

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201792539** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2018.11.30

(51) Int. Cl. *A61K 38/16* (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2016.05.19

(54) **ПЕПТИД-ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ КОНЬЮГАТЫ**

(31) **62/163,960; 62/337,536**

(32) **2015.05.19; 2016.05.17**

(33) **US**

(86) **PCT/US2016/033276**

(87) **WO 2016/187425 2016.11.24**

(71) Заявитель:
**САРЕПТА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)**

(72) Изобретатель:
Хансон Гуннар Дж., Чжоу Мин (US)

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

(57) В данном документе представлены олигонуклеотиды, пептиды и пептид-олигонуклеотидные конъюгаты. Также в данном документе представлены способы лечения мышечного заболевания, вирусной инфекции или бактериальной инфекции у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту олигонуклеотидов, пептидов и пептид-олигонуклеотидных конъюгатов, описанных в данном документе.

201792539
A1

201792539

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-546527EA/061

ПЕПТИД-ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ КОНЪЮГАТЫ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/163,960, поданной 19 мая 2015 года, и предварительной заявки на патент США № 62/337,536, поданной 17 мая 2016 года. Полное содержание этих заявок включено в данный документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка подана вместе с перечнем последовательностей в машиночитаемом формате. Перечень последовательностей представлен в файле под названием 581432_SPT-001-2_sequence_listing_ST25.txt, созданном 13 мая 2016 года, размер которого составляет 4227 байт. Информация в машиночитаемом формате из перечня последовательностей включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Антисмысловая технология обеспечивает средства для модуляции экспрессии одного или более конкретных продуктов гена, включая продукты альтернативного сплайсинга, и является уникальным образом применимой в ряде применений в терапевтических, диагностических и исследовательских целях. Принцип антисмысловой технологии заключается в том, что антисмысловое соединение, например, олигонуклеотид, который гибридизуется с нуклеиновой кислотой-мишенью, модулирует активности экспрессии генов, такие как транскрипция, сплайсинг или трансляция, посредством любого из ряда антисмысловых механизмов. Специфичность к последовательности антисмысловых соединений делает их привлекательными в качестве инструментов проверки достоверности мишени и геной функционализации, а также в качестве терапевтических средств для селективного модулирования экспрессии генов, вовлеченных в заболевание.

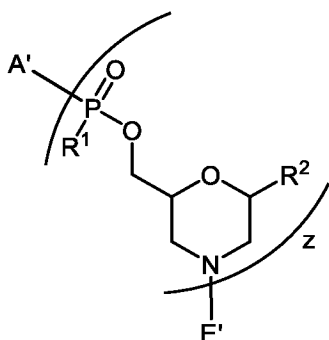
Несмотря на то, что в области антисмысловой технологии был достигнут значительный прогресс, сохраняется потребность в развитии направления олигонуклеотидов и пептид-олигонуклеотидных

конъюгатов с улучшенными антисмысловыми или антигенными характеристиками. Такие улучшенные антисмысловые или антигенные характеристики включают, по меньшей мере, например: более низкую токсичность, более сильную аффинность к ДНК и РНК без ущерба в отношении избирательности последовательности, улучшенную фармакокинетику и распределение в тканях, улучшенную доставку в клетку, а также надежное и регулируемое распределение *in vivo*.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе представлены пептиды, олигонуклеотиды и пептид-олигонуклеотидные конъюгаты. В данном документе также представлены способы лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту пептид-олигонуклеотидного конъюгата, описанного в данном документе.

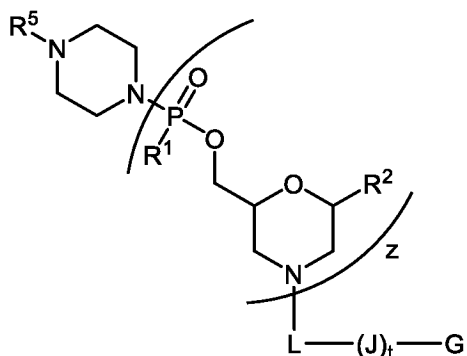
Соответственно, в одном аспекте в данном документе представлен пептид-олигонуклеотидный конъюгат по формуле I:



(I),

или его фармацевтически приемлемая соль.

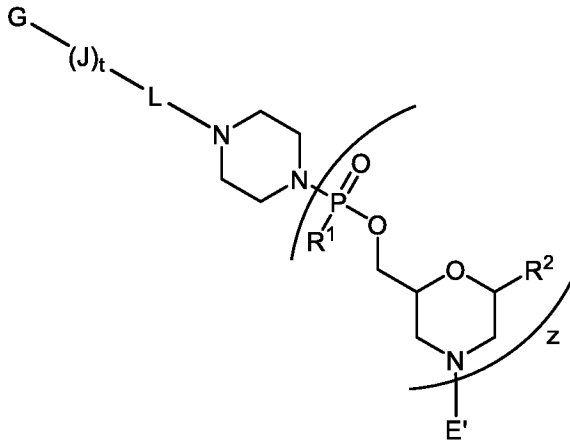
В одном варианте осуществления пептид-олигонуклеотидный конъюгат по формуле I представляет собой пептид-олигонуклеотидный конъюгат по формуле Ia:



(Ia),

или его фармацевтически приемлемую соль.

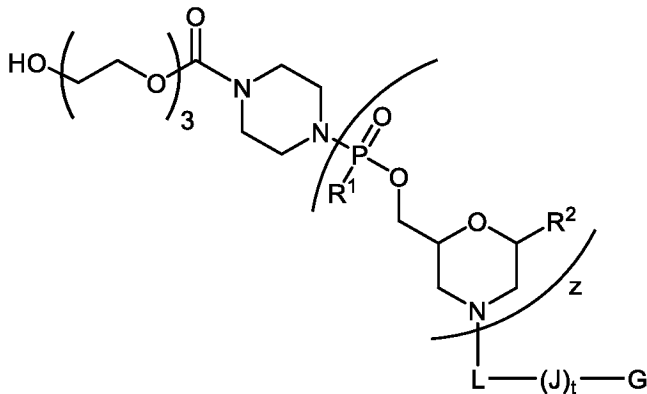
В другом варианте осуществления пептид-олигонуклеотидный конъюгат по формуле I представляет собой пептид-олигонуклеотидный конъюгат по формуле Ib:



(Ib),

или его фармацевтически приемлемую соль.

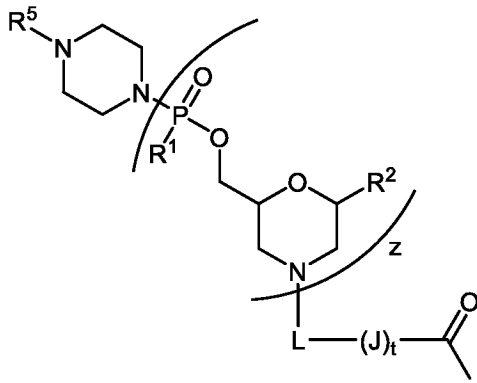
В еще одном варианте осуществления пептид-олигонуклеотидный конъюгат по формуле I представляет собой пептид-олигонуклеотидный конъюгат по формуле Ic:



(Ic),

или его фармацевтически приемлемую соль.

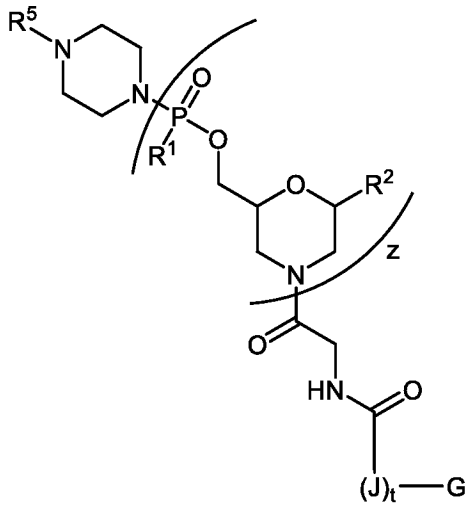
В еще одном варианте осуществления пептид-олигонуклеотидный конъюгат по формуле I представляет собой пептид-олигонуклеотидный конъюгат по формуле Id:



(Id),

или его фармацевтически приемлемую соль.

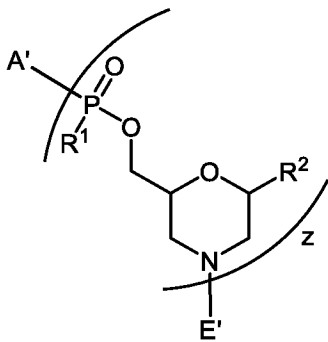
В еще одном варианте осуществления пептид-олигонуклеотидный конъюгат по формуле I представляет собой пептид-олигонуклеотидный конъюгат по формуле Ie:



(Ie),

или его фармацевтически приемлемую соль.

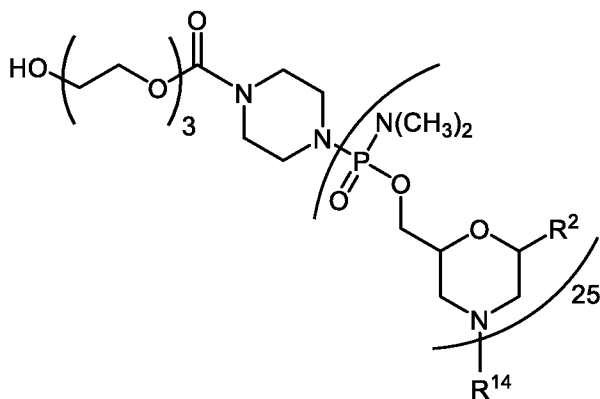
В другом аспекте в данном документе представлен пептид-олигонуклеотидный конъюгат по формуле IV:



(IV),

или его фармацевтически приемлемая соль.

В другом аспекте в данном документе представлен пептид-олигонуклеотидный конъюгат по формуле IV:



(V)

или его фармацевтически приемлемая соль.

В еще одном аспекте в данном документе представлен способ лечения мышечного заболевания, вирусной инфекции или бактериальной инфекции у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту пептид-олигонуклеотидного конъюгата в соответствии с настоящим изобретением.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

На **фигуре 1** показана степень проникновения выбранных олигонуклеотидов, пептидов и пептид-олигонуклеотидных конъюгатов в клетки линии HeLa на основании экспериментов с применением проточной цитометрии.

На **фигуре 2A** представлен результат вестерн-блоттинга, демонстрирующий уровни дистрофина в ткани четырехглавой мышцы мыши после введения РРМО 5.

На **фигуре 2B** представлен результат вестерн-блоттинга, демонстрирующий уровни дистрофина в ткани четырехглавой мышцы мыши после введения РРМО 6.

На **фигуре 2C** представлен результат вестерн-блоттинга, демонстрирующий уровни дистрофина в ткани четырехглавой мышцы мыши после введения РРМО 8.

На **фигуре 2D** представлен результат вестерн-блоттинга, демонстрирующий уровни дистрофина в ткани четырехглавой мышцы мыши после введения РРМО 10.

На **фигуре 3А** представлен результат вестерн-блоттинга, демонстрирующий уровни дистрофина в ткани четырехглавой мышцы после введения РРМО 5.

На **фигуре 3В** представлен результат вестерн-блоттинга, демонстрирующий уровни дистрофина в ткани четырехглавой мышцы после введения РРМО 7.

На **фигуре 3С** представлен результат вестерн-блоттинга, демонстрирующий уровни дистрофина в ткани четырехглавой мышцы после введения РРМО 9.

На **фигуре 3D** представлен результат вестерн-блоттинга, демонстрирующий уровни дистрофина в ткани четырехглавой мышцы после введения РРМО 11.

На **фигуре 4А** показана количественная оценка уровней дистрофина в ткани четырехглавой мышцы после введения РРМО 5 (в двух повторностях одного и того же анализа).

На **фигуре 4В** показана количественная оценка уровней дистрофина в ткани четырехглавой мышцы после введения РРМО 5 (в двух повторностях одного и того же анализа) или РРМО 6.

На **фигуре 4С** показана количественная оценка пропуска экзона 23 (%) в ткани четырехглавой мышцы после введения РРМО 5 (в двух повторностях одного и того же анализа).

На **фигуре 4D** показана количественная оценка пропуска экзона 23 (%) в ткани четырехглавой мышцы после введения РРМО 5 (в двух повторностях одного и того же анализа) или РРМО 6; при этом в качестве контролей применяли мышей дикого типа и линии mdx.

На **фигуре 5А** показана количественная оценка уровней дистрофина в ткани четырехглавой мышцы после введения РРМО 5 (в двух повторностях одного и того же анализа) или РРМО 8.

На **фигуре 5В** показана количественная оценка уровней дистрофина в ткани четырехглавой мышцы после введения РРМО 5 (в двух повторностях одного и того же анализа) или РРМО 10.

На **фигуре 5С** показана количественная оценка пропуска экзона 23 (%) в ткани четырехглавой мышцы после введения РРМО 5 (в двух повторностях одного и того же анализа) или РРМО 8; при этом в качестве контролей применяли мышей дикого типа и mdx.

На **фигуре 5D** показана количественная оценка пропуска экзона 23 (%) в ткани четырехглавой мышцы мыши после введения РРМО 5 (в двух повторностях одного и того же анализа) или РРМО 10; при этом в качестве контролей применяли мышей дикого типа и mdx.

На **фигуре 6A** показана количественная оценка уровней дистрофина в ткани четырехглавой мышцы мыши после введения РРМО 5 (в двух повторностях одного и того же анализа).

На **фигуре 6B** показана количественная оценка уровней дистрофина в ткани четырехглавой мышцы мыши после введения РРМО 5 (в двух повторностях одного и того же анализа) или РРМО 7.

На **фигуре 6C** показана количественная оценка пропуска экзона 23 (%) в ткани четырехглавой мышцы мыши после введения РРМО 5 (в двух повторностях одного и того же анализа).

На **фигуре 6D** показана количественная оценка пропуска экзона 23 (%) в ткани четырехглавой мышцы мыши после введения РРМО 5 (в двух повторностях одного и того же анализа) или РРМО 7; при этом в качестве контролей применяли мышей дикого типа и mdx.

На **фигуре 7A** показана количественная оценка уровней дистрофина в ткани четырехглавой мышцы мыши после введения РРМО 5 (в двух повторностях одного и того же анализа) или РРМО 9.

На **фигуре 7B** показана количественная оценка уровней дистрофина в ткани четырехглавой мышцы мыши после введения РРМО 5 (в двух повторностях одного и того же анализа) или РРМО 11.

На **фигуре 7C** показана количественная оценка пропуска экзона 23 (%) в ткани четырехглавой мышцы мыши после введения РРМО 5 (в двух повторностях одного и того же анализа) или РРМО 9; при этом в качестве контролей применяли мышей дикого типа и mdx.

На **фигуре 7D** показана количественная оценка пропуска экзона 23 (%) в ткани четырехглавой мышцы мыши после введения РРМО 5 (в двух повторностях одного и того же анализа) или РРМО 11; при этом в качестве контролей применяли мышей дикого типа и mdx.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

В данном документе представлены пептиды, олигонуклеотиды и пептид-олигонуклеотидные конъюгаты. В данном документе также представлены способы лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту пептид-

олигонуклеотидного конъюгата, описанного в данном документе. Олигонуклеотиды и, соответственно, пептид-олигонуклеотидные конъюгаты, описанные в данном документе, проявляют более сильную аффинность к ДНК и РНК без ущерба в отношении избирательности последовательности относительно нативных или немодифицированных олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды в соответствии с настоящим изобретением минимизируют или предотвращают расщепление РНКазой H. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды в соответствии с настоящим изобретением не активируют РНКазу H.

Пептиды, описанные в данном документе, передают соответствующим им пептид-олигонуклеотидным конъюгатам более низкую токсичность, повышают активность олигонуклеотида, улучшают фармакокинетику и распределение в тканях, улучшают доставку в клетку и обеспечивают как надежное, так и регулируемое распределение *in vivo*.

Определения

Описанное ниже представляет собой определения различных терминов, применяемых для описания настоящего изобретения. Эти определения относятся к терминам, которые используются в описании и в формуле изобретения, если они иными способами не ограничены конкретными значениями либо по отдельности, либо как часть более крупной группы.

Термин «приблизительно» будет понятен специалистам в данной области техники и будет в некоторой степени изменяться в зависимости от контекста, в котором он используется. Применимо к данному документу, когда речь идет об измеряемой величине, такой как количество, временная продолжительность и т. п., термин «приблизительно» предназначен для охвата отклонений $\pm 20\%$ или $\pm 10\%$, включая $\pm 5\%$, $\pm 1\%$ и $\pm 0,1\%$ от указанного значения, поскольку такие отклонения подходят для осуществления раскрытых способов.

Термин «алкил» относится к насыщенным углеводородным фрагментам с прямой или разветвленной цепью, содержащим, в некоторых вариантах осуществления, от одного до шести или от одного до восьми атомов углерода соответственно. Примеры C₁₋₆-

алкильных фрагментов включают, без ограничения, метильные, этильные, пропильные, изопропильные, *n*-бутильные, трет-бутильные, неопентильные, *n*-гексильные фрагменты; и примеры C₁₋₈-алкильных фрагментов включают, без ограничения, метильные, этильные, пропильные, изопропильные, *n*-бутильные, трет-бутильные, неопентильные, *n*-гексильные, гептильные и октильные фрагменты.

Число атомов углерода в алкильном заместителе может быть обозначено приставкой «C_{x-y}», где «x» представляет собой минимальное число, а «y» представляет собой максимальное число атомов углерода в заместителе. Аналогичным образом C_x-цепь означает алкильную цепь, содержащую «x» атомов углерода.

Термин «гетероалкил» сам по себе или в комбинации с другими терминами означает, если не указано иное, устойчивую алкильную группу с прямой или разветвленной цепью, состоящей из указанного числа атомов углерода и одного или трех гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из O, N и S, при этом атомы азота и серы необязательно могут быть окисленными и гетероатом азота необязательно может быть четвертичным. Гетероатом(ы) могут быть размещены в любом положении гетероалкильной группы, включая положение между остальной частью гетероалкильной группы и фрагментом, к которому она присоединена, а также могут быть присоединены к наиболее отдаленному атому углерода в гетероалкильной группе. Примеры включают: -O-CH₂-CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-CH₂-OH, -CH₂-CH₂-NH-CH₃, -CH₂-S-CH₂-CH₃ и -CH₂-CH₂-S(=O)-CH₃. Последовательными могут быть не более двух гетероатомов, как, например, -CH₂-NH-OCH₃ или -CH₂-CH₂-S-S-CH₃.

Термин «арил», используемый отдельно или в сочетании с другими терминами, означает, если не указано иное, карбоциклическую ароматическую систему, содержащую одно или более колец (обычно одно, два или три кольца), причем такие кольца могут быть соединены вместе подвешенным образом, например, как в бифениле, или могут быть конденсированы, например, как в нафталине. Примеры арильных групп включают фенил, антрацил и нафтил. В различных вариантах осуществления примеры арильной группы могут включать фенил (например, C₆-арил)

и бифенил (например, C₁₂-арил). В некоторых вариантах осуществления арильные группы содержат от шести до шестнадцати атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления арильные группы содержат от шести до двенадцати атомов углерода (например, C₆₋₁₂-арил). В некоторых вариантах осуществления арильные группы содержат шесть атомов углерода (например, C₆-арил).

Применяемый в данном документе термин «гетероарил» или «гетероароматический радикал» относится к гетероциклу, имеющему ароматический характер. Заместители в гетероариле могут быть определены по числу атомов углерода, например, C₁₋₉-гетероарил указывает на число атомов углерода, содержащихся в гетероарильной группе, без включения числа гетероатомов. Например, C₁₋₉-гетероарил будет включать дополнительные от одного до четырех гетероатомов. Полициклический гетероарил может включать одно или более колец, которые частично насыщены. Неограничивающие примеры гетероариллов включают пиридил, пиразинил, пиримидинил (включая, например, 2 и 4 пиримидинил), пиридазинил, тиенил, фурил, пирролил (включая, например, 2 пирролил), имидазолил, тиазолил, оксазолил, пиразолил (включая, например, 3 и 5 пиразолил), изотиазолил, 1,2,3 триазолил, 1,2,4 триазолил, 1,3,4 триазолил, тетразолил, 1,2,3 тиадиазолил, 1,2,3 оксадиазолил, 1,3,4 тиадиазолил и 1,3,4 оксадиазолил.

Неограничивающие примеры полициклических гетероциклов и гетероариллов включают индолил (включая, например, 3, 4, 5, 6 и 7 индолил), индолинил, хинолил, тетрагидрохинолил, изохинолил (включая, например, 1 и 5 изохинолил), 1,2,3,4 тетрагидроизохинолил, циннолинил, хиноксалинил (включая, например, 2 и 5 хиноксалинил), хиназолинил, фталазинил, 1,8 нафтиридинил, 1,4 бензодиоксанил, кумарин, дигидрокумарин, 1,5 нафтиридинил, бензофурил (включая, например, 3, 4, 5, 6 и 7 бензофурил), 2,3 дигидробензофурил, 1,2 бензизоксазолил, бензотиенил (включая, например, 3, 4, 5, 6 и 7 бензотиенил), бензоксазолил, бензотиазолил (включая, например, 2 бензотиазолил и 5 бензотиазолил), пуринил, бензимидазолил (включая, например,

2 бензимидазолил), бензотриазолил, тиоксантинил, карбазолил, карболинил, акридилил, пирролизидинил и хинолизидинил.

Термин «защитная группа» или «химическая защитная группа» относится к химическим фрагментам, которые блокируют некоторые или все реакционноспособные фрагменты соединения и препятствуют участию таких фрагментов в химических реакциях до тех пор, пока защитная группа не будет удалена, например, фрагменты, перечисленные и описанные в T.W. Greene, P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd ed. John Wiley & Sons (1999). Может быть преимущественным использование различных защитных групп, таких, чтобы каждая (отличная) защитная группа могла быть удалена различными средствами. Защитные группы, которые расщепляются при полностью различных реакционных условиях, позволяют осуществлять дифференцированное удаление таких защитных групп. Например, защитные группы могут быть удалены с помощью кислоты, основания и гидрогенолиза. Группы, такие как тритил, монометокситритил, диметокситритил, ацеталь и трет-бутилдиметилсилил, являются кислото-неустойчивыми и могут применяться для защиты реактивных карбокси- и гидроксифрагментов в присутствии аминогрупп, защищенных группами Cbz, которые являются удаляемыми посредством гидрогенолиза, и группами Fmoc, которые являются неустойчивыми по отношению к основаниям. Фрагменты карбоновой кислоты могут быть заблокированы неустойчивыми по отношению к основаниям группами, такими как, без ограничения, метил или этил, а гидроксиреактивные фрагменты могут быть заблокированы неустойчивыми по отношению к основаниям группами, такими как ацетил, в присутствии аминов, заблокированных кислото-неустойчивыми группами, такими как трет-бутил-карбамат; или карбаматами, которые являются устойчивыми по отношению как к кислотам, так и к основаниям, но являются гидролитически удаляемыми.

Реактивные фрагменты карбоновой кислоты и гидроксильные фрагменты также могут быть заблокированы с помощью гидролитически удаляемых защитных групп, таких как бензильная группа, при этом аминогруппы могут быть заблокированы неустойчивыми по отношению к основаниям группами, такими как Fmoc. Особенно применимой

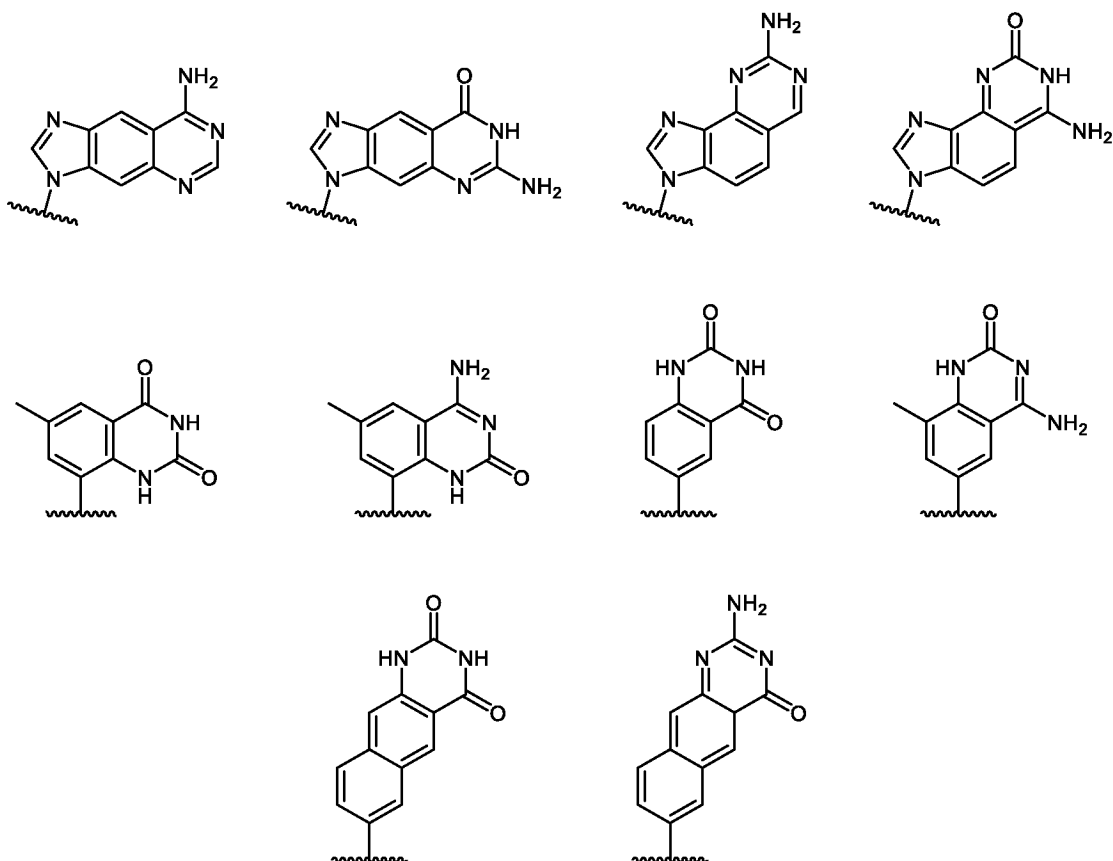
защитной группой для аминогруппы при проведении синтеза соединений по формуле (I) является трифторацетамид. Реактивные фрагменты карбоновой кислоты могут быть блокированы удаляемыми посредством окисления защитными группами, такими как 2,4-диметоксибензил, при этом находящиеся рядом аминогруппы могут быть блокированы неустойчивыми по отношению к фторидам силил-карбаматами.

Аллильные блокирующие группы применимы в присутствии защитных групп для кислот и оснований, поскольку первые являются устойчивыми и могут быть затем удалены с помощью катализаторов на основе металла или пи-кислоты (pi-acid). Например, с аллил-блокированной карбоновой кислоты можно удалить защитную группу с помощью катализируемой палладием (0) реакции в присутствии кислото-неустойчивого трет-бутил-карбамата или неустойчивых по отношению к основаниям ацетатных защитных групп для аминогрупп. Еще одной формой защитной группы является смола, к которой могут быть присоединены соединение или промежуточное соединение. До тех пор, пока остаток присоединен к смоле, такая функциональная группа блокируется и не может вступать в реакцию. После высвобождения из смолы функциональная группа способна вступать в реакцию.

Термины «нуклеиновое основание», «фрагмент для спаривания оснований», «фрагмент для спаривания нуклеиновых оснований» или «основание» относятся к части, представляющей собой гетероциклическое кольцо, нуклеозида, нуклеотида и/или субъединицы на основе морфолино. Нуклеиновые основания могут представлять собой встречающиеся в природе основания, могут представлять собой модифицированные встречающиеся в природе нуклеиновые основания или могут представлять собой их аналоги, например, один или более атомов азота в нуклеиновом основании могут быть независимо в каждом случае заменены атомами углерода. Иллюстративные аналоги включают гипоксантин (основной компонент нуклеозида инозина); 2,6-диаминопурин; 5-метил-цитозин; C5-пропинил-модифицированные пиримидины; 10-(9-(аминоэтокси)феноксазил) (G-clamp) и т. п.

Дополнительные примеры фрагментов для спаривания оснований включают, без ограничения, урацил, тимин, аденин, цитозин, гуанин и гипоксантин, имеющий их соответствующие аминогруппы, защищенные ацильными защитными группами, 2-фторурацил, 2-фторцитозин, 5-бром урацил, 5-йод урацил, 2,6-диаминопурин, азацитозин, пиримидиновые аналоги, такие как псевдоизоцитозин и псевдоурацил, и другие модифицированные нуклеиновые основания, такие как 8-замещенные пурины, ксантин или гипоксантин (последние два представляют собой продукты естественного разложения). Модифицированные нуклеиновые основания раскрыты в Chiu and Rana, *RNA*, 2003, 9, 1034-1048, Limbach *et al.* *Nucleic Acids Research*, 1994, 22, 2183-2196, и также рассматриваются в Revankar and Rao, *Comprehensive Natural Products Chemistry*, vol. 7, 313, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки.

Дополнительные примеры фрагментов для спаривания оснований включают, без ограничения, нуклеиновые основания увеличенного размера, в которые было добавлено одно или более бензольных колец. Замены нуклеиновых оснований, описанные в каталоге Glen Research (www.glenresearch.com); Krueger AT *et al.*, *Acc. Chem. Res.*, 2007, 40, 141-150; Kool, ET, *Acc. Chem. Res.*, 2002, 35, 936-943; Benner S.A., *et al.*, *Nat. Rev. Genet.*, 2005, 6, 553-543; Romesberg, F.E., *et al.*, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2003, 7, 723-733; Hirao, I., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2006, 10, 622-627, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки, рассматриваются как применимые для синтеза описанных в данном документе олигомеров. Примеры нуклеиновых оснований увеличенного размера показаны ниже.



Термины «олигонуклеотид» или «олигомер» относятся к соединению, содержащему множество связанных нуклеозидов, нуклеотидов или комбинации нуклеозидов и нуклеотидов. В конкретных вариантах осуществления в данном документе представлен олигонуклеотид, представляющий собой морфолиновый олигонуклеотид.

Выражение «морфолиновый олигонуклеотид» или «РМО» относится к модифицированному олигонуклеотиду, содержащему субъединицы на основе морфолино, связанные вместе фосфорамидатными или фосфордиамидатными мостиками, соединяющие атом азота в морфолино из одной субъединицы с 5'-экзоциклическим атомом углерода в смежной субъединице. Каждая субъединица на основе морфолино содержит фрагмент для спаривания нуклеиновых оснований, эффективный для связывания с нуклеиновым основанием в мишени посредством специфического для нуклеинового основания образования водородной связи.

Термины «антисмысловый олигомер» «антисмысловое соединение» и «антисмысловый олигонуклеотид» применяют взаимозаменяемо, они относятся к последовательности субъединиц, каждая из которых

несет фрагмент для спаривания оснований, связанных межсубъединичными связями, что позволяет фрагментам для спаривания оснований гибридизироваться с последовательностью-мишенью в нуклеиновой кислоте (как правило, РНК) посредством спаривания оснований по Уотсону-Крику с образованием гетеродуплекса нуклеиновая кислота:олигомер в последовательности-мишени. Олигомер может характеризоваться точной (совершенной) или близкой (достаточной) комплементарностью последовательности к последовательности-мишени; при этом отклонения в последовательности вблизи концов олигомера обычно предпочтительнее показателей изменчивости во внутренней части.

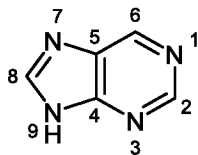
Такой антисмысловой олигомер может быть сконструирован для блокировки или ингибирования трансляции мРНК или для ингибирования/изменения естественного или аномального сплайсинга пре-процессированной мРНК, и может называться «направленным на» последовательность-мишень, с которой он гибридизуется, или «нацеленным в отношении» нее. Последовательность-мишень, как правило, представляет собой участок в мРНК, включающий старт-кодон AUG, - для олигомера для супрессии трансляции, или сайт сплайсинга пре-процессированной мРНК - для олигомера для супрессии сплайсинга (SSO). Последовательность-мишень для сайта сплайсинга может включать последовательность мРНК, имеющую на своем 5'-конце от 1 до приблизительно 25 пар оснований в направлении от 5'-конца к 3'-концу нормальной акцепторной точки сплайсинга в пре-процессированной мРНК. В различных вариантах осуществления последовательность-мишень может представлять собой любой участок пре-процессированной мРНК, который включает сайт сплайсинга или полностью содержится в экзоне, кодирующем последовательность, или перекрывает акцепторный сайт сплайсинга или донорный сайт. Олигомер в более общем смысле обычно называют «нацеленным в отношении» биологически релевантной мишени, такой как белок, вирус или бактерии, когда он нацелен в отношении нуклеиновой кислоты в мишени способом, описанным выше.

Антисмысловой олигонуклеотид и РНК в мишени являются комплементарными друг другу, когда достаточное число

соответствующих положений в каждой молекуле занято нуклеотидами, которые могут так образовывать водородную связь друг с другом, вследствие чего происходит устойчивое и специфическое связывание между олигонуклеотидом и мишенью. Таким образом, «специфически гибридизируемый» и «комплементарный» представляют собой термины, которые применяют для обозначения настолько достаточной степени комплементарности или точного спаривания, при которых между олигонуклеотидом и мишенью происходит устойчивое и специфическое связывание. Из уровня техники понятно, что нет необходимости в том, чтобы последовательность олигонуклеотида была на 100% комплементарна таковой из последовательности-мишени для него, которая подлежит специфической гибридизации. Олигонуклеотид является специфически гибридизируемым, когда связывание олигонуклеотида с молекулой-мишенью нарушает нормальную функцию РНК - мишени, и при этом имеет место достаточная степень комплементарности во избежание неспецифического связывания бессмысленного олигонуклеотида с последовательностями, не представляющими собой мишень, при условиях, при которых специфическое связывание является необходимым, то есть, в физиологических условиях в случае тестирования *in vivo* или терапевтического лечения, и, в случае тестирования *in vitro*, - в условиях проведения тестирования.

Олигонуклеотиды также могут включать в себя модификации или замещения нуклеинового основания (часто называемого в данной области техники просто «основание»). Олигонуклеотиды, содержащие модифицированное или замещенное основание, включают в себя олигонуклеотиды, в которых одно или более пуриновых или пиримидиновых оснований, наиболее часто встречающихся в нуклеиновых кислотах, заменены менее часто встречающимися или искусственными основаниями. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновое основание ковалентно связано с морфолиновым кольцом нуклеотида или нуклеозида при атоме N9 пуринового основания или при атоме N1 пиримидинового основания.

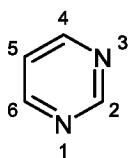
Пуриновые основания содержат пиримидиновое кольцо, конденсированное с имидазольным кольцом, как описано с помощью общей формулы:



Пурин

Аденин и гуанин представляют собой два пуриновых нуклеиновых основания, наиболее часто встречающиеся в нуклеиновых кислотах. Они могут быть замещены другими встречающимися в природе пуринами, включая, без ограничения, N6-метиладенин, N2-метилгуанин, гипоксантин и 7-метилгуанин.

Пиримидиновые основания содержат шестичленное пиримидиновое кольцо, как описано с помощью общей формулы:



Пиримидин

Цитозин, урацил и тимин представляют собой пиримидиновые основания, наиболее часто встречающиеся в нуклеиновых кислотах. Они могут быть замещены другими встречающимися в природе пиримидинами, включая, без ограничения, 5-метилцитозин, 5-гидроксиметилцитозин, псевдоурацил и 4-тиоурацил. В одном варианте осуществления олигонуклеотиды, описанные в данном документе, содержат тиминовые основания вместо урацила.

Другие модифицированные или замещенные основания включают, без ограничения, 2,6-диаминопурин, оротовую кислоту, адматидин, лизидин, 2-тиопиримидин (например, 2-тиоурацил, 2-тиотимин), G-clamp и его производные, 5-замещенный пиримидин (например 5-галогенурацил, 5-пропинилурацил, 5-пропинилцитозин, 5-аминометилурацил, 5-гидроксиметилурацил, 5-аминометилцитозин, 5-гидроксиметилцитозин, Super T), 7-деазагуанин, 7-деазааденин, 7-аза-2,6-диаминопурин, 8-аза-7-деазагуанин, 8-аза-7-деазааденин, 8-аза-7-деаза-2,6-диаминопурин, Super G, Super A и N4-этилцитозин или их производные; N2-циклопентилгуанин (cPent-G), N2-циклопентил-2-аминопурин (cPent-AP) и N2-пропил-2-аминопурин (Pr-AP), псевдоурацил или их производные; а также вырожденные или универсальные основания, такие как 2,6-дифтортолуол, или

отсутствующие основания, такие как участки с удаленными азотистыми основаниями (например 1-дезоксирибоза, 1,2-дидезоксирибоза, 1-дезоксидезокси-2-0-метилрибоза; или пирролидиновые производные, в которых кислород в кольце был заменен атомом азота (азарибоза)). Псевдоурацил представляет собой встречающиеся в природе изомеризованный вариант урацила с С-гликозидом вместо нормального N-гликозида как в уридине.

Некоторые модифицированные или замещенные нуклеиновые основания являются особенно применимыми для повышения аффинности связывания антисмысловых олигонуклеотидов в соответствии с настоящим изобретением. Такие включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2-, N-6- и 0-6-замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. В различных вариантах осуществления нуклеиновые основания могут включать замещения 5-метилцитозина, для которых было показано повышение устойчивости дуплекса нуклеиновой кислоты на 0,6-1,2 °C.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные или замещенные нуклеиновые основания применимы для облегчения очистки антисмысловых олигонуклеотидов. Например, в некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды могут содержать три или более (например, 3, 4, 5, 6 или более) последовательных гуаниновых оснований. В некоторых антисмысловых олигонуклеотидах нить из трех или более последовательных гуаниновых оснований может привести к агрегированию олигонуклеотидов с осложнением очистки. В таких антисмысловых олигонуклеотидах один или более из последовательных гуанинов может быть замещен гипоксантином. Замещение гипоксантином одного или более гуанинов в нити из трех или более последовательных гуаниновых оснований может снизить агрегирование антисмыслового олигонуклеотида, таким образом облегчая очистку.

Представленные в данном документе олигонуклеотиды являются синтезированными и не включают антисмысловые сочетания биологического происхождения. Молекулы в соответствии с настоящим изобретением также могут быть смешаны,

инкапсулированы, конъюгированы или иным способом связаны с другими молекулами, молекулярными структурами или смесями соединений, такими как, например, липосомы, нацеленные на рецепторы молекулы, составы для перорального, ректального, местного или другого применения с целью способствования усвоению, распределению или всасыванию, или их комбинации.

Термины «комплементарный» и «комплементарность» относятся к олигонуклеотидам (то есть, к последовательности нуклеотидов), связанным с правилами спаривания оснований. Например, последовательность «Т-Г-А (5'-3')» комплементарна последовательности «Т-С-А (5'-3')». Комплементарность может быть «частичной», при которой только некоторые из оснований нуклеиновых кислот совпадают согласно правилам спаривания оснований. Или между нуклеиновыми кислотами может иметь место «полная», «абсолютная» или «совершенная» (100%) комплементарность. Степень комплементарности между цепями нуклеиновых кислот оказывает значительные влияния на эффективность и силу гибридизации между нитями нуклеиновых кислот. Невзирая на то, что часто необходима совершенная комплементарность, некоторые варианты осуществления могут включать одно или более, но предпочтительно 6, 5, 4, 3, 2 или 1 ошибочное спаривание по отношению к РНК в мишени. Такая гибридизация может иметь место при «близкой» или «значительной» комплементарности антисмыслового олигомера к последовательности-мишени, а также при точной комплементарности. В некоторых вариантах осуществления олигомер может гибридизироваться с последовательностью-мишенью при приблизительно 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% комплементарности. Включаются отклонения в любом местоположении в олигомере. В некоторых вариантах осуществления отклонения в последовательности ближе к концам олигомера обычно предпочтительнее отклонений во внутренней части, и если они имеются, то составляют, как правило, в пределах приблизительно 6, 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотидов на 5'-конце, 3'-конце или обоих концах.

Термин «пептид» относится к соединению, содержащему множество связанных аминокислот. Представленные в данном документе пептиды можно рассматривать как проникающие в клетку пептиды.

Термины «проникающий в клетку пептид» и «СРР» применяют взаимозаменяемо, при этом они относятся к катионным проникающим в клетку пептидам, также называемым «транспортными пептидами», «пептидами-носителями» или «доменами пептидной трансдукции». Представленные в данном документе пептиды обладают способностью индуцирования проникновения в клетку в 100% клеток в определенной популяции культуры клеток и обеспечивают макромолекулярную транслокацию в ряде тканей *in vivo* при системном введении. В различных вариантах осуществления вариант осуществления СРР в соответствии с настоящим изобретением может включать богатый аргинином пептид, описанный дополнительно ниже.

Термин «лечение» относится к применению одной или более конкретных процедур, применяемых для снижения интенсивности заболевания. В некоторых вариантах осуществления конкретная процедура представляет собой введение одного или более фармацевтических средств. «Лечение» индивидуума (например, млекопитающего, такого как человек) или обработка клетки представляют собой любой тип вмешательства, применяемый при попытке изменения естественного течения болезни у индивидуума или в клетке. Лечение включает, но без ограничения, введение фармацевтической композиции, и может проводиться либо профилактически, либо после начала патологического события, либо после контакта с этиологическим фактором. Лечение включает любой желаемый эффект в отношении симптомов или патологии заболевания или состояния и может включать, например, минимальные изменения или улучшения в одном или более измеряемых маркерах заболевания или состояния, подлежащих лечению. Также включены «профилактические» способы лечения, которые могут быть направлены на снижение скорости прогрессирования заболевания или состояния, подлежащих лечению, задерживания начала такого заболевания или состояния или снижения тяжести его начала. «Эффективное количество» или «терапевтически эффективное

количество» относится к количеству терапевтического соединения, такого как антисмысловой олигомер, вводимого субъекту-млекопитающему либо в виде однократной дозы, либо как часть серии доз, которое является эффективным для достижения необходимого терапевтического эффекта.

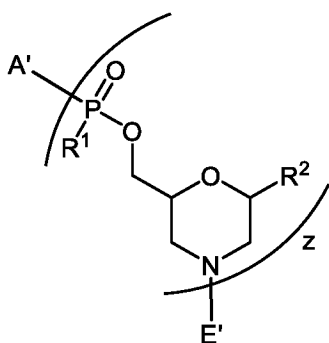
Термин «уменьшение интенсивности» означает снижение степени тяжести по меньшей мере одного признака состояния или заболевания. В некоторых вариантах осуществления уменьшение интенсивности включает задержку или замедление прогрессирования одного или более признаков состояния или заболевания. Тяжесть признаков может определяться по субъективным или объективным показателям, которые известны специалистам в данной области техники.

Применяемые в данном документе «фармацевтически приемлемые соли» относятся к производным раскрытых олигонуклеотидов, где исходный олигонуклеотид модифицирован посредством преобразования существующего фрагмента кислоты или основания в его солевую форму. Перечень подходящих солей находится в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, стр. 1418, и Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 (1977), каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки в своем полном объеме.

Пептид-олигонуклеотидные конъюгаты

В данном документе представлены олигонуклеотиды, химически связанные с одним или более фрагментами, такими как проникающие в клетку пептиды, которые повышают активность, распределение в клетке или усвоение клеткой олигонуклеотида. Олигонуклеотиды могут быть дополнительно химически связаны с одним или более гетероалкильными фрагментами (например, полиэтиленгликоль), которые дополнительно повышают активность, распределение в клетке или захват клеткой олигонуклеотида. В одном иллюстративном варианте осуществления богатый аргинином полипептид ковалентно связан по N-концевому или C-концевому остатку с одним из концов либо с обоими концами антисмыслового соединения.

Таким образом, в одном аспекте в данном документе представлен пептид-олигонуклеотидный конъюгат по формуле I:

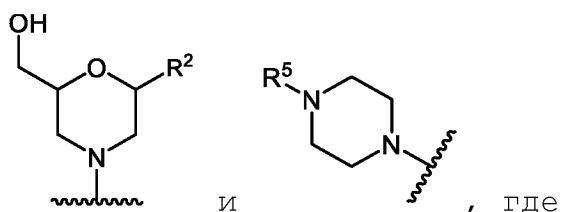


(I),

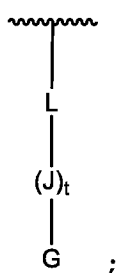
или его фармацевтически приемлемая соль,

где:

A' выбран из $-\text{NHCH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{N}(\text{C}_{1-6}\text{-алкил})\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$,



R^5 представляет собой $-\text{C}(\text{O})(\text{O-алкил})_x\text{-OH}$, где x находится в диапазоне 3-10, и каждая алкильная группа независимо в каждом случае представляет собой C_{2-6} -алкил, или R^5 выбран из $-\text{C}(\text{O})\text{C}_{1-6}$ -алкила, тритила, монометокситритила, $-(\text{C}_{1-6}\text{-алкил})\text{R}^6$, $-(\text{C}_{1-6}\text{-гетероалкил})\text{-R}^6$, арил- R^6 , гетероарил- R^6 , $-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{C}_{1-6}\text{алкил})\text{-R}^6$, $-\text{C}(\text{O})\text{O-арил-R}^6$, $-\text{C}(\text{O})\text{O-гетероарил-R}^6$ и



где R^6 выбран из OH , SH и NH_2 , или R^6 представляет собой O , S , или NH , ковалентно связанный с твердой подложкой;

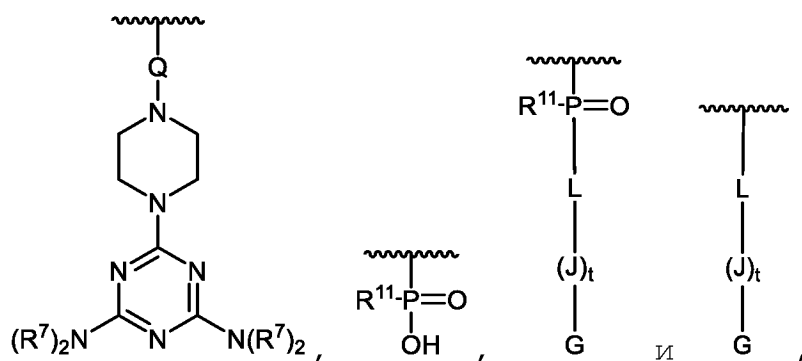
каждый R^1 независимо выбран из OH и $-\text{NR}^3\text{R}^4$, где каждый из R^3 и R^4 независимо в каждом случае представляет собой $-\text{C}_{1-6}$ -алкил;

каждый R^2 независимо выбран из H , нуклеинового основания и нуклеинового основания, функционализированного химической защитной группой, где нуклеиновое основание независимо в каждом

случае содержит C_{3-6} гетероциклическое кольцо, выбранное из пиридина, пиримидина, триазина, пурина и деазапурина;

z находится в диапазоне 8-40; и

E' выбран из H, $-C_{1-6}$ алкила, $-C(O)C_{1-6}$ алкила, бензоила, стеароида, тритила, монометокситритила, диметокситритила, триметокситритила,

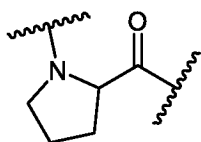


где

Q представляет собой $-C(O)(CH_2)_6C(O)-$ или $-C(O)(CH_2)_2S_2(CH_2)_2C(O)-$,

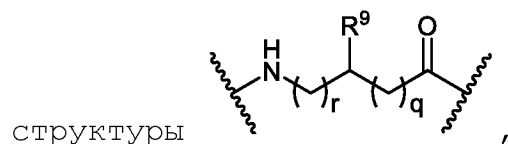
R^7 представляет собой $-(CH_2)_2OC(O)N(R^8)_2$, где R^8 представляет собой $-(CH_2)_6NHC(=NH)NH_2$, и R^{11} выбран из OH и $-NR^3R^4$,

где L ковалентно связан посредством амидной связи с карбокси-концом в J, и L выбран из $-NH(CH_2)_{1-6}C(O)-$, $-NH(CH_2)_{1-6}C(O)NH(CH_2)_{1-6}C(O)-$ и



; t находится в диапазоне 4-9;

каждый J независимо в каждом случае выбран из аминокислоты



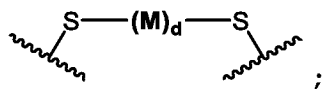
структуры

где:

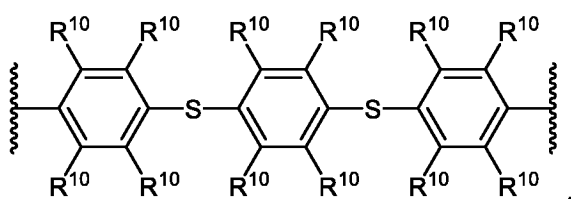
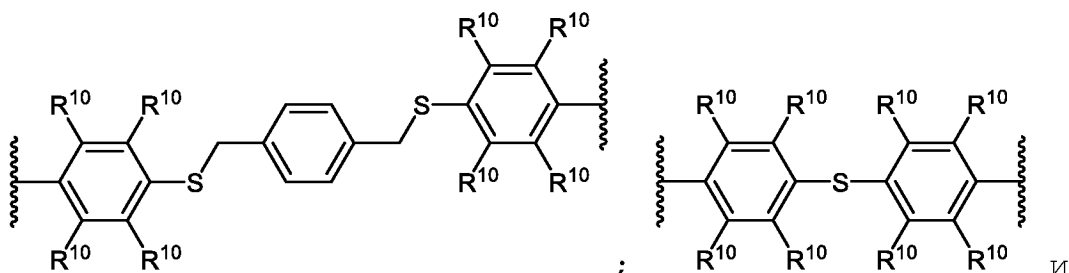
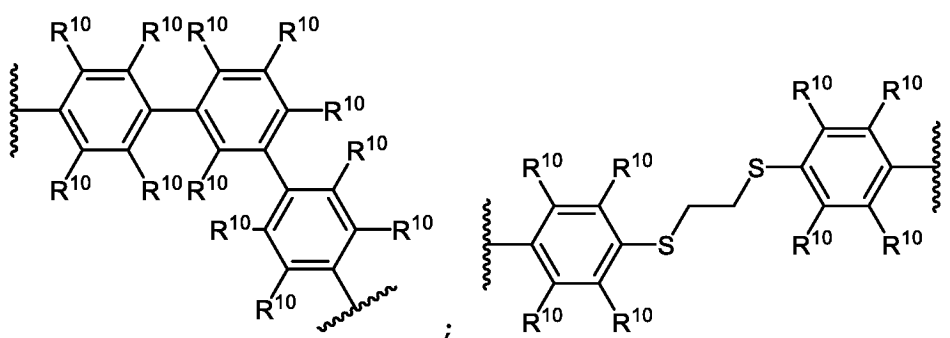
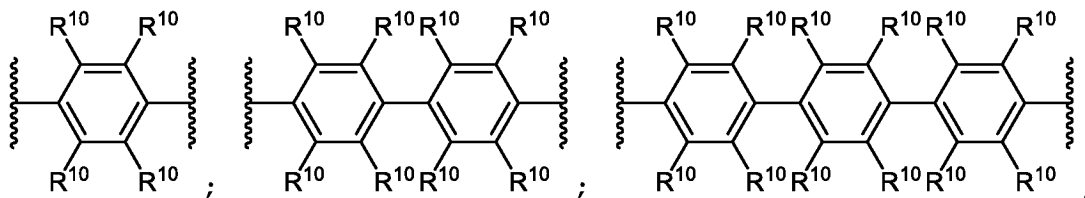
каждый из r и q независимо представляет собой 0, 1, 2, 3 или 4; и

каждый R^9 независимо в каждом случае выбран из H, боковой группы аминокислоты и боковой группы аминокислоты, функционализированной химической защитной группой,

где две или более групп боковой группы аминокислоты из R^9 независимо в каждом случае содержат серу, где два атома серы вместе с атомами, к которым они присоединены, образуют структуру



где d равняется 0 или 1, и M выбран из:



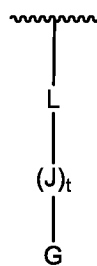
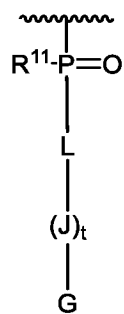
где каждый R^{10} независимо в каждом случае представляет собой H или галоген; и


G ковалентно связан амино-концом в J , и G выбран из H, $C(O)C_1$ -алкила, бензоила и стеариола, и

где по меньшей мере одно из следующих условий является верным:

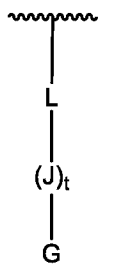


1) А' представляет собой ; 2) Е' представляет собой

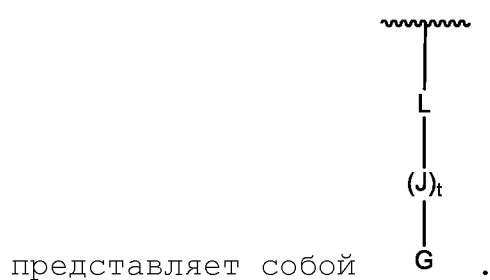
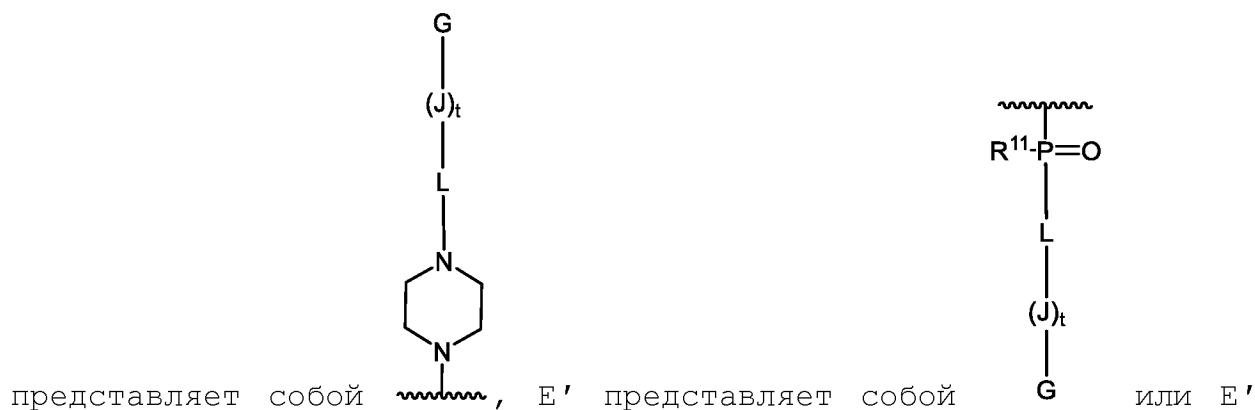


или 3) Е' представляет собой  .

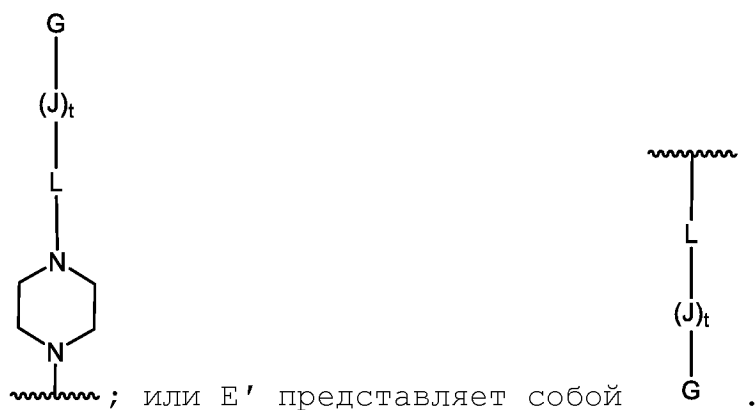
В одном варианте осуществления Е' выбран из Н, -С₁₋₆алкила, -С(О)С₁₋₆алкила, бензоила, стеароила, тритила, монометокситритила, диметокситритила, триметокситритила и



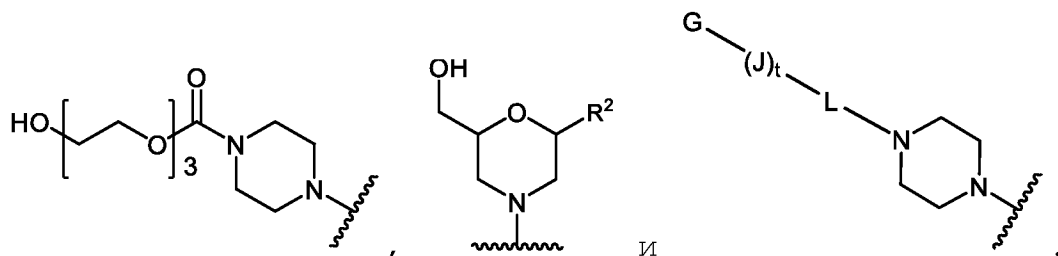
В другом варианте осуществления только один из А'



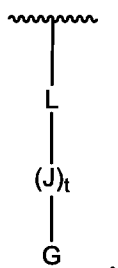
В еще одном варианте осуществления А' представляет собой



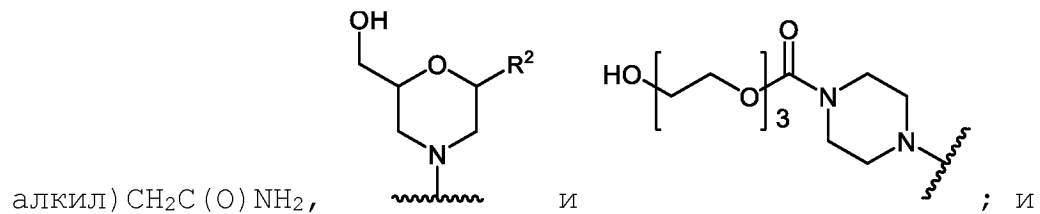
В еще одном варианте осуществления А' выбран из $-N(C_{1-6}$ -алкил) $CH_2C(O)NH_2$,



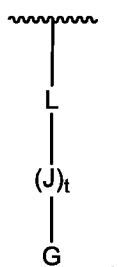
В другом варианте осуществления Е' выбран из Н, $-C(O)CH_3$, тритила, 4 метокситритила, бензоила, стеароила и



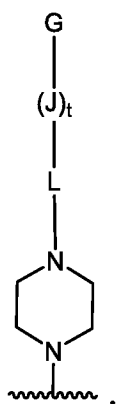
В еще одном варианте осуществления А' выбран из $-\text{N}(\text{C}_{1-6}-$



Е' представляет собой



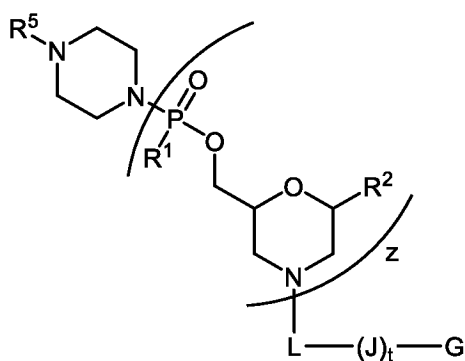
В еще одном варианте осуществления А' представляет собой



В другом варианте осуществления Е' выбран из Н, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$, тритила, 4 метокситритила, бензоила и стеароида.

В еще одном варианте осуществления Е' выбран из Н и $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$.

В еще одном варианте осуществления пептид-олигонуклеотидный конъюгат по формуле I представляет собой пептид-олигонуклеотидный конъюгат по формуле Ia:

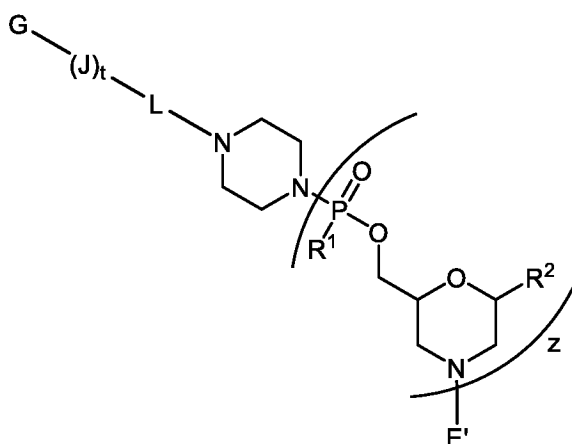


(Ia).

В одном варианте осуществления формул I и Ia R^5 представляет собой $-C(O)(O\text{-алкил})_xOH$, где каждая алкильная группа независимо для каждого случая представляет собой C_{2-6} -алкил.

В другом варианте осуществления формул I и Ia R^5 представляет собой $-C(O)(O-CH_2CH_2)_3OH$.

В другом варианте осуществления пептид-олигонуклеотидный конъюгат по формуле I представляет собой пептид-олигонуклеотидный конъюгат по формуле Ib:



(Ib).

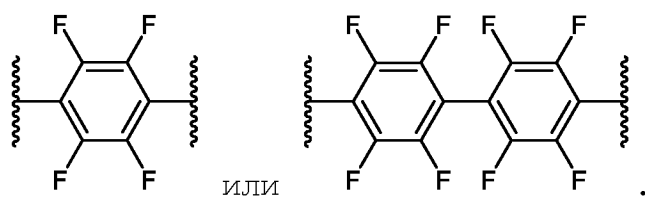
В одном варианте осуществления формул I и Ib E' выбран из H, C_1 -алкила, $-C(O)CH_3$, бензоила и стеариола.

В другом варианте осуществления формул I и Ib E' выбран из H и $-C(O)CH_3$.

В одном варианте осуществления формул I, Ia и Ib каждый R^{10} независимо представляет собой галоген, выбранный из фтора, хлора, брома и йода.

В другом варианте осуществления формул I, Ia и Ib каждый R^{10} представляет собой фтор.

В еще одном варианте осуществления формул I, Ia и Ib M представляет собой



В другом варианте осуществления формул I, Ia и Ib две группы боковой группы аминокислоты независимо в каждом случае представляют собой цистеиновую или гомоцистеиновую группы боковой группы аминокислоты.

В еще одном варианте осуществления формул I, Ia и Ib каждый J независимо в каждом случае выбран из α -аминокислоты, β -аминокислоты и β^3 -аминокислоты.

В еще одном варианте осуществления формул I, Ia и Ib каждый из r и q равняется 0.

В другом варианте осуществления формул I, Ia и Ib J независимо выбран из цистеина и аргинина.

В еще одном варианте осуществления формул I, Ia и Ib две группы J представляют собой цистеин.

В еще одном варианте осуществления формул I, Ia и Ib z находится в диапазоне 8-25.

В другом варианте осуществления формул I, Ia и Ib z находится в диапазоне 15-25.

В еще одном варианте осуществления формул I, Ia и Ib z находится в диапазоне 10-20.

В другом варианте осуществления формул I, Ia и Ib каждый R^1 независимо представляет собой NR^3R^4 , где каждый из R^3 и R^4 независимо в каждом случае представляет собой C_{1-3} -алкил.

В еще одном варианте осуществления формул I, Ia и Ib каждый R^1 представляет собой $N(CH_3)_2$.

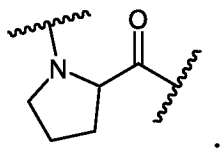
В еще одном варианте осуществления формул I, Ia и Ib каждый R^2 представляет собой нуклеиновое основание, где нуклеиновое основание независимо в каждом случае содержит C_{4-6} -гетероциклическое кольцо, выбранное из пиридина, пиримидина, триазинана, пурина и деазапурина.

В другом варианте осуществления формул I, Ia и Ib каждый R² представляет собой нуклеиновое основание, где нуклеиновое основание независимо в каждом случае содержит C₄₋₆-гетероциклическое кольцо, выбранное из пиримидина, пурина и деазапурина.

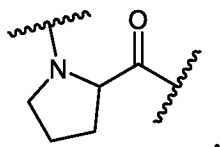
В еще одном варианте осуществления формул I, Ia и Ib каждый R² представляет собой нуклеиновое основание, независимо в каждом случае выбранное из аденина, 2,6-диаминопурина, 7-деаза-аденина, гуанина, 7-деаза-гуанина, гипоксантина, цитозина, 5-метил-цитозина, тимина, урацила и гипоксантина.

В еще одном варианте осуществления формул I, Ia и Ib каждый R² представляет собой нуклеиновое основание, независимо в каждом случае выбранное из аденина, гуанина, цитозина, 5-метил-цитозина, тимина, урацила и гипоксантина.

В другом варианте осуществления формул I, Ia и Ib L выбран из $-\text{NH}(\text{CH}_2)_{1-6}\text{C}(\text{O})-$, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})-$ и



В еще одном варианте осуществления формул I, Ia и Ib L выбран из глицина и



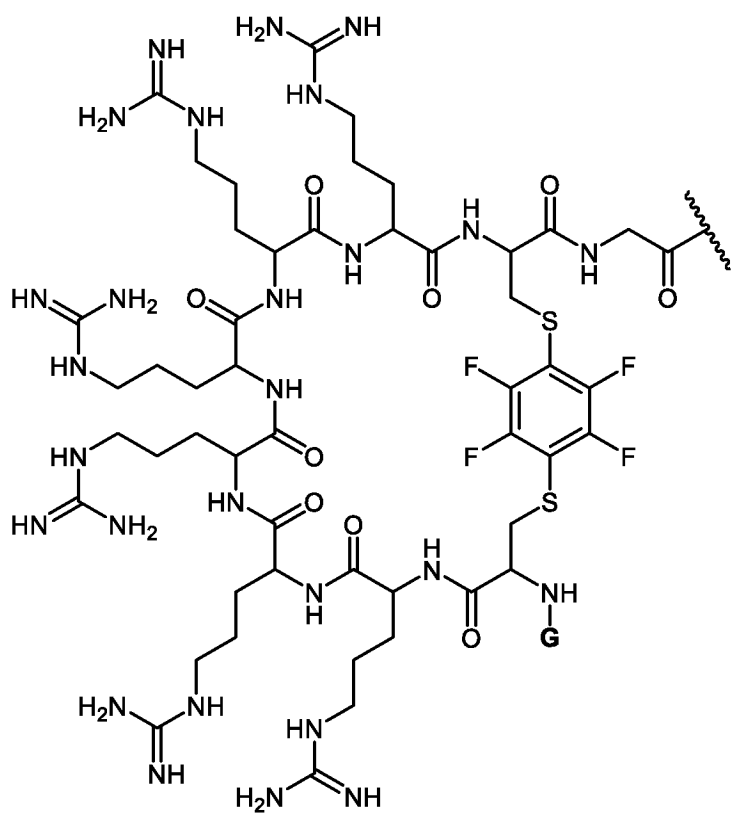
В еще одном варианте осуществления формул I, Ia и Ib L представляет собой глицин.

В другом варианте осуществления формул I, Ia и Ib G выбран из H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$, бензоила и стеароида.

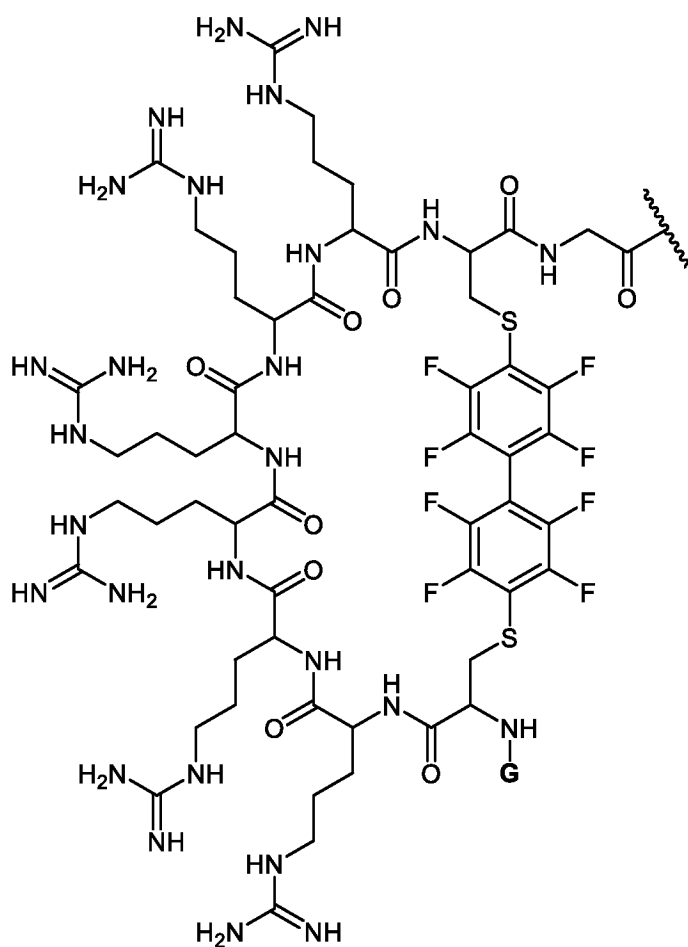
В еще одном варианте осуществления формул I, Ia и Ib G представляет собой H или $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$.

В еще одном варианте осуществления формул I, Ia и Ib G представляет собой $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$.

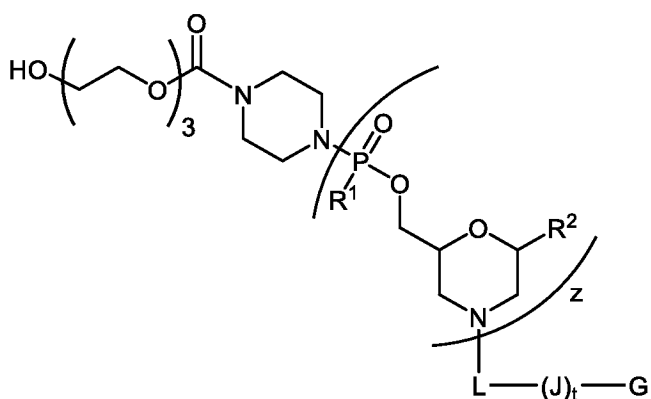
В другом варианте осуществления формул I, Ia и Ib d равняется 1.



И

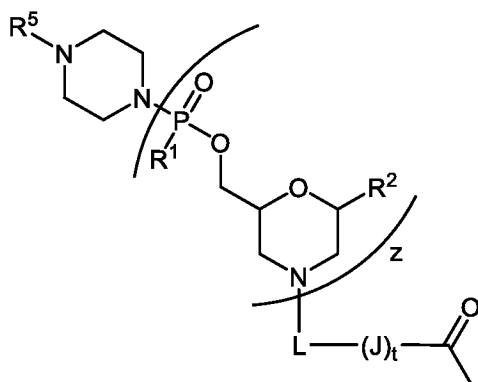


В еще одном варианте осуществления пептид-олигонуклеотидный конъюгат по формуле I представляет собой пептид-олигонуклеотидный конъюгат по формуле Ic:



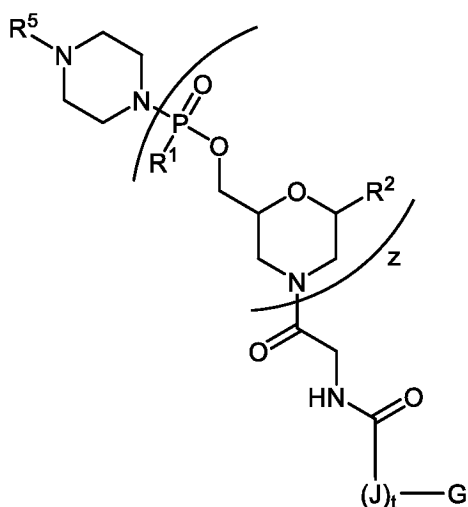
(Ic).

В еще одном варианте осуществления пептид-олигонуклеотидный конъюгат по формуле I представляет собой пептид-олигонуклеотидный конъюгат по формуле Id:



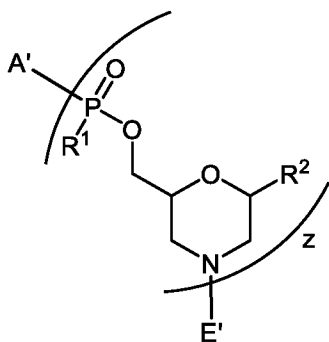
(Id).

В другом варианте осуществления пептид-олигонуклеотидный конъюгат по формуле I представляет собой пептид-олигонуклеотидный конъюгат по формуле Ie:



(Ie).

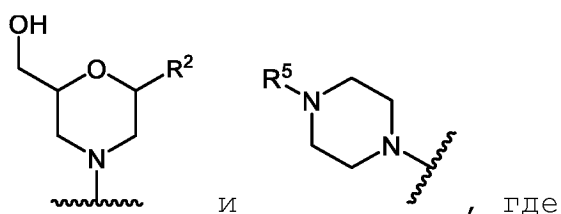
В другом аспекте в данном документе представлен пептид-олигонуклеотидный конъюгат по формуле IV:



(IV),

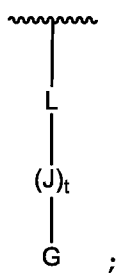
или его фармацевтически приемлемая соль,

где:

A' выбран из $-\text{NHCH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{N}(\text{C}_{1-6}\text{-алкил})\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$,

и , где

R^5 представляет собой $-\text{C}(\text{O})(\text{O-алкил})_x\text{-OH}$, где x находится в диапазоне 3-10, и каждая алкильная группа независимо в каждом случае представляет собой C_{2-6} -алкил, или R^5 выбран из $-\text{C}(\text{O})\text{C}_{1-6}$ -алкила, тритила, монометокситритила, $-(\text{C}_{1-6}\text{-алкил})\text{R}^6$, $-(\text{C}_{1-6}\text{-гетероалкил})\text{-R}^6$, арил- R^6 , гетероарил- R^6 , $-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{C}_{1-6}\text{алкил})\text{-R}^6$, $-\text{C}(\text{O})\text{O-арил}\text{-R}^6$, $-\text{C}(\text{O})\text{O-гетероарил}\text{-R}^6$ и



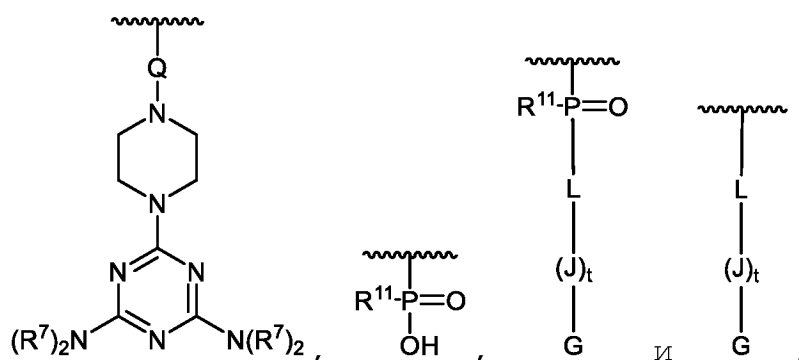
где R^6 выбран из OH , SH и NH_2 , или R^6 представляет собой O , S , или NH , ковалентно связанный с твердой подложкой;

каждый R^1 независимо выбран из OH и $-\text{NR}^3\text{R}^4$, где каждый из R^3 и R^4 независимо в каждом случае представляет собой $-\text{C}_{1-6}$ -алкил;

каждый R^2 независимо выбран из H , нуклеинового основания и нуклеинового основания, функционализированного химической защитной группой, где нуклеиновое основание независимо в каждом случае содержит C_{3-6} -гетероциклическое кольцо, выбранное из пиридина, пиримидина, триазина, пурина и дезапурина;

z находится в диапазоне 8-40; и

Е' выбран из Н, -С₁₋₆алкила, -С(О)С₁₋₆алкила, бензоила, стеароида, тритила, монометокситритила, диметокситритила, триметокситритила,

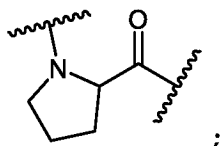


где

Q представляет собой -С(О)(СН₂)₆С(О)- или -С(О)(СН₂)₂С₂(СН₂)₂С(О)-,

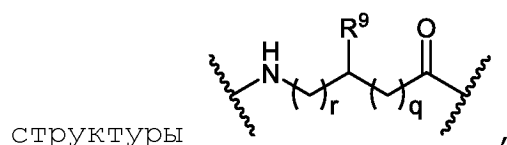
R⁷ представляет собой -(СН₂)₂ОС(О)N(R⁸)₂, где R⁸ представляет собой -(СН₂)₆NHC(=NH)NH₂, и R¹¹ выбран из ОН и -NR³R⁴,

где L ковалентно связан посредством амидной связи с карбокси-концом в J, и L выбран из -NH(СН₂)₁₋₆С(О)-, -NH(СН₂)₁₋₆С(О)NH(СН₂)₁₋₆С(О)- и



t находится в диапазоне 4-9;

каждый J независимо в каждом случае выбран из аминокислоты



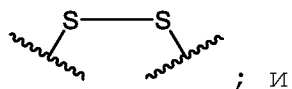
где:

каждый из r и q независимо представляет собой 0, 1, 2, 3 или 4; и

каждый R⁹ независимо в каждом случае выбран из Н, боковой группы аминокислоты и боковой группы аминокислоты, функционализированной химической защитной группой,

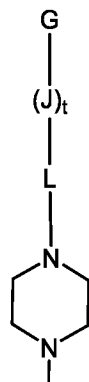
где две или более групп боковой группы аминокислоты из R⁹ независимо в каждом случае содержат серу, где два атома серы

вместе с атомами, к которым они присоединены, образуют структуру

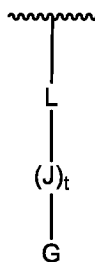
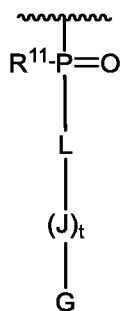


G ковалентно связан амино-концом в J, и G выбран из H, C(O)C₁₋₆-алкила, бензоила и стеариола, и

где по меньшей мере одно из следующих условий является верным:



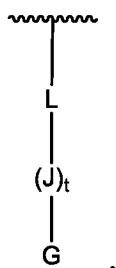
1) A' представляет собой ; 2) E' представляет собой



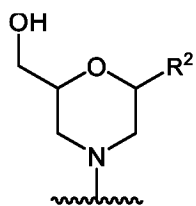
или 3) E' представляет собой .

В одном варианте осуществления формулы IV d равняется 1.

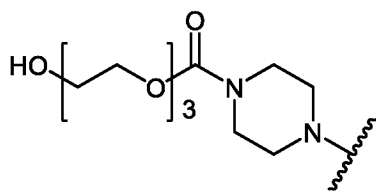
В другом варианте осуществления формулы IV E' выбран из H, -C(O)CH₃ и



В еще одном варианте осуществления формулы IV A' выбран из -N(C₁₋₆-алкил)CH₂C(O)NH₂,

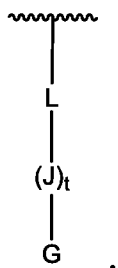


и

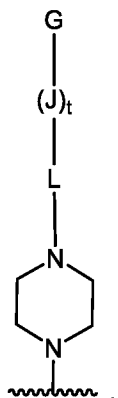


; и

Е' представляет собой

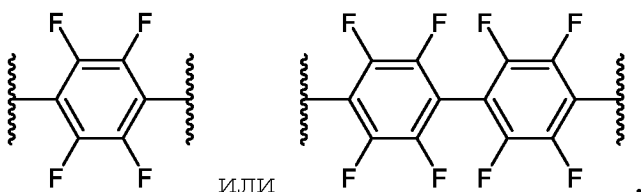


В еще одном варианте осуществления формулы IV А' представляет собой



В другом варианте осуществления формулы IV Е' выбран из Н и $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$.

В еще одном варианте осуществления формулы IV М представляет собой



В еще одном варианте осуществления формулы IV каждый J независимо в каждом случае выбран из α -аминокислоты, β^2 -аминокислоты и β^3 -аминокислоты.

В еще одном варианте осуществления формулы IV каждый из r и q равняется 0.

В другом варианте осуществления формулы IV J независимо выбран из цистеина и аргинина.

В другом варианте осуществления формулы IV z находится в диапазоне 15-25.

В еще одном варианте осуществления формулы IV z находится в диапазоне 10-20.

В еще одном варианте осуществления формулы IV каждый R^1 представляет собой $N(CH_3)_2$.

В еще одном варианте осуществления формулы IV каждый R^2 представляет собой нуклеиновое основание, независимо в каждом случае выбранное из аденина, гуанина, цитозина, 5-метилцитозина, тимина, урацила и гипоксантина.

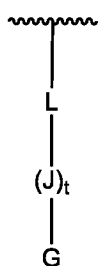
В еще одном варианте осуществления формулы IV L представляет собой глицин.

В другом варианте осуществления формулы IV G выбран из H, $C(O)CH_3$, бензоила и стеароила.

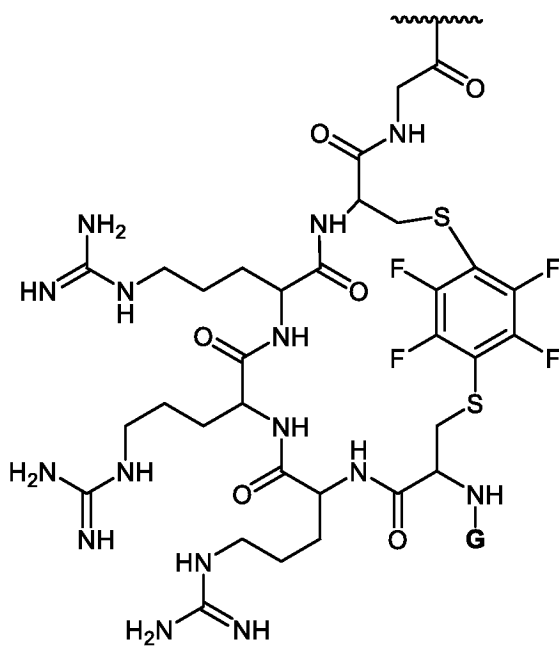
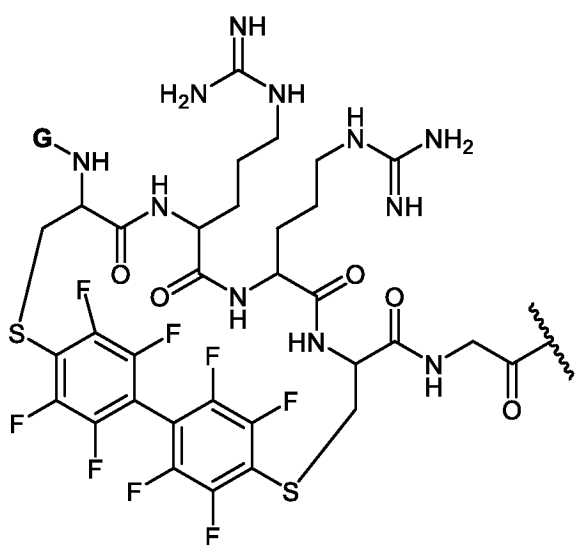
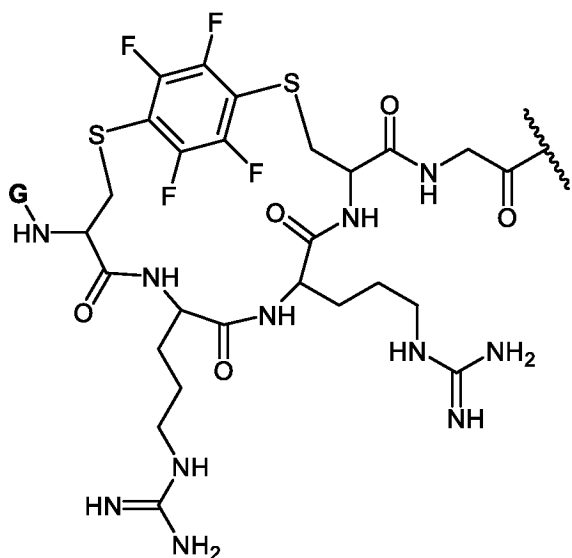
В еще одном варианте осуществления формулы IV G представляет собой $-C(O)CH_3$.

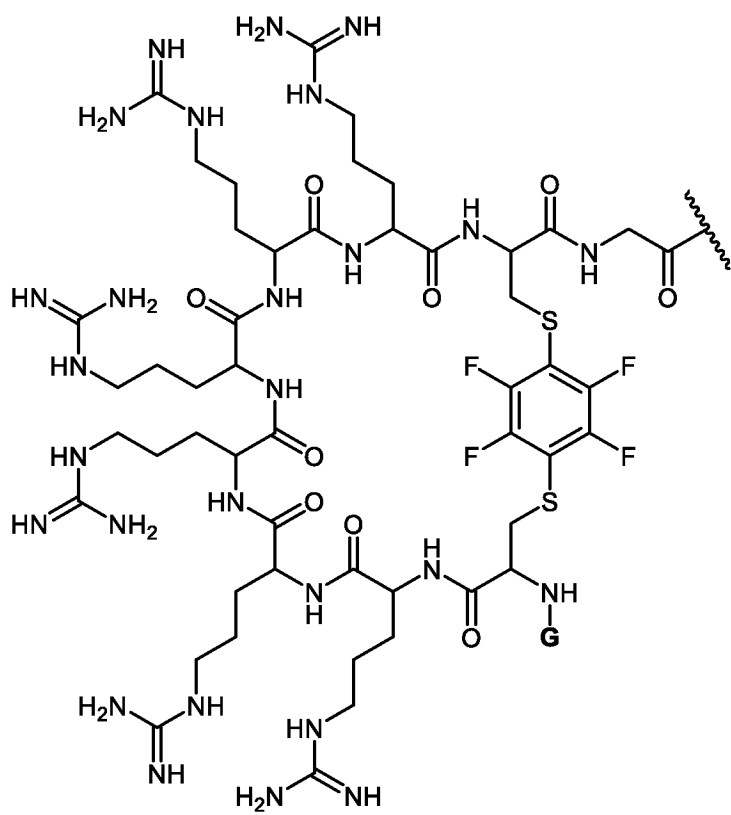
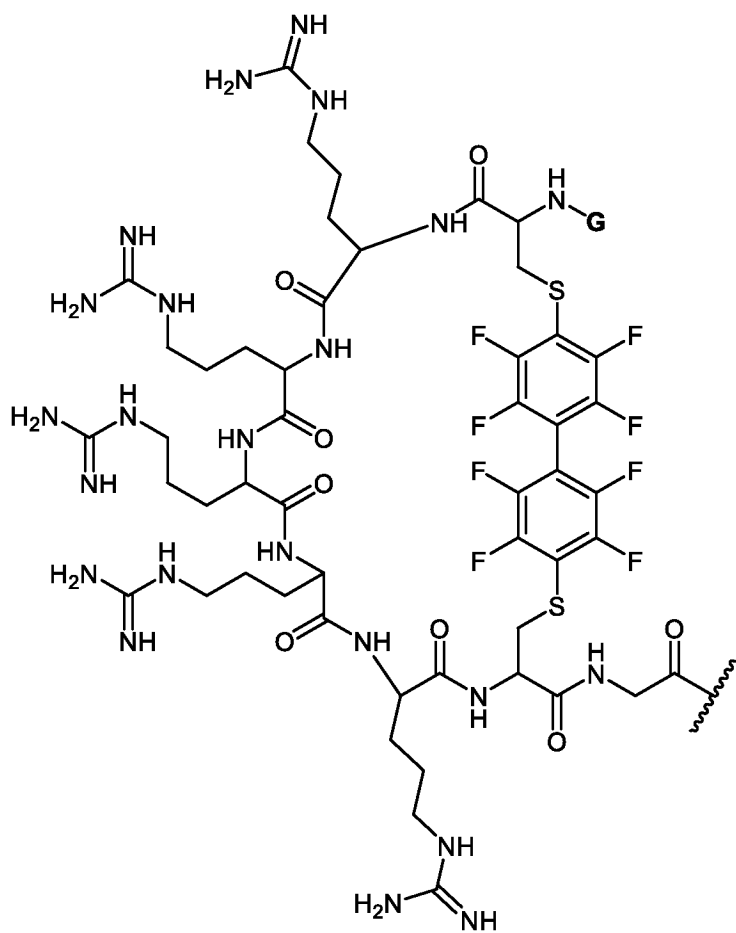
В еще одном варианте осуществления олигонуклеотид содержит нацеливающую последовательность, характеризующуюся комплементарностью последовательности к РНК-мишени. В конкретном варианте осуществления РНК-мишень представляет собой клеточную РНК-мишень. В другом конкретном варианте осуществления нацеливающая последовательность характеризуется достаточной комплементарностью последовательности для связывания с РНК-мишенью. В еще одном конкретном варианте осуществления нацеливающая последовательность характеризуется совершенной комплементарностью последовательности к РНК-мишени.

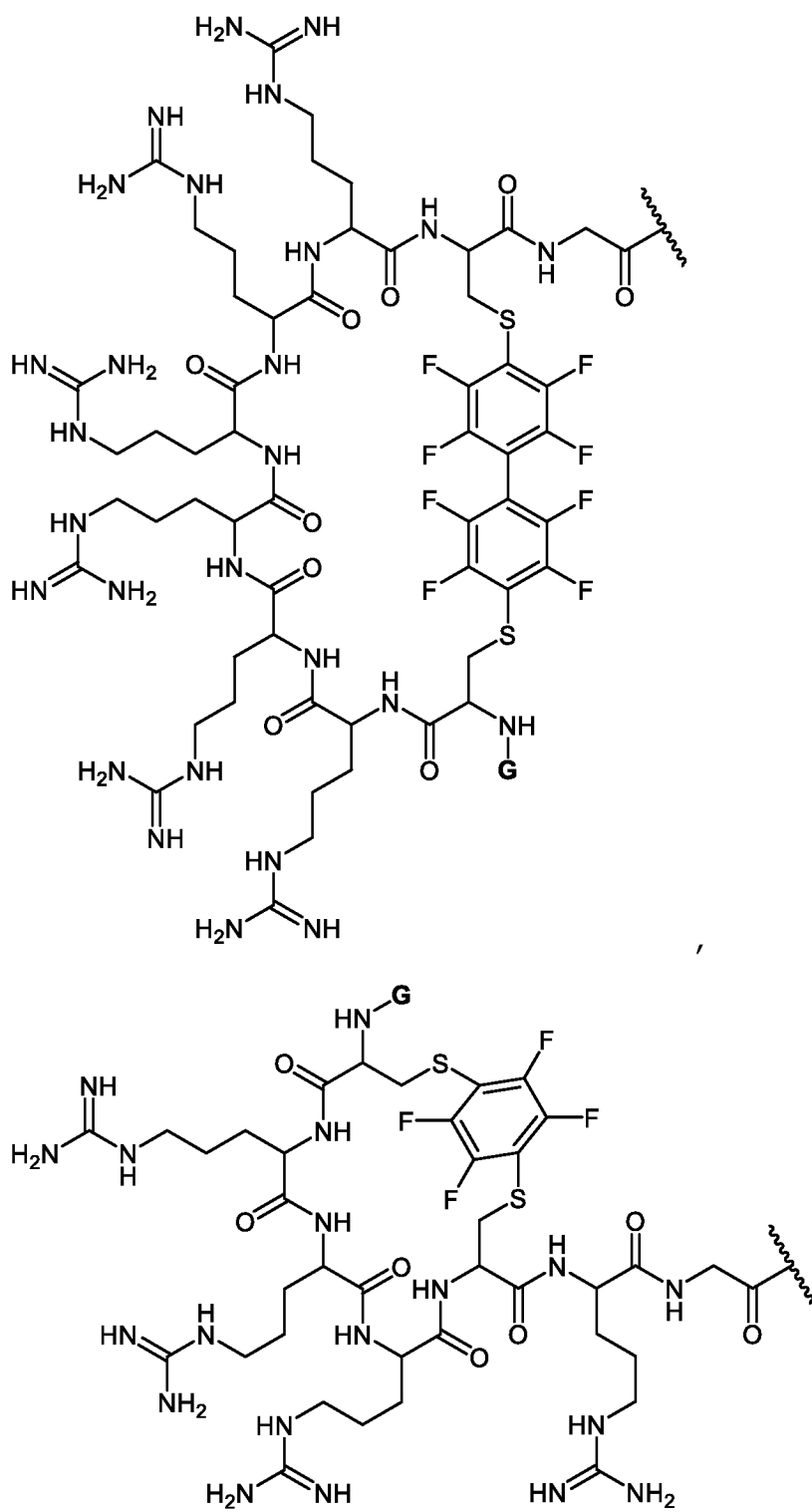
Характерные

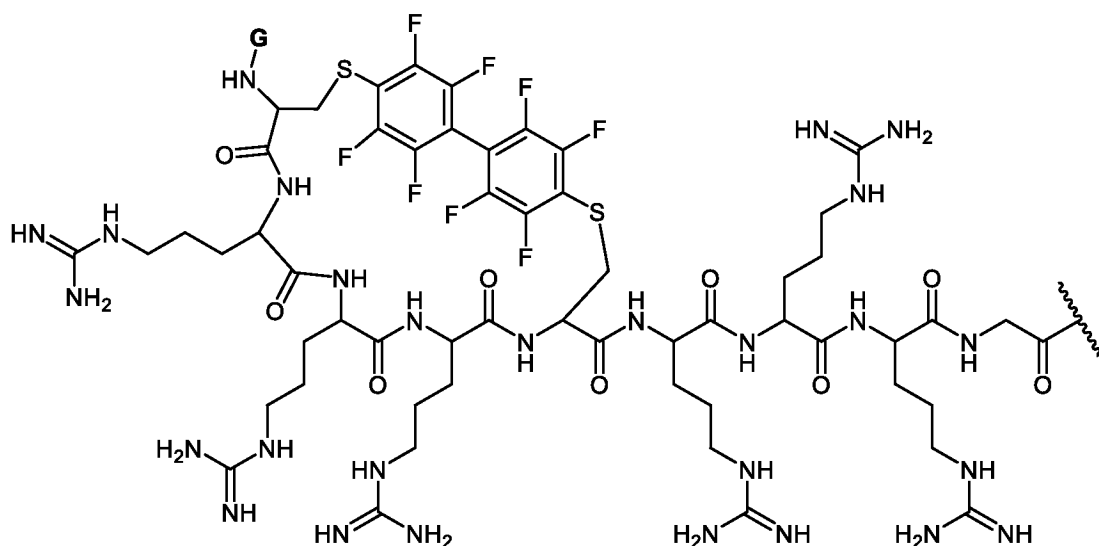


фрагменты в соответствии с настоящим изобретением включают, среди прочих, фрагменты следующих формул:

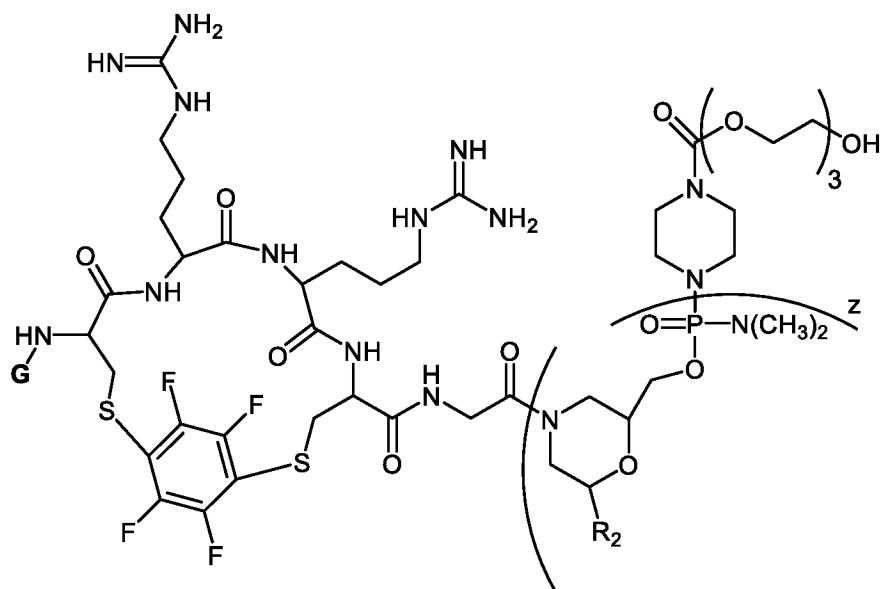


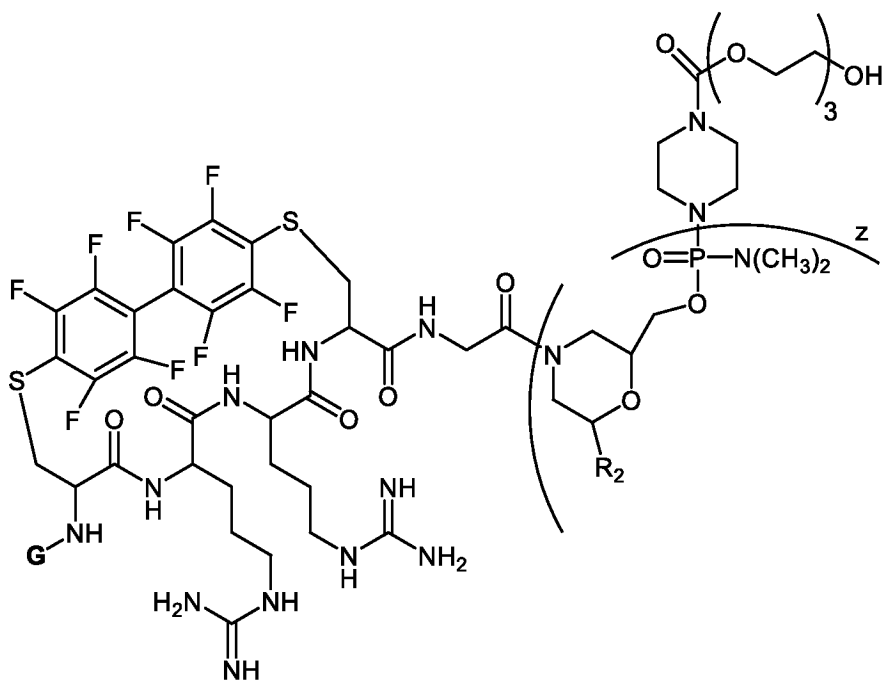
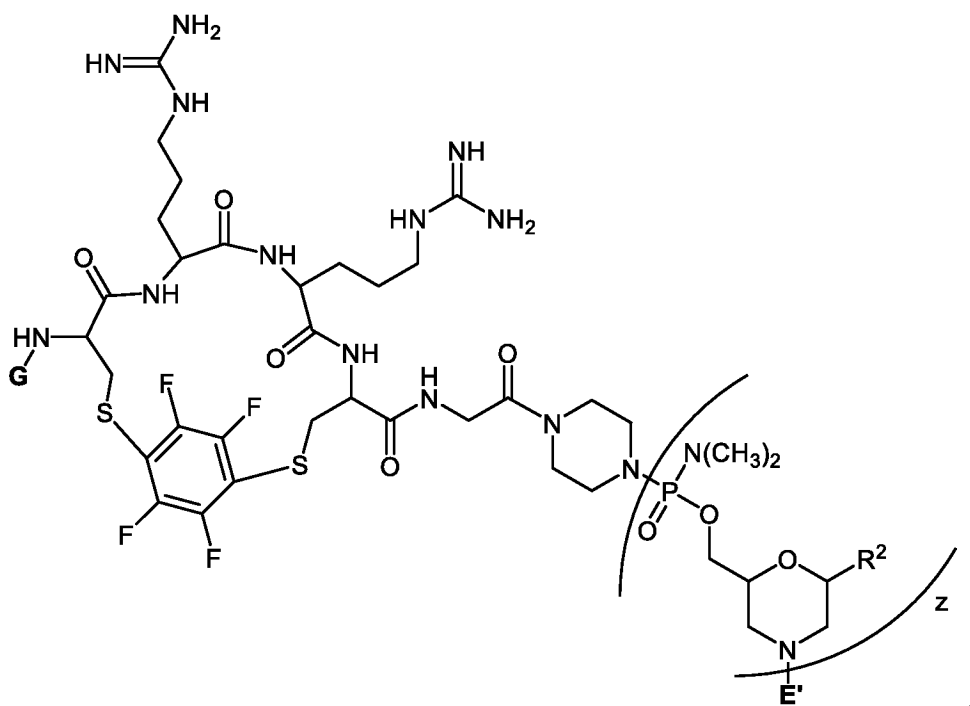


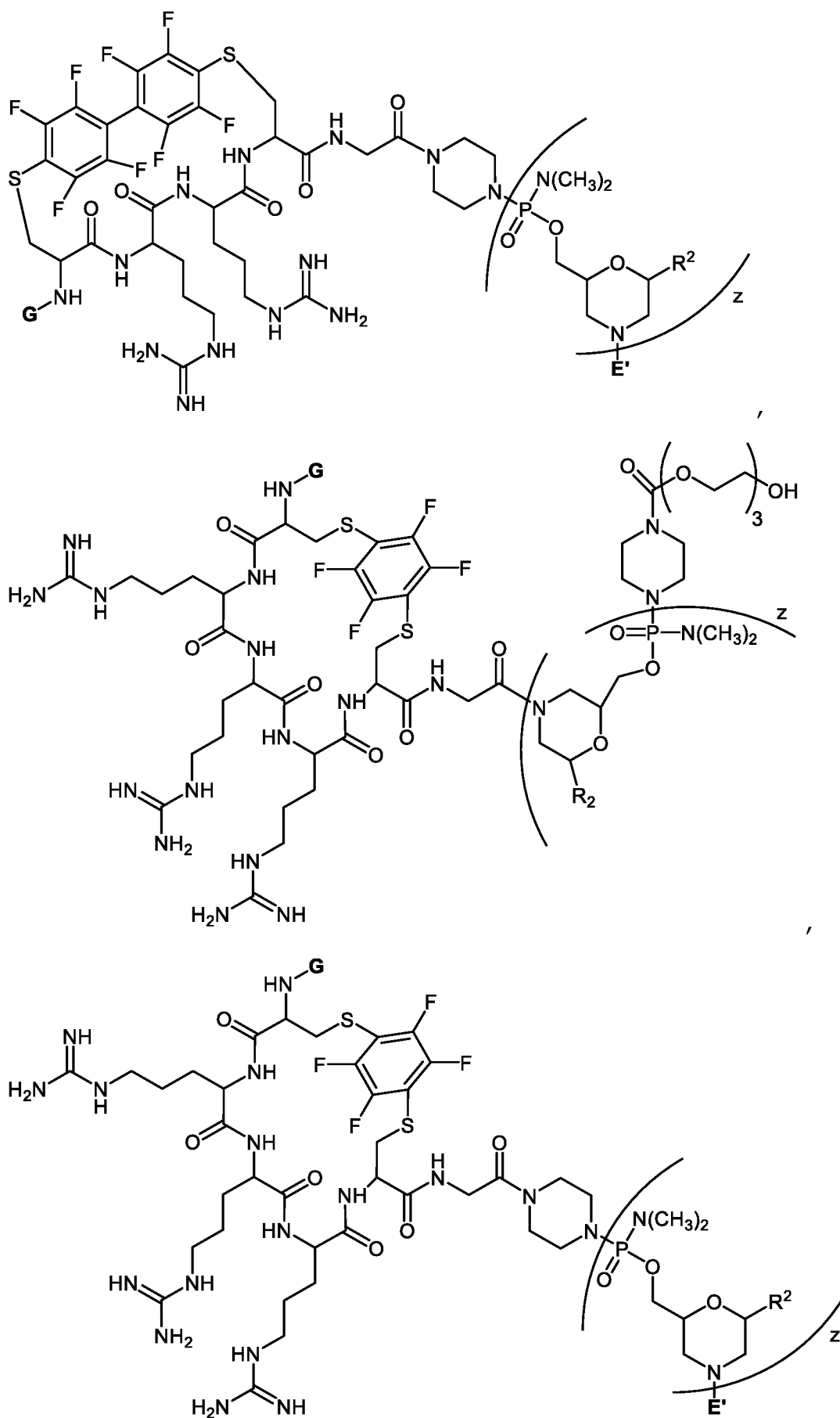


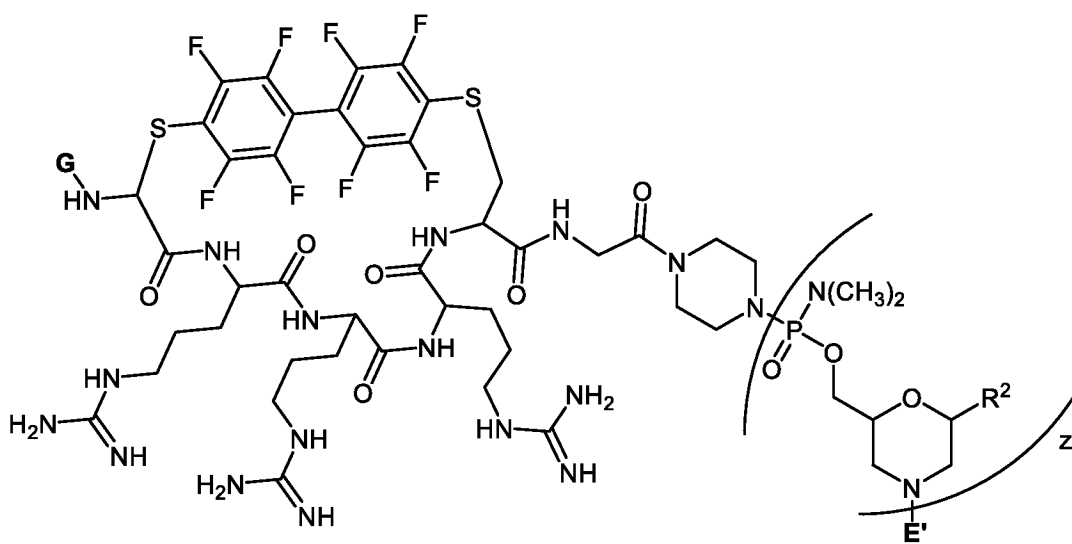
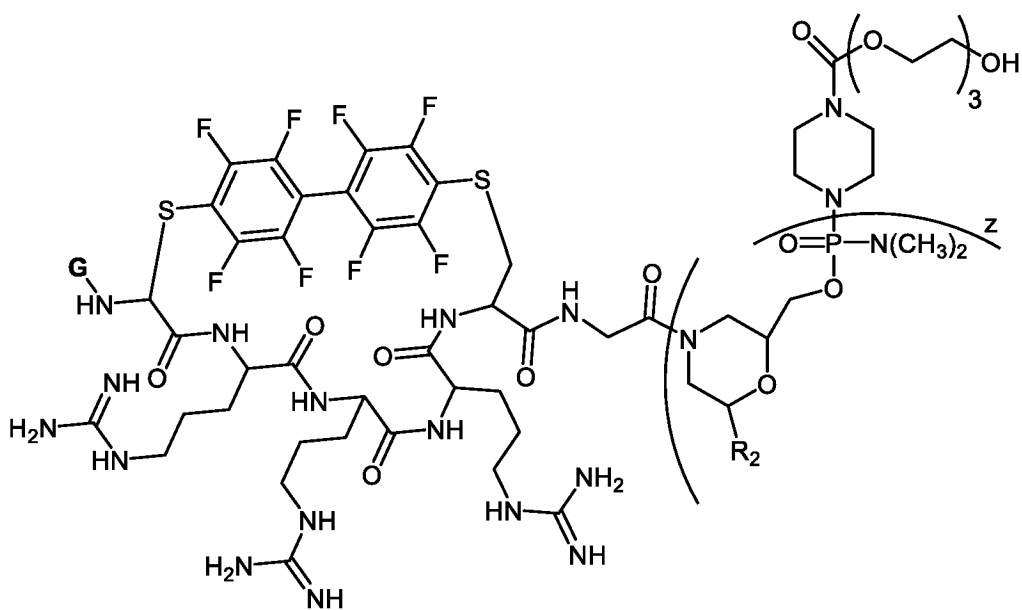


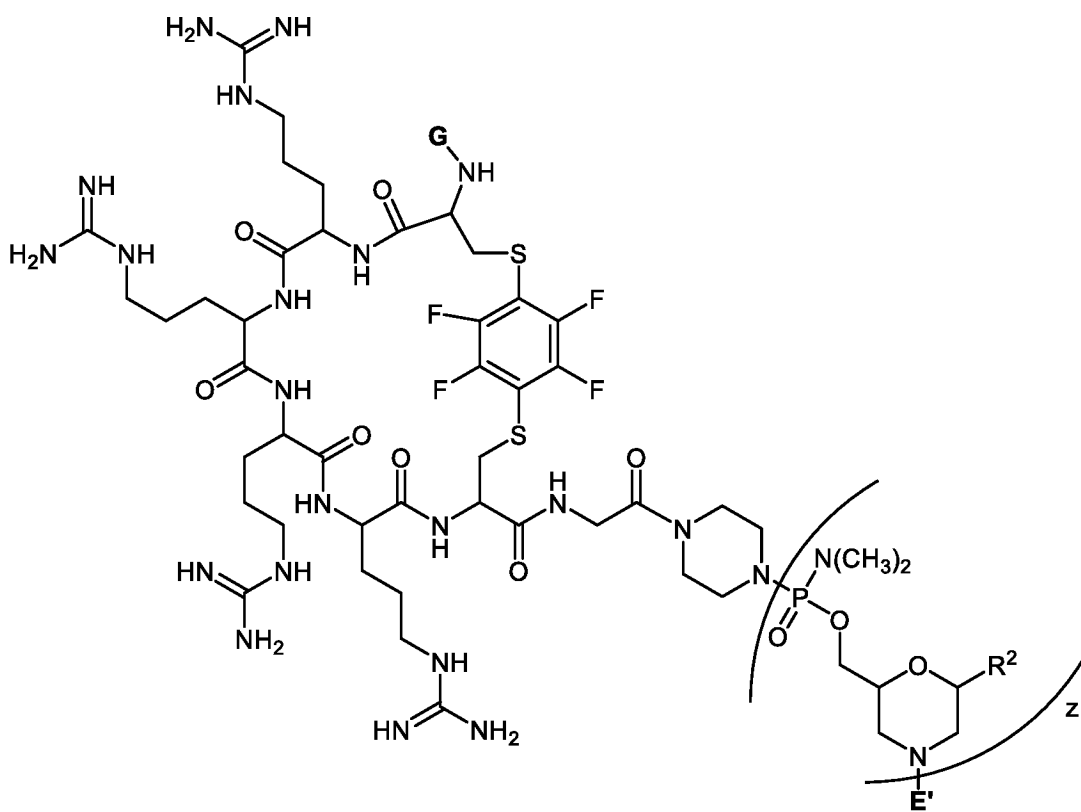
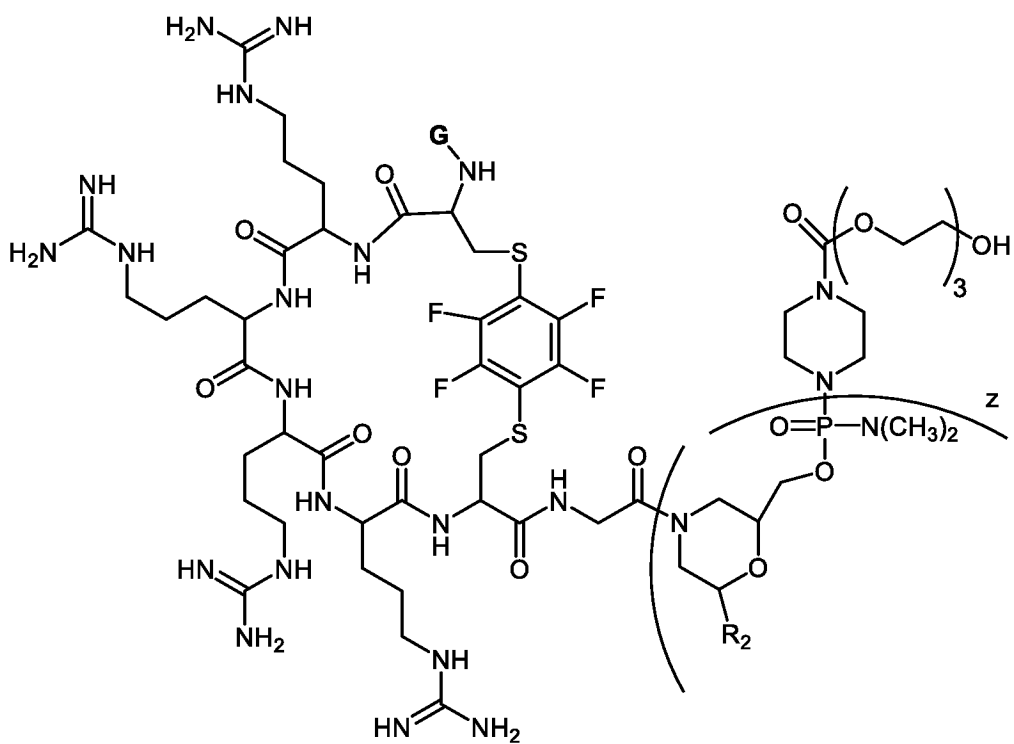
Характерные пептид-олигонуклеотидные конъюгаты в соответствии с настоящим изобретением включают, среди прочих, пептид-олигонуклеотидные конъюгаты со следующими структурами:

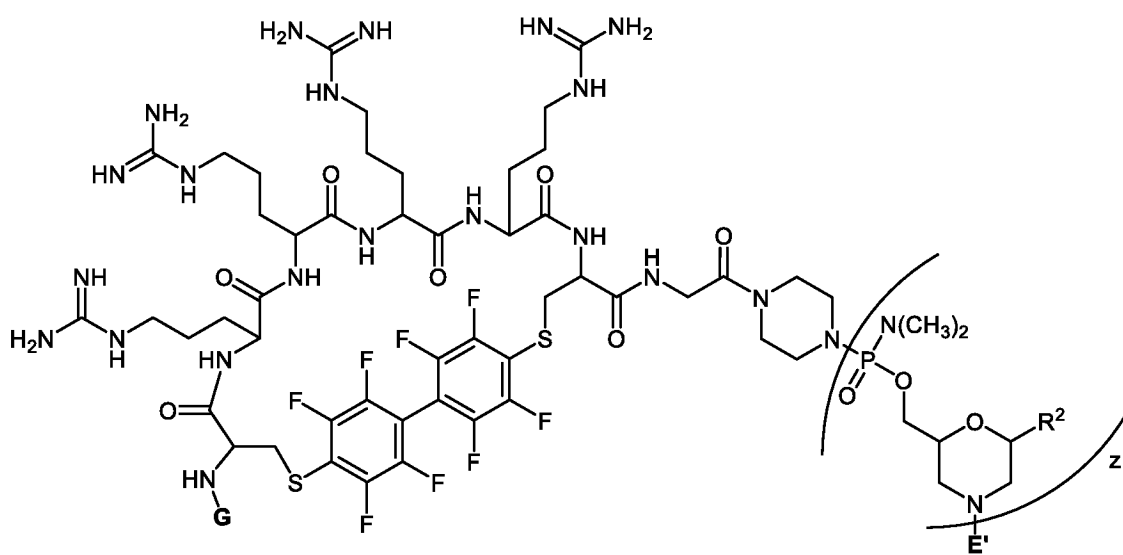
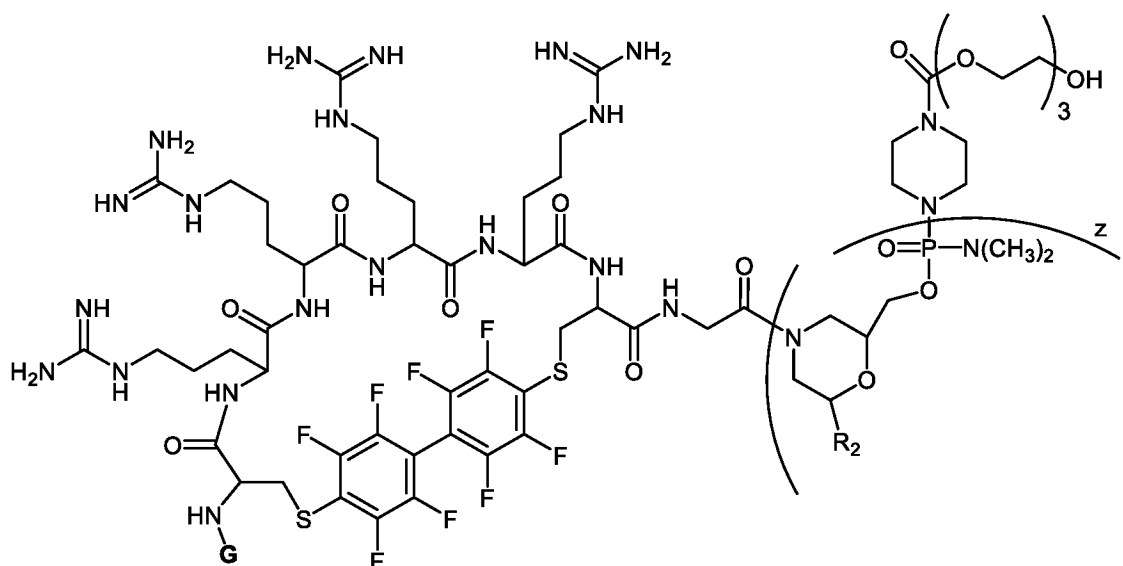


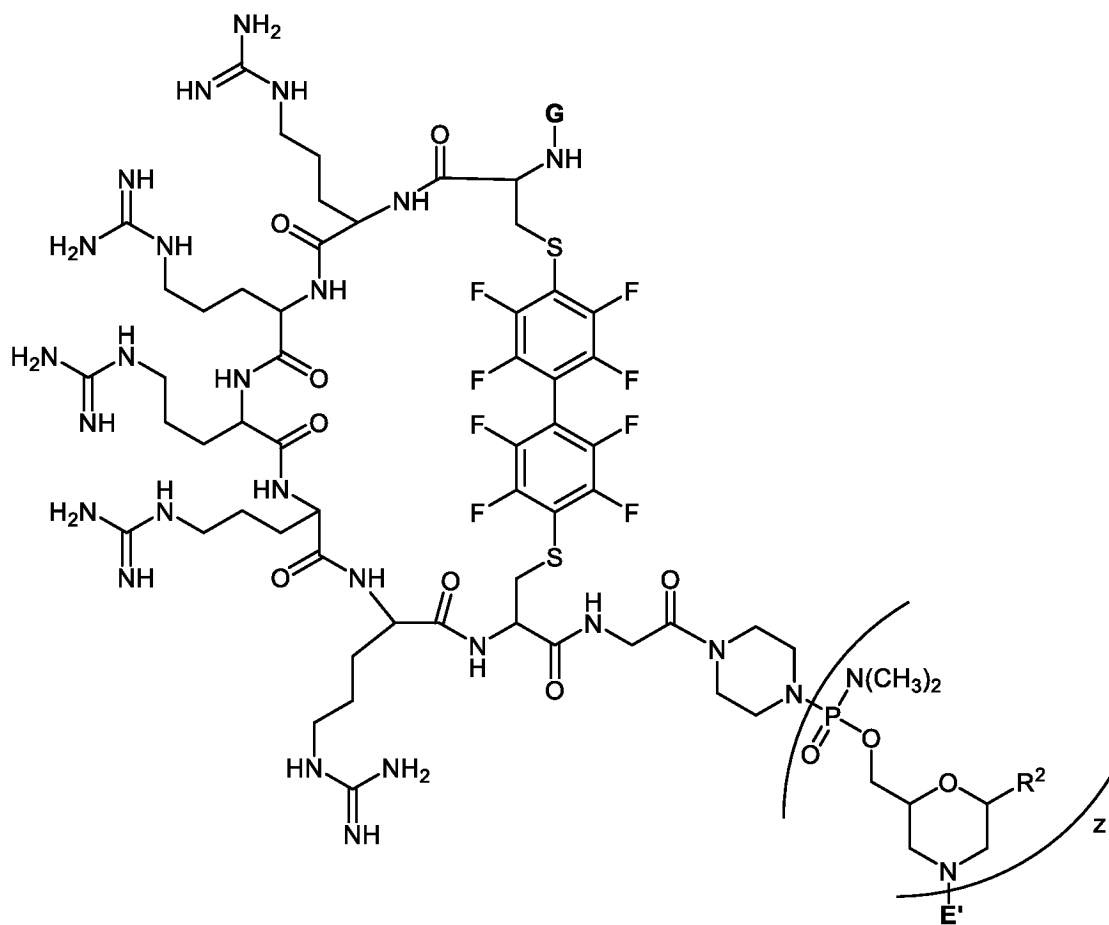
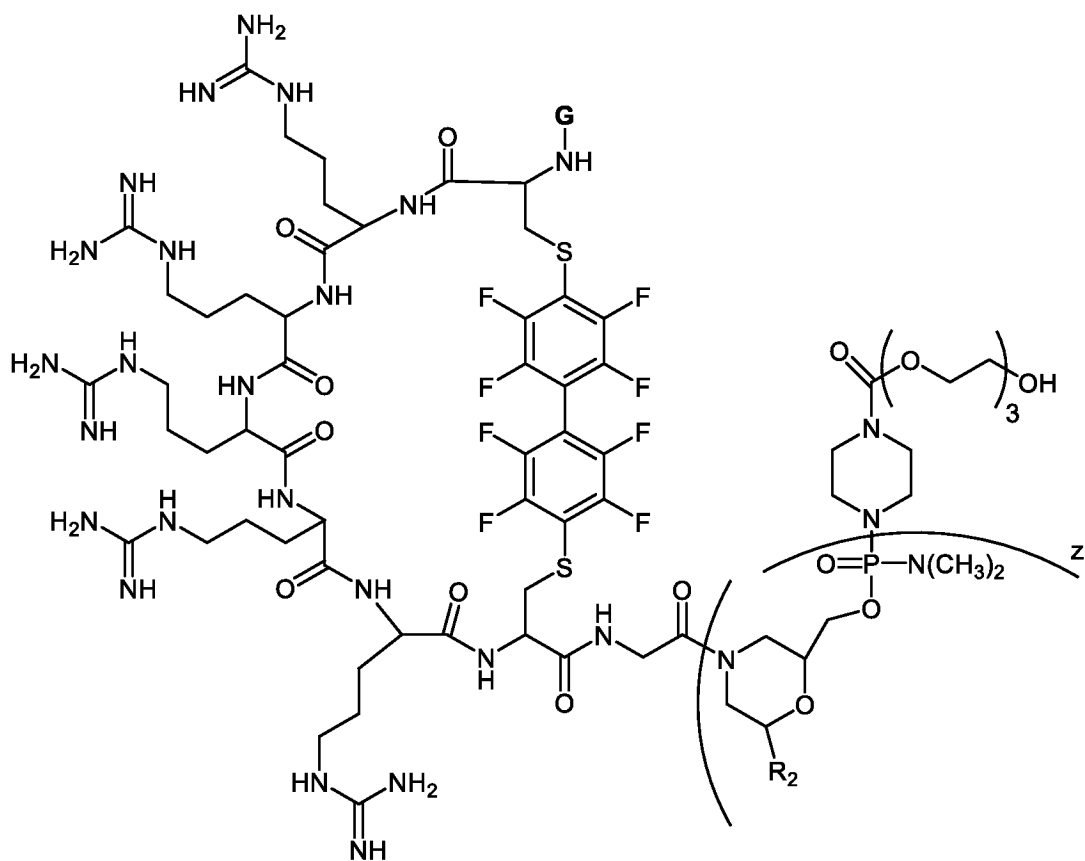


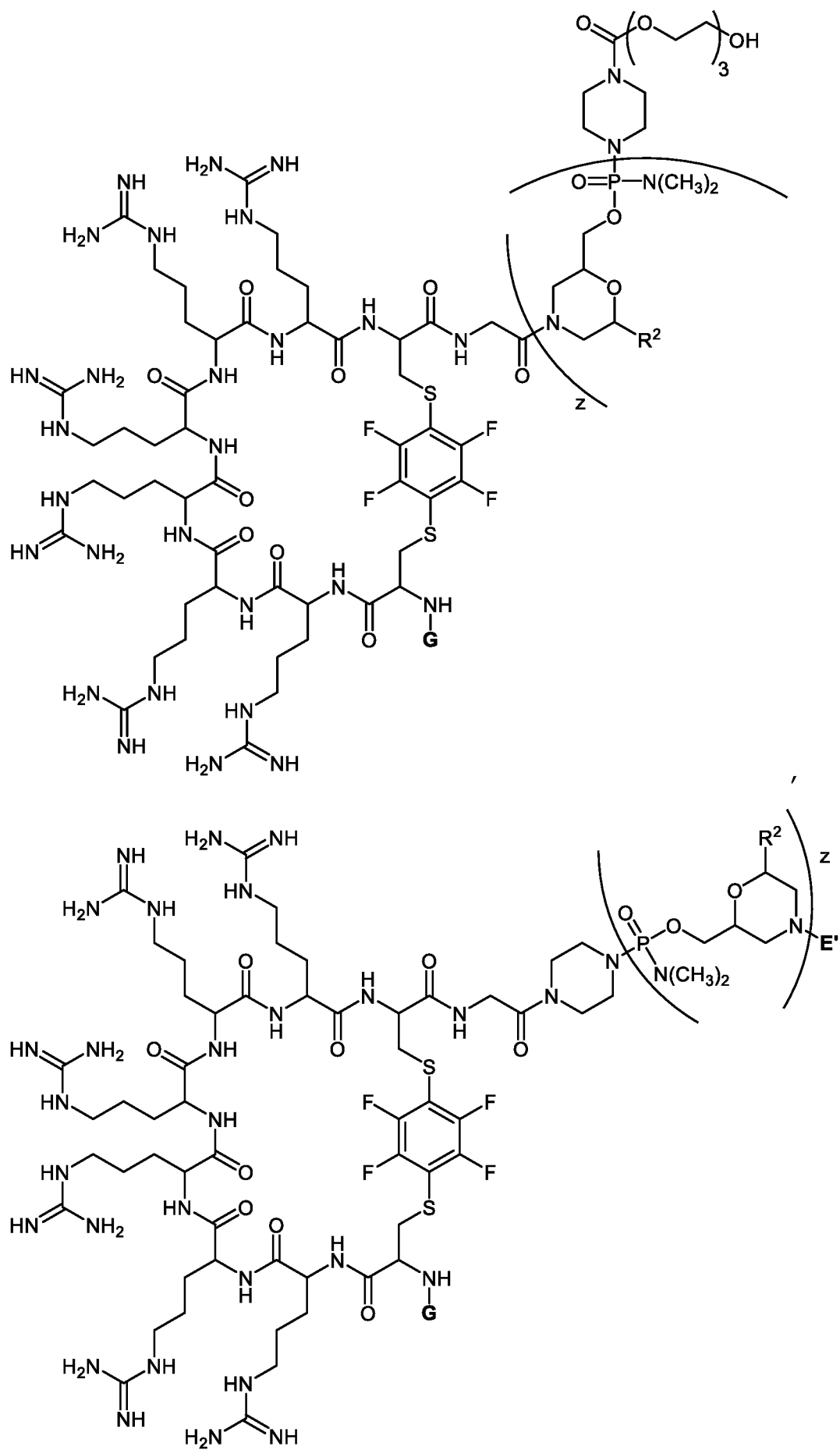


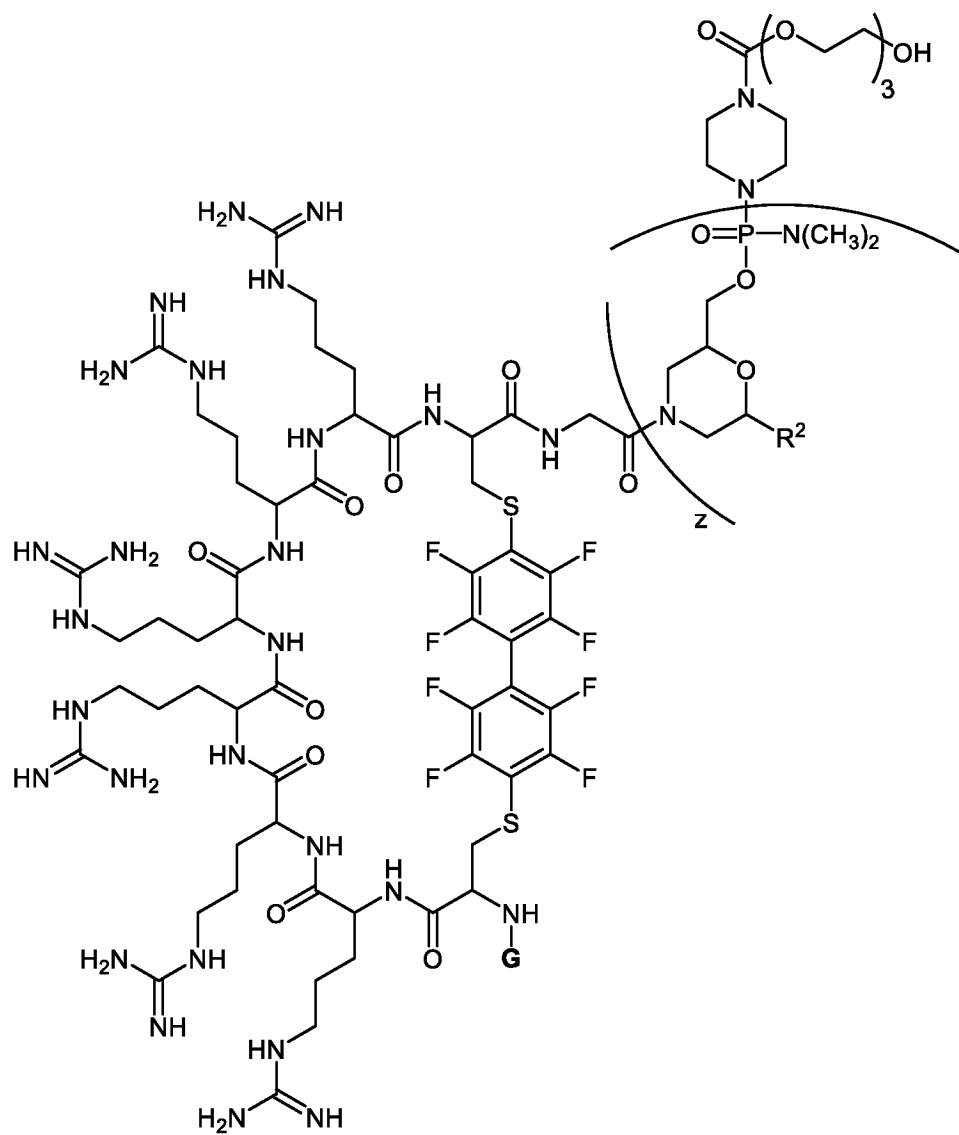


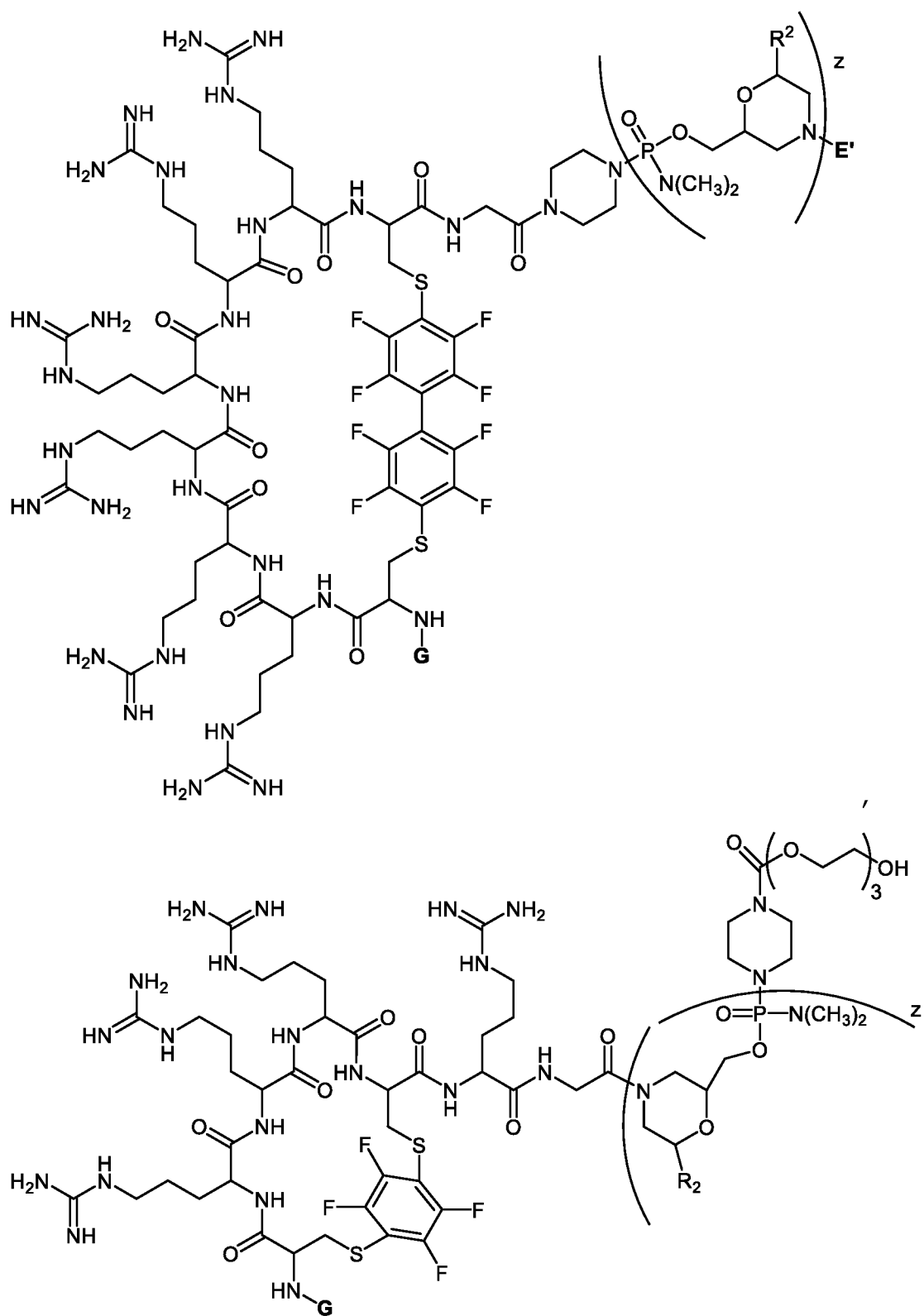


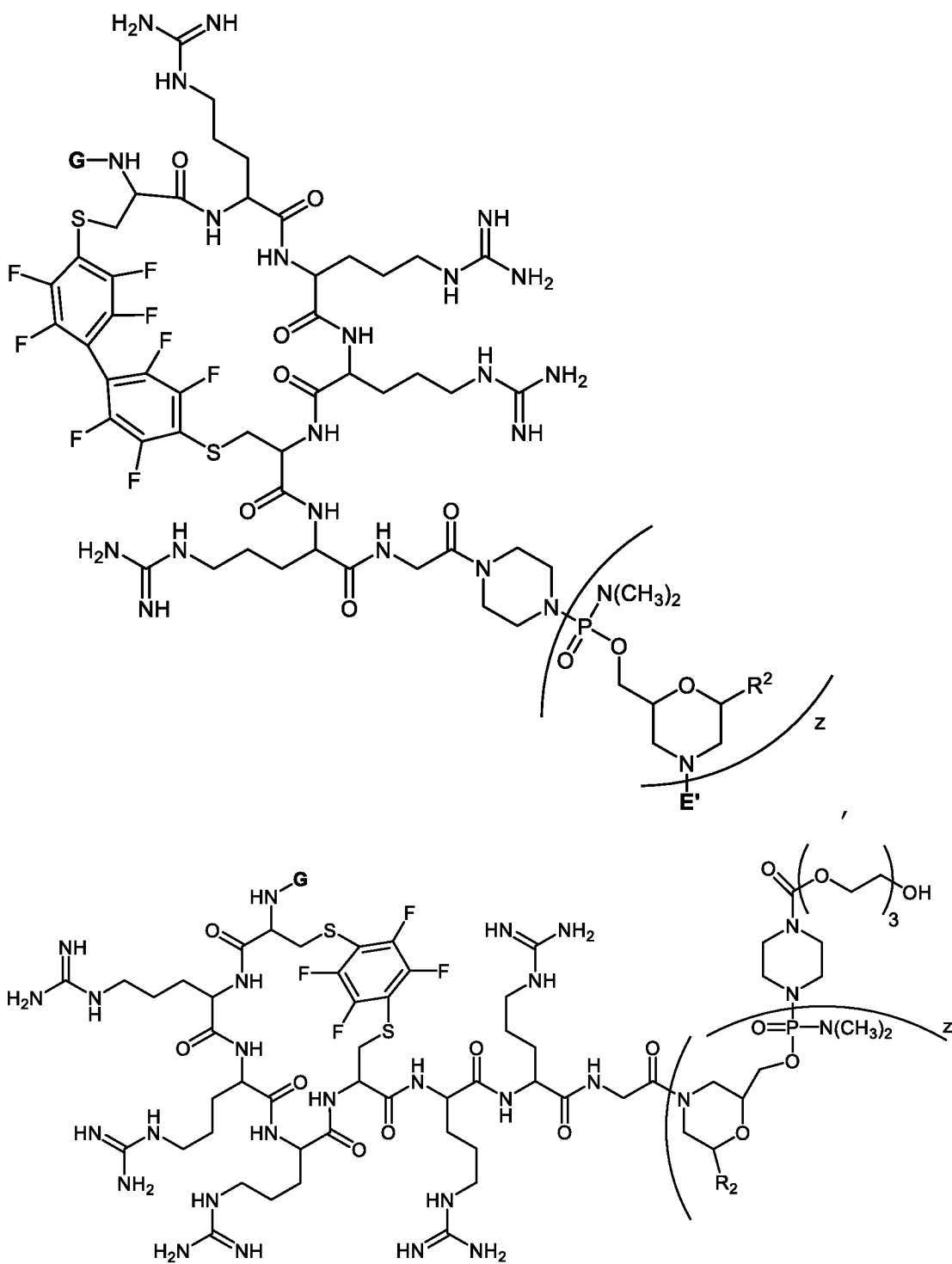


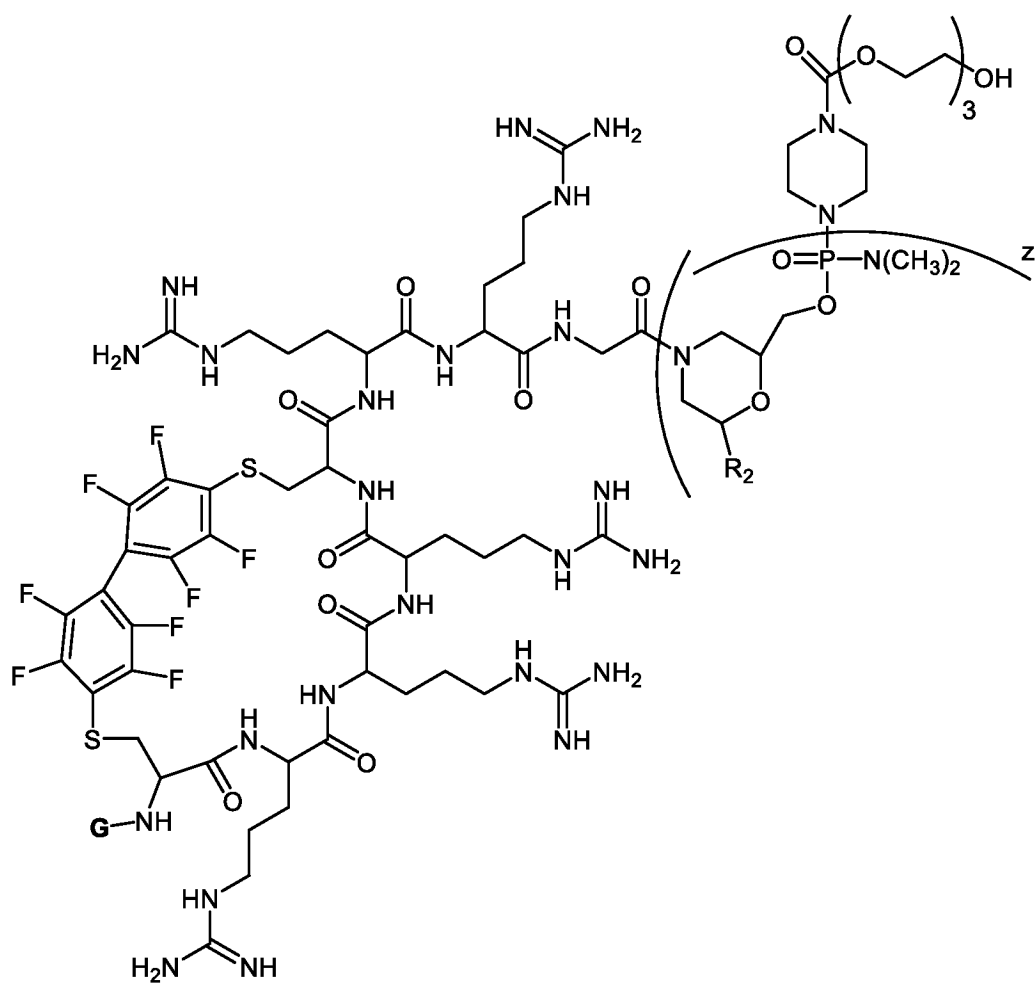
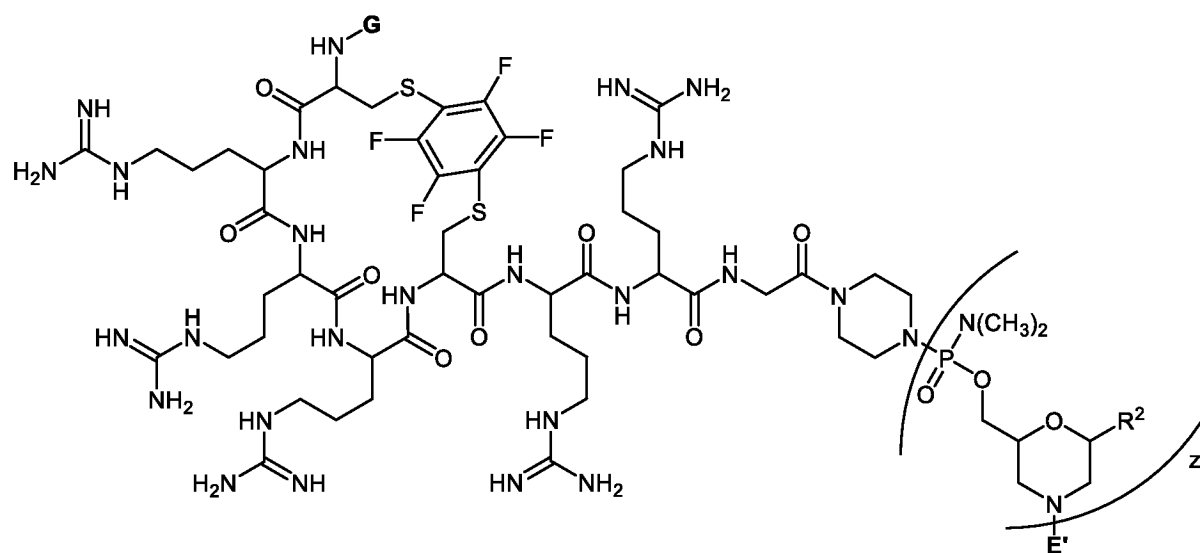


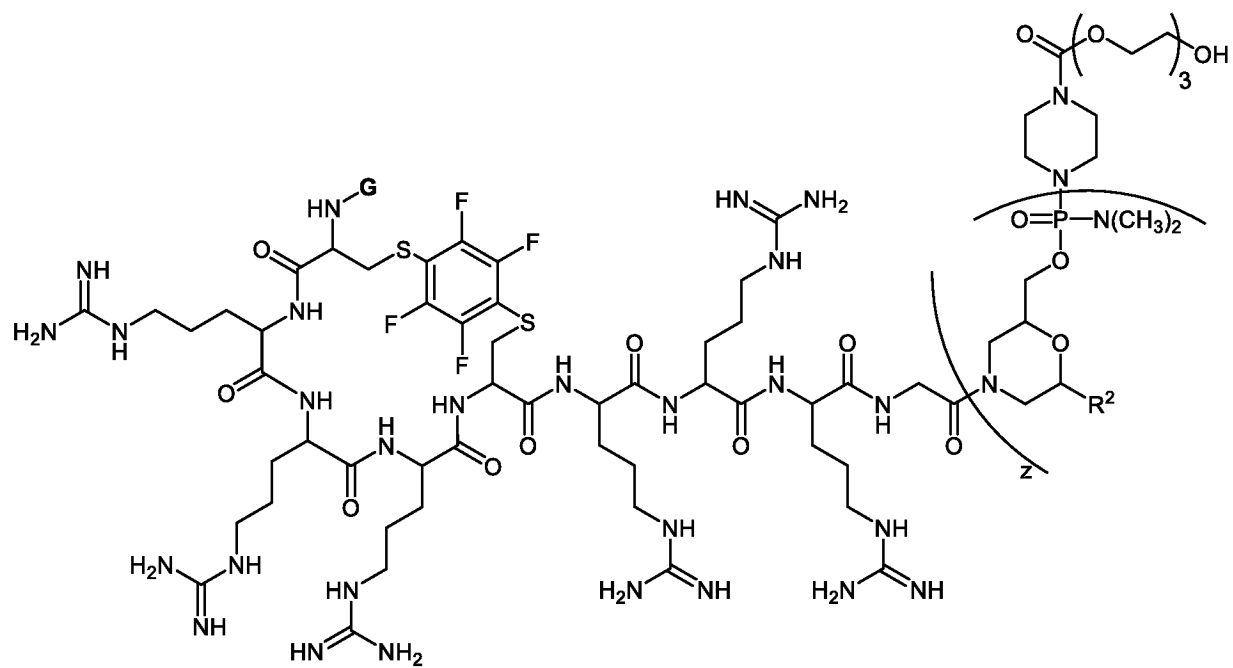
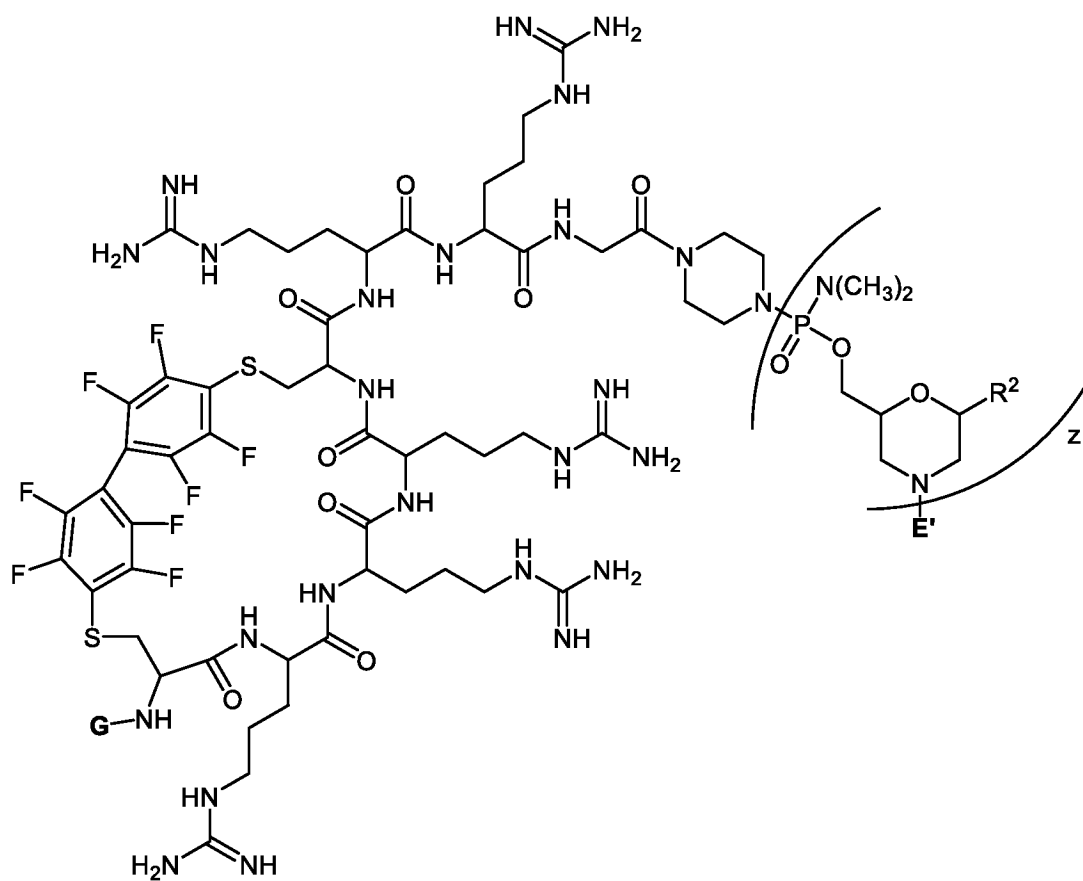


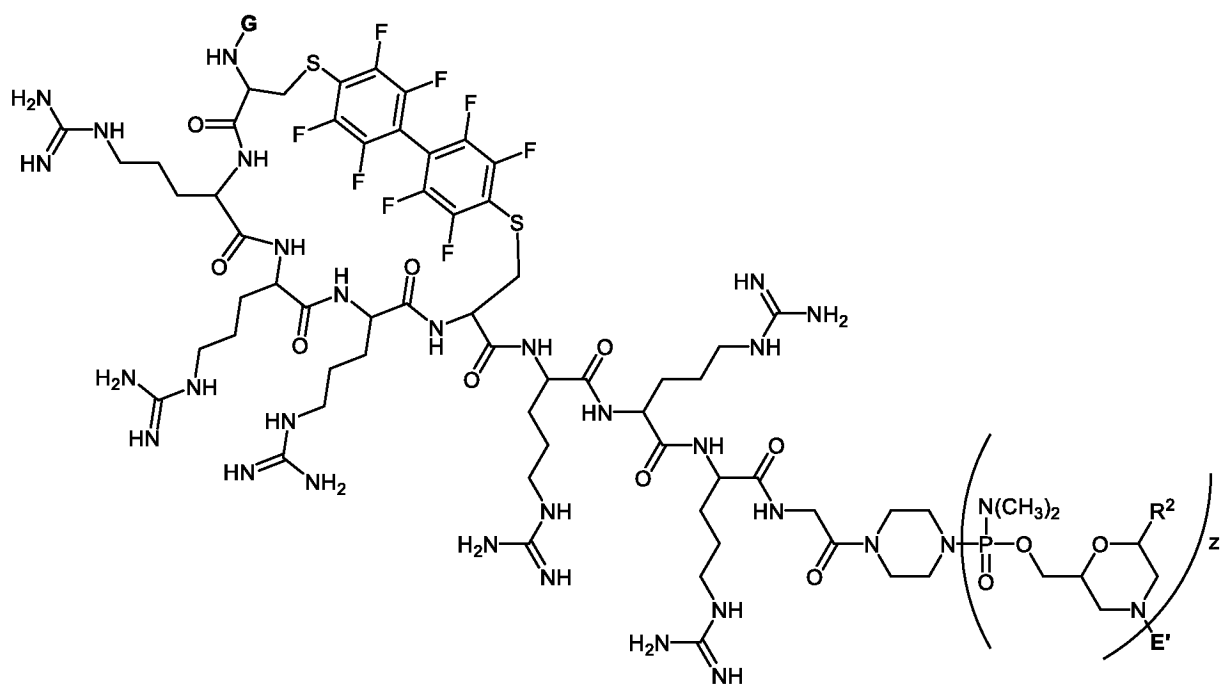
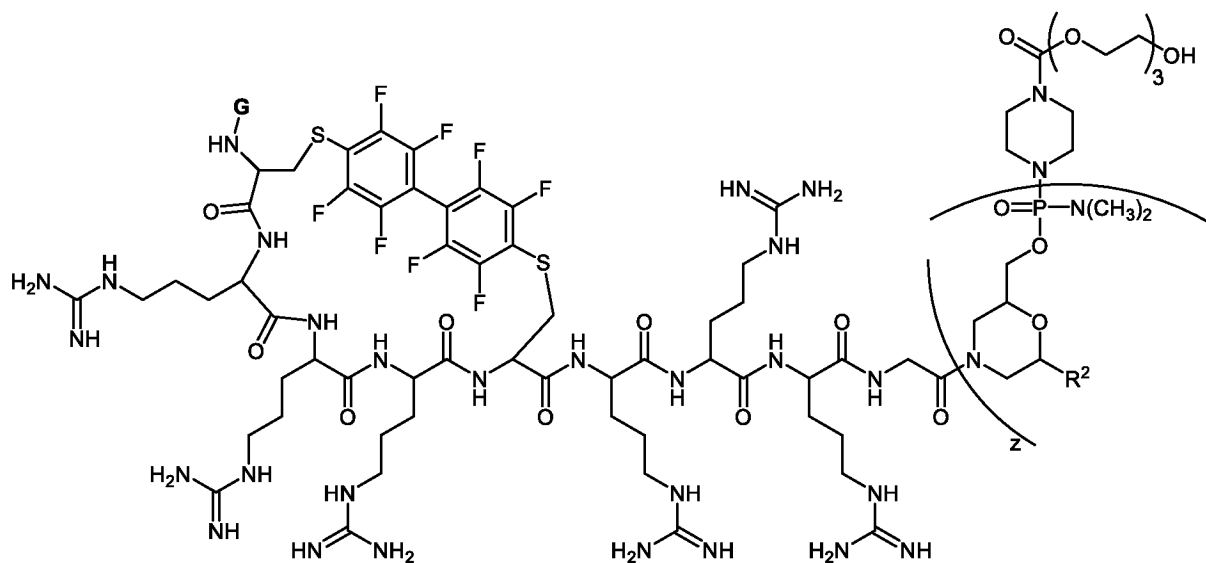
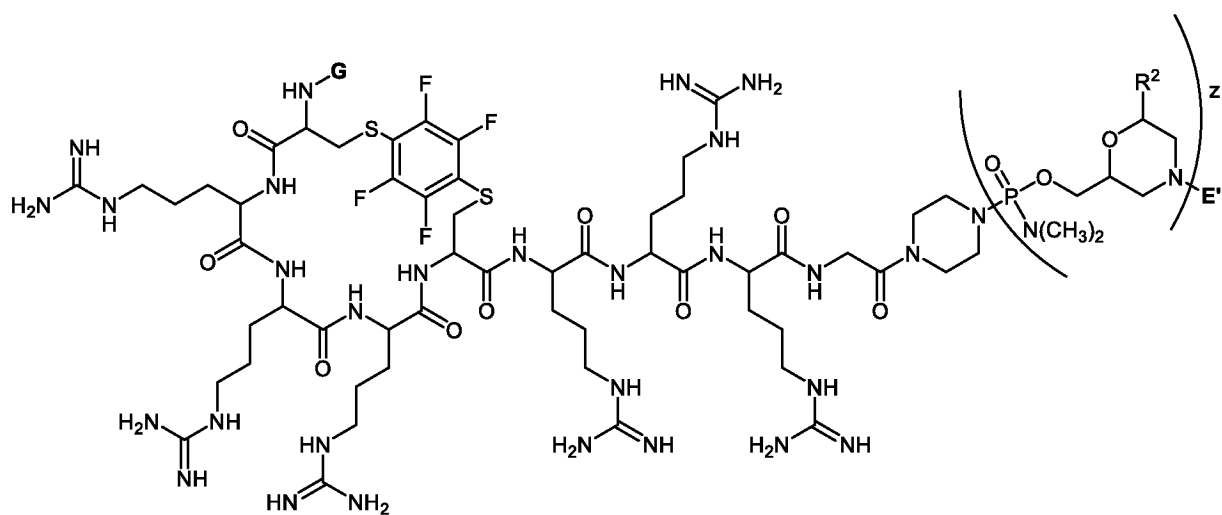












или их фармацевтически приемлемую соль, где

G выбран из H и $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$, и

Е' выбран из Н и $-C(O)CH_3$.

В одном варианте осуществления пептид-олигонуклеотидных конъюгатов в соответствии с настоящим изобретением G представляет собой Н.

В другом варианте осуществления пептид-олигонуклеотидных конъюгатов в соответствии с настоящим изобретением G представляет собой $-C(O)CH_3$.

В еще одном варианте осуществления пептид-олигонуклеотидных конъюгатов в соответствии с настоящим изобретением Е' представляет собой Н.

В еще одном варианте осуществления пептид-олигонуклеотидных конъюгатов в соответствии с настоящим изобретением Е' представляет собой $-C(O)CH_3$.

В еще одном варианте осуществления пептид-олигонуклеотидных конъюгатов в соответствии с настоящим изобретением Е' и G представляют собой $-C(O)CH_3$.

В еще одном варианте осуществления пептид-олигонуклеотидных конъюгатов в соответствии с настоящим изобретением G представляет собой $-C(O)CH_3$, и Е' представляет собой Н.

В некоторых вариантах осуществления пептид-олигонуклеотидные конъюгаты, описанные в данном документе, являются несольватированными. В других вариантах осуществления один или более из пептид-олигонуклеотидных конъюгатов находятся в сольватированной форме. Как известно из уровня техники, сольват может быть образован любым фармацевтически приемлемым растворителем, таким как вода, этанол и т. п.

Несмотря на то, что пептид-олигонуклеотидные конъюгаты по формулам I, Ia, Ib, Ic, Id, Ie и IV изображены в их нейтральных формах, в некоторых вариантах осуществления такие пептид-олигонуклеотидные конъюгаты применяют в форме фармацевтически приемлемой соли.

Олигонуклеотиды

Важные свойства субъединиц на основе морфолино включают: 1) способность к связыванию в олигомерной форме посредством устойчивых незаряженных или положительно заряженных мостиков основной цепи; 2) способность к поддержанию нуклеотидного

основания (например аденина, цитозина, гуанина, тимидина, урацила, 5-метил-цитозина и гипоксантина) так, что образованный полимер может гибридизироваться с комплементарным основанием нуклеиновой кислоты-мишени, включая РНК - мишень, при этом значения T_m выше приблизительно 45°C в относительно коротких олигонуклеотидах (например, 10-15 оснований); 3) способность олигонуклеотида к активному или пассивному транспорту в клетки млекопитающих и 4) способность олигонуклеотида и гетеродуплекса олигонуклеотид:РНК сопротивляться расщеплению РНКазы и РНКазы N соответственно.

Устойчивость дуплекса, образованного олигомером и последовательностью-мишенью, представляет собой функцию T_m связывания и чувствительности дуплекса к ферментативному расщеплению клетки. T_m олигомера в отношении РНК комплементарной последовательности может быть измерена посредством традиционных способов, например, таковых, описанных Hames et al., *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, 1985, стр. 107-108, или описанных в Miyada C. G. and Wallace R. B., 1987, *Oligomer Hybridization Techniques*, *Methods Enzymol.* Vol. 154 стр. 94-107. В некоторых вариантах осуществления, антисмысловые олигомеры могут характеризоваться T_m связывания в отношении РНК комплементарной последовательности, превышающей температуру тела, и в некоторых вариантах осуществления составляющей более приблизительно 45°C или 50°C . Также включены значения T_m в диапазоне $60-80^\circ\text{C}$ или выше. Согласно хорошо известным принципам, T_m олигомера в отношении гибрида РНК на основе комплементарной последовательности может быть повышена за счет повышения соотношения спаренных оснований С:G в дуплексе или за счет повышения длины (в парах оснований) гетеродуплекса, или за счет обоих. Наряду с этим, в целях оптимизации захвата клеткой может быть преимущественным ограничение размера олигомера. Поэтому соединения в соответствии с настоящим изобретением включают в себя соединения, которые проявляют высокую T_m ($45-50^\circ\text{C}$ или выше) при длине 25 оснований или меньше.

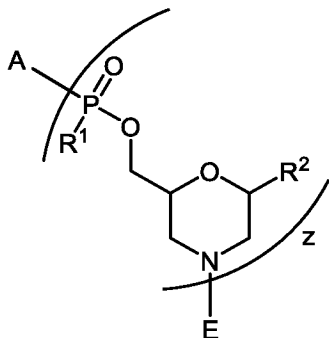
Длину олигонуклеотида можно изменять до тех пор, пока он будет сохранять способность селективного связывания с предполагаемым местоположением в молекуле пре-мРНК. Длина таких последовательностей может быть определена в соответствии с процедурами селекции, описанными в данном документе. Обычно олигонуклеотид будет составлять от приблизительно 8 нуклеотидов в длину до не более чем приблизительно 50 нуклеотидов в длину. Например, длина олигонуклеотида (z) может составлять 8-38, 8-25, 15-25, 17-21 или приблизительно 18. Однако понятно, что любая длина нуклеотидов в данном диапазоне может быть применимой в способах, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды содержат модификации или замещения оснований. Например, некоторые нуклеиновые основания могут быть выбраны для повышения аффинности связывания антисмысловых олигонуклеотидов, описанных в данном документе. Такие включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2-, N-6- и 0-6-замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил, 5-пропинилцитозин и 2,6-диаминопурин. Для замещений 5-метилцитозина было показано повышение устойчивости дуплекса нуклеиновой кислоты на 0,6-1,2 °C, и при этом они могут быть включены в антисмысловые олигонуклеотиды, описанные в данном документе. В одном варианте осуществления по меньшей мере одно пиримидиновое основание олигонуклеотида содержит 5-замещенное пиримидиновое основание, где пиримидиновое основание выбрано из группы, состоящей из цитозина, тимина и урацила. В одном варианте осуществления 5-замещенное пиримидиновое основание представляет собой 5-метилцитозин. В другом варианте осуществления по меньшей мере одно пуриновое основание олигонуклеотида содержит N-2-, N-6-замещенное пуриновое основание. В одном варианте осуществления N-2-, N-6-замещенное пуриновое основание представляет собой 2,6-диаминопурин.

Олигомеры на основе морфолино (включая антисмысловые олигомеры) подробно описаны, например, в патентах США №№ 5,698,685; 5,217,866; 5,142,047; 5,034,506; 5,166,315;

5,185,444; 5,521,063; 5,506,337; и находящихся на рассмотрении заявках на патент США №№ 12/271,036; 12/271,040; и публикациях заявок по PCT № WO/2009/064471 и WO/2012/043730, а также Summerton et al. 1997, Antisense and Nucleic Acid Drug Development, 7, 187-195, которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Соответственно, в одном аспекте в данном документе представлен олигонуклеотид по формуле II:

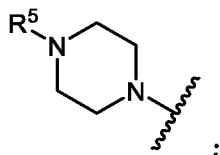


(II),

или его фармацевтически приемлемая соль,

где

A выбран из группы, состоящей из OH, $-NHCH_2C(O)NH_2$, $-N(C_{1-6}\text{-алкил})CH_2C(O)NH_2$ и



R^5 представляет собой $-C(O)(O\text{-алкил})_xOH$, где x находится в диапазоне 3-10, и каждая алкильная группа независимо в каждом случае представляет собой $-C_{2-6}\text{-алкил}$, или R^5 выбран из группы, состоящей из $-C(O)C_{1-6}\text{-алкила}$, тритила, монометокситритила, $-C_{1-6}\text{-алкил-}R^6$, $-C_{1-6}\text{-гетероалкил-}R^6$, $\text{-арил-}R^6$, $\text{-гетероарил-}R^6$, $-C(O)O\text{-}C_{1-6}\text{-алкил-}R^6$, $-C(O)O\text{-арил-}R^6$ и $-C(O)O\text{-гетероарил-}R^6$;

R^6 выбран из группы, состоящей из OH, SH и NH_2 , или R^6 представляет собой O, S или NH, ковалентно связанный с твердой подложкой;

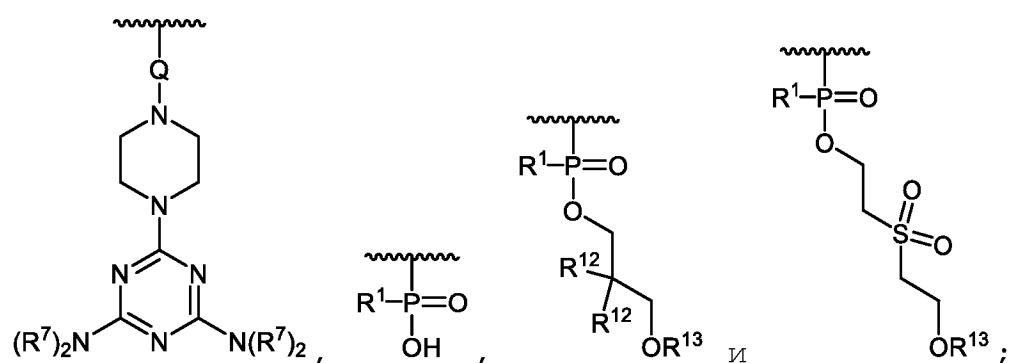
каждый R^1 независимо представляет собой OH или $-NR^3R^4$;

каждый из R^3 и R^4 независимо в каждом случае представляет собой $-C_{1-6}\text{-алкил}$;

каждый R^2 независимо выбран из группы, состоящей из H, нуклеинового основания и нуклеинового основания, функционализированного химической защитной группой, где нуклеиновое основание независимо в каждом случае содержит 3-6-гетероциклическое кольцо, выбранное из группы, состоящей из пиридина, пиримидина, триазина, пурина и деазапурина;

z находится в диапазоне 8-40;

E выбран из группы, состоящей из H, $-C_{1-6}$ -алкила, $-C(O)C_{1-6}$ -алкила, бензоила, стеароила, тритила, монометокситритила, диметокситритила, триметокситритила,



Q представляет собой $-C(O)(CH_2)_6C(O)-$ или $-C(O)(CH_2)_2S_2(CH_2)_2C(O)-$;

R^7 представляет собой $-(CH_2)_2OC(O)N(R^8)_2$;

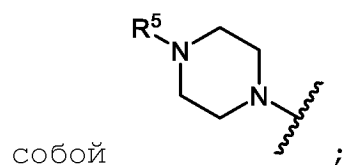
R^8 представляет собой $-(CH_2)_6NHC(=NH)NH_2$;

R^{12} представляет собой $-C(O)NHC_{1-6}$ -алкил или $-C(O)OC_{1-6}$ -алкил;

и

R^{13} выбран из группы, состоящей из тритила, монометокситритила, диметокситритила и триметокситритила.

В одном варианте осуществления формулы II A представляет



собой

E выбран из группы, состоящей из H, $-C(O)CH_3$, бензоила и стеароила;

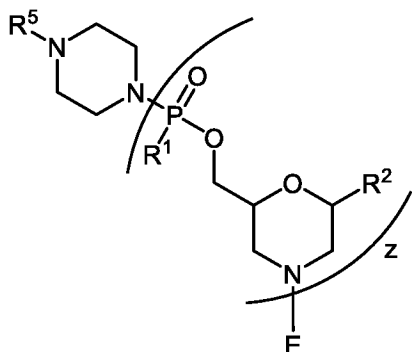
R^5 представляет собой $-C(O)(O\text{-алкил})_x-OH$, где каждая алкильная группа независимо в каждом случае представляет собой $-C_{2-6}$ -алкил, тритил и 4-метокситритил; и

каждый R^2 независимо представляет собой нуклеиновое основание, где нуклеиновое основание независимо в каждом случае содержит C_{4-6} -гетероциклическое кольцо, выбранное из группы, состоящей из пиридина, пиримидина, пурина и деазапурина.

В другом варианте осуществления формулы II R^5 представляет собой $C(O)(O-CH_2CH_2)_3-OH$; и

каждый R^2 независимо представляет собой нуклеиновое основание, где нуклеиновое основание независимо в каждом случае содержит пиримидин или пурин.

В еще одном варианте осуществления олигонуклеотид по формуле II представляет собой олигонуклеотид по формуле IIa:



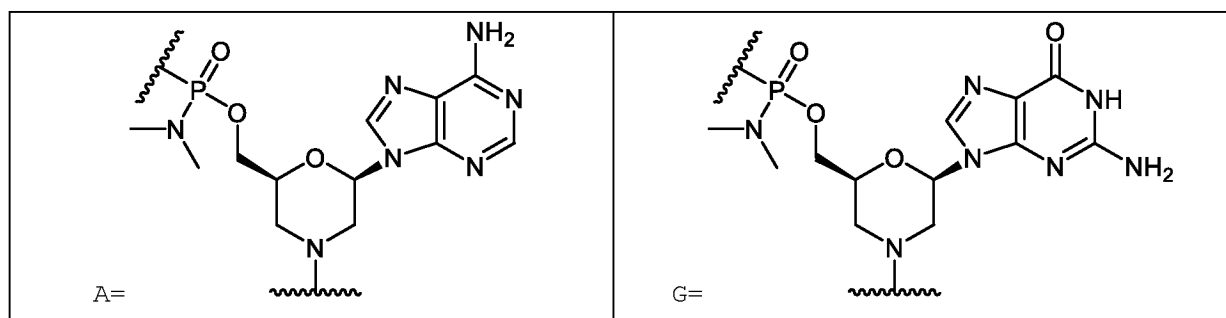
(IIa).

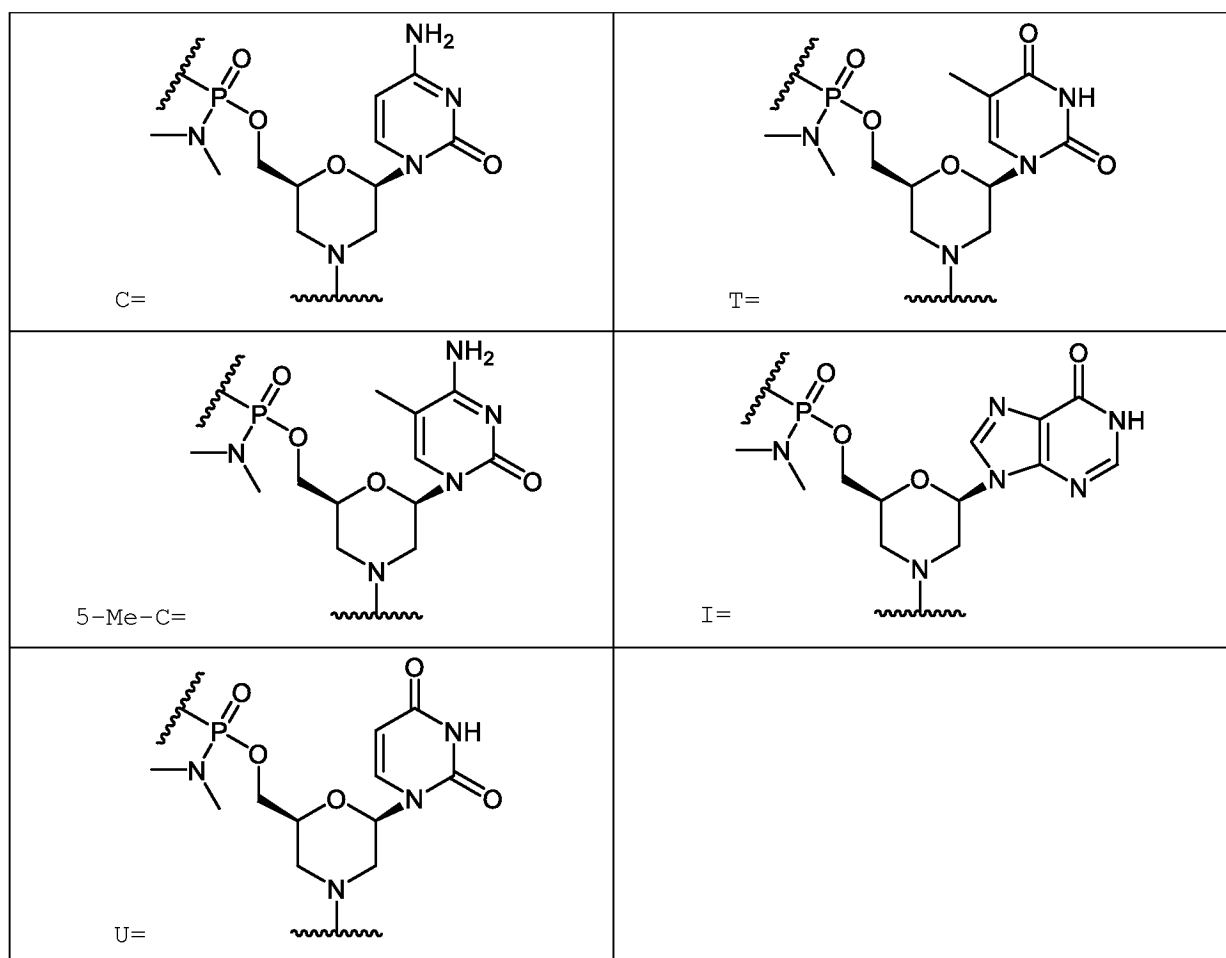
В одном варианте осуществления формулы II и IIa R^2 независимо в каждом случае представляет собой аденин, 2,6-диаминопурин, гуанин, гипоксантин, цитозин, 5-метил-цитозин, тимин, урацил и гипоксантин; и

каждый R^1 представляет собой $-N(CH_3)_2$.

В таблице 1 представлены различные варианты осуществления нуклеотидных фрагментов, описанных в данном документе.

Таблица 1. Различные варианты осуществления нуклеотидных фрагментов





В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды, описанные в данном документе, являются несольватированными. В других вариантах осуществления один или более из олигонуклеотидов находятся в сольватированной форме. Как известно из уровня техники, сольват может быть образован любым фармацевтически приемлемым растворителем, таким как вода, этанол и т. п.

Несмотря на то, что олигонуклеотиды по формулам II и IIa изображены в их нейтральных формах, в некоторых вариантах осуществления такие олигонуклеотиды применяют в форме фармацевтически приемлемой соли.

Пептиды

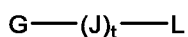
Представленные в данном документе олигонуклеотиды включают в себя олигонуклеотидный фрагмент, конъюгированный с СРР. В некоторых вариантах осуществления СРР может представлять собой транспортный фрагмент на основе богатого аргинином пептида, эффективный для повышения транспорта соединения в клетки. Транспортный фрагмент в некоторых вариантах осуществления

присоединен к концу олигомера. Пептиды обладают способностью индуцирования проникновения в клетку в 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% клеток в определенной популяции культуры клеток, включая все целые числа в промежутках диапазона, и обеспечивают высокомолекулярную транслокацию в ряде тканей *in vivo* при системном введении. В одном варианте осуществления проникающий в клетку пептид может представлять собой переносчик на основе богатых аргинином пептидов. В различных вариантах осуществления в пептид-олигонуклеотидном конъюгате в соответствии с настоящим изобретением может использоваться глицин в качестве линкера между СРР и антисмысловым олигонуклеотидом.

Для транспортных фрагментов, описанных выше, было показано значительное повышение попадания внутрь клетки у прикрепленных олигомеров по сравнению с захватом олигомера при отсутствии прикрепленного транспортного фрагмента. Захват может быть повышен по меньшей мере в десять раз и в некоторых вариантах осуществления - в двадцать раз по сравнению с неконъюгированным соединением.

Применение переносчиков на основе богатых аргинином пептидов (то есть, проникающих в клетку пептидов) особенно применимо при реализации на практике настоящего изобретения. Для некоторых переносчиков на основе пептидов была показана высокая эффективность при доставке антисмысловых соединений в первичные клетки, в том числе в мышечные клетки. Кроме того, по сравнению с другими известными переносчиками на основе пептидов, такими как Penetratin и пептид Tat, переносчики на основе пептидов, описанные в данном документе, при конъюгировании с антисмысловым РМО демонстрируют повышенную способность к изменению сплайсинга нескольких транскриптов генов.

Таким образом, в одном аспекте в данном документе представлен пептид по формуле III:



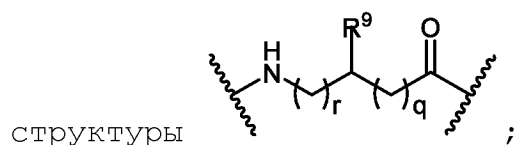
(III),

или его фармацевтически приемлемая соль,

где

G выбран из группы, состоящей из H, C(O)C₁₋₆-алкила, бензоила и стеароида;

каждый J независимо в каждом случае выбран из аминокислоты



каждый R⁹ независимо в каждом случае выбран из группы, состоящей из H, боковой группы аминокислоты и боковой группы аминокислоты, функционализированной химической защитной группой,

где две или более групп боковой группы аминокислоты в R⁹ независимо в каждом случае содержат тиол или тиол, функционализированный химической защитной группой;

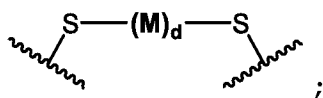
r и q независимо равняются 0, 1, 2, 3 или 4;

L выбран из группы, состоящей из -NH(CH₂)₁₋₆C(O)OH, -

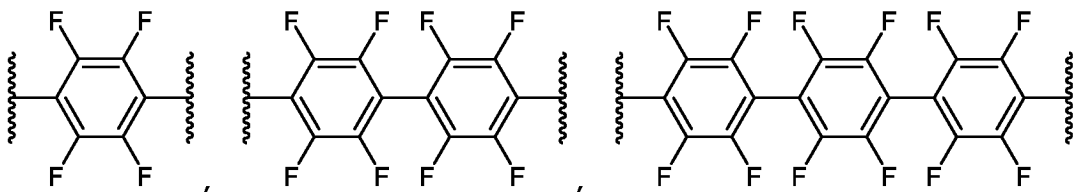
NH(CH₂)₅C(O)NH(CH₂)₂C(O)OH и  , каждый из которых может быть ковалентно связан с твердой подложкой; и

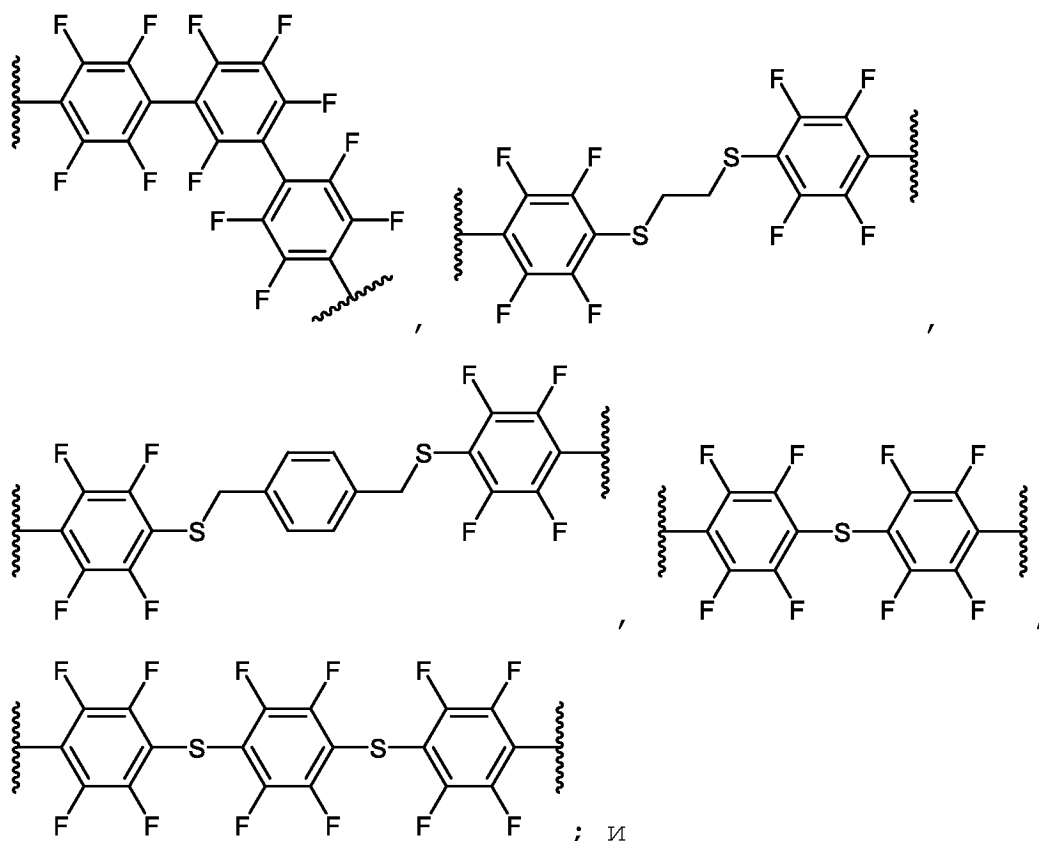
t находится в диапазоне 4-9.

В одном варианте осуществления две группы боковой группы аминокислоты, где каждая из двух групп боковой группы аминокислоты независимо содержит серу, вместе с атомами к которым они присоединены, образуют структуру



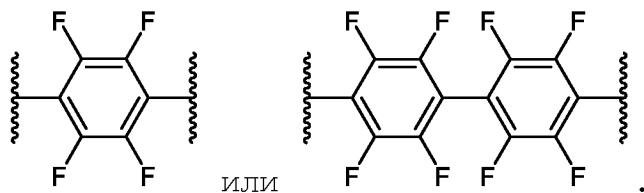
M выбран из группы, состоящей из





d равняется 0 или 1.

В другом варианте осуществления, M представляет собой



В еще одном варианте осуществления две группы боковой группы аминокислоты независимо в каждом случае представляют собой цистеиновую или гомоцистеиновую группы боковой группы аминокислоты.

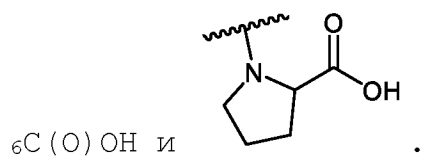
В еще одном варианте осуществления каждый J независимо в каждом случае выбран из α -аминокислоты, β -аминокислоты и β^3 -аминокислоты.

В другом варианте осуществления каждый из r и q равняется 0.

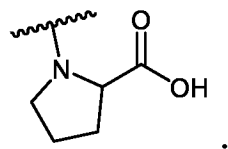
В другом варианте осуществления J независимо выбран из цистеина и аргинина.

В еще одном варианте осуществления две группы J представляют собой цистеин.

В еще одном варианте осуществления L выбран из $-\text{NH}(\text{CH}_2)_{1-}$



В другом варианте осуществления L представляет собой



В еще одном варианте осуществления L представляет собой $\text{NHCH}_2\text{C}(\text{O})\text{OH}$.

В еще одном варианте осуществления G выбран из группы, состоящей из H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$, бензоила и стеароида.

В еще одном варианте осуществления G представляет собой $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ или стеароил.

В другом варианте осуществления G представляет собой $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$.

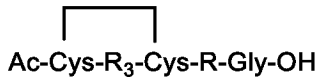
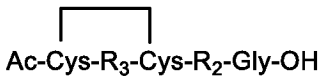
В еще одном варианте осуществления G ковалентно связан с амино-концом в J. В дополнительном варианте осуществления L ковалентно связан посредством амидной связи с карбокси-концом в J.

В другом варианте осуществления d равняется 0.

В еще одном варианте осуществления d равняется 1.

В таблице 2 представлены характерные пептиды, описанные в данном документе.

Таблица 2. Иллюстративные пептиды

Структура	Соединение	SEQ ID NO
	1AC	1
	1AD	
	1AE	
	1BC	
	1BD	
	1BE	
	2AC	2
	2AD	
	2AE	
	2BC	

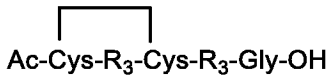
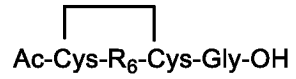
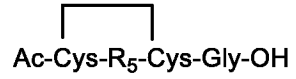
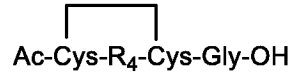
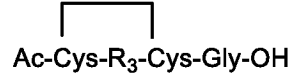
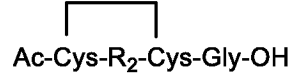
		2BD	
		2BE	
		3AC	3
		3AD	
		3AE	
		3BC	
		3BD	
		3BE	
		4AC	4
		4AD	
		4AE	
		4BC	
		4BD	
		5AC	5
		5AD	
		5AE	
		5BC	
		5BD	
		6AC	6
		6AD	
		6AE	
		6BC	
		6BD	
		7AC	7
		7AD	
		7AE	
		7BC	
		7BD	
		8AC	8
		8AD	
		8AE	
		8BC	
		8BD	
	8BE		
Gly = glycynyl or Gly-P3P (A) (B)		R=Arg	

Схема 1с. Конъюгация пептида с 5'-концом РМО

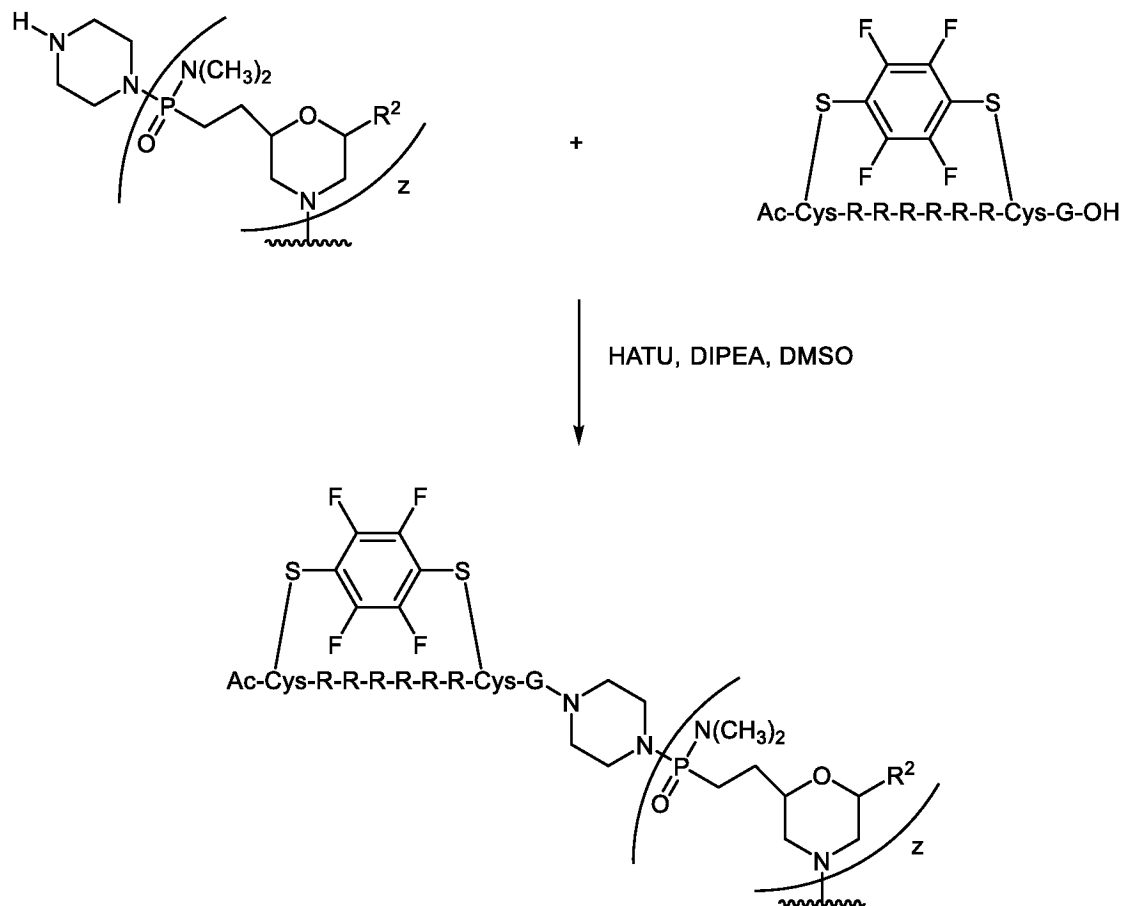
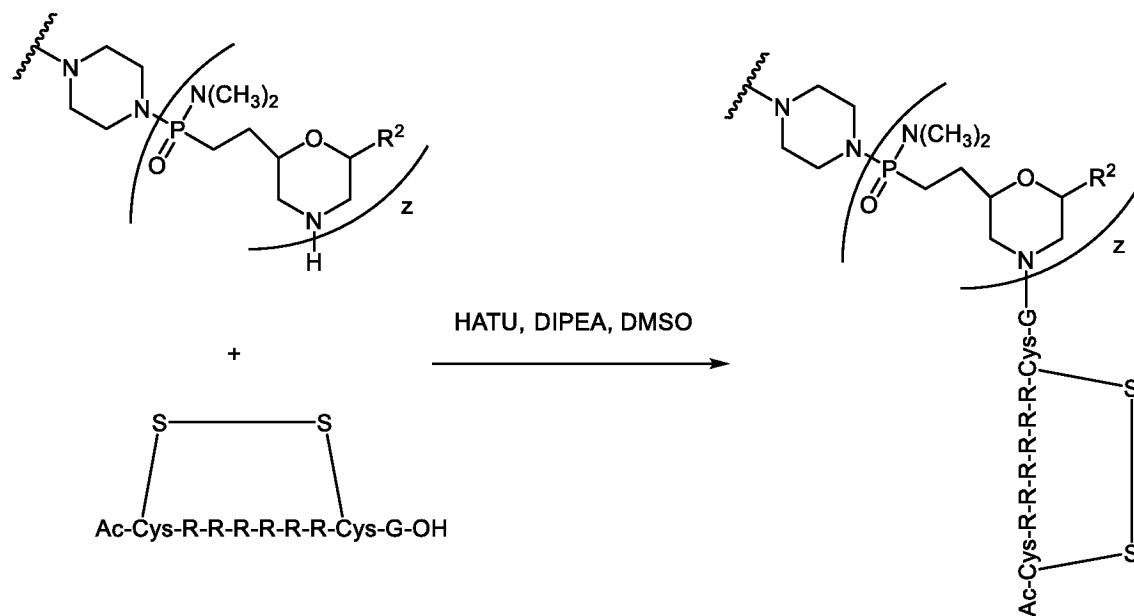
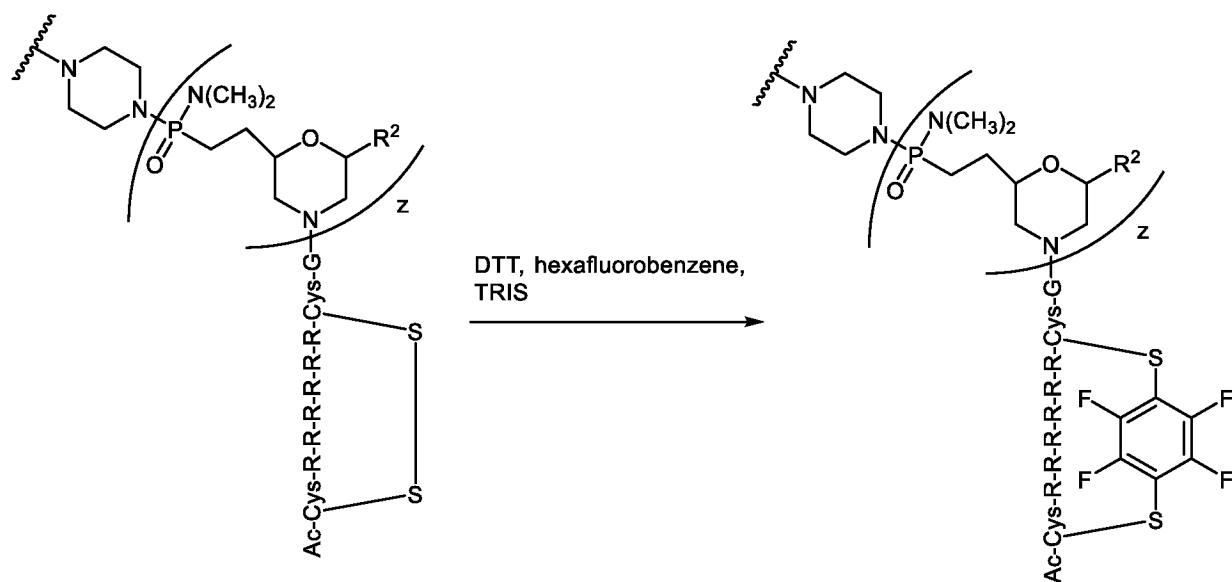


Схема 1Ia. Конъюгация пептида по дисульфидным связям с 3'-концом РМО



Способ на схеме 1Ia применим для конъюгации пептида с 5'-концом РМО в аналогичных условиях (см. схему 1с).

Схема 1Ib. Сшивание пептид-РМО-конъюгат



Способ на схеме IIb применим для конъюгации пептида с 5'-концом РМО в аналогичных условиях.

Схема IIIa. Конъюгация и шивание с пептидом и РМО в одном реакционном сосуде

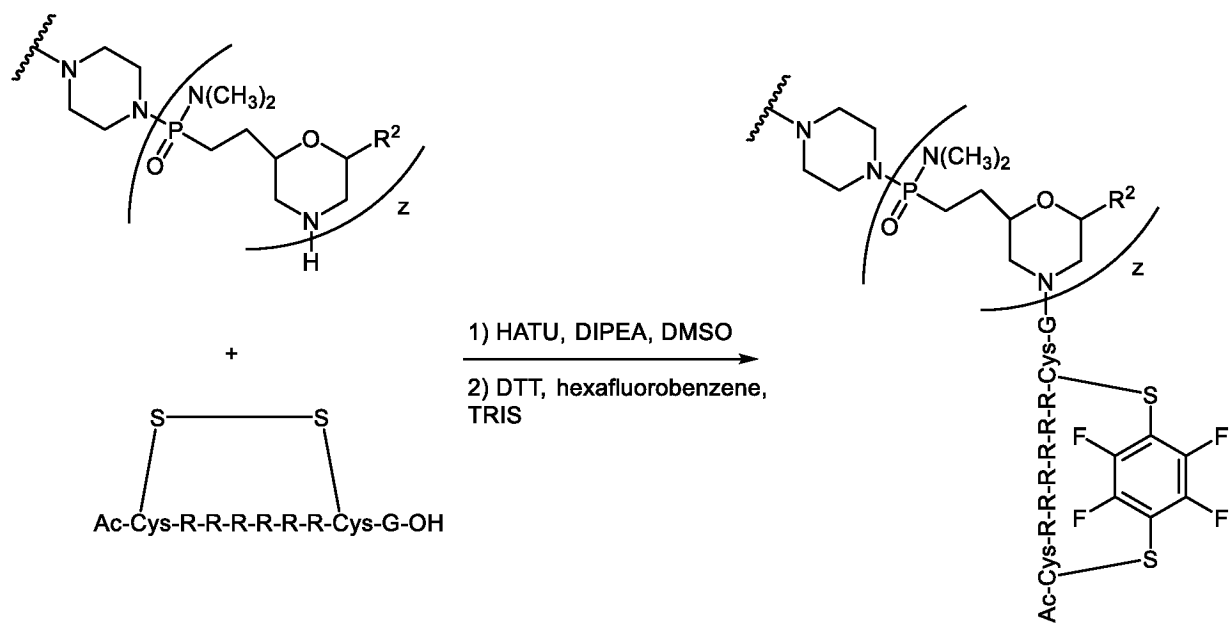
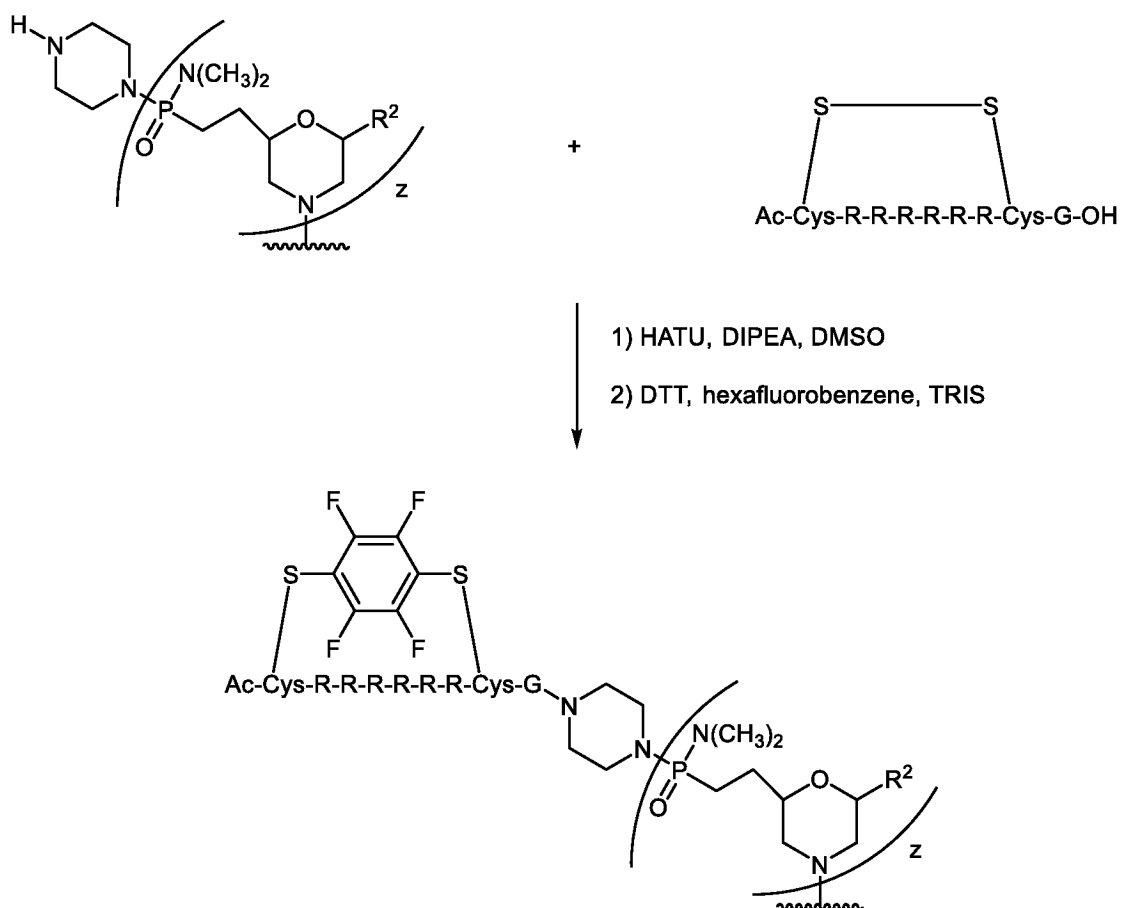


Схема IIIb. Конъюгация и шивание с пептидом и РМО в одном реакционном сосуде



Способы

В данном документе представлены способы лечения мышечного заболевания, вирусной инфекции или бактериальной инфекции у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту пептид-олигонуклеотидного конъюгата по формулам I, Ia, Ib, Ic, Id, Ie или V.

Соответственно, в одном аспекте в данном документе представлен способ лечения мышечного заболевания, вирусной инфекции или бактериальной инфекции у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту пептид-олигонуклеотидного конъюгата в соответствии с настоящим изобретением.

В одном варианте осуществления мышечное заболевание представляет собой мышечную дистрофию Дюшенна.

В другом варианте осуществления вирусная инфекция обусловлена вирусом, выбранным из группы, состоящей из вируса, вызывающего «марбургскую болезнь», вируса Эбола, вируса гриппа и вируса денге.

В другом варианте осуществления бактериальная инфекция обусловлена *Mycobacterium tuberculosis*.

Под субъектом в данном документе, как правило, подразумевается человек. Однако субъект может представлять собой любое млекопитающее, для которого лечение является необходимым. Таким образом, способы, описанные в данном документе, могут применяться как для человека, так и в ветеринарии.

Введение/доза

Состав терапевтических композиций и их последующее введение (дозирование) находятся в компетенции специалистов в данной области техники. Дозирование зависит от степени тяжести и восприимчивости болезненного состояния, подлежащего лечению, в ходе курса лечения, продолжающегося от нескольких дней до нескольких месяцев, или от момента, пока не будет достигнуто достаточное уменьшение болезненного состояния. Оптимальные режимы дозирования могут быть рассчитаны исходя из измерений накопления лекарственного средства в теле пациента.

Специалисты могут легко определить оптимальные дозировки, методики дозирования и значения частоты повторения. Оптимальные дозировки могут изменяться в зависимости от относительной активности отдельных олигомеров и, как правило, могут быть оценены на основании значений EC_{50} , которые оказались эффективными в животных моделях *in vitro* и *in vivo*. В целом дозировка составляет от 0,01 мкг до 100 г/кг массы тела и может быть назначена один или более раз в день, в неделю, в месяц или в год, или даже один раз каждые 2-20 лет. Специалисты в данной области техники могут легко оценить значения частоты повторения для дозирования исходя из измеренных значений времени удержания и концентраций лекарственного средства в физиологических жидкостях или тканях. После успешного лечения, для пациента может быть необходимо прохождение поддерживающей терапии для предупреждения рецидива болезненного состояния, при котором где олигомер вводят в поддерживающих дозах в диапазоне от 0,01 мкг до 100 г/кг массы тела от одного или более раз в день до одного раза каждые 20 лет.

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид (олигонуклеотид по формуле II или IIa) вводят отдельно.

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид вводят в терапевтически эффективном количестве или дозировке. «Терапевтически эффективное количество» представляет собой количество олигонуклеотида по формуле II или IIa, которое при введении пациенту отдельно обеспечивает эффективное лечение мышечного заболевания, вирусной инфекции или бактериальной инфекции. Количество, которое оказывается «терапевтически эффективным количеством» в заданном случае для определенного субъекта, может не быть эффективным на 100% для субъектов, получающих подобным образом лечение от рассматриваемых заболевания или состояния, даже если такая дозировка считается «терапевтически эффективным количеством» специалистами в данной области. Количество олигонуклеотида, которое соответствует терапевтически эффективному количеству, сильно зависит от типа заболевания, стадии заболевания, возраста пациента, подлежащего лечению, и других фактов.

В различных вариантах осуществления в зависимости от олигонуклеотида по формуле II или IIa и применяемых эффективных количеств, олигонуклеотиды могут модулировать экспрессию гена, вовлеченного в мышечное заболевание, вирусную инфекцию или бактериальную инфекцию.

Если количество олигонуклеотида по формуле II или IIa должны привести к эффективному лечению мышечного заболевания, вирусной инфекции или бактериальной инфекции, количество предпочтительно не является чрезмерно токсичным для пациента (то есть, количество предпочтительно находится в пределах токсичности, установленных в медицинских рекомендациях). В некоторых вариантах осуществления либо с целью предупреждения чрезмерной токсичности, либо с целью обеспечения более эффективного лечения, либо с целью того и другого в отношении мышечного заболевания, вирусной инфекции или бактериальной инфекции, предусматривается ограничение общей вводимой дозировки. Как правило, количества, рассматриваемые в данном документе, представлены в виде количества в день; однако в данном документе также рассмотрены циклы на полдня, а также на два дня или три дня.

Для лечения мышечного заболевания, вирусной инфекции или бактериальной инфекции могут применяться различные режимы дозирования. В некоторых вариантах осуществления дневная дозировка, такая как любая из иллюстративных дозировок, описанных выше, вводится один раз, два раза, три раза, или четыре раза в день в течение трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти дней. В зависимости от стадии и степени тяжести заболевания, подлежащего лечению, может быть применено более короткое время лечения (например, не более пяти дней) наряду с высокой дозировкой, или может быть применено более продолжительное время лечения (например, десять или более дней, или недели, или месяц, или более продолжительный период) наряду с низкой дозировкой. В некоторых вариантах осуществления дозировку один раз или два раза в день вводят через день.

Олигонуклеотиды по формуле II и IIa или их фармацевтически приемлемые соли или сольватные формы, в чистой форме или в подходящей фармацевтической композиции, могут быть введены посредством любого из приемлемых способов введения или средств, известных в данной области техники. Олигонуклеотиды могут быть введены, например, перорально, назально, парентерально (внутривенно, внутримышечно или подкожно), местно, трансдермально, интравагинально, внутрипузырно, интрацистемально или ректально. Лекарственная форма может представлять собой, например, твердый, полутвердый, лиофилизированный порошок или жидкие лекарственные формы, такие как, например, таблетки, пилюли, мягкие эластичные или твердые желатиновые капсулы, порошки, растворы, суспензии, суппозитории, аэрозоли или тому подобное, например, в единичных лекарственных формах, подходящих для простого введения точных дозировок. Конкретный способ введения представляет собой пероральный, в частности, такой, при котором можно регулировать удобный суточный режим дозирования в зависимости от степени тяжести заболевания, подлежащего лечению.

Вспомогательное вещество и вспомогательные средства могут включать в себя, например, консервирующие, увлажняющие, суспендирующие, подслащивающие, вкусовые, ароматизирующие,

эмульгирующие средства и средства для дозирования. Предупреждение действия микроорганизмов в целом обеспечивается с помощью различных антибактериальных и противогрибковых средств, таких как парабены, хлорбутанол, фенол, сорбиновая кислота и тому подобные. Также могут быть включены изотонические средства, такие как сахара, хлорид натрия и тому подобное. Пролонгированное всасывание инъекционной фармацевтической формы может быть достигнуто путем применения средств, замедляющих всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина. Вспомогательные средства также могут включать смачивающие средства, эмульгирующие средства, средства для забуферивания pH и антиоксиданты, такие как, например, лимонная кислота, монолаурат сорбитана, олеат триэтаноламина, бутилированный гидрокситолуол и тому подобное.

Твердые лекарственные формы могут быть получены с покрытиями и оболочками, такими как энтеросолюбильные покрытия и другие хорошо известные из уровня техники. Они могут содержать замутняющие средства, а также могут иметь такой состав, при котором будет происходить высвобождение активного олигонуклеотида или олигонуклеотидов в определенном отделе кишечника с задержкой. Примеры инкапсулирующих композиций, которые могут быть использованы, представляют собой полимерные вещества и воски. При необходимости активные олигонуклеотиды также могут находиться в микроинкапсулированной форме с одним или более из вышеуказанных вспомогательных веществ.

Жидкие лекарственные формы для перорального введения включают фармацевтически приемлемые эмульсии, растворы, суспензии, сиропы и крепкие настои. Такие лекарственные формы получают, например, растворением, диспергированием и т.д. ингибиторов HDAC или ретиноевой кислоты, описанных в данном документе, или их фармацевтически приемлемых солей и необязательных фармацевтических вспомогательных средств в носителе, таком как, например, вода, солевой раствор, водный раствор декстрозы, глицерин, этанол и т.п.; солюбилизующих средств и эмульгаторов, таких как, например, этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт,

бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид; масел, в частности, хлопкового масла, арахисового масла, масла проростков кукурузы, оливкового масла, касторового масла и кунжутного масла, глицерина, тетрагидрофурурилового спирта, полиэтиленгликолей и сложных эфиров жирных кислот и сорбита; или смесей указанных веществ и т.п., с получением раствора или суспензии.

Обычно в зависимости от предполагаемого способа введения фармацевтически приемлемые композиции будут содержать от приблизительно 1% до приблизительно 99% по массе олигонуклеотидов, описанных в данном документе, или их фармацевтически приемлемой соли, и от 99% до 1% по массе фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества. В одном примере композиция будет содержать от приблизительно 5% до приблизительно 75% по массе олигонуклеотида, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли, при этом остальное будут составлять подходящие фармацевтические вспомогательные вещества.

Существующие способы получения таких лекарственных форм известны или будут очевидны специалистам в данной области техники. Ссылка приведена, например, на Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (Mack Publishing Company, Истон, Пенсильвания, 1990).

Наборы

В других вариантах осуществления представлены наборы. Наборы в соответствии с настоящим изобретением включают в себя упаковки, содержащие олигонуклеотиды, пептиды, пептид-олигонуклеотидные конъюгаты или композиции в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления наборы содержат пептид-олигонуклеотидный конъюгат в соответствии с формулами I, Ia, Ib, Ic, Id, Ie или V или его фармацевтически приемлемую соль. В других вариантах осуществления наборы содержат олигонуклеотид в соответствии с формулами II или IIa или его фармацевтически приемлемую соль. В еще других вариантах осуществления наборы содержат пептид в соответствии с формулой III или его фармацевтически приемлемую соль.

Выражение «упаковка» подразумевает любую емкость, содержащую олигонуклеотиды или композиции, представленные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления упаковка может представлять собой коробку или обертку. Упаковочные материалы для применения в упаковке фармацевтических продуктов хорошо известны специалистам в данной области техники. Примеры фармацевтических упаковочных материалов включают, без ограничений, бутылки, пробирки, ингаляторы, помпы, сумки, флаконы, контейнеры, шприцы, бутылки и любой упаковочный материал, подходящий для выбранного состава и предполагаемого способа введения и лечения.

Набор также может содержать элементы, которые не содержатся в упаковке, но прикреплены к внешней стороне упаковки, например, пипетки.

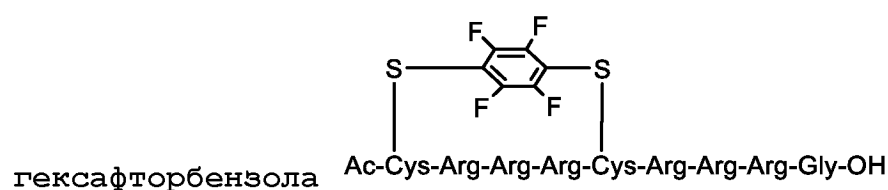
Наборы могут дополнительно содержать инструкции для введения олигонуклеотидов или композиций в соответствии с настоящим изобретением пациенту. Наборы также могут содержать инструкции для способов применения олигонуклеотидов, представленных в данном документе, одобренные контролирующими органами, такими как Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США. Наборы также могут содержать этикетку или листки-вкладыши для олигонуклеотидов. Упаковки или любые листки-вкладыши, или и то, и другое, сами могут быть одобрены контролирующими органами. Наборы могут включать олигонуклеотиды в твердой фазе или в жидкой фазе (например, с буферами) в упаковке. Наборы также могут включать в себя буферы для получения растворов, предназначенных для осуществления способов, и пипетки для переноса жидкостей из одного контейнера в другой.

ПРИМЕРЫ

Примеры приведены ниже с целью иллюстрации и описания некоторых конкретных вариантов настоящего изобретения. Однако объем формулы изобретения никоим образом не ограничивается приведенными в данном документе примерами. Различные изменения и модификации раскрытых вариантов осуществления будут очевидны специалистам в данной области техники, и такие изменения и

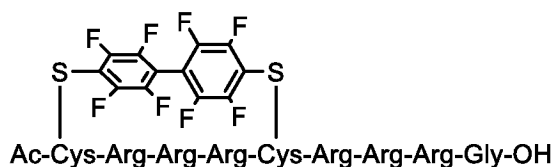
модификации, включая, без ограничения, изменения и модификации, связанные с химическими структурами, заместителями, производными, составами или способами в соответствии с настоящим изобретением, могут быть выполнены без отступления от сущности настоящего изобретения и объема прилагаемой формулы изобретения. Определения переменных в структурах в схемах в данном документе соответствуют определениям соответствующих положений в формулах, представленных в данном документе.

Пример 1. Протокол для сшивания пептида с применением



К циклическому пептиду с дисульфидной связью Ac-CRRRCRRRG-OH (74,8 мг, 38,5 мкмоль) (SEQ ID NO:3) в стеклянном флаконе добавляют раствор Трис-основания (8 мл, 50 мМ в DMF) и гексафторбензол (111 мкл, 962 мкмоль). К данному раствору добавляют раствор ТСЕР в H₂O (136 мкл, 0,71 М, pH=8) для восстановления дисульфидной связи и инициации реакции. Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 7 часов и контролируют посредством ЖХ-МС (LC-MS). Полученную смесь разбавляют 40 мл 0,1% TFA в воде, центрифугируют, фильтруют и подвергают очистке посредством ВЭЖХ (HPLC). Фракции, содержащие пептидный продукт (анализируемый посредством ЖХ-МС), объединяют и лиофилизируют с получением необходимого перфторарил-пептида (19,9 мг, 8,9 мкмоль, выход 23%).

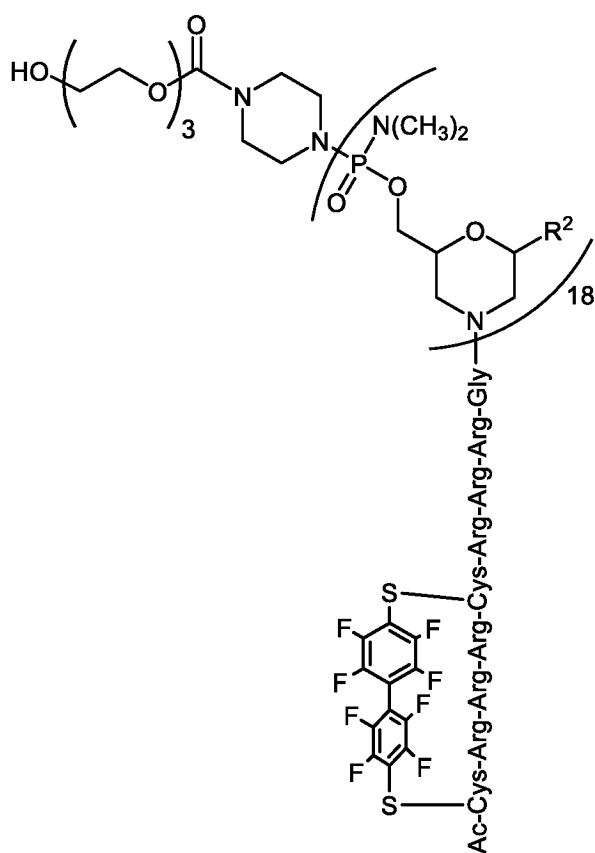
Пример 2. Протокол для сшивания пептида с применением декафторбифенила



В стеклянном флаконе растворяют циклический пептид с дисульфидной связью Ac-CRRRCRRRG-OH (74,5 мг, 38,4 мкмоль) (SEQ ID NO:3) и декафторбифенил (25,6 мг, 76,7 мкмоль) в растворе

Трис-основания в DMF (8 мл, 50 мМ). К данному раствору добавляют раствор ТСЕР в H₂O (135 мкл, 0,71 М, рН ~ 8) с целью восстановления дисульфидной связи и инициации реакции. Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 7 часов и контролируют посредством ЖХ-МС. Полученную смесь разбавляют TFA в воде (40 мл 0,1%), центрифугируют, фильтруют и подвергают очистке посредством ВЭЖХ. Фракции, содержащие пептидный продукт, анализируют посредством ЖХ-МС, объединяют и лиофилизируют с получением конечного перфторарил-пептида (20 мг, 8,9 мкмоль, выход 23%).

Пример 3. Протокол конъюгации пептида

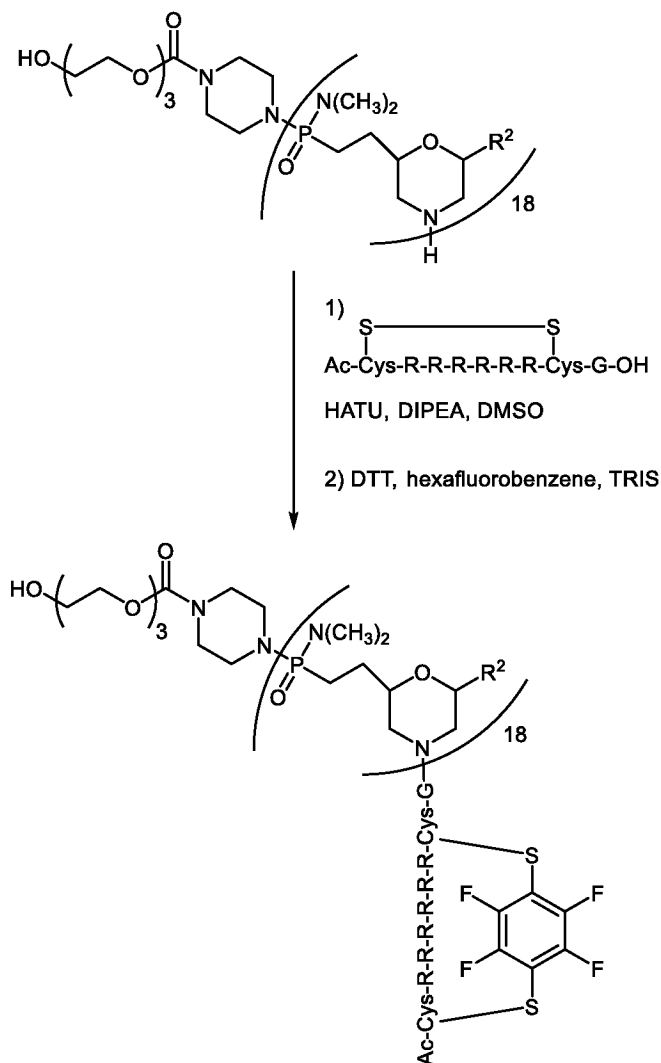


(РРМО 1)

К смеси РМО (последовательность нуклеиновых оснований (R²), представляющая собой GCT ATT ACC TTA ACC CAG (SEQ ID NO:9); 10,7 мг, 1,72 мкмоль) и декафторбифенил-пептида Ac-CRRRCRRRG-OH (5,9 мг, 2,64 мкмоль) в пластиковой пробирке Эппендорф добавляют ДМСО (0,4 мл), NATU в DMSO (6,6 мкл, 2,64 мкмоль, 0,4 М) и ДИПЭА (Диизопропилэтиламин) (2,3 мкл, 13,2 мкмоль). Содержимое пробирки смешивают и оставляют отстояться при комнатной температуре в течение 2 часов. Полученную смесь разбавляют водой

(8 мл) и последовательно подвергают слабому катионному обмену (CM Sepharose) и твердофазной экстракции (Amberchrom CG 300M). Полученный продукт анализируют посредством ЖХ-МС и MALDI-TOF MS и лиофилизируют с получением конъюгата РМО-пептид (9,8 мг, 1,26 мкмоль, выход 73%).

Пример 4. Протокол конъюгации в одном реакционном сосуде РМО с циклическим пептидом с дисульфидной связью с последующим сшиванием пептида



(РМО 2)

К раствору РМО (85 мг, 0,01 ммоль, 1 экв.; последовательность нуклеиновых оснований (R²): GCT ATT ACC TTA ACC CAG (SEQ ID NO:9)), пептида (Ac-Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys-Gly-OH или Ac-Cys-Arg-Arg-Arg-Cys-Arg-Arg-Arg-Gly-OH, 37 мг, каждый с дисульфидным мостиком, 2 экв.) и HATU (8 мг, 2 экв.) в ДМСО (2 мл) добавляют диизопропилэтиламин (9 мкл, 5 экв.). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в

течение 5 часов. После добавления 50 мМ дитиотреитола (DTT) в раствор ДМСО (1 мл, 5 экв.), 50 мМ Трис в растворе ДМСО (1 мл, 5 экв.), затем гексафторбензола (60 мкл, 25 экв.) реакционный раствор перемешивают в течение еще 5 часов. Необходимый продукт получают посредством хроматографии со слабым катионным обменом (CM-Sepharose) с последующей твердофазной экстракцией (Amberchrome CG300M) для обессоливания и в конце с лиофилизацией. Масс-спектр, полученный с помощью MALDI/TOF (масса/заряд): расч.: 9975; измеренное значение: 9976 (M+H).

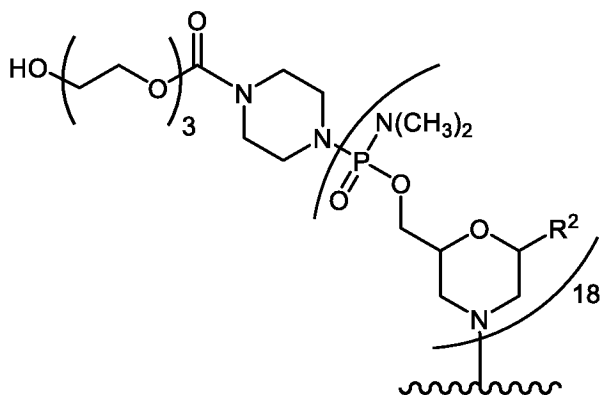
Пример 5. Анализ в клетках линии HeLa

На графике на фигуре 1 (см. также таблицу 3) на оси y показана «средняя интенсивность флуоресценции» испускаемая зеленой флуоресценцией белком e-GFP, считанной для каждой отдельной клетки посредством проточного цитометра Accuri C6 и просуммированной с помощью программного обеспечения для обработки. Высота столбцов зеленого флуоресцентного сигнала указывает на разную интенсивность на основе уровня пропускания экзона, которое происходит в ядре клеток линии HeLa-654, независимо от того, обрабатываются ли клетки или не обрабатываются тестируемыми соединениями. Интенсивность сигнала или размер столбца также соответствуют эффективности захвата клеткой (то есть, доставки в клетку). На оси x показаны испытываемые соединения, тестируемые с применением ряда различных режимов обработки. Различные режимы обработки включают непрерывную обработку клеток линии HeLa-654 во времени или варианты обработки с вытеснением метки, где тестируемое соединение инкубируют с клетками, а затем через определенный промежуток времени (3 часа) вымывают из культуры клеток и добавляют не содержащую тестового соединения свежую среду.

Результаты. Показана базовая активность для неконъюгированного РМО и необработанных клеток. Все конъюгаты пептид/РМО (РРМО) в соответствии с настоящим изобретением демонстрируют захват клеткой, который выше чем у: 1) неконъюгированного РМО и 2) необработанных клеток (которые проявляют зеленый флуоресцентный фоновый сигнал). Данное отличие в интенсивности флуоресценции между конъюгатами пептид/РМО в

соответствии с настоящим изобретением и фоном или неконъюгированным РМО указывает на существенную фармакологическую активность шитых конъюгатов пептид/РМО.

В каждом случае РМО представлен следующей структурой:

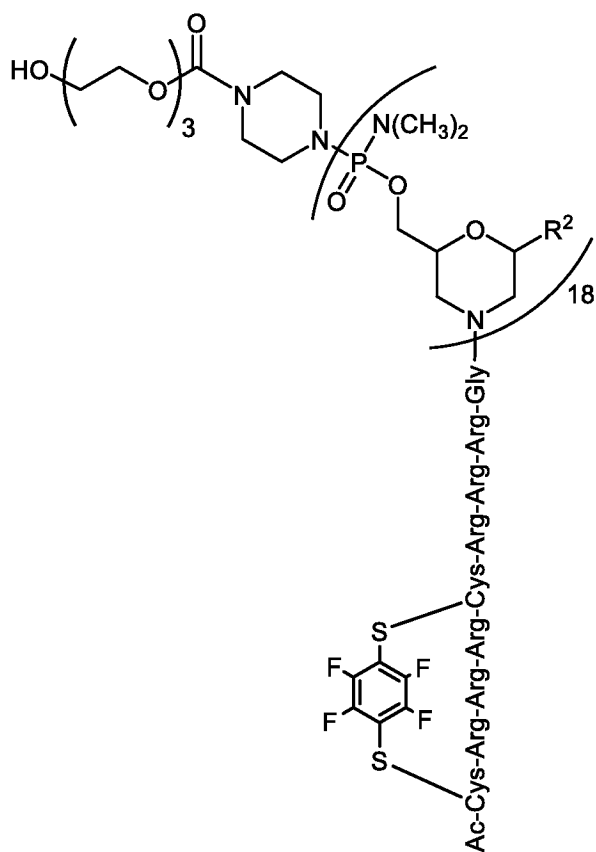


где последовательность нуклеиновых оснований (содержащая каждый вариант R^2 , независимо выбранный из нуклеинового основания, выбранного из А, G, С или Т) представляет собой: GCT ATT ACC TTA ACC CAG (SEQ ID NO:9).

Таблица 3. Доставка в клетку пептид-олигонуклеотидных конъюгатов (фигура 1)

	Среднее значение FL1-H
Без обработки	36 594,96
РМО	43 039,34
(<i>i, i+4</i>) Hexa - РРМО 3	123 401,08
(<i>i, i+4</i>) Deca - РРМО 1	87 951,78
(<i>i, i+7</i>) Deca - РРМО 4	137 184,08

РРМО 3 относится к следующей структуре:

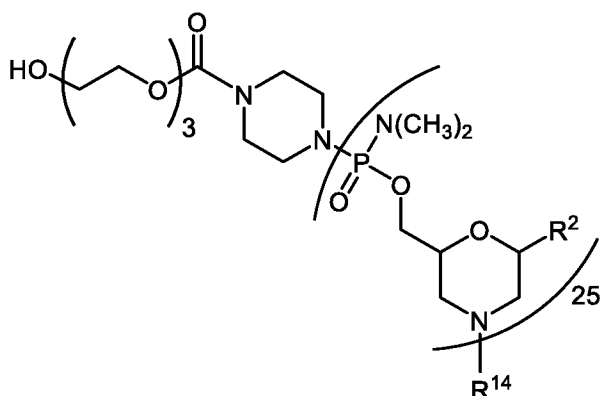


где последовательность нуклеиновых оснований (содержащая каждый вариант R^2 , независимо выбранный из нуклеинового основания, выбранного из А, G, С или Т) представляет собой: GCT ATT ACC TTA ACC CAG (SEQ ID NO:9).

РРМО 4 относится к следующей структуре:

vivo воздействовать на мРНК и ремоделирование белка. Как оказалось, такие тестируемые соединения демонстрировали активность у мышей линии *mdx*, вызывая значительное повышение пропуска экзона 23 и экспрессии белка дистрофина, как показано посредством ПЦР с обратной транскрипцией и вестерн-блоттинга соответственно. Данная активность особенно выражена при измерении на фоне экспериментов с отрицательным контролем, в которых мыши линии *mdx* получали дозу солевого раствора: условие, при котором обеспечивается практически нулевое пропускание экзона 23 и экспрессия дистрофина (фигуры 4D, 5C, 5D, 6D, 7C и 7D). При сравнении с двумя положительными контролями, у мышей дикого типа и мышей линии *mdx*, получающих дозу с известным активным соединением Ac-R6-Gly-M23D(+7-18) (РРМО 5), тестируемые соединения демонстрировали явную активность. В некоторых случаях активность превышала таковую для контроля; например, РРМО 11 (таблица 4) вызывал более значительные ответы в отношении пропуска экзона и экспрессии дистрофина при более низких дозах, чем соединение положительного контроля (фигуры 7B и 7D). Таким образом, тестируемые соединения отвечают условию выявления положительных фармакологических ответов в контексте семидневного скринингового исследования *in vivo*.

Варианты осуществления соединений (РРМО) в соответствии с настоящим изобретением, применяемые в таких исследованиях, характеризуются структурой в соответствии с формулой V:



(V);

где

последовательность нуклеиновых оснований (содержащая каждый вариант R^2 , независимо выбранный из нуклеинового основания,

выбранного из А, G, С или Т) представляет собой: 5'-GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T-3' (SEQ ID NO:14); и

R¹⁴ определен в таблице 4.

Соединения из таблицы 4 получали согласно примерам 1-4 выше.

Таблица 4

Соединение формулы (V)	R ¹⁴ (* см. таблицу 2)
РРМО 5	Ac-R ₆ -Gly- (SEQ ID NO:15)
РРМО 6	4AD*
РРМО 7	3AD*
РРМО 8	4AC*
РРМО 9	3AC*
РРМО 10	4AE*
РРМО 11	3AE*

Протокол вестерн-блоттинга в отношении дистрофина

1. Ткань удаляли из условий при -80 °С и вручную резали на мелкие кусочки, добавляли 400-800 мкл буфера для лизиса RIPA в зависимости от типа ткани.

а. ТА: 400 мкл, QC: 800 мкл, сердце: 400 мкл

б. Буфер для лизиса: буфер RIPA (Pierce, кат. № 89901) и коктейль ингибиторов протеаз (Roche, кат. № 04693124001)

2. В пробирку добавляли приблизительно десять циркониевых шариков диаметром 2,0 мм (Biospec, кат. № 11079124zx) и ткани лизировали с помощью MagNA Lyser (Roche) следующим образом:

а. 5000 об./мин., 30-40 с, охлаждение в течение 2 мин. на льду. Циклы повторяли до тех пор, пока ткани не были полностью лизированы.

В качестве альтернативы циркониевым шарикам применяли металлические шарики (3-5 шариков), 3000 об./мин., 20 с на цикл (охлаждали на льду между циклами в течение 3-5 минут или до холодного на ощупь состояния).

3. После лизиса образцы центрифугировали при 12 000 об./мин. в течение 10 мин. и переносили надосадочную жидкость в неиспользованную пробирку, после чего проводили анализ с использованием ВСА для количественного определения уровней белков.

4. Гель-электрофорез

а. Загружали маркер (Invitrogen, кат. № P/NLC5699), загружали 100 мкг белка на дорожку и образцы испытывали на 3-8% Трис-ацетатном геле (Midi Gel, Biorad, кат. № 345-0130) при 50 В, 5 мин.; 150 В, 1 ч., а затем 200 В в течение 1,5 ч. (маркер размером 71 кДа находился внизу геля).

5. Перенос

Влажный перенос в течение ночи (16-18 ч.) при 4 °С, постоянный ток 100 мА (~25 В), 0,45-мкм PVDF-мембрана (Biorad, кат. № 1620261).

6. Мембрану промывали в TBST в течение 5 мин. и блокировали в 10% молоке (Biorad, кат. № 170-6404) в TBST в течение 1-2 ч. при комнатной температуре (к. т.).

7. PVDF-мембрану ополаскивали с помощью TBST 2-3 раза и затем инкубировали с первичным антителом в 5% BSA в ФСБ (фосфатно-солевой буфер) (PBS) в течение ночи при 4 °С.

а. Dys2 (Novocastra, Leica Biosystem, кат. № NCL-DYS2) 1:30

б. Dys1 (Novocastra, Leica Biosystem, кат. № NCL-DYS1) 1:1000

с. Mandys8 (Sigma, кат. № D8168) 1:3000.

8. Мембрану промывали TBST (трижды, по 10 мин. каждый раз), добавляли вторичное антитело, представляющее собой козье антитело к IgG мыши, конъюгированное с пероксидазой хрена (BioRad, кат. № 1706516, 1:10000), инкубировали в течение 1 ч. при к. т. и затем промывали TBST (трижды, по 10 мин. каждый раз).

9. Добавляли субстрат Clarity Western ECL (Biorad), инкубировали в течение 5 мин. при к. т., и затем визуализировали с помощью системы визуализации ChemiDoc Touch.

10. Мембрану очищали с применением 0,2 N NaOH в течение 7 мин., затем уравнивали в TBST в течение по меньшей мере 10 мин. Блот блокировали с помощью 10% молока в TBST в течение 1 ч. при к. т.

11. Добавляли антитело к α -актину-2 (Abcam, кроличье, кат. № ab68168, 1:15000) и инкубировали в течение 1 ч. при к. т.

12. Промывали TBST (трижды, по 10 мин. каждый раз) и затем инкубировали с вторичным антителом, представляющим собой козье антитело к IgG мыши, конъюгированное с пероксидазой хрена (BioRad, кат. № 1706515, 1:10000), в течение 1 ч. при к. т.

13. Мембрану тщательно промывали TBST и затем визуализировали, как описано выше.

Способ выделения РНК для тканей мыши

1. Цельные кусочки тканей (половина четырехглавой мышцы, половина сердца, цельная БМ...) гомогенизировали с применением MagNA Lyser и металлических шариков при 3000 об./мин., 20 на цикл, пока ткани не были достаточным образом лизированы (образцы охлаждали на льду между циклами в течение 3-5 минут или до холодного на ощупь состояния). Переносили 50-100 мкл цельного лизата в новый 96-луночный планшет и смешивали с тем же объемом буфера RA4 (из набора GE RNAspin), затем смесь на основе лизата загружали в 96-луночный планшет RNAspin для остальных стадий очистки. Неиспользованный лизат (в буфере RA1) хранили при -80 °С в течение одного года в соответствии с протоколом из набора.

2. Образцы центрифугировали в течение 2 мин. при 5200 г. Добавляли 500 мкл RA3 в каждую лунку планшета для связывания РНК и планшет центрифугировали в течение 2 мин. при 5200 г. Отбрасывали фильтрат.

3. Промывали мембрану посредством добавления 500 мкл RA2 в каждую лунку планшета для связывания РНК и центрифугировали в течение 2 мин. при 5200 г.

4. Добавляли 800 мкл RA3 в каждую лунку и центрифугировали в течение 2 мин. при 5200 г.

5. Добавляли 500 мкл RA4 в каждую лунку и центрифугировали в течение 10 мин. при 5200 г.

6. Образцы элюировали в планшет для ПЦР (с коническими лунками) путем пипетирования 50 мкл не содержащей РНКазы воды на дно каждой лунки, обеспечивая полное смачивание мембраны. Образцы инкубировали в течение 2 мин. при к. т. и центрифугировали при 5200 г в течение 3 мин. Если в лунке

оставалась жидкость, образцы инкубировали еще 2 минуты при к. т. и снова центрифугировали при 5200 g в течение 3 мин.

7. Концентрацию РНК затем измеряли на спектрофотометре Nanodrop 2000.

Протокол ПЦР с обратной транскрипцией

Праймеры, применяемые для ПЦР с обратной транскрипцией, представляли собой следующие: внешний прямой для дистрофина: 5'-СААТГТТТСТГГАТГСАГАСТТТГТГГ-3' (SEQ ID NO:10); внешний обратный для дистрофина: 5'-ГТТСАГСТТСАСТТТТАТСТТСТГСС-3' (SEQ ID NO:11); внутренний прямой для дистрофина: 5'-САСАТСТТТГАТГГТГТГАГГ-3' (SEQ ID NO:12); и внутренний обратный для дистрофина: 5'-СААСТТСАГССАТССАТТТСТГ-3' (SEQ ID NO:13).

Получали 25 мкл реакционных смесей (таблица 5) для ПЦР с обратной транскрипцией и первичной амплификации. Программу для ПЦР с обратной транскрипцией осуществляли согласно таблице 6.

Таблица 5. Реакционная смесь для ПЦР с обратной транскрипцией

2x реакционная смесь	12,5 мкл
Внутренний прямой праймер для Dys (10 мкМ)	0,75 мкл
Внутренний обратный праймер для Dys (10 мкМ)	0,75 мкл
Смесь Superscript III/Platinum Taq	1 мкл
Матричная РНК (образец РНК)	3 мкл
Вода до 25 мкл общего объема	7 мкл

Таблица 6. Программа для ПЦР с обратной транскрипцией и первичной амплификации

	Температура	Время	
Обратная транскрипция	55 °C	30 минут	45 циклов
Инактивация при обратной транскрипции	94°C	2 минуты	
Денатурирование	94°C	45 секунд	
Отжиг	59°C	45 секунд	
Расширение	68°C	1 минута	
	4°C	∞	

Протокол Caliper

После завершения ПЦР с обратной транскрипцией 25 мкл добавляли буфер для ПЦР и общий объем 50 мкл реакционной смеси переносили в планшет Caliper. Биоанализ с помощью Caliper LabChip проводили на основании рекомендованного производителем протокола. Продукт ПЦР полноразмерного транскрипта дистрофина составляет 445 п.о. и 232 п.о. из мРНК с пропуском экзона 23.

Включение посредством ссылки

Содержание всех ссылок (в том числе ссылок на литературу, выданные патенты, опубликованные патентные заявки и находящиеся на рассмотрении патентные заявки), приведенных по всей данной заявке, определенным образом полностью включено в данный документ. Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют значение, обычно известное специалисту в данной области техники.

Эквиваленты

Специалисты в данной области техники поймут или смогут определить множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе, с применением не более чем стандартных экспериментов. Подразумевается, что такие эквиваленты включены в объем нижеследующей формулы изобретения.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Sarepta Therapeutics, Inc.

<120> ПЕПТИД-ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ КОНЬЮГАТЫ

<130> 581438: SPT-001PC

<150> 62/163,960

<151> 2015-05-19

<150> 62/337,536

<151> 2016-05-17

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический пептид; модификации цистеина см. в описании

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> АЦЕТИЛИРОВАНИЕ

<400> 1

Cys Arg Arg Arg Cys Arg Gly
1 5

<210> 2

<211> 8

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический пептид; модификации цистеина см. в описании

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> АЦЕТИЛИРОВАНИЕ

<400> 2

Cys Arg Arg Arg Cys Arg Arg Gly
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетический пептид; модификации цистеина см. в описании

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> АЦЕТИЛИРОВАНИЕ

<400> 3

Cys Arg Arg Arg Cys Arg Arg Arg Gly
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетический пептид; модификации цистеина см. в описании

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> АЦЕТИЛИРОВАНИЕ

<400> 4

Cys Arg Arg Arg Arg Arg Arg Cys Gly
1 5

<210> 5
<211> 8
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетический пептид; модификации цистеина см. в описании

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> АЦЕТИЛИРОВАНИЕ

<400> 5

Cys Arg Arg Arg Arg Arg Cys Gly
1 5

<210> 6
<211> 7
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетический пептид; модификации цистеина см. в описании

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> АЦЕТИЛИРОВАНИЕ

<400> 6

Cys Arg Arg Arg Arg Cys Gly
1 5

<210> 7
<211> 6
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетический пептид; модификации цистеина см. в описании

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> АЦЕТИЛИРОВАНИЕ

<400> 7

Cys Arg Arg Arg Cys Gly
1 5

<210> 8
<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетический пептид; модификации цистеина см. в описании

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> АЦЕТИЛИРОВАНИЕ

<400> 8

Cys Arg Arg Cys Gly
1 5

<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> фосфordiамидат-связанный морфолино-олигомер

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(18)
<223> остатки фосфordiамидат-связанного морфолино

<400> 9
gctattacct taacccag 18

<210> 10
<211> 27
<212> DNA
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Внешний прямой праймер дистрофина

<400> 10
caatgtttct ggatgcagac tttgtgg 27

<210> 11
<211> 27
<212> DNA
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Внешний обратный праймер дистрофина

<400> 11
gttcagcttc actctttatc ttctgcc 27

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Внутренний прямой праймер дистрофина

<400> 12
cacatctttg atggtgtgag g 21

<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Внутренний обратный праймер дистрофина

<400> 13
саacttcagc catccatttc tg 22

<210> 14
<211> 25
<212> DNA
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> фосфордиамидат-связанный морфолино-олигомер

<220>
<221> misc_feature

<222> (1)..(25)
<223> остатки фосфордиамидат-связанного морфолино

<400> 14
ggcscaaacct cggcttacct gaaat

25

<210> 15
<211> 7
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетический пептид

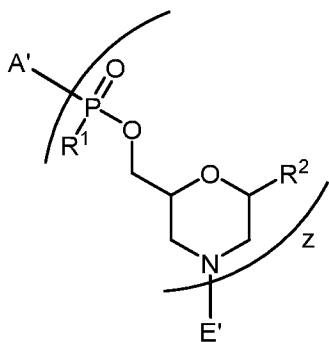
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> АЦЕТИЛИРОВАНИЕ

<400> 15

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly
1 5

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по формуле I:

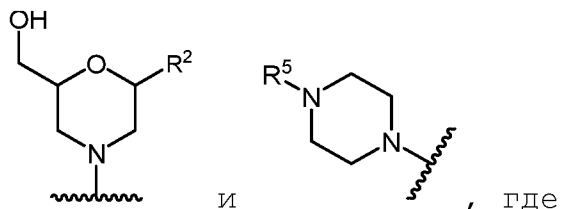


(I),

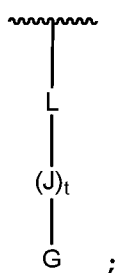
или его фармацевтически приемлемая соль,

где:

A' выбран из $-\text{NHCH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{N}(\text{C}_{1-6}\text{-алкил})\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$,



R^5 представляет собой $-\text{C}(\text{O})(\text{O-алкил})_x-\text{OH}$, где x находится в диапазоне 3-10, и каждая алкильная группа независимо в каждом случае представляет собой C_{2-6} -алкил, или R^5 выбран из $-\text{C}(\text{O})\text{C}_{1-6}$ -алкила, тритила, монометокситритила, $-(\text{C}_{1-6}\text{-алкил})\text{R}^6$, $-(\text{C}_{1-6}\text{-гетероалкил})-\text{R}^6$, арил- R^6 , гетероарил- R^6 , $-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{C}_{1-6}\text{алкил})-\text{R}^6$, $-\text{C}(\text{O})\text{O-арил}-\text{R}^6$, $-\text{C}(\text{O})\text{O-гетероарил}-\text{R}^6$ и



где R^6 выбран из OH , SH и NH_2 , или R^6 представляет собой O , S , или NH , ковалентно связанный с твердой подложкой;

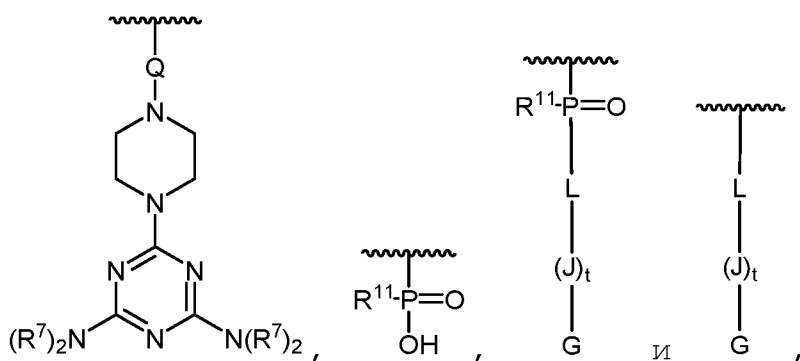
каждый R^1 независимо выбран из OH и $-\text{NR}^3\text{R}^4$, где каждый из R^3 и R^4 независимо в каждом случае представляет собой $-\text{C}_{1-6}$ -алкил;

каждый R^2 независимо выбран из H , нуклеинового основания и нуклеинового основания, функционализированного химической защитной группой, где нуклеиновое основание независимо в каждом

случае содержит C_{3-6} гетероциклическое кольцо, выбранное из пиридина, пиримидина, триазина, пурина и деазапурина;

z находится в диапазоне 8-40; и

E' выбран из H, $-C_{1-6}$ алкила, $-C(O)C_{1-6}$ алкила, бензоила, стеариола, тритила, монометокситритила, диметокситритила, триметокситритила,



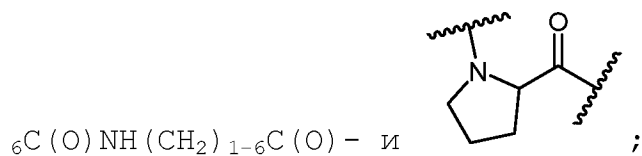
где

Q представляет собой $-C(O)(CH_2)_6C(O)-$ или $-C(O)(CH_2)_2S_2(CH_2)_2C(O)-$,

R^7 представляет собой $-(CH_2)_2OC(O)N(R^8)_2$, где R^8 представляет собой $-(CH_2)_6NHC(=NH)NH_2$, и

R^{11} выбран из OH и $-NR^3R^4$,

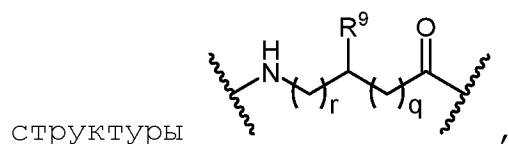
где L ковалентно связан посредством амидной связи с карбокси-концом в J, и L выбран из $-NH(CH_2)_{1-6}C(O)-$, $-NH(CH_2)_{1-6}C(O)NH(CH_2)_{1-6}C(O)-$ и



$-NH(CH_2)_{1-6}C(O)-$ и

t находится в диапазоне 4-9;

каждый J независимо в каждом случае выбран из аминокислоты



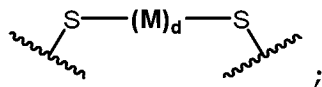
структуры

где:

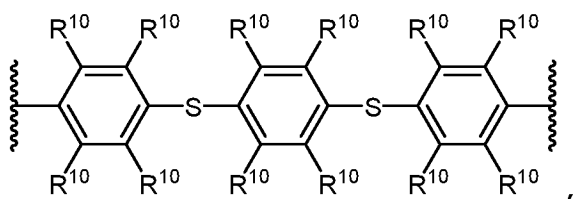
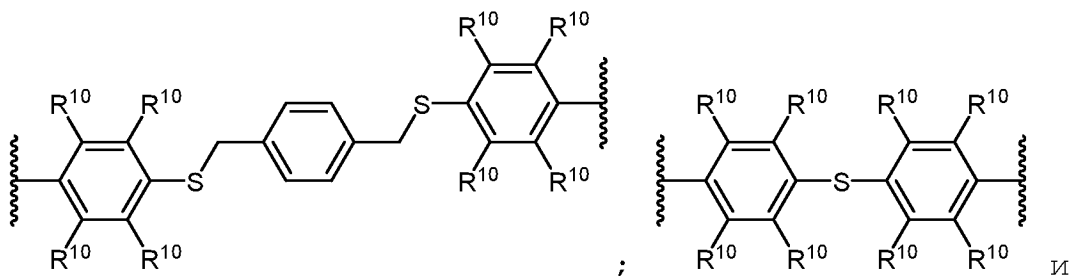
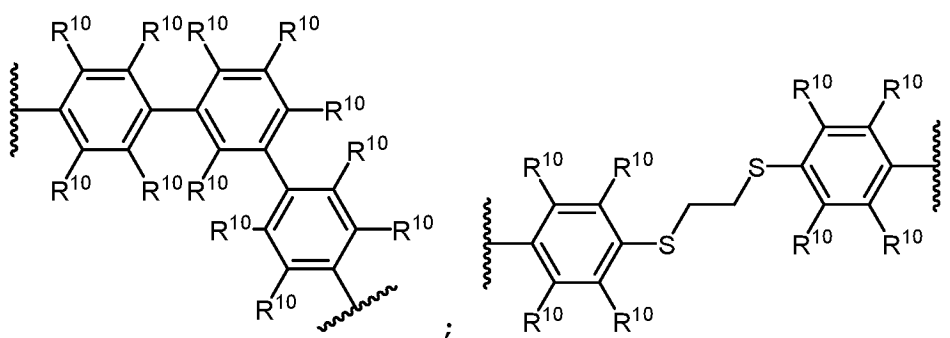
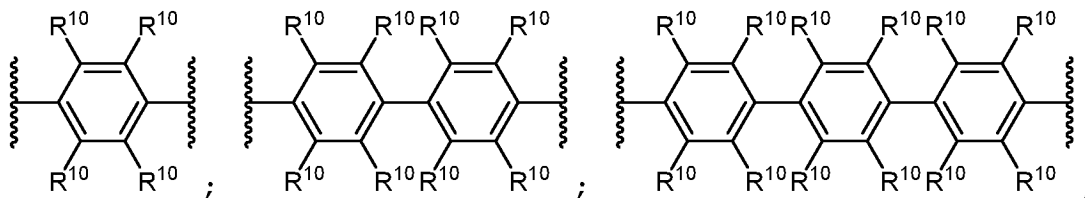
каждый из r и q независимо представляет собой 0, 1, 2, 3 или 4; и

каждый R^9 независимо в каждом случае выбран из H, боковой группы аминокислоты и боковой группы аминокислоты, функционализированной химической защитной группой,

где две или более групп боковой группы аминокислоты из R^9 независимо в каждом случае содержат серу, где два атома серы вместе с атомами, к которым они присоединены, образуют структуру



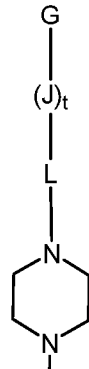
где d равняется 0 или 1, и M выбран из:



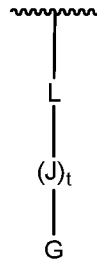
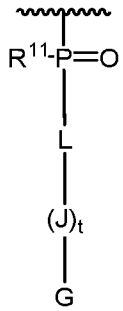
где каждый R^{10} независимо в каждом случае представляет собой H или галоген; и


G ковалентно связан амино-концом в J , и G выбран из H, $C(O)C_{1-6}$ алкила, бензоила и стеариола, и

где по меньшей мере одно из следующих условий является верным:

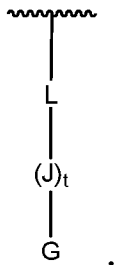


1) А' представляет собой ; 2) Е' представляет собой

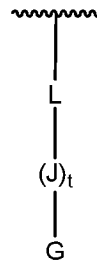
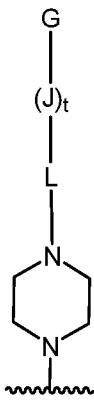




или 3) Е' представляет собой  .

2. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по п. 1 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающиеся тем, что Е' выбран из Н, -С₁₋₆алкила, -С(О)С₁₋₆алкила, бензоила, стеароида, тритила, монометокситритила, диметокситритила, триметокситритила и

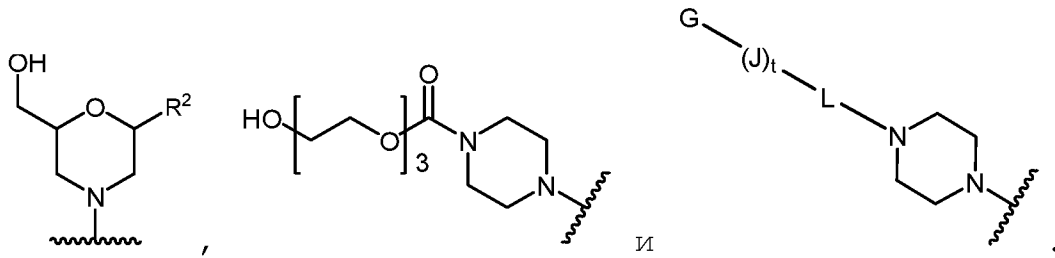


3. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по п. 1 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающиеся тем, что А' представляет собой

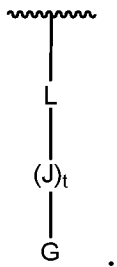


; или Е' представляет собой  .

4. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по п. 1 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающиеся тем, что А' выбран из $-N(C_{1-6}\text{-алкил})CH_2C(O)NH_2$,

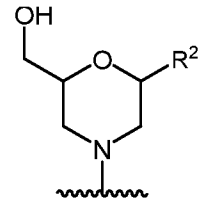


5. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по любому из пп. 1-4 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающиеся тем, что Е' выбран из Н, $-C(O)CH_3$, третила, 4 метокситретила, бензоила, стеароида и

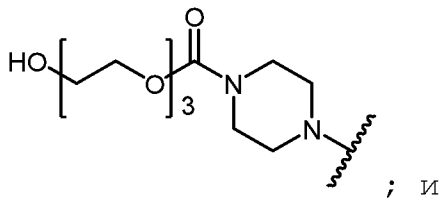


6. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по любому из пп. 1-5 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающиеся тем, что

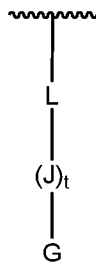
А' выбран из $-N(C_{1-6}\text{-алкил})CH_2C(O)NH_2$,



и

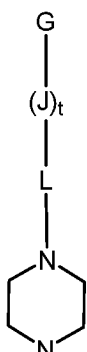


; и



Е' представляет собой

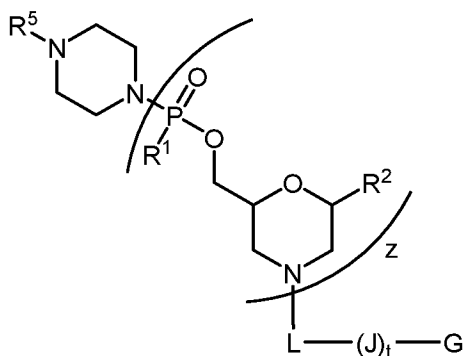
7. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по п. 1 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающиеся тем, что А'



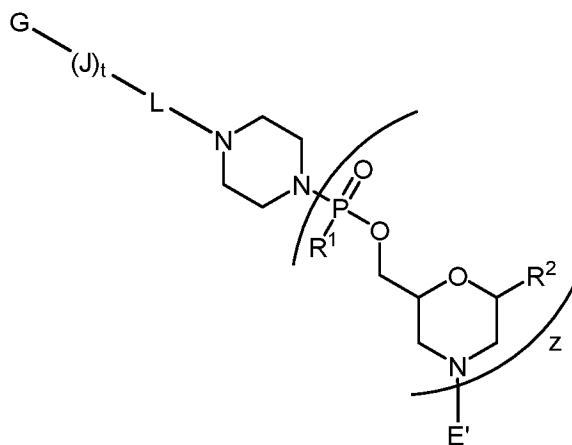
представляет собой , и

Е' выбран из H, $-C(O)CH_3$, третила, 4 метокситретила, бензоила и стеароила.

8. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по п. 1 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающиеся тем, что пептид-олигонуклеотидный конъюгат по формуле I представляет собой пептид-олигонуклеотидный конъюгат, выбранный из:



(Ia) и



(Ib) .

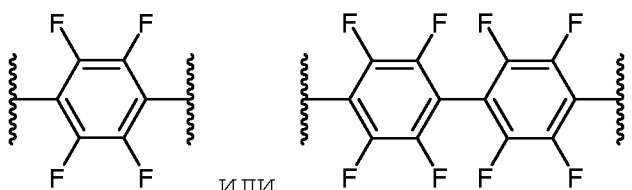
9. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по п. 1 или п. 8 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающиеся тем, что

пептид-олигонуклеотидный конъюгат представлен формулой (Ia), и R^5 представляет собой $-C(O)(O-CH_2CH_2)_3OH$.

10. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по п. 1 или п. 8 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающиеся тем, что пептид-олигонуклеотидный конъюгат представлен формулой (Ib), и E' выбран из H, C_{1-6} алкила, $-C(O)CH_3$, бензоила и стеароила.

11. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по любому из пп. 1-10 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающиеся тем, что каждый R^{10} представляет собой фтор.

12. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по любому из пп. 1-11 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающиеся тем, что



M представляет собой

или

13. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по любому из пп. 1-12 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающиеся тем, что J независимо выбран из цистеина и аргинина.

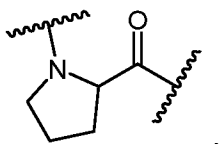
14. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по любому из пп. 1-13 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающиеся тем, что две группы J представляют собой цистеин.

15. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по любому из пп. 1-14 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающиеся тем, что z находится в диапазоне 8-25.

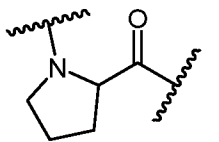
16. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по любому из пп. 1-15 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающиеся тем, что каждый R^1 представляет собой $N(CH_3)_2$.

17. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по любому из пп. 1-16 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающиеся тем, что каждый R^2 представляет собой нуклеиновое основание, независимо в каждом случае выбранное из аденина, гуанина, цитозина, 5-метил-цитозина, тимина, урацила и гипоксантина.

18. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по любому из пп. 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающиеся тем, что L выбран из $-NH(CH_2)_{1-6}C(O)-$, $-NH(CH_2)_5C(O)NH(CH_2)_2C(O)-$ и



19. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по любому из пп. 1-18 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающиеся тем, что L выбран из глицина и



20. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по любому из пп. 1-19 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающиеся тем, что L представляет собой глицин.

21. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по любому из пп. 1-20 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающиеся тем, что G выбран из H, C(O)CH₃, бензоила и стеароида.

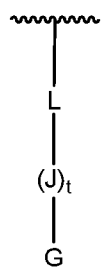
22. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по любому из пп. 1-21 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающиеся тем, что G представляет собой H или -C(O)CH₃.

23. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по любому из пп. 1-22 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающиеся тем, что G представляет собой -C(O)CH₃.

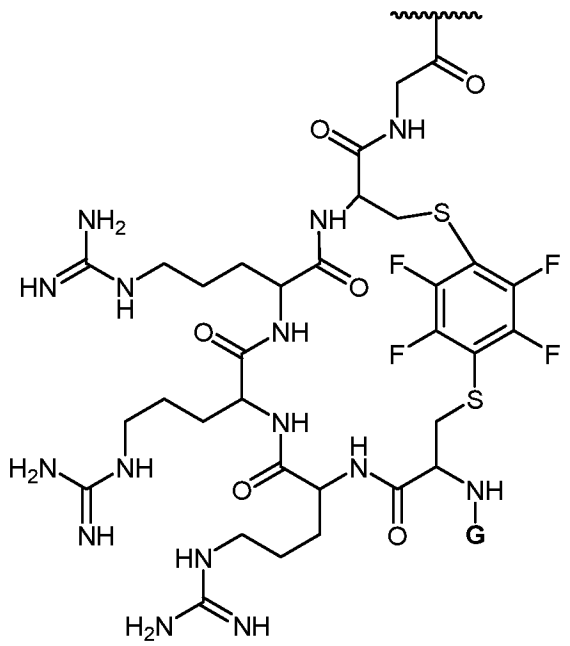
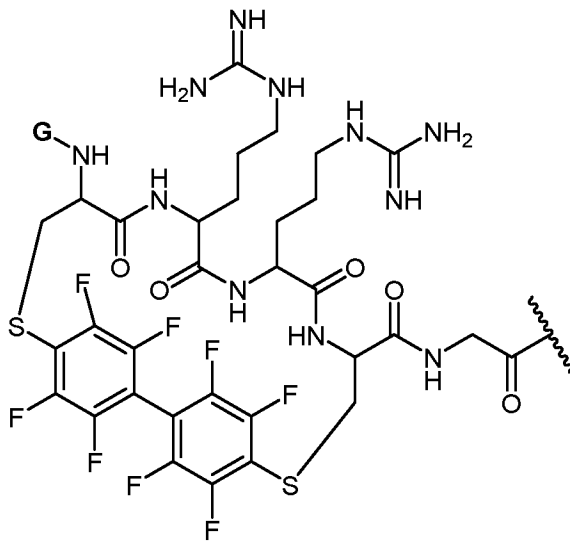
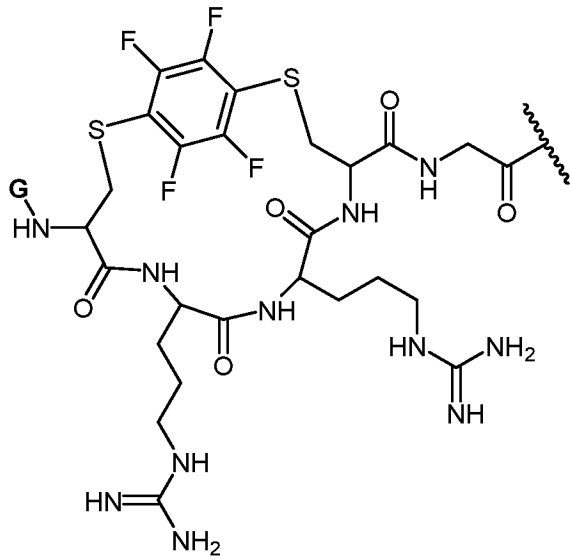
24. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по п. 1-23 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающиеся тем, что d равняется 1.

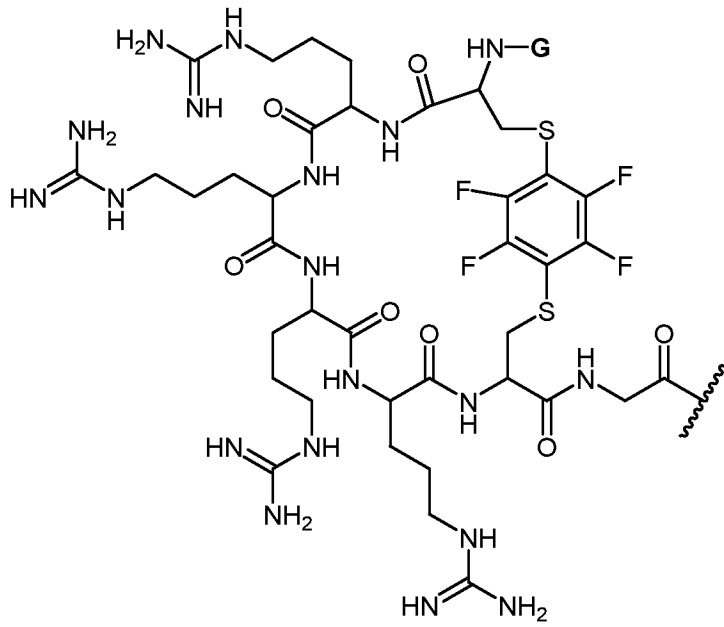
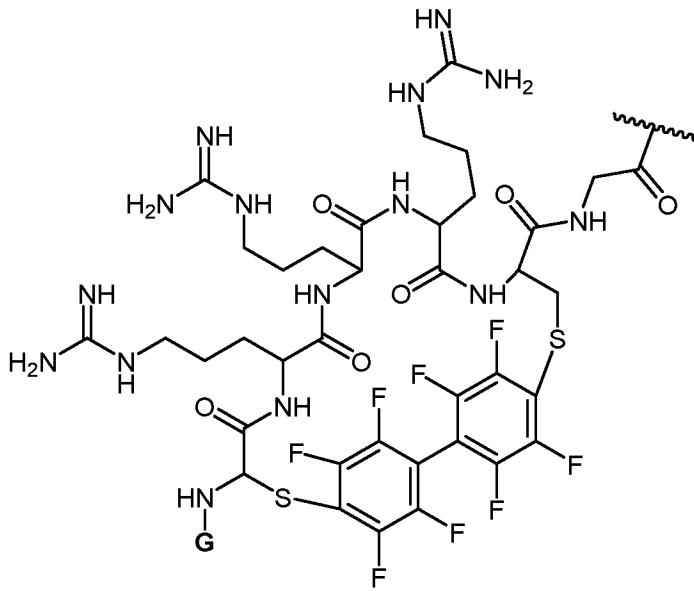
25. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по любому из пп. 1-23 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающиеся тем, что d равняется 0.

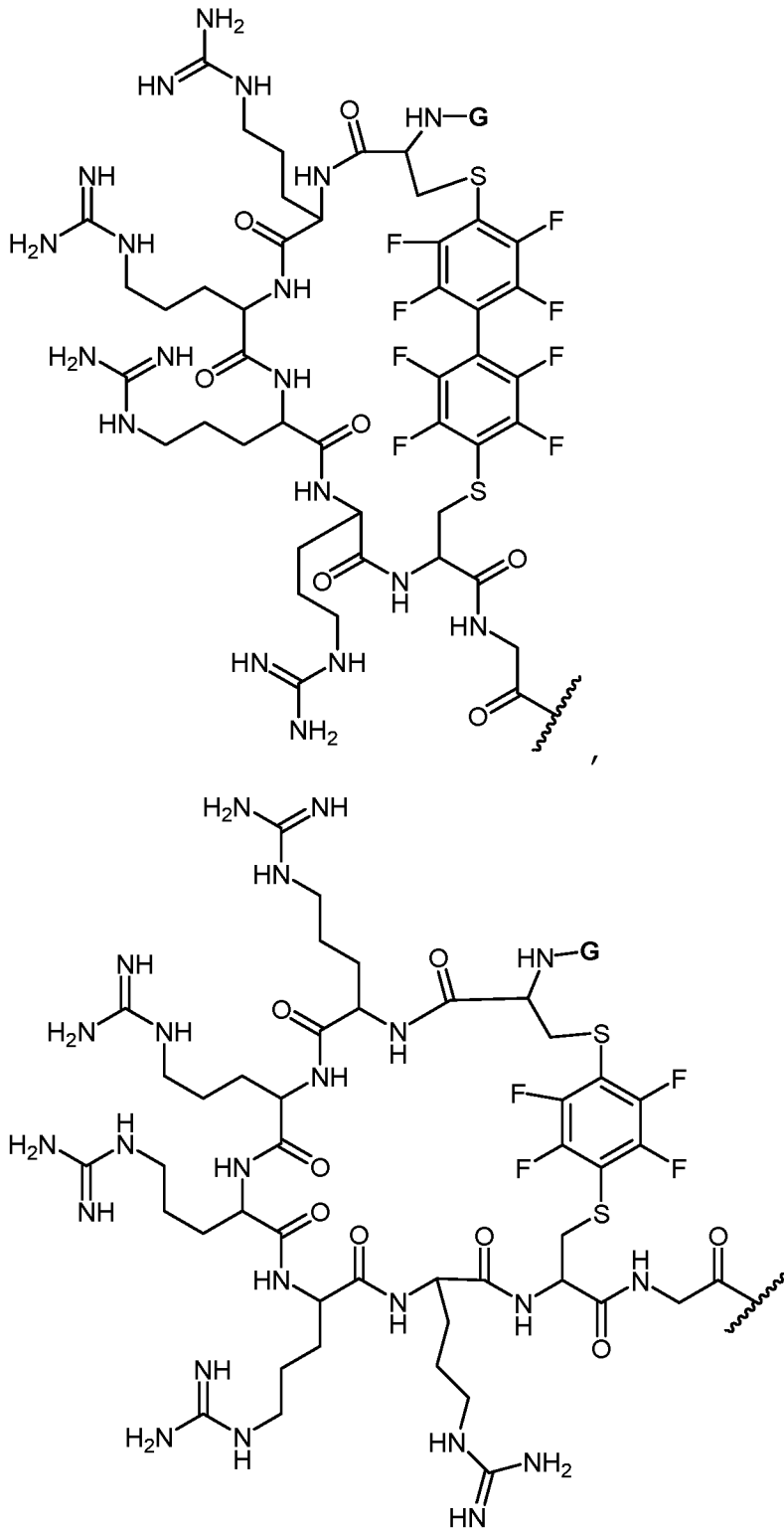
26. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по любому из пп. 1-24 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающиеся тем, что

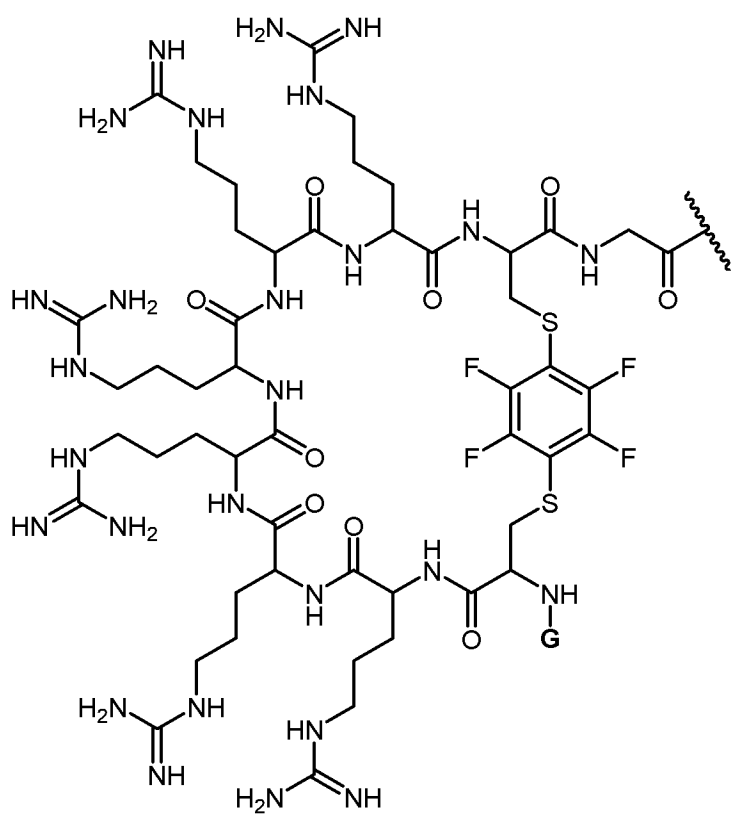
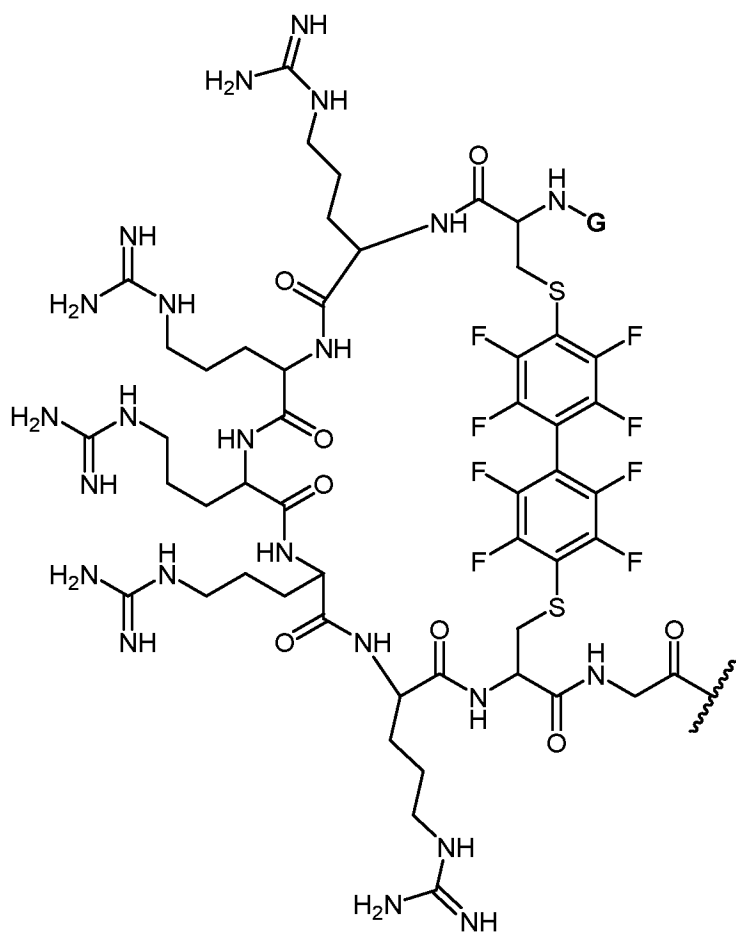


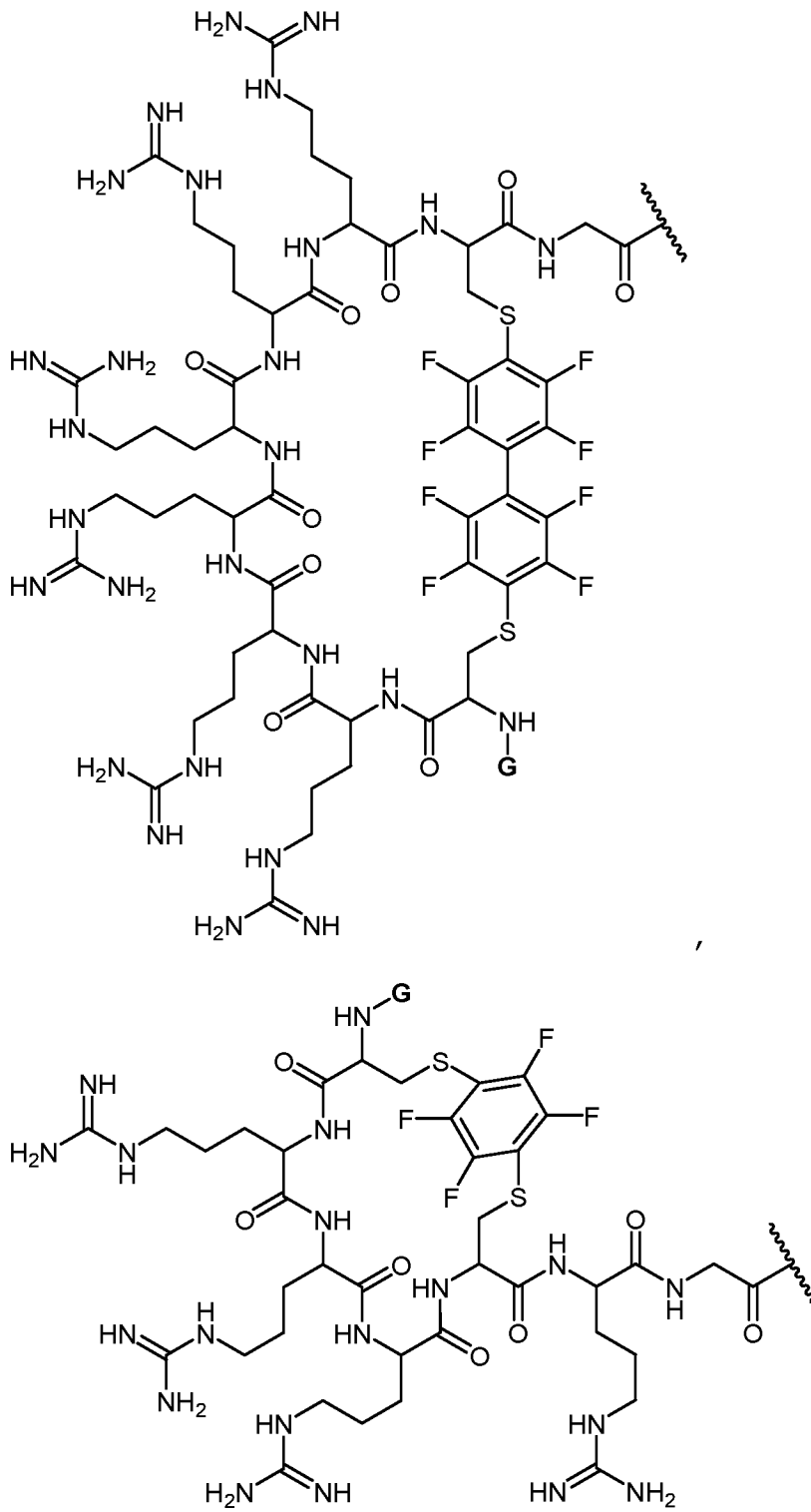
G выбран из:

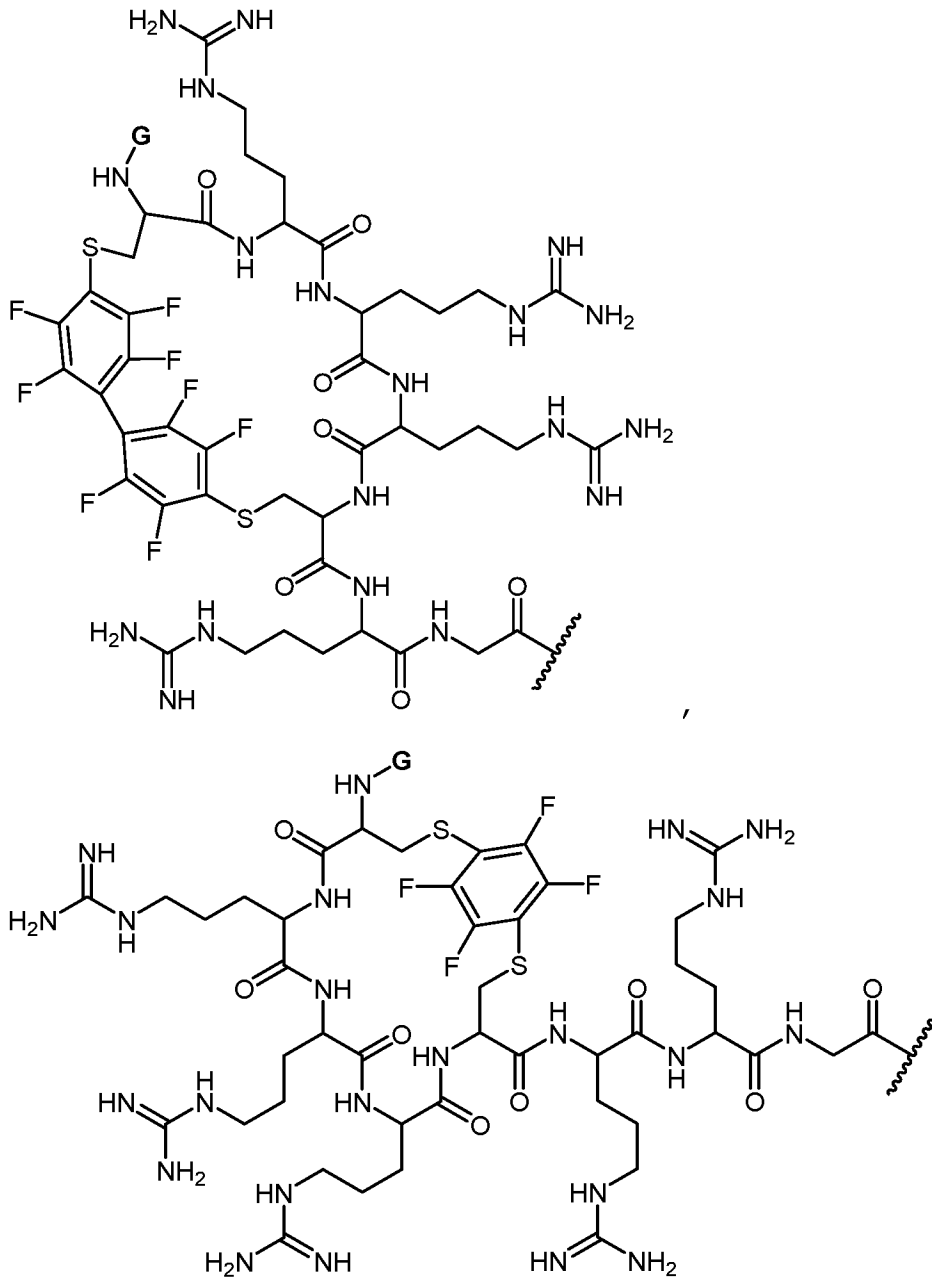


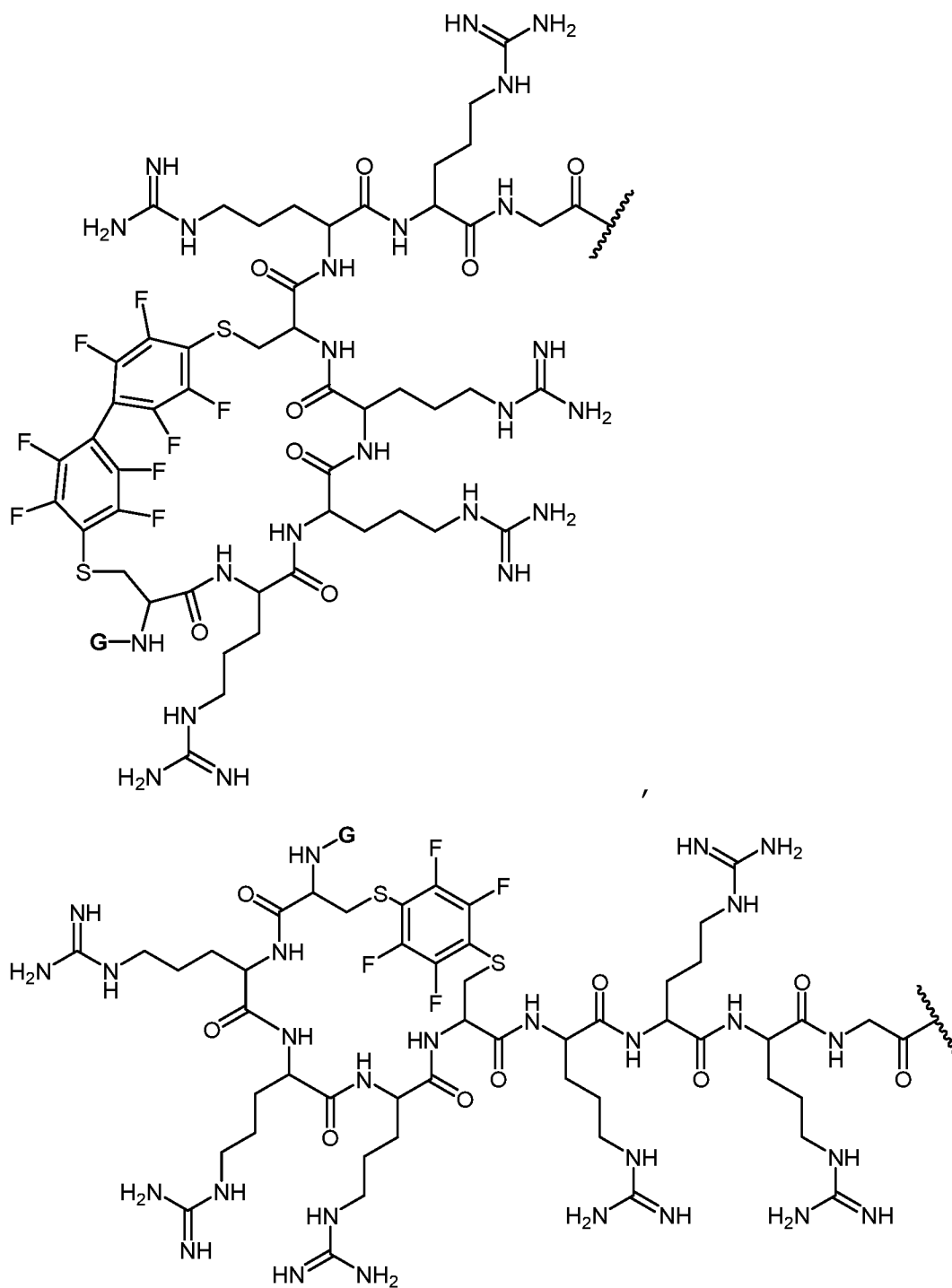


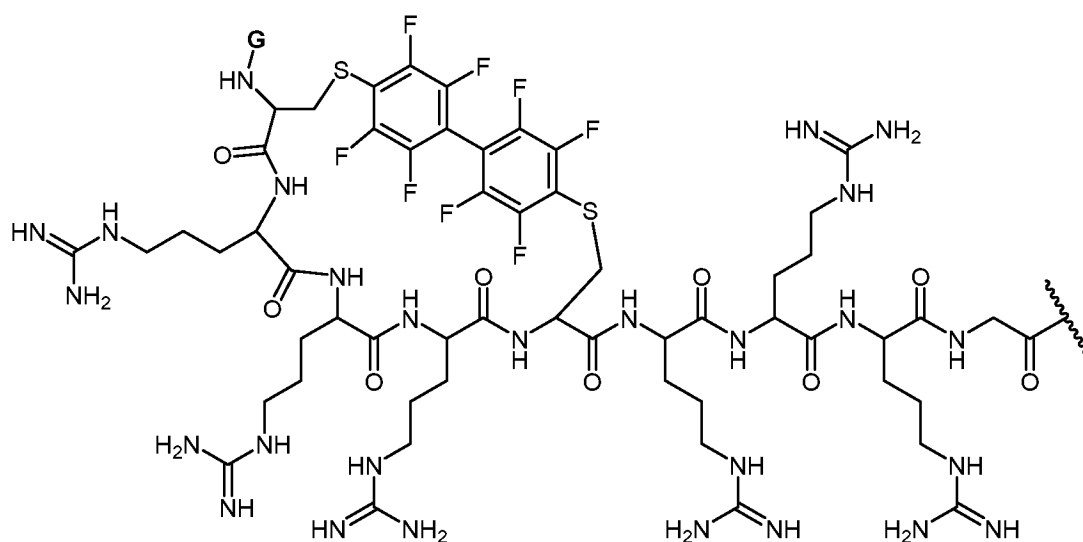




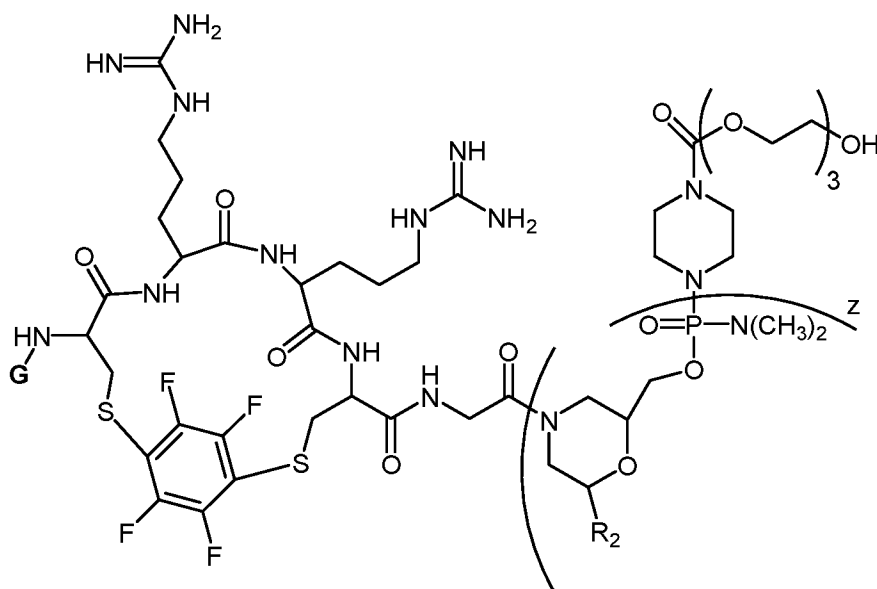


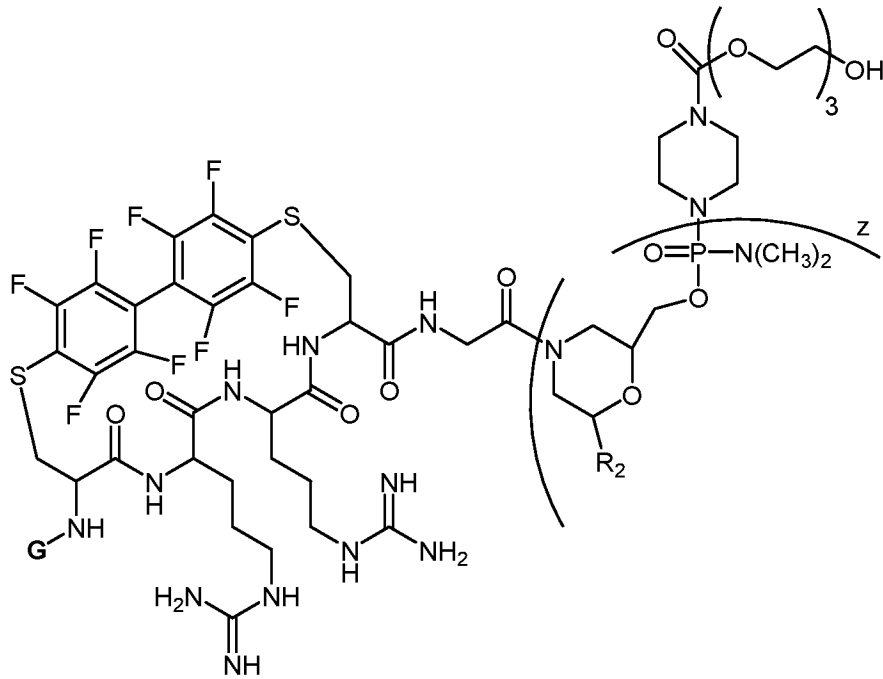
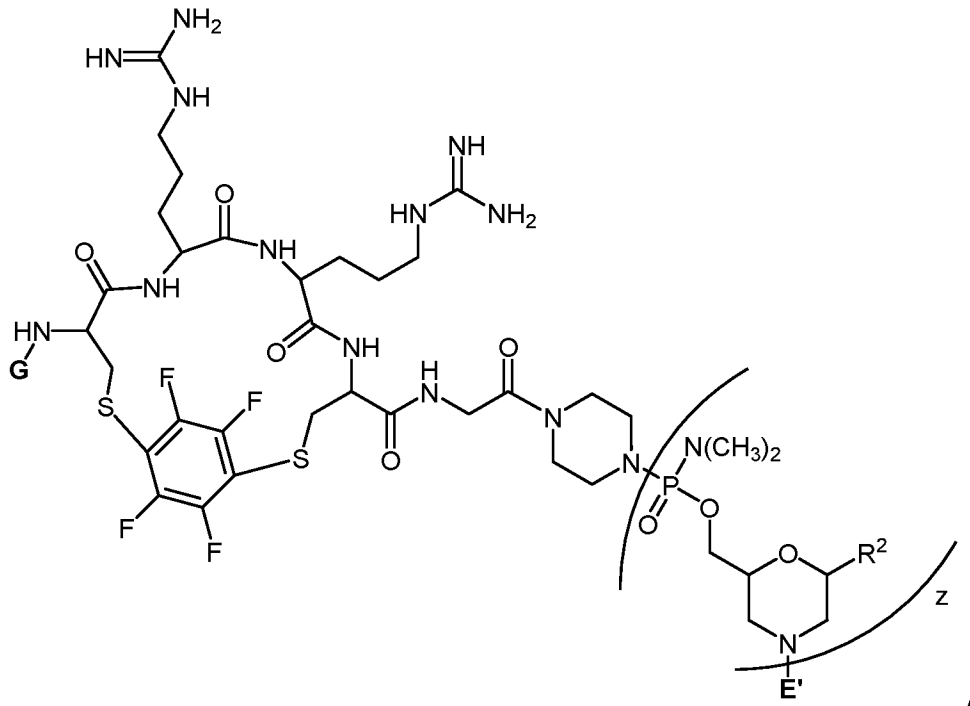


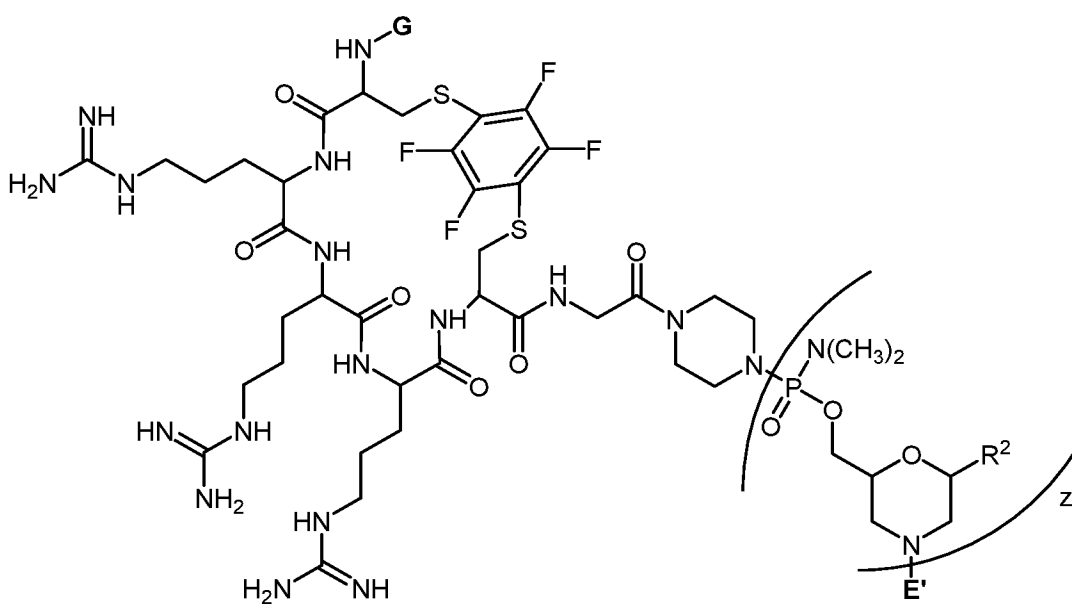
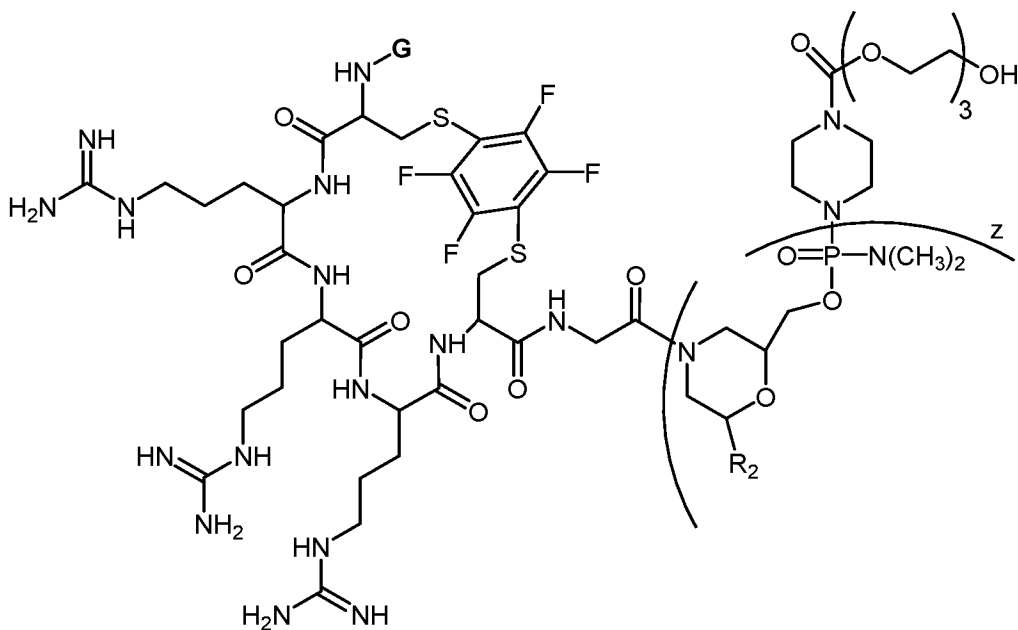
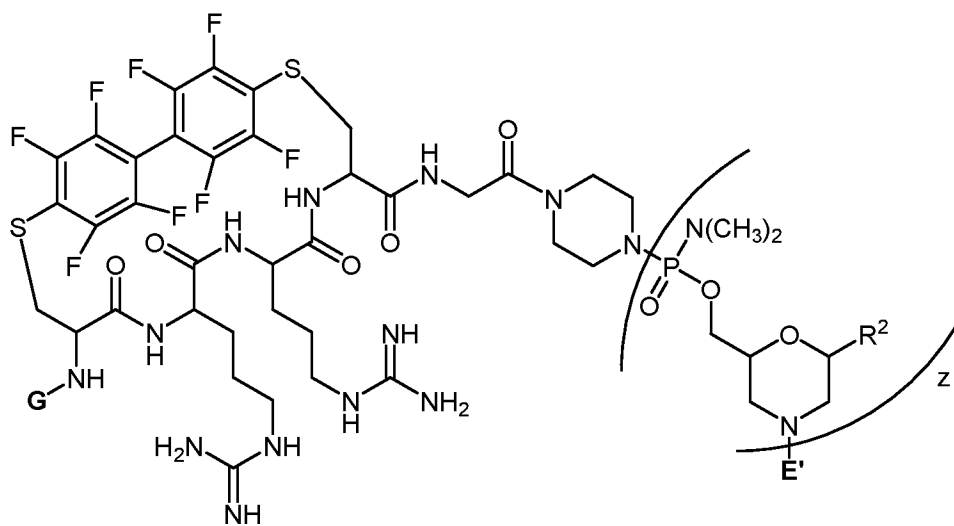


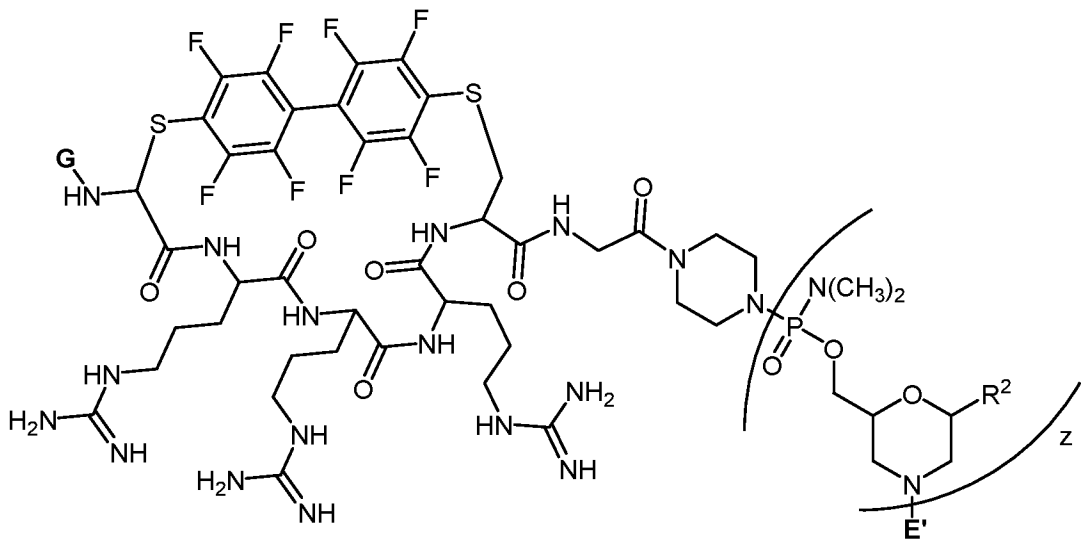
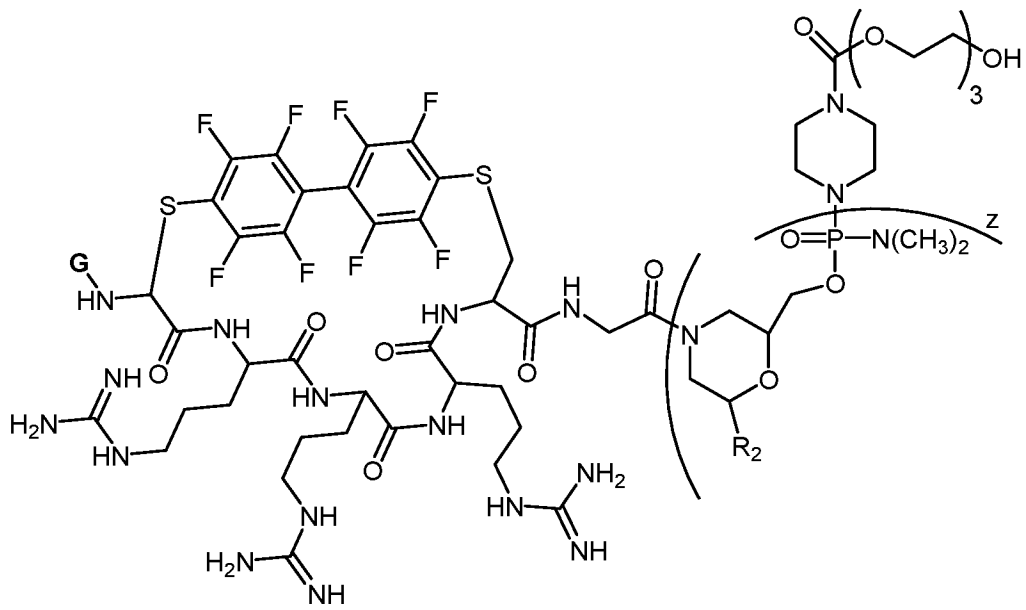


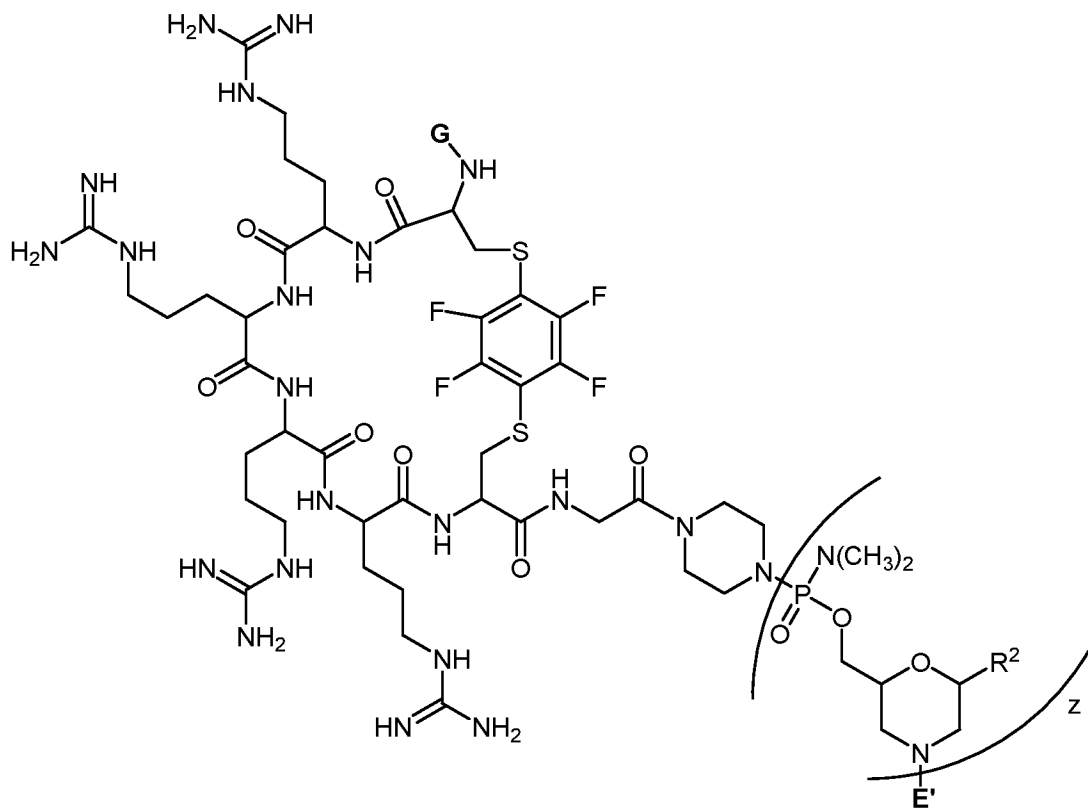
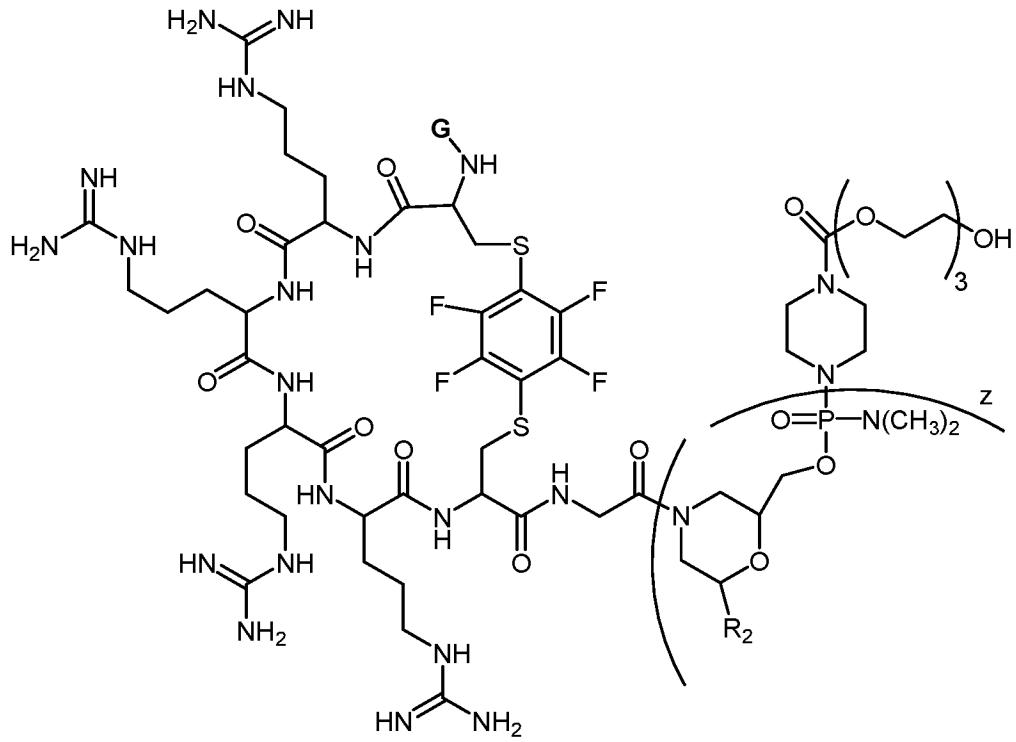
27. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по любому из пп. 1-24 и п. 26 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающиеся тем, что пептид-олигонуклеотидный конъюгат выбран из:

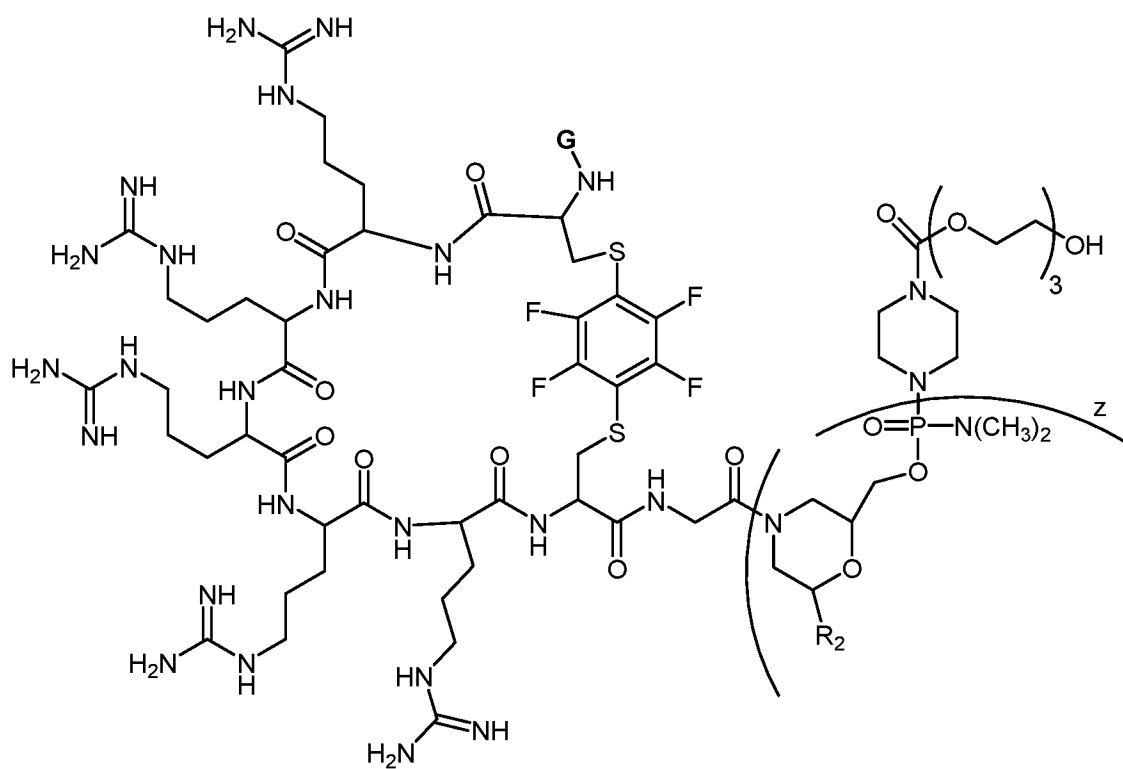
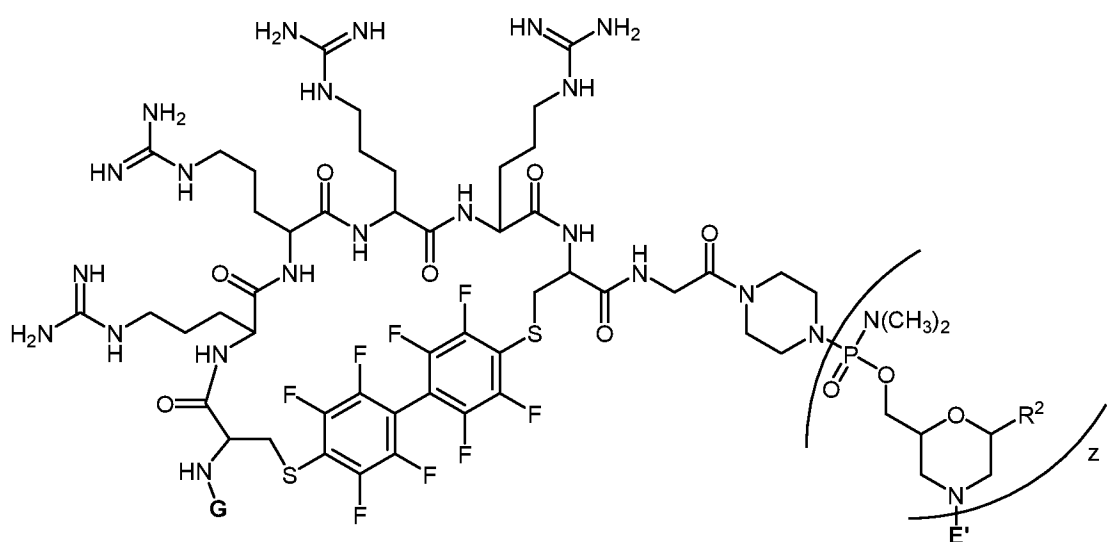
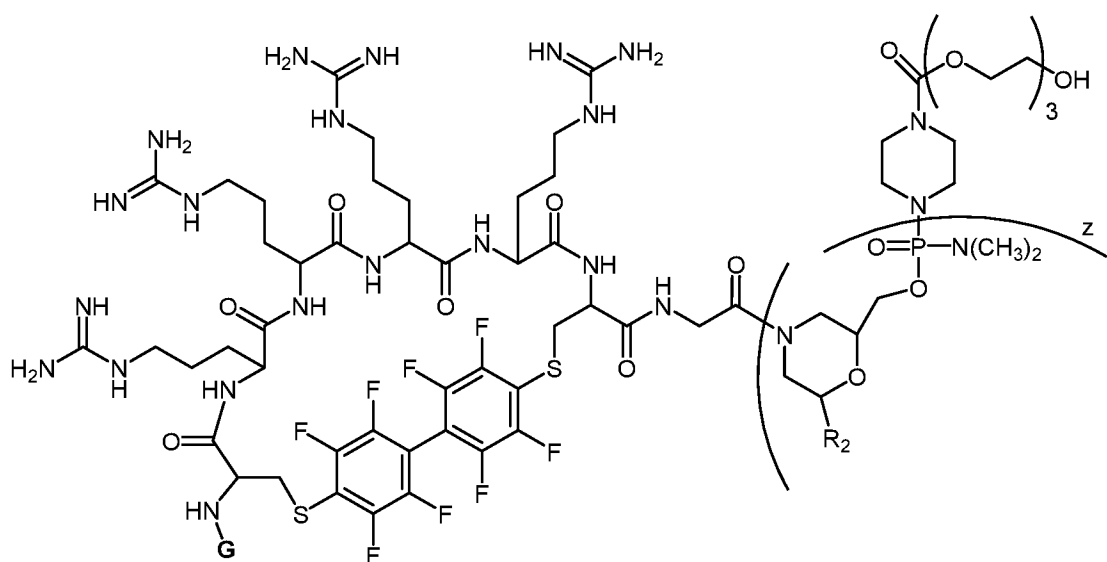


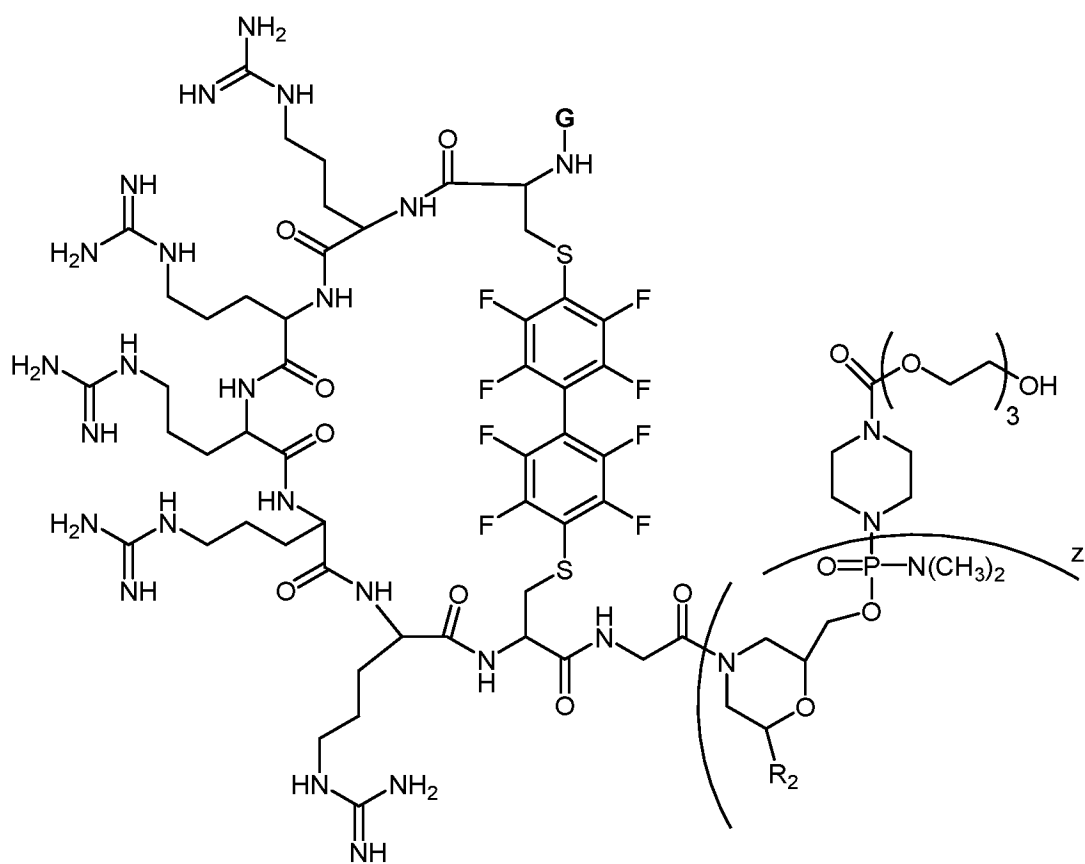
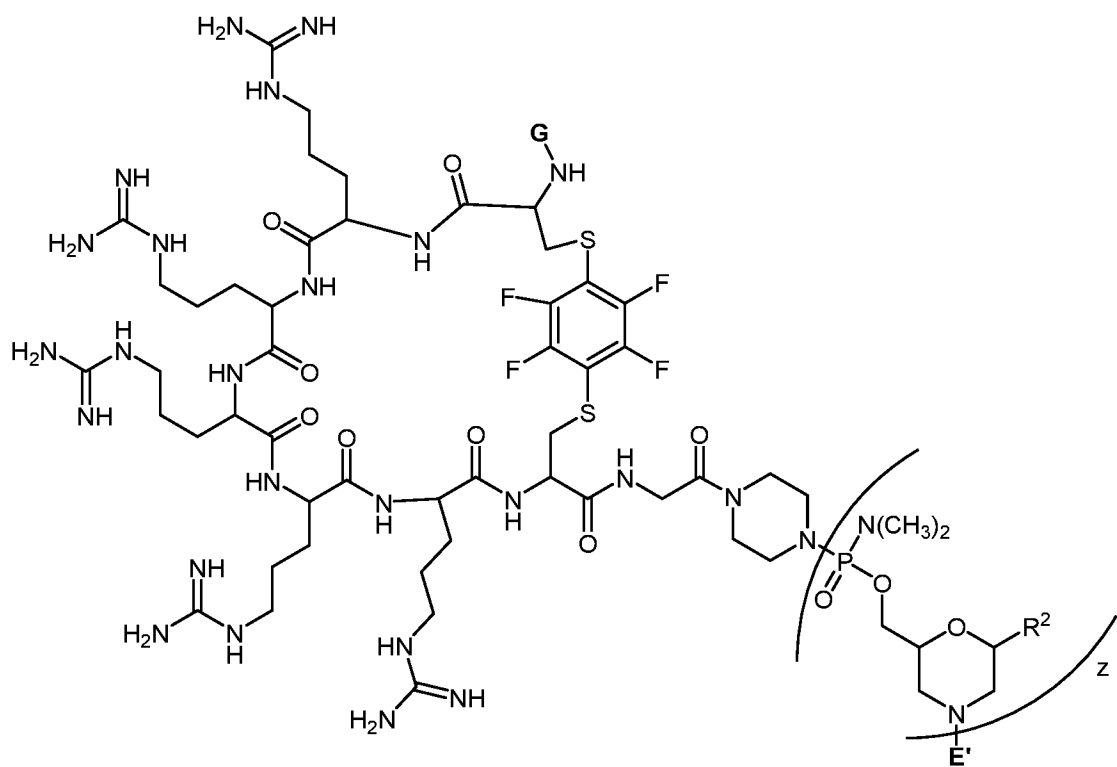


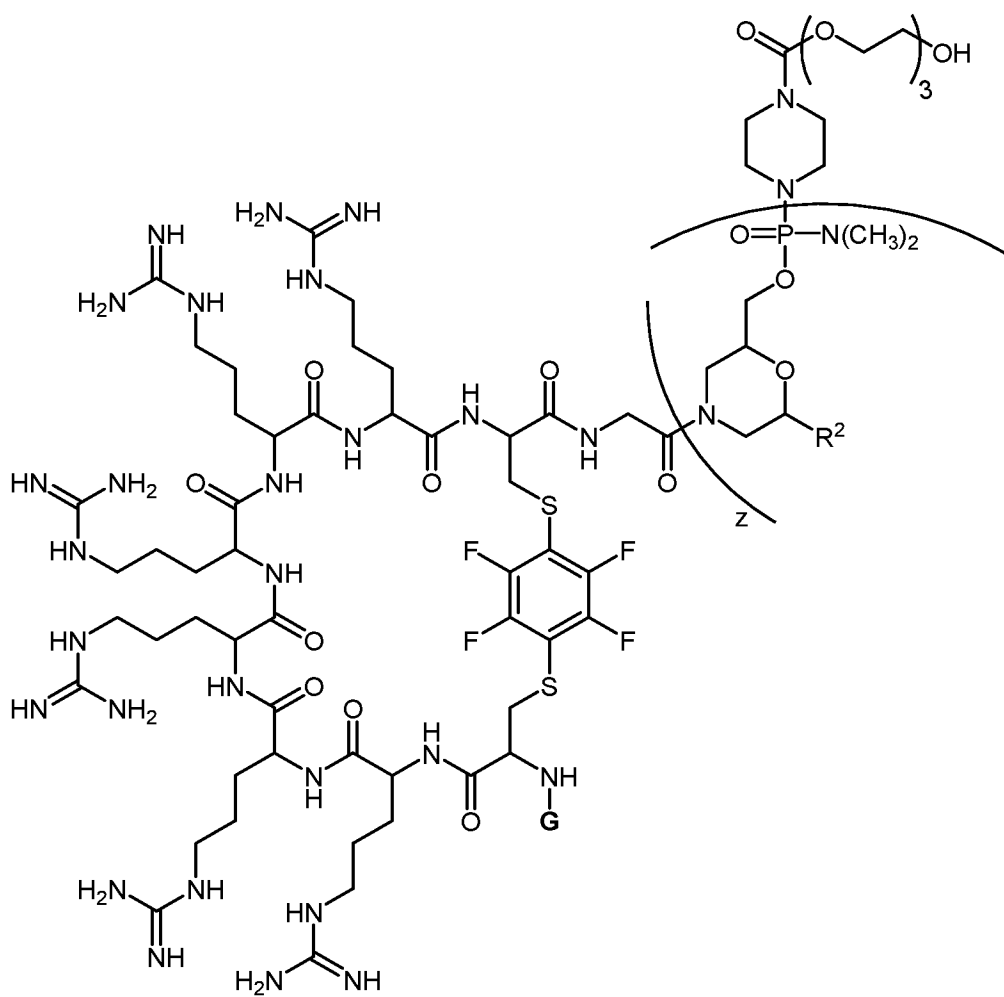
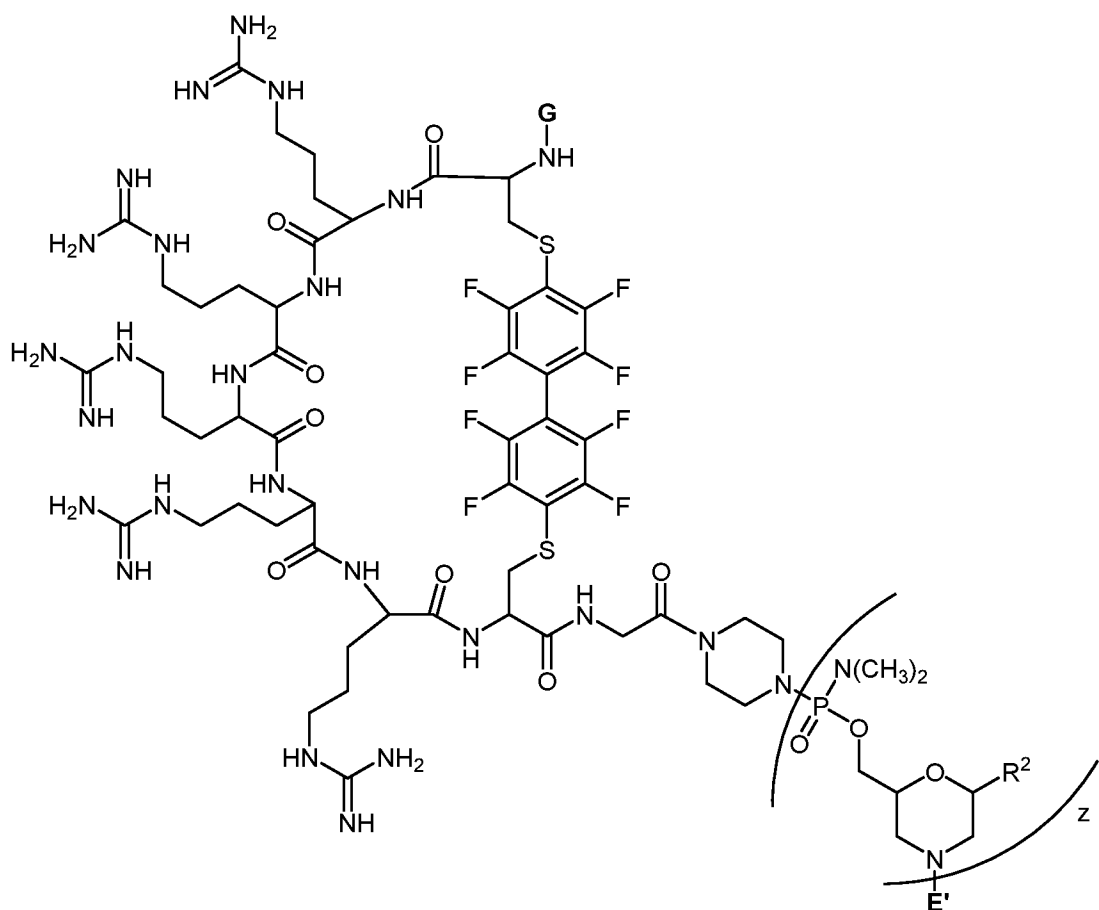


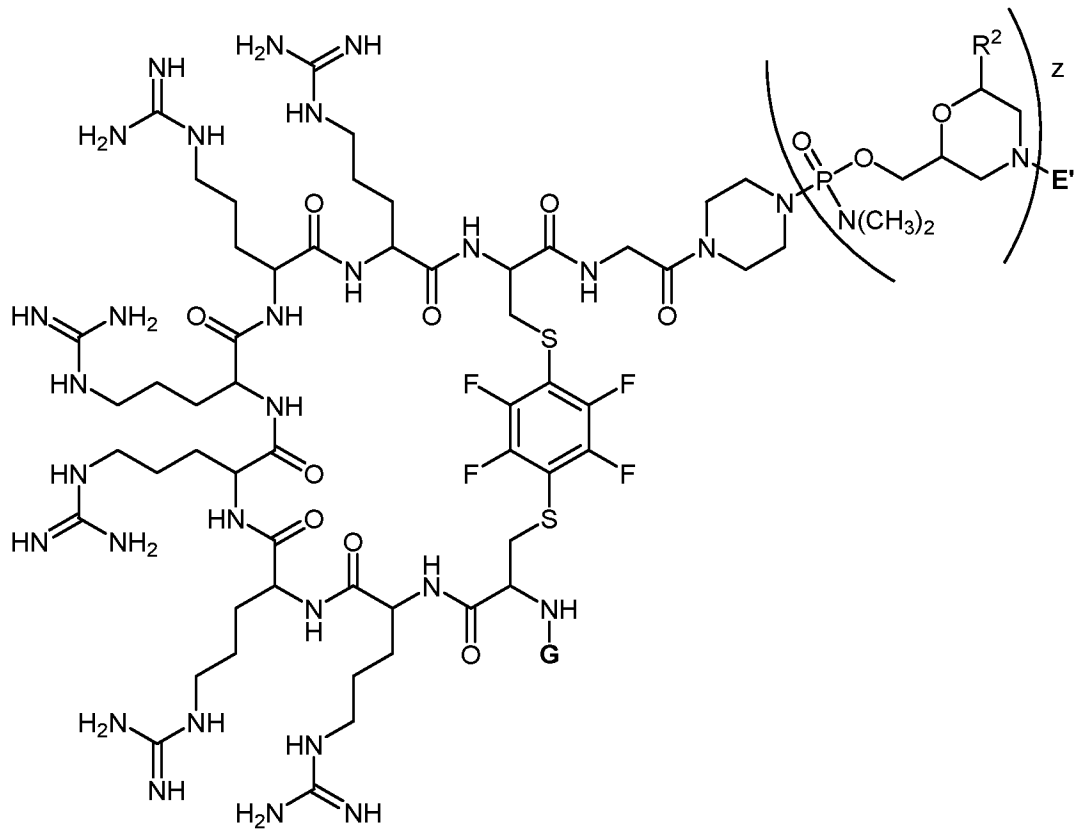


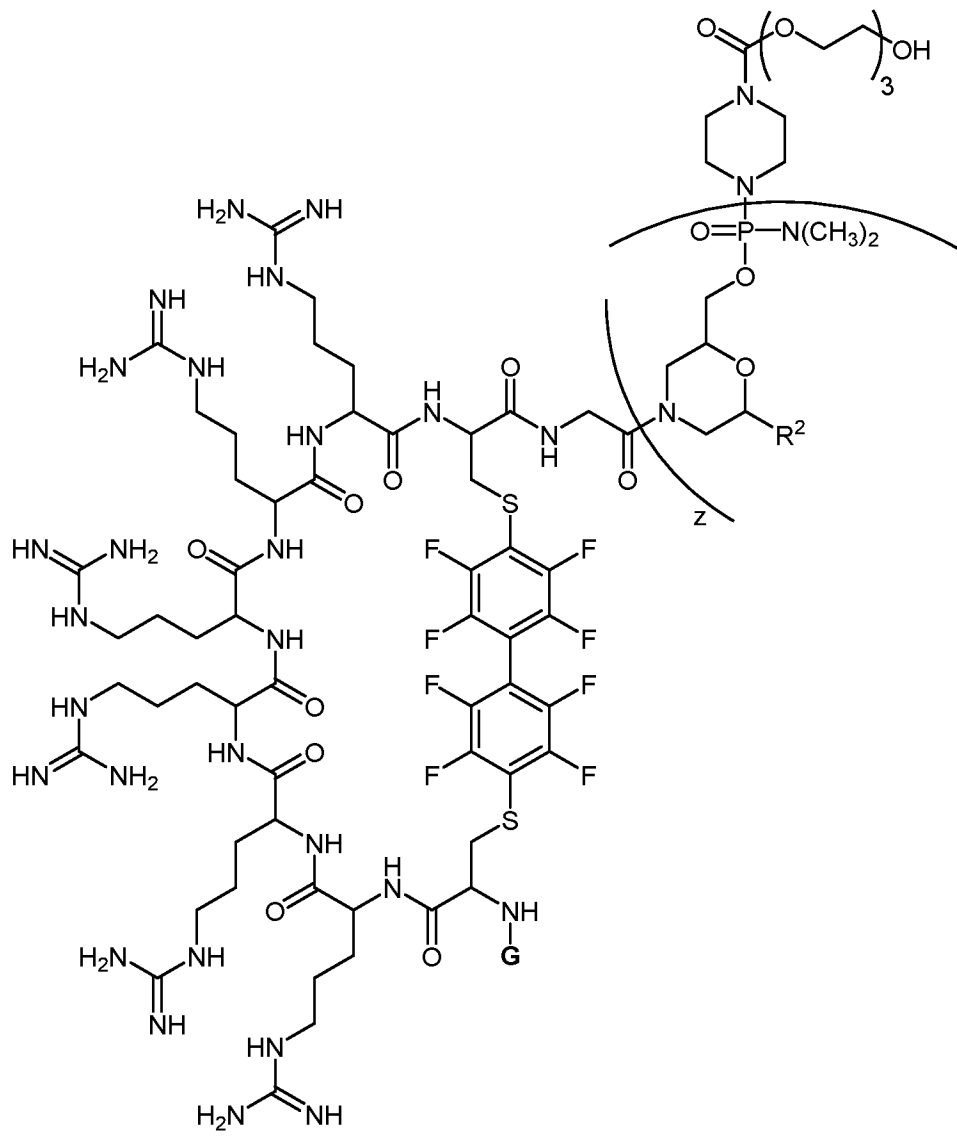


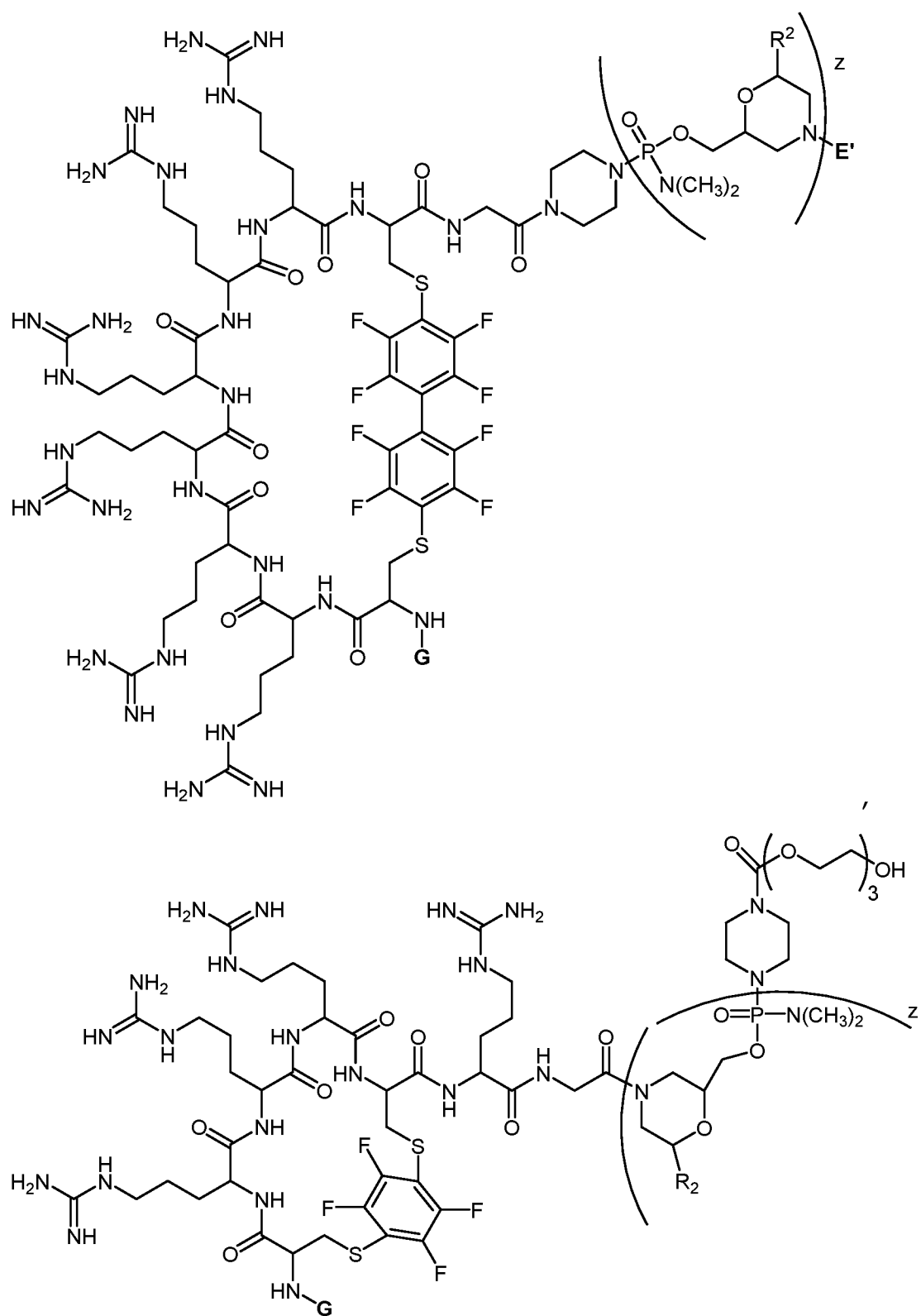


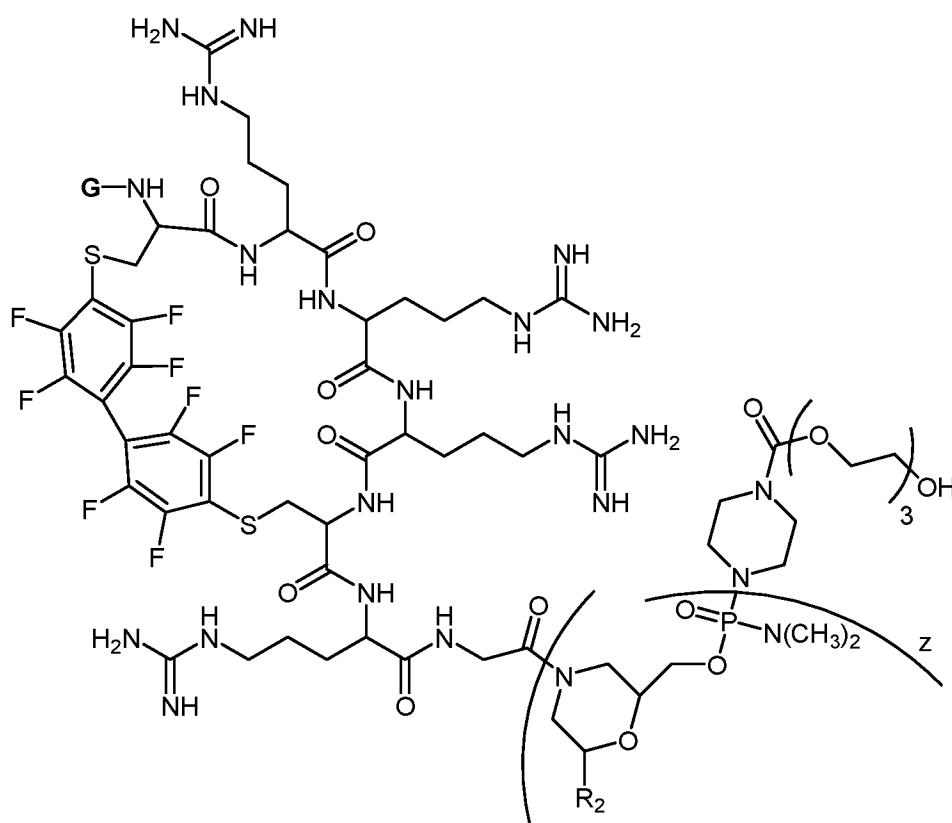
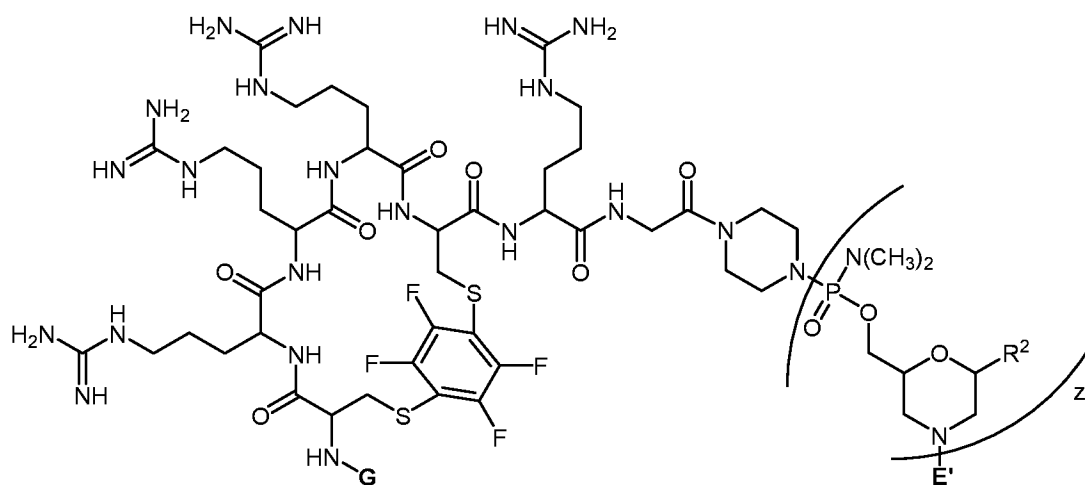


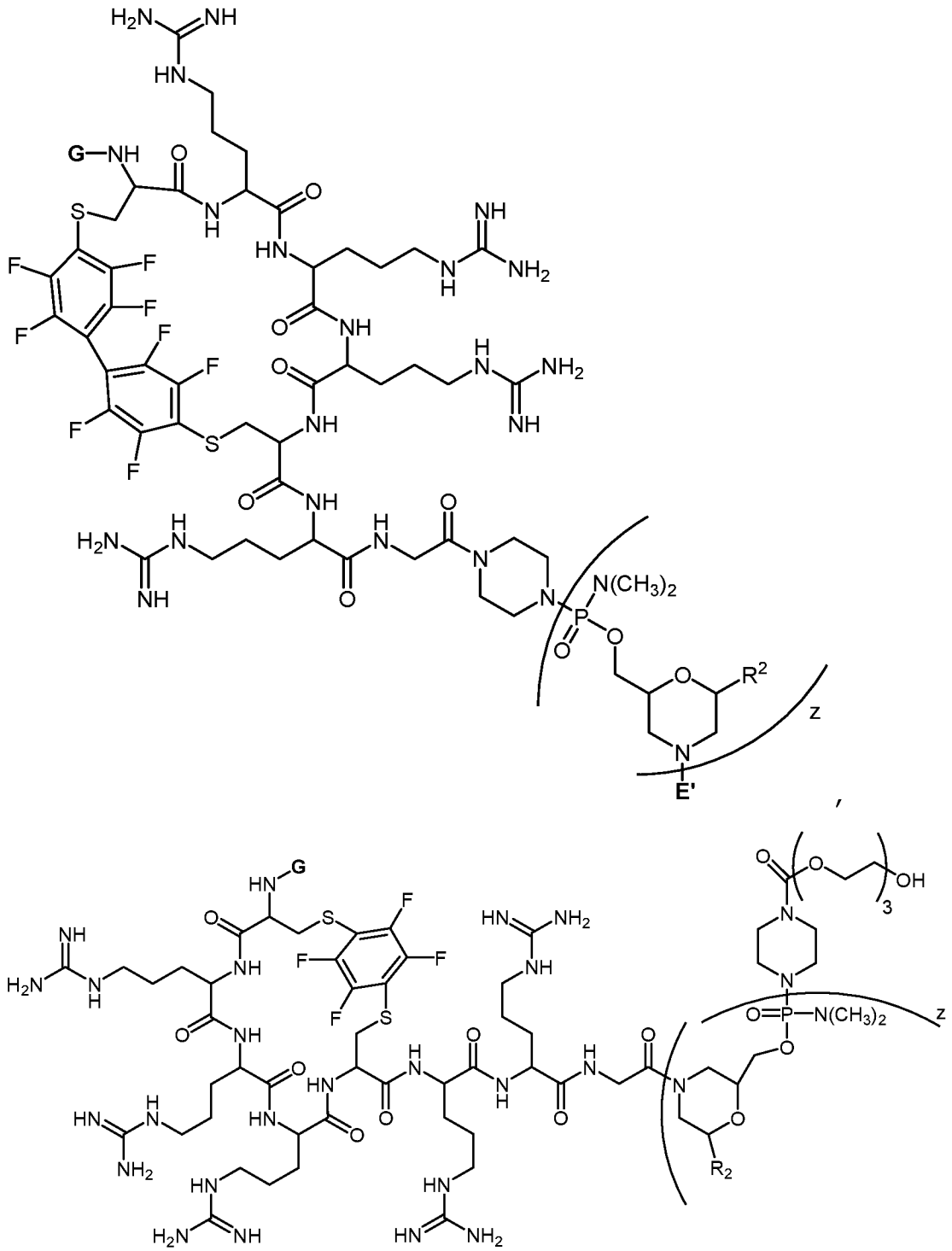


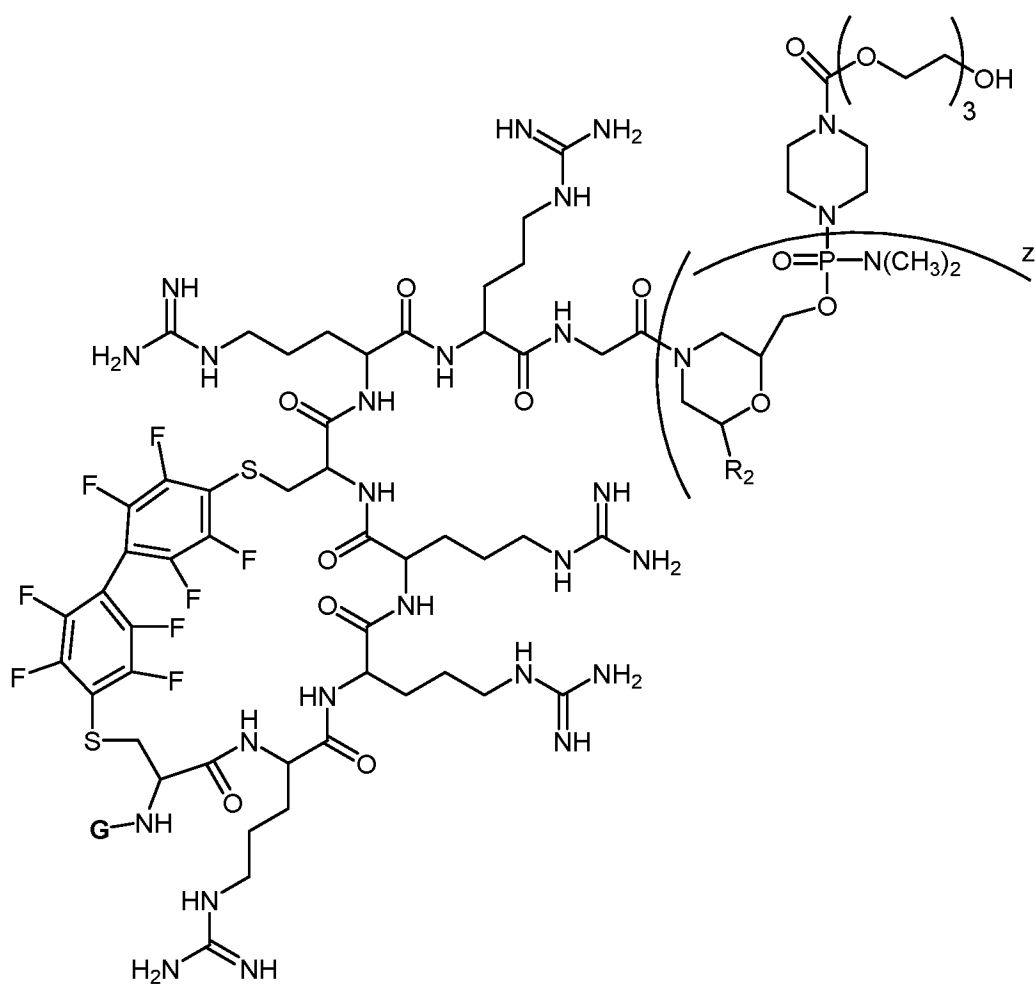
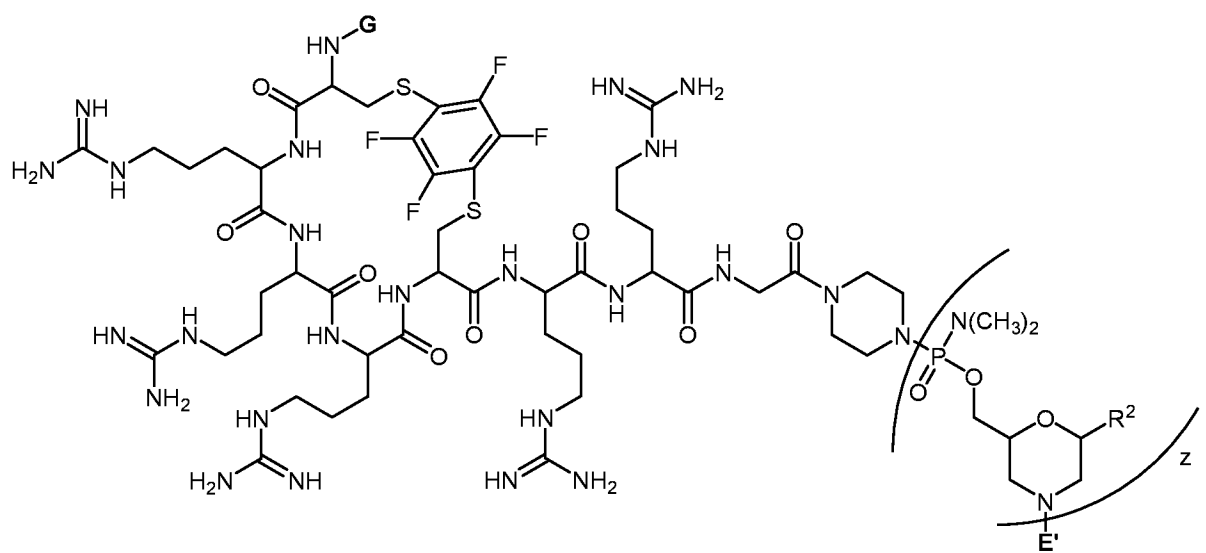


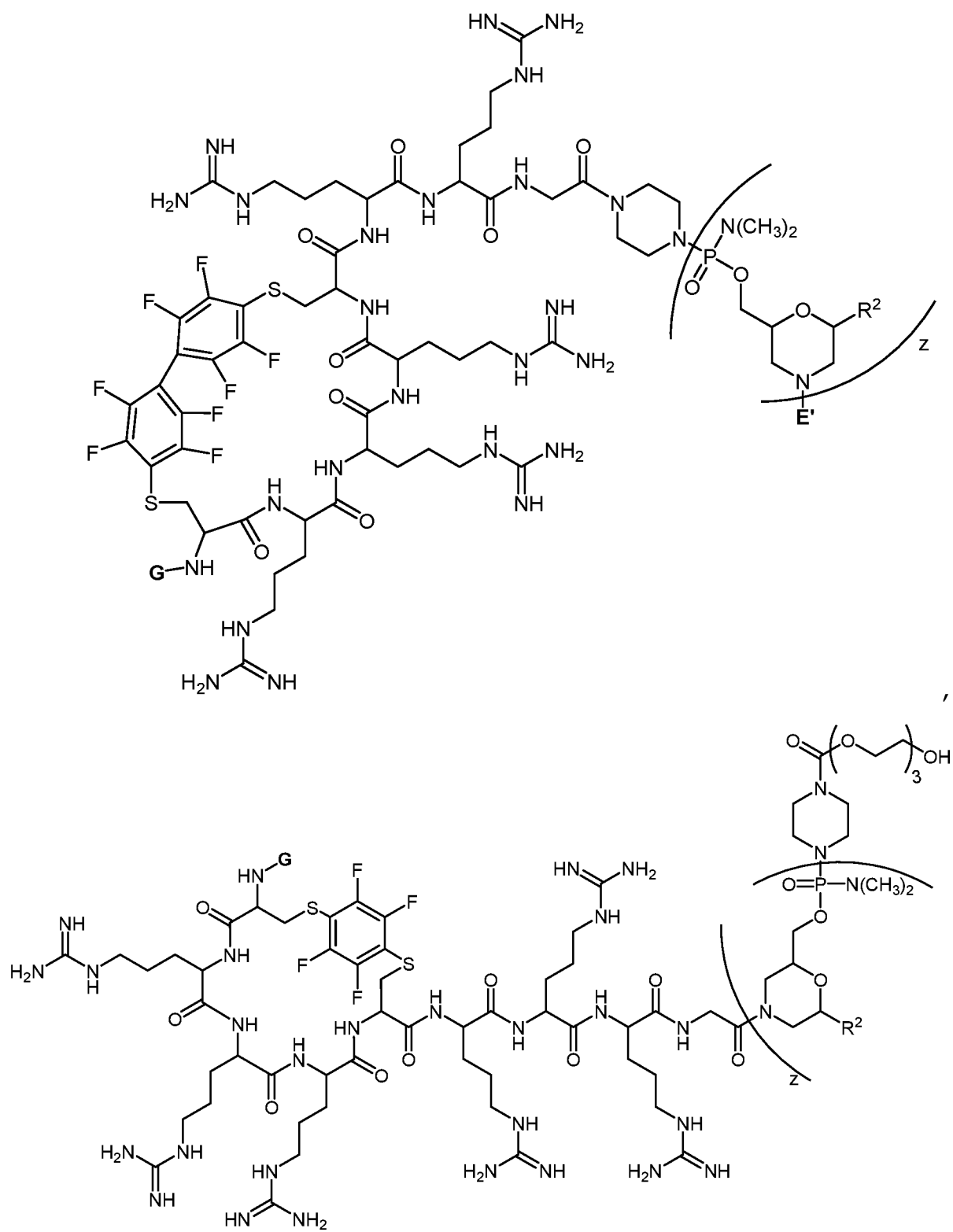












E' выбран из H и $-C(O)CH_3$.

28. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по п. 27, отличающиеся тем, что G представляет собой H .

29. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по п. 27, отличающиеся тем, что G представляет собой $-C(O)CH_3$.

30. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по п. 27, отличающиеся тем, что E' представляет собой H .

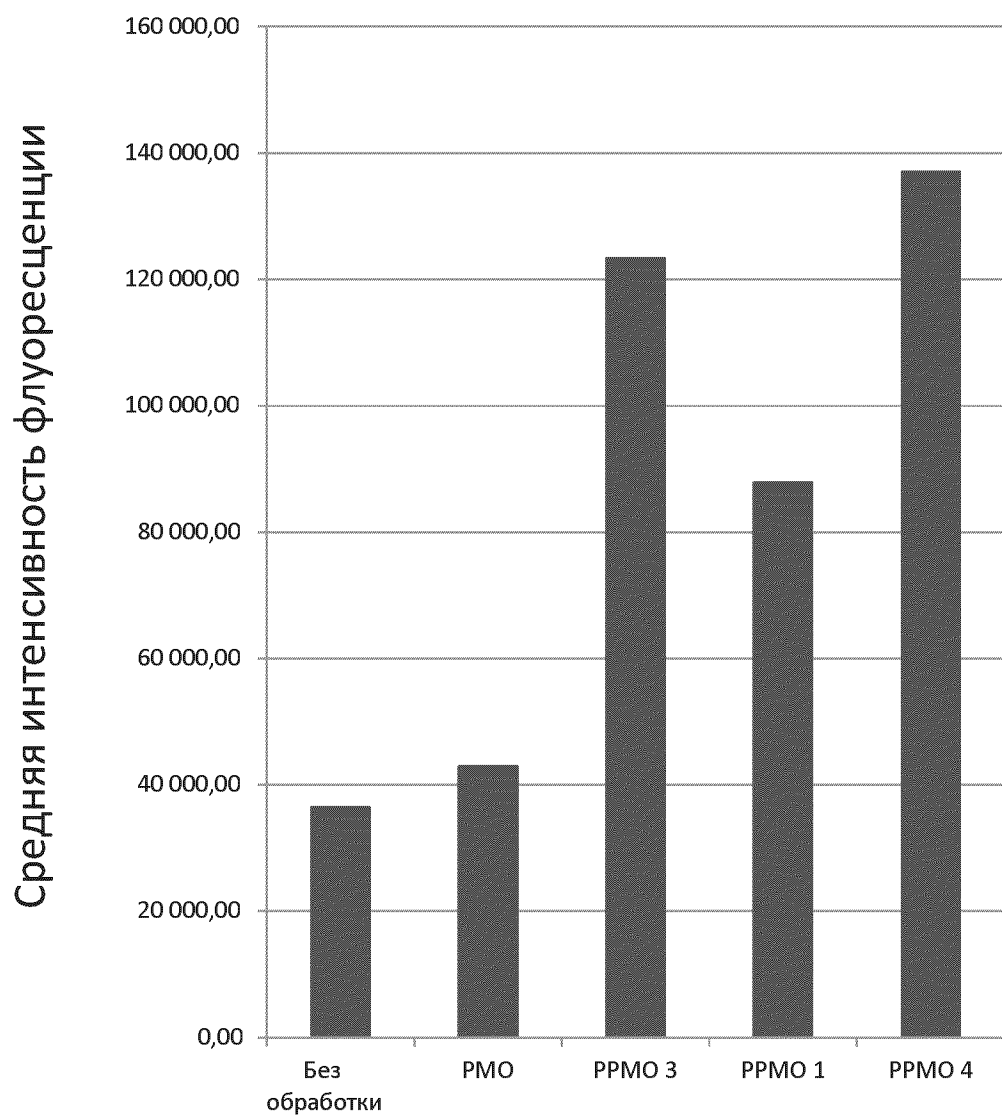
31. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по п. 27, отличающиеся тем, что E' представляет собой $-C(O)CH_3$.

32. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по п. 27, отличающиеся тем, что E' и G представляют собой $-C(O)CH_3$.

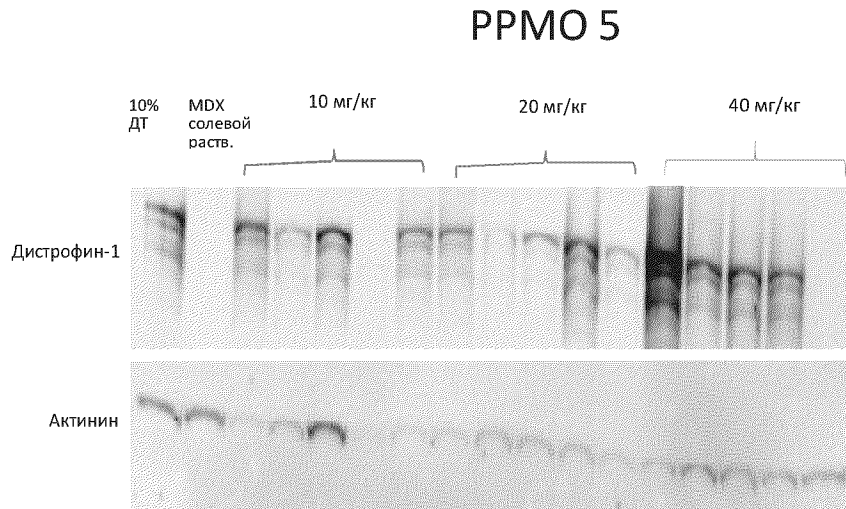
33. Пептид-олигонуклеотидный конъюгат по п. 27, отличающиеся тем, что G представляет собой $-C(O)CH_3$ и E' представляет собой H .

По доверенности

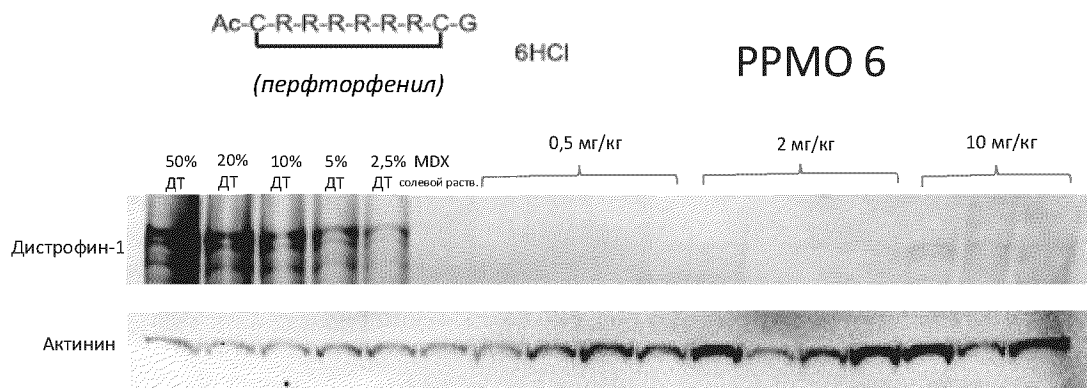
Фигура 1



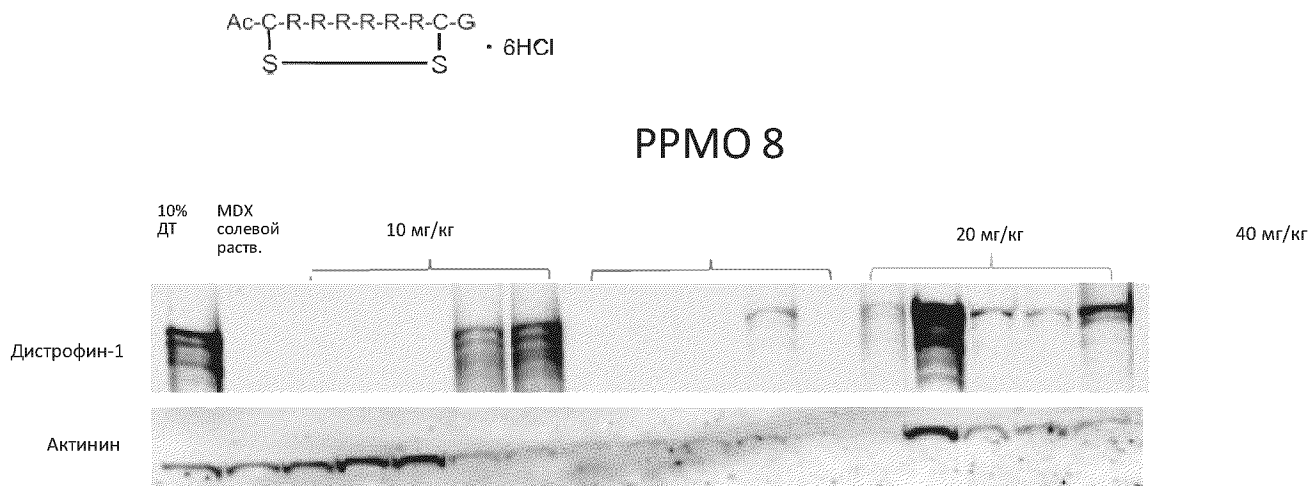
Фигура 2А



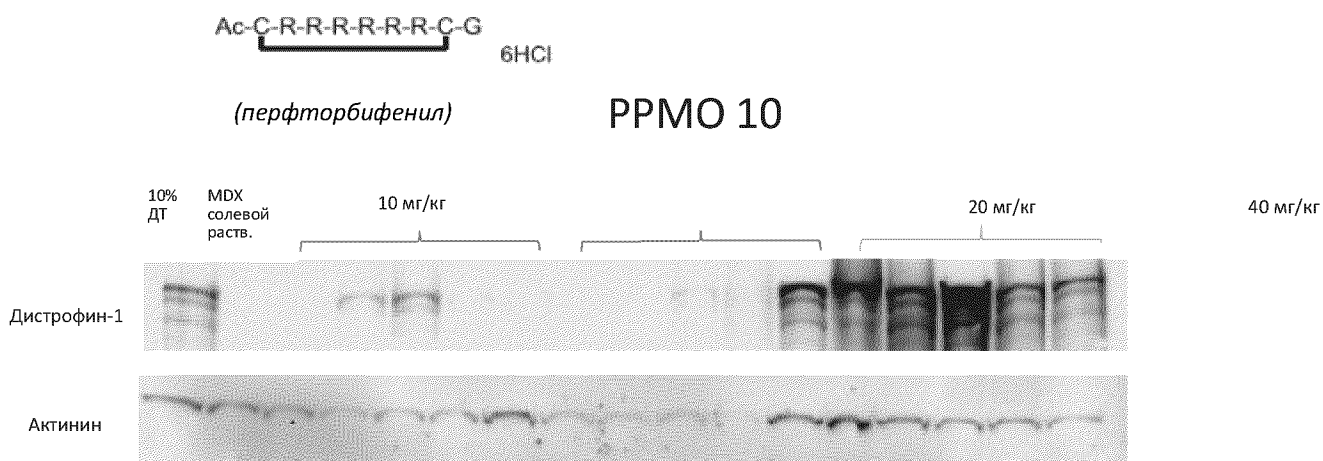
Фигура 2В



Фигура 2С

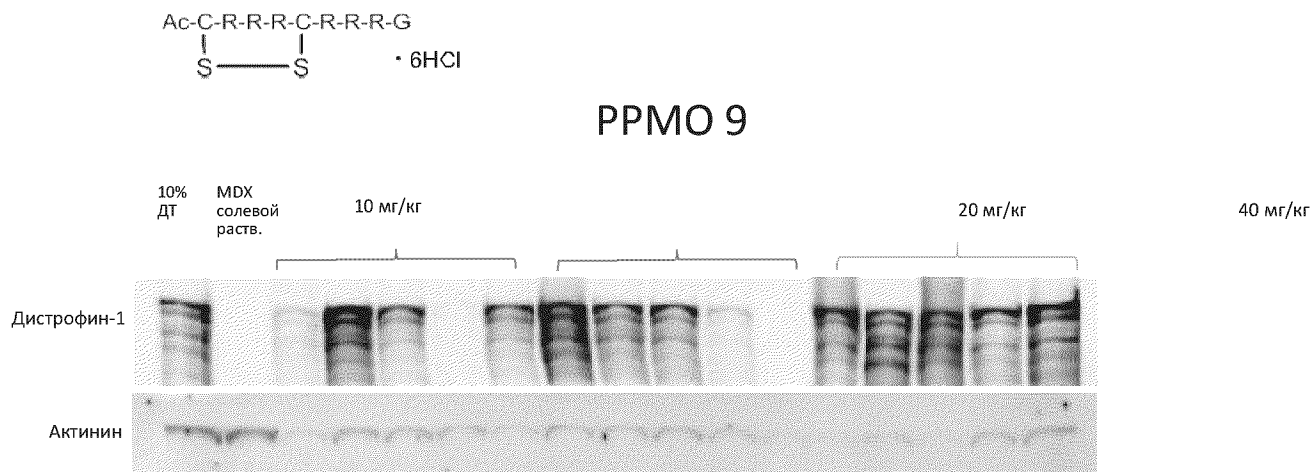


Фигура 2D

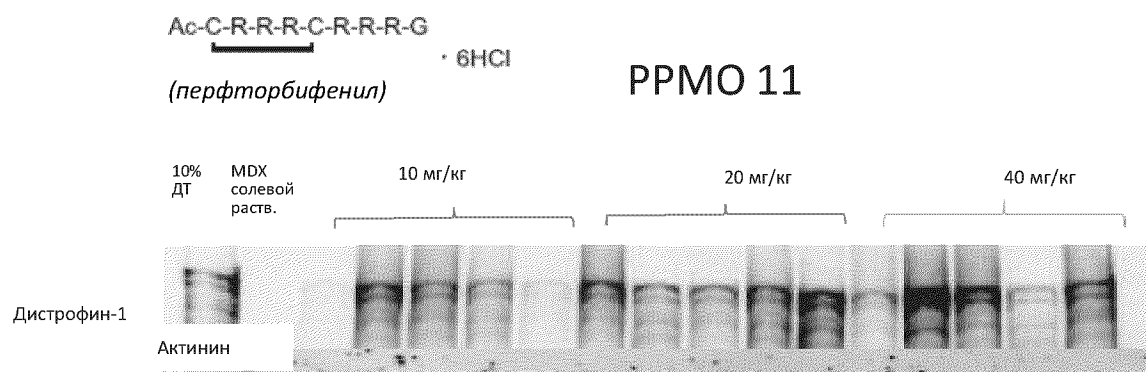


5/13

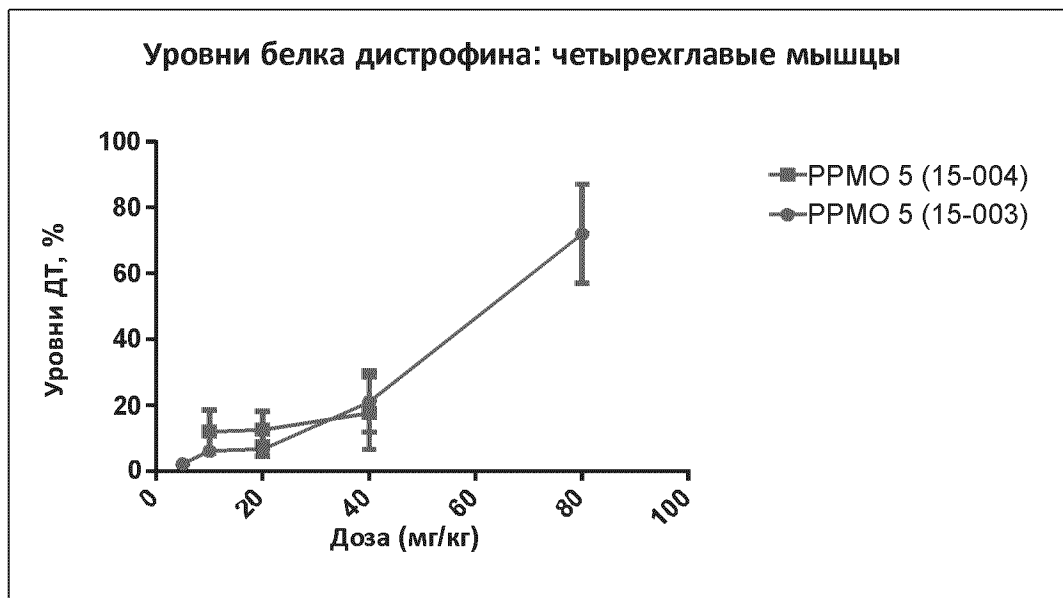
Фигура 3С



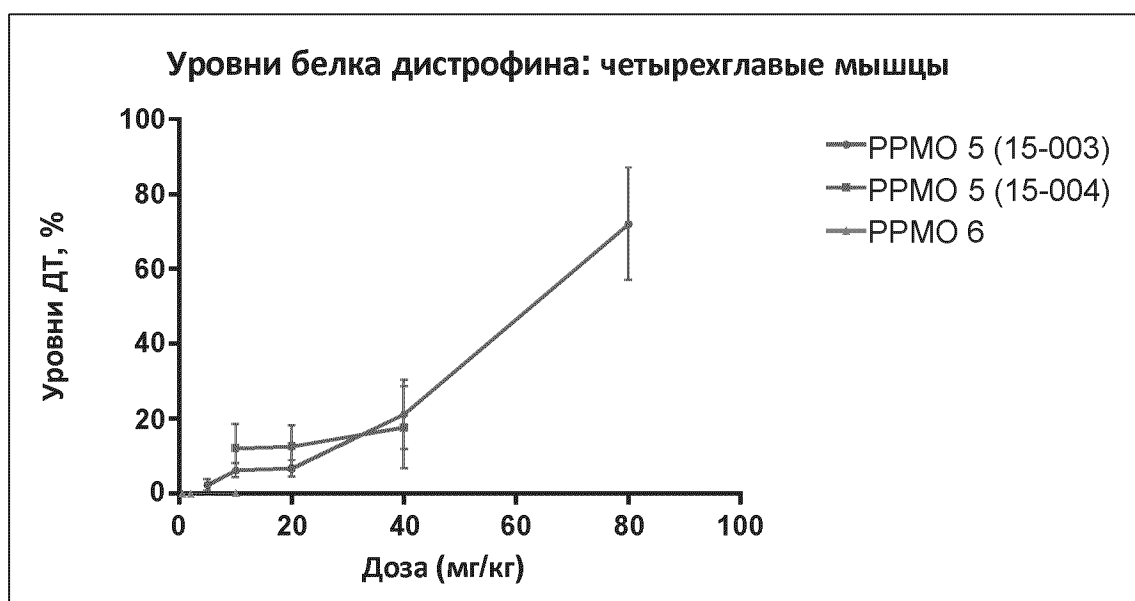
Фигура 3D



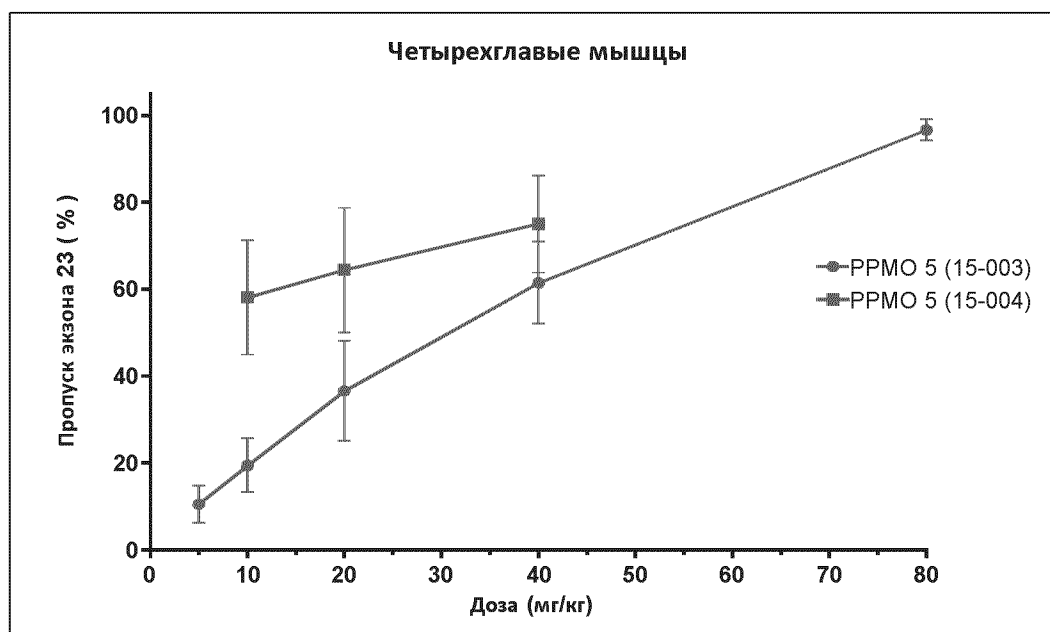
Фигура 4А



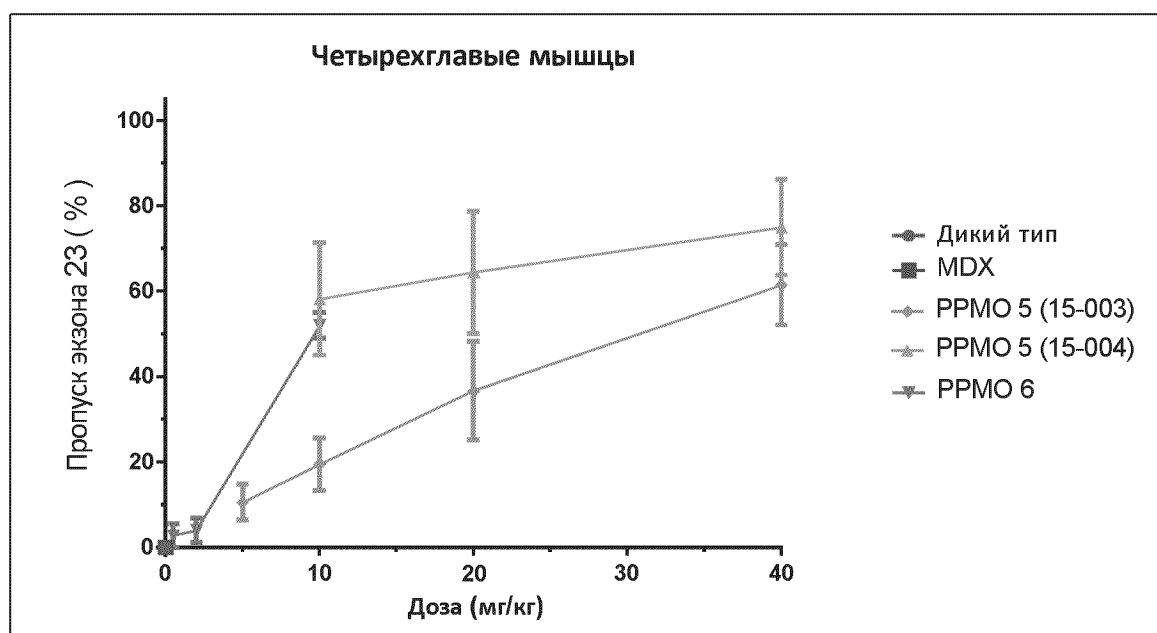
Фигура 4В



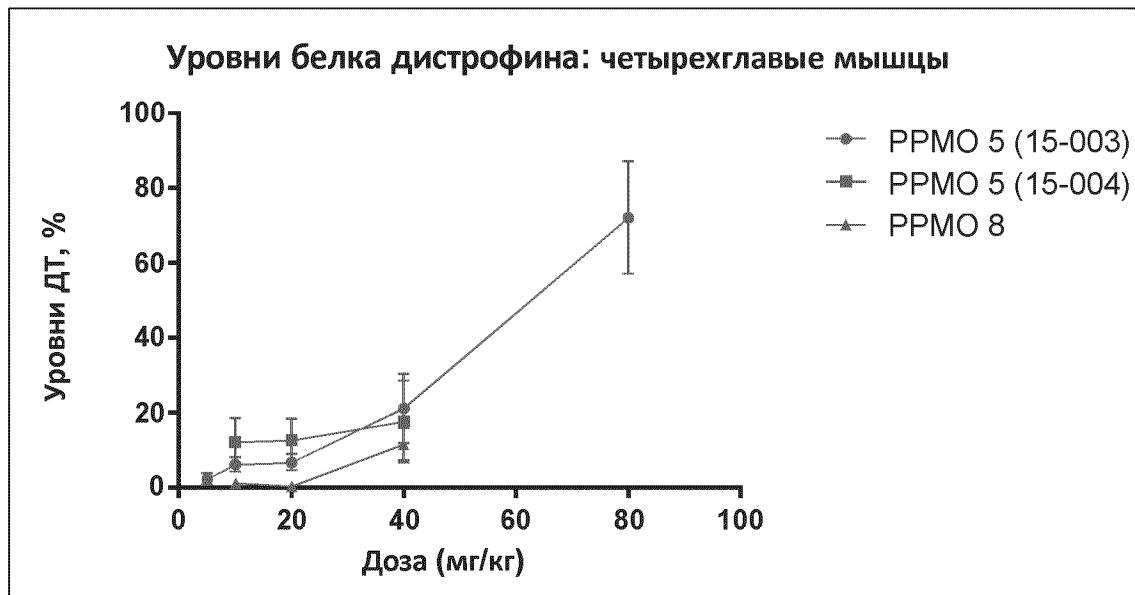
Фигура 4С



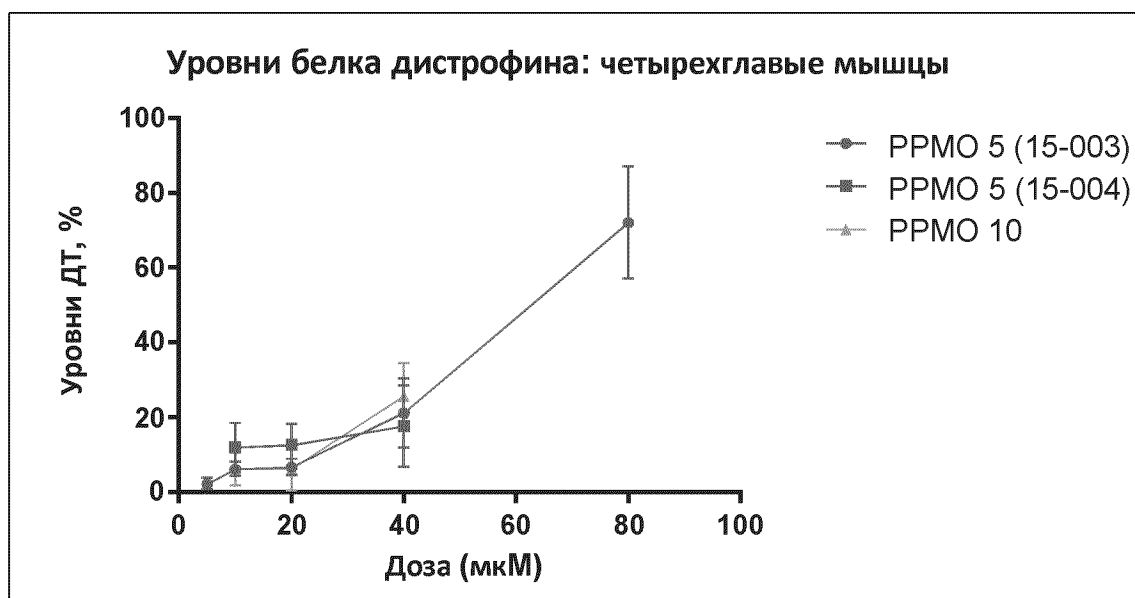
Фигура 4D



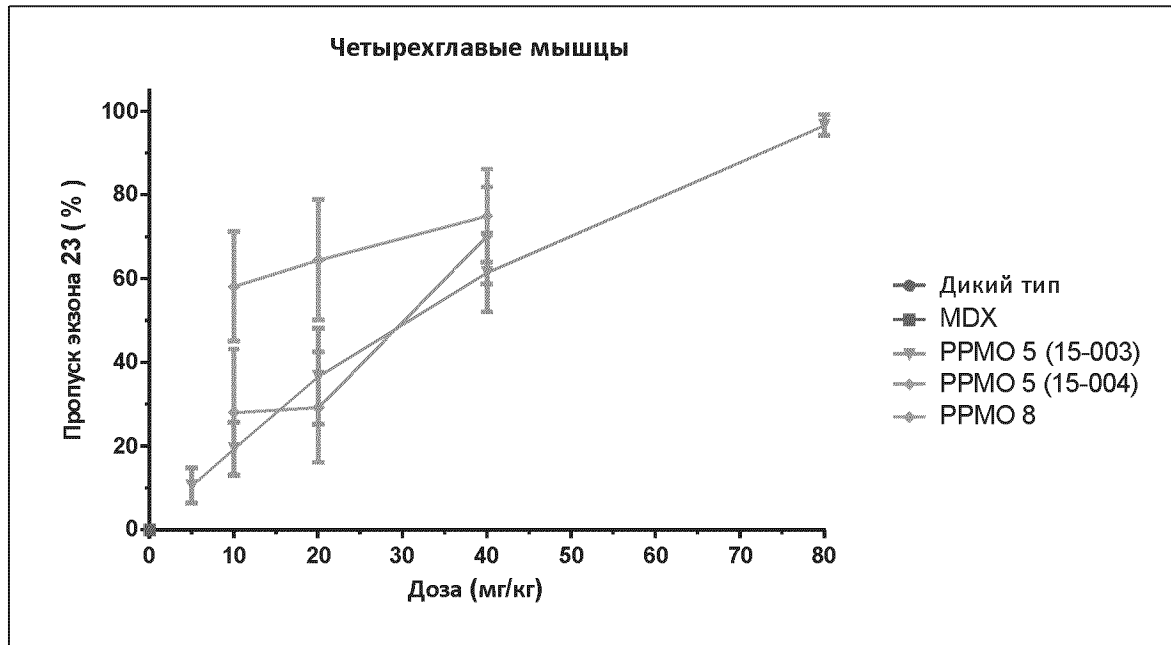
Фигура 5А



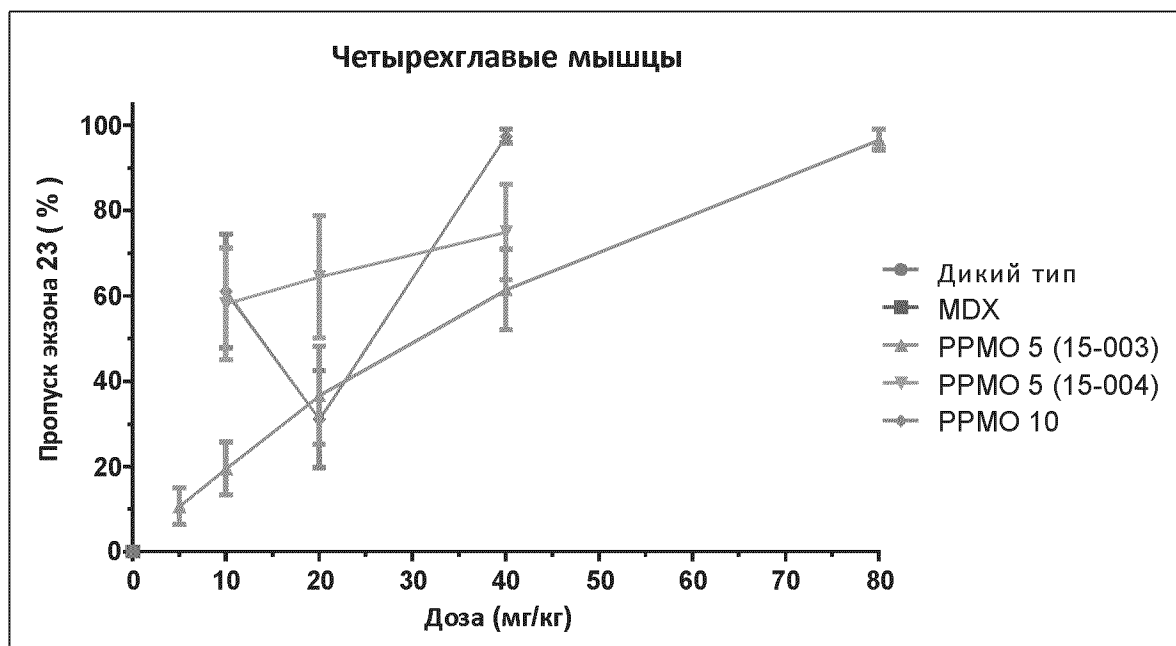
Фигура 5В



Фигура 5С



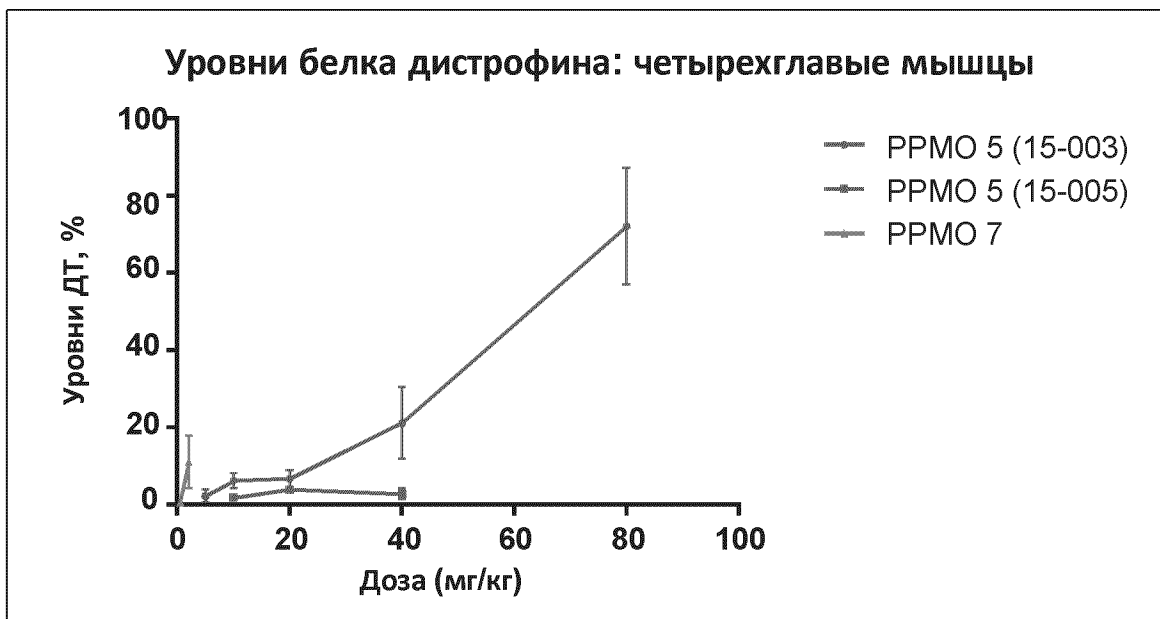
Фигура 5D



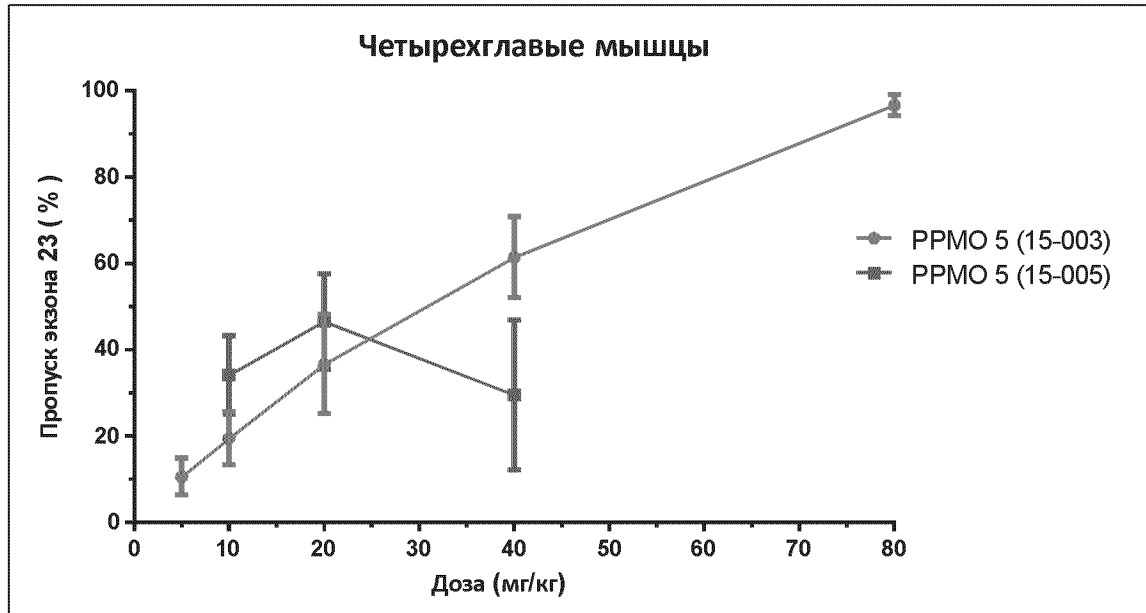
Фигура 6А



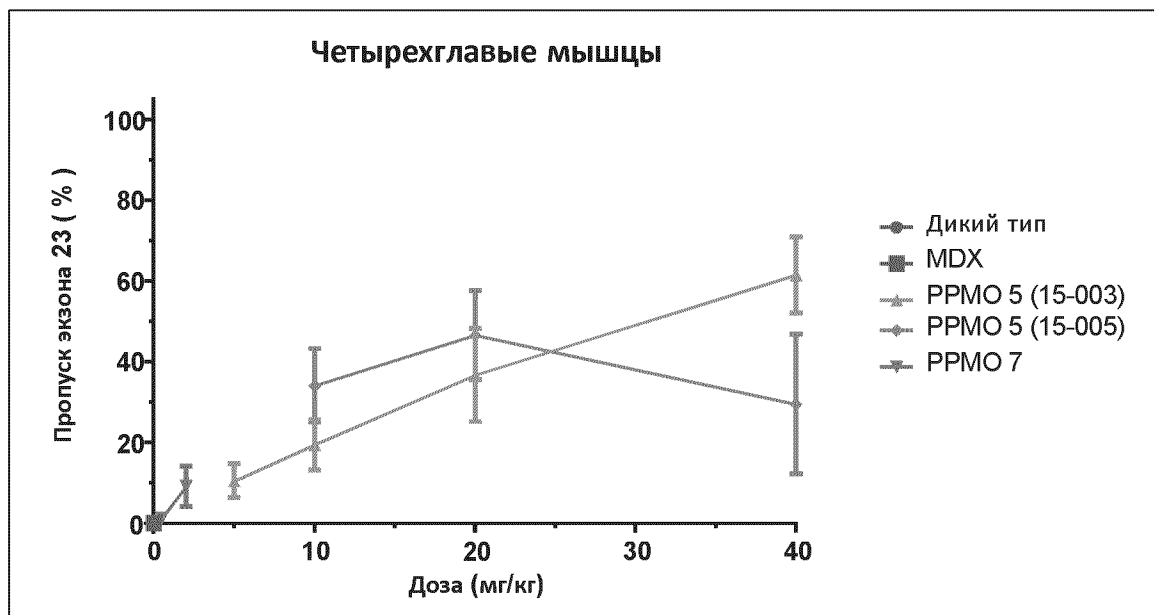
Фигура 6В



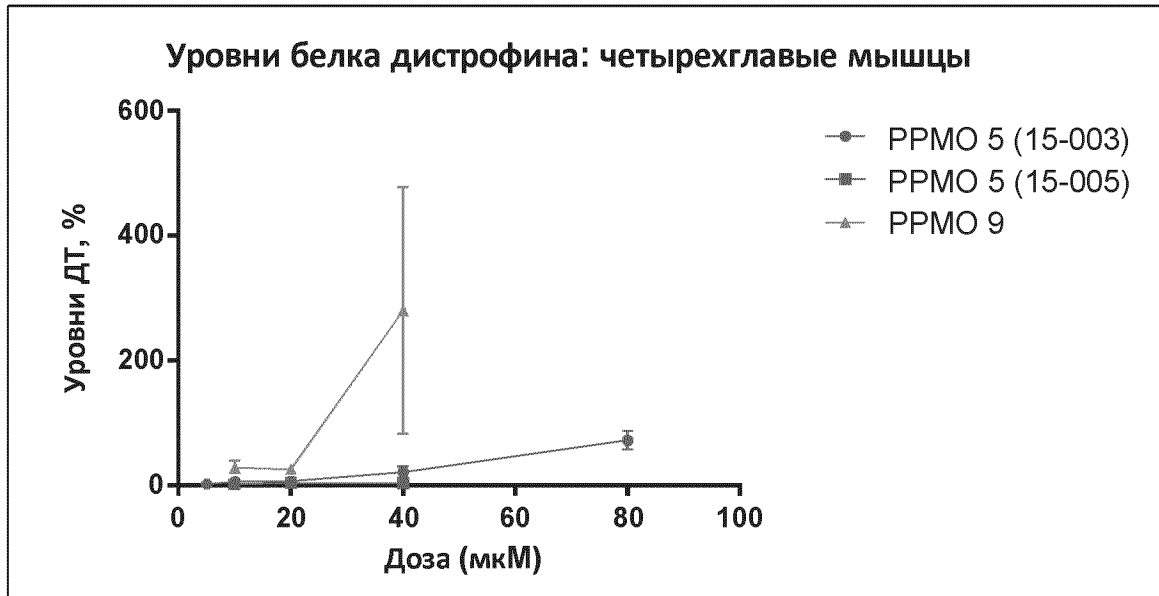
Фигура 6С



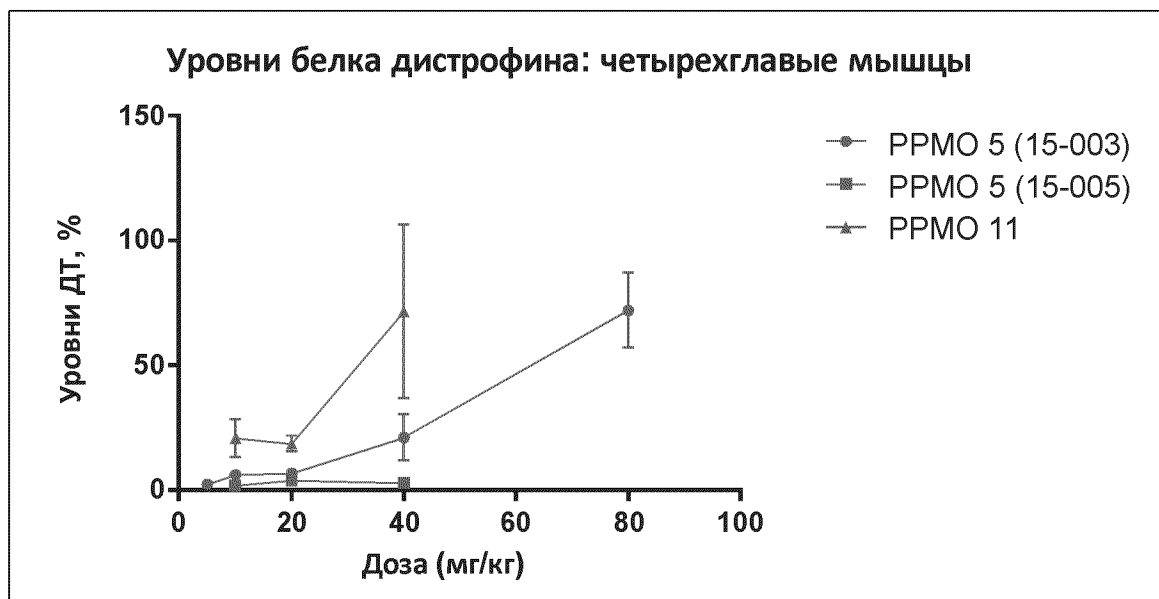
Фигура 6D



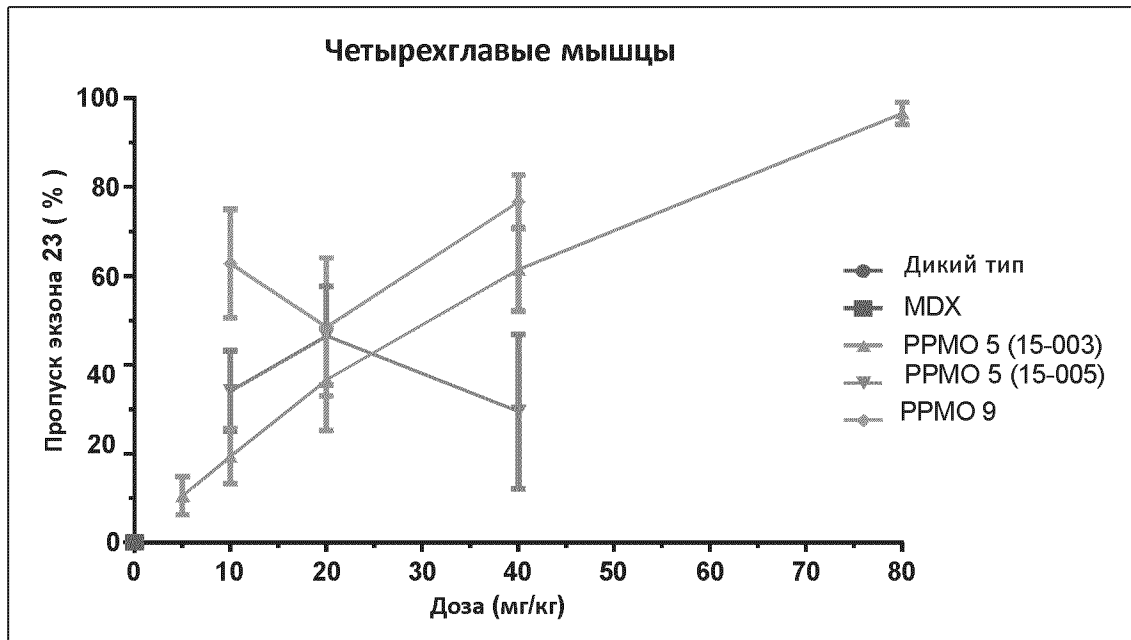
Фигура 7А



Фигура 7В



Фигура 7С



Фигура 7D

