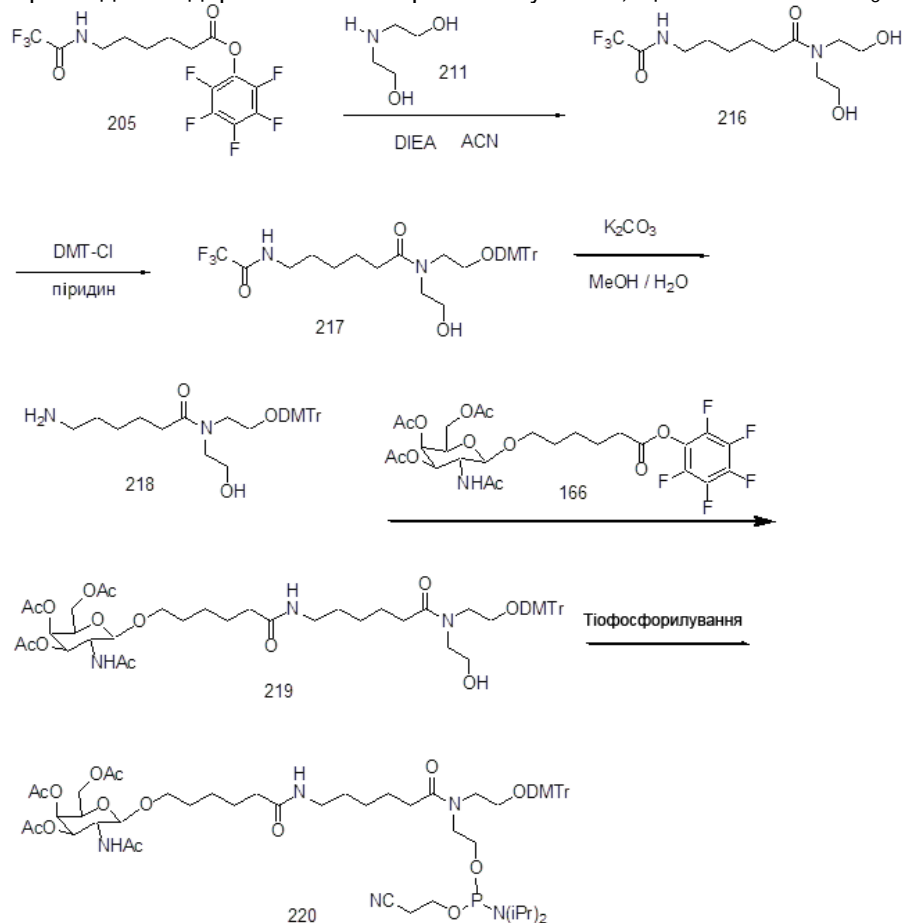
Приклад 72. Одержання олігомерної сполуки 215, що містить GalNAc₃-21

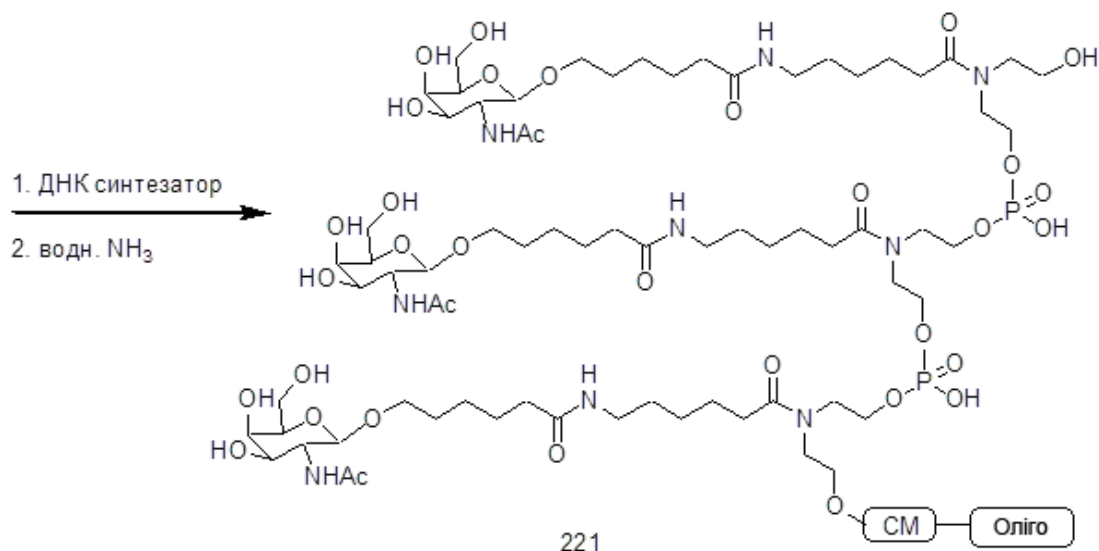


- Сполука 211 є в продажу. Олігомерну Сполуку 215, що містить кон'югвальну групу GalNAc₃-21, одержали із сполуки 213 загальними способами, представленими у Прикладі 52. Кластерна частина GalNAc₃ кон'югальної групи GalNAc₃-21 (GalNAc₃-21_a) може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом для одержання різноманітних кон'югувальних груп. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент являє собою -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-. Структура GalNAc₃-21 (GalNAc₃-21_a-CM-) представлена нижче:

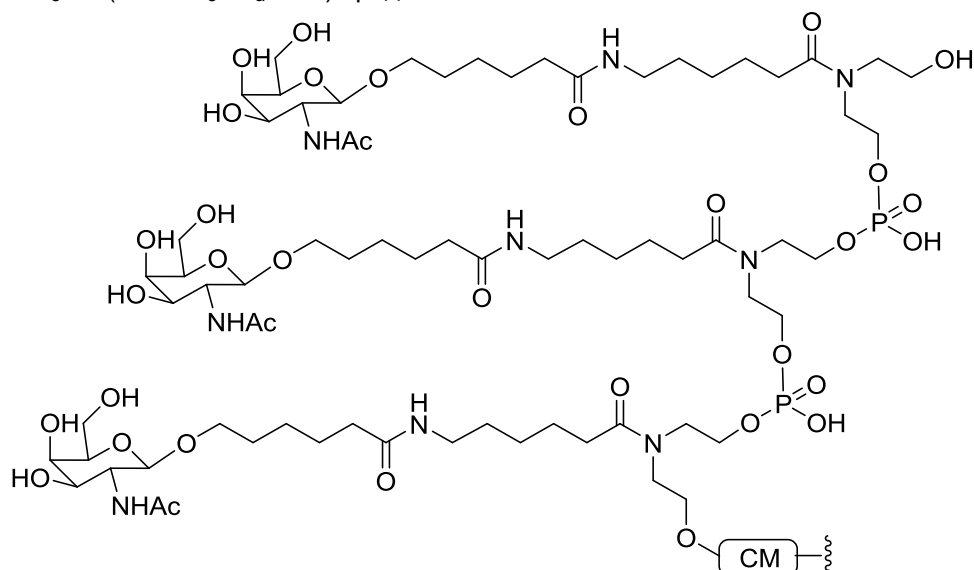


Приклад 73. Одержання олігомерної сполуки 221, що містить GalNAc₃-22





- Сполуку 220 одержали із сполуки 219, застосувавши тетразолід діізопропіламонію. Олігомерну сполуку 221, що містить кон'югальну групу GalNAc₃-21, одержали із сполуки 220 загальним способом, представленим у Прикладі 52. Кластерна частина GalNAc₃ кон'югальної групи GalNAc₃-22 (GalNAc₃-22_a) може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом для одержання різноманітних кон'югальних груп. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент являє собою -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-. Структура GalNAc₃-22 (GalNAc₃-22_a-CM-) представлена нижче:



- Приклад 74. Вплив різних розщеплюваних фрагментів на антисмислове інгібування in vivo під дією олігонуклеотидів, націлених на SRB-1, що містять кон'югат 5'-GalNAc₃. Олігонуклеотиди, наведені нижче, випробували в дозозалежному дослідженні антисмислового інгібування SRB-1 у мишей. Кожна з кон'югальних груп GalNAc₃ була приєднана до 5'-кінця відповідного олігонуклеотиду.

Таблиця 47

Модифіковані ASO, націлені на SRB-1

ISIS №	Послідовність (від 5' до 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO.
353382	G ^{es} _{es} C ^m _{es} T ^{es} _{es} T ^m _{es} C ^{es} _{es} A ^{ds} _{ds} G ^{ds} _{ds} T ^{ds} _{ds} C ^{ds} _{ds} A ^{ds} _{ds} T ^{ds} _{ds} G ^{ds} _{ds} A ^{ds} _{ds} C ^{ds} _{ds} T ^{ds} _{ds} T ^{es} _{es} mC ^{es} _{es} mC ^{es} _{es} T ^{es} _{es} T ^e _e	н.д.	н.д.	28
661161	GalNAc ₃ -3 _a -o ^o -A ^{do} _{do} G ^{es} _{es} C ^m _{es} T ^{es} _{es} T ^m _{es} C ^{es} _{es} A ^{ds} _{ds} G ^{ds} _{ds} T ^{ds} _{ds} C ^{ds} _{ds} A ^{ds} _{ds} T ^{ds} _{ds} G ^{ds} _{ds} A ^{ds} _{ds} C ^{ds} _{ds} T ^{ds} _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^{es} _{es} T ^e _e	GalNAc ₃ -3a	A _d	30

Таблиця 47

Модифіковані ASO, націлені на SRB-1

ISIS №	Послідовність (від 5' до 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO.
666904	GalNAc ₃ -3 _a -o'G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	GalNAc ₃ -3a	PO	28
675441	GalNAc ₃ -17 _a -o'A ^m _{do} G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	GalNAc ₃ -17a	A _d	30
675442	GalNAc ₃ -18 _a -o'A ^m _{do} G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	GalNAc ₃ -18a	A _d	30

У всіх таблицях заголовні букви вказують азотисту основу для кожного нуклеозиду, а ^mC позначає 5-метилцитозин. Нижні індекси: "e" позначає 2'-МОЕ модифікований нуклеозид; "d" позначає β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "s" позначає тіофосфатний міжнуклеозидний зв'язок (PS); "o" позначає фосфодіестерний міжнуклеозидний зв'язок (PO); і "o'" позначає -O-P(=O)(OH)-. Кон'югвальні групи виділені напівжирним шрифтом.

Структура GalNAc₃-3_a показана раніше у Прикладі 39. Структура GalNAc₃-17_a показана раніше у Прикладі 68, а структура GalNAc₃-18_a показана раніше у Прикладі 69.

Лікування

Шести-восьмитижневим мишам C57BL/6 (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мен) ввели одноразову підшкірну ін'єкцію дози, представленої нижче, олігонуклеотиду, наведеного в Табл. 47, або сольового розчину. Кожна експериментальна група складалася із 4 тварин. Мишей умертвили через 72 години після останнього введення для визначення рівнів мРНК SRB-1 у печінці за допомогою ПЛР у реальному часі і реагенту для кількісного визначення РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) за стандартними протоколами. Результати, наведені нижче, представлені як середній відсоток рівнів мРНК SRB-1 для кожної експериментальної групи, нормалізованих до контрольного зразка, обробленого сольовим розчином.

Як показано в Табл. 48, лікування антисмисловими олігонуклеотидами знижує рівні мРНК SRB-1 дозозалежним чином. Антисмислові олігонуклеотиди, що містять кон'югат GalNAc, демонструють однакову ефективність і є значно ефективнішими, ніж початковий олігонуклеотид, що не має кон'югату GalNAc.

Таблиця 48

мРНК SRB-1 (% від сольового розчину)

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% від сольового розчину)	Кластер GalNAc ₃	CM
Сольовий розчин	н.д.	100,0	н.д.	н.д.
353382	3	79,38	н.д.	н.д.
	10	68,67		
	30	40,70		
661161	0,5	79,18	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1,5	75,96		
	5	30,53		
	15	12,52		
666904	0,5	91,30	GalNAc ₃ -3a	PO
	1,5	57,88		
	5	21,22		
	15	16,49		
675441	0,5	76,71	GalNAc ₃ -17a	A _d
	1,5	63,63		
	5	29,57		
	15	13,49		

Таблица 48

мРНК SRB-1 (% від сольового розчину)

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% від сольового розчину)	Кластер GalNAc ₃	СМ
675442	0,5	95,03	GalNAc ₃ -18a	A _d
	1,5	60,06		
	5	31,04		
	15	19,40		

- 5 Рівні трансамінази в печінці, аланін-амінотрансферази (ALT) і аспартат-амінотрансферази (AST) в сироватці вимірювали відносно мишей, ін'єктованих сольовим розчином, застосовуючи стандартні протоколи. Оцінили також загальний білірубін і нітроген сечовини в крові (НСК). Перевірили зміну маси тіла, яка істотно не відрізнялася від групи сольового розчину (дані не показані). Значення ALT, AST, загального білірубину і НСК представлені нижче у Табл. 49.

Таблица 49

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (Од/л)	AST (Од/л)	Загальний білірубін (мг/дл)	НСК (мг/дл)	Кластер GalNAc ₃	СМ
Сольовий розчин	н.д.	26	59	0,16	42	н.д.	н.д.
353382	3	23	58	0,18	39	н.д.	н.д.
	10	28	58	0,16	43		
	30	20	48	0,12	34		
661161	0,5	30	47	0,13	35	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1,5	23	53	0,14	37		
	5	26	48	0,15	39		
	15	32	57	0,15	42		
666904	0,5	24	73	0,13	36	GalNAc ₃ -3a	PO
	1,5	21	48	0,12	32		
	5	19	49	0,14	33		
	15	20	52	0,15	26		
675441	0,5	42	148	0,21	36	GalNAc ₃ -17a	A _d
	1,5	60	95	0,16	34		
	5	27	75	0,14	37		
	15	24	61	0,14	36		
675442	0,5	26	65	0,15	37	GalNAc ₃ -18a	A _d
	1,5	25	64	0,15	43		
	5	27	69	0,15	37		
	15	30	84	0,14	37		

- 10 Приклад 75. Фармакокінетичний аналіз олігонуклеотидів, що містять 5'-кон'югуювальну групу ФК ASO, представлених вище у Табл. 41, 44 і 47, оцінили із застосуванням зразків печінки, які одержали після виконання способів лікування, описаних у Прикладах 65, 66 і 74. Зразки печінки подрібнили і екстрагували за стандартними протоколами, і аналізували за допомогою ІП-ВЕРХ-МС разом з внутрішнім стандартом. Сумарний рівень (мкг/г) всіх метаболітів у тканині
- 15 виміряли інтеграцією відповідних УФ піків, а рівні в тканині ASO повної довжини, що не містять кон'югату ("початковий", в даному випадку Isis № 353382), виміряли із застосуванням відповідних іон-екстракційних хроматограм (EIC).

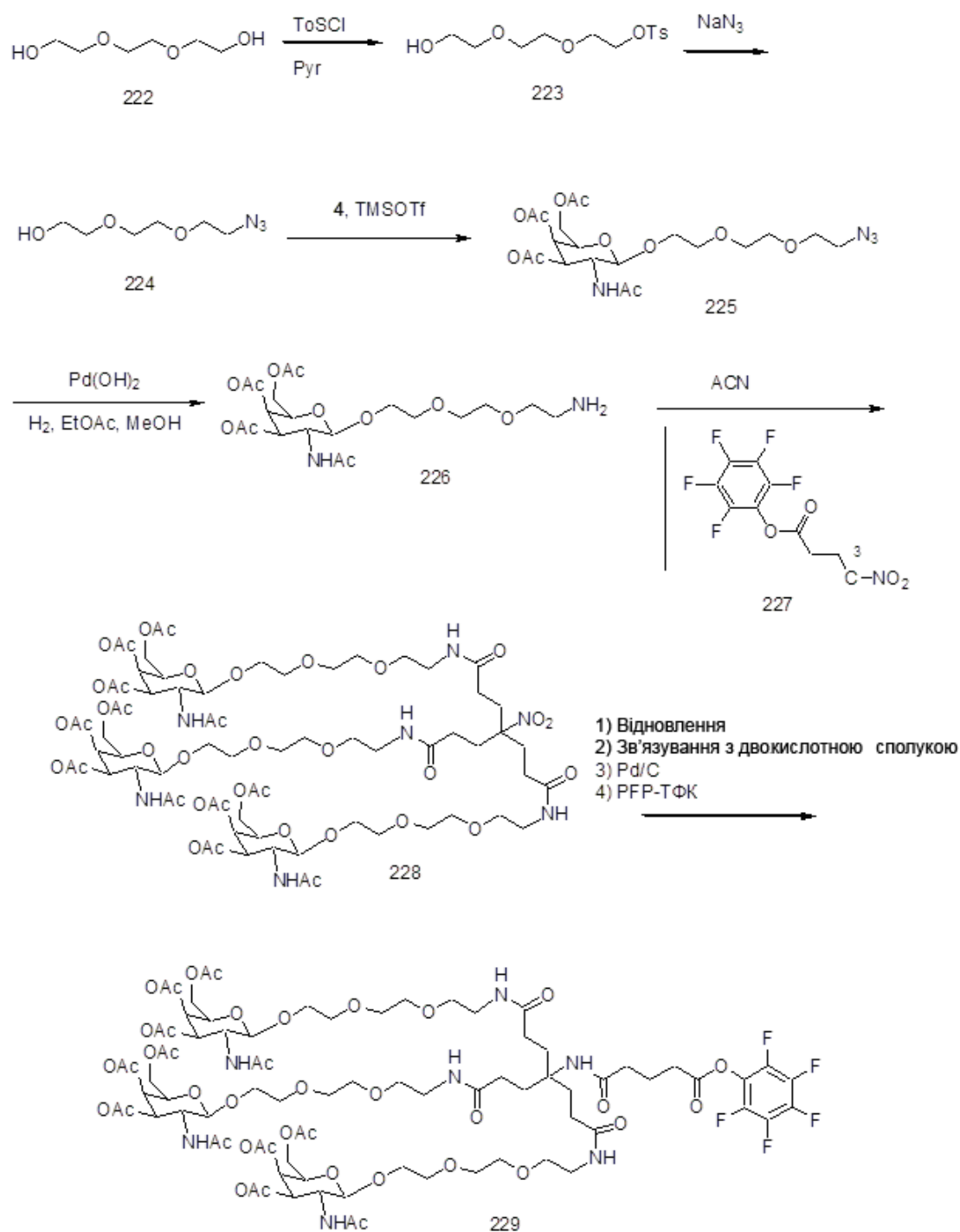
Таблиця 50

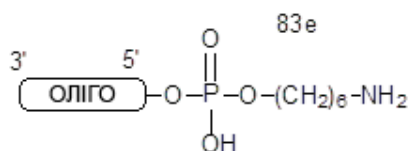
ФК аналіз в печінці

ISIS №	Доза (мг/кг)	Загальний рівень в печінці за УФ (мкг/г)	Рівень початкового ASO в печінці за EIC (мкг/г)	Кластер GalNAc ₃	CM
353382	3	8,9	8,6	н.д.	н.д.
	10	22,4	21,0		
	30	54,2	44,2		
661161	5	32,4	20,7	GalNAc ₃ -3a	A _d
	15	63,2	44,1		
671144	5	20,5	19,2	GalNAc ₃ -12a	A _d
	15	48,6	41,5		
670061	5	31,6	28,0	GalNAc ₃ -13a	A _d
	15	67,6	55,5		
671261	5	19,8	16,8	GalNAc ₃ -14a	A _d
	15	64,7	49,1		
671262	5	18,5	7,4	GalNAc ₃ -15a	A _d
	15	52,3	24,2		
670699	5	16,4	10,4	GalNAc ₃ -3a	T _d
	15	31,5	22,5		
670700	5	19,3	10,9	GalNAc ₃ -3a	A _e
	15	38,1	20,0		
670701	5	21,8	8,8	GalNAc ₃ -3a	T _e
	15	35,2	16,1		
671165	5	27,1	26,5	GalNAc ₃ -13a	A _d
	15	48,3	44,3		
666904	5	30,8	24,0	GalNAc ₃ -3a	PO
	15	52,6	37,6		
675441	5	25,4	19,0	GalNAc ₃ -17a	A _d
	15	54,2	42,1		
675442	5	22,2	20,7	GalNAc ₃ -18a	A _d
	15	39,6	29,0		

Результати, представлені вище у Табл. 50, демонструють, що спостерігали вищі рівні в печінці олігонуклеотидів, що містять кон'югувальну групу GalNAc₃, ніж початкового олігонуклеотиду, що не містить кон'югувальну групу GalNAc₃ (ISIS 353382) через 72 години після введення олігонуклеотиду, особливо з урахуванням введення різних доз для олігонуклеотидів з групою кон'югату GalNAc₃ і без неї. Крім того, через 72 годин 40-98 % кожного олігонуклеотиду, що містить кон'югувальну групу GalNAc₃, було метаболізовано до початкової сполуки, що вказує на те, що кон'югувальні групи GalNAc₃ розщеплюються у вказаних олігонуклеотидах.

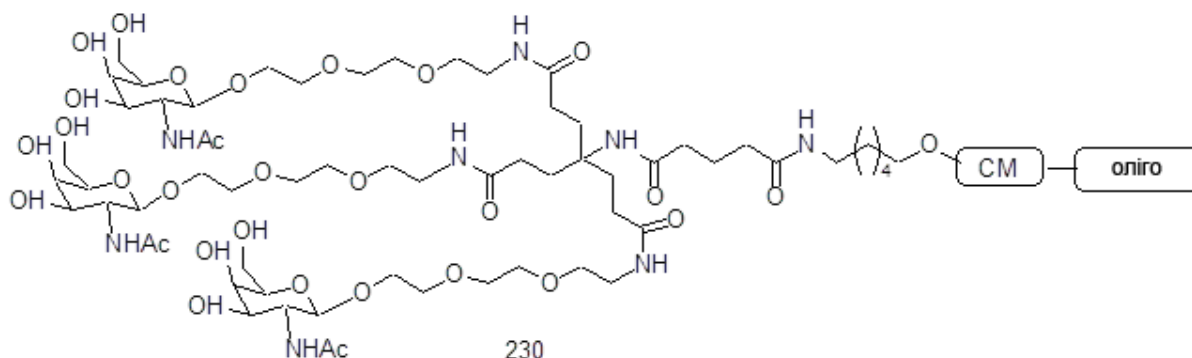
Приклад 76. Отримання олігомерної сполуки 230, що містить GalNAc₃-23





1. Боратний буфер, ДМСО, рН 8,5, кімн. т-ра

2. водн. аміак, кімн. т-ра

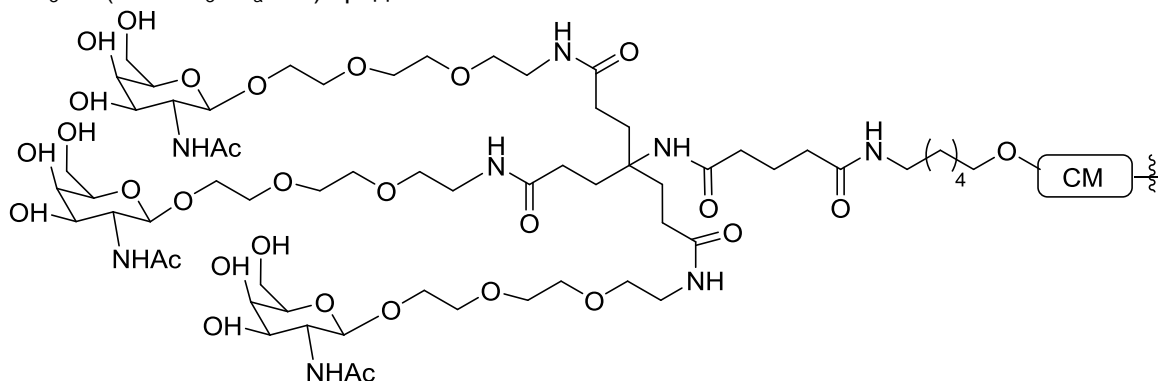


Сполука 222 є в продажу. 44,48 мл (0,33 моль) сполуки 222 обробляли тозилхлоридом (25,39 г, 0,13 моль) в піридині (500 мл) протягом 16 годин. Потім реакційну суміш випарували до маслянистої речовини, розчинили в EtOAc і промили водою, насиченим розчином NaHCO₃, насиченим сольовим розчином і висушили над Na₂SO₄. Етилацетат концентрували до сухого стану і очистили колонковою хроматографією, елюювали EtOAc в гексанах (1:1), потім 10 % метанолу в CH₂Cl₂ з одержанням сполуки 223 у вигляді безбарвної маслянистої речовини. Дані РХМС і ЯМР узгоджувалися із вказаною структурою. 10 г (32,86 ммоль) 1-тозилтриетилєнєгліколь (сполука 223) обробляли азидом натрію (10,68 г, 164,28 ммоль) в ДМСО (100 мл) при кімнатній температурі протягом 17 годин. Потім реакційну суміш вилили у воду і екстрагували EtOAc. Органічний шар тричі промили водою і висушили над Na₂SO₄. Органічний шар концентрували до сухого стану з одержанням 5,3 г сполуки 224 (92 %). Дані РХМС і ЯМР узгоджувалися із вказаною структурою. 1-Азидотриетилєнєгліколь (сполука 224, 5,53 г, 23,69 ммоль) і сполуку 4 (6 г, 18,22 ммоль) обробили 4A молекулярними ситами (5 г) і TMSOTf (1,65 мл, 9,11 ммоль) в дихлорметані (100 мл) в інертній атмосфері. Через 14 годин реакційну суміш відфільтрували для видалення сит, а органічний шар промили насиченим розчином NaHCO₃, водою, насиченим сольовим розчином і висушили над Na₂SO₄. Органічний шар концентрували до сухого стану і очистили колонковою хроматографією, елюючи з градієнтом від 2 до 4 % метанолу в дихлорметані з одержанням сполуки 225. Дані РХМС і ЯМР узгоджувалися із структурою. Сполуку 225 (11,9 г, 23,59 ммоль) гідрогенізували в EtOAc/метанолі (4:1, 250 мл) на каталізаторі Перлмана. Через 8 годин каталізатор видалили фільтрацією, а розчинники видалили до сухого стану з одержанням сполуки 226. Дані РХМС і ЯМР узгоджувалися із структурою.

Для одержання сполуки 227 розчин нітروметантриспропіонової кислоти (4,17 г, 15,04 ммоль) і основи Хюніга (10,3 мл, 60,17 ммоль) в ДМФА (100 мл) по краплях обробили пентафлуортрифлуорацетатом (9,05 мл, 52,65 ммоль). Через 30 хвилин реакційну суміш вилили в льодяну воду і екстрагували EtOAc. Органічний шар промили водою, насиченим сольовим розчином і висушили над Na₂SO₄. Органічний шар концентрували до сухого стану, і далі перекристалізували з гептану з одержанням сполуки 227 у вигляді білої твердої речовини. Дані РХМС і ЯМР узгоджувалися із вказаною структурою. Сполуку 227 (1,5 г, 1,93 ммоль) і сполуку 226 (3,7 г, 7,74 ммоль) перемішували при кімнатній температурі в ацетонітрилі (15 мл) протягом 2 годин. Потім реакційну суміш випарували до сухого стану і очистили колонковою хроматографією, елюючи з градієнтом від 2 до 10 % метанолу в дихлорметані, з одержанням сполуки 228. Дані РХМС і ЯМР узгоджувалися із структурою. Сполуку 228 (1,7 г, 1,02 ммоль) обробили нікелем Ренею (близько 2 г, вологий) в етанолі (100 мл) в атмосфері водню. Через 12 годин каталізатор видалили фільтрацією, а органічний шар випарували до твердої речовини, яку застосували безпосередньо на наступній стадії. Дані РХМС і ЯМР узгоджувалися із вказаною структурою. Цю тверду речовину (0,87 г, 0,53 ммоль) обробили бензилглутаровою кислотою (0,18 г, 0,8 ммоль), HBTU (0,3 г, 0,8 ммоль) і DIEA (273,7 мкл, 1,6 ммоль) в ДМФА (5

мл). Через 16 годин ДМФА видалили при зниженому тиску при 65 °С з одержанням маслянистої речовини, і цю маслянисту речовину розчинили в дихлорметані. Органічний шар промили насиченим розчином NaHCO_3 , насиченим сольовим розчином і висушили над Na_2SO_4 . Після випаровування органічного шару сполуку очистили колонковою хроматографією, елюючи з градієнтом від 2 до 20 % метанолу в дихлорметані з одержанням зв'язаного продукту. Дані РХМС і ЯМР узгоджувалися із вказаною структурою. З бензилового естеру зняли захист на каталізаторі Перлмана в атмосфері водню протягом 1 години. Потім каталізатор видалили фільтрацією, а розчинники видалили до сухого стану з одержанням кислоти. Дані РХМС і ЯМР узгоджувалися із вказаною структурою. Цю кислоту (486 мг, 0,27 ммоль) розчинили в сухому ДМФА (3 мл). Додали піридин (53,61 мкл, 0,66 ммоль) і продули реакційну суміш аргонем. До реакційної суміші поволи додали пентафлуортрифлуорацетат (46,39 мкл, 0,4 ммоль). Колір реакційної суміші змінився з блідо-жовтого на винний, і з'явився легкий димок, який випарувався з потоком аргону. Реакційну суміш залишили перемішуватися при кімнатній температурі на одну годину (завершення реакції підтвердили методом РХМС). Розчинник видалили при зниженому тиску (ротаційний випарник) при 70 °С. Залишок розбавили ДХМ і промили 1 н NaHSO_4 , насиченим сольовим розчином, насиченим розчином бікарбонату натрію і знову насиченим сольовим розчином. Органічний шар висушили над Na_2SO_4 , відфільтрували і концентрували до сухого стану з одержанням 225 мг сполуку 229 у вигляді крихкої жовтої піни. Дані РХМС і ЯМР узгоджувалися із вказаною структурою.

Олігомерну Сполуку 230, що містить кон'югвальну групу $\text{GalNAc}_3\text{-23}$, одержали із сполуки 229 загальними способами, представленими у Прикладі 46. Кластерна частина GalNAc_3 кон'югальної групи $\text{GalNAc}_3\text{-23}$ ($\text{GalNAc}_3\text{-23}_a$) може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом для одержання різноманітних кон'югвальних груп. Структура $\text{GalNAc}_3\text{-23}$ ($\text{GalNAc}_3\text{-23}_a\text{-CM}$) представлена нижче:



Приклад 77. Антисмислове інгібування *in vivo* під дією олігонуклеотидів, націлених на SRB-1, що містять кон'югат GalNAc_3

Олігонуклеотиди, наведені нижче, випробували в дозозалежному дослідженні антисмислового інгібування SRB-1 у мишей.

Таблиця 51

Модифіковані ASO, націлені на SRB-1

ISIS №	Послідовність (від 5' до 3')	Кластер GalNAc_3	CM	SEQ ID NO.
661161	$\text{GalNAc}_3\text{-3}_a\text{'-o'-A}_{do}\text{G}_{es}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_{es}^m\text{C}_{es}\text{A}_{ds}\text{G}_{ds}\text{T}_{ds}^m\text{C}_{ds}\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}$ $\text{G}_{ds}\text{A}_{ds}^m\text{C}_{ds}\text{T}_{ds}\text{T}_{es}^m\text{C}_{es}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_{e}$	$\text{GalNAc}_3\text{-3}_a$	A_d	30
666904	$\text{GalNAc}_3\text{-3}_a\text{'-o'-G}_{es}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_{es}^m\text{C}_{es}\text{A}_{ds}\text{G}_{ds}\text{T}_{ds}^m\text{C}_{ds}\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}$ $\text{G}_{ds}\text{A}_{ds}^m\text{C}_{ds}\text{T}_{ds}\text{T}_{es}^m\text{C}_{es}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_{e}$	$\text{GalNAc}_3\text{-3}_a$	PO	28
673502	$\text{GalNAc}_3\text{-10}_a\text{'-o'-A}_{do}\text{G}_{es}^m\text{C}_{eo}\text{T}_{eo}\text{T}_{eo}^m\text{C}_{eo}\text{A}_{ds}\text{G}_{ds}\text{T}_{ds}^m\text{C}_{ds}\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}$ $\text{G}_{ds}\text{A}_{ds}^m\text{C}_{ds}\text{T}_{ds}\text{T}_{eo}^m\text{C}_{eo}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_{e}$	$\text{GalNAc}_3\text{-10}_a$	A_d	30
677844	$\text{GalNAc}_3\text{-9}_a\text{'-o'-A}_{do}\text{G}_{es}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_{es}^m\text{C}_{es}\text{A}_{ds}\text{G}_{ds}\text{T}_{ds}^m\text{C}_{ds}\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}$ $\text{G}_{ds}\text{A}_{ds}^m\text{C}_{ds}\text{T}_{ds}\text{T}_{es}^m\text{C}_{es}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_{e}$	$\text{GalNAc}_3\text{-9}_a$	A_d	30
677843	$\text{GalNAc}_3\text{-23}_a\text{'-o'-A}_{do}\text{G}_{es}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_{es}^m\text{C}_{es}\text{A}_{ds}\text{G}_{ds}\text{T}_{ds}^m\text{C}_{ds}\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}$ $\text{G}_{ds}\text{A}_{ds}^m\text{C}_{ds}\text{T}_{ds}\text{T}_{es}^m\text{C}_{es}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_{e}$	$\text{GalNAc}_3\text{-23}_a$	A_d	30
655861	$\text{G}_{es}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_{es}^m\text{C}_{es}\text{A}_{ds}\text{G}_{ds}\text{T}_{ds}^m\text{C}_{ds}\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}\text{G}_{ds}\text{A}_{ds}^m\text{C}_{ds}\text{T}_{ds}\text{T}_{es}^m\text{C}_{es}$ $^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_{eo}\text{A}_{do}\text{'-GalNAc}_3\text{-1}_a$	$\text{GalNAc}_3\text{-1}_a$	A_d	29

Модифіковані ASO, націлені на SRB-1

ISIS №	Послідовність (від 5' до 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO.
677841	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}$ $m C_{es} T_{es} T_{eo} A_{do}' - GalNAc_3 - 19_a$	GalNAc ₃ -19a	A _d	29
677842	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds}$ $G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es} m C_{es} T_{es} T_{eo} A_{do}' - GalNAc_3 - 20_a$	GalNAc ₃ -20a	A _d	29

Структура GalNAc₃-1_a показана раніше у Прикладі 9, GalNAc₃-3_a показана у Прикладі 39, GalNAc₃-9_a показана у Прикладі 52, GalNAc₃-10_a показана у Прикладі 46, GalNAc₃-19_a показана у Прикладі 70, GalNAc₃-20_a показана у Прикладі 71, і GalNAc₃-23_a показана у Прикладі 76.

5 Лікування

Шести-восьмитижневим мишам C57BL/6 (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мен) ввели одноразову підшкірну ін'єкцію дози, представленої нижче, олігонуклеотиду, наведеного в Табл. 51, або сольового розчину. Кожна експериментальна група складалася із 4 тварин. Мишей умертвили через 72 години після останнього введення для визначення рівнів мРНК SRB-1 у печінці за допомогою ПЛР у реальному часі і реагенту для кількісного визначення РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) за стандартними протоколами. Результати, наведені нижче, представлені як середній відсоток рівнів мРНК SRB-1 для кожної експериментальної групи, нормалізованих до контрольного зразка, обробленого сольовим розчином.

15 Як показано в Табл. 52, лікування антисмисловими олігонуклеотидами знижує рівні мРНК SRB-1 дозозалежним чином.

Таблиця 52

мРНК SRB-1 (% від сольового розчину)

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% від сольового розчину)	Кластер GalNAc ₃	CM
Сольовий розчин	н.д.	100,0	н.д.	н.д.
661161	0,5	89,18	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1,5	77,02		
	5	29,10		
	15	12,64		
666904	0,5	93,11	GalNAc ₃ -3a	PO
	1,5	55,85		
	5	21,29		
	15	13,43		
673502	0,5	77,75	GalNAc ₃ -10a	A _d
	1,5	41,05		
	5	19,27		
	15	14,41		
677844	0,5	87,65	GalNAc ₃ -9a	A _d
	1,5	93,04		
	5	40,77		
	15	16,95		
677843	0,5	102,28	GalNAc ₃ -23a	A _d
	1,5	70,51		
	5	30,68		
	15	13,26		
655861	0,5	79,72	GalNAc ₃ -1a	A _d
	1,5	55,48		
	5	26,99		
	15	17,58		

Таблиця 52

мРНК SRB-1 (% від сольового розчину)

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% від сольового розчину)	Кластер GalNAc ₃	CM
677841	0,5	67,43	GalNAc ₃ -19a	A _d
	1,5	45,13		
	5	27,02		
	15	12,41		
677842	0,5	64,13	GalNAc ₃ -20a	A _d
	1,5	53,56		
	5	20,47		
	15	10,23		

5 Виміряли також рівні трансамінази в печінці, аланін-амінотрансферази (ALT) і аспартат-амінотрансферази (AST) в сироватці, застосовуючи стандартні протоколи. Оцінили також загальний білірубін і нітроген сечовини в крові (HCK). Перевірили зміну маси тіла, яка істотно не відрізнялася від групи сольового розчину (дані не показані). Значення ALT, AST, загального білірубину і HCK представлені нижче у Табл. 53.

Таблиця 53

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (Од/л)	AST (Од/л)	Загальний білірубін (мг/дл)	HCK (мг/дл)	Кластер GalNAc ₃	CM
Сольовий розчин	н.д.	21	45	0,13	34	н.д.	н.д.
661161	0,5	28	51	0,14	39	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1,5	23	42	0,13	39		
	5	22	59	0,13	37		
	15	21	56	0,15	35		
666904	0,5	24	56	0,14	37	GalNAc ₃ -3a	PO
	1,5	26	68	0,15	35		
	5	23	77	0,14	34		
	15	24	60	0,13	35		
673502	0,5	24	59	0,16	34	GalNAc ₃ -10a	A _d
	1,5	20	46	0,17	32		
	5	24	45	0,12	31		
	15	24	47	0,13	34		
677844	0,5	25	61	0,14	37	GalNAc ₃ -9a	A _d
	1,5	23	64	0,17	33		
	5	25	58	0,13	35		
	15	22	65	0,14	34		
677843	0,5	53	53	0,13	35	GalNAc ₃ -23a	A _d
	1,5	25	54	0,13	34		
	5	21	60	0,15	34		
	15	22	43	0,12	38		
655861	0,5	21	48	0,15	33	GalNAc ₃ -1a	A _d
	1,5	28	54	0,12	35		
	5	22	60	0,13	36		
	15	21	55	0,17	30		

Таблиця 53

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (Од/л)	AST (Од/л)	Загальний білірубін (мг/дл)	НСК (мг/дл)	Кластер GalNAc ₃	CM
677841	0,5	32	54	0,13	34	GalNAc ₃ -19a	A _d
	1,5	24	56	0,14	34		
	5	23	92	0,18	31		
	15	24	58	0,15	31		
677842	0,5	23	61	0,15	35	GalNAc ₃ -20a	A _d
	1,5	24	57	0,14	34		
	5	41	62	0,15	35		
	15	24	37	0,14	32		

Приклад 78. Антисмислове інгібування *in vivo* під дією олігонуклеотидів, націлених на ангіотензиноген, що містять кон'югат GalNAc₃

- 5 Олігонуклеотиди, наведені нижче, випробували в дозозалежному дослідженні антисмислового інгібування ангіотензиногену(AGT) у нормотензивних мишей Спрага-Доулі.

Таблиця 54

Модифіковані ASO, націлені на AGT

ISIS №	Послідовність (від 5' до 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO.
552668	^m C _{es} A _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{es} G _{es} G _{es} A _{es} T _e	н.д.	н.д.	34
669509	^m C _{es} A _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{es} G _{es} G _{es} A _{es} T _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -1 _a	GalNAc ₃ -1 _a	A _d	35

Структура GalNAc₃-1_a показана раніше у Прикладі 9.

- 10 Лікування

Шеститижневим самцям щурів Спрага-Доулі один раз на тиждень вводили підшкірну ін'єкцію дози, представленої нижче, в цілому три дози олігонуклеотиду, наведеного в Табл. 54, або PBS. Кожна експериментальна група складалася із 4 тварин. Щурів умертвили через 72 години після введення останньої дози. Рівні мРНК AGT в печінці виміряли за допомогою ПЛР у реальному часі і реагенту для кількісного визначення РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) за стандартними протоколами. Рівні білка AGT в плазмі виміряли за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу для визначення загального ангіотензиногену (кат. № JP27412, IBL International, Торонто, штат Онтаріо) з розведенням плазми 1:20000. Результати, наведені нижче, представлені як середній відсоток від рівнів мРНК AGT в печінці або від рівнів білка AGT в плазмі для кожної експериментальної групи, нормалізованих до контрольного зразка з PBS.

- 20

Як показано в Табл. 55, лікування антисмисловими олігонуклеотидами знижує рівні мРНК AGT в печінці і рівні білка в плазмі дозозалежним чином, і олігонуклеотид, що містить кон'югат GalNAc, був значно ефективнішим, ніж початковий олігонуклеотид, що не містить кон'югату GalNAc.

- 25

Таблиця 55

Рівні мРНК AGT в печінці і білка в плазмі

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК AGT в печінці (% PBS)	Білок AGT в плазмі (% PBS)	Кластер GalNAc ₃	CM
PBS	н.д.	100	100	н.д.	н.д.
552668	3	95	122	н.д.	н.д.
	10	85	97		
	30	46	79		
	90	8	11		

Таблиця 55

Рівні мРНК AGT в печінці і білка в плазмі

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК AGT в печінці (% PBS)	Білок AGT в плазмі (% PBS)	Кластер GalNAc ₃	СМ
669509	0,3	95	70	GalNAc ₃ -1a	A _d
	1	95	129		
	3	62	97		
	10	9	23		

Виміряли також рівні трансамінази в печінці, аланін-амінотрансферази (ALT) і аспартат-амінотрансферази (AST) в плазмі, а також масу тіла на момент умертвіння, застосовуючи стандартні протоколи. Результати представлені нижче у Табл. 56.

5

Таблиця 56

Рівні трансамінази в печінці і маса тіла щурів

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (Од/л)	AST (Од/л)	Маса тіла (% від початкового значення)	Кластер GalNAc ₃	СМ
PBS	н.д.	51	81	186	н.д.	н.д.
552668	3	54	93	183	н.д.	н.д.
	10	51	93	194		
	30	59	99	182		
	90	56	78	170		
669509	0,3	53	90	190	GalNAc ₃ -1a	A _d
	1	51	93	192		
	3	48	85	189		
	10	56	95	189		

Приклад 79. Тривалість дії in vivo олігонуклеотидів, націлених на АРОС-III, що містять кон'югат GalNAc₃

Олігонуклеотиди, наведені нижче у Табл. 57, випробували в дослідженні одноразової дози на тривалість дії у мишей.

10

Таблиця 57

Модифіковані ASO, націлені на АРОС-III

ISIS №	Послідовність (від 5' до 3')	Кластер GalNAc ₃	СМ	SEQ ID NO.
304801	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	н.д.	н.д.	20
647535	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _{eo} A _{do} -GalNAc ₃ -1 _a	GalNAc ₃ -1a	A _d	21
663083	GalNAc ₃ -3 _a -o _o -A _{do} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	A _d	36
674449	GalNAc ₃ -7 _a -o _o -A _{do} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	GalNAc ₃ -7a	A _d	36
674450	GalNAc ₃ -10 _a -o _o -A _{do} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	GalNAc ₃ -10a	A _d	36
674451	GalNAc ₃ -13 _a -o _o -A _{do} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	GalNAc ₃ -13a	A _d	36

Структура GalNAc₃-1_a показана раніше у Прикладі 9, GalNAc₃-3_a показана у Прикладі 39, GalNAc₃-7_a показана у Прикладі 48, GalNAc₃-10_a показана у Прикладі 46, і GalNAc₃-13_a показана у Прикладі 62.

15

Лікування

Шести-восьмитижневим трансгенним мишам, які експресують людський АРОС-III, ввели одноразову підшкірну ін'єкцію олігонуклеотиду, наведеного у Табл. 57, або PBS. Кожна експериментальна група складалася із 3 тварин. Зразки крові відбирали до введення дози для визначення початкового значення, а також через 72 години, 1 тиждень, 2 тижні, 3 тижні, 4 тижні, 5 тижнів і 6 тижнів після введення дози. Рівні тригліцеридів і білка АРОС-III в плазмі виміряли таким чином, як описано у Прикладі 20. Результати, наведені нижче, представлені як середній відсоток від рівнів тригліцеридів і АРОС-III у плазмі для кожної експериментальної групи, нормалізованих до початкових значень, і вони демонструють, що олігонуклеотиди, які містять кон'югуювальну групу GalNAc, мають тривалішу дію, ніж початковий олігонуклеотид, що не містить кон'югуювальної групи (ISIS 304801), навіть незважаючи на те, що доза початкової сполуки була втричі вищою, ніж доза олігонуклеотидів, що містять кон'югуювальну групу GalNAc.

Таблица 58

Рівні тригліцеридів і білка АРОС-III в плазмі трансгенних мишей

ISIS №	Доза (мг/кг)	Точки часу (дні після введення дози)	Тригліцериди (% від початкового значення)	Білок АРОС-III (% від початкового значення)	Кластер GalNAc ₃	СМ
PBS	н.д.	3	97	102	н.д.	н.д.
		7	101	98		
		14	108	98		
		21	107	107		
		28	94	91		
		35	88	90		
		42	91	105		
304801	30	3	40	34	н.д.	н.д.
		7	41	37		
		14	50	57		
		21	50	50		
		28	57	73		
		35	68	70		
		42	75	93		
647535	10	3	36	37	GalNAc ₃ -1a	A _d
		7	39	47		
		14	40	45		
		21	41	41		
		28	42	62		
		35	69	69		
		42	85	102		
663083	10	3	24	18	GalNAc ₃ -3a	A _d
		7	28	23		
		14	25	27		
		21	28	28		
		28	37	44		
		35	55	57		
		42	60	78		
674449	10	3	29	26	GalNAc ₃ -7a	A _d
		7	32	31		
		14	38	41		
		21	44	44		
		28	53	63		
		35	69	77		
		42	78	99		

Таблиця 58

Рівні тригліцеридів і білка АРОС-III в плазмі трансгенних мишей

ISIS №	Доза (мг/кг)	Точки часу (дні після введення дози)	Тригліцериди (% від початкового значення)	Білок АРОС-III (% від початкового значення)	Кластер GalNAc ₃	СМ
674450	10	3	33	30	GalNAc ₃ -10a	A _d
		7	35	34		
		14	31	34		
		21	44	44		
		28	56	61		
		35	68	70		
		42	83	95		
674451	10	3	35	33	GalNAc ₃ -13a	A _d
		7	24	32		
		14	40	34		
		21	48	48		
		28	54	67		
		35	65	75		
		42	74	97		

Приклад 80. Антисмислове інгібування *in vivo* під дією олігонуклеотидів, націлених на альфа-1 антитрипсин (A1AT), що містять кон'югат GalNAc₃

5 Олігонуклеотиди, наведені нижче у Табл. 59, випробували в дослідженні дозозалежного інгібування A1AT у мишей.

Таблиця 59

Модифіковані ASO, націлені на A1AT

ISIS №	Послідовність (від 5' до 3')	Кластер GalNAc ₃	СМ	SEQ ID NO.
476366	A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _e	н.д.	н.д.	37
656326	A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _{eo} A _{do} -GalNAc ₃ -1 _a	GalNAc ₃ -1a	A _d	38
678381	GalNAc ₃ -3 _a -o-A _{do} A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _e	GalNAc ₃ -3a	A _d	39
678382	GalNAc ₃ -7 _a -o-A _{do} A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _e	GalNAc ₃ -7a	A _d	39
678383	GalNAc ₃ -10 _a -o-A _{do} A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _e	GalNAc ₃ -10a	A _d	39
678384	GalNAc ₃ -13 _a -o-A _{do} A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _e	GalNAc ₃ -13a	A _d	39

10 Структура GalNAc₃-1_a показана раніше у Прикладі 9, GalNAc₃-3_a показана у Прикладі 39, GalNAc₃-7_a показана у Прикладі 48, GalNAc₃-10_a показана у Прикладі 46, і GalNAc₃-13_a показана у Прикладі 62.

Лікування

15 Шеститижневим самцям мишей C57BL/6 (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мен) один раз на тиждень вводили підшкірну ін'єкцію дози, представленої нижче, в цілому три дози олігонуклеотиду, наведеного в Табл. 59, або PBS. Кожна експериментальна група складалася із 4 тварин. Мишей умертвили через 72 години після останнього введення. Рівні мРНК A1AT в печінці визначали за допомогою ПЛР у реальному часі і реагенту для кількісного визначення РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) за стандартними протоколами. Рівні білка A1AT в плазмі визначили за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу

для визначення мишачого альфа 1-антитрипсину (кат. № 41-A1AMS-E01, Alpro, Салем, штат Нью-Гемпшир). Результати, наведені нижче, представлені як середній відсоток рівнів мРНК A1AT в печінці і білка в плазмі для кожної експериментальної групи, нормалізованих до контрольного зразка з PBS.

- 5 Як показано в Табл. 60, лікування антисмисловими олігонуклеотидами знижує рівні мРНК A1AT в печінці і рівні білка A1AT в плазмі дозозалежним чином. Олігонуклеотиди, що містять кон'югат GalNAc, були значно ефективнішими, ніж початкова сполука (ISIS 476366).

Таблиця 60

Рівні мРНК A1AT в печінці і білка в плазмі

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК A1AT в печінці (% PBS)	Білок A1AT в плазмі (% PBS)	Кластер GalNAc ₃	СМ
PBS	н.д.	100	100	н.д.	н.д.
476366	5	86	78	н.д.	н.д.
	15	73	61		
	45	30	38		
656326	0,6	99	90	GalNAc ₃ -1a	A _d
	2	61	70		
	6	15	30		
	18	6	10		
678381	0,6	105	90	GalNAc ₃ -3a	A _d
	2	53	60		
	6	16	20		
	18	7	13		
678382	0,6	90	79	GalNAc ₃ -7a	A _d
	2	49	57		
	6	21	27		
	18	8	11		
678383	0,6	94	84	GalNAc ₃ -10a	A _d
	2	44	53		
	6	13	24		
	18	6	10		
678384	0,6	106	91	GalNAc ₃ -13a	A _d
	2	65	59		
	6	26	31		
	18	11	15		

- 10 Під час умертвіння виміряли рівні трансамінази в печінці і НСК в плазмі за стандартними протоколами. Виміряли також масу тіла і масу органів. Результати представлені нижче у Табл. 61. Маса тіла представлена як % від початкового значення. Маса органів представлена як % від маси тіла відносно контрольної групи PBS.

Таблиця 61

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (Од/л)	AST (Од/л)	НСК (мг/дл)	Маса тіла (% від початкового значення)	Маса печінки (% відн. маси тіла)	Маса нирок (% відн. маси тіла)	Маса селезінки (% відн. маси тіла)
PBS	н.д.	25	51	37	119	100	100	100
476366	5	34	68	35	116	91	98	106
	15	37	74	30	122	92	101	128
	45	30	47	31	118	99	108	123
656326	0,6	29	57	40	123	100	103	119
	2	36	75	39	114	98	111	106
	6	32	67	39	125	99	97	122
	18	46	77	36	116	102	109	101

Таблиця 61

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (Од/л)	AST (Од/л)	НСК (мг/дл)	Маса тіла (% від початкового значення)	Маса печінки (% відн. маси тіла)	Маса нирок (% відн. маси тіла)	Маса селезінки (% відн. маси тіла)
678381	0,6	26	57	32	117	93	109	110
	2	26	52	33	121	96	106	125
	6	40	78	32	124	92	106	126
	18	31	54	28	118	94	103	120
678382	0,6	26	42	35	114	100	103	103
	2	25	50	31	117	91	104	117
	6	30	79	29	117	89	102	107
	18	65	112	31	120	89	104	113
678383	0,6	30	67	38	121	91	100	123
	2	33	53	33	118	98	102	121
	6	32	63	32	117	97	105	105
	18	36	68	31	118	99	103	108
678384	0,6	36	63	31	118	98	103	98
	2	32	61	32	119	93	102	114
	6	34	69	34	122	100	100	96
	18	28	54	30	117	98	101	104

Приклад 81. Тривалість дії in vivo олігонуклеотидів, націлених на A1AT, що містять кластер GalNAc₃

5 Олігонуклеотиди, наведені у Табл. 59, випробували в дослідженні одноразової дози на тривалість дії у мишей.

Лікування

10 Шеститижневим самцям мишей C57BL/6 ввели одноразову підшкірну ін'єкцію олігонуклеотиду, наведеного в Табл. 59, або PBS. Кожна експериментальна група складалася із 4 тварин. Зразки крові відбирали за день до введення дози для визначення початкового значення, а також на 5, 12, 19 і 25 день після введення дози. Рівні білка A1AT в плазмі виміряли за допомогою твердофазного імуоферментного аналізу (див. Приклад 80). Результати, наведені нижче, представлені як середній відсоток рівнів білка A1AT в плазмі для кожної експериментальної групи, нормалізованих до початкових рівнів. Результати демонструють, що 15 олігонуклеотиди, які містять кон'югат GalNAc, були ефективнішими і мали тривалішу дію, ніж початкова сполука без кон'югату GalNAc (ISIS 476366). Крім того, олігонуклеотиди, що містять 5'-GalNAc кон'югат (ISIS 678381, 678382, 678383 і 678384), були, в цілому, ще ефективнішими з ще тривалішою дією, ніж олігонуклеотид, що містить 3'-GalNAc кон'югат (ISIS 656326).

Таблиця 62

Рівні білка A1AT в плазмі мишей

ISIS №	Доза (мг/кг)	Точки часу (дні після введення дози)	A1AT (% від початкового значення)	Кластер GalNAc ₃	СМ
PBS	н.д.	5	93	н.д.	н.д.
		12	93		
		19	90		
		25	97		
476366	100	5	38	н.д.	н.д.
		12	46		
		19	62		
		25	77		
656326	18	5	33	GalNAc ₃ -1a	A _d
		12	36		
		19	51		

Рівні білка A1AT в плазмі мишей

ISIS №	Доза (мг/кг)	Точки часу (дні після введення дози)	A1AT (% від початкового значення)	Кластер GalNAc ₃	CM
		25	72		
678381	18	5	21	GalNAc ₃ -3a	A _d
		12	21		
		19	35		
		25	48		
678382	18	5	21	GalNAc ₃ -7a	A _d
		12	21		
		19	39		
		25	60		
678383	18	5	24	GalNAc ₃ -10a	A _d
		12	21		
		19	45		
		25	73		
678384	18	5	29	GalNAc ₃ -13a	A _d
		12	34		
		19	57		
		25	76		

Приклад 82. Антисмислове інгібування *in vitro* під дією олігонуклеотидів, націлених на SRB-1, що містять кон'югат GalNAc₃

- Первинні гепатоцити печінки мишей висівали у 96-ямкові планшети при 15000 клітин на ямку за 2 години до обробки. Олігонуклеотиди, наведені в Табл. 63, додали в концентрації 2, 10, 50 або 250 нМ в середовищі Уїльяма Е, і інкубували клітини протягом ночі при 37 °C в 5 % CO₂. Клітини лізували через 16 годин після додавання олігонуклеотиду, а загальну РНК очистили за допомогою RNease 3000 BioRobot (Qiagen). Рівні мРНК SRB-1 визначили за допомогою ПЛР у реальному часі і реагенту для кількісного визначення РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) за стандартними протоколами. Значення IC₅₀ визначили за допомогою програми Prism 4 (GraphPad). Результати демонструють, що олігонуклеотиди, які містять численні різноманітні кон'югувальні групи GalNAc і численні різноманітні розщеплювані фрагменти, є значно ефективнішими в *in vitro* експерименті вільного поглинання, ніж початкові олігонуклеотиди, що не містять кон'югувальної групи GalNAc (ISIS 353382 і 666841).

Таблиця 63

Інгібування експресії SRB-1 *in vitro*

ISIS №	Послідовність (від 5' до 3')	Зв'язки	Кластер GalNAc	CM	IC ₅₀ (нМ)	SEQ ID NO.
353382	G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} m _{C_{ds}T_{ds}T_{es}m_{C_{es}m_{C_{es}T_{es}T_e}}}	PS	н.д.	н.д.	250	28
655861	G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} m _{C_{ds}T_{ds}T_{es}m_{C_{es}m_{C_{es}T_{es}T_{eo}A_{do}'-GalNAc₃-1_a}}}	PS	GalNAc ₃ -1 _a	A _d	40	29
661161	GalNAc ₃ -3 _a -o'-A _{do} G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} m _{C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}m_{C_{ds}T_{ds}T_{es}m_{C_{es}m_{C_{es}T_{es}T_e}}}}	PS	GalNAc ₃ -3 _a	A _d	40	30
661162	GalNAc ₃ -3 _a -o'-A _{do} G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} m _{C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}m_{C_{ds}T_{ds}T_{eo}m_{C_{eo}m_{C_{es}T_{es}T_e}}}}	PO/PS	GalNAc ₃ -3 _a	A _d	8	30
664078	G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} m _{C_{ds}T_{ds}T_{es}m_{C_{es}m_{C_{es}T_{es}T_{eo}A_{do}'-GalNAc₃-9_a}}}	PS	GalNAc ₃ -9 _a	A _d	20	29
665001	GalNAc ₃ -8 _a -o'-A _{do} G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} m _{C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}m_{C_{ds}T_{ds}T_{es}m_{C_{es}m_{C_{es}T_{es}T_e}}}}	PS	GalNAc ₃ -8 _a	A _d	70	30
666224	GalNAc ₃ -5 _a -o'-A _{do} G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} m _{C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}m_{C_{ds}T_{ds}T_{es}m_{C_{es}m_{C_{es}T_{es}T_e}}}}	PS	GalNAc ₃ -5 _a	A _d	80	30

Інгібування експресії SRB-1 in vitro

ISIS №	Послідовність (від 5' до 3')	Зв'язки	Кластер GalNac	СМ	IC ₅₀ (нМ)	SEQ ID NO.
666841	G ^m _{es} C ^m _{eo} T ^m _{eo} T ^m _{eo} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} mC ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{eo} C ^m _{eo} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	PO/PS	н.д.	н.д.	>250	28
666881	GalNac ₃ -10 _a -o-A ^m _{do} G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} mC ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} mC ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	PS	GalNac ₃ -10 _a	A _d	30	30
666904	GalNac ₃ -3 _a -o-G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} mC ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	PS	GalNac ₃ -3 _a	PO	9	28
666924	GalNac ₃ -3 _a -o-T ^m _{do} G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} mC ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} mC ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	PS	GalNac ₃ -3 _a	T _d	15	33
666961	GalNac ₃ -6 _a -o-A ^m _{do} G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} mC ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} mC ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	PS	GalNac ₃ -6 _a	A _d	150	30
666981	GalNac ₃ -7 _a -o-A ^m _{do} G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} mC ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} mC ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	PS	GalNac ₃ -7 _a	A _d	20	30
670061	GalNac ₃ -13 _a -o-A ^m _{do} G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} mC ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} mC ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	PS	GalNac ₃ -13 _a	A _d	30	30
670699	GalNac ₃ -3 _a -o-T ^m _{do} G ^m _{es} C ^m _{eo} T ^m _{eo} T ^m _{eo} C ^m _{eo} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} mC ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} mC ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{eo} C ^m _{eo} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	PO/PS	GalNac ₃ -3 _a	T _d	15	33
670700	GalNac ₃ -3 _a -o-A ^m _{eo} G ^m _{es} C ^m _{eo} T ^m _{eo} T ^m _{eo} C ^m _{eo} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} mC ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} mC ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{eo} C ^m _{eo} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	PO/PS	GalNac ₃ -3 _a	A _e	30	30
670701	GalNac ₃ -3 _a -o-T ^m _{eo} G ^m _{es} C ^m _{eo} T ^m _{eo} T ^m _{eo} C ^m _{eo} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} mC ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} mC ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{eo} C ^m _{eo} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	PO/PS	GalNac ₃ -3 _a	T _e	25	33
671144	GalNac ₃ -12 _a -o-A ^m _{do} G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} mC ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} mC ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	PS	GalNac ₃ -12 _a	A _d	40	30
671165	GalNac ₃ -13 _a -o-A ^m _{do} G ^m _{es} C ^m _{eo} T ^m _{eo} T ^m _{eo} C ^m _{eo} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} mC ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} mC ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{eo} C ^m _{eo} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	PO/PS	GalNac ₃ -13 _a	A _d	8	30
671261	GalNac ₃ -14 _a -o-A ^m _{do} G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} mC ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} mC ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	PS	GalNac ₃ -14 _a	A _d	>250	30
671262	GalNac ₃ -15 _a -o-A ^m _{do} G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} mC ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} mC ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	PS	GalNac ₃ -15 _a	A _d	>250	30
673501	GalNac ₃ -7 _a -o-A ^m _{do} G ^m _{es} C ^m _{eo} T ^m _{eo} T ^m _{eo} C ^m _{eo} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} mC ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} mC ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{eo} C ^m _{eo} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	PO/PS	GalNac ₃ -7 _a	A _d	30	30
673502	GalNac ₃ -10 _a -o-A ^m _{do} G ^m _{es} C ^m _{eo} T ^m _{eo} T ^m _{eo} C ^m _{eo} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} mC ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} mC ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{eo} C ^m _{eo} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	PO/PS	GalNac ₃ -10 _a	A _d	8	30
675441	GalNac ₃ -17 _a -o-A ^m _{do} G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} mC ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} mC ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	PS	GalNac ₃ -17 _a	A _d	30	30
675442	GalNac ₃ -18 _a -o-A ^m _{do} G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} mC ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} mC ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	PS	GalNac ₃ -18 _a	A _d	20	30
677841	G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} mC ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{eo} A ^m _{do} -GalNac ₃ -19 _a	PS	GalNac ₃ -19 _a	A _d	40	29
677842	G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} mC ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{eo} A ^m _{do} -GalNac ₃ -20 _a	PS	GalNac ₃ -20 _a	A _d	30	29
677843	GalNac ₃ -23 _a -o-A ^m _{do} G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} mC ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} mC ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	PS	GalNac ₃ -23 _a	A _d	40	30

Структура GalNac₃-1_a показана раніше у Прикладі 9, GalNac₃-3_a показана у Прикладі 39, GalNac₃-5_a показана у Прикладі 49, GalNac₃-6_a показана у Прикладі 51, GalNac₃-7_a показана у Прикладі 48, GalNac₃-8_a показана у Прикладі 47, GalNac₃-9_a показана у Прикладі 52, GalNac₃-10_a показана у Прикладі 46, GalNac₃-12_a показана у Прикладі 61, GalNac₃-13_a показана у Прикладі 62, GalNac₃-14_a показана у Прикладі 63, GalNac₃-15_a показана у Прикладі 64, GalNac₃-17_a показана у Прикладі 68, GalNac₃-18_a показана у Прикладі 69, GalNac₃-19_a показана у Прикладі 70, GalNac₃-20_a показана у Прикладі 71, і GalNac₃-23_a показана у Прикладі 76.

Приклад 83. Антисмислове інгібування in vivo під дією олігонуклеотидів, націлених на фактор XI, що містять кластер GalNac₃

Олігонуклеотиди, наведені нижче у Табл. 64, випробували в дослідженні дозозалежного

інгібування фактора XI у мишей.

Таблиця 64

Модифіковані олігонуклеотиди, націлені на фактор XI

ISIS №	Послідовність (від 5' до 3')	Кластер GalNac	CM	SEQ ID NO.
404071	T _{es} G _{es} G _{es} T _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{es} G _{es} A _{es} G _{es} G _e	н.д.	н.д.	31
656173	T _{es} G _{eo} G _{eo} T _{eo} A _{eo} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} G _{eo} A _{es} G _{es} G _{eo} A _{do} -GalNac ₃ -1 _a	GalNac ₃ -1 _a	A _d	32
663086	GalNac ₃ -3 _a -o _o A _{do} T _{es} G _{eo} G _{eo} T _{eo} A _{eo} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} G _{eo} A _{es} G _{es} G _e	GalNac ₃ -3 _a	A _d	40
678347	GalNac ₃ -7 _a -o _o A _{do} T _{es} G _{eo} G _{eo} T _{eo} A _{eo} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} G _{eo} A _{es} G _{es} G _e	GalNac ₃ -7 _a	A _d	40
678348	GalNac ₃ -10 _a -o _o A _{do} T _{es} G _{eo} G _{eo} T _{eo} A _{eo} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} G _{eo} A _{es} G _{es} G _e	GalNac ₃ -10 _a	A _d	40
678349	GalNac ₃ -13 _a -o _o A _{do} T _{es} G _{eo} G _{eo} T _{eo} A _{eo} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} G _{eo} A _{es} G _{es} G _e	GalNac ₃ -13 _a	A _d	40

Структура GalNac₃-1_a показана раніше у Прикладі 9, GalNac₃-3_a показана у Прикладі 39, GalNac₃-7_a показана у Прикладі 48, GalNac₃-10_a показана у Прикладі 46, і GalNac₃-13_a показана у Прикладі 62.

Лікування

Шести-восьмитижневим мишам один раз на тиждень вводили підшкірну ін'єкцію дози, представленої нижче, в цілому три дози олігонуклеотиду, наведеного нижче, або PBS. Кожна експериментальна група складалася із 4 тварин. Мишей умертвили через 72 години після останньої дози. Рівні мРНК фактора XI в печінці виміряли за допомогою ПЛР у реальному часі і нормалізували до циклофіліну за стандартними протоколами. Виміряли також трансаміназу в печінці, НСК і білірубін. Результати, наведені нижче, представлені як середній відсоток для кожної експериментальної групи, нормалізований до контролю з PBS.

Як показано в Табл. 65, лікування антисмисловими олігонуклеотидами знижує рівні мРНК фактора XI в печінці дозозалежним чином. Результати демонструють, що олігонуклеотиди, які містять кон'югат GalNac, були ефективнішими, ніж початкова сполука без кон'югату GalNac (ISIS 404071). Крім того, олігонуклеотиди, що містять 5'-GalNac кон'югат (ISIS 663086, 678347, 678348 і 678349), були ще ефективнішими, ніж олігонуклеотид, що містить 3'-GalNac кон'югат (ISIS 656173).

Таблиця 65

Рівні мРНК фактора XI в печінці, трансамінази в печінці, НСК і білірубину

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК фактора XI (% від PBS)	ALT (Од/л)	AST (Од/л)	НСК (мг/дл)	Біліру-бін (мг/дл)	Кластер GalNac ₃	SEQ ID NO.
PBS	н.д.	100	63	70	21	0,18	н.д.	н.д.
404071	3	65	41	58	21	0,15	н.д.	31
	10	33	49	53	23	0,15		
	30	17	43	57	22	0,14		
656173	0,7	43	90	89	21	0,16	GalNac ₃ -1 _a	32
	2	9	36	58	26	0,17		
	6	3	50	63	25	0,15		
663086	0,7	33	91	169	25	0,16	GalNac ₃ -3 _a	40
	2	7	38	55	21	0,16		
	6	1	34	40	23	0,14		
678347	0,7	35	28	49	20	0,14	GalNac ₃ -7 _a	40
	2	10	180	149	21	0,18		
	6	1	44	76	19	0,15		
678348	0,7	39	43	54	21	0,16	GalNac ₃ -	40

Таблиця 65

Рівні мРНК фактора XI в печінці, трансамінази в печінці, НСК і білірубін

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК фактора XI (% від PBS)	ALT (Од/л)	AST (Од/л)	НСК (мг/дл)	Біліру-бін (мг/дл)	Кластер GalNAc ₃	SEQ ID NO.
	2	5	38	55	22	0,17	10a	
	6	2	25	38	20	0,14		
678349	0,7	34	39	46	20	0,16	GalNAc ₃ - 13a	40
	2	8	43	63	21	0,14		
	6	2	28	41	20	0,14		

Приклад 84. Тривалість дії in vivo олігонуклеотидів, націлених на фактор XI, що містять кон'югат GalNAc₃

Олігонуклеотиди, наведені в Табл. 64, випробували в дослідженні одноразової дози на тривалість дії у мишей.

Лікування

Шести-восьмитижневим мишам ввели одноразову підшкірну ін'єкцію олігонуклеотиду, наведеного у Табл. 64, або PBS. Кожна експериментальна група складалася із 4 тварин. Зразки крові відбирали із хвостової вени за день до введення дози для визначення початкового значення, а також на 3, 10 і 17 день після введення дози. Рівні білка фактора XI в плазмі визначали твердофазним імуноферментним аналізом, застосовуючи іммобілізовані і біотинільовані детекторні антитіла для фактора XI виробництва R & D Systems, Мінеаполіс, штат Мінесота (кат. № AF2460 і № BAF2460, відповідно), а також реагент OptEIA, набір В (кат. № 550534, BD Biosciences, Сан-Хосе, штат Каліфорнія). Результати, наведені нижче, представлені як середній відсоток рівнів білка фактора XI в плазмі для кожної експериментальної групи, нормалізованих до початкових рівнів. Результати демонструють, що олігонуклеотиди, які містять кон'югат GalNAc, були ефективнішими і мали тривалішу дію, ніж початкова сполука без кон'югату GalNAc (ISIS 404071). Крім того, олігонуклеотиди, що містять 5'-GalNAc кон'югат (ISIS 663086, 678347, 678348 і 678349), були ще ефективнішими з ще тривалішою дією, ніж олігонуклеотид, що містить 3'-GalNAc кон'югат (ISIS 656173).

Таблиця 66

Рівні білка фактора XI в плазмі мишей

ISIS №	Доза (мг/кг)	Точки часу (дні після введення дози)	Фактор XI (% від початкового значення)	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO.
PBS	н.д.	3	123	н.д.	н.д.	н.д.
		10	56			
		17	100			
404071	30	3	11	н.д.	н.д.	31
		10	47			
		17	52			
656173	6	3	1	GalNAc ₃ -1a	A _d	32
		10	3			
		17	21			
663086	6	3	1	GalNAc ₃ -3a	A _d	40
		10	2			
		17	9			
678347	6	3	1	GalNAc ₃ -7a	A _d	40
		10	1			
		17	8			

Таблиця 66

Рівні білка фактора XI в плазмі мишей

ISIS №	Доза (мг/кг)	Точки часу (дні після введення дози)	Фактор XI (% від початкового значення)	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO.
678348	6	3	1	GalNAc ₃ -10a	A _d	40
		10	1			
		17	6			
678349	6	3	1	GalNAc ₃ -13a	A _d	40
		10	1			
		17	5			

Приклад 85. Антисмислове інгібування in vivo під дією олігонуклеотидів, націлених на SRB-1, що містять кон'югат GalNAc₃

- 5 Олігонуклеотиди, наведені в Табл. 63, випробували в дозозалежному дослідженні антисмислового інгібування SRB-1 у мишей.

Лікування

- 10 Шести-восьмитижневим мишам C57BL/6 один раз на тиждень вводили підшкірну ін'єкцію дози, представленої нижче, в цілому три дози олігонуклеотиду, наведеного в Табл. 63, або сольового розчину. Кожна експериментальна група складалася із 4 тварин. Мишей умертвили через 48 годин після останнього введення для визначення рівнів мРНК SRB-1 у печінці за допомогою ПЛР у реальному часі і реагенту для кількісного визначення РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) за стандартними протоколами. Результати, наведені нижче, представлені як середній відсоток рівнів мРНК SRB-1 у печінці для кожної експериментальної групи, нормалізованих до контрольного зразка, обробленого сольовим розчином.

15 Як показано в Табл. 67 і 68, лікування антисмисловими олігонуклеотидами знижує рівні мРНК SRB-1 дозозалежним чином.

Таблиця 67

мРНК SRB-1 у печінці

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% від сольового розчину)	Кластер GalNAc ₃	CM
Сольовий розчин	н.д.	100	н.д.	н.д.
655861	0,1	94	GalNAc ₃ -1a	A _d
	0,3	119		
	1	68		
	3	32		
661161	0,1	120	GalNAc ₃ -3a	A _d
	0,3	107		
	1	68		
	3	26		
666881	0,1	107	GalNAc ₃ -10a	A _d
	0,3	107		
	1	69		
	3	27		
666981	0,1	120	GalNAc ₃ -7a	A _d
	0,3	103		
	1	54		
	3	21		
670061	0,1	118	GalNAc ₃ -13a	A _d
	0,3	89		
	1	52		
	3	18		

Таблиця 67

мРНК SRB-1 у печінці

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% від сольового розчину)	Кластер GalNAc ₃	СМ
677842	0,1	119	GalNAc ₃ -20a	A _d
	0,3	96		
	1	65		
	3	23		

Таблиця 68

мРНК SRB-1 у печінці

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% від сольового розчину)	Кластер GalNAc ₃	СМ
661161	0,1	107	GalNAc ₃ -3a	A _d
	0,3	95		
	1	53		
	3	18		
677841	0,1	110	GalNAc ₃ -19a	A _d
	0,3	88		
	1	52		
	3	25		

Виміряли також рівні трансамінази в печінці, загального білірубину, НСК і масу тіла за стандартними протоколами. Середні значення для кожної експериментальної групи представлені нижче у Табл. 69.

Таблиця 69

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (Од/л)	AST (Од/л)	Білі-рубін (мг/дл)	НСК (мг/дл)	Маса тіла (% від початкового значення)	Кластер GalNAc ₃	СМ
Сольовий розчин	н.д.	19	39	0,17	26	118	н.д.	н.д.
655861	0,1	25	47	0,17	27	114	GalNAc ₃ -1a	A _d
	0,3	29	56	0,15	27	118		
	1	20	32	0,14	24	112		
	3	27	54	0,14	24	115		
661161	0,1	35	83	0,13	24	113	GalNAc ₃ -3a	A _d
	0,3	42	61	0,15	23	117		
	1	34	60	0,18	22	116		
	3	29	52	0,13	25	117		
666881	0,1	30	51	0,15	23	118	GalNAc ₃ -10a	A _d
	0,3	49	82	0,16	25	119		
	1	23	45	0,14	24	117		
	3	20	38	0,15	21	112		
666981	0,1	21	41	0,14	22	113	GalNAc ₃ -7a	A _d
	0,3	29	49	0,16	24	112		
	1	19	34	0,15	22	111		
	3	77	78	0,18	25	115		
670061	0,1	20	63	0,18	24	111	GalNAc ₃ -13a	A _d
	0,3	20	57	0,15	21	115		
	1	20	35	0,14	20	115		
	3	27	42	0,12	20	116		
677842	0,1	20	38	0,17	24	114	GalNAc ₃ -20a	A _d

Таблиця 69

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (Од/л)	AST (Од/л)	Білі-рубін (мг/дл)	НСК (мг/дл)	Маса тіла (% від початкового значення)	Кластер GalNAc ₃	CM
	0,3	31	46	0,17	21	117		
	1	22	34	0,15	21	119		
	3	41	57	0,14	23	118		

Приклад 86. Антисмислове інгібування in vivo під дією олігонуклеотидів, націлених на TTR, що містять кластер GalNAc₃

Олігонуклеотиди, наведені нижче у Табл. 70, випробували в дозозалежному дослідженні антисмислового інгібування людського транстиретину (TTR) у трансгенних мишей, які експресують людський TTR ген.

Лікування

Восьмитижневим TTR трансгенним мишам один раз на тиждень протягом трьох тижнів, в цілому три дози, вводили підшкірну ін'єкцію олігонуклеотиду і дози, наведені в представлених нижче таблицях, або PBS. Кожна експериментальна група складалася із 4 тварин. Мишей умертвили через 72 години після останнього введення. Протягом експерименту в різних точках часу відбирали зразки крові з хвостової вени і вимірювали рівні білка TTR у плазмі, ALT і AST, які представлені в Табл. 72-74. Після умертвіння тварин виміряли рівні ALT, AST і людського TTR в плазмі, а також масу тіла, масу органів і рівні мРНК людського TTR у печінці. Рівні білка TTR виміряли за допомогою клінічного аналізатора (AU480, Beckman Coulter, штат Каліфорнія). ПЛР у реальному часі і реагент для кількісного визначення РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) застосовували за стандартними протоколами для визначення рівнів мРНК людського TTR у печінці. Результати, наведені в Табл. 71-74, є середніми значеннями для кожної експериментальної групи. Рівні мРНК є середніми значеннями відносно середнього значення для PBS групи. Рівні білка в плазмі є середніми значеннями відносно середнього значення для PBS групи в початковому стані. Маса тіла є середньою відсотковою зміною маси від початкового значення до умертвіння для кожної окремої експериментальної групи. Представлена маса органів нормалізована до маси тіла тварини, і далі представлена середня нормалізована маса органів для кожної експериментальної групи відносно середньої нормалізованої маси органів для PBS групи.

У Табл. 71-74 "BL" позначає початкове значення вимірювань, виконаних безпосередньо перед введенням першої дози. Як показано в Табл. 71 і 72, лікування антисмисловими олігонуклеотидами знижує рівні експресії TTR дозозалежним чином. Олігонуклеотиди, що містять кон'югат GalNAc, були ефективнішими, ніж початкова сполука без кон'югату GalNAc (ISIS 420915). Крім того, олігонуклеотиди, що містять кон'югат GalNAc і змішані PS/PO міжнуклеозидні зв'язки, були ще ефективнішими, ніж олігонуклеотид, що містить кон'югат GalNAc і тільки PS зв'язки.

Таблиця 70

Олігонуклеотиди, націлені на людський TTR

Isis №	Послідовність від 5' до 3'	Зв'язки	Кластер GalNAc	CM	SEQ ID NO.
420915	T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS	н.д.	н.д.	41
660261	T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -1 _a	PS	GalNAc ₃ -1a	A _d	42
682883	GalNAc ₃ -3 _{a-o'} T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS/PO	GalNAc ₃ -3a	PO	74
682884	GalNAc ₃ -7 _{a-o'} T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS/PO	GalNAc ₃ -7a	PO	41
682885	GalNAc ₃ -10 _{a-o'} T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS/PO	GalNAc ₃ -10a	PO	41

Таблиця 70

Олігонуклеотиди, націлені на людський TTR

Isis №	Послідовність від 5' до 3'	Зв'язки	Кластер GalNAc	CM	SEQ ID NO.
682886	GalNAc ₃ -13 _{a-o'} T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS/PO	GalNAc ₃ -13a	PO	41
684057	T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -19 _a	PS/PO	GalNAc ₃ -19a	A _d	42

Легенда для Табл. 72 представлена у Прикладі 74. Структура GalNAc₃-1 показана у Прикладі 9. Структура GalNAc₃-3_a показана у Прикладі 39. Структура GalNAc₃-7_a показана у Прикладі 48. Структура GalNAc₃-10_a показана у Прикладі 46. Структура GalNAc₃-13_a показана у Прикладі 62. Структура GalNAc₃-19_a показана у Прикладі 70.

Таблиця 71

Антисмислове інгібування людського TTR in vivo

Isis №	Доза (мг/кг)	МРНК TTR (% PBS)	Білок TTR у плазмі (% PBS)	Кластер GalNAc	CM	SEQ ID NO.
PBS	н.д.	100	100	н.д.	н.д.	
420915	6	99	95	н.д.	н.д.	41
	20	48	65			
	60	18	28			
	0,6	113	87			
660261	2	40	56	GalNAc ₃ -1a	A _d	42
	6	20	27			
	20	9	11			
	0,6	113	87			

Таблиця 72

Антисмислове інгібування людського TTR in vivo

Isis №	Доза (мг/кг)	МРНК TTR (% PBS)	Білок TTR у плазмі (% PBS при BL)				Кластер GalNAc	CM	SEQ ID NO.
			BL	3-й день	10-й день	17-й день (після умертвіння)			
PBS	н.д.	100	100	96	90	114	н.д.	н.д.	
420915	6	74	106	86	76	83	н.д.	н.д.	41
	20	43	102	66	61	58			
	60	24	92	43	29	32			
	0,6	60	88	73	63	68			
682883	2	18	75	38	23	23	GalNAc ₃ -3a	PO	41
	6	10	80	35	11	9			
	0,6	56	88	78	63	67			
682884	2	19	76	44	25	23	GalNAc ₃ -7a	PO	41
	6	15	82	35	21	24			
	0,6	60	92	77	68	76			
682885	2	22	93	58	32	32	GalNAc ₃ -10a	PO	41
	6	17	85	37	25	20			

Таблиця 72

Антисмислове інгібування людського TTR in vivo

Isis №	Доза (мг/кг)	мРНК TTR (% PBS)	Білок TTR у плазмі (% PBS при BL)				Кластер GalNAc	CM	SEQ ID NO.
			BL	3-й день	10-й день	17-й день (після умертвіння)			
682886	0,6	57	91	70	64	69	GalNAc ₃ -13a	PO	41
	2	21	89	50	31	30			
	6	18	102	41	24	27			
684057	0,6	53	80	69	56	62	GalNAc ₃ -19a	A _d	42
	2	21	92	55	34	30			
	6	11	82	50	18	13			

Таблиця 73

Рівні трансамінази, зміна маси тіла і відносна маса органів

Isis №	Доза (мг/кг)	ALT (Од/л)				AST (Од/л)				Маса тіла (% BL)	Печінка (% PBS) BL	Селезінка (% PBS) 3 день	Нирки (% PBS) 10 день	SEQ ID NO. 17 день
		BL	3 день	10 день	17 день	BL	3 день	10 день	17 день					
PBS	н.д.	33	34	33	24	58	62	67	52	105	100	100	100	н.д.
420915	6	34	33	27	21	64	59	73	47	115	99	89	91	41
	20	34	30	28	19	64	54	56	42	111	97	83	89	
	60	34	35	31	24	61	58	71	58	113	102	98	95	
660261	0,6	33	38	28	26	70	71	63	59	111	96	99	92	42
	2	29	32	31	34	61	60	68	61	118	100	92	90	
	6	29	29	28	34	58	59	70	90	114	99	97	95	
	20	33	32	28	33	64	54	68	95	114	101	106	92	

Таблиця 74

Рівні трансамінази, зміна маси тіла і відносна маса органів

Isis №	Доза (мг/кг)	ALT (Од/л)				AST (Од/л)				Маса тіла (% BL)	Печінка (% PBS) BL	Селезінка (% PBS) 3 день	Нирки (% PBS) 10 день	SEQ ID NO. 17 день
		BL	3 день	10 день	17 день	BL	3 день	10 день	17 день					
PBS	н.д.	32	34	37	41	62	78	76	77	104	100	100	100	н.д.
420915	6	32	30	34	34	61	71	72	66	102	103	102	105	41
	20	41	34	37	33	80	76	63	54	106	107	135	101	
	60	36	30	32	34	58	81	57	60	106	105	104	99	
682883	0,6	32	35	38	40	53	81	74	76	104	101	112	95	41
	2	38	39	42	43	71	84	70	77	107	98	116	99	
	6	35	35	41	38	62	79	103	65	105	103	143	97	
682884	0,6	33	32	35	34	70	74	75	67	101	100	130	99	41
	2	31	32	38	38	63	77	66	55	104	103	122	100	
	6	38	32	36	34	65	85	80	62	99	105	129	95	
682885	0,6	39	26	37	35	63	63	77	59	100	109	109	112	41
	2	30	26	38	40	54	56	71	72	102	98	111	102	
	6	27	27	34	35	46	52	56	64	102	98	113	96	
682886	0,6	30	40	34	36	58	87	54	61	104	99	120	101	41
	2	27	26	34	36	51	55	55	69	103	91	105	92	

Таблиця 74

Рівні трансамінази, зміна маси тіла і відносна маса органів

Isis №	Доза (мг/кг)	ALT (Од/л)				AST (Од/л)				Маса тіла (% BL)	Печінка (% PBS) BL	Селезінка (% PBS) 3 день	Нирки (% PBS) 10 день	SEQ ID NO. 17 день
		BL	3 день	10 день	17 день	BL	3 день	10 день	17 день					
	6	40	28	34	37	107	54	61	69	109	100	102	99	
684057	0,6	35	26	33	39	56	51	51	69	104	99	110	102	42
	2	33	32	31	40	54	57	56	87	103	100	112	97	
	6	39	33	35	40	67	52	55	92	98	104	121	108	

Приклад 87. Тривалість дії in vivo одноразових доз олігонуклеотидів, націлених на TTR, що містять кластер GalNAc₃

ISIS № 420915 і 660261 (див. Таблицю 70) випробували в дослідженні одноразової дози на тривалість дії у мишей. ISIS № 420915, 682883 і 682885 (див. Табл. 70) також випробували в дослідженні одноразової дози на тривалість дії у мишей.

Лікування

Восьмитижневим самцям трансгенних мишей, які експресують людський TTR, ввели одноразову підшкірну ін'єкцію 100 мг/кг ISIS № 420915 або 13,5 мг/кг ISIS № 660261. Кожна експериментальна група складалася із 4 тварин. Зразки крові з хвостової вени відбирали до введення дози для визначення початкових показників і на 3-й, 7-й, 10-й, 17-й, 24-й і 39-й день після введення дози. Рівні білка TTR в плазмі вимірювали таким чином, як описано у Прикладі 86. Результати, наведені нижче, представлені як середній відсоток рівнів TTR в плазмі для кожної експериментальної групи, нормалізованих до початкових рівнів.

Таблиця 75

Рівні білка TTR у плазмі

ISIS №	Доза (мг/кг)	Точки часу (дні після введення дози)	TTR (% від початкового значення)	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO.
420915	100	3	30	н.д.	н.д.	41
		7	23			
		10	35			
		17	53			
		24	75			
		39	100			
660261	13,5	3	27	GalNAc ₃ -1a	A _d	42
		7	21			
		10	22			
		17	36			
		24	48			
		39	69			

Лікування

Восьмитижневим самкам трансгенних мишей, які експресують людський TTR, ввели одноразову підшкірну ін'єкцію 100 мг/кг ISIS № 420915, 10,0 мг/кг ISIS № 682883 або 10,0 мг/кг ISIS № 682885. Кожна експериментальна група складалася із 4 тварин. Зразки крові з хвостової вени відбирали до введення дози для визначення початкових показників і на 3-й, 7-й, 10-й, 17-й, 24-й і 39-й день після введення дози. Рівні білка TTR в плазмі вимірювали таким чином, як описано у Прикладі 86. Результати, наведені нижче, представлені як середній відсоток рівнів TTR в плазмі для кожної експериментальної групи, нормалізованих до початкових рівнів.

Таблиця 76

Рівні білка TTR у плазмі

ISIS №	Доза (мг/кг)	Точки часу (дні після введення дози)	TTR (% від початкового значення)	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO.
420915	100	3	48	н.д.	н.д.	41
		7	48			
		10	48			
		17	66			
		31	80			
682883	10,0	3	45	GalNAc ₃ -3a	PO	41
		7	37			
		10	38			
		17	42			
		31	65			
682885	10,0	3	40	GalNAc ₃ -10a	PO	41
		7	33			
		10	34			
		17	40			
		31	64			

Результати в Табл. 75 і 76 демонструють, що олігонуклеотиди, які містять кон'югат GalNAc, є ефективнішими і мають тривалішу дію, ніж початковий олігонуклеотид без кон'югату (ISIS 420915).

Приклад 88. Сплайсинг-модуляція in vivo під дією олігонуклеотидів, націлених на SMN, що містять кон'югат GalNAc₃

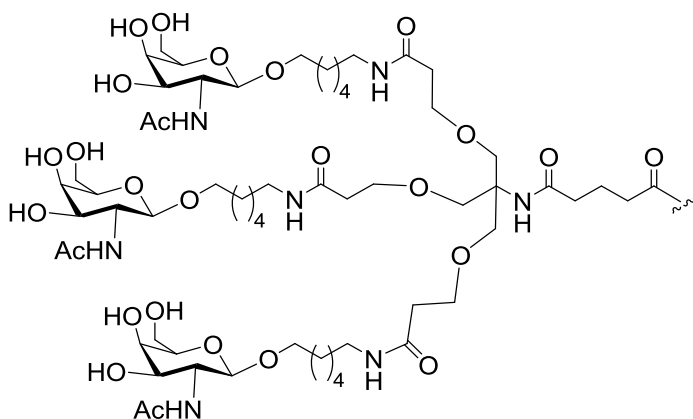
Олігонуклеотиди, наведені в Табл. 77, випробували на сплайсинг-модуляцію людських генів виживаності мотонейронів (SMN) у мишей.

Таблиця 77

Модифіковані ASO, націлені на SMN

ISIS №	Послідовність (від 5' до 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO.
387954	A _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{es} A _{es} A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} G _e	н.д.	н.д.	43
699819	GalNAc ₃ -7 _a -o _o A _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{es} A _{es} A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} G _e	GalNAc ₃ -7a	PO	43
699821	GalNAc ₃ -7 _a -o _o A _{es} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{eo} T _{eo} A _{eo} A _{eo} T _{eo} G _{eo} ^m C _{eo} T _{es} G _{es} G _e	GalNAc ₃ -7a	PO	43
700000	A _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{es} A _{es} A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} G _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -1 _a	GalNAc ₃ -1a	A _d	44
703421	X-ATT ^m CA ^m CTTT ^m CATAATG ^m CTGG	н.д.	н.д.	43
703422	GalNAc ₃ -7 _b -X-ATT ^m CA ^m CTTT ^m CATAATG ^m CTGG	GalNAc ₃ -7b	н.д.	43

Структура GalNAc₃-7_a показана раніше у Прикладі 48. "X" позначає 5'-первинний амін, одержаний компанією Gene Tools (Філомат, штат Орегон), а GalNAc₃-7_b означає структуру GalNAc₃-7_a, що не містить частини –NH-C₆-O зв'язку, як показано нижче:



ISIS № 703421 і 703422 являють собою морфоліно-олігонуклеотиди, при цьому кожен нуклеотид із двох олігонуклеотидів є морфоліно-нуклеотидом.

Лікування

- 5 Шеститижневим трансгенним мишам, які експресують людський SMN, ввели одноразову підшкірну ін'єкцію олігонуклеотиду, наведеного в Табл. 78, або сольового розчину. Кожна експериментальна група складалася із 2 самців і 2 самок. Мишей умертвили через 3 дні після введення дози для визначення рівнів мРНК людського SMN в печінці з екзоном 7 і без нього, застосувавши ПЛР у реальному часі за стандартними протоколами. Загальну РНК виміряли за допомогою реагенту Ribogreen. Рівні мРНК SMN нормалізували до загальної мРНК, і далі нормалізували до середніх значень в групі, обробленій сольовим розчином. Одержані середні співвідношення мРНК SMN, що містить екзон 7, до мРНК SMN, що не містить екзону 7, представлені у Табл. 78. Результати демонструють, що повністю модифіковані олігонуклеотиди, які модулюють сплайсинг і містять кон'югат GalNAc, є значно ефективнішими для зміни сплайсингу в печінці, ніж початкові олігонуклеотиди, що не містять кон'югату GalNAc. Крім того, ця тенденція зберігається для хімізму багаторазових модифікацій, включаючи 2'-MOE і морфоліно-модифіковані олігонуклеотиди.

Таблица 78

Вплив олігонуклеотидів, націлених на людський SMN, in vivo

ISIS №	Доза (мг/кг)	+екзон 7/-екзон 7	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO.
Сольовий розчин	н.д.	1,00	н.д.	н.д.	н.д.
387954	32	1,65	н.д.	н.д.	43
387954	288	5,00	н.д.	н.д.	43
699819	32	7,84	GalNAc ₃ -7a	PO	43
699821	32	7,22	GalNAc ₃ -7a	PO	43
700000	32	6,91	GalNAc ₃ -1a	A _d	44
703421	32	1,27	н.д.	н.д.	43
703422	32	4,12	GalNAc ₃ -7b	н.д.	43

- 20 Приклад 89. Антисмислове інгібування in vivo під дією олігонуклеотидів, націлених на аполіпопротеїн А (Apo(a)), що містять кон'югат GalNAc₃

Олігонуклеотиди, наведені нижче у Табл. 79, випробували в дослідженні дозозалежного інгібування Apo(a) у трансгенних мишей.

Таблиця 79

Модифіковані ASO, націлені на Aро(a)

ISIS №	Послідовність (від 5" до 3")	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO.
494372	T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} ^m C _e	н.д.	н.д.	53
681257	GalNAc ₃ -7 _a -o-T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	53

Структура GalNAc₃-7_a показана у Прикладі 48.

Лікування

- 5 Восьмитижневим самкам мишей C57BL/6 (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мен) один раз на тиждень вводили підшкірну ін'єкцію дози, представленої нижче, в цілому шість доз олігонуклеотиду, наведеного в Табл. 79, або PBS. Кожна експериментальна група складалася із 3-4 тварин. Зразки крові з хвостової вени відбирали за день до введення першої дози і щотижня після введення кожної дози для визначення рівнів білка Aро(a) в плазмі. Мишей умертвили
- 10 через два дні після останнього введення. Рівні мРНК Aро(a) в печінці визначили за допомогою ПЛР у реальному часі і реагенту для кількісного визначення РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) за стандартними протоколами. Рівні білка Aро(a) в плазмі визначили за допомогою твердофазного імуоферментного аналізу, і визначили рівні трансамінази в печінці. Результати аналізу мРНК і білка в плазмі в Табл. 80 представлені як
- 15 середнє відсоткове значення для експериментальної групи відносно групи, обробленої PBS. Рівні білка в плазмі додатково нормалізували до початкового значення (BL) для групи з PBS. Середні абсолютні рівні трансамінази і маса тіла (% відносно середнього початкового значення) представлені у Табл. 81.

- 20 Як показано у Табл. 80, лікування олігонуклеотидами знижує рівні мРНК Aро(a) в печінці і рівні білка в плазмі дозозалежним чином. Крім того, олігонуклеотид, що містить кон'югат GalNAc, був значно ефективнішим з тривалішою дією, ніж початковий олігонуклеотид, що не містить кон'югату GalNAc. Як показано у Табл. 81, представлені олігонуклеотиди не впливають на рівні трансамінази і маси тіла, що вказує на хорошу переносимість олігонуклеотидів.

Таблиця 80

Рівні мРНК Aро(a) в печінці і білка в плазмі

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК Aро(a) (% PBS)	Білок Aро(a) в плазмі (% PBS)						
			BL	Тиж- день 1	Тиж- день 2	Тиж- день 3	Тиж- день 4	Тиж- день 5	Тиж- день 6
PBS	н.д.	100	100	120	119	113	88	121	97
494372	3	80	84	89	91	98	87	87	79
	10	30	87	72	76	71	57	59	46
	30	5	92	54	28	10	7	9	7
681257	0,3	75	79	76	89	98	71	94	78
	1	19	79	88	66	60	54	32	24
	3	2	82	52	17	7	4	6	5
	10	2	79	17	6	3	2	4	5

25

Таблиця 81

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (Од/л)	AST (Од/л)	Маса тіла (% від початкового значення)
PBS	н.д.	37	54	103
494372	3	28	68	106
	10	22	55	102
	30	19	48	103
	0,3	30	80	104
681257	1	26	47	105
	3	29	62	102
	10	21	52	107

Приклад 90. Антисмислове інгібування in vivo під дією олігонуклеотидів, націлених на TTR, що містять кластер GalNAc₃

- 5 Олігонуклеотиди, наведені нижче у Табл. 82, випробували в дозозалежному дослідженні антисмислового інгібування людського транстиретину (TTR) у трансгенних мишей, які експресують людський TTR ген.

Лікування

- 10 TTR трансгенним мишам один раз на тиждень протягом трьох тижнів, в цілому три дози, вводили підшкірну ін'єкцію олігонуклеотиду і дози, наведених в Табл. 83, або PBS. Кожна експериментальна група складалася із 4 тварин. Перед введенням першої дози узяли зразок крові з хвостової вени для визначення рівнів білка TTR в плазмі в початковому стані (BL). Мишей умертвили через 72 години після останнього введення. Рівні білка TTR виміряли за допомогою клінічного аналізатора (AU480, Beckman Coulter, штат Каліфорнія). ПЛР у реальному часі і реагент для кількісного визначення РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) застосовували за стандартними протоколами для визначення рівнів мРНК людського TTR в печінці. Результати, наведені в Табл. 83, є середніми значеннями для кожної експериментальної групи. Рівні мРНК є середніми значеннями відносно середнього значення для PBS групи. Рівні білка в плазмі є середніми значеннями відносно середнього значення для PBS групи в початковому стані. "BL" позначає початкове значення вимірювань, виконаних безпосередньо перед введенням першої дози. Як показано в Табл. 83, лікування антисмисловими олігонуклеотидами знижує рівні експресії TTR дозозалежним чином. Олігонуклеотид, що містить кон'югат GalNAc, був ефективнішим, ніж початкова сполука без кон'югату GalNAc (ISIS 420915), а олігонуклеотиди, що містять фосфодіестерний або дезоксиденозинний розщеплюваний фрагмент, демонстрували значне підсилення ефективності, порівняно з початковою сполукою, що не містить кон'югату (див. ISIS № 682883 і 666943 порівняно з 420915, а також див. Приклади 86 і 87).

Таблиця 82

Олігонуклеотиди, націлені на людський TTR

Isis №	Послідовність від 5' до 3'	Зв'язки	Кластер GalNAc	CM	SEQ ID NO.
420915	T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS	н.д.	н.д.	41
682883	GalNAc ₃ -3 _{a-o'} T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS/PO	GalNAc ₃ -3a	PO	41
666943	GalNAc ₃ -3 _{a-o'} A _{do} T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{do} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS/PO	GalNAc ₃ -3a	A _d	45
682887	GalNAc ₃ -7 _{a-o'} A _{do} T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{do} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS/PO	GalNAc ₃ -7a	A _d	45
682888	GalNAc ₃ -10 _{a-o'} A _{do} T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{do} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS/PO	GalNAc ₃ -10a	A _d	45
682889	GalNAc ₃ -13 _{a-o'} A _{do} T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{do} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS/PO	GalNAc ₃ -13a	A _d	45

- 30 Легенда для Табл. 82 представлена у Прикладі 74. Структура GalNAc₃-3_a показана у

Прикладі 39. Структура GalNAc₃-7_a показана у Прикладі 48. Структура GalNAc₃-10_a показана у Прикладі 46. Структура GalNAc₃-13_a показана у Прикладі 62.

Таблиця 83

Антисмислове інгібування людського TTR in vivo

Isis №	Доза (мг/кг)	мРНК TTR (% PBS)	Білок TTR (% BL)	Кластер GalNAc	CM
PBS	н.д.	100	124	н.д.	н.д.
420915	6	69	114	н.д.	н.д.
	20	71	86		
	60	21	36		
	0,6	61	73		
682883	2	23	36	GalNAc ₃ -3a	PO
	6	18	23		
	0,6	74	93		
666943	2	33	57	GalNAc ₃ -3a	A _d
	6	17	22		
	0,6	60	97		
682887	2	36	49	GalNAc ₃ -7a	A _d
	6	12	19		
	0,6	65	92		
682888	2	32	46	GalNAc ₃ -10a	A _d
	6	17	22		
	0,6	72	74		
682889	2	38	45	GalNAc ₃ -13a	A _d
	6	16	18		

5 Приклад 91. Антисмислове інгібування in vivo під дією олігонуклеотидів, націлених на фактор VII, що містять кон'югат GalNAc₃, у приматів, що не є людиною

Олігонуклеотиди, наведені нижче у Табл. 84, випробували в нетермінальному дослідженні з підвищенням дози на антисмислове інгібування фактора VII у мавп.

Лікування

10 Мавпам, яких раніше не використовували в експериментах, на 0-й, 15-й і 29-й день вводили підшкірні ін'єкції доз олігонуклеотидів, наведених в Табл. 84, що підвищувалися, або PBS. Кожна експериментальна група складалася із 4 самців і 1 самки. Перед введенням першої дози і в різних точках часу після нього відбирали зразки крові для визначення рівнів білка фактора VII в плазмі. Рівні білка фактора VII визначали за допомогою твердофазного імуноферментного

15 аналізу. Результати, наведені у Табл. 85, є середніми значеннями для кожної експериментальної групи відносно середнього значення для групи PBS в початковому стані (BL), вимірювання виконані безпосередньо перед введенням першої дози. Як показано у Табл. 85, лікування антисмисловими олігонуклеотидами знижує рівні експресії фактора VII дозозалежним чином, і олігонуклеотид, що містить кон'югат GalNAc, був значно ефективнішим у

20 мавп, ніж олігонуклеотид, що не містить кон'югату GalNAc.

Таблиця 84

Олігонуклеотиди, націлені на фактор VII

Isis №	Послідовність від 5' до 3'	Зв'язки	Кластер GalNAc	CM	SEQ ID NO.
407935	A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} A _e	PS	н.д.	н.д.	46
686892	GalNAc ₃ -10 _{a-o'} A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} A _e	PS	GalNAc ₃ -10a	PO	46

Легенда для Табл. 84 представлена у Прикладі 74. Структура GalNAc₃-10_a показана у Прикладі 46.

Рівні білка фактора VII в плазмі

ISIS №	День	Доза (мг/кг)	Фактор VII (% BL)
407935	0	н.д.	100
	15	10	87
	22	н.д.	92
	29	30	77
	36	н.д.	46
	43	н.д.	43
686892	0	3	100
	15	10	56
	22	н.д.	29
	29	30	19
	36	н.д.	15
	43	н.д.	11

Приклад 92. Антисмислове інгібування в первинних гепатоцитах під дією олігонуклеотидів, націлених на Apo-CIII, що містять кон'югат GalNAc₃

- Первинні мишачі гепатоцити висівали на 96-ямкові планшети при 15000 клітин на ямку і додавали олігонуклеотиди, наведені у Табл. 86, націлені на мишачий ApoC-III, в концентрації 0,46, 1,37, 4,12 або 12,35, 37,04, 111,11 або 333,33 нМ або 1,00 мкМ. Після інкубації з олігонуклеотидами протягом 24 годин клітини лізували і очистили загальну РНК за допомогою RNeasy (Qiagen). Рівні мРНК ApoC-III визначили за допомогою ПЛР у реальному часі і реагенту для кількісного визначення РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc.) за стандартними протоколами. Значення IC₅₀ визначили за допомогою програми Prism 4 (GraphPad). Результати демонструють, що незалежно від того, чи є розщеплюваний фрагмент фосфодіестером або фосфодіестер-зв'язаним дезоксиаденозином, олігонуклеотиди, що містять кон'югат GalNAc, були значно ефективнішими, ніж початковий олігонуклеотид, що не містить кон'югату.

Таблиця 86

Інгібування експресії мишачого APOC-III в первинних гепатоцитах мишей

ISIS №	Послідовність (від 5' до 3')	CM	IC ₅₀ (нМ)	SEQ ID NO.
440670	^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	н.д.	13,20	47
661180	^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -1 _a	A _d	1,40	48
680771	GalNAc ₃ -3 _{a-o'} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	PO	0,70	47
680772	GalNAc ₃ -7 _{a-o'} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	PO	1,70	47
680773	GalNAc ₃ -10 _{a-o'} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	PO	2,00	47
680774	GalNAc ₃ -13 _{a-o'} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	PO	1,50	47
681272	GalNAc ₃ -3 _{a-o'} ^m C _{es} A _{eo} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{eo} A _{eo} G _{es} ^m C _{es} A _e	PO	< 0,46	47
681273	GalNAc ₃ -3 _{a-o'} A _{do} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	A _d	1,10	49
683733	^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -19 _a	A _d	2,50	48

Структура GalNAc₃-1_a показана раніше у Прикладі 9, GalNAc₃-3_a показана у Прикладі 39, GalNAc₃-7_a показана у Прикладі 48, GalNAc₃-10_a показана у Прикладі 46, і GalNAc₃-13_a показана у Прикладі 62, і GalNAc₃-19_a показана у Прикладі 70.

Приклад 93. Антисмислове інгібування *in vivo* під дією олігонуклеотидів, націлених на SRB-1, що містять змішані крила і 5'-GalNAc₃ кон'югат

Олігонуклеотиди, наведені у Табл. 87, випробували в дозозалежному дослідженні антисмислового інгібування SRB-1 у мишей.

5

Таблица 87

Модифіковані ASO, націлені на SRB-1

ISIS №	Послідовність (від 5" до 3")	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO.
449093	T _{ks} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _k	н.д.	н.д.	50
699806	GalNAc ₃ -3 _a -o ⁻ T _{ks} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -3a	PO	50
699807	GalNAc ₃ -7 _a -o ⁻ T _{ks} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -7a	PO	50
699809	GalNAc ₃ -7 _a -o ⁻ T _{ks} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	50
699811	GalNAc ₃ -7 _a -o ⁻ T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -7a	PO	50
699813	GalNAc ₃ -7 _a -o ⁻ T _{ks} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ds} ^m C _k	GalNAc ₃ -7a	PO	50
699815	GalNAc ₃ -7 _a -o ⁻ T _{es} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	50

Структура GalNAc₃-3_a показана раніше у Прикладі 39, а структура GalNAc₃-7_a показана раніше у Прикладі 48. Нижні індекси: "e" позначає 2'-MOE модифікований нуклеозид; "d" позначає β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "k" позначає 6'-(S)-CH₃ біциклічний нуклеозид (сEt); "s" позначає тіофосфатні міжнуклеозидні зв'язки (PS); "o" позначає фосфодіестерні міжнуклеозидні зв'язки (PO). Верхній індекс "m" позначає 5-метилцитозини.

Лікування

Шести-восьмитижневим мишам C57BL/6 (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мен) ввели одноразову підшкірну ін'єкцію дози, представленої нижче, олігонуклеотиду, наведеного у Табл. 87, або сольового розчину. Кожна експериментальна група складалася із 4 тварин. Мишей умертвили через 72 години після останнього введення. Рівні мРНК SRB-1 у печінці виміряли за допомогою ПЛР у реальному часі. Рівні мРНК SRB-1 нормалізували до рівнів мРНК циклофіліну за стандартними протоколами. Результати, наведені нижче, представлені як середній відсоток рівнів мРНК SRB-1 для кожної експериментальної групи, порівняно з контрольною групою, обробленою сольовим розчином. Як показано у Табл. 88, лікування антисмисловими олігонуклеотидами знижує рівні мРНК SRB-1 дозозалежним чином, а гепмерні олігонуклеотиди, що містять кон'югат GalNAc і мають крила, які є або повністю сEt або змішаними цукровими модифікаціями, були значно ефективнішими, ніж початковий олігонуклеотид, що не містить кон'югату і містить повністю сEt модифіковані крила.

Виміряли також масу тіла, рівні трансамінази в печінці, загальний білірубін і НСК, а середні значення для кожної експериментальної групи представлені у Табл. 88. Маса тіла показана як середній відсоток маси тіла відносно початкової маси тіла (% BL), виміряної безпосередньо перед введенням дози олігонуклеотиду.

Таблица 88

Рівні мРНК SRB-1, ALT, AST, НСК і загального білірубину, а також маси тіла

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% PBS)	ALT (Од/л)	AST (Од/л)	Білірубін	НСК	Маса тіла (% BL)
PBS	н.д.	100	31	84	0,15	28	102
449093	1	111	18	48	0,17	31	104
	3	94	20	43	0,15	26	103
	10	36	19	50	0,12	29	104
	0,1	114	23	58	0,13	26	107
699806	0,3	59	21	45	0,12	27	108

Таблиця 88

Рівні мРНК SRB-1, ALT, AST, HCK і загального білірубину, а також маси тіла

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% PBS)	ALT (Од/л)	AST (Од/л)	Білірубін	HCK	Маса тіла (% BL)
	1	25	30	61	0,12	30	104
699807	0,1	121	19	41	0,14	25	100
	0,3	73	23	56	0,13	26	105
	1	24	22	69	0,14	25	102
699809	0,1	125	23	57	0,14	26	104
	0,3	70	20	49	0,10	25	105
	1	33	34	62	0,17	25	107
699811	0,1	123	48	77	0,14	24	106
	0,3	94	20	45	0,13	25	101
	1	66	57	104	0,14	24	107
699813	0,1	95	20	58	0,13	28	104
	0,3	98	22	61	0,17	28	105
	1	49	19	47	0,11	27	106
699815	0,1	93	30	79	0,17	25	105
	0,3	64	30	61	0,12	26	105
	1	24	18	41	0,14	25	106

Приклад 94. Антисмислове інгібування in vivo під дією олігонуклеотидів, націлених на SRB-1, що містять 2'-цукрові модифікації і 5'-GalNAc₃ кон'югат

Олігонуклеотиди, наведені у Табл. 89, випробували в дозозалежному дослідженні антисмислового інгібування SRB-1 у мишей.

Таблиця 89

Модифіковані ASO, націлені на SRB-1

ISIS №	Послідовність (від 5' до 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO.
353382	G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	н.д.	н.д.	28
700989	G ^m _{ms} C ^m _{ms} U ^m _{ms} U ^m _{ms} C ^m _{ms} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} U ^m _{ms} C ^m _{ms} C ^m U ^m _{ms} U ^m _m	н.д.	н.д.	51
666904	GalNAc ₃ -3'-a'-o'-G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	GalNAc ₃ -3a	PO	28
700991	GalNAc ₃ -7'-a'-o'-G ^m _{ms} C ^m _{ms} U ^m _{ms} U ^m _{ms} C ^m _{ms} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} U ^m _{ms} C ^m _{ms} C ^m _{ms} U ^m _{ms} U ^m _m	GalNAc ₃ -7a	PO	51

Нижній індекс "m" позначає 2'-О-метил-модифікований нуклеозид. Повна легенда до таблиці представлена у Прикладі 74. Структура GalNAc₃-3_a показана раніше у Прикладі 39, а структура GalNAc₃-7_a показана раніше у Прикладі 48.

Лікування

Дослідження виконали за протоколом, описаним у Прикладі 93. Результати представлені нижче у Табл. 90 і демонструють, що і 2'-МОЕ, і 2'-ОМЕ-модифіковані олігонуклеотиди, які містять кон'югат GalNAc, були значно ефективнішими, ніж відповідні початкові олігонуклеотиди, що не містять кон'югату. Результати вимірювань маси тіла, трансамінази в печінці, загального білірубину і HCK демонструють, що ці сполуки добре переносяться.

Таблиця 90

мПНК SRB-1

ISIS №	Доза (мг/кг)	мПНК SRB-1 (% PBS)
PBS	н.д.	100
353382	5	116
	15	58
	45	27
700989	5	120
	15	92
	45	46
666904	1	98
	3	45
	10	17
700991	1	118
	3	63
	10	14

Приклад 95. Антисмислове інгібування *in vivo* під дією олігонуклеотидів, націлених на SRB-1, що містять біциклічні нуклеозиди і 5'-GalNAc₃ кон'югат

5 Олігонуклеотиди, наведені у Табл. 91, випробували в дозозалежному дослідженні антисмислового інгібування SRB-1 у мишей.

Таблиця 91

Модифіковані ASO, націлені на SRB-1

ISIS №	Послідовність (від 5' до 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID No
440762	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	н.д.	н.д.	22
666905	GalNAc ₃ -3 _a - o' _{ks} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -3 _a	PO	22
699782	GalNAc ₃ -7 _a - o' _{ks} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -7 _a	PO	22
699783	GalNAc ₃ -3 _a -o' _{ls} T _{ls} ^m C _{ls} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ls} ^m C _l	GalNAc ₃ -3 _a	PO	22
653621	T _{ls} ^m C _{ls} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ls} ^m C _{lo} A _{do} '- GalNAc ₃ -1 _a	GalNAc ₃ -1 _a	A _d	23
439879	T _{gs} ^m C _{gs} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _d G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{gs} ^m C _q	н.д.	н.д.	22
699789	GalNAc ₃ -3 _a -o' _{gs} T _{gs} ^m C _{gs} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _d G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{gs} ^m C _q	GalNAc ₃ -3 _a	PO	22

10 Нижній індекс "g" позначає флуор-HNA нуклеозид, нижній індекс "l" позначає закритий нуклеозид, що містить місток 2'-O-CH₂-4". Інші скорочення представлені в легенді таблиці Прикладу 74. Структура GalNAc₃-1_a показана раніше у Прикладі 9, структура GalNAc₃-3_a показана раніше у Прикладі 39, а структура GalNAc₃-7_a показана раніше у Прикладі 48.

Лікування

15 Дослідження виконали за протоколом, описаним у Прикладі 93. Результати представлені нижче у Табл. 92 і демонструють, що олігонуклеотиди, які містять кон'югат GalNAc і різні біциклічні нуклеозидні модифікації, були значно ефективнішими, ніж початковий олігонуклеотид, що не містить кон'югату і містить біциклічні нуклеозидні модифікації. Крім того, олігонуклеотид, що містить кон'югат GalNAc і флуор-HNA модифікації, був значно ефективнішим, ніж початкова сполука, що не містить кон'югату і містить флуор-HNA модифікації. Результати вимірювань маси тіла, трансамінази в печінці, загального білірубину і НСК демонструють, що ці сполуки добре переносяться.

20

Таблиця 92

Рівні мРНК SRB-1, ALT, AST, HCK і загального білірубину, а також маси тіла

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% PBS)
PBS	н.д.	100
440762	1	104
	3	65
	10	35
666905	0,1	105
	0,3	56
	1	18
699782	0,1	93
	0,3	63
	1	15
699783	0,1	105
	0,3	53
	1	12
653621	0,1	109
	0,3	82
	1	27
439879	1	96
	3	77
	10	37
699789	0,1	82
	0,3	69
	1	26

Приклад 96. Зв'язування білка плазми антисмисловими олігонуклеотидами, що містять кон'югувальну групу GalNAc₃

- 5 Олігонуклеотиди, наведені у Табл. 57, націлені на ApoC-III, і олігонуклеотиди у Табл. 93, націлені на Apo(a), випробували в аналізі ультрафільтрації для оцінки зв'язування білка в плазмі.

Таблиця 93

Модифіковані олігонуклеотиди, націлені на Apo(a)

ISIS №	Послідовність (від 5' до 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID No
494372	T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} T _{es} ^m C _e	н.д.	н.д.	53
693401	T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	н.д.	н.д.	53
681251	GalNAc ₃ -7'-a'-o'-T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7 _a	PO	53
681257	GalNAc ₃ -7'-a'-o'-T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7 _a	PO	53

- 10 Легенда таблиці представлена у Прикладі 74. Структура GalNAc₃-7_a показана раніше у Прикладі 48.

- 15 Елементи для ультрафільтрації Ultrafree-MC (номінальне обмеження молекулярної маси 30000, слабкозв'язувальна регенована целюозна мембрана, Millipore, Бедфорд, штат Масачусетс) попередньо кондиціонували з 300 мкл 0,5 % Tween 80 і центрифугували при 2000 g протягом 10 хвилин, потім з 300 мкл 300 мкг/мл розчину контрольного олігонуклеотиду в H₂O і центрифугували при 2000 g протягом 16 хвилин. Для оцінки неспецифічного зв'язування з фільтрами кожного досліджуваного олігонуклеотиду із Табл. 57 і 93, які застосовували у випробуваннях, 300 мкл 250 нг/мл розчину олігонуклеотиду в H₂O при pH 7,4 вмістили на

попередньо кондиційовані фільтри і центрифугували при 2000 g протягом 16 хвилин. Нефільтровані і фільтровані зразки аналізували твердофазним імуноферментним аналізом для визначення концентрацій олігонуклеотидів. Для одержання середньої концентрації для кожного зразка виконували три паралельних експерименти. Середню концентрацію фільтрованого зразка відносно нефільтрованого зразка застосовували для визначення відсотка олігонуклеотиду, що пройшов через фільтр без плазми (% виділення).

Заморожені зразки цільної плазми, зібрані в КЗ-ЕДТК і одержані від здорових, не приймаючих лікарських засобів людей-добровольців, макак яванців і мишей CD-1, придбали у компанії Bioreclamation LLC (Вестбері, штат Нью-Йорк). Досліджувані олігонуклеотиди додавали до 1,2 мл аліквот плазми у двох концентраціях (5 і 150 мкг/мл). Аліквоту (300 мкл) кожного маркованого зразка плазми вмістили на попередньо кондиційований фільтрувальний елемент та інкубували при 37 °C протягом 30 хвилин, потім негайно виконали центрифугування при 2000 g протягом 16 хвилин. Аліквоти фільтрованих і нефільтрованих маркованих зразків плазми аналізували твердофазним імуноферментним аналізом для визначення концентрації олігонуклеотиду в кожному зразку. Виконували три паралельних експерименти для кожної концентрації для визначення середнього відсотка зв'язаного і незв'язаного олігонуклеотиду в кожному зразку. Середню концентрацію фільтрованого зразка відносно концентрації нефільтрованого зразка використали для визначення відсотка олігонуклеотиду в плазмі, не зв'язаного з білками плазми (% незв'язаного). Кінцеві значення незв'язаного олігонуклеотиду коректували на неспецифічне зв'язування шляхом ділення % незв'язаного на % виділення для кожного олігонуклеотиду. Кінцеві значення % зв'язаного олігонуклеотиду визначили відніманням кінцевих значень % незв'язаного від 100. Результати показані у Табл. 94 для двох концентрацій випробуваного олігонуклеотиду (5 і 150 мкг/мл) в плазмі кожного виду. Результати демонструють, що кон'югувальні групи GalNAc не здійснюють істотного впливу на зв'язування білка плазми. Крім того, олігонуклеотиди, що містять тільки PS міжнуклеозидні зв'язки і змішані PO/PS зв'язки, - обидва варіанти зв'язують білки плазми, при цьому олігонуклеотиди, що містять тільки PS зв'язки, зв'язують білки плазми дещо більшою мірою, ніж олігонуклеотиди, що містять змішані PO/PS зв'язки.

Таблиця 94

Відсоток модифікованого олігонуклеотиду, зв'язаного з білками плазми

ISIS №	Плазма людини		Плазма мавп		Плазма мишей	
	5 мкг/мл	150 мкг/мл	5 мкг/мл	150 мкг/мл	5 мкг/мл	150 мкг/мл
304801	99,2	98,0	99,8	99,5	98,1	97,2
663083	97,8	90,9	99,3	99,3	96,5	93,0
674450	96,2	97,0	98,6	94,4	94,6	89,3
494372	94,1	89,3	98,9	97,5	97,2	93,6
693401	93,6	89,9	96,7	92,0	94,6	90,2
681251	95,4	93,9	99,1	98,2	97,8	96,1
681257	93,4	90,5	97,6	93,7	95,6	92,7

Приклад 97. Модифіковані олігонуклеотиди, націлені на TTR, що містять кон'югувальну групу GalNAc₃

Олігонуклеотиди, представлені у Табл. 95, що містять кон'югат GalNAc, призначені для впливу на TTR.

Таблиця 95

Модифіковані олігонуклеотиди, націлені на TTR

ISIS №	Послідовність (від 5' до 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID No
666941	GalNAc ₃ -3 _{a-o'} A _{do} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -3	A _d	45
666942	T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -3 _a	GalNAc ₃ -1	A _d	42
682876	GalNAc ₃ -3 _{a-o'} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -3	PO	41

Модифіковані олігонуклеотиди, націлені на TTR

ISIS №	Послідовність (від 5" до 3")	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID No
682877	GalNAc ₃ -7 _{a-o'} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7	PO	41
682878	GalNAc ₃ -10 _{a-o'} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -10	PO	41
682879	GalNAc ₃ -13 _{a-o'} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -13	PO	41
682880	GalNAc ₃ -7 _{a-o'} A _{do} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7	A _d	45
682881	GalNAc ₃ -10 _{a-o'} A _{do} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -10	A _d	45
682882	GalNAc ₃ -13 _{a-o'} A _{do} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -13	A _d	45
684056	T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e A _{do} -GalNAc ₃ -19 _a	GalNAc ₃ -19	A _d	42

Легенда для Табл. 95 представлена у Прикладі 74. Структура GalNAc₃-1 показана у Прикладі 9. Структура GalNAc₃-3_a показана у Прикладі 39. Структура GalNAc₃-7_a показана у Прикладі 48. Структура GalNAc₃-10_a показана у Прикладі 46. Структура GalNAc₃-13_a показана у Прикладі 62. Структура GalNAc₃-19_a показана у Прикладі 70.

Приклад 98. Оцінка прозапальної дії олігонуклеотидів, що містять кон'югат GalNAc, в аналізі hPMBC

Олігонуклеотиди, наведені у Табл. 96, досліджували на прозапальну дію в аналізі hPMBC, описаному у Прикладах 23 і 24 (див. Табл. 17, 70, 82 і 95, де представлений опис олігонуклеотидів). ISIS 353512 має високу відповідь, і його застосовували як позитивний контроль, а інші олігонуклеотиди описані у Табл. 70, 82 і 95. Результати, представлені у Табл. 96, одержані із застосуванням крові, одержаної від одного донора-добровольця. Результати демонструють, що олігонуклеотиди, які містять змішані PO/PS міжнуклеозидні зв'язки, спричиняють значно слабші прозапальні реакції, порівняно з тими ж олігонуклеотидами, що містять тільки PS зв'язки. Крім того, в цьому аналізі кон'югувальна група GalNAc не здійснює істотного впливу.

Таблиця 96

ISIS №	E _{max} /EC ₅₀	Кластер GalNAc ₃	Зв'язки	CM
353512	3630	н.д.	PS	н.д.
420915	802	н.д.	PS	н.д.
682881	1311	GalNAc ₃ -10	PS	A _d
682888	0,26	GalNAc ₃ -10	PO/PS	A _d
684057	1,03	GalNAc ₃ -19	PO/PS	A _d

Приклад 99. Зв'язувальні афінності олігонуклеотидів, що містять кон'югат GalNAc, відносно асіалоглікопротеїнового рецептора

Зв'язувальні афінності олігонуклеотидів, наведених у Табл. 97 (див. Табл. 63, у якій представлено опис олігонуклеотидів), відносно асіалоглікопротеїнового рецептора випробували в аналізі конкурентного зв'язування рецепторів. Конкуруючий ліганд, α1-кислий глікопротеїн (AGP), інкубували у 50 мМ ацетатно-натрієвому буфері (pH 5) з 1 Од нейрамінідази-агарози протягом 16 годин при 37 °C, і > 90 % дезаліювання підтвердили аналізом із сіаловою кислотою або ексклюзійною хроматографією (SEC). Для йодування АГФ застосували монохлорид йоду за способом, описаним авторами Atsma et al. (див. J Lipid Res. січень 1991 г.; 32(1):173-81.) У даному способі дезаліюваний α1-кислий глікопротеїн (de-AGP) додавали до 10 мМ хлориду йоду, Na¹²⁵I з 1 М гліцину у 0,25 М NaOH. Після інкубації протягом 10 хвилин при кімнатній температурі, ¹²⁵I-мічений de-AGP відокремили від вільного ¹²⁵I дворазовим концентруванням суміші із застосуванням спін-колонки з номінальним відсіканням за молекулярною масою 3 кДа. Білок випробували на ефективність мічення і чистоту на системі ВЕРХ, обладнану колонкою

- Agilent SEC-3 (7,8 × 300 мм) та лічильником β -RAM. Конкурентні дослідження із застосуванням ^{125}I -міченого de-AGP і ASO, що містять різні GalNAc-кластери, виконали наступним чином. Людські клітини HepG2 (10^6 клітин/мл) вмістили на 6-ямкові планшети у 2 мл відповідного поживного середовища. Застосовували середовище MEM з додаванням 10 % фетальної бичачої сироватки (FBS), 2 мМ L-глутаміну і 10 мМ HEPES. Клітини вирощували протягом 16-20 годин при 37 °C з 5 % і 10 % CO_2 , відповідно. Перед експериментом клітини промили середовищем без FBS. Клітини вирощували протягом 30 хвилин при 37 °C з 1 мл конкурентної суміші, що містила відповідне поживне середовище з 2 % FBS, 10^{-8} М ^{125}I -міченого de-AGP та ASO, що містив GalNAc-кластер в концентраціях у діапазоні від 10^{-11} до 10^{-5} М. Неспецифічне зв'язування визначали в присутності 10^{-2} М GalNAc цукру. Клітини двічі промили середовищем без FBS для видалення незв'язаного ^{125}I -міченого de-AGP і конкуруючого GalNAc ASO. Клітини лізували із застосуванням буфера RLT виробництва компанії Qiagen, що містить 1 % β -меркаптоетанолу. Лізати перенесли до круглодонних аналітичних пробірок після швидкого 10-хвилинного циклу заморожування/розморожування, і аналізували на γ -лічильнику. Неспецифічне зв'язування відняли, і далі розділили імпульси білка ^{125}I на значення імпульсів при найнижчій концентрації GalNAc-ASO. Криві інгібування побудували за рівняннями моносайтового конкурентного зв'язування, застосувавши алгоритм нелінійної регресії для розрахунку зв'язувальної афінності (K_D).
- Результати у Табл. 97 були одержані в експериментах, виконаних у п'ять різних днів. Результати для олігонуклеотидів, відмічених верхнім індексом "а", є середніми значеннями експериментів, виконаних у два різні дні. Результати демонструють, що олігонуклеотиди, які містять кон'югувальну групу GalNAc на 5'-кінці, зв'язують асіалоглікопротеїновий рецептор людських клітин HepG2 з афінністю, що є в 1,5-16 разів більшою, ніж для олігонуклеотидів, які містять кон'югувальну групу GalNAc на 3'-кінці.

Таблиця 97

Результати аналізу зв'язування асіалоглікопротеїнового рецептора

ISIS №	Кон'югат GalNAc	Кінець олігонуклеотиду, до якого приєднаний кон'югат GalNAc	K_D (нМ)
661161 ^a	GalNAc ₃ -3	5'	3,7
666881 ^a	GalNAc ₃ -10	5'	7,6
666981	GalNAc ₃ -7	5'	6,0
670061	GalNAc ₃ -13	5'	7,4
655861 ^a	GalNAc ₃ -1	3'	11,6
677841 ^a	GalNAc ₃ -19	3'	60,8

Приклад 100. Антисмислове інгібування *in vivo* під дією олігонуклеотидів, що містять кон'югувальну групу GalNAc, націлених на Apo(a), *in vivo*

- Олігонуклеотиди, наведені нижче у Табл. 98a, випробували в дослідженні одноразової дози на тривалість дії у мишей.

Таблиця 98a

Модифіковані ASO, націлені на Apo(a)

ISIS №	Послідовність (від 5' до 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO.
681251	GalNAc ₃ -7 _a -o'-T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	53
681257	GalNAc ₃ -7 _a -o'-T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	53

Структура GalNAc₃-7_a показана у Прикладі 48.

Лікування

- Кожній самці трансгенних мишей, які експресують людський Apo(a), один раз на тиждень, в цілому 6 доз, вводили підшкірну ін'єкцію олігонуклеотиду і дози, наведеної у Табл. 98b, або PBS. Кожна експериментальна група складалася із 3 тварин. Зразки крові відбирали за день до введення дози для визначення початкових рівнів білка Apo(a) в плазмі, а також через 72 години,

- 1 тиждень і 2 тижні після введення першої дози. Додаткові проби крові відбирали через 3 тижні, 4 тижні, 5 тижнів і 6 тижнів після введення першої дози. Рівні білка Аро(а) в плазмі вимірювали за допомогою твердофазного імуоферментного аналізу. Результати у Табл. 98b представлені як середній відсоток від рівнів білка Аро(а) в плазмі для кожної експериментальної групи, нормалізованих до початкових рівнів (% BL). Результати показують, що олігонуклеотиди, які містять кон'югувальну групу GalNAc, демонструють ефективне зниження експресії Аро(а). Вказаний потужний ефект спостерігали для олігонуклеотиду, що містить тільки PS міжнуклеозидні зв'язки, і для олігонуклеотиду, що містить змішані PO і PS зв'язки.

Таблиця 98b

Рівні білка Аро(а) в плазмі

ISIS №	Доза (мг/кг)	Аро(а) через 72 години (% BL)	Аро(а) через 1 тиждень (% BL)	Аро(а) через 3 тижні (% BL)
PBS	н.д.	116	104	107
681251	0,3	97	108	93
	1,0	85	77	57
	3,0	54	49	11
	10,0	23	15	4
681257	0,3	114	138	104
	1,0	91	98	54
	3,0	69	40	6
	10,0	30	21	4

Приклад 101. Антисмислове інгібування олігонуклеотидами, що містять кластер GalNAc, зв'язаний через стабільний фрагмент

Олігонуклеотиди, наведені у Табл. 99, випробували на інгібування експресії мишачого АРОС-III in vivo. Мишам C57Bl/6 ввели одноразову підшкірну ін'єкцію олігонуклеотиду, наведеного у Табл. 99, або PBS. Кожна експериментальна група складалася із 4 тварин. Кожній миші, обробленій сполукою ISIS 440670, ввели дозу 2, 6, 20 або 60 мг/кг. Кожній миші, обробленій сполукою ISIS 680772 або 696847, ввели 0,6, 2, 6 або 20 мг/кг. Кон'югувальна група GalNAc в ISIS 696847 зв'язана через стабільний фрагмент, тіофосфатний зв'язок, замість легко розщеплюваного фосфодіестер-вмісного зв'язку. Тварин умертвили через 72 години після введення дози. Рівні мРНК АРОС-III в печінці виміряли за допомогою ПЛР у реальному часі. Рівні мРНК АРОС-III нормалізували до рівнів мРНК циклофіліну за стандартними протоколами. Результати представлені у Табл. 99 як середній відсоток рівнів мРНК АРОС-III для кожної експериментальної групи, порівняно з контрольною групою, обробленою сольовим розчином. Результати демонструють, що олігонуклеотиди, які містять кон'югувальну групу GalNAc, були значно ефективнішими, ніж олігонуклеотид, що не містить кон'югувальної групи. Крім того, олігонуклеотид, що містить кон'югувальну групу GalNAc, з'єднану з олігонуклеотидом через розщеплюваний фрагмент (ISIS 680772), був ще ефективнішим, ніж олігонуклеотид, що містить кон'югувальну групу GalNAc, з'єднану з олігонуклеотидом через стабільний фрагмент (ISIS 696847).

Таблиця 99

Модифіковані олігонуклеотиди, націлені на мишачий АРОС-III

ISIS №	Послідовність (від 5' до 3')	СМ	Доза (мг/кг)	мРНК АРОС-III (% PBS)	SEQ ID NO.
440670	${}^m\text{C}_{\text{es}}\text{A}_{\text{es}}\text{G}_{\text{es}}{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}$ $\text{G}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{A}_{\text{es}}\text{G}_{\text{es}}{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{A}_{\text{e}}$	н.д.	2	92	47
			6	86	
			20	59	
			60	37	
680772	$\text{GalNAc}_3\text{-T}_{\text{a-o'}}{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{A}_{\text{es}}\text{G}_{\text{es}}{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}$ $\text{T}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{A}_{\text{es}}\text{G}_{\text{es}}{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{A}_{\text{e}}$	PO	0,6	79	47
			2	58	
			6	31	

Модифіковані олігонуклеотиди, націлені на мишачий АРОС-III

ISIS №	Послідовність (від 5' до 3')	СМ	Доза (мг/кг)	мПНК АРОС-III (% PBS)	SEQ ID NO.
			20	13	
696847	$\text{GalNAc}_3\text{-}7_{\text{a-s'}}^{\text{m}}\text{C}_{\text{es}}\text{A}_{\text{es}}\text{G}_{\text{es}}^{\text{m}}\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}$ $\text{T}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}^{\text{m}}\text{C}_{\text{es}}\text{A}_{\text{es}}\text{G}_{\text{es}}^{\text{m}}\text{C}_{\text{es}}\text{A}_{\text{e}}$	н.д. (PS)	0,6	83	47
			2	73	
			6	40	
			20	28	

Структура GalNAc₃-7_a показана у Прикладі 48.

Приклад 102. Розподіл у печінці антисмислових олігонуклеотидів, що містять кон'югат GalNAc

- 5 Оцінили розподіл у печінці ISIS 353382 (див. Таблицю 23), що не містить кон'югату GalNAc, і ISIS 655861 (див. Таблицю 23), що містить кон'югат GalNAc. Самцям мишей balb/c ввели одноразову підшкірну ін'єкцію ISIS 353382 або 655861 в дозі, наведеній у Табл. 100. Кожна експериментальна група складалася із 3 тварин, за винятком групи з дозою 18 мг/кг для ISIS 655861, яка складалася із 2 тварин. Тварин умертвили через 48 годин після введення дози для визначення розподілу олігонуклеотидів у печінці. Для вимірювання кількості молекул антисмислового олігонуклеотиду на клітину, мітку трис-біпіридину рутенію (II) (MSD TAG, Meso Scale Discovery) кон'югували з олігонуклеотидним зразком, застосовуваним для виявлення антисмислових олігонуклеотидів. Результати, представлені у Табл. 100, є середніми концентраціями олігонуклеотиду для кожної експериментальної групи в одиницях вимірювання мільйонів молекул олігонуклеотиду на клітину. Результати демонструють, що при рівних дозах олігонуклеотид, що містить кон'югат GalNAc, містився у вищих концентраціях в цілому у печінці і в гепатоцитах, ніж олігонуклеотид, що не містить кон'югату GalNAc. Крім того, олігонуклеотид, що містить кон'югат GalNAc, містився в нижчих концентраціях у непаренхіматозних клітинах печінки, ніж олігонуклеотид, що не містить кон'югату GalNAc. І тоді як концентрації ISIS 655861 в гепатоцитах і непаренхіматозних клітинах печінки були однаковими в перерахунку на одну клітину, вміст гепатоцитів в печінці складає близько 80 % за об'ємом. Отже, основна частина олігонуклеотиду ISIS 655861, що міститься в печінці, знаходилася в гепатоцитах, тоді як основна частина олігонуклеотиду ISIS 353382, що міститься в печінці, знаходилася в непаренхіматозних клітинах печінки.

Таблиця 100

ISIS №	Доза (мг/кг)	Концентрація в печінці в цілому (молекул*10 ⁶ на клітину)	Концентрація в гепатоцитах (молекул*10 ⁶ на клітину)	Концентрація у непаренхіматозних клітинах печінки (молекул*10 ⁶ на клітину)
353382	3	9,7	1,2	37,2
	10	17,3	4,5	34,0
	20	23,6	6,6	65,6
	30	29,1	11,7	80,0
	60	73,4	14,8	98,0
	90	89,6	18,5	119,9
655861	0.5	2,6	2,9	3,2
	1	6,2	7,0	8,8
	3	19,1	25,1	28,5
	6	44,1	48,7	55,0
	18	76,6	82,3	77,1

Приклад 103. Тривалість дії in vivo олігонуклеотидів, націлених на АРОС-III, що містять кон'югат GalNAc₃

- 30 Олігонуклеотиди, наведені нижче у Табл. 101, випробували в дослідженні одноразової дози на тривалість дії у мишей.

Модифіковані ASO, націлені на АРОС-III

ISIS №	Послідовність (від 5' до 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO.
304801	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	н.д.	н.д.	20
663084	GalNAc ₃ -3 _a -o-A _{do} A _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{eo} T _{eo} T _{es} A _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	A _d	36
679241	A _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{eo} T _{eo} T _{es} A _{es} T _{eo} A _{do} -GalNAc ₃ -19 _a	GalNAc ₃ -19a	A _d	21

Структура GalNAc₃-3_a показана в прикладі 39, а GalNAc₃-19_a показана у Прикладі 70.

Лікування

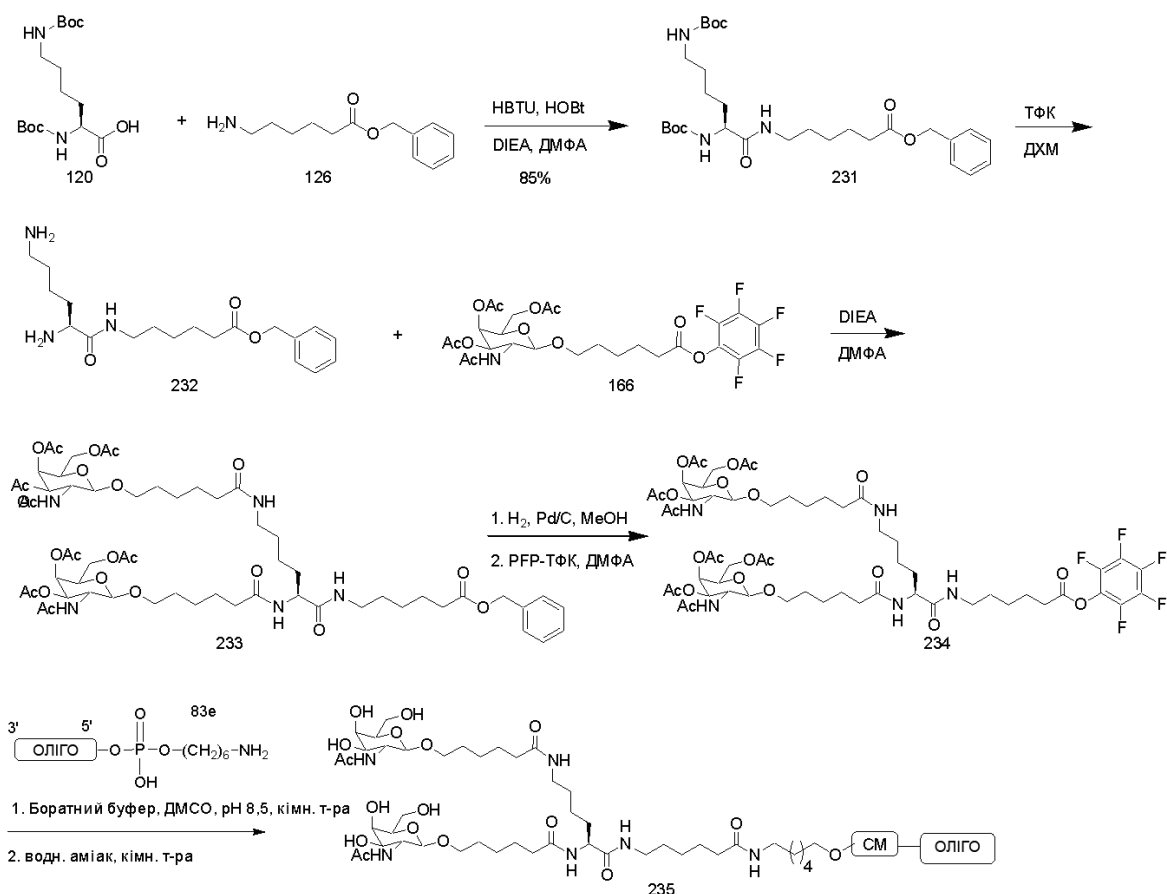
- Самкам трансгенних мишей, які експресують людський АРОС-III, ввели одноразову підшкірну ін'єкцію олігонуклеотиду, наведеного у Табл. 101, або PBS. Кожна експериментальна група складалася із 3 тварин. Зразки крові відбирали до введення дози для визначення початкових показників і на 3-й, 7-й, 14-й, 21-й, 28-й, 35-й і 42-й день після введення дози. Рівні тригліцеридів і білка АРОС-III в плазмі вимірювали таким чином, як описано у Прикладі 20. Результати у Табл. 102 представлені як середній відсоток рівнів тригліцеридів і АРОС-III в плазмі для кожної експериментальної групи, нормалізованих до початкових рівнів. Порівняння результатів у Табл. 58 прикладу 79 з результатами, представленими нижче у Табл. 102, демонструє, що олігонуклеотиди, які містять суміш фосфодіестерних і тіофосфатних міжнуклеозидних зв'язків, мають збільшену тривалість дії, ніж еквівалентні олігонуклеотиди, що містять тільки тіофосфатні міжнуклеозидні зв'язки.

Рівні тригліцеридів і білка АРОС-III в плазмі трансгенних мишей

ISIS №	Доза (мг/кг)	Точки часу (дні після введення дози)	Тригліцериди (% від початкового значення)	Білок АРОС-III (% від початкового значення)	Кластер GalNAc ₃	CM
PBS	н.д.	3	96	101	н.д.	н.д.
		7	88	98		
		14	91	103		
		21	69	92		
		28	83	81		
		35	65	86		
		42	72	88		
304801	30	3	42	46	н.д.	н.д.
		7	42	51		
		14	59	69		
		21	67	81		
		28	79	76		
		35	72	95		
		42	82	92		
663084	10	3	35	28	GalNAc ₃ -3a	A _d
		7	23	24		
		14	23	26		
		21	23	29		
		28	30	22		
		35	32	36		
		42	37	47		

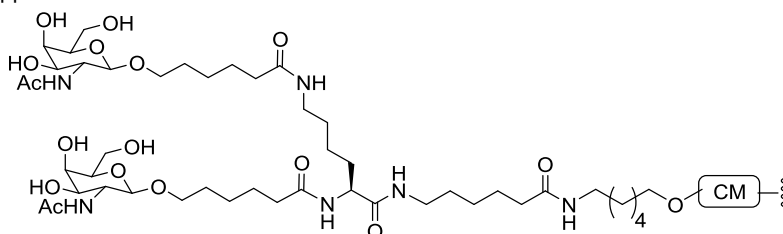
Рівні тригліцеридів і білка АРОС-III в плазмі трансгенних мишей

ISIS №	Доза (мг/кг)	Точки часу (дні після введення дози)	Тригліцериди (% від початкового значення)	Білок АРОС-III (% від початкового значення)	Кластер GalNAc ₃	СМ
679241	10	3	38	30	GalNAc ₃ -19a	A _d
		7	31	28		
		14	30	22		
		21	36	34		
		28	48	34		
		35	50	45		
		42	72	64		

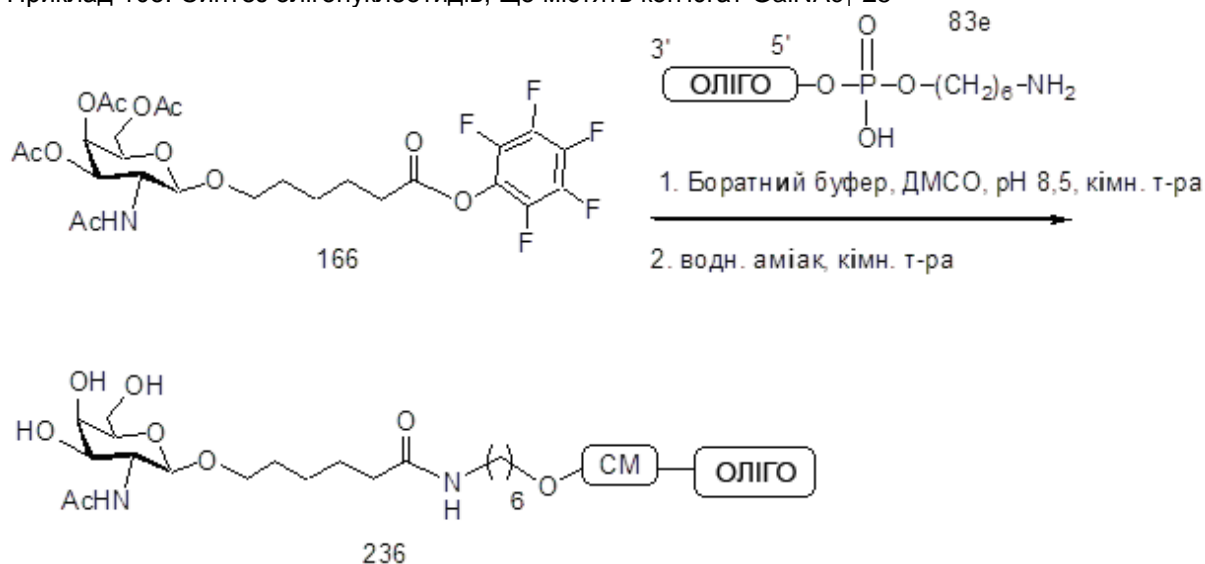
Приклад 104. Синтез олігонуклеотидів, що містять кон'югат 5'-GalNAc₂

- 5 Сполука 120 є у продажу, а синтез сполуки 126 описаний у Прикладі 49. Сполуку 120 (1 г, 2,89 ммоль), HBTU (0,39 г, 2,89 ммоль) і HOBT (1,64 г, 4,33 ммоль) розчинили в ДМФА (10 мл) і додали N, N-діізопропілетиламін (1,75 мл, 10,1 ммоль). Приблизно через 5 хвилин в реакційну суміш додали бензиловий естер аміногексанової кислоти (1,36 г, 3,46 ммоль). Через 3 години реакційну суміш вилили у 100 мл 1 М розчину NaHSO₄ та екстрагували 2 × 50 мл етилацетату.
- 10 Органічні шари об'єднали і промили 3 × 40 мл насиченого розчину NaHCO₃ і 2 х насиченим сольовим розчином, висушили за допомогою Na₂SO₄, відфільтрували і концентрували. Продукт очистили колонковою хроматографією на силікагелі (ДХМ:ЕА:гексани, 1:1:1) з одержанням сполуки 231. Дані РХМС і ЯМР узгоджувалися із структурою. Сполуку 231 (1,34 г, 2,438 ммоль) розчинили в дихлорметані (10 мл) і додали трифлуороцтову кислоту (10 мл). Після перемішування при кімнатній температурі протягом 2 годин, реакційну суміш концентрували під зниженим тиском і випарували разом з толуеном (3 × 10 мл). Залишок висушили при зниженому

тиску з одержанням сполуки 232 у вигляді трифлуорацетатної солі. Синтез сполуки 166 описаний у Прикладі 54. Сполуку 166 (3,39 г, 5,40 ммоль) розчинили у ДМФА (3 мл). Розчин сполуки 232 (1,3 г, 2,25 ммоль) розчинили у ДМФА (3 мл) і додали N, N-діізопропілетиламін (1,55 мл). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин, потім вилили у воду (80 мл), а водний шар екстрагували EtOAc (2 × 100 мл). Органічну фазу відокремили і промили насиченим водним розчином NaHCO₃ (3 × 80 мл), 1 М NaHSO₄ (3 × 80 мл) і насиченим сольовим розчином (2 × 80 мл), потім висушили (Na₂SO₄), відфільтрували і концентрували. Залишок очистили колонковою хроматографією на силікагелі з одержанням сполуки 233. Дані РХМС і ЯМР узгоджувалися із структурою. Сполуку 233 (0,59 г, 0,48 ммоль) розчинили в метанолі (2,2 мл) і етилацетаті (2,2 мл). Додали паладій на вугіллі (10 мас. % Pd/C, вологий, 0,07 г) і перемішували реакційну суміш в атмосфері гідрогену протягом 3 годин. Реакційну суміш профільтрували крізь шар целіту і концентрували з одержанням карбоксильної кислоти. Карбоксильну кислоту (1,32 г, 1,15 ммоль, кислота, що не містить кластера) розчинили у ДМФА (3,2 мл). До неї додали додали N, N-діізопропілетиламін (0,3 мл, 1,73 ммоль) і PFP-ТФК (0,30 мл, 1,73 ммоль). Через 30 хвилин перемішування при кімнатній температурі реакційну суміш вилили у воду (40 мл) і екстрагували EtOAc (2 × 50 мл). Виконали стандартну процедуру виділення продукту, як описано вище, з одержанням сполуки 234. Дані РХМС і ЯМР узгоджувалися із структурою. Олігонуклеотид 235 одержали за загальним способом, описаним в Прикладі 46. Кластерна частина GalNAc₂ (GalNAc₂-24_a) кон'югуювальної групи GalNAc₂-24 може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом, що міститься в олігонуклеотиді, з одержанням різноманітних кон'югуювальних груп. Структура GalNAc₂-24 (GalNAc₂-24_a-CM) представлена нижче:

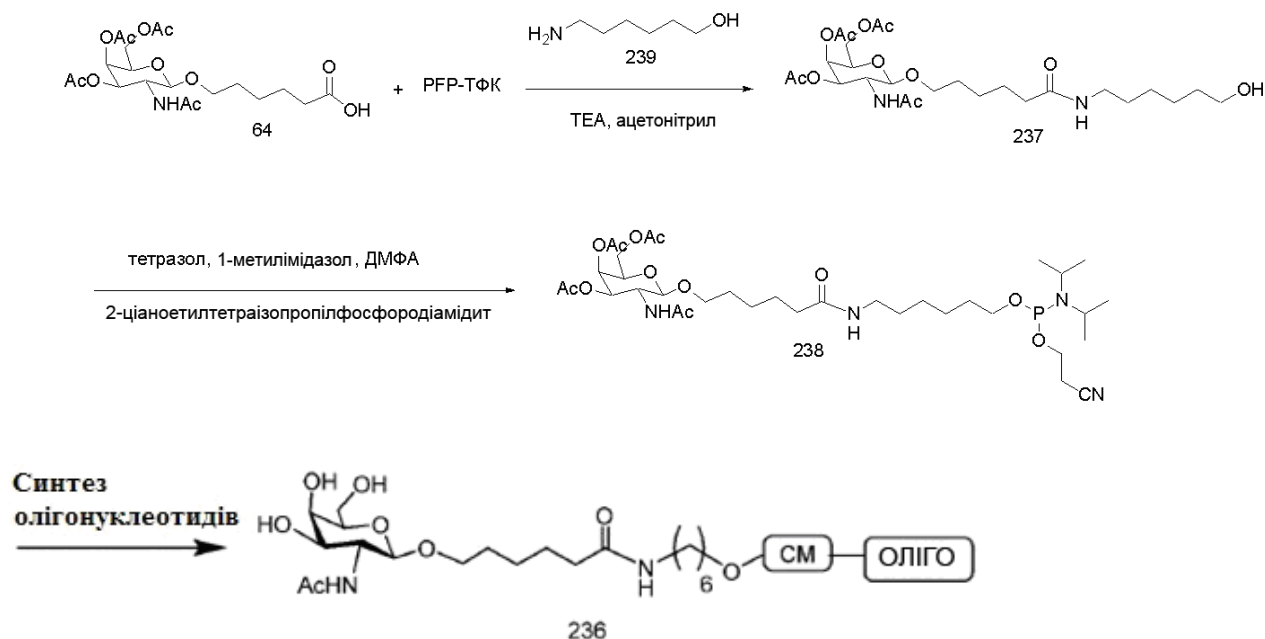


Приклад 105. Синтез олігонуклеотидів, що містять кон'югат GalNAc₁-25

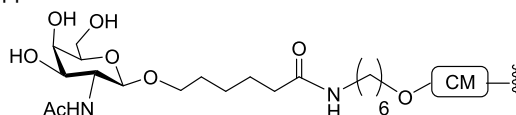


Синтез сполуки 166 описаний у Прикладі 54. Олігонуклеотид 236 одержали за загальним способом, описаним у Прикладі 46.

Альтернативно, олігонуклеотид 236 синтезували за схемою, зображеною нижче, а сполуку 238 застосовували для одержання олігонуклеотиду 236 за способами, описаними у Прикладі 10.



Кластерна частина GalNAc_1 (GalNAc_{1-25a}) кон'югуювальної групи GalNAc_{1-25} може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом, що міститься в олігонуклеотиді, з одержанням різноманітних кон'югуювальних груп. Структура GalNAc_{1-25} ($\text{GalNAc}_{1-25a}\text{-CM}$) представлена нижче:



Приклад 106. Антисмислове інгібування *in vivo* під дією олігонуклеотидів, націлених на SRB-1, що містять кон'югат 5'- GalNAc_2 або 5'- GalNAc_3

Олігонуклеотиди, наведені у Табл. 103 і 104, випробували в дозозалежних дослідженнях антисмислового інгібування SRB-1 у мишей.

Лікування

Шеститижневим самцям мишей C57BL/6 (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мен) ввели одноразову підшкірну ін'єкцію 2, 7 або 20 мг/кг ISIS № 440762; або 0,2, 0,6, 2, 6 або 20 мг/кг ISIS № 686221, 686222 або 708561; або сольового розчину. Кожна експериментальна група складалася із 4 тварин. Мишей умертвили через 72 години після останнього введення. Рівні мРНК SRB-1 у печінці виміряли за допомогою ПЛР у реальному часі. Рівні мРНК SRB-1 нормалізували до рівнів мРНК циклофіліну за стандартними протоколами. Антисмислові олігонуклеотиди знижують рівні мРНК SRB-1 дозозалежним чином, а результати ED_{50} представлені у Табл. 103 і 104. Хоча в попередніх дослідженнях показано, що тривалентні GalNAc -кон'юговані олігонуклеотиди значно більш ефективні, ніж двохвалентні GalNAc -кон'юговані олігонуклеотиди, що, у свою чергу, є значно більш ефективними, ніж одновалентні GalNAc -кон'юговані олігонуклеотиди (див., наприклад, Khorev et al., Bioorg. & Med. Chem., том 16, 5216-5231 (2008)), обробка антисмисловими олігонуклеотидами, що містять одновалентні, двохвалентні і тривалентні кластери GalNAc , приводить до зниження рівнів мРНК SRB-1 з однаковою ефективністю, як показано у Табл. 103 і 104.

Таблиця 103

Модифіковані олігонуклеотиди, націлені на SRB-1

ISIS №	Послідовність (від 5" до 3")	Кластер GalNAc	ED ₅₀ (мг/кг)	SEQ ID No
440762	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	н.д.	4,7	22
686221	GalNAc ₂ -24 _a -o _o ·A _{do} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	GalNAc ₂ -24 _a	0,39	26
686222	GalNAc ₃ -13 _a -o _o ·A _{do} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -13 _a	0,41	26

Легенда до таблиці представлена у Прикладі 93. Структура GalNAc₃-13а показана у Прикладі 62, а структура GalNAc₂-24а показана у Прикладі 104.

5

Таблиця 104

Модифіковані олігонуклеотиди, націлені на SRB-1

ISIS №	Послідовність (від 5" до 3")	Кластер GalNAc	ED ₅₀ (мг/кг)	SEQ ID No
440762	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	н.д.	5	22
708561	GalNAc ₁ -25 _a -o _o ·T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	GalNAc ₁ -25 _a	0,4	22

Легенда до таблиці представлена у Прикладі 93. Структура GalNAc₁-25а показана у Прикладі 105.

Оцінили також концентрації олігонуклеотидів, представлених у Табл. 103 і 104, в печінці, застосувавши способи, описані у Прикладі 75. Результати, наведені нижче у Табл. 104а і 104b, є середніми значеннями загального вмісту антисмислових олігонуклеотидів в тканинах для кожної експериментальної групи, виміряні за УФ, в одиницях вимірювання мкг олігонуклеотиду на грам тканини печінки. Результати демонструють, що олігонуклеотиди, які містять кон'югвальну групу GalNAc, накопичуються в печінці у значно вищих кількостях, ніж при тій же дозі олігонуклеотиду, що не містить кон'югвальної групи GalNAc. Крім того, антисмислові олігонуклеотиди, що містять один, два або три ліганди GalNAc в своїх відповідних групах кон'югату, накопичуються в печінці у рівних кількостях. Цей результат є несподіваним з урахуванням даних, представлених вище в літературному джерелі Khorev et al., і він узгоджується з даними активності, представленими вище у Табл. 103 і 104.

20

Таблиця 104а

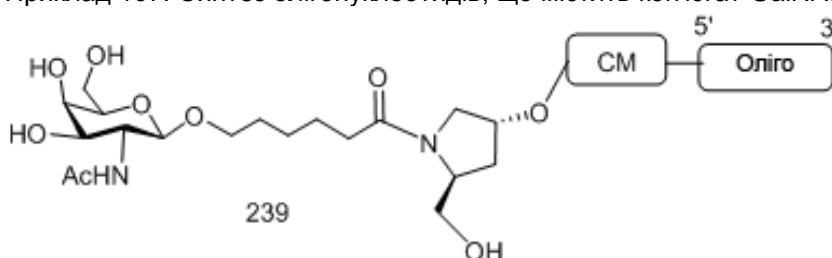
Концентрації в печінці олігонуклеотидів, що містять кон'югвальну групу GalNAc₂ або GalNAc₃

ISIS №	Доза (мг/кг)	[Антисмисловий олігонуклеотид] (мкг/г)	Кластер GalNAc	СМ
440762	2	2,1	н.д.	н.д.
	7	13,1		
	20	31,1		
686221	0,2	0,9	GalNAc ₂ -24 _a	A _d
	0,6	2,7		
	2	12,0		
	6	26,5		
686222	0,2	0,5	GalNAc ₃ -13 _a	A _d
	0,6	1,6		
	2	11,6		
	6	19,8		

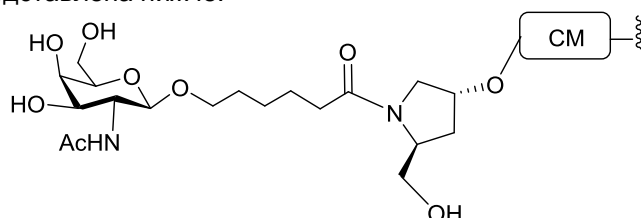
Таблиця 104b

Концентрації в печінці олігонуклеотидів, що містять кон'югувальну групу GalNAc₁

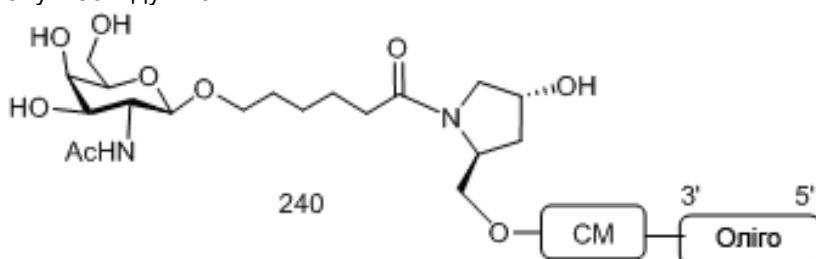
ISIS №	Доза (мг/кг)	[Антисмисловий олігонуклеотид] (мкг/г)	Кластер GalNAc	СМ
440762	2	2,3	н.д.	н.д.
	7	8,9		
	20	23,7		
708561	0,2	0,4	GalNAc ₁ -25 _a	PO
	0,6	1,1		
	2	5,9		
	6	23,7		
	20	53,9		

Приклад 107. Синтез олігонуклеотидів, що містять кон'югат GalNAc₁-26 або GalNAc₁-27

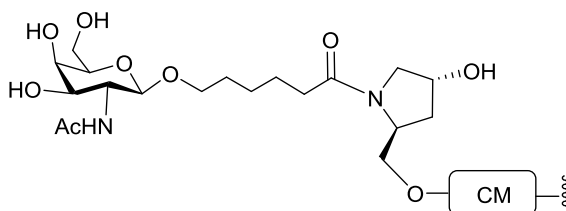
- 5 Олігонуклеотид 239 синтезували зв'язуванням сполуки 47 (див. Приклад 15) з кислотою 64 (див. Приклад 32), застосовуючи HBTU і DIEA в ДМФА. Одержану амідовмісну сполуку тіофосфорилювали, і далі приєднали до 5'-кінця олігонуклеотиду способами, описаними у Прикладі 10. Кластерна частина GalNAc₁ (GalNAc₁-26_a) кон'югувальної групи GalNAc₁-26 може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом, що міститься в олігонуклеотиді, з одержанням різноманітних кон'югувальних груп. Структура GalNAc₁-26 (GalNAc₁-26_a-CM) представлена нижче:



- 15 Для приєднання кон'югувальної групи GalNAc₁ до 3'-кінця олігонуклеотиду амід, утворений за реакцією сполук 47 і 64, приєднали до твердої основи за способами, описаними у Прикладі 7. Потім виконали синтез олігонуклеотиду за способами, описаними у Прикладі 9, з одержанням олігонуклеотиду 240.



- 20 Кластерна частина GalNAc₁ (GalNAc₁-27_a) кон'югувальної групи GalNAc₁-27 може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом, що міститься в олігонуклеотиді, з одержанням різноманітних кон'югувальних груп. Структура GalNAc₁-27 (GalNAc₁-27_a-CM) представлена нижче:



Приклад 108. Антисмислове інгібування *in vivo* під дією олігонуклеотидів, що містять кон'югувальну групу GalNAc, націлених на Apo(a), *in vivo*

Олігонуклеотиди, наведені нижче у Табл. 105, випробували в дослідженні одноразової дози на мишах.

Таблиця 105

Модифіковані ASO, націлені на Apo(a)

ISIS №	Послідовність (від 5' до 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO.
494372	T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} T _{es} ^m C _e	н.д.	н.д.	53
681251	GalNAc ₃ -7 _a -o'-T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	53
681255	GalNAc ₃ -3 _a -o'-T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -3a	PO	53
681256	GalNAc ₃ -10 _a -o'-T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -10a	PO	53
681257	GalNAc ₃ -7 _a -o'-T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	53
681258	GalNAc ₃ -13 _a -o'-T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -13a	PO	53
681260	T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e -A _{do} '-GalNAc ₃ -19	GalNAc ₃ -19a	A _d	52

Структура GalNAc₃-7_a показана у Прикладі 48.

Лікування

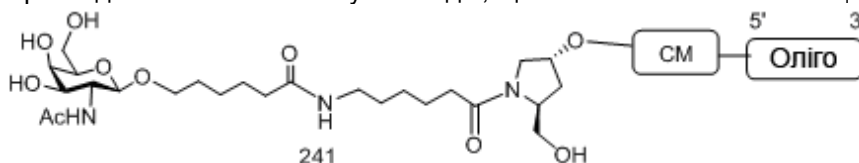
- 10 Самцям трансгенних мишей, які експресують людський Apo(a), ввели одноразову підшкірну ін'єкцію олігонуклеотиду і дози, наведених у Табл. 106, або PBS. Кожна експериментальна група складалася із 4 тварин. Зразки крові відбирали за день до введення дози для визначення початкових рівнів білка Apo(a) в плазмі, а також через 1 тиждень після введення першої дози.
- 15 Зразки крові відбирали додатково щотижня протягом близько 8 тижнів. Рівні білка Apo(a) в плазмі вимірювали за допомогою твердофазного імуоферментного аналізу. Результати у Табл. 106 представлені як середній відсоток від рівнів білка Apo(a) в плазмі для кожної експериментальної групи, нормалізованих до початкових рівнів (% BL). Результати показують, що антисмислові олігонуклеотиди знижують експресію білка Apo(a). Крім того, олігонуклеотиди, що містять кон'югувальну групу GalNAc, демонструють ще ефективніше зниження експресії
- 20 Apo(a), ніж олігонуклеотид, що не містить кон'югувальної групи.

Таблиця 106

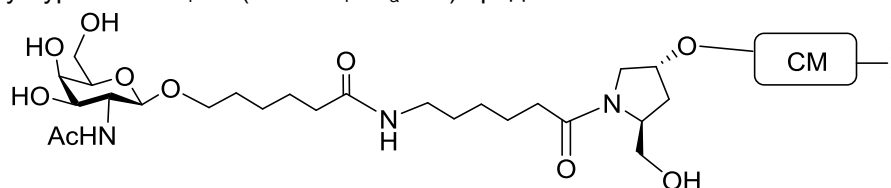
Рівні білка Apo(a) в плазмі

ISIS №	Доза (мг/кг)	Apo(a) через 1 тиждень (% BL)
PBS	н.д.	143
494372	50	58
681251	10	15
681255	10	14
681256	10	17
681257	10	24
681258	10	22
681260	10	26

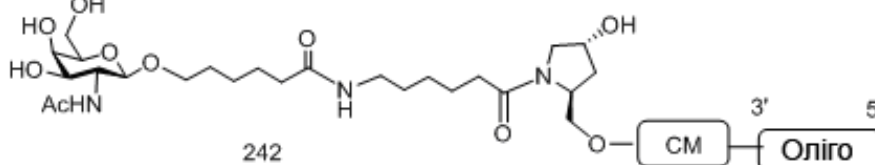
Приклад 109. Синтез олігонуклеотидів, що містять кон'югат GalNAc₁-28 або GalNAc₁-29



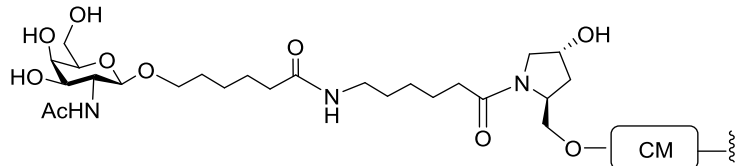
Олігонуклеотид 241 синтезували за такими ж способами, як описані у Прикладі 71, з одержанням фосфорамідитної проміжної сполуки, після чого виконали прийоми, описані у Прикладі 10, для синтезу олігонуклеотиду. Кластерна частина GalNAc₁ (GalNAc₁-28_a) кон'югувальної групи GalNAc₁-28 може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом, що міститься в олігонуклеотиді, з одержанням різноманітних кон'югувальних груп. Структура GalNAc₁-28 (GalNAc₁-28_a-CM) представлена нижче:



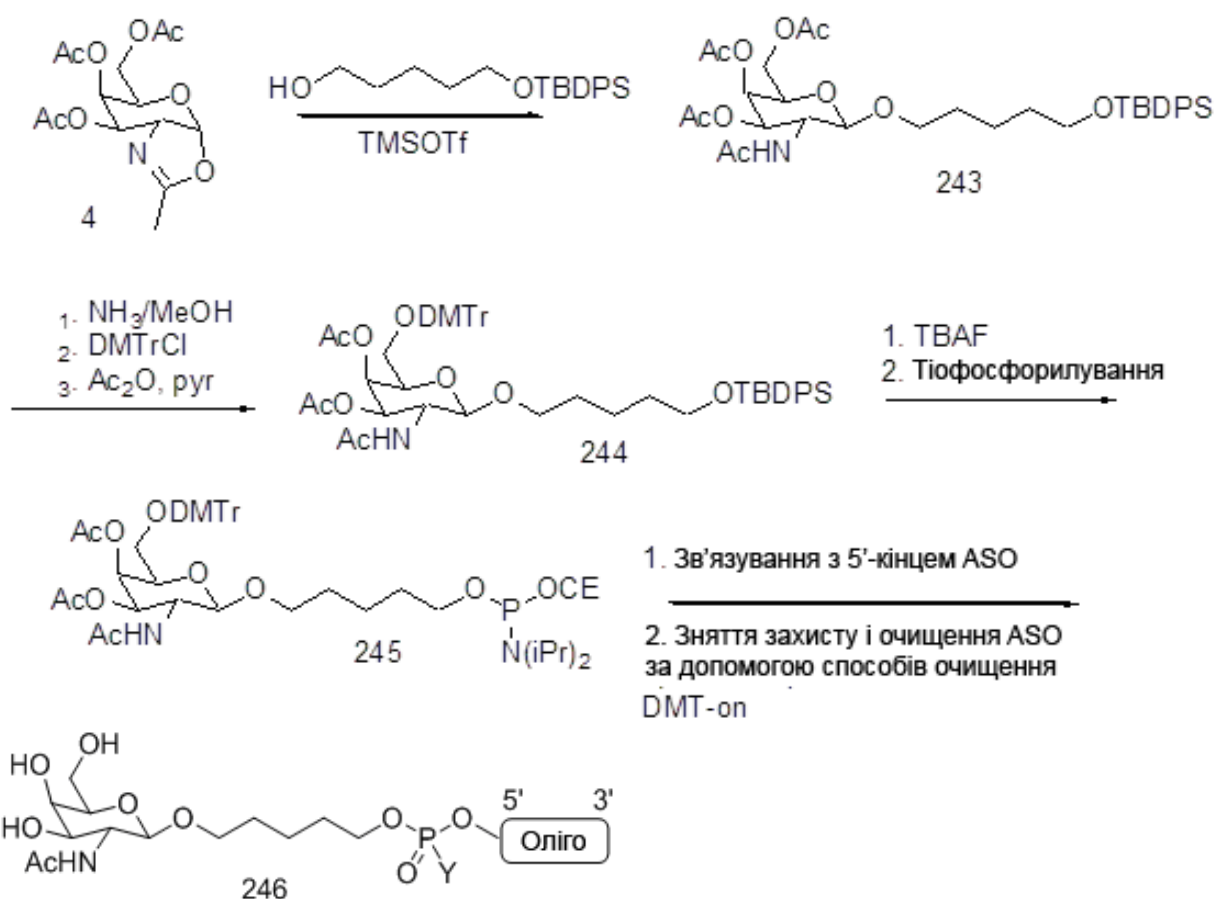
Для приєднання кон'югувальної групи GalNAc₁ до 3'-кінця олігонуклеотиду застосовували такі ж способи, як описані у Прикладі 71, з одержанням гідроксильної проміжної сполуки, яку далі приєднали до твердої основи за способами, описаними у Прикладі 7. Потім виконали синтез олігонуклеотиду за способами, описаними у Прикладі 9, з одержанням олігонуклеотиду 242.



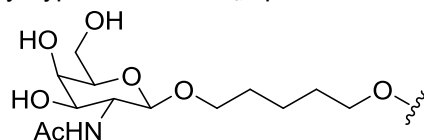
Кластерна частина GalNAc₁ (GalNAc₁-29_a) кон'югувальної групи GalNAc₁-29 може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом, що міститься в олігонуклеотиді, з одержанням різноманітних кон'югувальних груп. Структура GalNAc₁-29 (GalNAc₁-29_a-CM) представлена нижче:



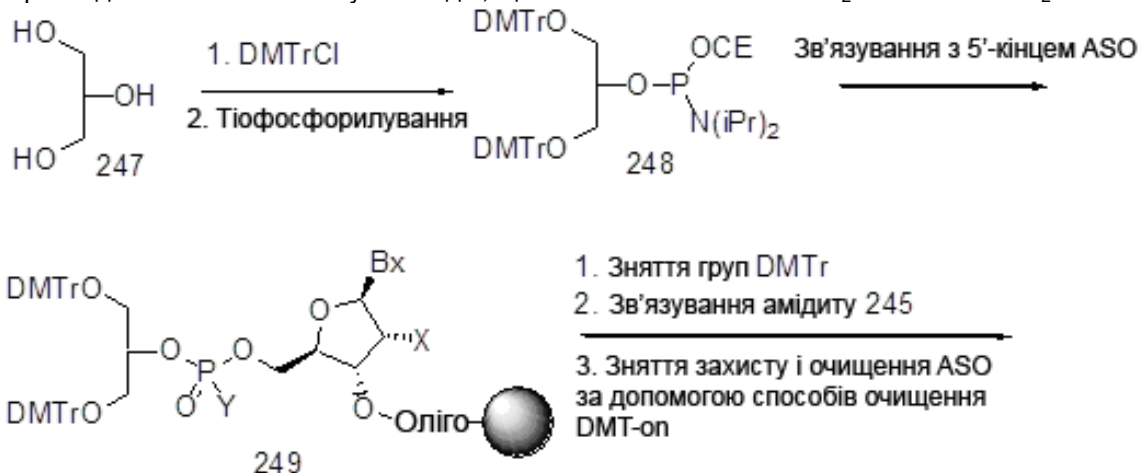
Приклад 110. Синтез олігонуклеотидів, що містять кон'югат GalNAc₁-30

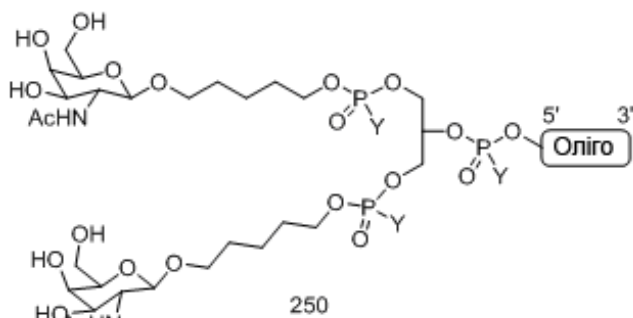


Олігонуклеотид 246, що містить кон'югальну групу $\text{GalNAc}_1\text{-30}$, де Y вибраний з O , S , заміщеного або незаміщеного $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ алкілу, аміно, заміщеного аміно, азида, алкенілу або алкінілу, синтезували таким чином, як показано вище. Кластерна частина GalNAc_1 ($\text{GalNAc}_1\text{-30}_a$) кон'югальної групи $\text{GalNAc}_1\text{-30}$ може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом з одержанням різноманітних кон'югальних груп. У деяких варіантах реалізації винаходу Y є частиною розщеплюваного фрагмента. У деяких варіантах реалізації винаходу Y є частиною стабільного фрагмента, а розщеплюваний фрагмент знаходиться в олігонуклеотиді. Структура $\text{GalNAc}_1\text{-30}_a$ представлена нижче:

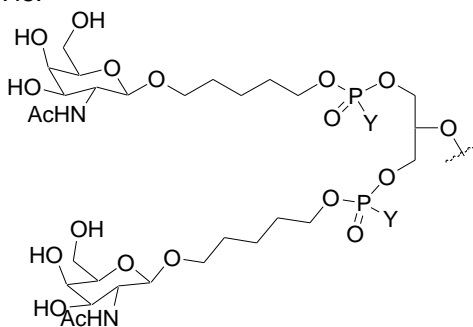


Приклад 111. Синтез олігонуклеотидів, що містять кон'югат $\text{GalNAc}_2\text{-31}$ або $\text{GalNAc}_2\text{-32}$

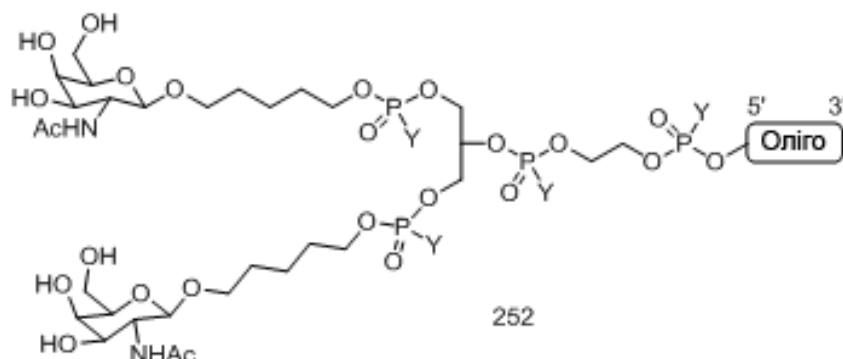
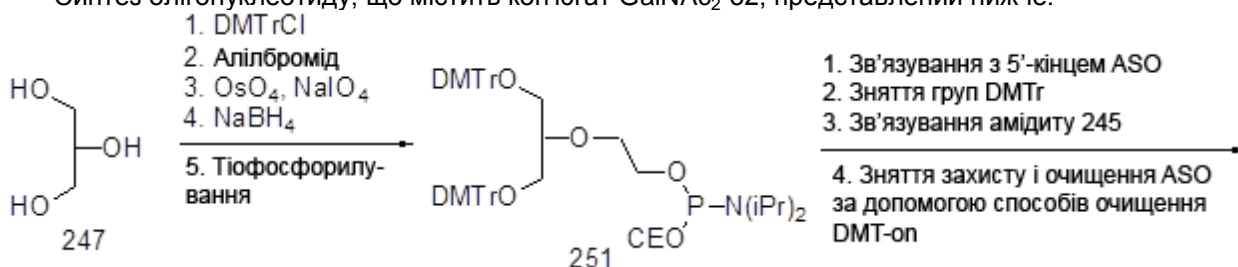




Олігонуклеотид 250, що містить кон'югувальну групу GalNAc₂-31, де Y вибраний з O, S, заміщеного або незаміщеного C₁-C₁₀ алкілу, аміно, заміщеного аміно, азидо, алкенілу або алкінілу, синтезували таким чином, як показано вище. Кластерна частина GalNAc₂ (GalNAc₂-31_a) кон'югувальної групи GalNAc₂-31 може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом з одержанням різних кон'югувальних груп. У деяких варіантах реалізації винаходу Y-вмісна група, яка знаходиться безпосередньо біля 5'-кінця олігонуклеотиду, є частиною розщеплюваного фрагмента. У деяких варіантах реалізації винаходу Y-вмісна група, яка знаходиться безпосередньо біля 5'-кінця олігонуклеотиду, є частиною стабільного фрагмента, а розщеплюваний фрагмент знаходиться в олігонуклеотиді. Структура GalNAc₂-31_a представлена нижче:

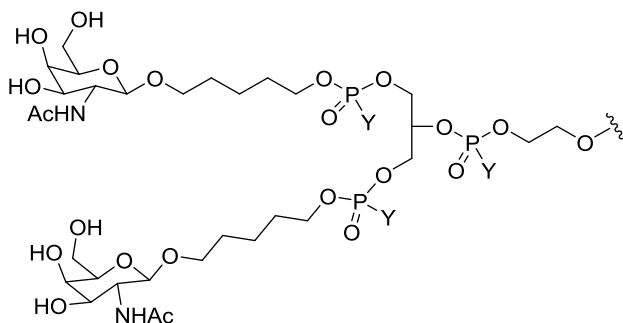


Синтез олігонуклеотиду, що містить кон'югат GalNAc₂-32, представлений нижче.



Олігонуклеотид 252, що містить кон'югувальну групу GalNAc₂-32, де Y вибраний з O, S, заміщеного або незаміщеного C₁-C₁₀ алкілу, аміно, заміщеного аміно, азидо, алкенілу або алкінілу, синтезували таким чином, як показано вище. Кластерна частина GalNAc₂ (GalNAc₂-32_a) кон'югувальної групи GalNAc₂-32 може бути комбінована з будь-яким розщеплюваним фрагментом з одержанням різних кон'югувальних груп. У деяких варіантах реалізації винаходу Y-вмісна група, яка знаходиться безпосередньо біля 5'-кінця олігонуклеотиду, є частиною розщеплюваного фрагмента. У деяких варіантах реалізації винаходу Y-вмісна група, яка

знаходиться безпосередньо біля 5'-кінця олігонуклеотиду, є частиною стабільного фрагмента, а розщеплюваний фрагмент знаходиться в олігонуклеотиді. Структура GalNAc₂-32_a представлена нижче:



5 Приклад 112. Модифіковані олігонуклеотиди, що містять кон'югат GalNAc₁

Олігонуклеотиди у Табл. 107, націлені на SRB-1, були синтезовані з групою кон'югату GalNAc₁ для додаткової перевірки ефективності олігонуклеотидів, що містять кон'югувальні групи, які містять ліганд GalNAc.

Таблиця 107

ISIS №	Послідовність (від 5' до 3')	Кластер GalNAc	CM	SEQ ID NO.
711461	GalNAc ₁ -25 _{a-o'} A _{do} G ^m C ^{es} T ^{es} T ^m C ^{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T ^m C ^{es} ^m C ^{es} T ^{es} T ^e	GalNAc ₁ -25 _a	A _d	30
711462	GalNAc ₁ -25 _{a-o'} G ^m C ^{es} T ^{es} T ^m C ^{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T ^m C ^{es} ^m C ^{es} T ^{es} T ^e	GalNAc ₁ -25 _a	PO	28
711463	GalNAc ₁ -25 _{a-o'} G ^m C ^{eo} T ^{eo} T ^{eo} ^m C ^{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T ^{eo} ^m C ^{eo} ^m C ^{es} T ^{es} T ^e	GalNAc ₁ -25 _a	PO	28
711465	GalNAc ₁ -26 _{a-o'} A _{do} G ^m C ^{es} T ^{es} T ^m C ^{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T ^m C ^{es} ^m C ^{es} T ^{es} T ^e	GalNAc ₁ -26 _a	A _d	30
711466	GalNAc ₁ -26 _{a-o'} G ^m C ^{es} T ^{es} T ^m C ^{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T ^m C ^{es} ^m C ^{es} T ^{es} T ^e	GalNAc ₁ -26 _a	PO	28
711467	GalNAc ₁ -26 _{a-o'} G ^m C ^{eo} T ^{eo} T ^{eo} ^m C ^{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T ^{eo} ^m C ^{eo} ^m C ^{es} T ^{es} T ^e	GalNAc ₁ -26 _a	PO	28
711468	GalNAc ₁ -28 _{a-o'} A _{do} G ^m C ^{es} T ^{es} T ^m C ^{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T ^m C ^{es} ^m C ^{es} T ^{es} T ^e	GalNAc ₁ -28 _a	A _d	30
711469	GalNAc ₁ -28 _{a-o'} G ^m C ^{es} T ^{es} T ^m C ^{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T ^m C ^{es} ^m C ^{es} T ^{es} T ^e	GalNAc ₁ -28 _a	PO	28
711470	GalNAc ₁ -28 _{a-o'} G ^m C ^{eo} T ^{eo} T ^{eo} ^m C ^{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T ^{eo} ^m C ^{eo} ^m C ^{es} T ^{es} T ^e	GalNAc ₁ -28 _a	PO	28
713844	G ^m C ^{es} T ^{es} T ^m C ^{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T ^m C ^{es} ^m C ^{es} T ^{es} T ^{eo} 'GalNAc ₁ -27 _a	GalNAc ₁ -27 _a	PO	28
713845	G ^m C ^{eo} T ^{eo} T ^{eo} ^m C ^{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T ^{eo} ^m C ^{eo} ^m C ^{es} T ^{es} T ^{eo} 'GalNAc ₁ -27 _a	GalNAc ₁ -27 _a	PO	28
713846	G ^m C ^{eo} T ^{eo} T ^{eo} ^m C ^{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T ^{eo} ^m C ^{eo} ^m C ^{es} T ^{es} T ^{eo} A _{do} 'GalNAc ₁ -27 _a	GalNAc ₁ -27 _a	A _d	29
713847	G ^m C ^{es} T ^{es} T ^m C ^{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T ^m C ^{es} ^m C ^{es} T ^{es} T ^{eo} 'GalNAc ₁ -29 _a	GalNAc ₁ -29 _a	PO	28
713848	G ^m C ^{eo} T ^{eo} T ^{eo} ^m C ^{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T ^{eo} ^m C ^{eo} ^m C ^{es} T ^{es} T ^{eo} 'GalNAc ₁ -29 _a	GalNAc ₁ -29 _a	PO	28
713849	G ^m C ^{es} T ^{es} T ^m C ^{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T ^m C ^{es} ^m C ^{es} T ^{es} T ^{eo} A _{do} 'GalNAc ₁ -29 _a	GalNAc ₁ -29 _a	A _d	29
713850	G ^m C ^{eo} T ^{eo} T ^{eo} ^m C ^{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T ^{eo} ^m C ^{eo} ^m C ^{es} T ^{es} T ^{eo} A _{do} 'GalNAc ₁ -29 _a	GalNAc ₁ -29 _a	A _d	29

10

Приклад 113. Модифіковані олігонуклеотиди, що містять кон'югувальну групу GalNAc, націлені на вірус гепатиту В (HBV)

Олігонуклеотиди, наведені нижче у Табл. 108, призначені для впливу на HBV. У деяких варіантах реалізації винаходу розщеплюваний фрагмент являє собою фосфодіестерний зв'язок.

Послідовність (від 5' до 3')	SEQ ID No.
GalNac ₃ -3-G _{es} ^m C _{es} A _{es} G _{es} A _{es} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{es} G _{es} T _{es} G _{es} ^m C _e	3
GalNac ₃ -3-G _{es} ^m C _{eo} A _{eo} G _{eo} A _{eo} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{eo} G _{eo} T _{es} G _{es} ^m C _e	3
GalNac ₃ -7-G _{es} ^m C _{es} A _{es} G _{es} A _{es} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{es} G _{es} T _{es} G _{es} ^m C _e	3
GalNac ₃ -7-G _{es} ^m C _{eo} A _{eo} G _{eo} A _{eo} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{eo} G _{eo} T _{es} G _{es} ^m C _e	3
GalNac ₃ -10-G _{es} ^m C _{es} A _{es} G _{es} A _{es} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{es} G _{es} T _{es} G _{es} ^m C _e	3
GalNac ₃ -10-G _{es} ^m C _{eo} A _{eo} G _{eo} A _{eo} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{eo} G _{eo} T _{es} G _{es} ^m C _e	3
GalNac ₃ -13-G _{es} ^m C _{es} A _{es} G _{es} A _{es} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{es} G _{es} T _{es} G _{es} ^m C _e	3
GalNac ₃ -13-G _{es} ^m C _{eo} A _{eo} G _{eo} A _{eo} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{eo} G _{eo} T _{es} G _{es} ^m C _e	3
G _{es} ^m C _{es} A _{es} G _{es} A _{es} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{es} G _{es} T _{es} G _{es} ^m C _e -GalNac ₃ -19	3
G _{es} ^m C _{eo} A _{eo} G _{eo} A _{eo} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{eo} G _{eo} T _{es} G _{es} ^m C _e -GalNac ₃ -19	3
GalNac ₃ -24-G _{es} ^m C _{es} A _{es} G _{es} A _{es} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{es} G _{es} T _{es} G _{es} ^m C _e	3
GalNac ₃ -24-G _{es} ^m C _{eo} A _{eo} G _{eo} A _{eo} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{eo} G _{eo} T _{es} G _{es} ^m C _e	3
GalNac ₃ -25-G _{es} ^m C _{es} A _{es} G _{es} A _{es} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{es} G _{es} T _{es} G _{es} ^m C _e	3
GalNac ₃ -25-G _{es} ^m C _{eo} A _{eo} G _{eo} A _{eo} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{eo} G _{eo} T _{es} G _{es} ^m C _e	3

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

- 5 <110> Isis Pharmaceuticals, Inc.
- <120> КОМПОЗИЦІЇ І СПОСОБИ МОДУЛЮВАННЯ ЕКСПРЕСІЇ HBV І TTR
- <130> BIOL0248WO
- 10 <150> 61/818442
- <151> 2013-05-01
- <150> 61/823826
- 15 <151> 2013-05-15
- <150> 61/843887
- <151> 2013-07-08
- 20 <150> 61/871673
- <151> 2013-08-29
- <150> 61/880790
- <151> 2013-09-20
- 25 <150> 61/976991
- <151> 2014-04-08
- <150> 61/986867
- 30 <151> 2014-04-30
- <160> 53
- <170> PatentIn версії 3.5
- 35 <210> 1
- <211> 3182
- <212> ДНК
- <213> Вірус гепатиту В
- 40 <400> 1
- aattccacaa cttttcacca aactctgcaa gatcccagag tgagaggcct gtatttcct

gctggtggct ccagttcagg agcagtaaac cctgttccga ctactgcctc tcccttatcg 120
tcaatcttct cgaggattgg ggacctgcg ctgaacatgg agaacatcac atcaggattc 180
5 ctaggacccc ttctcgtgtt acaggcgggg ttttcttgt tgacaagaat cctcacaata 240
ccgcagagtc tagactcgtg gtggacttct ctcaatttc tagggggaac taccgtgtgt 300
cttgccaaa attcgagtc cccaacctcc aatcactcac caacctctg tctccaact 360
10 tgtcctggtt atcgctggat gtgtctgcg cgtttatca tctcctctt catcctgctg 420
ctatgcctca tctcttgtt ggttctctg gactatcaag gtatgtgcc cgttgtcct 480
15 ctaattccag gatcctaac caccagcacg ggaccatgcc gaacctgcat gactactgct 540
caaggaacct ctatgatcc ctctgttgc tgtaccaaac cttcgacgg aaattgcacc 600
tgtattccca tccatcatc ctgggcttc ggaaaattcc tatgggagtg ggcctcagcc 660
20 cgtttctct ggctcagtt actagtcca ttgttcagt ggttcgtagg gctttcccc 720
actgtttggc ttacagttat atggatgat tggtattggg ggccaagtct gtacagcatc 780
25 ttgagtcctt ttaccgct gttaccaatt ttctttgtc ttgggtata catttaaacc 840
ctaacaaaac aaagagatgg ggttactctc tgaatttat gggttatgc attggaagtt 900
atgggtcctt gccacaagaa cacatcatc aaaaaatcaa agaattttt agaaaacttc 960
30 ctattaacag gcctattgat tggaaagtat gtcaacgaat tgtgggtctt ttgggtttg 1020
ctgccccatt tacacaatgt ggttatcctg cgftaatgcc cttgtatgca tgtattcaat 1080
35 ctaagcaggc ttactcttc tcgccaactt acaaggcctt tctgtgtaa caatacctga 1140
acctttacc cggtgcccgg caacggccag gtctgtgcca agtgtttgct gacgcaacct 1200
ccactggctg gggcttggtc atgggccatc agcgcgtgcg tggaacctt tcggctcctc 1260
40 tgccgatcca tactgcggaa ctctagccg ctgttttgc tcgcagcagg tctggagcaa 1320
acattatcg gactgataac tctgtgtcc tctccgcaa atatacatg tatccatggc 1380
45 tgctaggctg tgctgccaac tggatcctgc gcgggacgc cttgtttac gtcccgtcgg 1440
cgctgaatcc tgcggacgac cttctcggg gtcgcttggg actctctct ccccttctc 1500
gtctgccgtt ccgaccgacc acggggcgca cctctctta cgcggactcc ccgtctgtc 1560
50 cttctcatc gccggaccgt gtgcacttcg cttcacctc gcacgtcga tggagaccac 1620
cgtaacgcc caccgaatgt tgccaaggt ctacataag aggactctg gactctctc 1680
55 aatgtcaac accgacctg aggcatact caaagactgt ttgttaaag actgggagga 1740
gttgggggag gagattagat taaaggtct tgtactagga ggctgtaggc ataaattggt 1800
ctgcgcacca gcaccatgca acttttcac ctctgcctaa tcactcttg tcatgtcct 1860
60

actgttcaag cctccaagct gtgccttggg tggctttggg gcatggacat cgacccttat 1920
aaagaattg gagctactgt ggagttactc tcgttttgc cttctgactt ctttcctca 1980
5 gtacgagatc ttctagatac cgcctcagct ctgtatcggg aagccttaga gtctcctgag 2040
cattgttcac ctcaccatac tgcactcagg caagcaattc ttgtctgggg ggaactaatg 2100
actctagcta cctgggtggg tgtaatttg gaagatccag catctagaga cctagtagtc 2160
10 agttatgtca acactaatat gggcctaaag ttcaggcaac tctgtgggtt tcacatttct 2220
tgtctcactt ttggaagaga aaccgttata gagtatttgg tgtcttcgg agtgtggatt 2280
15 cgcactcctc cagcttatag accaccaaact gccctatcc tatcaacact tccggaaact 2340
actgttgta gacgacgagg caggctccct agaagaagaa ctccctcgcc tcgcagacga 2400
aggtctcaat cgccgctcg cagaagatct caatctcggg aacctcaatg ttagtattcc 2460
20 ttggactcat aagggtggga actttactgg tctttattct tctactgtac ctgtctttaa 2520
tcctcattgg aaaacaccat ctttcctaa tatacattta caccaagaca ttatcaaaaa 2580
25 atgtgaacag ttgtaggcc cacttacagt taatgagaaa agaagattgc aattgattat 2640
gcctgctagg tttatccaa aggttacaa atattacca ttggataagg gtattaaacc 2700
ttattatcca gaacatctag ttaatcatta ctccaaact agacactatt tacacactct 2760
30 atggaaggcg ggtatattat ataagagaga aacaacacat agcgcctcat ttgtgggtc 2820
accatattct tggaacaag atctacagca tggggcagaa tctttccacc agcaatcctc 2880
35 tgggattctt tcccgaccac cagttggatc cagccttcag agcaaacaca gcaaatccag 2940
attgggactt caatcccaac aaggacacct ggccagacgc caacaaggta ggagctggag 3000
cattcgggct gggtttacc ccaccgcacg gaggcctttt ggggtggagc cctcaggctc 3060
40 agggcatact acaaacttg ccagcaaact cgctcctgc ctccaccaat cgccagacag 3120
gaaggcagcc taccgcgtg tctccacct tgagaaacac tcacctcag gccatgcagt 3180
45 gg 3182
<210> 2
<211> 938
<212> ДНК
50 <213> Homo sapiens
<400> 2
gttgactaag tcaataatca gaatcagcag gttgcagtc agattggcag ggataagcag 60
55 cctagctcag gagaagttag tataaaagcc ccaggctggg agcagccatc acagaagtcc 120
actcattctt ggcaggatgg cttctcatcg tctgctcctc ctctgccttg ctggactggt 180
atttgtgtct gaggctggcc ctacgggcac cggatgaatcc aagtgctctc tgatggtaa 240
60

	agttctagat gctgtccgag gcagtcctgc catcaatgtg gccgtgcatg tggtcagaaa	300
	ggctgtgat gacacctggg agccatttgc ctctgggaaa accagtgagt ctggagagct	360
5	gcatgggctc acaactgagg aggaatttgt agaagggata taaaaagtgg aaatagacac	420
	caaactctac tggaaggcac ttggcatctc cccattccat gagcatgcag aggtgggtatt	480
	cacagccaac gactccggcc cccgccgcta caccattgcc gccctgctga gccctactc	540
10	ctattccacc acggctgtcg tcaccaatcc caaggaatga gggacttctc ctccagtga	600
	cctgaaggac gagggatggg atttcagtga accaagagta ttccattttt actaaagcag	660
15	tgttttcacc tcatatgcta tgtagaagt ccaggcagag acaataaaaac attcctgtga	720
	aaggcacttt tcattccact ttaacttgat ttttaaatt cccttattgt cccttccaaa	780
	aaaaagagaa tcaaaatttt acaagaatc aaaggaattc tagaaagtat ctgggcagaa	840
20	cgctaggaga gatccaaatt tccattgtct tgcaagcaaa gcacgtatta aatatgatct	900
	gcagccatta aaaagacaca ttctgtaaaa aaaaaaaaaa	938
25	<210> 3 <211> 20 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
30	<220> <223> Синтетичний олігонуклеотид	
	<400> 3 gcagaggtga agcgaagtgc	20
35	<210> 4 <211> 20 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
40	<220> <223> Синтетичний олігонуклеотид	
	<400> 4 ccaatttatg cctacagcct	20
45	<210> 5 <211> 17 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
50	<220> <223> Синтетичний олігонуклеотид	
55	<400> 5 ggcatagcag caggatg	17
	<210> 6 <211> 20 <212> ДНК	
60		

	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Синтетичний олігонуклеотид	
5	<400> 6	
	aggagttccg cagtatggat	20
	<210> 7	
10	<211> 20	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
15	<223> Синтетичний олігонуклеотид	
	<400> 7	
	gtgaagcga gtcacacgg	20
20	<210> 8	
	<211> 20	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
25	<220>	
	<223> Синтетичний олігонуклеотид	
	<400> 8	
	gtgcagaggt gaagcgaagt	20
30	<210> 9	
	<211> 16	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
35	<220>	
	<223> Синтетичний олігонуклеотид	
	<400> 9	
40	aggtgaagcg aagtgc	16
	<210> 10	
	<211> 16	
	<212> ДНК	
45	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Синтетичний олігонуклеотид	
50	<400> 10	
	tccgcagtat ggatcg	16
	<210> 11	
	<211> 18	
55	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
60	<223> Синтетичний олігонуклеотид	

	<400> 11 aatttatgcc tacagcct	18
5	<210> 12 <211> 20 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
10	<220> <223> Синтетичний олігонуклеотид	
	<400> 12 tcttggttac atgaaatccc	20
15	<210> 13 <211> 20 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
20	<220> <223> Синтетичний олігонуклеотид	
25	<400> 13 cttggttaca tgaatccsa	20
30	<210> 14 <211> 20 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
	<220> <223> Синтетичний олігонуклеотид	
35	<400> 14 ggaataactct tgggtacatg	20
40	<210> 15 <211> 20 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
	<220> <223> Синтетичний олігонуклеотид	
45	<400> 15 tggaataactc ttggttacat	20
50	<210> 16 <211> 20 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
	<220> <223> Синтетичний олігонуклеотид	
55	<400> 16 ttttattgtc tctgcctgga	20
60	<210> 17 <211> 20	

	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
5	<223> Синтетичний олігонуклеотид	
	<400> 17	
	gaatgttta ttgtctctgc	20
10	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
15	<220>	
	<223> Синтетичний олігонуклеотид	
	<400> 18	
	aggaatgttt tattgtctct	20
20	<210> 19	
	<211> 20	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
25	<220>	
	<223> Синтетичний олігонуклеотид	
	<400> 19	
30	acaggaatgt ttattgtct	20
	<210> 20	
	<211> 20	
	<212> ДНК	
35	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Синтетичний олігонуклеотид	
40	<400> 20	
	agcttcttgt ccagctttat	20
	<210> 21	
	<211> 21	
45	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Синтетичний олігонуклеотид	
50	<400> 21	
	agcttcttgt ccagctttat a	21
	<210> 22	
55	<211> 14	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
60	<223> Синтетичний олігонуклеотид	

	<400> 22 tcagtcatga cttc	14
5	<210> 23 <211> 15 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
10	<220> <223> Синтетичний олігонуклеотид	
15	<400> 23 tcagtcatga cttca	15
20	<210> 24 <211> 20 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
25	<220> <223> Синтетичний олігонуклеотид	
30	<400> 24 gctgattaga gagaggtccc	20
35	<210> 25 <211> 20 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
40	<220> <223> Синтетичний олігонуклеотид	
45	<400> 25 tcccatttca ggagacctgg	20
50	<210> 26 <211> 15 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
55	<220> <223> Синтетичний олігонуклеотид	
60	<400> 26 atcagtcatg acttc	15
65	<210> 27 <211> 20 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
70	<220> <223> Синтетичний олігонуклеотид	
75	<400> 27 cggtgcaagg cttaggaatt	20
80	<210> 28	

	<211> 20	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
5	<220>	
	<223> Синтетичний олігонуклеотид	
	<400> 28	
10	gcttcagtca tgacttcctt	20
	<210> 29	
	<211> 21	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
15	<220>	
	<223> Синтетичний олігонуклеотид	
	<400> 29	
20	gcttcagtca tgacttcctt a	21
	<210> 30	
	<211> 21	
	<212> ДНК	
25	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Синтетичний олігонуклеотид	
30	<400> 30	
	agcttcagtc atgacttcct t	21
	<210> 31	
	<211> 20	
35	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Синтетичний олігонуклеотид	
40	<400> 31	
	tggtaatcca ctttcagagg	20
	<210> 32	
45	<211> 21	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
50	<223> Синтетичний олігонуклеотид	
	<400> 32	
	tggtaatcca ctttcagagg a	21
55	<210> 33	
	<211> 21	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
60	<220>	

	<223> Синтетичний олігонуклеотид	
5	<400> 33 tgcttcagtc atgacttcct t	21
	<210> 34 <211> 20 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
10	<220> <223> Синтетичний олігонуклеотид	
15	<400> 34 cactgatttt tgcccaggat	20
20	<210> 35 <211> 21 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
	<220> <223> Синтетичний олігонуклеотид	
25	<400> 35 cactgatttt tgcccaggat a	21
30	<210> 36 <211> 21 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
	<220> <223> Синтетичний олігонуклеотид	
35	<400> 36 aagcttcttg tccagcttta t	21
40	<210> 37 <211> 20 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
45	<220> <223> Синтетичний олігонуклеотид	
	<400> 37 acccaattca gaaggaagga	20
50	<210> 38 <211> 21 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
55	<220> <223> Синтетичний олігонуклеотид	
60	<400> 38 acccaattca gaaggaagga a	21

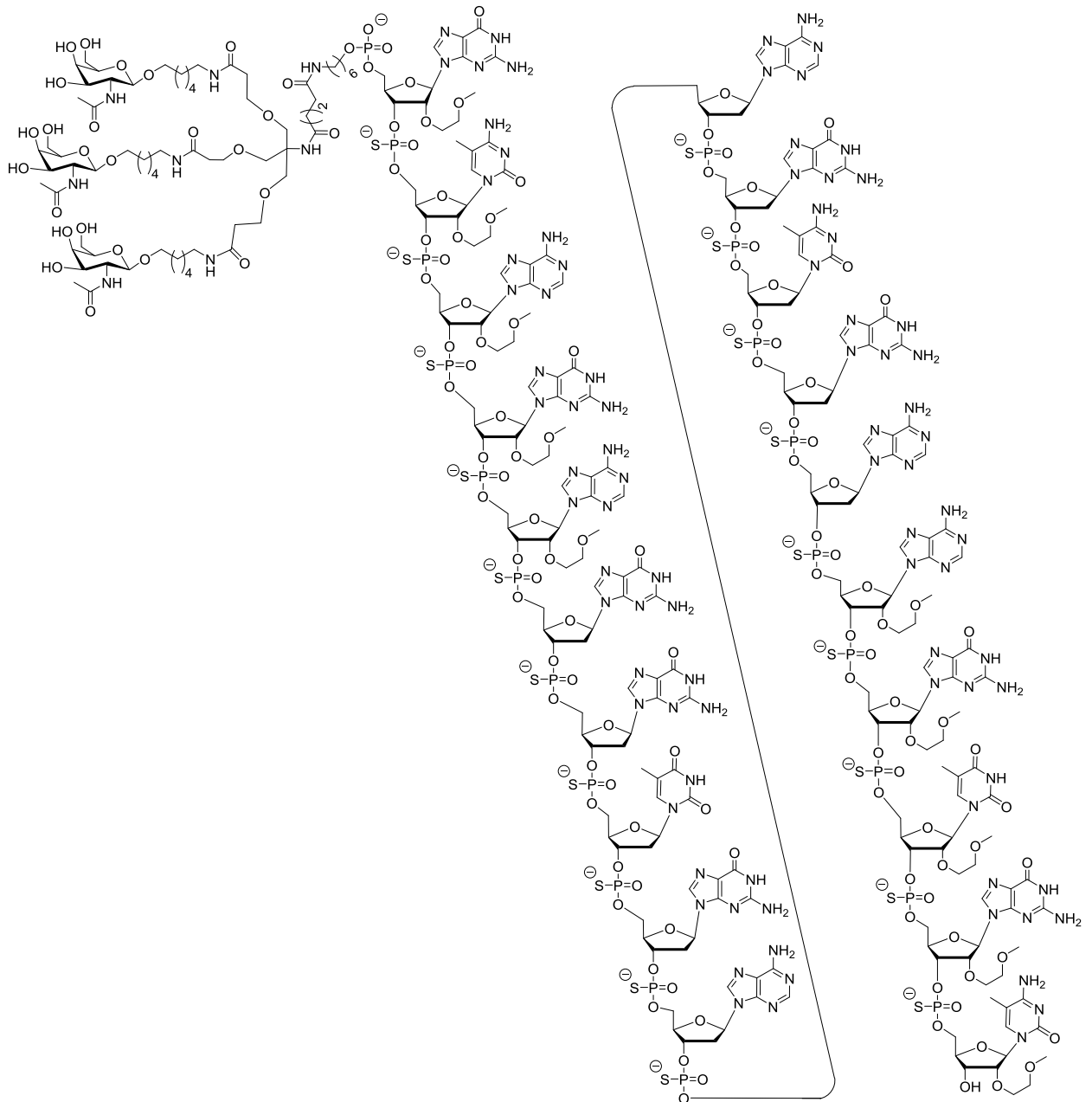
	<210> 39	
	<211> 21	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
5	<220>	
	<223> Синтетичний олігонуклеотид	
	<400> 39	
10	аасссаатс агааггаагг а	21
	<210> 40	
	<211> 21	
	<212> ДНК	
15	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Синтетичний олігонуклеотид	
	<400> 40	
20	атггтаатсс акттскагг г	21
	<210> 41	
	<211> 20	
25	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Синтетичний олігонуклеотид	
30	<400> 41	
	тктгггтас атгаатссс	20
	<210> 42	
35	<211> 21	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
40	<223> Синтетичний олігонуклеотид	
	<400> 42	
	тктгггтас атгаатссс а	21
45	<210> 43	
	<211> 20	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
50	<220>	
	<223> Синтетичний олігонуклеотид	
	<400> 43	
55	аттсакттс атаатггтгг	20
	<210> 44	
	<211> 21	
	<212> ДНК	
60	<213> Штучна послідовність	

	<220>		
	<223> Синтетичний олігонуклеотид		
	<400> 44		
5	attcactttc ataatgctgg a	21	
	<210> 45		
	<211> 21		
	<212> ДНК		
10	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
	<223> Синтетичний олігонуклеотид		
	<400> 45		
15	atcttggtta catgaaatcc c	21	
	<210> 46		
	<211> 20		
20	<212> ДНК		
	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
	<223> Синтетичний олігонуклеотид		
25	<400> 46		
	atgcatgggtg atgcttctga	20	
	<210> 47		
30	<211> 20		
	<212> ДНК		
	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
35	<223> Синтетичний олігонуклеотид		
	<400> 47		
	cagctttatt agggacagca	20	
40	<210> 48		
	<211> 21		
	<212> ДНК		
	<213> Штучна послідовність		
45	<220>		
	<223> Синтетичний олігонуклеотид		
	<400> 48		
	cagctttatt agggacagca a	21	
50	<210> 49		
	<211> 21		
	<212> ДНК		
	<213> Штучна послідовність		
55	<220>		
	<223> Синтетичний олігонуклеотид		
	<400> 49		
60	acagctttat tagggacagc a	21	

	<210> 50		
	<211> 16		
	<212> ДНК		
5	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
	<223> Синтетичний олігонуклеотид		
10	<400> 50		
	ttcagtcatg acttcc	16	
	<210> 51		
	<211> 18		
15	<212> ДНК		
	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
	<223> Синтетичний олігонуклеотид		
20	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (1)..(4)		
	<223> основи у вказаних положеннях являють собою РНК		
25	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (15)..(18)		
	<223> основи у вказаних положеннях являють собою РНК		
30	<400> 51		
	gcuucagtca tgactucc	18	
	<210> 52		
35	<211> 21		
	<212> ДНК		
	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
40	<223> Синтетичний олігонуклеотид		
	<400> 52		
	tgctccgttg gtgcttggtc a	21	
45	<210> 53		
	<211> 20		
	<212> ДНК		
	<213> Штучна послідовність		
50	<220>		
	<223> Синтетичний олігонуклеотид		
	<400> 53		
55	tgctccgttg gtgcttggtc		20

ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

1. Сполука А, що має формулу:



5

або її фармацевтично прийнятну сіль.

2. Композиція, що містить сполуку за п. 1 і фармацевтично прийнятний носій або розріджувач.

3. Застосування сполуки за п. 1, при виготовленні лікарського засобу, для лікування у суб'єкта захворювання, розладу або патологічного стану, пов'язаного з вірусом гепатиту В (HBV), де захворювання, розлад або патологічний стан є розлиттям жовчі, запаленням печінки, фіброзом печінки, запаленням, цирозом печінки, печінковою недостатністю, раком печінки, дифузним гепатоцелюлярним запальним захворюванням, гемофагоцитарним синдромом, сироватковим гепатитом, HBV віремією або трансплантацією, пов'язаною із захворюванням печінки.

4. Застосування композиції за п. 2, при виготовленні лікарського засобу, для лікування у суб'єкта захворювання, розладу або патологічного стану, пов'язаного з вірусом гепатиту В (HBV), де захворювання, розлад або патологічний стан є розлиттям жовчі, запаленням печінки, фіброзом печінки, запаленням, цирозом печінки, печінковою недостатністю, раком печінки, дифузним гепатоцелюлярним запальним захворюванням, гемофагоцитарним синдромом, сироватковим гепатитом, HBV віремією або трансплантацією, пов'язаною із захворюванням печінки.

5. Застосування сполуки за п. 1, при виготовленні лікарського засобу, для зниження рівня антигену HBV суб'єкта, інфікованого вірусом гепатиту В (HBV).
6. Застосування за п. 5, де антиген HBV являє собою HBsAg або HBeAg.
7. Застосування композиції за п. 2, при виготовленні лікарського засобу, для зниження рівня антигену HBV суб'єкта, інфікованого вірусом гепатиту В (HBV).
- 5 8. Застосування за п. 7, де антиген HBV являє собою HBsAg або HBeAg.

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601