

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043736**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.06.19**

**(21)** Номер заявки  
**201990125**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2014.06.27**

**(51)** Int. Cl. **C12N 15/113** (2010.01)  
**A61K 31/712** (2006.01)  
**A61P 3/06** (2006.01)

---

**(54) АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОМЕРЫ И ИХ КОНЪЮГАТЫ, НАПРАВЛЕННЫЕ НА ПРОПРОТЕИН КОНВЕРТАЗУ СУБТИЛИЗИН/КЕКСИН ТИПА 9 (PCSK9)**

---

**(31)** 13174092.0; 13192930.9; 13192938.2;  
PCT/EP2013/073858; 14153253.1;  
14168331.8

**(32)** 2013.06.27; 2013.11.14; 2013.11.14;  
2013.11.14; 2014.01.30; 2014.05.14

**(33)** EP

**(43)** 2019.09.30

**(62)** 201592215; 2014.06.27

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**РОШ ИННОВЕЙШЕН СЕНТЕР  
КОПЕНГАГЕН А/С (DK)**

**(72)** Изобретатель:  
**Альбек Нанна, Хедтьорн Май (DK),  
Линдхольм Мари (SE), Нильсен  
Нильс Фискер, Петри Андреас, Равн  
Якоб (DK)**

**(74)** Представитель:  
**Хмара М.В., Новоселова С.В.,  
Липатова И.И., Дощечкина В.В.,  
Пантелеев А.С., Осипов К.В. (RU)**

**(56)** WO-A1-2011009697  
WO-A2-2009134487  
WO-A2-2008043753  
WO-A1-2009127680  
WO-A2-2009148605  
WO-A2-2012083046

ERIK A.L. BIESSEN ET AL.: "Targeted delivery of oligodeoxynucleotides to parenchymal liver cells in vivo", *BIOCHEMICAL JOURNAL*, vol. 340, № 3, 15 June 1999 (1999-06-15), p. 783-792, XP055101395, ISSN: 0264-6021, DOI: 10.1042/0264-6021:3400783, the whole document

ZHENG SU-JUN ET AL.: "Distribution and anti-HBV effects of antisense oligodeoxynucleotides conjugated to galactosylated poly-L-lysine", *WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY*, WJG PRESS, CN, [online] vol. 9, № 6, 1 January 2003 (2003-01-01), p. 1251-1255, XP002510287, ISSN: 1007-9327, the whole document

MAIER M.A. ET AL.: "Synthesis of antisense oligonucleotides conjugated to a multivalent carbohydrate cluster for cellular targeting", *BIOCONJUGATE CHEMISTRY*, ACS, WASHINGTON, DC, US, vol. 14, 1 January 2003 (2003-01-01), p. 18-29, XP002510288, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/BC020028V [retrieved on 2002-12-03], the whole document

---

**(57)** Изобретение относится к олигомерным соединениям и их конъюгатам, направленным на мРНК PCSK9 пропротеина конвертазы субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9) в клетке, приводящим к сниженной экспрессии PCSK9. Снижение экспрессии PCSK9 полезно для ряда заболеваний, таких как гиперхолестеринемия и родственные расстройства.

---

**B1**

**043736**

**043736  
B1**

### Область изобретения

Настоящее изобретение относится к олигомерным соединениям и их конъюгатам, направленным на мРНК пропротеина конвертазы субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9) в клетке, приводящим к сниженной экспрессии PCSK9. Снижение экспрессии PCSK9 полезно для ряда заболеваний, таких как гиперхолестеринемия и родственные расстройства.

#### Предшествующий уровень техники

Пропротеин конвертаза субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9) стал известен в качестве терапевтической мишени для снижения холестерина липопротеинов низкой плотности (холестерина ЛПНП). PCSK9 увеличивает распад рецептора ЛПНП, приводящий в результате к высокому содержанию холестерина ЛПНП у индивидов с высокой активностью PCSK9.

В статье Lindholm et al., *Molecular Therapy* (2012), 20, 2, 376-381 описано два антисмысловых нуклеотида запертой нуклеиновой кислоты (ЗНК), направленных на PCSK9, которые обеспечивают пролонгированное снижение холестерина ЛПНП у нечеловекообразных приматов после насыщающей дозы (20 мг/кг) и четырех еженедельных поддерживающих доз (5 мг/кг). Применяемые соединения представляли собой 14-мер SPC5001 (SEQ ID NO: 1) и 13-мер SPC4061. SPC5001 также раскрыт в WO 2011/009697. Эффективность этих ингибиторов PCSK9 связана с их малой длиной (Krieg et al., *Molecular Therapy Nucleic Acids* (2012), 1, e6).

В WO 2007/146511 описаны короткие бициклические (ЗНК) гэтамерные антисмысловые олигонуклеотиды, которые, очевидно, являются более эффективными и менее токсичными, чем соединения большей длины. Оказалось, что иллюстративные соединения имеют длину 14 нуклеотидов (нт).

Согласно статье van Poelgeest et al. (*American Journal of Kidney Disease*, 2013 Oct, 62(4): 796-800) введение антисмыслового олигонуклеотида ЗНК SPC5001 в клинических испытаниях на человеке может привести в результате к острому повреждению почек.

Согласно публикациям EP 1984381B1, Seth et al., *Nucleic Acids Symposium Series*, 2008, № 52, 553-554; и Swayze et al., *Nucleic Acid Research*, 2007, vol 35, p. 687-700 олигонуклеотиды ЗНК вызывают значительную гепатотоксичность у животных. Согласно WO 2007/146511 токсичности олигонуклеотидов ЗНК можно избежать путем использования гэтамеров ЗНК, настолько коротких, как 12-14 нуклеотидов в длину. В EP 1984381 B1 рекомендовано использование 6'-замещенных бициклических нуклеотидов для уменьшения гепатотоксического потенциала олигонуклеотидов ЗНК. Согласно статье Hagedorn et al., *Nucleic Acid Therapeutics*, 2013, гепатотоксический потенциал антисмыслового олигонуклеотида можно предсказать на основании его последовательности и паттерна модификации.

Олигонуклеотидные конъюгаты обширно оценивали на использование в малых интерферирующих РНК (миРНК), где их считали существенными для получения достаточной эффективности *in vivo*. Например, WO 2004/044141 относится к модифицированным олигомерным соединениям, которые модулируют генную экспрессию посредством биохимического пути РНК-интерференции. Олигомерные соединения включают в себя одну или более конъюгатных группировок, которые могут модифицировать или усилить фармакокинетические и фармакодинамические свойства присоединенного олигомерного соединения.

В WO 2012/083046 описана группировка, направляющая фармакокинетический модулятор кластера галактозы, для миРНК.

Напротив, однонитевые антисмысловые олигонуклеотиды обычно вводят терапевтически без конъюгации или включения в препарат. Основными тканями-мишенями для антисмысловых олигонуклеотидов являются печень и почки, хотя широкий ряд других тканей также доступен для антисмыслового метода, включая лимфатический узел, селезенку и костный мозг.

WO 2005/086775 относится к направленной доставке терапевтических средств в конкретные органы с использованием терапевтической химической группировки, отщепляемого линкера и меченого домена. Отщепляемый линкер может представлять собой, например, дисульфидную группу, пептид или олигонуклеотидный домен, расщепляемый ферментом рестрикции.

WO 2011/126937 относится к направленной внутриклеточной доставке олигонуклеотидов посредством конъюгации с низкомолекулярными лигандами.

WO 2009/025669 относится к полимерным (полиэтиленгликолевым) линкерам, содержащим пиридилдисульфидные группировки. См. также Zhao et al., *Bioconjugate Chem.*, 2005, 16, 758-766.

В статье Chaltin et al., *Bioconjugate Chem.*, 2005, 16, 827-836 описаны модифицированные холестерином моно-, ди- и тетрамерные олигонуклеотиды, используемые для включения антисмысловых олигонуклеотидов в катионные липосомы с получением дендримерной системы доставки. Холестерин конъюгирует с олигонуклеотидами посредством лизинового линкера.

Другие нерасщепляемые холестериновые конъюгаты использованы для направления миРНК и антагомиров в печень; см., например, Soutscheck et al., *Nature*, 2004, vol. 432, 173-178; и Krützfeldt et al., *Nature*, 2005, vol. 438, 685-689. Обнаружено, что для частично фосфоротиолированных миРНК и антагомиров применение холестерина в качестве направляющей молекулы печени существенно для активности *in vivo*.

### Объект изобретения

Таким образом, существует необходимость в антисмысловых соединениях, направленных на PCSK9, которые являются такими же эффективными, как SPC5001, но обладают сниженным риском токсичности, в частности сниженной почечной токсичностью.

Согласно настоящему изобретению эта цель достигнута путем идентификации новых последовательностей PCSK9 человека, которые частично эффективны для направления с использованием антисмыслового метода (SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34), а также более длинных вариантов последовательности SPC5001, которые сохраняют значительную эффективность или обладают улучшенной эффективностью по сравнению с SPC5001 без проблем токсичности. Антисмысловые нуклеотиды по изобретению могут быть дополнительно усовершенствованы путем применения конъюгатов, для которых обнаружено, что они значительно усиливают терапевтический индекс антисмысловых олигонуклеотидов ЗНК.

Соединения по настоящему изобретению являются сильными и нетоксичными ингибиторами PCSK9, полезными при лечении гиперхолестеринемии и родственных расстройств.

### Сущность изобретения

Олигомер по изобретению может содержать от 10 до 22, например от 12 до 18 нуклеотидов в длину, которые представляют собой либо

- a) последовательность из 10-16 смежных нуклеотидов, которая комплементарна соответствующей длине SEQ ID NO: 33 или 34 или 45; либо
- b) последовательность из 16 смежных нуклеотидов, которая комплементарна соответствующему отрезку длины SEQ ID NO: 31.

В изобретении предложен конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, содержащий олигомер согласно изобретению и по меньшей мере одну группировку, отличающуюся от нуклеотида или отличающуюся от полинуклеотида, ковалентно присоединенную к олигомеру.

В изобретении также предложен конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, содержащий олигомер (A) согласно изобретению и по меньшей мере одну группировку, отличающуюся от нуклеотида или отличающуюся от полинуклеотида, ковалентно присоединенную к олигомеру (C) необязательно посредством линкерного участка (B и/или Y), расположенного между непрерывной нуклеотидной последовательностью олигомера и конъюгатной группировкой.

В некоторых воплощениях в изобретении также предложен конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, содержащий олигомер из 10-22, например из 12-18 нуклеотидов в длину, где олигомер содержит

- a) последовательность из 10-16 смежных нуклеотидов, которая комплементарна соответствующей длине SEQ ID NO: 33, или 34, или 45; или
- b) последовательность из 16 смежных нуклеотидов, которая комплементарна соответствующему отрезку длины SEQ ID NO: 31.

В изобретении также предложено соединение, выбранное из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24.

В изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая олигомер или конъюгат согласно изобретению и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель, соль или адъювант.

В изобретении предложены олигомер, или конъюгат, или фармацевтическая композиция согласно изобретению, применяемые в качестве лекарственного средства, например, для лечения гиперхолестеринемии или родственного расстройства, такого как расстройство, выбранное из группы, состоящей из атеросклероза, гиперлипидемии, гиперхолестеринемии, семейной гиперхолестеринемии, например приобретения функциональных мутаций в PCSK9, дисбаланса холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП)/липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), дислипидемий, например семейной гиперлипидемии (семейной комбинированной гиперлипидемии (СКГ)) или семейной гиперхолестеринемии (СГХС), приобретенной гиперлипидемии, статин-резистентной гиперхолестеринемии, коронарной артериальной болезни (КАБ) и ишемической болезни сердца (ИБС).

В изобретении предложено применение олигомера или конъюгата или фармацевтической композиции по изобретению для получения лекарственного средства для лечения гиперхолестеринемии или родственного расстройства, такого как расстройство, выбранное из группы, состоящей из атеросклероза, гиперлипидемии, гиперхолестеринемии, семейной гиперхолестеринемии, например приобретения функциональных мутаций в PCSK9, дисбаланса холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП)/липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), дислипидемий, например семейной гиперлипидемии (семейной комбинированной гиперлипидемии (СКГ)) или семейной гиперхолестеринемии (СГХС), приобретенной гиперлипидемии, статин-резистентной гиперхолестеринемии, коронарной артериальной болезни (КАБ) и ишемической болезни сердца (ИБС).

В изобретении предложен способ лечения гиперхолестеринемии или родственного расстройства, такого как расстройство, выбранное из группы, состоящей из атеросклероза, гиперлипидемии, гиперхолестеринемии, семейной гиперхолестеринемии, например приобретения функциональных мутаций в PCSK9, дисбаланса холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП)/липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), дислипидемий, например семейной гиперлипидемии (семейной комбинированной гиперлипидемии (СКГ)) или семейной гиперхолестеринемии (СГХС), приобретенной гиперлипидемии,

статин-резистентной гиперхолестеринемии, коронарной артериальной болезни (КАБ) и ишемической болезни сердца (ИБС), где способ включает введение эффективного количества олигомера или конъюгата или фармацевтической композиции по изобретению пациенту, страдающему или вероятно страдающему гиперхолестеринемией или родственным расстройством.

В изобретении предложен способ ингибирования *in vivo* или *in vitro* PCSK9 в клетке, экспрессирующей PCSK9, где способ включает введение олигомера или конъюгата или фармацевтической композиции согласно изобретению в клетку так, чтобы ингибировать PCSK9 в клетке.

В изобретении также предложен олигомер согласно изобретению, такой как олигомер ЗНК, содержащий участок из 10-22, например из 12-18, например из 13, 14, 15, 16 или 17, смежных нуклеозидов, связанных фосфоротиоатной связью (т.е. участок А, который в характерном случае комплементарен соответствующему участку последовательности-мишени, такой как SEQ ID NO: 46), и дополнительно содержащий от 1 до 6 нуклеозидов ДНК, примыкающих к олигомеру ЗНК, где межнуклеозидные связи между ДНК и/или примыкающим к ДНК нуклеозидом (нуклеозидами) физиологически лабильны, как и фосфодиэфирные связи. Такой олигомер ЗНК может находиться в форме конъюгата, как раскрыто в настоящем документе, или может представлять собой, например, промежуточное соединение для использования на последующей стадии конъюгации. При конъюгации конъюгат может, например, представлять собой или содержать стерин, такой как холестерин или токоферол, либо может представлять собой или содержать (не нуклеотидный) углевод, например конъюгат GalNAc или другой конъюгат, как раскрыто в настоящем документе.

В изобретении также предложен гэммерный олигомер, содержащий по меньшей мере один нуклеотид сЕТ, такой как (S)-сЕТ, из 10-22, например из 12-18, например из 13, 14, 15, 16 или 17, нуклеотидов в длину, который направлен (т.е. имеет последовательность, комплементарную соответствующему участку) на PCSK9 человека.

#### Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлены примеры конъюгатов три-GalNAc, которые можно применять. Конъюгаты 1-4 иллюстрируют 4 подходящие группировки конъюгатов GalNAc, а конъюгаты 1a-4a относятся к тем же конъюгатам с дополнительной линкерной группировкой (Y), которую используют для сшивания конъюгата с олигомером (участком А или с биоотщепляемым линкером, таким как участок В). Волнистая линия представляет собой ковалентную связь с олигомером.

На фиг. 2 - примеры холестериновой и токоферольной конъюгатных группировок. Конъюгаты 5a и 6a относятся к тем же конъюгатам с дополнительной линкерной группировкой (Y), которую используют для сшивания конъюгата с олигомером (участком А или с биоотщепляемым линкером, таким как участок В). Волнистая линия представляет собой ковалентную связь с олигомером.

На фиг. 3 - конкретные соединения ЗНК. Бета-D-окси-ЗНК идентифицированы надстрочным знаком "L" (locked) после буквы, подстрочный знак "s" представляет собой фосфоротиоатную связь, надстрочный знак "Me", предшествующий заглавной букве С, представляет собой 5-метилцитозин-ЗНК, не-ЗНК нуклеотиды представляют собой нуклеотиды ДНК (без надстрочного знака "L").

На фиг. 4 - примеры холестериновых конъюгатов соединений ЗНК. Бета-D-окси-ЗНК идентифицированы надстрочным знаком "L" (locked) после буквы, подстрочный знак "s" представляет собой фосфоротиоатную связь, надстрочный знак "Me", предшествующий заглавной букве С, представляет собой 5-метилцитозин-ЗНК, не-ЗНК нуклеотиды представляют собой нуклеотиды ДНК (без надстрочного знака "L").

На фиг. 5 - примеры конъюгатов GalNAc соединений ЗНК. Конъюгаты по существу соответствуют Conj2a на фигуре, где волнистая линия заменена олигомером ЗНК. Бета-D-окси-ЗНК идентифицированы надстрочным знаком "L" (locked) после буквы, подстрочный знак "s" представляет собой фосфоротиоатную связь, надстрочный знак "Me", предшествующий заглавной букве С, представляет собой 5-метилцитозин-ЗНК, не-ЗНК нуклеотиды представляют собой нуклеотиды ДНК (без надстрочного знака "L").

На фиг. 5A показана подробная структура SEQ ID NO: 18.

На фиг. 5B - подробная структура SEQ ID NO: 19.

На фиг. 6 представлен пример конъюгатной группы FAM.

На фиг. 7 представлены конъюгаты ЗНК-FAM с расщепляемыми фосфодиэфирными связями и без них. Бета-D-окси-ЗНК идентифицированы надстрочным знаком "L" (locked) после буквы, подстрочный знак "s" представляет собой фосфоротиоатную связь, надстрочный знак "Me", предшествующий заглавной букве С, представляет собой 5-метилцитозин-ЗНК, не-ЗНК нуклеотиды представляют собой нуклеотиды ДНК (без надстрочного знака "L").

На фиг. 8 - гэммеры против PCSK9, ранжированные по активности *in vitro*.

На фиг. 9 - выбранные гэммеры против PCSK9, ранжированные по активности *in vitro*.

На фиг. 10 показана активность выбранных соединений против PCSK9 *in vitro* и вычисления IC<sub>50</sub>.

На фиг. 11 - данные ALT *in vivo* для выбранных конъюгатов против PCSK9.

Фиг. 12 является неограничивающей иллюстрацией соединений по изобретению. Межнуклеозидная связь L может представлять собой, например, фосфодиэфирную, фосфоротиоатную, фосфородитиоат-

ную, боранофосфатную или метилфосфатную, например фосфодиэфирную. РО представляет собой фосфодиэфирную связь. Соединение а) имеет участок В с одной ДНК (или РНК), где связь между первым и вторым участком представляет собой РО. Соединение б) имеет два ДНК/РНК (таких как ДНК) нуклеозида, связанных фосфодиэфирной связью. Соединение с) имеет три ДНК/РНК (таких как ДНК) нуклеозида, связанных фосфодиэфирными связями. В некоторых воплощениях изобретения участок В может быть дополнительно удлинен дополнительными фосфодиэфирными ДНК/РНК (такими как нуклеозиды ДНК). Конъюгатная группа (Marked X, иначе в настоящем документе участок С) проиллюстрирована на левой стороне каждого соединения (например, холестерин, GalNAc, Conj1-4, 1a-4a и 5 или 6) и может быть необязательно ковалентно присоединена к концевому нуклеозиду участка В посредством фосфорной нуклеозидной связывающей группы, такой как фосфодиэфирная, фосфоротиоатная, фосфородитиоатная, боранофосфатная или метилфосфатная, или может быть связана посредством альтернативной связи, например тиазольной связи (см. L в соединениях d), e) и f).

Фиг. 13 является неограничивающей иллюстрацией соединений по изобретению, где соединения содержат необязательный линкер (Y) между третьим (конъюгатным) участком (X) и вторым участком (участком В). Номенклатура такая же, как на фиг. 12. Подходящие линкеры раскрыты в настоящем документе и включают, например, алкильные линкеры, например С6 линкеры. В соединениях а), б) и с) линкер между X и участком В присоединен к участку В посредством фосфорной нуклеозидной связывающей группы, такой как фосфодиэфирная, фосфоротиоатная, фосфородитиоатная, боранофосфатная или метилфосфатная, или может быть связана посредством альтернативной связи, например тиазольной связи (Li). В этих соединениях Li представляет собой межнуклеозидную связь между первым (А) и вторым участками (В). Соединения d), e) и f) дополнительно содержат линкер (Y) между участком В и конъюгатной группой, и участок Y может быть связан с участком В посредством, например, фосфорной нуклеозидной связывающей группы, такой как фосфодиэфир, фосфоротиоат, фосфородитиоат, боранофосфат или метилфосфат, или в некоторых воплощениях тиазольной связи. В дополнение или альтернативно X может представлять собой активирующую группу или реакционную группу. X может быть ковалентно присоединен к участку В посредством фосфорной нуклеозидной связывающей группы, такой как фосфодиэфир, фосфоротиоат, фосфородитиоат, боранофосфат или метилфосфат, или может быть связана посредством альтернативной связи, например тиазольной связи.

На фиг. 14 показан сайленсинг мРНК PCSK9 конъюгатами с холестерином *in vivo*. Мышам инъекцировали однократную дозу 10 мг/кг неконъюгированного антисмыслового олигонуклеотида ЗНК (#40) или эквимоларные количества антисмысловых олигонуклеотидов ЗНК, конъюгированных с холестерином с различными линкерами, и умерщвляли на сутки 1, 3, 7 и 10 после дозирования. РНК выделяли из печени и почек и подвергали PCSK9-специфичной количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-qПЦР) А. Количественное определение мРНК PCSK9 из образцов печени нормализовано по ВАСТ и показано в виде процента среднего значения эквивалентных контролей с физиологическим раствором В. Количественное определение мРНК PCSK9 из образцов почек нормализовано по ВАСТ и показано в виде процента среднего значения эквивалентных контролей с физиологическим раствором.

На фиг. 15 показана экспрессия Kim-1 из исследования безопасности на крысах (см. пример 5).

На фиг. 16 - PCSK9 в сыворотке и холестерин ЛПНП в образцах от яванских макаков, инъектированных четыре раза (одна инъекция/неделя) 0,5 или 1,5 мг/кг/неделя SEQ ID 2 и 18.

На фиг. 17 - PCSK9 в сыворотке и холестерин ЛПНП в образцах от яванских макаков, инъектированных четыре раза (одна инъекция/неделя) 0,5 или 1,5 мг/кг/неделя SEQ ID 3 и 19.

#### **Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения**

Далее раскрыты различные элементы изобретения под отдельными заголовками. Понятно, что для получения соединения по изобретению воплощение изобретения из одного элемента можно комбинировать с воплощениями изобретения из других элементов (например, как проиллюстрировано на фиг. 12 и 13).

Олигомер (участок А).

Термин "олигомер" или "олигонуклеотид" в контексте настоящего изобретения относится к молекуле, образованной посредством ковалентной связи двух или более нуклеотидов (т.е. к олигонуклеотиду). В настоящем документе отдельный нуклеотид (звено) может быть также обозначен как мономер или звено. В некоторых воплощениях изобретения термины "нуклеозид", "нуклеотид", "звено" и "мономер" используют взаимозаменяемо. Понятно, что при ссылке последовательность из нуклеотидов или мономеров, на которую ссылаются, представляет собой последовательность из оснований, таких как А, Т, G, С или U.

Олигомер по изобретению может содержать от 10 до 22, например от 12 до 22 нуклеотидов, например от 12 до 18 нуклеотидов в длину. Олигомер содержит либо

а) последовательность из 10-16 смежных нуклеотидов, комплементарную соответствующему отрезку длины SEQ ID NO: 33 или 34 или 45; либо

б) последовательность из 16 смежных нуклеотидов, комплементарную соответствующему отрезку длины SEQ ID NO: 31.

В некоторых воплощениях изобретения олигомер по изобретению содержит непрерывную нуклео-

тидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29 и 44.

Соединение (например, олигомер или конъюгат) по изобретению направлено на PCSK9 и само по себе способно к понижающей регуляции экспрессии или к ингибированию PCSK9, такого как PCSK9 у человека или в клетке, экспрессирующей PCSK9.

В некоторых воплощениях изобретения межнуклеозидные связи последовательности из 10-16 смежных нуклеотидов, комплементарной соответствующему отрезку длины SEQ ID NO: 33, или 34, или 45, могут представлять собой фосфоротиоатные связи.

В некоторых воплощениях изобретения олигомер по изобретению содержит последовательность или состоит из непрерывной нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 40. В одном воплощении изобретения олигомер содержит последовательность или состоит из последовательности, выбранной из

- a) SEQ ID NO: 2 или 3; либо
- b) SEQ ID NO: 4, 5 или 6; либо
- c) SEQ ID NO: 7 или 8; либо
- d) SEQ ID NO: 40.

В некоторых воплощениях изобретения олигомер содержит 10-16 нуклеозидов, связанных фосфотиоатной связью.

В некоторых воплощениях изобретения олигомер по изобретению содержит последовательность из по меньшей мере 10-16 смежных нуклеотидов, комплементарную соответствующему отрезку длины SEQ ID NO: 33, или 34, или 45, либо последовательность из 16 смежных нуклеотидов, комплементарную соответствующему отрезку длины SEQ ID NO: 31, где непрерывная нуклеотидная последовательность содержит аналоги нуклеотидов. Предпочтительно аналоги нуклеотидов представляют собой усиливающие средство аналоги нуклеотидов.

В некоторых воплощениях изобретения аналоги нуклеотидов представляют собой нуклеотиды с модифицированным сахаром, такие как нуклеотиды с модифицированным сахаром, независимо или зависимо выбранные из группы, состоящей из звеньев запертой нуклеиновой кислоты (ЗНК), звеньев 2'-О-алкил-РНК, звеньев 2'-ОМе-РНК, звеньев 2'-амино-ДНК и звеньев 2'-фтор-ДНК.

В некоторых воплощениях изобретения аналоги нуклеотидов содержат или представляют собой звенья запертой нуклеиновой кислоты (ЗНК).

В некоторых воплощениях изобретения олигомер по изобретению содержит или представляет собой гэпмер, такой как гэпмерный олигонуклеотид ЗНК.

В некоторых воплощениях изобретения гэпмер содержит на каждой стороне (5' и 3') сегмент-крыло из аналогов нуклеотидов в количестве от 2 до 4, предпочтительно аналогов ЗНК.

В некоторых воплощениях изобретения олигомер по изобретению содержит последовательность из 13, 14, 15 или 16 смежных нуклеотидов, комплементарную соответствующему отрезку длины SEQ ID NO: 33, или 34, или 45, либо последовательность из 16 смежных нуклеотидов, комплементарную соответствующему отрезку длины SEQ ID NO: 31, и может необязательно содержать дополнительные 1-6 нуклеотидов, которые могут образовывать или содержать биорасщепляемый участок из нуклеотидов, такой как нуклеотидфосфатный линкер. Целесообразно этот биорасщепляемый участок из нуклеотидов образован коротким фрагментом (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6) из нуклеотидов, являющимся физиологически лабильным. Это может быть достигнуто путем использования фосфодиэфирных связей с ДНК/РНК нуклеозидами, либо, если его физиологическая лабильность может сохраняться, можно использовать другой нуклеозид. Физиологическую лабильность можно измерить, используя экстракт печени, как проиллюстрировано в примере 6.

Олигомер по изобретению может, таким образом, состоять из последовательности из 10-16 смежных нуклеотидов (нт) в длину, комплементарной соответствующему отрезку длины SEQ ID NO: 33, или 34, или 45, либо из последовательности из 16 смежных нуклеотидов, комплементарной соответствующему отрезку длины SEQ ID NO: 31 (первый участок или участок А). Олигомер по изобретению может содержать дополнительный участок из нуклеотидов. В некоторых воплощениях изобретения дополнительный участок из нуклеотидов содержит биорасщепляемый участок из нуклеотидов, такой как последовательность нуклеотидфосфатов (второй участок, участок В), который может ковалентно связывать участок А с нуклеотидной группировкой, такой как конъюгатная группа (третий участок или участок С). В некоторых воплощениях изобретения непрерывная нуклеотидная последовательность олигомера по изобретению (участок А) ковалентно связан непосредственно с участком С. В некоторых воплощениях изобретения участок С является биорасщепляемым.

Олигомер состоит из последовательности или содержит последовательность смежных нуклеотидов из 12-22, например из 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 нуклеотидов в длину, например из 14-16 нуклеотидов в длину, например из 15 или 16 нуклеотидов в длину. Олигомер может, таким образом, относиться к объединенной длине участка А и участка В, например участка А (10-16 нт) и участка В (1-6 нт).

В различных воплощениях изобретения соединение по изобретению не содержит РНК (звеньев). В некоторых воплощениях изобретения соединение согласно изобретению первый участок или первый и второй участки вместе (например, в виде единой непрерывной нуклеотидной последовательности) пред-

ставляют собой линейную молекулу или синтезируются в виде линейной молекулы. Олигомер может, таким образом, представлять собой одноцепочечную молекулу. В некоторых воплощениях изобретения олигомер не содержит короткие участки из, например, по меньшей мере 3, 4 или 5 смежных нуклеотидов, которые комплементарны эквивалентным участкам в пределах того же олигомера (т.е. дуплексов). Олигомер в некоторых воплощениях изобретения может быть не (по существу) двухцепочечным. В некоторых воплощениях изобретения олигомер по существу является не двухцепочечным, например представляет собой не мРНК.

Последовательности олигомера.

В приведенной ниже таблице приведены олигомеры и конъюгаты олигомеров по изобретению и последовательностей-мишеней PCSK9 по изобретению.

Таблица 1

SEQ ID	Последовательность	PO	Chol-C6	GalNAc	Положение на гене PCSK9 SEQ ID NO 44
1	TGCTacaaaacCCA				3643-3656
2	AATgctacaaaCCCA				3643-3658
3	AATgctacaaaacCCA				3643-3658
4	GctgtgtgagcttGG				3251-3265
5	TGctgtgtgagctTGG				3251-3266
6	TGCTgtgtgagctTGG				3251-3266
7	TCCtggctctgtgtTCC				3373-3388
8	TCCtggctctgtgttCC				3373-3388
9	TGCTacaaaacCCA	да	да		3643-3656
10	AATgctacaaaCCCA	да	да		3643-3658
11	AATgctacaaaacCCA	да	да		3643-3658
12	GctgtgtgagcttGG	да	да		3251-3265
13	TGctgtgtgagctTGG	да	да		3251-3266
14	TGCTgtgtgagctTGG	да	да		3251-3266
15	TCCtggctctgtgtTCC	да	да		3373-3388
16	TCCtggctctgtgttCC	да	да		3373-3388
17	TGCTacaaaacCCA			да	3643-3656
18	AATgctacaaaCCCA			да	3643-3658
19	AATgctacaaaacCCA			да	3643-3658
20	GctgtgtgagcttGG			да	3251-3265
21	TGctgtgtgagctTGG			да	3251-3266
22	TGCTgtgtgagctTGG			да	3251-3266
23	TCCtggctctgtgtTCC			да	3373-3388
24	TCCtggctctgtgttCC			да	3373-3388
40	GTctgtggaagCG				1005-1017
41	GTctgtggaagCG		да		1005-1017
42	GTctgtggaagCG	да	да		1005-1017

43	GТctgtggaagCG	да	да	1005-1017
25	tgctacaaaaccca			3643-3656
26	aatgctacaaaaccca			3643-3658
27	gctgtgtgagcttgg			3251-3265
28	tgctgtgtgagcttgg			3251-3266
29	tctgtgtgtgttcc			3373-3388
44	gtctgtggaagcg			1005-1017
30	UGGGUUUUGUAGCA			3643-3656
31	UGGGUUUUGUAGCAUU			3643-3658
32	CCAAGCUCACACAGC			3251-3265
33	CCAAGCUCACACAGCA			3251-3266
34	GGAACACAGACCAGGA			3373-3388
45	CGCUUCCACAGAC			1005-1017

SEQ ID NO: 25-29 и 44 представляют собой мотивы последовательностей нуклеотидных оснований.

SEQ ID NO: 30-34 и 45 представляют собой последовательности-мишени РНК, присутствующие в мРНК PCSK9 человека.

SEQ ID NO: 1 представляет собой SPC5001.

SEQ ID NO: 1-24 и 40-43 представляют собой олигомеры, содержащие аналоги нуклеотидов, такие как гэнмерные олигомеры ЗНК, где строчные буквы представляют собой звенья ДНК (нуклеозид/нуклеотид), где прописные буквы представляют собой звенья ЗНК.

В некоторых воплощениях изобретения все ЗНК С представляют собой 5-метилцитозин. В некоторых воплощениях изобретения все звенья ЗНК представляют собой бета-D-окси-ЗНК. В некоторых воплощениях изобретения все межнуклеозидные связи между нуклеозидами SEQ ID NO: 1-24 и 40-43 представляют собой фосфоротиоатные связи.

SEQ ID NO: 9-16 и 41-43 содержат олигомер (как указано SEQ ID), а также холестеринный конъюгат, который может быть ковалентно связан с олигомером на 5'- или 3'-конце олигомера, необязательно посредством биорасщепляемого линкера, такого как нуклеозидфосфатный линкер. В некоторых воплощениях изобретения холестеринный конъюгат связан с 5'-концом олигомера.

SEQ ID NO: 17-24 содержат олигомер (как указано SEQ ID), а также конъюгат GalNAc, который может быть ковалентно связан с олигомером на 5'- или 3'-конце олигомера, необязательно посредством биорасщепляемого линкера, такого как нуклеозидфосфатный линкер или расщепляемый пептидный линкер. В некоторых воплощениях изобретения конъюгат GalNAc связан на 5'-конце олигомера.

Конкретные олигомеры и конъюгаты, используемые в настоящем документе, проиллюстрированы на фиг. 3 (олигомеры), фиг. 4 (холестериновые конъюгаты), фиг. 5 (конъюгаты GalNAc). Другие примеры конъюгатов, которые можно использовать с олигомером по изобретению, проиллюстрированы на фиг. 1 и 2 и описаны в разделе "Конъюгатные группировки GalNAc".

В табл. 2 приведены конкретные комбинации олигомера и конъюгатов.

Таблица 2

Комбинации олигомер/конъюгат

SEQ ID	Номер конъюгата (см. Фиг. 1)							
	Conj1	Conj2	Conj3	Conj4	Conj1a	Conj2a	Conj3a	Conj4a
2	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
3	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18
4	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19
5	C30	C31	C32	C33	C34	C35	C36	C37
6	C40	C41	C42	C43	C44	C45	C46	C47
7	C50	C51	C52	C53	C54	C55	C56	C57
8	C60	C61	C62	C63	C64	C65	C66	C67

SEQ ID	Номер конъюгата (см. Фиг. 2)			
	Conj5	Conj6	Conj5a	Conj6a
2	C9	C10	C70	C71
3	C19	C20	C72	C73
4	C20	C21	C74	C75
5	C38	C39	C76	C77
6	C48	C49	C78	C79
7	C58	C59	C80	C81
8	C68	C69	C82	C83

Все эти комбинации можно визуализировать путем замещения волнистой линии на фиг. 1 или 2 последовательностью олигомера. На фиг. 5 показана комбинация Conj2a с указанными выше номерами SEQ ID. Фиг. 5A и 5B представляют собой два подробных примера соединений на фиг. 5. Следует отметить, что биорасщепляемый линкер (B) может присутствовать или не присутствовать между конъюгатной группировкой (C) и олигомером (A). Для Conj1-4 и 1a-4a сам конъюгат GalNAc является биорасщепляемым, применение пептидного линкера в кластере GalNAc и как такового биорасщепляемого линкера (B) можно использовать или не использовать. Тем не менее предварительные данные указывают на то, что включение биорасщепляемого линкера (B), такого как нуклеотидфосфатные линкеры, раскрытые в настоящем документе, может усилить активность таких олигомерных конъюгатов с кластером GalNAc. На фиг. 4 показана комбинация Conj5a с указанными выше номерами SEQ ID с биорасщепляемым линкером (B), состоящим из двух мономеров ДНК С и А, связанных фосфодиэфирной связью. Поскольку при применении с Conj 5 и Conj 6 использование биорасщепляемого линкера значительно усиливает активность соединения, рекомендовано включение биорасщепляемого линкера (B), такого как нуклеотидфосфатные линкеры, раскрытые в настоящем документе.

Термины "соответствующий" и "соответствует" относятся к сравнению между нуклеотидной последовательностью олигомера (т.е. последовательностью нуклеотидных оснований или оснований) или непрерывной нуклеотидной последовательностью (первым участком/участком А) и обратным комплементом нуклеиновой кислоты-мишени или его подучастком (например, SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34 или 45). Аналоги нуклеотидов сравнивают непосредственно с их эквивалентом или соответствующими нуклеотидами. В предпочтительном воплощении изобретения олигомеры (или их первый участок) комплементарны, например, полностью комплементарны участку-мишени или его подучастку (например, SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34 или 45).

Термины "обратный комплемент", "обратно комплементарный" и "обратная комплементарность" при использовании в настоящем документе являются взаимозаменяемыми с терминами "комплемент", "комплементарный" и "комплементарность".

Термин "комплементарный" означает, что две последовательности комплементарны в том случае, когда последовательность одной может связываться с последовательностью другой во встречном-параллельном направлении, причем 3'-конец каждой последовательности связывается с 5'-концом другой последовательности, а затем каждый А, Т(У), G и С одной последовательности выравниваются с Т(У), А, С и G другой последовательности соответственно. Обычно комплементарная последовательность олигонуклеотида обладает по меньшей мере 90%, предпочтительно 95%, более предпочтительно 100% комплементарностью определенной последовательности.

Под термином "соответствующий аналог нуклеотида" и "соответствующий нуклеотид" подразумевают указание на то, что нуклеотид в аналоге нуклеотида и встречающийся в природе нуклеотид идентичны. Например, когда 2-дезоксирибозное звено нуклеотида связано с аденином, "соответствующий аналог нуклеотида" содержит пентозное звено (отличающееся от 2-дезоксирибозы) связано с аденином.

Термин "нуклеотидное основание" относится к группировке нуклеотида, представляющей собой основание, и охватывает как встречающиеся в природе, так и не встречающиеся в природе варианты. Таким образом, "нуклеотидное основание" охватывает не только известные пуриновые и пиримидиновые гетероциклы, но также их гетероциклические аналоги и таутомеры. Понятно, что ДНК- или РНК-нуклеозиды участка В могут иметь встречающееся в природе и/или не встречающееся в природе нуклеотидное основание (основания).

Примеры нуклеотидных оснований включают без ограничений аленин, гуанин, цитозин, тимидин, урацил, ксантин, гипоксантин, 5-метилцитозин, изоцитозин, псевдоизоцитозин, 5-бромурацил, 5-пропинилурацил, 6-аминопурин, 2-аминопурин, инозин, диаминопурин и 2-хлор-6-аминопурин. В некоторых воплощениях изобретения нуклеотидные основания могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из аденина, гуанина, цитозина, тимидина, урацила, 5-метилцитозина. В некоторых воплощениях изобретения нуклеотидные основания могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из

аденина, гуанина, цитозина, тимидина и 5-метилцитозина.

В некоторых воплощениях изобретения по меньшей мере одно из нуклеотидных оснований, присутствующих в олигомере, представляет собой модифицированное нуклеотидное основание, выбранное из группы, состоящей из 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоизоцитозина, 5-бром урацила, 5-пропини урацила, 6-аминопурина, 2-аминопурина, инозина, диаминопурина и 2-хлор-6-аминопурина.

Мишень.

Целесообразно олигомер по изобретению способен к модулированию экспрессии гена PCSK9. Предпочтительно олигомер способен к понижающей регуляции экспрессии гена PCSK9. В этом отношении олигомер по изобретению может влиять на экспрессию PCSK9, в характерном случае в клетки млекопитающего, такой как клетка человека, например клетка печени. В некоторых воплощениях изобретения олигомеры по изобретению связываются с нуклеиновой кислотой-мишенью и их действие на экспрессию представляет собой ее снижение по меньшей мере на 10 или 20% по сравнению с нормальным уровнем экспрессии (например, с уровнем экспрессии клетки животного или человека, обработанного физиологическим раствором), более предпочтительно по меньшей мере 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 95% ингибирование по сравнению с нормальным уровнем экспрессии. В некоторых воплощениях изобретения такое модулирование наблюдают при использовании приблизительно от 0,04 до 25 нМ, например от 0,8 до 20 нМ, концентрации соединения по изобретению. В некоторых воплощениях изобретения такое модулирование наблюдают при использовании от 0,01 до 15 мг/кг, например от 0,05 до 10 мг/кг, например от 0,1 до 7,5 мг/кг, например от 0,25 до 5 мг/кг, например, концентрации 0,5 и 2,5 мг/кг соединения по изобретению. В том же или в другом воплощении изобретения ингибирование экспрессии составляет менее 100%, как, например, менее 98% ингибирование, менее 95% ингибирование, менее 90% ингибирование, менее 80% ингибирование, например менее 70% ингибирование. Модулирование уровня экспрессии можно определить путем измерения уровней белка, например, способами, такими как электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДСН-ПААГ) с последующим Вестерн-блоттингом с использованием подходящих антител, индуцированных против белка-мишени. Альтернативно модулирование уровней экспрессии можно определить путем измерения уровней мРНК, например, с помощью Нозерн-блоттинга или количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). При измерении с помощью уровней мРНК уровень понижающей регуляции при использовании надлежащей дозировки, например, концентрации от 0,04 до 25 нМ, например от 0,8 до 20 нМ, в некоторых воплощениях изобретения в характерном случае составляет уровень до 10-20% от нормальных уровней в отсутствие соединения по изобретению.

Таким образом, в изобретении предложен способ понижающей регуляции или ингибирования экспрессии белка и/или мРНК PCSK9 в клетке, экспрессирующей белок и/или мРНК PCSK9, где упомянутый способ включает введение в клетку олигомера или конъюгата согласно изобретению для понижающей регуляции или ингибирования экспрессии белка и/или мРНК PCSK9 в клетке. Целесообразно клетка представляет собой клетку млекопитающего, такую как клетка человека. Введение в некоторых воплощениях изобретения можно осуществлять *in vitro*. Введение в некоторых воплощениях изобретения можно осуществлять *in vivo*.

Термин "нуклеиновая кислота-мишень" при использовании в настоящем документе относится к ДНК или РНК, кодирующей полипептид PCSK9 млекопитающего, такой как PCSK9 человека, такой как номер доступа Национального центра биотехнологической информации (NCBI; National Center for Biotechnology Information) NM\_174936 SEQ ID NO: 46. Нуклеиновые кислоты, кодирующие PCSK9 или его встречающиеся в природе варианты, и образованные из них РНК-нуклеиновые кислоты, предпочтительно мРНК, такую как пре-мРНК, хотя предпочтительно зрелую мРНК. В некоторых воплощениях изобретения, например, при использовании в исследовании или диагностике, "нуклеиновая кислота-мишень" может представлять собой кДНК или синтетический олигонуклеотид, образованный из вышеупомянутых ДНК- или РНК-нуклеиновых кислот-мишеней. Олигомер согласно изобретению предпочтительно способен к гибридизации с нуклеиновой кислотой-мишенью. Должно быть понятно, что SEQ ID NO: 46 представляет собой последовательность кДНК и как таковая соответствует последовательности зрелой мРНК-мишени, хотя урацил в последовательностях кДНК заменен тимидином.

Термин "его встречающийся в природе вариант" относится к вариантам полипептидной или нуклеиново-кислотной последовательности PCSK9, существующей в природе в пределах определенной таксономической группы, такой как млекопитающее, например, мышь, обезьяна и предпочтительно человек. В характерном случае при ссылке на "встречающиеся в природе варианты" полинуклеотида термин может также охватывать любой аллельный вариант геномной ДНК, кодирующей PCSK9, которая находится на хромосоме 4 в локусе 4 C7, в результате хромосомной транслокации или дупликации, и образованную от него РНК, такую как мРНК. "Встречающиеся в природе варианты" могут также включать варианты, образованные в результате альтернативного сплайсинга мРНК PCSK9. При ссылке на конкретную полипептидную последовательность термин, например, также включает встречающиеся в природе формы белка, которые могут, таким образом, претерпевать процессинг, например, посредством ко- или посттрансляционных модификаций, таких как отщепление сигнального пептида, протеолитическое расщепление, гликозилирование и т.д.

В некоторых воплощениях изобретения олигомер (или его участок из смежных нуклеотидов) выбран из одной из последовательностей или содержит одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28, или 29, или 44 или ее подпоследовательность из по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов, где олигомер (или его участок из смежных нуклеотидов) может необязательно содержать одно, два или три ошибочных спаривания по сравнению с последовательностью.

В некоторых воплощениях изобретения последовательность-мишень выбрана из последовательностей, либо содержит последовательности или состоит из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34 или 45, или подпоследовательности из по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов SEQ ID NO: 33, 34 или 45.

В некоторых воплощениях изобретения подпоследовательность может состоять из 11, 12, 13, 14, 15 или 16 смежных нуклеотидов, например из от 12 до 16 нуклеотидов. Целесообразно в некоторых воплощениях изобретения подпоследовательность имеет такую же длину, как непрерывная нуклеотидная последовательность олигомера по изобретению (необязательно за исключением участка В, когда участок В не комплементарен мишени).

Тем не менее признано, что в некоторых воплощениях изобретения нуклеотидная последовательность олигомера может содержать дополнительные 5' или 3' нуклеотиды, например независимо 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дополнительных нуклеотидов на 5'- и/или 3'-конце, которые не комплементарны последовательности-мишени, и такие некомплементарные олигонуклеотиды могут формировать участок В. В этом отношении олигомер по изобретению в некоторых воплощениях изобретения может содержать непрерывную нуклеотидную последовательность, фланкированную на 5'- и/или 3'-конце дополнительными нуклеотидами. В некоторых воплощениях изобретения дополнительные 5' или 3' нуклеотиды представляют собой встречающиеся в природе нуклеотиды, такие как ДНК или РНК. В некоторых воплощениях изобретения дополнительные 5' или 3' нуклеотиды могут представлять собой участок D, на который ссылаются в контексте гэммерных олигомеров в настоящем документе.

В некоторых воплощениях изобретения олигомер согласно изобретению состоит из нуклеотидной последовательности или содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 27 или ее подпоследовательность из по меньшей мере 10 или 12 нуклеотидных оснований.

В некоторых воплощениях изобретения олигомер согласно изобретению состоит из нуклеотидной последовательности или содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 28 или ее подпоследовательность из по меньшей мере 10 или 12 нуклеотидных оснований. В предпочтительном воплощении изобретения олигомер согласно изобретению состоит из нуклеотидной последовательности или содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 5 или 6. В другом предпочтительном воплощении изобретения конъюгат олигомера согласно изобретению состоит из нуклеотидной последовательности или содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 13, или 14, или 21, или 22.

В некоторых воплощениях изобретения олигомер согласно изобретению состоит из нуклеотидной последовательности или содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 29 или ее подпоследовательность из по меньшей мере 10 или 12 нуклеотидных оснований. В предпочтительном воплощении олигомер согласно изобретению состоит из нуклеотидной последовательности или содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 7 или 8. В другом предпочтительном воплощении изобретения конъюгат олигомера согласно изобретению состоит из нуклеотидной последовательности или содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 15, или 16, или 23, или 24.

В некоторых воплощениях изобретения олигомер согласно изобретению состоит из нуклеотидной последовательности или содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 44 или ее подпоследовательность из по меньшей мере 10 или 12 нуклеотидных оснований. В предпочтительном воплощении изобретения олигомер согласно изобретению состоит из нуклеотидной последовательности или содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 40. В другом предпочтительном воплощении изобретения конъюгат олигомера согласно изобретению состоит из нуклеотидной последовательности или содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 41, 42 или 43.

В некоторых воплощениях изобретения олигомер согласно изобретению состоит из нуклеотидной последовательности или содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 26. В предпочтительном воплощении изобретения олигомер согласно изобретению состоит из нуклеотидной последовательности или содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 2 или 3. В другом предпочтительном воплощении изобретения конъюгат олигомера согласно изобретению состоит из нуклеотидной последовательности или содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 10, или 11, или 18, или 19.

Длина.

Олигомеры могут содержать последовательность или состоять из непрерывной нуклеотидной последовательности суммарной длины 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 смежных нуклеотидов. Отрезки длины могут включать, например, участок А или участки А и В.

В некоторых воплощениях изобретения олигомеры содержат или состоят из непрерывной нуклеотидной последовательности суммарной длины 10-22, например 12-18, например 13-17 или 12-16, например 13, 14, 15, 16, смежных нуклеотидов. Предпочтительно олигомер участка А содержит или состоит из непрерывной нуклеотидной последовательности из 14 смежных нуклеотидов в длину, более предпочтительно из 15 смежных нуклеотидов в длину и наиболее предпочтительно из 16 смежных нуклеотидов в длину.

В некоторых воплощениях изобретения олигомер согласно изобретению состоит из не более 22 нуклеотидов, например не более 20 нуклеотидов, например не более 18 нуклеотидов, например 15, 16 или 17 нуклеотидов. В некоторых воплощениях изобретения олигомер по изобретению содержит менее 20 нуклеотидов.

Аналоги нуклеотидов.

Термин "нуклеотид" при использовании в настоящем документе относится к гликозиду, содержащему сахарную группировку, группировку основания и ковалентно связанную группу, такую как фосфатная или фосфоротиоатная межнуклеотидная связывающая группа, и охватывает как встречающиеся в природе нуклеотиды, такие как ДНК или РНК, так и не встречающиеся в природе нуклеотиды, содержащие модифицированные сахарные группировки и/или группировки оснований, которые также называют в настоящем документе "аналогами нуклеотидов". В настоящем документе отдельный нуклеотид (звено) может также называться мономером или нуклеиново-кислотным звеном.

В области биохимии термин "нуклеозид" широко используют как относящийся к гликозиду, содержащему сахарную группировку и группировку основания. Ковалентная связь между двумя нуклеозидами может называться межнуклеозидной связью. Альтернативно термин межнуклеозидная связь может использоваться для характеристики связи между нуклеотидами олигомера.

Как должно быть понятно обычному специалисту в данной области техники, 5' нуклеотид олигонуклеотида не содержит 5' межнуклеотидную связывающую группу, хотя может содержать или не содержать 5' концевую группу, такую как фосфодиэфир или фосфоротиоат, для конъюгации линкера (В или Y или конъюгатную группировку).

Не встречающиеся в природе нуклеотиды включают нуклеотиды, имеющие модифицированные сахарные группировки, такие как бициклические нуклеотиды или 2'-модифицированные нуклеотиды, такие как 2'-замещенные нуклеотиды.

"Аналоги нуклеотидов" представляют собой варианты природных нуклеотидов, таких как ДНК- или РНК-нуклеотиды, в результате модификаций в сахарных группировках и/или группировках оснований. Аналоги могут быть в принципе исключительно "молчащими" или "эквивалентными" природным нуклеотидам в контексте олигонуклеотида, т.е. не обладают функциональным воздействием на тот путь, посредством которого олигомер ингибирует экспрессию гена-мишени. Такие "эквивалентные" аналоги могут быть тем не менее полезными, если, например, они могут быть проще и дешевле получены или более стабильны в условиях хранения или получения либо представляют собой концевую метку или метку. Предпочтительно, однако, чтобы аналоги обладали функциональным воздействием на путь, посредством которого олигомер ингибирует экспрессию гена-мишени; например, путем получения повышенного связывающего средства (усиления средства) к мишени и/или повышенной устойчивости к внутриклеточным нуклеазам и/или повышенной легкости транспортировки в клетку. Конкретные примеры аналогов нуклеозидов описаны, например, в статьях Freier & Altmann, Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443; и Uhlmann, Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213, и на схеме 1.

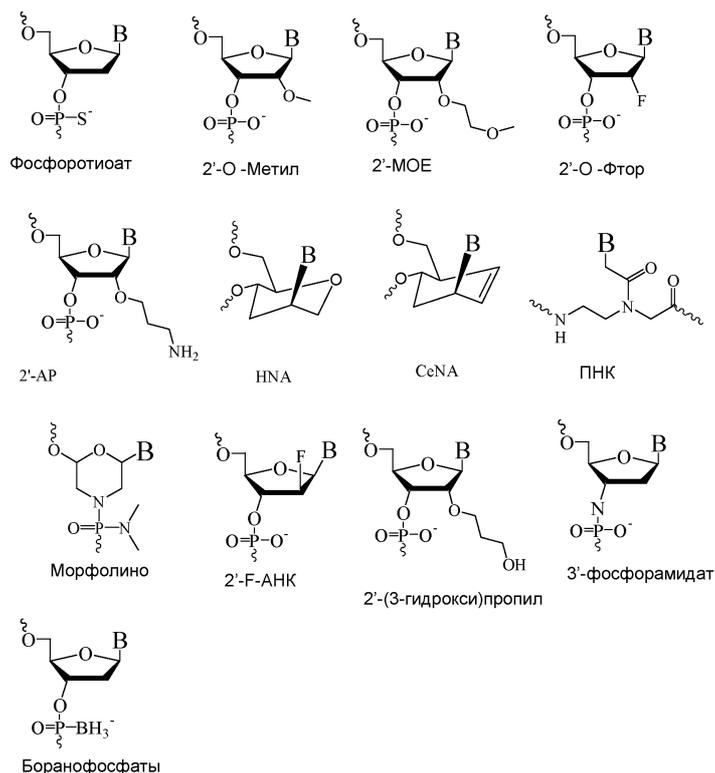


Схема 1

Олигомер может, таким образом, содержать простую последовательность или состоять из простой последовательности встречающихся в природе нуклеотидов, предпочтительно 2'-дезоксирибонуклеотидов (как правило, называемой в настоящем документе "ДНК"), но также, возможно, рибонуклеотидов (как правило, называемой в настоящем документе "РНК") или комбинации таких встречающихся в природе нуклеотидов и одного или более не встречающихся в природе нуклеотидов, т.е. аналогов нуклеотидов. Такие аналоги нуклеотидов могут соответствующим образом усиливать сродство олигомера к последовательности-мишени. Примеры подходящих и предпочтительных аналогов нуклеотидов приведены в WO 2007/031091 или приведены в этом документе посредством ссылки.

Включение в олигомер усиливающих сродство аналогов нуклеотидов, таких как ЗНК или 2'-замещенные сахара, может дать возможность уменьшения размера специфично связывающегося олигомера, а также может уменьшить верхний предел размера олигомера, до которого происходит неспецифическое или аберрантное связывание.

В некоторых воплощениях изобретения олигомер содержит по меньшей мере 2 аналога нуклеотидов. В некоторых воплощениях изобретения олигомер содержит 3-8 аналогов нуклеотидов, например 6 или 7 аналогов нуклеотидов.

Примеры аналогов нуклеотидов включают модификацию сахарной группировки с получением 2'-замещенной группы или с получением бициклической структуры, которая усиливает связывающее сродство, а также может обеспечить повышенную устойчивость к нуклеазам.

В некоторых воплощениях изобретения аналоги нуклеотидов, присутствующие внутри антисмыслового олигомера по настоящему изобретению (например, в участках X' и Y', упомянутых в разделе "Конструкция гэмпера"), независимо выбраны из, например, звеньев 2'-О-алкил-РНК, звеньев 2'-ОМетил-РНК, звеньев 2'-О-алкил-ДНК, звеньев 2'-амино-ДНК, звеньев 2'-фтор-ДНК, звеньев ЗНК, звеньев арабинонуклеиновой кислоты (АНК), звеньев 2'-фтор-АНК, звеньев HNA, звеньев ИНК (интеркалирующей нуклеиновой кислоты; Christensen, 2002, Nucl. Acids. Res., 2002, 30: 4918-4925, включена в настоящий документ посредством ссылки) и звеньев 2'МОЕ.

В некоторых воплощениях изобретения аналоги нуклеотидов представляют собой 2'-О-метоксиэтил-РНК (2'МОЕ), мономеры 2'-фтор-ДНК или аналоги нуклеотидов ЗНК и антисмысловый олигонуклеотид по настоящему изобретению может сам по себе содержать аналоги нуклеотидов, независимо выбранные из этих трех типов аналога, либо может содержать только один тип аналога, выбранный из трех типов. В некоторых воплощениях изобретения по меньшей мере один из аналогов нуклеотидов представляет собой 2'-МОЕ-РНК, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 звеньев нуклеотидов 2'-МОЕ-РНК. В некоторых воплощениях изобретения по меньшей мере один из аналогов нуклеотидов представляет собой 2'-фтор-ДНК, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 звеньев нуклеотидов 2'-фтор-ДНК.

Предпочтительным аналогом нуклеотида является ЗНК, например окси-ЗНК (например, бета-D-окси-ЗНК и альфа-L-окси-ЗНК) и/или аминокислот-ЗНК (например, бета-D-амино-ЗНК и альфа-L-амино-ЗНК)

и/или тио-ЗНК (например, бета-D-тио-ЗНК и альфа-L-тио-ЗНК) и/или ENA (например, бета-D-ENA и альфа-L-ENA). Наиболее предпочтительна бета-D-окси-ЗНК.

В некоторых воплощениях изобретения в антисмысловом олигонуклеотиде по настоящему изобретению или в его непрерывной нуклеотидной последовательности присутствует только один из описанных выше типов аналогов нуклеотидов.

В некоторых воплощениях изобретения антисмысловой олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит по меньшей мере одно звено запертой нуклеиновой кислоты (ЗНК), например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 звеньев ЗНК, например от 3 до 7 или от 4 до 8 звеньев ЗНК. В безусловно наиболее предпочтительных воплощениях изобретению по меньшей мере один из аналогов нуклеотидов представляет собой запертую нуклеиновую кислоту (ЗНК); например, по меньшей мере 3, либо по меньшей мере 4, либо по меньшей мере 5, либо по меньшей мере 6, либо по меньшей мере 7 или 8 из аналогов нуклеотидов могут представлять собой ЗНК. В некоторых воплощениях изобретения все аналоги нуклеотидов могут представлять собой ЗНК.

В некоторых воплощениях изобретения антисмысловой олигонуклеотид по настоящему изобретению может содержать и аналоги нуклеотидов (предпочтительно ЗНК), и звенья ДНК. Предпочтительно сумма объединенных аналогов нуклеотидов (предпочтительно ЗНК) и звеньев ДНК составляет 10-25, например 10-24, предпочтительно 10-20, например 10-18, даже более предпочтительно 12-16. В некоторых воплощениях изобретения нуклеотидная последовательность антисмыслового олигонуклеотида по настоящему изобретению, например непрерывная нуклеотидная последовательность, состоит из по меньшей мере одного аналога нуклеотида (предпочтительно ЗНК), а остальные нуклеотидные звенья представляют собой звенья ДНК. В некоторых воплощениях изобретения антисмысловой олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит только аналоги нуклеотидов ЗНК и встречающиеся в природе нуклеотиды (такие как РНК или ДНК, наиболее предпочтительно нуклеотиды ДНК), необязательно с модифицированными межнуклеотидными связями, такими как фосфотиоат.

Понятно, что при ссылке на предпочтительный мотив нуклеотидной последовательности или предпочтительную нуклеотидную последовательность, состоящие только из нуклеотидов, олигомеры по изобретению, которые определены этой последовательностью, могут включать соответствующий аналог нуклеотида вместо одного или более нуклеотидов, присутствующих в данной последовательности, таких как звенья ЗНК или другие аналоги нуклеотидов, которые повышают стабильность дуплекса/температуру плавления ( $T_m$ ) дуплекса олигомер/мишень (т.е. усиливающих сродство аналогов нуклеотидов).

Анализ  $T_m$ . Дуплексы олигонуклеотид:олигонуклеотид и РНК-мишень (РО) разводят до 3 мМ в 500 мл воды без РНК-аз и смешивают с 500 мл  $2 \times T_m$ -буфера (200 мМ NaCl, 0,2 мМ этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), 20 мМ фосфат Na, pH 7,0). Раствор нагревают до 95°C в течение 3 мин, а затем дают возможность отжига при комнатной температуре в течение 30 мин. Температуры плавления ( $T_m$ ) дуплексов измеряют на спектрофотометре Lambda 40 UV/VIS, оборудованном устройством программирования температуры Пельтье РТР6, с использованием программы PE Templab (Perkin Elmer). Температуру резко поднимают с 20 до 95°C, а затем резко снижают до 25°C, регистрируя поглощение при 260 нм. Для оценки  $T_m$  дуплекса используют первую производную и локальные максимумы и плавления, и отжига.

В некоторых воплощениях изобретения какие-либо ошибочные спаривания между нуклеотидной последовательностью олигомера и последовательностью-мишенью предпочтительно обнаруживаются в участках снаружи от усиливающих сродство аналогов нуклеотидов, таких как участок Y', на который ссылаются в разделе "Конструкция гэнмера", и/или в положении немодифицированных нуклеотидов, например, ДНК, в олигонуклеотиде и/или в участках, находящихся в 5' или 3' положении к непрерывной нуклеотидной последовательности.

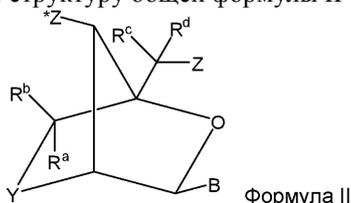
#### ЗНК

Термин "ЗНК" относится к бициклическому аналогу нуклеозида, который содержит мостиковую связь между 2' и 4' положением в рибозном кольце (2'-4' бициклический аналог нуклеотида) и известен как "запертая нуклеиновая кислота"). В литературе на ЗНК иногда ссылаются как на мостиковую или бициклическую нуклеиновую кислоту (BNA; bridged nucleic acid или bicyclic nucleic acid), и эти два термина можно использовать взаимозаменяемо. Термин ЗНК может относиться к мономеру ЗНК или при использовании в контексте "олигонуклеотид ЗНК" ЗНК относится к олигонуклеотиду, содержащему один или более таких бициклических аналогов нуклеотидов. В некоторых аспектах бициклические аналоги нуклеозидов представляют собой нуклеотиды ЗНК и эти термины можно, таким образом, использовать взаимозаменяемо и представляют собой такие воплощения изобретения, которые характеризуются также присутствием линкерной группы (такой как мостиковая группа) между C2' и C4' рибозного сахарного кольца.

В некоторых воплощениях изобретения антисмысловой олигонуклеотид по настоящему изобретению может содержать оба из бета-D-окси-ЗНК и одного или более из следующих звеньев ЗНК: тио-ЗНК, аминок-ЗНК, окси-ЗНК, 5'-метил-ЗНК и/или ENA либо в бета-D, либо в альфа-L-конфигурациях или их комбинаций. В некоторых воплощениях изобретения все цитозиновые звенья ЗНК представляют собой

5'-метил-цитозин. В некоторых воплощениях изобретения по меньшей мере один аналог нуклеозида, присутствующий в первом участке ( $X'$ ), представляет собой бициклический аналог нуклеозида, например, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8 (за исключением нуклеозидов ДНК и/или РНК участка  $Y'$ ) аналогов нуклеозидов с модифицированным сахаром, например бициклических аналогов нуклеозидов, таких как ЗНК, например бета-D-X-ЗНК или альфа-L-X-ЗНК (где X представляет собой окси, amino или тио) или другие ЗНК, раскрытые в настоящем документе, включающие без ограничения (R/S) сЕТ, сМОЕ или 5'-Me-ЗНК.

В некоторых воплощениях изобретения ЗНК, используемая в олигонуклеотидных соединениях по изобретению, предпочтительно имеет структуру общей формулы II



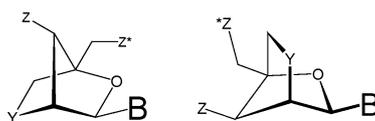
где Y выбран из группы, состоящей из -O-, -CH<sub>2</sub>O-, -S-, -NH-, N(R<sup>c</sup>) и/или -CH<sub>2</sub>-; Z и Z\* независимо выбраны из межнуклеотидной связи, R<sup>H</sup>, концевой группы или защитной группы;

В составляет группировку природного или синтетического нуклеотидного основания (нуклеотидное основание) и R<sup>H</sup> выбран из атома водорода и C<sub>1-4</sub>-алкила;

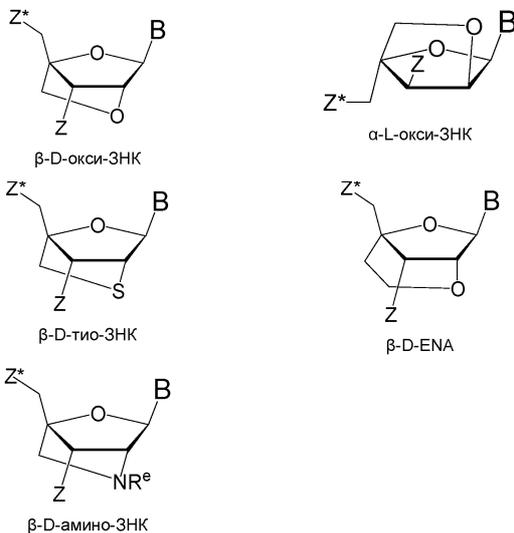
R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup>, R<sup>c</sup>, R<sup>d</sup> и R<sup>e</sup> необязательно независимо выбраны из группы, состоящей из атома водорода, необязательно замещенного C<sub>1-12</sub>-алкила, необязательно замещенного C<sub>2-12</sub>-алкенила, необязательно замещенного C<sub>2-12</sub>-алкинила, гидроксигруппы, C<sub>1-12</sub>-алкокси, C<sub>2-12</sub>-алкоксиалкила, C<sub>2-12</sub>-алкенилокси, карбокси, C<sub>1-12</sub>-алкоксикарбонила, C<sub>1-12</sub>-алкилкарбонила, формила, арила, арил-окси-карбонила, арилокси, арилкарбонила, гетероарила, гетероарилокси-карбонила, гетероарилокси, гетероарилкарбонила, amino, моно- и ди(C<sub>1-6</sub>-алкил)амино, карбамоила, моно- и ди(C<sub>1-6</sub>-алкил)-амино-карбонила, amino-C<sub>1-6</sub>-алкил-аминокарбонила, моно- и ди(C<sub>1-6</sub>-алкил)амино-C<sub>1-6</sub>-алкил-аминокарбонила, C<sub>1-6</sub>-алкил-карбониламино, карбамидо, C<sub>1-6</sub>-алканоиокси, сульфоно, C<sub>1-6</sub>-алкилсульфонилокси, нитро, азидо, сульфанила, C<sub>1-6</sub>-алкилтио, атома галогена, интеркаляторов ДНК, фотохимически активных групп, термохимически активных групп, хелатирующих групп, групп-репортеров и лигандов, где арил и гетероарил могут быть необязательно замещенными и где два присоединенных к одному и тому же атому заместителя R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> вместе могут обозначать необязательно замещенный метилен (=CH<sub>2</sub>); и

R<sup>H</sup> выбран из атома водорода и C<sub>1-4</sub>-алкила.

В некоторых воплощениях изобретения R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup>, R<sup>c</sup>, R<sup>d</sup> и R<sup>e</sup> необязательно независимо выбраны из группы, состоящей из атома водорода и C<sub>1-6</sub>-алкила, такого как метил. Для всех хиральных центров асимметрические группы могут находиться либо в R, либо в S ориентации, например, два иллюстративных стереохимических изомера включают бета-D и альфа-L изоформы, которые можно проиллюстрировать следующим образом.



Конкретные иллюстративные звенья ЗНК показаны ниже.



Термин "тио-ЗНК" включает запертый нуклеотид, в котором Y в приведенной выше общей формуле выбран из S или  $-\text{CH}_2\text{-S-}$ . Тио-ЗНК может находиться и в бета-D-, и в альфа-L-конфигурации.

Термин "амино-ЗНК" включает запертый нуклеотид, в котором Y в приведенной выше общей формуле выбран из  $-\text{N}(\text{H})-$ ,  $\text{N}(\text{R})-$ ,  $\text{CH}_2\text{-N}(\text{H})-$  и  $-\text{CH}_2\text{-N}(\text{R})-$ , где R выбран из атома водорода и  $\text{C}_{1-4}$ -алкила. Амино-ЗНК может находиться и в бета-D-, и в альфа-L-конфигурации.

Термин "окси-ЗНК" включает запертый нуклеотид, в котором Y в приведенной выше общей формуле представляет собой -O-. Окси-ЗНК может находиться и в бета-D-, и в альфа-L-конфигурации.

Термин "ENA" включает запертый нуклеотид, в котором Y в приведенной выше общей формуле представляет собой  $-\text{CH}_2\text{-O-}$  (где атом кислорода  $-\text{CH}_2\text{-O-}$  присоединен в 2'-положении относительно основания В). R<sup>o</sup> представляет собой атом водорода или метил.

В некоторых иллюстративных воплощениях изобретения ЗНК выбрана из бета-D-окси-ЗНК, альфа-L-окси-ЗНК, бета-D-амино-ЗНК и бета-D-тио-ЗНК, в частности бета-D-окси-ЗНК.

При использовании в настоящем документе "бициклические нуклеозиды" относятся к модифицированным нуклеозидам, содержащим бициклическую сахарную группировку. Примеры бициклических нуклеозидов включают без ограничения нуклеозиды, содержащие мостиковую связь между 4' и 2' атомами рибозильного кольца. В некоторых воплощениях изобретения соединения, предложенные в настоящем документе, включают один или более бициклических нуклеозидов, где мостик содержит 4'-2' бициклические нуклеозиды. Примеры таких 4'-2' бициклических нуклеозидов включают без ограничений одну из формул 4'-( $\text{CH}_2$ )-O-2' (ЗНК); 4'-( $\text{CH}_2$ )-S-2'; 4-( $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>-O-2' (ENA); 4'-CH( $\text{CH}_3$ )-O-2' и 4'-CH( $\text{CH}_2\text{OCH}_3$ )-O-2\* и их аналоги (см. патент US 7399845, опубл. 15 июля 2008 г.); 4'-C( $\text{CH}_3$ )( $\text{CH}_3$ )-O-2' и ее аналоги (см. опубликованную международную заявку на патент PCT WO 2009/006478, опубл. 8 января 2009 г.); 4'-CH<sub>2</sub>-N(OCH<sub>3</sub>)-2' и ее аналоги (см. опубликованную международную заявку на патент PCT WO 2008/150729, опубл. 11 декабря 2008 г.); 4'-CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-2' (см. опубликованную заявку на патент US 2004/0171570, опубл. 2 сентября 2004); 4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2', где R представляет собой H,  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -алкил или защитную группу (см. патент US 7427672, опубл. 23 сентября 2008 г.); 4'-CH<sub>2</sub>-C(H)(CH<sub>3</sub>)-2' (см. Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134); и 4'-CH<sub>2</sub>-C(=CH<sub>2</sub>)-2' и ее аналоги (см. опубликованную международную заявку на патент PCT WO 2008/154401, опубл. 8 декабря 2008 г.). Также см., например, статьи Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 2000, 97, 5633-5638; Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 129(26)8362-8379 (Jul. 4, 2007); Elayadi et al., Curr. Opinion Invens. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch et al., Chem. Biol., 2001, 8, 1-7; Oram et al., Curr. Opinion Mol. Then, 2001, 3, 239-243; патенты US № 6670461, 7053207, 6268490, 6770748, 6794499, 7034133, 6525191, 7399845; опубликованные международные заявки PCT WO 2004/106356, WO 94/14226, WO 2005/021570 и WO 2007/134181; публикации патентов US № US 2004/0171570, US 2007/0287831 и US 2008/0039618; и патенты US серийные № 12/129154, 60/989574, 61/026995, 61/026998, 61/056564, 61/086231, 61/097787 и 61/099844; и международные заявки PCT № PCT/US2008/064591, PCT/US2008/066154 и PCT/US2008/068922. Каждый из указанных выше бициклических нуклеозидов может быть получен так, что он имеет одну или более стереохимических конфигураций сахара, включающих, например, α-L-рибофуранозу и β-D-рибофуранозу (см. международную заявку PCT DK98/00393, опубл. 25 марта 1999 как WO 99/14226).

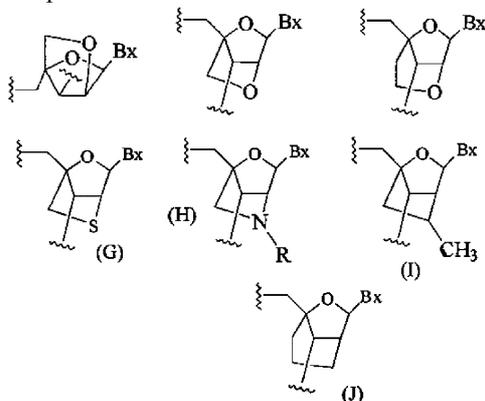
В некоторых воплощениях изобретения бициклические сахарные группировки нуклеозидов ЗНК включают без ограничений соединения, имеющие по меньшей мере одну мостиковую связь между 4' и 2' положением пентозофуранозильной сахарной группировки, где такие мостиковые связи независимо содержат 1 или от 2 до 4 связанных групп, независимо выбранных из  $-\text{[CiR}_a\text{XR}_b\text{)]-}$ ,  $-\text{C(R}_a\text{)=C(R}_b\text{)-}$ ,  $-\text{C(R}_a\text{)=N-}$ ,  $-\text{C(=NR}_a\text{)-}$ ,  $-\text{C(=O)-}$ ,  $-\text{C(=S)-}$ ,  $-\text{O-}$ ,  $-\text{Si(R}_a\text{)}_2\text{-}$ ,  $-\text{S(=O)}_x\text{-}$  и  $-\text{N(R}_a\text{)-}$ , где x равно 0, 1 или 2; n равно 1, 2, 3 или 4; каждый R<sub>a</sub> и R<sub>b</sub> независимо представляет собой H, защитную группу, гидроксил,  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ -алкил, замещенный  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ -алкил,  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ -алкенил, замещенный  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ -алкенил,  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ -алкинил, замещенный  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ -алкинил,  $\text{C}_5\text{-C}_{20}$ -арил, замещенный  $\text{C}_5\text{-C}_{20}$ -арил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал, гетероарил, замещенный гетероарил,  $\text{C}_5\text{-C}_7$ -алициклический радикал, замещенный  $\text{C}_5\text{-C}_7$ -алициклический радикал, атом галогена, OJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, COOJ<sub>1</sub>, ацил (C(=O)-H), замещенный ацил, CN, сульфонил (S(=O)<sub>2</sub>-J<sub>1</sub>) или сульфоксил (S(=O)-J<sub>1</sub>); и каждый J<sub>1</sub> и J<sub>2</sub> независимо представляет собой H,  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкил, замещенный  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ -алкил,  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ -алкенил, замещенный  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ -алкенил,  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ -алкинил, замещенный  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ -алкинил,  $\text{C}_5\text{-C}_{20}$ -арил, замещенный  $\text{C}_5\text{-C}_{20}$ -арил, ацил (C(=O)-H), замещенный ацил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал,  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ -аминоалкил, замещенный  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ -аминоалкил или защитную группу.

В некоторых воплощениях изобретения мостиковая связь бициклической сахарной группировки представляет собой  $-\text{[C(R}_a\text{)(R}_b\text{)]}_n\text{-}$ ,  $-\text{[C(R}_a\text{)(R}_b\text{)]}_n\text{-O-}$ ,  $-\text{C(R}_a\text{R}_b\text{)-N(R)-O-}$  или  $-\text{C(R}_a\text{R}_b\text{)-O-N(R)-}$ . В некоторых воплощениях изобретения мостиковая связь представляет собой 4'-CH<sub>2</sub>-2', 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-2', 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-2', 4'-CH<sub>2</sub>-O-2', 4\*-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2', 4'-CH<sub>2</sub>-O-N(R)-2' и 4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2'-, где каждый R независимо представляет собой H, защитную группу или  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ -алкил.

В некоторых воплощениях изобретения бициклические нуклеозиды дополнительно определены изомерной конфигурацией. Например, нуклеозид, содержащий мостиковую связь 4'-2'-метилен-окси,

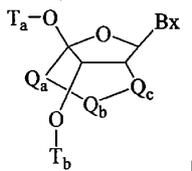
может находиться в  $\alpha$ -L-конфигурации или в  $\beta$ -D-конфигурации. Ранее  $\alpha$ -L-метиленокси (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') BNA включали в антисмысловые олигонуклеотиды, которые проявляли антисмысловую активность (Frieden et al., Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365-6372).

В некоторых воплощениях изобретения бициклические нуклеозиды включают без ограничений (A)  $\alpha$ -L-метиленокси (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') BNA, (B)  $\beta$ -D-метиленокси (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') BNA, (C) этиленокси (4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2') BNA, (D) аминокси (4'-CH<sub>2</sub>-O-N(R)-2') BNA, (E) оксиамино (4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2') BNA, (F) метил(метиленокси) (4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2') BNA, (G) метилен-тио (4'-CH<sub>2</sub>-S-2') BNA, (H) метилен-амино (4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-2') BNA, (I) метилкарбоциклическую (4'-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-2') BNA и (J) пропиленкарбоциклическую (4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-2') BNA, как изображено ниже.



где Bx представляет собой группировку основания; и R независимо представляет собой H, защитную группу или C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-алкил.

В некоторых воплощениях изобретения бициклический нуклеозид определен формулой I

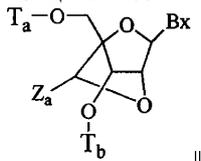


где Bx представляет собой гетероциклическую группировку основания; -Q<sub>a</sub>-Q<sub>b</sub>-Q<sub>c</sub>- представляет собой -CH<sub>2</sub>-N(R<sub>c</sub>)-CH<sub>2</sub>-, -C(=O)-N(R<sub>c</sub>)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-N(R<sub>c</sub>)-, -CH<sub>2</sub>-N(R<sub>c</sub>)-O- или -N(R<sub>c</sub>)-O-CH<sub>2</sub>;

R<sub>c</sub> представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкил или амино-защитную группу; и

T<sub>a</sub> и T<sub>b</sub> каждый независимо представляет собой H, гидрокси-защитную группу, конъюгатную группу, реакционную фосфорную группу, фосфорную группировку или ковалентное присоединение к иммобилизирующему носителю.

В некоторых воплощениях изобретения бициклический нуклеозид определен формулой II



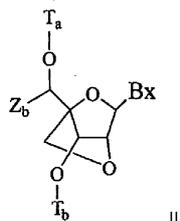
где Bx представляет собой гетероциклическую группировку основания;

T<sub>a</sub> и T<sub>b</sub> каждый независимо представляет собой H, гидроксил-защитную группу, конъюгатную группу, реакционную фосфорную группу, фосфорную группировку или ковалентное присоединение к иммобилизирующему носителю;

Z<sub>a</sub> представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкинил, замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкенил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкинил, ацил, замещенный ацил, замещенный амид, тиол или замещенный тиол.

В некоторых воплощениях изобретения каждая из замещенных групп независимо является моно- или полизамещенной группами заместителей, независимо выбранными из атома галогена, оксо, гидроксила, OJ<sub>c</sub>, NJ<sub>d</sub>, SJ<sub>c</sub>, N<sub>3</sub>, OC(=X)J<sub>c</sub> и NJ<sub>c</sub>C(=X)NJ<sub>c</sub>J<sub>d</sub>, где каждый J<sub>c</sub>, J<sub>d</sub> и J<sub>e</sub> независимо представляет собой H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил или замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил и X представляет собой O или NJ<sub>c</sub>.

В некоторых воплощениях изобретения бициклический нуклеозид определен формулой III

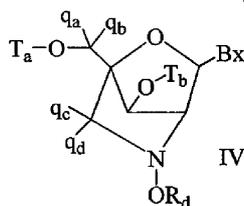


где Bx представляет собой гетероциклическую группировку основания;

Ta и Tb каждый независимо представляет собой H, гидроксил-защитную группу, конъюгатную группу, реакционную фосфорную группу, фосфорную группировку или ковалентное присоединение к иммобилизирующему носителю;

Rd представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкинил, замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкенил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкинил или замещенный ацил (C(=O)-).

В некоторых воплощениях изобретения бициклический нуклеозид определен формулой IV



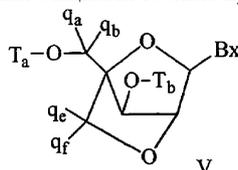
где Bx представляет собой гетероциклическую группировку основания;

Ta и Tb каждый независимо представляет собой H, гидроксил-защитную группу, конъюгатную группу, реакционную фосфорную группу, фосфорную группировку или ковалентное присоединение к иммобилизирующему носителю;

Rd представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил, замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкенил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкинил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкинил;

каждый qb, qc и qd независимо представляет собой H, атом галогена, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил, замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкенил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкинил или замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкинил, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкоксил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкоксил, ацил, замещенный ацил, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-аминоалкил или замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-аминоалкил.

В некоторых воплощениях изобретения бициклический нуклеозид определен формулой V



где Bx представляет собой гетероциклическую группировку основания;

Ta и Tb каждый независимо представляет собой H, гидроксил-защитную группу, конъюгатную группу, реакционную фосфорную группу, фосфорную группировку или ковалентное присоединение к иммобилизирующему носителю;

qa, qb, qc и qf каждый независимо представляет собой атом водорода, атом галогена, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкил, замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкил, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкенил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкинил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкинил, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкокси, замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкокси, OJ<sub>j</sub>, SJ<sub>j</sub>, SOJ<sub>j</sub>, SO<sub>2</sub>J<sub>j</sub>, NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>, N<sub>3</sub>, CN, C(=O)OJ<sub>j</sub>, C(=O)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>, C(=O)J<sub>j</sub>, O-C(=O)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>, N(H)C(=NH)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>, N(H)C(=O)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub> или N(H)C(=S)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>; либо

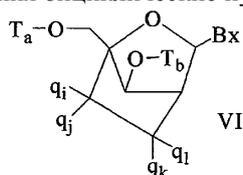
qc и qf вместе представляют собой =C(qg)(qh);

qg и qh каждый независимо представляет собой H, атом галогена, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкил или замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкил.

Синтез и получение мономеров метиленокси (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') BNA аденина, цитозина, гуанина, 5-метил-цитозина, тимина и урацила в сочетании с их свойствами олигомеризации и распознавания нуклеиновых кислот описаны (см, например, статью Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630). BNA и их получение также описаны в документах WO 98/39352 и WO 99/14226.

Аналоги метиленокси (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') BNA, метиленокси (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') BNA и 2'-тио-BNA также получены (см., например, статью Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222). Получение замкнутых аналогов нуклеозидов, содержащих олигодезоксирибонуклеотидные дуплексы, в качестве субстратов для полимераз нуклеиновых кислот также описано (см., например, Wengel et al., WO 99/14226). Кроме того, на уровне техники описан синтез 2'-амино-BNA, нового конформационно-ограниченного аналога олигонуклеотида с высоким родством (см., например, Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039). Кроме того, ранее описаны 2'-амино- и 2'-метиламино-BNA и термостабильность их дуплексов с комплементарными РНК и ДНК.

В некоторых воплощениях изобретения бициклические нуклеозиды определены формулой VI



где Bx представляет собой гетероциклическую группировку основания;

T<sub>a</sub> и T<sub>b</sub> каждый независимо представляет собой H, гидроксил-защитную группу, конъюгатную группу, реакционную фосфорную группу, фосфорную группировку или ковалентное присоединение к иммобилизирующему носителю;

каждый q<sub>i</sub>, q<sub>j</sub>, q<sub>k</sub> и q<sub>l</sub> независимо представляет собой H, атом галогена, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкил, замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкил, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкенил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкинил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкинил, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкоксил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкоксил, OJ<sub>j</sub>, SJ<sub>j</sub>, SOJ<sub>j</sub>, SO<sub>2</sub>J<sub>j</sub>, NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>, N<sub>3</sub>, CN, C(=O)OJ<sub>j</sub>, C(=O)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>, C(=O)J<sub>j</sub>, O-C(=O)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>, N(H)C(=NH)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>, N(H)C(=O)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub> или (H)C(=S)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>; и

q<sub>i</sub> и q<sub>j</sub> или q<sub>i</sub> и q<sub>k</sub> вместе представляют собой =C(q<sub>g</sub>)(q<sub>h</sub>), где q<sub>g</sub> и q<sub>h</sub> каждый независимо представляет собой H, атом галогена, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкил или замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил.

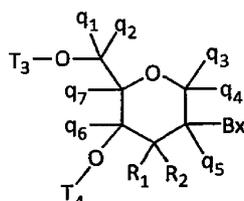
Описаны другие карбоциклические бициклические нуклеозиды, имеющие мостиковую связь 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-2', и алкенильный аналог, мостиковую связь 4'-CH=CH-CH<sub>2</sub>-2' (см., например, Freier et al., *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22), 4429-4443; и Albaek et al., *J. Org. Chem.*, 2006, 71, 7731-7740). Синтез и получение карбоциклических бициклических нуклеозидов в сочетании с их олигомерзацией и биохимическими исследованиями также описаны (см., например, Srivastava et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129(26), 8362-8379).

При использовании в настоящем документе "4'-2' бициклический нуклеозид" или "4'-2' бициклический нуклеозид" относится к бициклическим нуклеозидам, содержащим кольцо фуранозы, содержащее мостик, соединяющий 2' атом углерода и 4' атом углерода.

При использовании в настоящем документе "моноциклические нуклеозиды" относятся к нуклеозидам, содержащим модифицированные сахарные группировки, представляющие собой не бициклические сахарные группировки. В некоторых воплощениях изобретения сахарная группировка или аналог сахарной группировки нуклеозида могут быть модифицированы или замещены в любом положении.

При использовании в настоящем документе "2'-модифицированный сахар" означает фуранозильный сахар, модифицированный в 2' положении. В некоторых воплощениях изобретения такие модификации включают заместители, выбранные из галогенида, включающего без ограничений замещенный и незамещенный алкокси, замещенный и незамещенный тиоалкил, замещенный и незамещенный аминоалкил, замещенный и незамещенный алкил, замещенный и незамещенный аллил и замещенный и незамещенный алкинил. В некоторых воплощениях изобретения 2' модификации выбраны из заместителей, включающих без ограничений O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)ONH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>C(=O)N(H)CH<sub>3</sub> и O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>, где n и m равны от 1 до примерно 10. Другие 2'-группы заместителей также могут быть выбраны из C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкила; замещенного алкила; алкенила; алкинила; алкарила; аралкила; О-алкарила или О-аралкила; SH; SCH<sub>3</sub>; OCN; Cl; Br; CN; CF<sub>3</sub>; OCF<sub>3</sub>; SOCH<sub>3</sub>; SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; ONO<sub>2</sub>; NO<sub>2</sub>; N<sub>3</sub>; NH<sub>2</sub>; гетероциклоалкил; гетероциклоалкарил; аминоалкиламино; полиалкиламино; замещенного силсила; R; отщепляемую группу; группу-репортер; интеркалятор; группу для улучшения фармакокинетических свойств и группу для улучшения фармакодинамических свойств антисмыслового соединения, а также другие заместители, обладающие подобными свойствами. В некоторых воплощениях изобретения модифицированные нуклеозиды содержат боковую цепь 2'-МОЕ (см., например, Baker et al., *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 1, 1944-12000). Описано, что такое замещение 2'-МОЕ обладает улучшенным связывающим средством по сравнению с немодифицированными нуклеозидами и с другими модифицированными нуклеозидами, такими как 2'-О-метил-, О-пропил- и О-аминопропил-. Также показано, что олигонуклеотиды, имеющие заместитель 2'-МОЕ, являются антисмысловыми ингибиторами экспрессии генов с перспективными признаками для применения *in vivo* (см., например, Martin, P., *He/v. Chirm. Acta*, 1995, 78, 486-504; Altmann et al., *Chimia*, 1996, 50, 168-176; Altmann et al., *Biochem. Soc. Trans.*, 1996, 24, 630-637; и Altmann et al., *Nucleosides Nucleotides*, 1997, 16, 917-926).

При использовании в настоящем документе "тетрагидропирановый модифицированный нуклеозид" или "ТГП модифицированный нуклеозид" означает нуклеозид, имеющий тетрагидропирановый "сахар", замещающий пентафуранозильный остаток в обычных нуклеозидах (суррогат сахара). Модифицированные ТГП нуклеозиды включают нуклеозиды, на которые ссылаются в данной области техники как на гекситоловую нуклеиновую кислоту (HNA, hexitol nucleic acid), анитоловую нуклеиновую кислоту (ANA, anitol nucleic acid), маннитоловую нуклеиновую кислоту (MNA, manitol nucleic acid) (см. статью Leumann, C.J., *Bioorg. and Med. Chem.* (2002), 10: 841-854), фтор-HNA (F-HNA) или соединения, определенные формулой X



Формула X

где независимо для каждого из упомянутого по меньшей мере одного тетрагидропиранового аналога нуклеозида формулы X Bx представляет собой гетероциклическую группировку основания;

T<sub>3</sub> и T<sub>4</sub> каждый независимо представляет собой межнуклеозидную связывающую группу, связывающую тетрагидропирановый аналог нуклеозида с антисмысловым соединением, или один из T<sub>3</sub> и T<sub>4</sub> представляет собой межнуклеозидную связывающую группу, связывающую тетрагидропирановый аналог нуклеозида с антисмысловым соединением, а другой из T<sub>3</sub> и T<sub>4</sub> представляет собой H, защитную группу гидроксила, группу, связанную с конъюгатом, или 5' или 3'-концевую группу;

q<sub>1</sub> q<sub>2</sub> q<sub>3</sub> q<sub>4</sub> q<sub>5</sub>, q<sub>6</sub> и q<sub>7</sub> каждый независимо представляет собой H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил, замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкенил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкинил или замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкинил; и один из R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> представляет собой атом водорода, а другой выбран из атома галогена, замещенного или незамещенного алкокси, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, OC(=X)J<sub>1</sub>, OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> и CN, где X представляет собой O, S или NJ<sub>1</sub>, и каждый J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub> и J<sub>3</sub> независимо представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил.

В некоторых воплощениях изобретения предложены модифицированные ТП нуклеозиды формулы X, где q<sub>m</sub>, q<sub>n</sub>, q<sub>p</sub>, q<sub>r</sub>, q<sub>s</sub>, q<sub>t</sub> и q<sub>u</sub> каждый представляет собой H. В некоторых воплощениях изобретения по меньшей мере один из q<sub>m</sub>, q<sub>n</sub>, q<sub>p</sub>, q<sub>r</sub>, q<sub>s</sub>, q<sub>t</sub> и q<sub>u</sub> отличается от H. В некоторых воплощениях изобретения по меньшей мере один из q<sub>m</sub>, q<sub>n</sub>, q<sub>p</sub>, q<sub>r</sub>, q<sub>s</sub>, q<sub>t</sub> и q<sub>u</sub> представляет собой метил. В некоторых воплощениях изобретения предложены ТП нуклеозиды формулы X, где один из R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> представляет собой F. В некоторых воплощениях изобретения R<sub>1</sub> представляет собой атом фтора, а R<sub>2</sub> представляет собой H, R<sub>1</sub> представляет собой метокси, а R<sub>2</sub> представляет собой H и R<sub>1</sub> представляет собой метоксиэтокси, а R<sub>2</sub> представляет собой H.

При использовании в настоящем документе "2'-модифицированный" или "2'-замещенный" относится к нуклеозиду, содержащему сахар, который содержит заместитель в 2' положении, отличающийся от H или OH. 2'-Модифицированные нуклеозиды включают без ограничения нуклеозиды с не мостиковыми 2'-заместителями, такими как аллил, амино, азидо, тио, O-аллил, O-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкил, -OCF<sub>3</sub>, O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>, 2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>) или O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), где каждый R<sub>m</sub> и R<sub>n</sub> независимо представляет собой H, либо замещенный или незамещенный C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкил. 2'-Модифицированные нуклеозиды могут дополнительно содержать другие модификации, например, в других положениях сахара и/или в нуклеотидном основании.

При использовании в настоящем документе "2'-F" относится к сахару, содержащему группу фтор в 2'-положении.

При использовании в настоящем документе "2'-OMe" или "2'-OCH<sub>3</sub>" или "2'-O-метил" каждый относится к нуклеозиду, содержащему сахар, который содержит группу -OCH<sub>3</sub> в 2'-положении сахарного кольца.

При использовании в настоящем документе "олигонуклеотид" относится к соединению, содержащему множество связанных нуклеозидов.

В некоторых воплощениях изобретения один или более из множества нуклеозидов модифицирован. В некоторых воплощениях изобретения олигонуклеотид содержит один или более рибонуклеозидов (РНК) и/или дезоксирибонуклеозидов (ДНК).

В данной области техники также известны многие другие бициклические и трициклические кольцевые системы суррогатов сахаров, которые можно использовать для модификации нуклеозидов для включения в антисмысловые соединения (см., например, обзорную статью Leumann, J.C., Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2002, 10, 841-854). Такие кольцевые системы могут претерпевать различные дополнительные замещения для усиления активности. Способы получения модифицированных сахаров также известны специалистам в данной области техники. В нуклеотидах, имеющих модифицированные сахарные группировки, сохраняются группировки нуклеотидных оснований (природные, модифицированные или их комбинации) для гибридизации с соответствующей нуклеиновой кислотой-мишенью.

В некоторых воплощениях изобретения антисмысловые соединения содержат один или более нуклеотидов, имеющих модифицированные сахарные группировки. В некоторых воплощениях изобретения модифицированная сахарная группировка представляет собой 2'-МОЕ. В некоторых воплощениях изобретения модифицированные 2'-МОЕ нуклеотиды сконструированы в виде гэммерного мотива. В некоторых воплощениях изобретения модифицированная сахарная группировка представляет собой сEt. В некоторых воплощениях изобретения модифицированные сEt нуклеотиды сконструированы посредством сегментов-крыльев гэммерного мотива.

В некоторых воплощениях изобретения в ЗНК R<sup>4\*</sup> и R<sup>2\*</sup> вместе обозначают бирадикал -O-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)- (2'-O-метоксиэтил-бициклические нуклеиновые кислоты; Seth et al., 2010, J. Org. Chem)

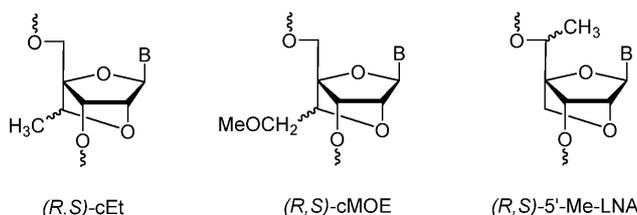
либо в R-, либо в S-конфигурации.

В некоторых воплощениях изобретения в ЗНК R<sup>4\*</sup> и R<sup>2\*</sup> вместе обозначают бирадикал -O-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)- (2'-O-этил-бициклические нуклеиновые кислоты; Seth at al., 2010, J. Org. Chem) либо в R-, либо в S-конфигурации.

В некоторых воплощениях изобретения в ЗНК R<sup>4\*</sup> и R<sup>2\*</sup> вместе обозначают бирадикал -O-CH(CH<sub>3</sub>)- либо в R-, либо в S-конфигурации. В некоторых воплощениях изобретения R<sup>4\*</sup> и R<sup>2\*</sup> вместе обозначают бирадикал -O-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>- (Seth at al., 2010, J. Org. Chem).

В некоторых воплощениях изобретения в ЗНК R<sup>4\*</sup> и R<sup>2\*</sup> вместе обозначают бирадикал -O-NR-CH<sub>3</sub>- (Seth at al., 2010, J. Org. Chem).

В некоторых воплощениях изобретения звенья ЗНК имеют структуру, выбранную из следующей группы:



Включение аналогов нуклеотидов, усиливающих сродство, в олигомер, такой как ЗНК или 2'-замещенные сахара, может дать возможность уменьшения размера специфично связывающегося олигомера и может также уменьшить верхний предел размера олигомера, до которого происходит неспецифическое или aberrantное связывание.

Авторы изобретения оценили нефротоксичность соединения сЕТ (используя (S)-сЕТ с последовательностью (соединение ID 6/411847 WO 2009/12495 и сравнительное соединение бета-D-окси-ЗНК 6/392063 WO 2009/12495) и обнаружили, что соединения сЕТ вызывают неожиданно высокую нейротоксичность по сравнению с контролем бета-D-окси-ЗНК. Исследование представляло собой исследование одной дозы с умерщвлением через 3 суток (методологию см. в примере 41 EP 1984381, хотя авторы изобретения использовали мышей NMRI). Нефротоксичность была подтверждена гистологическим анализом. В частности, признаки нейротоксичности авторы изобретения наблюдали при более низких дозах соединения сЕТ по сравнению с дозами, при которых была отмечена сывороточная аланинаминотрансфераза (ALT), что указывает на то, что нефротоксичность соединений сЕТ может представлять собой особую проблему. Таким образом, применение конъюгатов по настоящему изобретению, таких как трехвалентные конъюгаты GalNAc, в высокой степени полезно при уменьшении нефротоксичности соединений ЗНК, таких как соединения сЕТ.

В некоторых воплощениях изобретения олигомер содержит по меньшей мере 1 аналог нуклеозида. В некоторых воплощениях изобретения олигомер содержит по меньшей мере 2 аналога нуклеотида. В некоторых воплощениях изобретения олигомер содержит 3-8 аналогов нуклеотидов, например 6 или 7 аналогов нуклеотидов. В безусловно наиболее предпочтительных воплощениях изобретения по меньшей мере один из аналогов нуклеотидов представляет собой запертую нуклеиновую кислоту (ЗНК); например, по меньшей мере 3, либо по меньшей мере 4, либо по меньшей мере 5, либо по меньшей мере 6, либо по меньшей мере 7 или 8 из аналогов нуклеотидов может представлять собой ЗНК. В некоторых воплощениях изобретения все аналоги нуклеотидов могут представлять собой ЗНК.

Должно быть понятно, что при ссылке на предпочтительный мотив нуклеотидной последовательности или нуклеотидную последовательность, которая состоит только из нуклеотидов, олигомеры по изобретению, которые определены этой последовательностью, могут содержать соответствующий аналог нуклеотида вместо одного или более нуклеотидов, присутствующих в упомянутой последовательности, таких как звенья ЗНК или другие аналоги нуклеотидов, которые повышают стабильность дуплекса/T<sub>m</sub> дуплекса олигомер/мишень (т.е. аналоги нуклеотидов, усиливающие сродство).

Предпочтительный аналог нуклеотида представляет собой ЗНК, такую как окси-ЗНК (такую как бета-D-окси-ЗНК и альфа-L-окси-ЗНК) и/или аминокс-ЗНК (такую как бета-D-аминокс-ЗНК и альфа-L-аминокс-ЗНК) и/или тиокс-ЗНК (такую как бета-D-тиокс-ЗНК и альфа-L-тиокс-ЗНК) и/или ENA (такую как бета-D-ENA и альфа-L-ENA).

В некоторых воплощениях изобретения олигомер по изобретению, такой как участок A, может содержать звенья ЗНК и другие аналоги нуклеотидов. Дополнительные аналоги нуклеотидов, присутствующие в пределах олигомера по изобретению, независимо выбраны, например, из звеньев 2'-O-алкил-РНК, звеньев 2'-амино-ДНК, звеньев 2'-фтор-ДНК, звеньев ЗНК, звеньев арабинонуклеиновой кислоты (АНК), звеньев 2'-фтор-АНК, звеньев HNA, звеньев INA (интеркалирующей нуклеиновой кислоты; статья Christensen, 2002. Nucl. Acids. Res., 2002, 30: 4918-4925, включенная в настоящий документ посредством ссылки) и звеньев 2'-МОЕ. В некоторых воплощениях изобретения в олигомере по изобретению, например, в первом участке, или в непрерывной нуклеотидной последовательности присутствует только один тип аналогов нуклеотидов.

В некоторых воплощениях изобретения олигомер согласно изобретению (участок А) может, таким образом, содержать по меньшей мере одно звено запертой нуклеиновой кислоты (ЗНК), например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 звеньев ЗНК, например 3-7 или 4-8 звеньев ЗНК или 3, 4, 5, 6 или 7 звеньев ЗНК. В некоторых воплощениях изобретения все аналоги нуклеотидов представляют собой ЗНК. В некоторых воплощениях изобретения олигомеры могут содержать оба из бета-D-окси-ЗНК и одного или более из следующих звеньев ЗНК: тио-ЗНК, аминок-ЗНК, окси-ЗНК и/или ЕНА либо в бета-D, либо в альфа-L-конфигурациях или их комбинации. В некоторых воплощениях изобретения все цитозиновые звенья ЗНК представляют собой 5'-метил-цитозин. В некоторых воплощениях изобретения олигомер (такой как первые и необязательно вторые участки) может содержать оба звена ЗНК и ДНК. В некоторых воплощениях изобретения сумма комбинированных звеньев ЗНК и ДНК составляет 10-25, например 10-24, предпочтительно 10-20, например 10-18, например 12-16. В некоторых воплощениях изобретения по изобретению нуклеотидная последовательность олигомера, его первого участка, такая как непрерывная нуклеотидная последовательность, состоит из по меньшей мере одного звена ЗНК, а остальные нуклеотидные звенья представляют собой звенья ДНК. В некоторых воплощениях изобретения олигомер или его первый участок содержит только ЗНК, аналоги нуклеотидов и встречающиеся в природе нуклеотиды (такие как нуклеотиды РНК или ДНК, наиболее предпочтительно ДНК), необязательно с модифицированными межнуклеотидными связями, такими как фосфоротиоат.

#### Рекрутинг РНКазы.

Известно, что олигомерное соединение может функционировать посредством расщепления мРНК-мишени, опосредованного не РНКазой, например, путем стерического затруднения трансляции или другими способами. В некоторых воплощениях изобретения олигомеры по изобретению способны к рекрутингу эндорибонуклеазы (РНКазы), такой как РНКазы Н.

Предпочтительно, чтобы такие олигомеры, такие как участок А или непрерывная нуклеотидная последовательность, содержащая участок из по меньшей мере 4, например по меньшей мере 5, например по меньшей мере 6, например по меньшей мере 7, последовательных нуклеотидных звеньев, например по меньшей мере 8 или по меньшей мере 9 последовательных нуклеотидных звеньев (остатков), включающих 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 последовательных нуклеотидов, которые при формировании в дуплексе с комплементарной РНК-мишенью способны к рекрутингу РНКазы (таких как звенья ДНК). Непрерывная последовательность, способная к рекрутингу РНКазы, может представлять собой участок Y', на который ссылаются в контексте гэнмера, как раскрыто в настоящем документе. В некоторых воплощениях изобретения размер непрерывной последовательности, способной к рекрутингу РНКазы, такой как участок Y', может быть больше, например, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидных звеньев.

В ЕР 1222309 предложены способы определения активности РНКазы Н *in vitro*, которые можно использовать для определения способности к рекрутингу РНКазы Н. Олигомер считают способным к рекрутингу РНКазы Н, если при обеспечении комплементарной РНК-мишени он обладает начальной скоростью реакции, измеренной в пмоль/л/мин, составляющей по меньшей мере 1%, например по меньшей мере 5%, например по меньшей мере 10% или более 20%, от начальной скорости реакции, определенной с использованием только ДНК-олигонуклеотида, имеющего такую же последовательность оснований, но содержащего только ДНК-мономеры без 2'-замещений с фосфоротиоатными связывающими группами между всеми мономерами в олигонуклеотиде, используя методологию, предложенную в примерах 91-95 ЕР 1222309.

В некоторых воплощениях изобретения олигомер считают по существу неспособным к рекрутингу РНКазы Н, если при обеспечении комплементарной РНК-мишени он обладает начальной скоростью реакции, измеренной в пмоль/л/мин, менее 1%, например менее 5%, например менее 10% или менее 20%, начальной скорости реакции, определенной при использовании только ДНК-олигонуклеотида без 2'-замещений с фосфоротиоатными связывающими группами между всеми мономерами в олигонуклеотиде, используя методологию, предложенную в примерах 91-95 ЕР 1222309.

В других воплощениях изобретения олигомер считают способным к рекрутингу РНКазы Н, если при обеспечении комплементарной РНК-мишени и РНКазы Н начальная скорость реакции РНКазы Н, измеренная в пмоль/л/мин, составляет по меньшей мере 20%, например, по меньшей мере 40%, например, по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 80% от начальной скорости реакции при использовании только ДНК-олигонуклеотида без 2'-замещений с фосфоротиоатными связывающими группами между всеми мономерами в олигонуклеотиде, используя методологию, предложенную в примерах 91-95 ЕР 1222309.

В характерном случае участок олигомера, который формирует последовательные нуклеотидные звенья, которые при формировании в дуплекс с комплементарной РНК-мишенью способны к рекрутингу РНКазы, состоит из нуклеотидных звеньев, которые формируют ДНК/РНК-подобный дуплекс с РНК-мишенью. Олигомер по изобретению, такой как первый участок, может содержать нуклеотидную последовательность, содержащую и нуклеотиды, и аналоги нуклеотидов, и могут принимать форму, например, гэнмера.

### Конструкция гэмпера.

В некоторых воплощениях изобретения олигомер по изобретению, такой как первый участок, содержит или представляет собой гэмпер. Гэмперный олигомер представляет собой олигомер, содержащий непрерывный отрезок из нуклеотидов, способный к рекрутингу РНКазы, такой как РНКазы Н, например, участок из по меньшей мере 6 или 7 ДНК-нуклеотидов, на который в настоящем документе ссылаются как на участок Y' (Y'), где участок Y' фланкирован с 5'- и 3'-концов участками из аналогов нуклеотидов, усиливающих сродство, например 1-6 аналогов нуклеотидов в 5' и 3' направлении к непрерывному отрезку нуклеотидов, способных к рекрутингу РНКазы, где на данные участки ссылаются как на участки X' (X') и Z' (Z') соответственно. Участки X' и Z' могут быть также обозначены термином "сегменты-крылья" гэмпера. Гэмперные участки раскрыты в документах WO 2004/046160, WO 2008/113832 и WO 2007/146511.

В некоторых воплощениях изобретения мономеры, способные к рекрутингу РНКазы, выбраны из группы, состоящей из мономеров ДНК, мономеров альфа-L-ЗНК, C4'-алкилированных мономеров ДНК (см. документы PCT/EP2009/050349; и Vester et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 18 (2008), 2296-2300, включенные в настоящий документ посредством ссылки) и нуклеотидов незамкнутой нуклеиновой кислоты (UNA; unlinked nucleic acid) (см. статью Fluiter et al., Mol. Biosyst., 2009, 10, 1039, включенную в настоящий документ посредством ссылки). UNA представляет собой незамкнутую нуклеиновую кислоту, где, как правило, С-С связь C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> рибозы удалена с образованием незамкнутого остатка "сахара". Предпочтительно гэмпер содержит (поли)нуклеотидную последовательность формулы (5'-3') X'-Y'-Z', где участок X' (X') (5' участок) состоит из по меньшей мере одного или содержит по меньшей мере один аналог нуклеотида, например по меньшей мере одно звено ЗНК, например, от 1-6 аналогов нуклеотидов, таких как звенья ЗНК, и участок Y' (Y') состоит из по меньшей мере четырех или содержит по меньшей мере четыре или по меньшей мере пять последовательных нуклеотидов, способных к рекрутингу РНКазы (при формировании в дуплекс с комплементарной молекулой РНК, такой как мРНК-мишень), таких как нуклеотиды ДНК, и участок Z' (Z') (3' участок) состоит из по меньшей мере одного или содержит по меньшей мере один аналог нуклеотида, например по меньшей мере одно звено ЗНК, например, от 1-6 аналогов нуклеотидов, таких как звенья ЗНК.

В некоторых воплощениях изобретения

участок X' состоит из 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аналогов нуклеотидов, таких как звенья ЗНК, например, от 2-5 аналогов нуклеотидов, таких как 2-5 звеньев ЗНК, например 3 или 4 аналога нуклеотидов, таких как 3 или 4 звена ЗНК; и/или

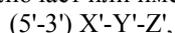
участок Z' состоит из 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аналогов нуклеотидов, таких как звенья ЗНК, например, от 2-5 аналогов нуклеотидов, таких как 2-5 звеньев ЗНК, например 3 или 4 аналога нуклеотидов, таких как 3 или 4 звена ЗНК.

В некоторых воплощениях изобретения Y' состоит из или содержит 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 последовательных нуклеотидов, способных к рекрутингу РНКазы, либо от 4-12, либо от 6-10, либо от 7-9, например 8 последовательных нуклеотидов, способных к рекрутингу РНКазы. В некоторых воплощениях изобретения участок Y' состоит из по меньшей мере одного или содержит по меньшей мере одно нуклеотидное звено ДНК, например 1-12 звеньев ДНК, предпочтительно от 4-12 звеньев ДНК, более предпочтительно от 6-10 звеньев ДНК, например от 7-10 звеньев ДНК, более предпочтительно 8, 9 или 10 звеньев ДНК.

В некоторых воплощениях изобретения участок X' состоит из 3 или 4 или содержит 3 или 4 аналога нуклеотидов, таких как ЗНК, участок X' состоит из 7, 8, 9 или 10 звеньев ДНК, и участок Z' состоит из 3 или 4 аналогов нуклеотидов, таких как ЗНК. Такие конструкции включают (X'-Y'-Z') 3-10-3, 3-10-4, 4-10-3, 3-9-3, 3-9-4, 4-9-3, 3-8-3, 3-8-4, 4-8-3, 3-7-3, 3-7-4, 4-7-3. В предпочтительном воплощении изобретения гэмпер представляет собой гэмпер 3-9-4, даже более предпочтительно гэмпер представляет собой гэмпер 3-10-3.

Дополнительные гэмперные конструкции раскрыты в документе WO 2004/046160, включенном в настоящий документ посредством ссылки. WO 2008/113832, которая испрашивает приоритет в отношении предварительной заявки US 60/977,409, включенная в настоящий документ посредством ссылки, относится к "короткомерным" гэмперным олигомерам. В некоторых воплощениях изобретения олигомеры, представленные в настоящем документе, могут представлять собой такие короткомерные гэмперы.

В некоторых воплощениях изобретения олигомер, например участок X', состоит из непрерывной нуклеотидной последовательности из суммарно 10, 11, 12, 13 или 14 нуклеотидных звеньев, где непрерывная нуклеотидная последовательность включает или имеет формулу



где X' состоит из 1, 2 или 3 звеньев аналогов нуклеотидов, таких как звенья ЗНК;

Y' состоит из 7, 8 или 9 смежных нуклеотидных звеньев, способных к рекрутингу РНКазы при формировании в дуплекс с комплементарной молекулой РНК (такой как мРНК-мишень); и

Z' состоит из 1, 2 или 3 аналогов нуклеотидов, таких как звенья ЗНК.

В некоторых воплощениях изобретения X' состоит из 1 звена ЗНК. В некоторых воплощениях изобретения X' состоит из 2 звеньев ЗНК. В некоторых воплощениях изобретения X' состоит из 3 звеньев ЗНК. В некоторых воплощениях изобретения Z' состоит из 1 звена ЗНК. В некоторых воплощениях изобретения Z' состоит из 2 звеньев ЗНК. В некоторых воплощениях изобретения Z' состоит из 3 звеньев ЗНК.

бретения Z' состоит из 2 звеньев ЗНК. В некоторых воплощениях изобретения Z' состоит из 3 звеньев ЗНК. В некоторых воплощениях изобретения Y' состоит из 7 нуклеотидных звеньев. В некоторых воплощениях изобретения Y' состоит из 8 нуклеотидных звеньев. В некоторых воплощениях изобретения Y' состоит из 9 нуклеотидных звеньев. В некоторых воплощениях изобретения Y' состоит из 1-10 нуклеотидных мономеров. В некоторых воплощениях изобретения Y' состоит из 1-10 или содержит 1-10 мономеров ДНК. В некоторых воплощениях изобретения Y' содержит от 1-9 звеньев ДНК, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 звеньев ДНК. В некоторых воплощениях изобретения Y' состоит из звеньев ДНК. В некоторых воплощениях изобретения Y' содержит по меньшей мере одно звено ЗНК, находящееся в альфа-L-конфигурации, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 звеньев ЗНК в альфа-L-конфигурации. В некоторых воплощениях изобретения Y' содержит по меньшей мере одно звено альфа-L-окси-ЗНК, или где все звенья ЗНК в альфа-L-конфигурации представляют собой звенья альфа-L-окси-ЗНК. В некоторых воплощениях изобретения число нуклеотидов, присутствующих в X'-Y'-Z', выбрано из группы, состоящей из (звенья аналогов нуклеотидов - участок Y' - звенья аналогов нуклеотидов) 1-8-1, 1-8-2, 2-8-1, 2-8-2, 3-8-3, 2-8-3, 3-8-2, 4-8-1, 4-8-2, 1-8-4, 2-8-4; или 1-9-1, 1-9-2, 2-9-1, 2-9-2, 2-9-3, 3-9-2, 1-9-3, 3-9-1, 4-9-1, 1-9-4; или 1-10-1, 1-10-2, 2-10-1, 2-10-2, 1-10-3, 3-10-1, 2-10-3, 3-10-2. В некоторых воплощениях изобретения число нуклеотидов в X'-Y'-Z' выбрано из группы, состоящей из 2-7-1, 1-7-2, 2-7-2, 3-7-3, 2-7-3, 3-7-2, 3-7-4 и 4-7-3. В некоторых воплощениях изобретения каждый из участков X' и Y' состоит из трех мономеров ЗНК, и участок Y' состоит из 8, либо 9, либо 10 нуклеотидных мономеров, предпочтительно мономеров ДНК. В некоторых воплощениях изобретения оба из X' и Z' состоят из двух звеньев ЗНК каждый и Y' состоит из 8 или 9 нуклеотидных звеньев, предпочтительно ДНК звеньев. В различных воплощениях изобретения другие гэммерные конструкции включают конструкции, где участки X' и/или Z' состоят из 3, 4, 5 или 6 аналогов нуклеотидов, таких как мономеры, содержащие сахар 2'-О-метоксиэтил-рибозу (2'-МОЕ), или мономеры, содержащие сахар 2'-фтор-дезоксирибозу, и участок Y' состоит из 8, 9, 10, 11 или 12 нуклеотидов, таких как мономеры ДНК, где участки X'-Y'-Z' имеют 3-9-3, 3-10-3, 5-10-5 или 4-12-4 мономеров. Дополнительные гэммерные конструкции раскрыты в документе WO 2007/146511A2, включенном в настоящий документ посредством ссылки.

Гэммеры ЗНК. Гэммер ЗНК представляет собой гэммерный олигомер (участок А), содержащий по меньшей мере один нуклеотид ЗНК. SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 40 представляют собой гэммерные олигомеры ЗНК. Олигомеры с непрерывной последовательностью из 10-16 нуклеотидов, комплементарной соответствующему отрезку длины SEQ ID NO: 33, или 34, или 45, могут также представлять собой гэммерные олигомеры, такие как гэммеры ЗНК.

Межнуклеотидные связи.

Нуклеотидные мономеры олигомеров (например, первый и второй участки), описанные в настоящем документе, соединяют вместе посредством межнуклеотидных связывающих групп. Целесообразно каждый мономер связывают с 3'-примыкающими мономерами посредством связывающей группы.

Обычному специалисту в данной области техники должно быть понятно, что в контексте настоящего изобретения 5'-мономер на конце олигомера не содержит 5'-связывающую группу, хотя он может содержать или не содержать 5'-концевую группу или связывающую группу для конъюгации.

Термины "связывающая группа" или "межнуклеотидная связь" предназначены для обозначения группы, способной к ковалентному связыванию вместе двух нуклеотидов. Конкретные и предпочтительные примеры включают фосфатные группы и фосфоротиоатные группы. Межнуклеотидную связь можно использовать взаимозаменяемо с межнуклеотидной связью.

Нуклеотиды олигомера по изобретению или его непрерывную нуклеотидную последовательность соединяют вместе посредством связывающих групп. Целесообразно каждый нуклеотид связывают с 3'-примыкающими нуклеотидами посредством связывающей группы.

Подходящие межнуклеотидные связи включают связи, перечисленные в пределах объема WO 2007/031091, например межнуклеотидные связи, перечисленные в первом параграфе с. 34 документа WO 2007/031091 (включенного в настоящий документ посредством ссылки). В некоторых воплощениях изобретения, где они представляют собой связи, отличающиеся от фосфодиэфирной связи(ей) участка В (где он присутствует), предпочтительно модифицировать межнуклеотидную связь из ее нормального фосфодиэфира с получением связи, более устойчивой к действию нуклеаз, такой как фосфоротиоат или боранофосфат, где эти две связи способны расщепляться РНКазой H, что также дает возможность антимисловое ингибирование при снижении экспрессии гена-мишени.

В некоторых воплощениях изобретения олигомер по настоящему изобретению содержит одну или более нуклеотидных связей, выбранных из группы, состоящей из фосфоротиоатной, фосфородитиоатной и боранофосфатной связей.

Предпочтительными могут быть межнуклеотидные связи, предложенные в настоящем документе, содержащие серу (S), такие как фосфоротиоат или фосфородитиоат. Фосфоротиоатные межнуклеотидные связи также предпочтительны, в частности, для первого участка, например, в гэммерах, миксмерах, антимисловых олигомерах, перекрывающих сплайсинг, и тоталмерах.

Термин "миксмер" относится к олигомерам, содержащим как встречающиеся в природе, так и не встречающиеся в природе нуклеотиды, где в противоположность гэммерам, тэйлмерам и хэдмерам от-

существует непрерывная последовательность из более чем 5, а в некоторых воплощениях изобретения не более чем 4, например не более 3, последовательных встречающихся в природе нуклеотидов, таких как звенья ДНК.

Термин "тоталмер" относится к однонитевому олигомеру, который содержит только не встречающиеся в природе нуклеозиды, такие как аналоги нуклеозидов с модифицированным сахаром.

Для гзпмеров межнуклеотидные связи в олигомере могут представлять собой, например, фосфоротиоатную или боранофосфатную, чтобы дать возможность расщепления РНК-мишени РНКазой N. Фосфоротиоат предпочтителен для улучшенной устойчивости к нуклеазам и по другим причинам, таким как простота получения.

В одном аспекте за исключением фосфодиэфирной связи между первым и вторым участками и обязательно внутри участка В остальные межнуклеотидные связи олигомера по изобретению, нуклеотиды и/или аналоги нуклеотидов связаны друг с другом посредством фосфоротиоатных групп. В некоторых воплощениях изобретения по меньшей мере 50%, например по меньшей мере 70%, например по меньшей мере 80%, например по меньшей мере 90%, например все, межнуклеотидные связи между нуклеозидами в первом участке отличаются от фосфодиэфира (фосфата), например, выбраны из группы, состоящей из фосфоротиоатной, фосфородитиоатной или боранофосфатной. В некоторых воплощениях изобретения по меньшей мере 50%, например по меньшей мере 70%, например по меньшей мере 80%, например по меньшей мере 90%, например все, межнуклеотидные связи между нуклеозидами в первом участке представляют собой фосфоротиоат.

WO 09124238 относится к олигомерным соединениям, имеющим по меньшей мере один бициклический нуклеозид, присоединенный к 3'- или 5'-концу посредством нейтральной межнуклеотидной связи. Олигомеры по изобретению могут, таким образом, иметь по меньшей мере один бициклический нуклеозид, присоединенный к 3'- или 5'-концу нейтральной межнуклеотидной связью, такой как один или более фосфотриэфир, метилфосфонат, ММ1, амид-3, формацеталь или тиоформацеталь. Остальные связи могут представлять собой фосфоротиоат.

Конъюгаты олигомеров (участок С).

Следующий аспект изобретения представляет собой конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, содержащий олигомер по изобретению и по меньшей мере одну нунуклеотидную или неполинуклеотидную группировку (С), ковалентно присоединенную к олигомеру (А), необязательно посредством линкерного участка, расположенного между непрерывной последовательностью олигомера и конъюгатной группировкой (В и/или Y).

Репрезентативные конъюгатные группировки, которые использованы с олигонуклеотидами, могут включать липофильные молекулы (ароматические и неароматические), включая стероидные молекулы; белки (например, антитела, ферменты, сывороточные белки); пептиды; витамины (водорастворимые или жирорастворимые); полимеры (водорастворимые или жирорастворимые); малые молекулы, включающие лекарственные средства, токсины, молекулы-репортеры и лиганды рецепторов; углеводные комплексы; комплексы, расщепляющие нуклеиновые кислоты; хелаторы металлов (например, порфирины, тексафирины, краун-эфиры и т.д.); интеркаляторы, включая гибридные фотонуклеазы/интеркаляторы; сшивающие агенты (например, фотоактивные, окислительно-восстановительно-активные) и их комбинации и производные. Различные подходящие конъюгатные группировки, их получение и связь с олигомерными соединениями предложены, например, в WO 93/07883 и в патенте US № 6395492, причем каждый из документов полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Конъюгаты олигонуклеотидов и их синтеза также описаны в исчерпывающих обзорах Manoharan, Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications, S.T. Crooke, ed., ch. 16, Marcel Dekker, Inc., 2001; и Manoharan, Antisense and Nucleic Acid Drug Development, 2002, 12, 103, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых воплощениях изобретения олигомер по изобретению направлен на печень, т.е. после системного введения соединение накапливается в клетках печени (таких как гепатоциты). Направление на печень можно значительно усилить путем присоединения конъюгатной группировки (С). Однако с целью получения максимальной эффективности олигомера часто желательно, чтобы конъюгатная (или направляющая группировка) была связана с олигомером посредством биорасщепляемого линкера (В), такого как нуклеотидфосфатный линкер. Таким образом, желательно использовать конъюгатную группировку, усиливающую захват и активность в гепатоцитах. Усиление активности может быть следствием усиленного захвата, либо может быть следствием усиленной эффективности соединения в гепатоцитах.

В некоторых воплощениях изобретения олигомерное соединение представляет собой олигомер ЗНК, такой как гзпмер, или, например, антисмысловой олигомер ЗНК (на который в настоящем документе могут ссылаться как на участок А), содержащий антисмысловой олигомер, необязательно биорасщепляемый линкер, такой как участок В, и углеводный конъюгат (на который могут ссылаться как на участок С). Антисмысловой олигомер ЗНК может составлять 7-30, например 8-26, нуклеозидов в длину, и он содержит по меньшей мере одно звено (нуклеозид) ЗНК.

В некоторых воплощениях изобретения конъюгат представляет собой или может содержать углевод, либо содержит углеводную группу. В некоторых воплощениях изобретения углевод выбран из груп-

пы, состоящей из галактозы, лактозы, *n*-ацетилгалактозамина, маннозы и маннозо-6-фосфата. В некоторых воплощениях изобретения конъюгатная группа представляет собой или может содержать маннозу или маннозо-6-фосфат. Углеводные конъюгаты можно применять для усиления доставки или активности в ряде тканей, таких как печень и/или мышцы. См., например, EP 1495769; WO 99/65925; Yang et al., *Bioconjug Chem.* (2009), 20(2): 213-21; Zatsepin & Oretskaya *Chem. Biodivers.* (2004), 1(10): 1401-17.

В некоторых воплощениях изобретения углеводная группировка представляет собой нелинейный углеводный полимер. В некоторых воплощениях изобретения олигомерное соединение представляет собой олигомер ЗНК, например антисмысловой олигомер ЗНК (на который в настоящем документе могут ссылаться как на участок А), содержащий антисмысловой олигомер, участок В, как определено в настоящем документе, и конъюгатную группировку, направленную на рецептор асиалогликопротеина, такую как группировка GalNAc (на которую могут ссылаться как на участок С). Углеводная группировка может быть мультивалентной, как, например, 2, 3, 4 или 4 идентичных или неидентичных углеводных группировки могут быть ковалентно соединены с олигомером необязательно посредством линкера или линкеров (таких как участок Y).

Конъюгатные группировки GalNAc.

В некоторых воплощениях изобретения углеводная группировка представляет собой нелинейный углеводный полимер. Углеводная группировка может быть, однако, мультивалентной, как, например, 2, 3, 4 или 4 идентичных или неидентичных углеводных группировки могут быть ковалентно соединены с олигомером необязательно посредством линкера или линкеров. В некоторых воплощениях в изобретении предложен конъюгат, содержащий олигомер по изобретению и углеводную конъюгатную группировку. В некоторых воплощениях в изобретении предложен конъюгат, содержащий олигомер по изобретению и конъюгатную группировку, направленную на группировку рецептора асиалогликопротеина, такую как группировка GalNAc, которая может формировать часть дополнительного участка (на который ссылаются как на участок С).

В изобретении также предложены антисмысловые олигонуклеотиды ЗНК, конъюгированные с группировкой, направленной на рецептор асиалогликопротеина. В некоторых воплощениях изобретения конъюгатная группировка (такая как третий участок или участок С) содержит группировку, направленную на рецептор асиалогликопротеина, такую как галактоза, галактозамин, *N*-формил-галактозамин, *N*-ацетилгалактозамин, *N*-пропионил-галактозамин, *N*-*n*-бутаноил-галактозамин и *N*-изобутаноилгалактозамин. В некоторых воплощениях изобретения конъюгат содержит галактозный кластер, такой как тример *N*-ацетилгалактозамина. В некоторых воплощениях изобретения конъюгатная группировка содержит GalNAc (*N*-ацетилгалактозамин), такой как моновалентный, двухвалентный, трехвалентный или четырехвалентный GalNAc. Трехвалентные конъюгаты GalNAc можно применять для направления соединения в печень. Конъюгаты GalNAc использованы с метилфосфонатом и антисмысловыми олигонуклеотидами пептидной нуклеиновой кислоты (ПНК) (например, US 5994517; и Hangeland et al., *Bioconjug. Chem.*, 1995 Nov-Dec, 6(6): 695-701) и siПНК (например, WO 2009/126933, WO 2012/089352 и WO 2012/083046). Ссылки на GalNAc и на конкретные конъюгаты, используемые там, включены в настоящий документ посредством ссылки. В WO 2012/083046 раскрыты siПНК с конъюгатными группировками GalNAc, содержащими расщепляемые фармакокинетические модуляторы, которые подходят для применения в настоящем изобретении, где предпочтительные фармакокинетические модуляторы представляют собой C<sub>16</sub> гидрофобные группы, такие как пальмитоил, гексадец-8-еноил, олеил, (9E,12E)-октадека-9,12-диеноил, диоктаноил и C<sub>16</sub>-C<sub>20</sub>-ацил. Расщепляемые фармакокинетические модуляторы '046 могут также представлять собой холестерин.

Направляющие группировки (конъюгатные группировки) могут быть выбраны из группы, состоящей из галактозы, галактозамина, *N*-формил-галактозамина, *N*-ацетилгалактозамина, *N*-пропионилгалактозамина, *N*-*n*-бутаноил-галактозамина, *N*-изобутаноилгалактозамина, галактозного кластера и тримера *N*-ацетилгалактозамина и могут иметь фармакокинетический модулятор, выбранный из группы, состоящей из гидрофобной группы, имеющей 16 или более атомов углерода, гидрофобной группы, имеющей 16-20 атомов углерода, пальмитоила, гексадец-8-еноила, олеила, (9E,12E)-октадека-9,12-диеноила, диоктаноила, C<sub>16</sub>-C<sub>20</sub>-ацила и холестерина. Некоторые кластеры GalNAc, раскрытые в '046, включают (E)-гексадец-8-еноила (C<sub>16</sub>), олеила (C<sub>18</sub>), (9E,12E)-октадека-9,12-диеноила (C<sub>18</sub>), октаноила (C<sub>8</sub>), додеканоила (C<sub>12</sub>), C<sub>20</sub>-ацила, C<sub>24</sub>-ацила, диоктаноила (2× C<sub>8</sub>). Направляющая группировка - направляющая группировка фармакокинетического модулятора может быть связана с полинуклеотидом посредством физиологически лабильной связи, либо, например, дисульфидной связи, либо полиэтиленгликолевого (ПЭГ) линкера. Изобретение также относится к применению фосфодиэфирных линкеров между олигомером и конъюгатной группой (в данном документе на них ссылаются как на участок В, и целесообразно они расположены между олигомером ЗНК и углеводной конъюгатной группой).

Для направления на гепатоциты в печени предпочтительный направляющий лиганд представляет собой галактозный кластер.

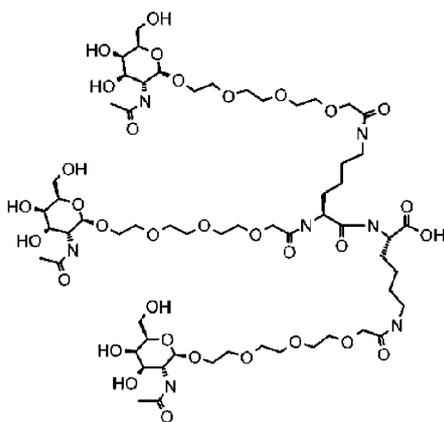
Галактозный кластер содержит молекулу, имеющую, например, содержащую от двух до четырех концевых производных галактозы. При использовании в настоящем документе термин "производное галактозы" включает и галактозу, и производные галактозы, обладающие средством к рецептору асиалог-

ликопротеина, равным или большим, чем сродство галактозы. Концевое производное галактозы присоединено к молекуле посредством его С-1 атома углерода. Рецептор асиалогликопротеина (ASGPr) экспрессируется в основном на гепатоцитах и связывает разветвленные гликопротеины с концевой галактозой. Предпочтительный галактозный кластер имеет три концевых галактозамина или производных галактозамина, каждое из которых обладает сродством к рецептору асиалогликопротеина. Более предпочтительный галактозный кластер имеет три концевых N-ацетил-галактозамина. Другие термины, общепринятые в данной области техники, включают трехантенную галактозу, трехвалентную галактозу и тример галактозы. Известно, что кластеры трехантенного производного галактозы связываются с ASGPr с большим сродством, чем производное галактозы, имеющее двухантенную и одноантенную структуру (Baenziger & Fiete, 1980, Cell, 22, 611-620; Connolly et al., 1982, 1, Biol. Chem., 257, 939-945). Для достижения нМ родства требуется мультивалентность. Согласно WO 2012/083046 присоединение одного производного галактозы, обладающего сродством к рецептору асиалогликопротеина не обеспечивает функциональную доставку полинуклеотида РНКi в гепатоциты *in vivo* при совместном введении с полимером доставки.

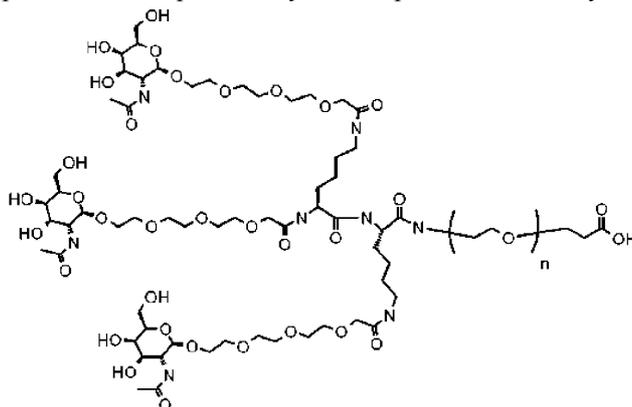
Галактозный кластер может содержать два или предпочтительно три производных галактозы, каждое из которых связано с центральной точкой разветвления. Производные галактозы присоединены к центральной точке разветвления посредством С-1 атомов углерода сахаридов. Производное галактозы предпочтительно связано с точкой разветвления посредством линкера или спейсера. Предпочтительный спейсер представляет собой гибкий гидрофильный спейсер (патент US 5885968; Biessen et al., J. Med. Chem., 1995, vol. 39, p. 1538-1546). Предпочтительный гибкий гидрофильный спейсер представляет собой ПЭГ спейсер. Предпочтительный ПЭГ спейсер представляет собой ПЭГЗ спейсер. Точка разветвления может представлять собой любую малую молекулу, которая дает возможность присоединения трех производных галактозы и дополнительно дает возможность присоединения точки разветвления к олигомеру. Иллюстративной группой точки разветвления является ди-лизин. Молекула ди-лизина содержит три аминных группы, посредством которых могут быть присоединены три производных галактозы и карбоксильная реакционная группа, посредством которой ди-лизин может быть присоединен к олигомеру. Присоединение точки разветвления к олигомеру может происходить посредством линкера или спейсера. Предпочтительный спейсер представляет собой гибкий гидрофильный спейсер. Предпочтительный гибкий гидрофильный спейсер представляет собой ПЭГ спейсер. Предпочтительный ПЭГ спейсер представляет собой ПЭГЗ спейсер (три этиленовых звена). Галактозный кластер может быть присоединен к 3'- или 5'-концу олигомера с использованием способов, известных в данной области техники.

Предпочтительное производное галактозы представляет собой N-ацетил-галактозамин (GalNAc). Другие сахараиды, обладающие сродством к рецептору асиалогликопротеина, могут быть выбраны из перечня, содержащего галактозамин, N-н-бутаноилгалактозамин и N-изо-бутаноилгалактозамин. Значения сродства различных производных галактозы к рецептору асиалогликопротеина изучено (см., например, Jobst, S.T. & Drickamer, K., J.B.C., 1996, 271, 6686) или легко определяется с использованием способов, характерных в данной области техники.

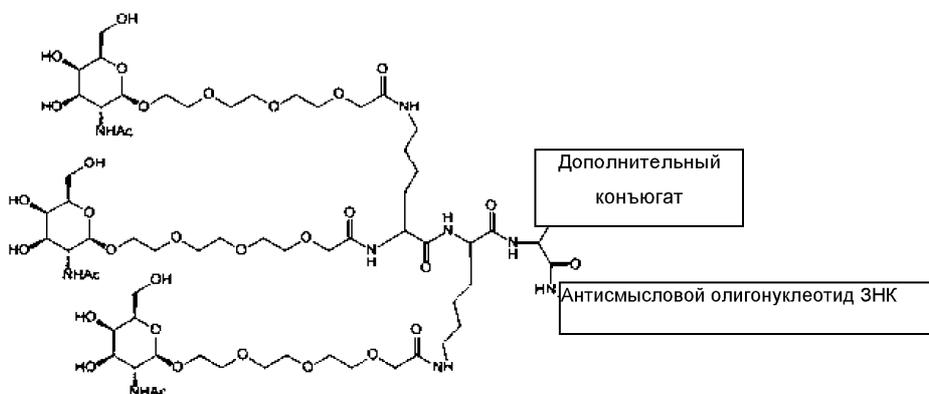
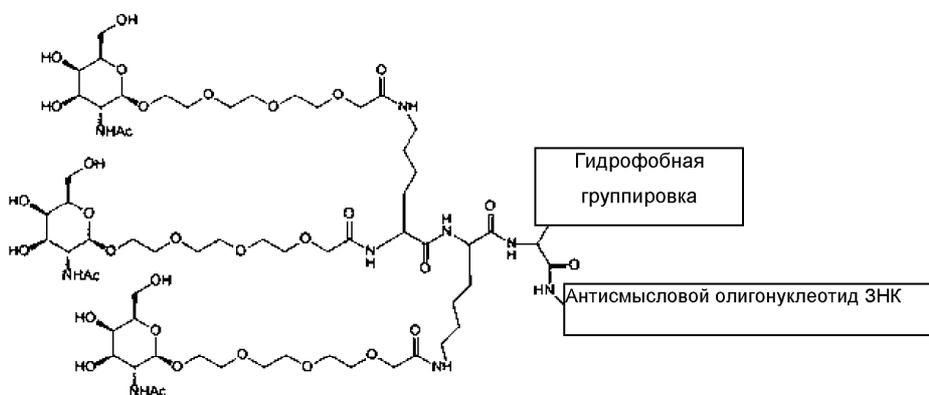
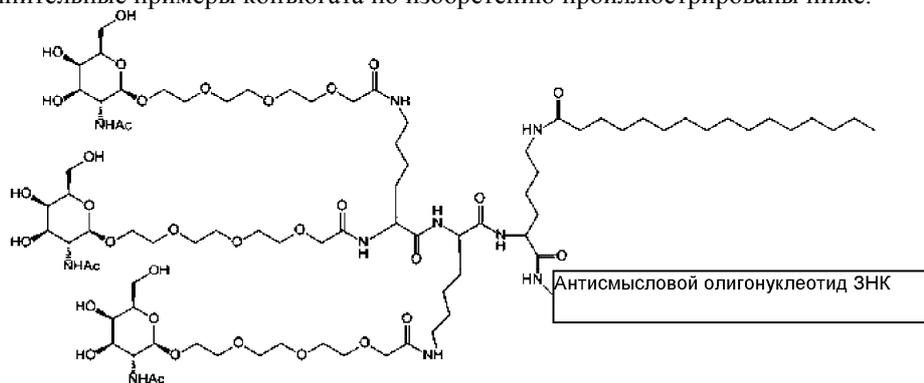
Одно воплощение галактозного кластера.

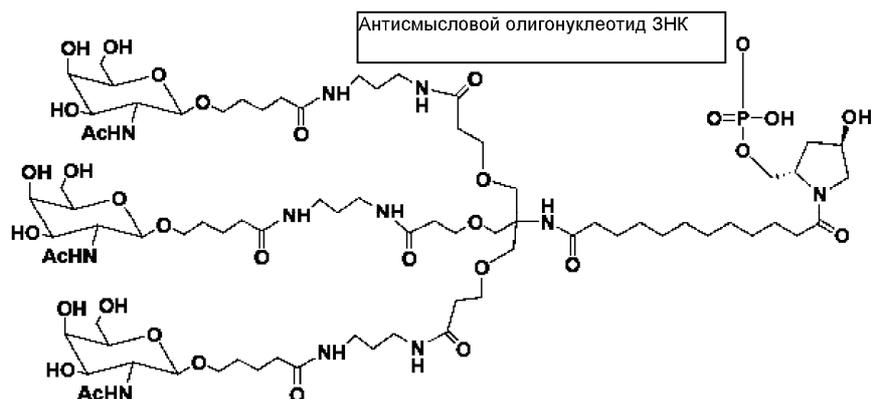


Галактозный кластер с ПЭГ спейсером между точкой разветвления и нуклеиновой кислотой.



Дополнительные примеры конъюгата по изобретению проиллюстрированы ниже.





При использовании в описанных выше конъюгатах кластера GalNAc гидрофобная или липофильная (или дополнительная конъюгатная) группировка (т.е. фармакокинетические модуляторы) является необязательной при использовании олигомеров ЗНК, таких как антисмысловые олигонуклеотиды ЗНК.

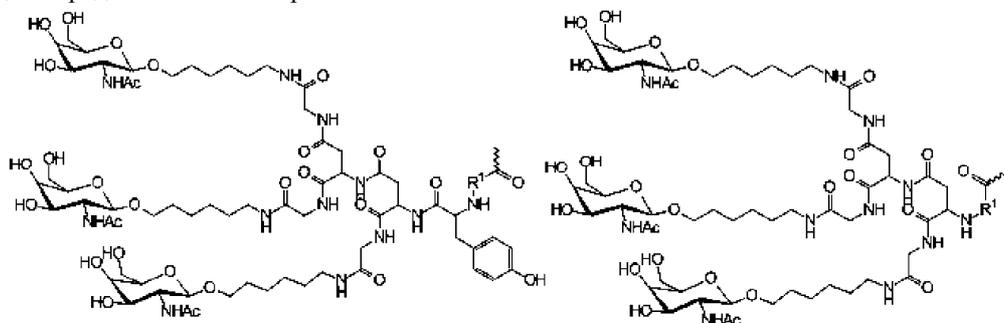
На фигурах показаны конкретные кластеры GalNAc, используемые в настоящем исследовании, Conj 1, 2, 3, 4 и Conj1a, 2a, 3a и 4a (которые показаны с необязательным линкером С6, соединяющим кластер GalNAc в олигомере).

В предпочтительном воплощении изобретения конъюгатная группировка конъюгата антисмыслового олигонуклеотида содержит или состоит из Conj 1,2,3, 4 и Conj1a, 2a, 3a и 4a. Наиболее предпочтительно конъюгатная группировка содержит или состоит из Conj 2a.

В другом предпочтительном воплощении изобретения конъюгат антисмыслового олигонуклеотида выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24.

Каждая углеводная группировка кластера GalNAc (например, GalNAc) может быть, таким образом, соединена с олигомером посредством спейсера, такого как (поли)этиленгликолевый (ПЭГ) линкер, такой как ди-, три-, тетра-, пента-, гексаэтиленгликолевый линкер. Как показано выше, ПЭГ группировка формирует спейсер между галактозной сахарной группировкой и пептидным (показан трилизин) линкером.

В некоторых воплощениях изобретения кластер GalNAc содержит пептидный линкер, например, трипептид Туг-Asp(Asp) или дипептид Asp(Asp), который присоединен к олигомеру (или к участку Y или участку B) посредством бирадикального линкера, например кластера GalNAc, который может содержать следующие бирадикальные линкеры:



$R^1$  представляет собой бирадикал, предпочтительно выбранный из  $-C_2H_4-$ ,  $-C_3H_6-$ ,  $-C_4H_8-$ ,  $-C_5H_{10}-$ ,  $-C_6H_{12}-$ , 1,4-циклогексила ( $-C_6H_{10}-$ ), 1,4-фенила ( $-C_6H_4-$ ),  $-C_2H_4OC_2H_4-$ ,  $-C_2H_4(OC_2H_4)_2-$  или  $-C_2H_4(OC_2H_4)_3-$ ,  $C(O)CH_2-$ ,  $-C(O)C_2H_4-$ ,  $-C(O)C_3H_6-$ ,  $-C(O)C_4H_8-$ ,  $-C(O)C_5H_{10}-$ ,  $-C(O)C_6H_{12}-$ , 1,4-циклогексила ( $-C(O)C_6H_{10}-$ ), 1,4-фенила ( $-(O)C_6H_4-$ ),  $-C(O)C_2H_4OC_2H_4-$ ,  $-C(O)C_2H_4(OC_2H_4)_2-$  или  $-C(O)C_2H_4(OC_2H_4)_3-$ .

В некоторых воплощениях изобретения  $R^1$  представляет собой бирадикал, предпочтительно выбранный из  $-C_2H_4-$ ,  $-C_3H_6-$ ,  $-C_4H_8-$ ,  $-C_5H_{10}-$ ,  $-C_6H_{12}-$ , 1,4-циклогексила ( $-C_6H_{10}-$ ), 1,4-фенила ( $-C_6H_4-$ ),  $-C_2H_4OC_2H_4-$ ,  $-C_2H_4(OC_2H_4)_2-$  или  $-C_2H_4(OC_2H_4)_3-$ .

Углеводный конъюгат (например, GalNAc) или углеводная линкерная группировка (например, группировка углевод-ПЭГ) могут быть ковалентно соединены (связаны) с олигомером посредством группы точки разветвления, такой как аминокислота или пептид, который целесообразно содержит две или более аминных групп (например, 3, 4 или 5), таких как лизин, ди-лизин либо три-лизин или тетра-лизин. Молекула три-лизина содержит четыре аминные группы, посредством которых могут быть присоединены три углеводные конъюгатные группы, такие как производные галактозы (например, GalNAc), и дополнительный конъюгат, такой как гидрофобная или липофильная группировка/группа, и карбоксильную реакционную группу, посредством которой три-лизин может быть присоединен к олигомеру. Дополнительный конъюгат, такой как липофильная/гидрофобная группировка, может быть присоединен к остатку лизина, присоединенному к олигомеру.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что конъюгаты GalNAc для применения

с олигомерами ЗНК не требуют фармакокинетического модулятора (как описано ниже) и в некоторых воплощениях изобретения сам по себе конъюгат GalNAc не присоединен ковалентно к липофильной или гидрофобной группировке, такой как группировки, описанные в настоящем документе, например, не содержит C8-C36 жирную кислоту или стерин. Таким образом, в изобретении также предложены конъюгаты олигомера ЗНК с GalNAc, которые не содержат липофильный или гидрофобный фармакокинетический модулятор или конъюгатную группировку/группу.

Фармакокинетические модуляторы.

Соединение по изобретению может дополнительно содержать одну или более дополнительных конъюгатных группировок, из которых особый интерес представляют липофильные или гидрофобные группировки, например, когда конъюгатная группа представляет собой углеводную группировку. Такие липофильные или гидрофобные группировки могут действовать как фармакокинетические модуляторы и могут быть ковалентно связаны либо с углеводным конъюгатом, либо с линкером, связывающим углеводный конъюгат с олигомером, либо с линкером, связывающим множественные углеводные конъюгаты (мультивалентные конъюгаты), либо с олигомером, необязательно посредством линкера, такого как биорасщепляемый линкер.

Таким образом, олигомер или конъюгатная группировка могут содержать фармакокинетический модулятор, такой как липофильные или гидрофобные группировки. Такие группировки раскрыты в контексте конъюгатов siРНК в WO 2012/082046. Гидрофобная группировка может содержать C<sub>8</sub>-C<sub>36</sub> жирную кислоту, которая может быть насыщенной или ненасыщенной. В некоторых воплощениях изобретения можно использовать C<sub>10</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub>, C<sub>22</sub>, C<sub>24</sub>, C<sub>26</sub>, C<sub>28</sub>, C<sub>30</sub>, C<sub>32</sub> и C<sub>34</sub>. Гидрофобная группа может иметь 16 или более атомов углерода. Иллюстративные подходящие гидрофобные группы могут быть выбраны из группы, содержащей: стерин, холестерин, пальмитоил, гексадек-8-еноил, олеил, (9E,12E)-октадека-9,12-диеноил, диоктаноил и C<sub>16</sub>-C<sub>20</sub>-ацил. Согласно WO'346 гидрофобные группы, имеющие менее 16 атомов углерода, менее эффективны при усилении направленности полинуклеотида, но их можно использовать во множестве копий (например, 2×, например 2× C<sub>8</sub> или C<sub>10</sub>, C<sub>12</sub> или C<sub>14</sub>) для усиления эффективности. Фармакокинетические модуляторы, полезные в качестве направляющих полинуклеотид группировок, могут быть выбраны из группы, состоящей из холестерина, алкильной группы, алкенильной группы, алкинильной группы, арильной группы, аралкильной группы, аралкенильной группы и аралкинильной группы, каждая из которых может быть нормальной, разветвленной или циклической. Фармакокинетические модуляторы предпочтительно представляют собой углеводороды, содержащие только атомы углерода и водорода. Тем не менее могут быть допустимы замещения или гетероатомы, сохраняющие гидрофобность, например, атом фтора.

Липофильные конъюгаты.

В некоторых воплощениях изобретения конъюгатная группа представляет собой или может содержать липофильную группировку, такую как стерин (например, холестерин, холестерил, холестанол, стигмастерин, холановую кислоту и эргостерин). В некоторых воплощениях изобретения конъюгат представляет собой или содержит токоферол (примерами являются Conj 6 и Conj 6a на фиг. 2). В некоторых воплощениях изобретения конъюгат представляет собой или может содержать холестерин (примерами являются Conj 5 и Conj 5a на фиг. 2).

В некоторых воплощениях изобретения конъюгат представляет собой или может содержать липид, фосфолипид или липофильный спирт, такой как катионный липид, нейтральный липид, сфинголипид, и жирную кислоту, такую как стеариновая, олеиновая, элаидиновая, линолевая, линоленэлаидиновая, линоленовая и миристиновая кислота. В некоторых воплощениях изобретения жирная кислота содержит C<sub>4</sub>-C<sub>30</sub> насыщенную или ненасыщенную алкильную цепь. Алкильная цепь может быть нормальной или разветвленной.

Липофильные конъюгатные группировки можно использовать, например, для измерения гидрофильной природы олигомерного соединения и усиления проникновения в клетку.

Липофильные группировки включают, например, стерины, станола и стероиды и родственные соединения, такие как холестерин (патент US № 4958013; и Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1989, 86, 6553), тиохолестерин (Oberhauser et al., Nucl. Acids. Res., 1992, 20, 533), ланостерин, копростанол, стигмастерин, эргостерин, кальциферол, холевая кислота, дезоксихолевая кислота, эстрон, эстрадиол, эстратриол, прогестерон, стильбэстрол, тестостерон, андростерон, дезоксикортикостерон, кортизон, 17-гидроксикортикостерон, их производные и т.п. В некоторых воплощениях изобретения конъюгат может быть выбран из группы, состоящей из холестерина, тиохолестерина, ланостерина, копростанола, сигмастерина, эргостерина, кальциферола, холевой кислоты, дезоксихолевой кислоты, эстрона, эстрадиола, эстратриола, прогестерона, стильбэстрола, тестостерона, андростерона, дезоксикортикостерона, кортизона и 17-гидроксикортикостерона. Другие липофильные конъюгатные группировки включают алифатические группы, такие как, например, прямоцепочечные, разветвленные и циклические алкилы, алкенилы и алкинилы. Алифатические группы могут иметь, например, от 5 до приблизительно 50, от 6 до приблизительно 50, от 8 до приблизительно 50 или от 10 до приблизительно 50 атомов углерода. Примеры алифатических групп включают ундецил, додецил, гексадецил, гептадецил, октадецил, нонадецил, терпены, борнил, адамантил, их производные и т.п. В некоторых воплощениях изобретения один или

более атомов углерода в алифатической группе могут быть замещены гетероатомом, таким как O, S или N (например, геранилоксигексил). Дополнительные подходящие липофильные конъюгатные группировки включают алифатические производные глицеринов, такие как алкилглицерины, бис(алкил)глицерины, трис(алкил) глицерины, моноглицериды, диглицериды и триглицериды. В некоторых воплощениях изобретения липофильный конъюгат представляет собой ди-гексилдецил-рац-глицерин или 1,2-ди-О-гексилдецил-рац-глицерин (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18, 3777) или их фосфонаты. Насыщенные и ненасыщенные жирные функциональные группы, такие как, например, жирные кислоты, жирные спирты, жирные сложные эфиры и жирные амины, могут также служить в качестве липофильных конъюгатных группировок. В некоторых воплощениях изобретения жирные функциональные группы могут содержать от приблизительно 6 атомов углерода до приблизительно 30 или от приблизительно 8 до приблизительно 22 атомов углерода. Примеры жирных кислот включают каприновую, каприловую, лауриновую, пальмитиновую, миристиновую, стеариновую, олеиновую, линолевую, линоленовую, арахидоновую, эйкозеновую кислоты и т.п.

В дополнительных воплощениях изобретения липофильные конъюгатные группы могут представлять собой полициклические ароматические группы, имеющие от 6 до приблизительно 50, от 10 до приблизительно 50 или от 14 до приблизительно 40 атомов углерода. Иллюстративные полициклические ароматические группы включают пирены, пурины, акридины, ксантины, флуорены, фенантроны, антрацены, хинолины, изохинолины, нафталины, их производные и т.п. Другие подходящие липофильные конъюгатные группировки включают ментолы, тритилы (например, диметокситритил (DMT)), феноксазины, липоевую кислоту, фосфолипиды, простые эфиры, тиоэфиры (например, гексил-S-тримитилтиол), их производные и т.п. Получение липофильных конъюгатов олигомерных соединений широко описано в данной области техники, например, в статьях Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.*, 1991, 10, 1111; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259, 327; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75, 49; Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264, 229; и Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651.

Олигомерные соединения, содержащие конъюгатные группировки, обладающие сродством к липопротеину низкой плотности (ЛПНП), могут способствовать обеспечению эффективной системы направленной доставки. Высокие уровни экспрессии рецепторов ЛПНП на опухолевых клетках делает ЛПНП привлекательным носителем для селективной доставки лекарственных средств в эти клетки (Rump et al., *Bioconjugate Chem.*, 1998, 9, 341; Firestone, *Bioconjugate Chem.*, 1994, 5, 105; Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264, 229). Группировки, обладающие сродством к ЛПНП, включают многие липофильные группы, такие как стероиды (например, холестерин), жирные кислоты, их производные и комбинации. В некоторых воплощениях изобретения конъюгатные группировки, обладающие сродством к ЛПНП, могут представлять собой диолеиловые эфиры холевых кислот, таких как хенодезоксихолева кислота и литохолева кислота.

В некоторых воплощениях изобретения липофильные конъюгаты могут представлять собой или могут включать биотин. В некоторых воплощениях изобретения липофильные конъюгаты могут представлять собой или могут содержать глицерид или сложный эфир глицерида.

Липофильные конъюгаты, такие как стерины, станоли и станины, такие как холестерин или такие, как раскрыто в настоящем документе, можно использовать для усиления доставки олигонуклеотида, например, в печень (в характерном случае в гепатоциты).

В предпочтительном воплощении изобретения конъюгатная группировка конъюгата антисмыслового олигонуклеотида содержит или состоит из Conj 5, 5a, 6 или 6a. Более предпочтительно конъюгатная группировка содержит или состоит из Conj 5a.

В другом предпочтительном воплощении изобретения конъюгат антисмыслового олигонуклеотида выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 41, 42 и 43.

Приведенные ниже ссылки также относятся к применению липофильных конъюгатов: Kobylanska et al., *Acta Biochim Pol.* (1999), 46(3): 679-91; Felber et al., *Biomaterials* (2012), 33(25): 599-65; Grijalvo et al., *J. Org. Chem.* (2010), 75(20): 6806-13; Koufaki et al., *Curr. Med. Chem.* (2009), 16(35): 4728-42; Godeau et al., *J. Med. Chem.* (2008), 51(15): 4374-6.

Линкеры (например, участок В или Y).

Связь или линкер представляет собой соединение между двумя атомами, которое связывает одну интересующую химическую группу или сегмент с другой интересующей химической группой или сегментом посредством одной или более ковалентных связей. Конъюгатные группировки (или направляющие или блокирующие группировки) могут быть присоединены к олигомерному соединению непосредственно или посредством связывающей группировки (линкерной или привязывающей), линкера. Линкеры представляют собой бифункциональные группировки, служащие для ковалентного соединения третьего участка, например конъюгатной группировки, с олигомерным соединением (например, с участком А). В некоторых воплощениях изобретения линкер содержит цепную структуру олигомера из повторяющихся звеньев, таких как этиленгликолевые или аминокислотные звенья. Линкер может иметь по меньшей мере две функциональные группы, одну для присоединения к олигомерному соединению, а другую для присоединения к конъюгатной группировке. Примеры функциональных групп линкера могут быть электрофильными для взаимодействия с нуклеофильными группами на олигомере или конъюгатной группиров-

ке или нуклеофильными для взаимодействия с электрофильными группами. В некоторых воплощениях изобретения функциональные группы линкера включают amino, гидроксил, карбоновую кислоту, тиол, фосфорамидат, фосфоротиоат, фосфат, фосфит, ненасыщенные связи (например, двойные или тройные связи) и т.п. Некоторые примеры линкеров включают 8-амино-3,6-диоксаоктановую кислоту (ADO), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), 6-аминогексановую кислоту (АНЕХ или АНА), 6-аминогексилокси, 4-аминомасляную кислоту, 4-аминоциклогексилкарбоновую кислоту, сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксо-(6-амидо-капроат) (LCSMCC), сукцинимидил-мета-малеимидо-бензоилат (MBS), сукцинимидил-N-ε-малеимидо-капроилат (EMCS), сукцинимидил-6-(β-малеимидо-пропионамидо)гексаноат (SMPH), сукцинимидил-N-(α-малеимидоацетат) (AMAS), сукцинимидил-4-(пара-малеимидофенил)бутират (SMPB), β-аланин (β-ALA), фенилглицин (PHG), 4-аминоциклогексановую кислоту (ACHC), β-(циклопропил)аланин (β-CYPR), аминокислоту додекановую кислоту (ADC), аллилендиолы, полиэтиленгликоли, аминокислоты и т.п.

В данной области техники известно широкое разнообразие дополнительных линкерных групп, которые могут быть полезны при присоединении конъюгатных группировок к олигомерным соединениям. Обзор многих из полезных линкерных групп можно найти, например, в кн. *Antisense Research & Applications*, S.T. Crooke & B. Lebleu, eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1993, p. 303-350. Дисульфидная связь использована для связывания 3'-конца олигонуклеотида с пептидом (Corey et al., *Science* 1987, 238, 1401; Zuckermann et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110, 1614; и Corey et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 8524). В статье Nelson et al., *Nucl. Acids Res.*, 1989, 17, 7187 описан связывающий реагент для присоединения биотина к 3'-концу олигонуклеотида. Этот реагент N-Fmoc-O-DMT-3-амино-1,2-пропандиол имеется в продаже от компании Clontech Laboratories (Пало Алто, штат Калифорния) под названием 3'-Amine. Он также имеется в продаже под названием 3'-Amino-Modifier Reagent от компании Glen Research Corporation (Стерлинг, штат Вирджиния). Этот реагент также использовали для связывания пептида с олигонуклеотидом, как описано в статье Judy et al., *Tetrahedron Letters*, 1991, 32, 879. Подобный коммерческий реагент для связывания с 5'-концом олигонуклеотида представляет собой 5'-Amino-Modifier C6. Эти реагенты имеются в продаже от компании Glen Research Corporation (Стерлинг, штат Вирджиния). Эти или подобные соединения были использованы исследователями Krieg et al., *Antisense Research and Development* 1991, 1, 161, для связывания флуоресцеина с 5'-концом олигонуклеотида. Другие соединения, такие как акридин, присоединены к 3'-концевой фосфатной группе олигонуклеотида посредством полиметиленовой связи (Asseline et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1984, 81, 3297). Любые из описанных выше групп можно использовать в виде отдельного линкера или в комбинации с одним или более дополнительных линкеров.

Линкеры и их применение при получении конъюгатов олигомерных соединений предложено на уровне техники, например, в документах WO 96/11205; и WO 98/52614; и патентах US № 4948882; 5525465; 5541313; 5545730; 5552538; 5580731; 5486603; 5608046; 4587044; 4667025; 5254469; 5245022; 5112963; 5391723; 5510475; 5512667; 5574142; 5684142; 5770716; 6096875; 6335432 и 6335437, WO 2012/083046, каждый из которых полностью включен посредством ссылки.

При использовании в настоящем документе физиологически лабильная связь представляет собой лабильную связь, которая является расщепляемой в условиях, в норме встречающихся или аналогичных встречающимся в организме млекопитающего (также называемую расщепляемым линкером, проиллюстрированным в качестве участка В на фиг. 12 и 13). Физиологические лабильные связывающие группы выбраны из групп, претерпевающих химическое преобразование (например, расщепление) при нахождении в определенных физиологических условиях. Внутриклеточные условия млекопитающих включают химические условия, такие как pH, температура, окислительные или восстановительные условия или агенты, и концентрацию соли, обнаруживаемые или аналогичные встречающимся в клетках млекопитающих. Внутриклеточные условия млекопитающих также включают наличие ферментативной активности, в норме присутствующей в клетке млекопитающего, например, активности протеолитических или гидролитических ферментов. В некоторых воплощениях изобретения расщепляемый линкер чувствителен к нуклеазе (нуклеазам), которая может, например, экспрессироваться в клетке-мишени, и как таковой, как подробно описано в настоящем документе, линкер может представлять собой короткий участок (например, 1-10) нуклеозидов, связанных фосфодиэфирными связями, таких как нуклеозиды ДНК.

Химическое преобразование (расщепление лабильной связи) может быть инициировано путем добавления в клетку фармацевтически приемлемого агента или может происходить спонтанно, когда молекула, содержащая лабильную связь, достигает соответствующего внутри- и/или внеклеточного окружения. Например, pH-лабильная связь может расщепляться при проникновении молекулы в подкисленную эндосому. Таким образом, pH-лабильную связь можно рассматривать как эндосомно расщепляемую связь. Ферментативно расщепляемые связи могут расщепляться под действием ферментов, например, присутствующих в эндосоме, либо в лизосоме, либо в цитоплазме. Дисульфидная связь может расщепляться при проникновении молекулы в большей степени восстанавливающую среду клеточной цитоплазмы. Таким образом, дисульфид можно рассматривать как цитоплазматически расщепляемую связь. При использовании в настоящем документе pH-лабильная связь представляет собой лабильную связь, которая селективно расщепляется в кислых условиях (pH менее 7). Такие связи могут также называться

эндосомно лабильными связями, поскольку клеточные эндосомы и лизосомы имеют рН менее 7.

Биорасщепляемые конъюгаты, связанные с олигомером.

Олигомерное соединение может необязательно содержать второй участок (участок В), расположенный между олигомером (на который ссылаются как на участок А) и конъюгатом (на который ссылаются как на участок С) (иллюстрации см. на фиг. 12 и 13). Участок В может представлять собой линкер, такой как расщепляемый линкер (на который также ссылаются как на физиологически лабильную связь). Чувствительные к нуклеазам физиологически лабильные связи следующие. В некоторых воплощениях изобретения олигомер (на который также ссылаются как на олигомерное соединение) по изобретению (или конъюгат) содержит три участка:

i) первый участок (участок А), содержащий 10-18 смежных нуклеотидов;  
 ii) второй участок (участок В), содержащий биорасщепляемый линкер;  
 iii) третий участок (С), содержащий конъюгатную группировку, направляющую группировку, активационную группировку, где третий участок ковалентно связан со вторым участком.

В некоторых воплощениях изобретения участок В может представлять собой нуклеотидфосфатный линкер. Например, такие линкеры можно использовать, когда конъюгат представляет собой липофильные конъюгаты, такие как липид, жирная кислота, стерин, такой как холестерин или токоферол. Нуклеотидфосфатные линкеры можно также использовать для других конъюгатов, например углеводных конъюгатов, таких как GalNAc.

Пептидные линкеры.

В некоторых воплощениях изобретения биорасщепляемый линкер (участок В) представляет собой пептид, такой как трилизиновый пептидный линкер, который можно использовать в полиGalNAc конъюгате, таком как триGalNAc конъюгате. См. также пептидные бирадикалы, упомянутые в настоящем документе.

Другие линкеры, известные в данной области техники, которые можно использовать, включают дисульфидные линкеры.

Нуклеотидфосфатные линкеры.

В некоторых воплощениях изобретения участок В содержит 1-6 нуклеотидов, ковалентно связанных с 5' или 3'-нуклеотидом первого участка, например, посредством межнуклеозидной связывающей группы, такой как фосфодиэфирная связь, где либо

а) межнуклеозидная связь между первым и вторым участком представляет собой фосфодиэфирную связь, а нуклеозид второго участка, (например, непосредственно) примыкающий к первому участку, представляет собой либо ДНК, либо РНК; и/или

б) по меньшей мере 1 нуклеозид второго участка представляет собой связанный фосфодиэфирной связью нуклеозид ДНК или РНК;

В некоторых воплощениях изобретения участок А и участок В формируют одну непрерывную нуклеотидную последовательность из 12-22 нуклеотидов в длину.

В некоторых аспектах межнуклеозидную связь между первым и вторым участками можно рассматривать как часть второго участка.

В некоторых воплощениях изобретения между вторым и третьим участками находится фосфорсодержащая связывающая группа. Фосфорная связывающая группа может, например, представлять собой фосфатную (фосфодиэфирную), фосфоротиоатную, фосфородитиоатную или боранофосфатную группу. В некоторых воплощениях изобретения данная фосфоросодержащая связывающая группа расположена между вторым участком и линкерным участком, который присоединен к третьему участку. В некоторых воплощениях изобретения фосфатная группа представляет собой фосфодиэфир.

Таким образом, в некоторых аспектах олигомерное соединение содержит по меньшей мере две фосфодиэфирные группы, где по меньшей мере одна представляет собой группу в соответствии с приведенным выше изложением сущности изобретения, а другая расположена между вторым и третьим участками, необязательно между линкерной группой и вторым участком.

В некоторых воплощениях изобретения третий участок представляет собой активационную группу, такую как активационная группа для применения при конъюгации. В данном аспекте в изобретении также предложены активированные олигомеры, содержащие участок А и В и активационную группу, например промежуточное соединение, которое подходит для последующего связывания с третьим участком, например, подходящим для конъюгации.

В некоторых воплощениях изобретения третий участок представляет собой реакционную группу, такую как реакционная группа для применения при конъюгации. В данном аспекте в изобретении также предложены олигомеры, содержащие участок А и В и реакционную группу, например промежуточное соединение, которое подходит для последующего связывания с третьим участком, например, подходящим для конъюгации. Реакционная группа может в некоторых воплощениях изобретения содержать амин спиртовой группы, такой как аминная группа.

В некоторых воплощениях изобретения участок А содержит по меньшей мере одну, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 межнуклеозидную связь, отличающуюся от фосфодиэфирной, такую как межнуклеозидные связи, которые (необязательно независимо) выбраны из

группы, состоящей из фосфоротиоатной, фосфородитиоатной и боранофосфатной, и метилфосфатной, такого как фосфоротиоатной. В некоторых воплощениях изобретения участок А содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь. В некоторых воплощениях изобретения по меньшей мере 50%, например по меньшей мере 75%, например по меньшей мере 90%, например все межнуклеозидные связи в пределах участка А отличаются от фосфодиэфирных, например представляют собой фосфоротиоатные связи. В некоторых воплощениях изобретения все межнуклеозидные связи в участке А отличаются от фосфодиэфирных.

В некоторых воплощениях изобретения олигомерное соединение представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, такой как конъюгат антисмыслового олигонуклеотида. Антисмысловой олигонуклеотид может представлять собой или может содержать первый участок и необязательно второй участок. В этом аспекте в некоторых воплощениях изобретения участок В может формировать часть непрерывной последовательности нуклеотидных оснований, комплементарной (нуклеиновокислотной) мишени. В других воплощениях изобретения в участке В может отсутствовать комплементарность мишени.

Альтернативно в некоторых воплощениях в изобретении предложен олигонуклеотид (например, антисмысловой олигонуклеотид), связанный не фосфодиэфирной связью, такой как фосфоротиоатная связь, который имеет по меньшей мере один концевой (5' и/или 3') нуклеозид ДНК или РНК, связанный с примыкающим нуклеозидом олигонуклеотида посредством фосфодиэфирной связи, где концевой нуклеозид ДНК или РНК дополнительно ковалентно связан с конъюгатной группировкой, направляющей группировкой или блокирующей группировкой, необязательно посредством линкерной группировки.

В некоторых воплощениях изобретения олигомерное соединение содержит антисмысловой олигонуклеотид, такой как конъюгат антисмыслового олигонуклеотида. Антисмысловой олигонуклеотид может представлять собой или может содержать первый участок и необязательно второй участок. В данном аспекте в некоторых воплощениях изобретения участок В может формировать часть непрерывной последовательности нуклеотидных оснований, комплементарной (нуклеиновокислотной) мишени. В других воплощениях изобретения в участке В может отсутствовать комплементарность мишени.

В некоторых воплощениях изобретения по меньшей мере два последовательных нуклеозида второго участка представляют собой нуклеозиды ДНК (например, по меньшей мере 3, или 4, или 5 последовательных нуклеотидов ДНК).

В таком воплощении изобретения олигонуклеотид по изобретению может быть описан согласно следующей формуле:



где А представляет собой участок А,

PO представляет собой фосфодиэфирную связь,

В представляет собой участок В,

Y представляет собой необязательную связывающую группу, и

X представляет собой конъюгатную, направляющую, блокирующую группу или реакционную или активационную группу.

В некоторых воплощениях изобретения участок В содержит 3'-5' или 5'-3'

i) фосфодиэфирную связь с 5'- или 3'-нуклеозидом участка А;

ii) нуклеозид ДНК или РНК, такой как нуклеозид ДНК; и

iii) дополнительную фосфодиэфирную связь



Дополнительная фосфодиэфирная связь связывает нуклеозид участка В с одним или более дополнительных нуклеозидов, таких как один или более нуклеозидов ДНК или РНК, или может связываться с X (представляет собой конъюгатную, направляющую или блокирующую группу или реакционную или активационную группу) необязательно посредством связывающей группы (Y).

В некоторых воплощениях изобретения участок В содержит 3'-5' или 5'-3'

i) фосфодиэфирную связь с 5' или 3'-нуклеозидом участка А;

ii) 2-10 связанных фосфодиэфирной связью нуклеозидов ДНК или РНК, таких как нуклеозид ДНК; и необязательно

iii) дополнительную фосфодиэфирную связь



где А представляет собой участок А,

[PO-B]<sub>n</sub> представляет собой участок В, где n равно 1-10, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10,

PO представляет собой необязательную фосфодиэфирную связывающую группу между участком В и X (или Y, если присутствует).

В некоторых воплощениях изобретения в изобретении предложены соединения в соответствии с одной из (или содержащие одну из) следующих формул:

5' [Участок А]-РО-[участок В] 3' –Y-X  
 5' [Участок А]-РО-[участок В]-РО 3' –Y-X  
 5' [Участок А]-РО-[участок В] 3' – X  
 5' [Участок А] – РО – [участок В] –РО 3' – X  
 3' [Участок А]-РО-[участок В] 5' –Y-X  
 3' [Участок А]-РО-[участок В]-РО 5' –Y-X  
 3' [Участок А]-РО-[участок В] 5' – X  
 3' [Участок А]-РО-[участок В]-РО 5' – X

Участок В может, например, содержать или состоять из

5' ДНК 3'  
 3' ДНК 5'  
 5' ДНК-РО-ДНК 3'  
 3' ДНК-РО-ДНК 5'  
 5' ДНК-РО-ДНК-РО-ДНК 3'  
 3' ДНК-РО-ДНК-РО-ДНК 5'  
 5' ДНК-РО-ДНК-РО-ДНК-РО-ДНК 3'  
 3' ДНК-РО-ДНК-РО-ДНК-РО-ДНК 5'  
 5' ДНК-РО-ДНК-РО-ДНК-РО-ДНК-РО-ДНК 3'  
 3' ДНК-РО-ДНК-РО-ДНК-РО-ДНК-РО-ДНК 5'

Должно быть понятно, что в связанных фосфатной связью биорасщепляемых линкерах можно использовать нуклеозиды, отличающиеся от ДНК и РНК. Биорасщепляемые нуклеотидные линкеры могут быть идентифицированы с использованием анализов в примере 6.

В некоторых воплощениях изобретения соединение по изобретению содержит биорасщепляемый линкер (на который также ссылаются как на физиологически лабильный линкер, чувствительные к нуклеазам физиологически лабильные связи или чувствительный к нуклеазам линкер), например нуклеотидфосфатный линкер (такой как участок В) или пептидный линкер, который соединяет олигомер (или непрерывную нуклеотидную последовательность или участок А) с конъюгатной группировкой (или участком С).

Чувствительность к расщеплению в анализах, показанных в примере 6, можно использовать для определения, является ли линкер биорасщепляемым или физиологически лабильным.

Биорасщепляемые линкеры согласно настоящему изобретению относятся к линкерам, чувствительным к расщеплению в ткани-мишени (т.е. физиологически лабильным), например, в печени и/или почке. Предпочтительно, чтобы скорость расщепления, наблюдаемая в ткани-мишени, была выше, чем обнаруживается в сыворотке крови. Подходящие способы определения уровня (%) расщепления в ткани (например, в печени или почке) и в сыворотке можно найти в примере 6. В некоторых воплощениях изобретения биорасщепляемый линкер (на который также ссылаются как на физиологически лабильный линкер или чувствительный к нуклеазам линкер), такой как участок В, в соединении по изобретению расщепляется по меньшей мере приблизительно на 20%, например расщепляется по меньшей мере приблизительно на 30%, например расщепляется по меньшей мере приблизительно на 40%, например расщепляется по меньшей мере приблизительно на 50%, например расщепляется по меньшей мере приблизительно на 60%, например расщепляется по меньшей мере приблизительно на 70%, например расщепляется по меньшей мере приблизительно на 75% в анализе гомогената печени или почки примера 6. В некоторых воплощениях изобретения расщепление (%) в сыворотке, используемое в анализе примера 6, составляет менее чем приблизительно 30%, менее чем приблизительно 20%, менее чем приблизительно 10%, менее чем приблизительно 5%, менее чем приблизительно 1%.

В некоторых воплощениях изобретения, которые могут быть одинаковыми или разными, биорасщепляемый линкер (на который также ссылаются как на физиологически лабильный линкер или чувствительный к нуклеазам линкер), такой как участок В, в соединении по изобретению чувствителен к расщеплению нуклеазой S1. Чувствительность к расщеплению S1 можно оценивать, используя S1 нуклеазный анализ, показанный в примере 6. В некоторых воплощениях изобретения биорасщепляемый линкер (на который также ссылаются как на физиологически лабильный линкер или чувствительный к нуклеазам линкер), такой как участок В, в соединении по изобретению расщеплен по меньшей мере приблизительно на 30%, например расщеплен по меньшей мере приблизительно на 40%, например расщеплен по меньшей мере приблизительно на 50%, например расщеплен по меньшей мере приблизительно на 60%, например расщеплен по меньшей мере приблизительно на 70%, например расщеплен по меньшей мере приблизительно на 80%, например расщеплен по меньшей мере приблизительно на 90%, например расщеплен по меньшей мере приблизительно на 95%, после 120 мин инкубации с нуклеазой S1 согласно

анализу, используемому в примере 6.

Выбор последовательности во втором участке.

В некоторых воплощениях изобретения участок В не формирует комплементарную последовательность при выравнивании участка А и В олигонуклеотида с комплементарной последовательностью-мишенью.

В некоторых воплощениях изобретения участок В не формирует комплементарную последовательность при выравнивании участка А и В олигонуклеотида с комплементарной последовательностью-мишенью. В этом аспекте участок А и В вместе могут формировать одну непрерывную последовательность, комплементарную последовательности-мишени.

В некоторых воплощениях изобретения последовательность оснований в участке В выбрана так, чтобы обеспечить оптимальный сайт расщепления эндонуклеазой на основании преобладающих ферментов эндонуклеазного расщепления, присутствующих в ткани или клетке-мишени или в субклеточном компартменте. В этом аспекте путем выделения клеточных экстрактов из тканей-мишеней и тканей, не являющихся мишенями, последовательности для эндонуклеазного расщепления для применения в участке В могут быть выбраны на основании преимущественной расщепляющей активности в желаемой клетке-мишени (например, в печени/гепатоцитах) по сравнению с клеткой, не являющейся мишенью (например, в почке). В этом аспекте эффективность соединения для целевой понижающей регуляции можно оптимизировать для желаемой ткани/клетки.

В некоторых воплощениях изобретения участок В содержит динуклеотидные последовательности AA, AT, AC, AG, TA, TT, TC, TG, CA, CT, CC, CG, GA, GT, GC или GG, где С может представлять собой 5-метилцитозин и/или Т может быть замещен U. В некоторых воплощениях изобретения участок В содержит тринуклеотидные последовательности AAA, AAT, AAC, AAG, ATA, ATT, ATC, ATG, ACA, ACT, ACC, ACG, AGA, AGT, AGC, AGG, TAA, TAT, TAC, TAG, TTA, TTT, TTC, TAG, TCA, TCT, TCC, TCG, TGA, TGT, TGC, TGG, CAA, CAT, CAC, CAG, CTA, CTG, CTC, CTT, CCA, CCT, CCC, CCG, CGA, CGT, CGC, CGG, GAA, GAT, GAC, CAG, GTA, GTT, GTC, GTG, GCA, GCT, GCC, GCG, GGA, GGT, GGC и GGG, где С может представлять собой 5-метилцитозин и/или Т может быть заменен U. В некоторых воплощениях изобретения участок В содержит тетрануклеотидные последовательности AAAAX, AATX, AACX, AAGX, ATAX, ATTX, ATCX, ATGX, ACAX, ACTX, ACCX, ACGX, AGAX, AGTX, AGCX, AGGX, TAAX, TATX, TACX, TAGX, TTAX, TTTX, TTCX, TAGX, TCA, TCT, TCCX, TCGX, TGAX, TGTX, TGCX, TGGX, CAAX, CATX, CACX, CAGX, СТАХ, СТGX, CTCX, CTTX, CCA, CCTX, CCCX, CCGX, CGAX, CGTX, CGCX, CGGX, GAAX, GATX, GACX, CAGX, GTAX, GTTX, GTCX, GTGX, GCA, GCTX, GCCX, GCGX, GGAX, GGTX, GGCX и GGGX, где X может быть выбран из группы, состоящей из А, Т, U, G, С и их аналогов, где С может представлять собой 5-метилцитозин и/или Т может быть заменен U. Должно быть понятно, что при ссылке на (встречающиеся в природе) нуклеотидные основания А, Т, U, G, С они могут быть замещены аналогами нуклеотидных оснований, функционирующих как эквиваленты природных нуклеотидных оснований (например, пара оснований с комплементарным нуклеозидом). В некоторых воплощениях изобретения участок В не содержит Т или U.

Аминоалкильные промежуточные соединения.

В изобретении дополнительно предложены промежуточные олигомеры ЗНК, содержащие антисмысловой олигомер ЗНК, содержащий (например, концевой, 5' или 3') аминоалкильный линкер, такой как C<sub>2</sub>-C<sub>36</sub> аминоалкильная группа, например, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> аминоалкильная группа, включающая, например, C<sub>6</sub> и C<sub>12</sub> аминоалкильные группы. Аминоалкильную группу можно присоединить к олигомеру ЗНК как часть олигонуклеотидного синтеза, например, используя (например, защищенный) аминоалкилфосфорамидит. Связывающая группа между аминоалкилом и олигомером ЗНК может представлять собой, например, фосфоротиоат или фосфодиэфир, или одну из других групп нуклеозидной связи, например, на которые ссылаются в настоящем документе. Аминоалкильная группа может быть ковалентно связана, например, с 5' или 3'-концом олигомера ЗНК, например, с помощью группы нуклеозидной связи, такой как фосфоротиоатная или фосфодиэфирная связь.

В изобретении также предложен способ синтеза олигомера ЗНК, включающий последовательный синтез олигомера ЗНК, такой как твердофазный олигонуклеотидный синтез, включающий стадию присоединения аминоалкильной группы к олигомеру, как, например, в течение первого или последнего раунда олигонуклеотидного синтеза. Способ синтеза может дополнительно включать стадию взаимодействия конъюгата с аминоалкил-олигомером ЗНК (стадию конъюгации). Конъюгат может содержать подходящие линкеры и/или группы точки разветвления и необязательно дополнительные конъюгатные группы, такие как гидрофобные или липофильные группы, как описано в настоящем документе. Стадию конъюгации можно выполнять в то время, когда олигомер связан с твердым носителем (например, после олигонуклеотидного синтеза, но до элюирования олигомера из твердого носителя), или последовательно (т.е. после элюирования). В изобретении предложено применение аминоалкильного линкера при синтезе олигомера по изобретению.

Способ получения/синтеза.

В изобретении предложен способ синтеза (или получения) олигомерного соединения, такого как олигомерное соединение по изобретению, где способ включает либо

а) стадию обеспечения носителя [твердофазного] олигонуклеотидного синтеза [третьего участка], к которому присоединяют одно из следующего:

i) линкерной группы (-Y-),

ii) группы, выбранной из группы, состоящей из конъюгата, направляющей группы, блокирующей группы, реакционной группы [например, аминной или спиртовой] или активационной группы (X-),

iii) группы -Y-X; и

б) стадию [последовательного] олигонуклеотидного синтеза участка В с последующим синтезом участка (А); и/или

с) стадию [последовательного] олигонуклеотидного синтеза первого участка (А) и второго участка (В); где за стадией синтеза следует

d) стадия присоединения третьего участка [включения фосфорамидита]

i) линкерной группы (-Y-),

ii) группы, выбранной из группы, состоящей из конъюгата, направляющей группы, блокирующей группы, реакционной группы [например, аминной или спиртовой] или активационной группы (X-),

iii) группы -Y-X; с последующим

е) отщеплением олигомерного соединения от [твердофазного] носителя, где необязательно упомянутый способ дополнительно включает дополнительную стадию, выбранную из стадий, где

f) третья группа представляет собой активационную группу, стадии активации активационной группы с получением реакционной группы с последующим присоединением конъюгата, блокирующей или направляющей группы к реакционной группе, необязательно посредством линкерной группы (Y);

g) третий участок представляет собой реакционную группу, стадии присоединения конъюгата, блокирующей или направляющей группы к реакционной группе, необязательно посредством линкерной группы (Y);

h) третий участок представляет собой линкерную группу (Y), стадии присоединения конъюгата, блокирующей или направляющей группы к линкерной группе (Y),

где стадии f), g) или h) выполняют либо до, либо после отщепления олигомерного соединения от носителя олигонуклеотидного синтеза.

В некоторых воплощениях изобретения способ может быть выполнен с использованием стандартной фосфорамидитной химии и сам по себе участок X, и/или участок X, или участок X и Y может быть получен до включения в олигомер в виде фосфорамидита. Пожалуйста, см. фиг. 5-10, которые иллюстрируют неограничивающие аспекты способа по изобретению.

В изобретении предложен способ синтеза (или получения) олигомерного соединения, такого как олигомерное соединение по изобретению, где способ включает а) стадию последовательного олигонуклеотидного синтеза первого участка (А) и второго участка (В), где за стадией синтеза следует стадия присоединения третьего участка, содержащего фосфорамидит участка X (на который также ссылаются как на участок С) или Y, такого как участок, содержащий группу, выбранную из группы, состоящей из конъюгатной группы, направляющей группы, блокирующей группы, функциональной группы, реакционной группы (например, аминной или спиртовой) или активационной группы (X), либо группу -Y-X с последующим отщеплением олигомерного соединения от [твердофазного] носителя.

Тем не менее признано, что участок X или X-Y может быть присоединен после отщепления от твердого носителя. Альтернативно способ может включать стадии синтеза первого (А) и необязательно второго участка (В) с последующим отщеплением олигомера от носителя и с последующей стадией присоединения третьего участка, такого как группа X или X-Y в олигомере. Присоединение третьего участка может быть достигнуто, например, путем присоединения аминфосфорамидитного звена на конечной стадии синтеза олигомера (на носителе), который после отщепления от носителя используют для соединения с группой X или X-Y необязательно посредством активационной группы на группе X или Y (когда присутствует). В воплощениях изобретения, где расщепляемый линкер представляет собой нуклеотидный участок, участок В может представлять собой нуклеотидный расщепляемый линкер, например, пептидный линкер, который может формировать часть участка X (на который также ссылаются как на участок С) или представлять собой участок Y (или его часть).

В некоторых воплощениях способа участок X (такой как С) или (X-Y), такой как конъюгат (например, конъюгат GalNAc) содержит активационную группу (активированную функциональную группу), и в способе синтеза активированный конъюгат (либо участок X, либо X-Y) присоединяют к первому и второму участкам, таким как аминосвязанный олигомер. Аминогруппу можно присоединять к олигомеру с помощью стандартной фосфорамидитной химии, например, в качестве конечной стадии синтеза олигомера (что в характерном случае приведет в результате к аминогруппе на 5'-конце олигомера). Например, в течение последней стадии олигонуклеотидного синтеза используют amino-алкилфосфорамидит, например, TFA-амино-С<sub>6</sub>-фосфорамидит (6-(трифторацетиламино)-гексил-(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)-фосфорамидит).

Участок X (или участок С, на который ссылаются в настоящем документе), такой как конъюгат (например, конъюгат GalNAc), можно активировать сложноэфирным N-гидроксисукцинимидным (NHS) способом, а затем присоединить аминосвязанный олигомер. Например, N-гидроксисукцинимид (NHS)

можно использовать в качестве активирующей группы для участка X (или участка C, такого как конъюгат, например конъюгатная группировка GalNAc).

В изобретении предложен олигомер, полученный способом по изобретению.

В некоторых воплощениях изобретения участок X и/или участок X или участок X и Y могут быть ковалентно соединены (связаны) с участком B посредством нуклеозидфосфатной связи, такой как описано в настоящем документе, включая фосфодиэфир или фосфоротиоат, или посредством альтернативной группы, такой как триазольная группа.

В некоторых воплощениях изобретения межнуклеозидная связь между первым и вторым участками представляет собой фосфодиэфир, связанный с первым (или единственным) нуклеозидом ДНК или РНК второго участка, либо участок B содержит по меньшей мере один нуклеозид ДНК или РНК, связанный фосфодиэфирной связью.

Второй участок в некоторых воплощениях изобретения может содержать дополнительные нуклеозиды ДНК или РНК, которые могут быть связаны фосфодиэфирной связью. Второй участок дополнительно ковалентно связан с третьим участком, который может, например, представлять собой конъюгат, направляющую группу, реакционную группу и/или блокирующую группу.

В некоторых аспектах настоящее изобретение основано на обеспечении лабильного участка, второго участка, связывающего первый участок, например, антисмысловой олигонуклеотид, и конъюгат или функциональную группу, например, направляющую или блокирующую группу. Лабильный участок содержит по меньшей мере один нуклеозид, связанный фосфодиэфирной связью, такой как нуклеозид ДНК или РНК, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеозидов, связанных фосфодиэфирной связью, таких как ДНК или РНК. В некоторых воплощениях изобретения олигомерное соединение содержит расщепляемый (лабильный) линкер. В этом аспекте расщепляемый линкер предпочтительно присутствует в участке B (или в некоторых воплощениях изобретения между участком A и B).

Альтернативно в некоторых воплощениях изобретения в изобретении предложен олигонуклеотид (например, антисмысловой олигонуклеотид), связанный не фосфодиэфирной связью, например, фосфоротиоатной связью, имеющий по меньшей мере один концевой (5' и/или 3' нуклеозид) ДНК или РНК, связанный с примыкающим нуклеозидом олигонуклеотида посредством фосфодиэфирной связи, где концевой нуклеозид ДНК или РНК дополнительно ковалентно связан с конъюгатной группировкой, направляющей группировкой или блокирующей группировкой, необязательно посредством линкерной группировки.

Композиции.

Олигомер или конъюгаты олигомера по изобретению можно применять в фармацевтических препаратах и композициях. Целесообразно такие композиции содержат фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель, соль или адъювант. В документе WO 2007/031091, включенном посредством ссылки, предложены подходящие и предпочтительные фармацевтически приемлемые разбавитель, носитель и адъюванты. Подходящие дозы, препараты, пути введения, композиции, дозируемые формы, комбинации с другими терапевтическими средствами, пролекарственные препараты также предложены в документе WO 2007/031091, также включенном в настоящий документ посредством ссылки.

Применения.

Олигомеры или конъюгаты олигомеров по изобретению можно применять в качестве экспериментальных реагентов, например, диагностических, терапевтических и профилактических.

При исследованиях такие олигомеры можно применять для специфического ингибирования синтеза белка PCSK9 (в характерном случае путем распада или ингибирования мРНК и посредством этого предотвращения формирования белка) в клетках и у подопытных животных, таким образом, способствуя функциональному анализу мишени или оценке ее полезности в качестве мишени для терапевтического вмешательства.

В диагностике такие олигомеры можно применять для обнаружения и количественного определения экспрессии PCSK9 в клетке и тканях с помощью Нозерн-блоттинга, гибридизации in-situ или подобных методов.

Для терапевтических применений животное или человека, подозреваемого на наличие заболевания или расстройства, которое можно лечить путем модулирования экспрессии PCSK9, лечат путем введения олигомерных соединений в соответствии с данным изобретением. Дополнительно предложены способы лечения млекопитающего, например человека, подозреваемого на наличие заболевания или состояния или предрасположенности к нему, связанного с экспрессией PCSK9, путем введения терапевтически или профилактически эффективного количества одного или более из олигомеров или композиций по изобретению. Олигомер, конъюгат или фармацевтическую композицию согласно изобретению в характерном случае вводят в эффективном количестве.

В изобретении также предложено применение соединения или конъюгата согласно изобретению, как описано в настоящем документе, для получения лекарственного средства для лечения расстройства, на которое ссылаются в настоящем документе, или для способа лечения расстройства, на которое ссылаются в настоящем документе.

В изобретении также предложен способ расстройства, на которое ссылаются в настоящем докумен-

те, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, соединения согласно изобретению, как описано в настоящем документе, и/или конъюгата согласно изобретению и/или фармацевтической композиции согласно изобретению.

Медицинские показания.

Олигомеры, конъюгаты олигомеров и другие композиции согласно изобретению можно применять для лечения состояний, связанных со сверхэкспрессией или с экспрессией мутированного варианта PCSK9.

В изобретении дополнительно предложено применение соединения по изобретению при получении лекарственного средства для лечения заболевания, расстройства или состояния, на которое ссылаются в настоящем документе.

В общих чертах один аспект изобретения относится к способу лечения млекопитающего, страдающего или подозреваемого на наличие состояний, связанных с аномальными уровнями и/или активностью PCSK9, где способ включает введение млекопитающему терапевтически эффективного количества олигомера или конъюгата олигомера, направленного на PCSK9, содержащего одно или более звеньев ЗНК. Олигомер, конъюгат или фармацевтическую композицию согласно изобретению в характерном случае вводят в эффективном количестве.

Заболевание или расстройство, на которое ссылаются в настоящем документе, в некоторых воплощениях изобретения может быть связано с мутацией в гене PCSK9 или в гене, белковый продукт которого ассоциирован или взаимодействует с PCSK9. Таким образом, в некоторых воплощениях изобретения мРНК-мишень представляет собой мутированную форму последовательности PCSK9.

Интересующий аспект изобретения относится к применению олигомера (соединения), как определено в настоящем документе, или конъюгата, как определено в настоящем документе, для получения лекарственного средства для лечения заболевания, расстройства или состояния, на которое ссылаются в настоящем документе.

Способы по изобретению предпочтительно применяют для лечения или профилактики заболеваний, вызванных аномальными уровнями и/или активностью PCSK9.

Альтернативно в некоторых воплощениях изобретения изобретение дополнительно относится к способу лечения аномальных уровней и/или активности PCSK9, где данный способ включает введение олигомера по изобретению, либо конъюгата по изобретению, либо фармацевтической композиции по изобретению пациенту, нуждающемуся в этом.

Изобретение также относится к олигомеру, композиции или конъюгату, как определено в настоящем документе, для применения в качестве лекарственного средства.

Изобретение дополнительно относится к применению соединения, композиции или конъюгата, как определено в настоящем документе, для получения лекарственного средства для лечения аномальных уровней и/или активности PCSK9 или экспрессии мутантных форм PCSK9 (таких как аллельные варианты, например, связанные с одним из заболеваний, на которые ссылаются в настоящем документе).

Кроме того, изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего заболеванием или состоянием, таким как те, на которые ссылаются в настоящем документе.

Пациент, нуждающийся в лечении, представляет собой пациента, страдающего или вероятно страдающего заболеванием или расстройством.

В некоторых воплощениях изобретения термин "лечение" при использовании в настоящем документе относится как к лечению существующего заболевания (например, заболевания или расстройства, на которое ссылаются в настоящем документе), так и к предотвращению заболевания, т.е. профилактике. Таким образом, хорошо известно, что лечение, на которое ссылаются в настоящем документе, в некоторых воплощениях изобретения может быть профилактическим.

В одном воплощении изобретения относится к соединениям или композициям, содержащим соединения, для лечения гиперхолестеринемии и родственных расстройств или к способам лечения с применением таких соединений или композиций лечения гиперхолестеринемии и родственных расстройств, где термин "родственные расстройства" при ссылке на гиперхолестеринемию относится к одному или более из состояний, выбранных из группы, состоящей из атеросклероза, гиперлипидемии, гиперхолестеринемии, семейной гиперхолестеринемии, например, накопления функциональных мутаций в PCSK9, дисбаланса ЛПВП/ЛПНП холестерина, дислипидемий, например, семейной гиперлипидемии (СГХС) или семейной гиперхолестеринемии (СКГ), приобретенной гиперлипидемии, статин-резистентной гиперхолестеринемии, болезни коронарных артерий (КАБ) и ишемической болезни сердца (ИБС).

Комбинированные терапии.

В некоторых воплощениях изобретения соединение по изобретению предназначено для применения при комбинированном лечении с другим терапевтическим средством. Например, ингибиторы HMGCoA-редуктазы, такие как, например, статины, широко применяют при лечении метаболического заболевания (см. WO 2009/043354, включенный в настоящий документ посредством ссылки в качестве примеров комбинированного лечения). Виды комбинированного лечения могут представлять собой другие гиполипидемические соединения, такие как соединения, выбранное из группы, состоящей из смолсеквестрантов желчных кислот (например, холестирамина, колестипола и гидрохлорида колесевелама),

ингибиторов HMGCoA-редуктазы (например, ловастатина, церивастатина, правастатина, аторвастатина, симвастатина, розувастатина и флувастатина), никотиновой кислоты, производных фибриновой кислоты (например, клофибрата, гемфиброзила, фенофибрата, безафибрата и ципрофибрата), пробукола, неомицина, декстротироксина, сложных эфиров растительных станолов, ингибиторов абсорбции холестерина (например, эзегимиба), имплитапида, ингибиторов транспортеров желчной кислоты (апикальных натрийзависимых транспортеров желчной кислоты), регуляторов печеночного CYP7a, средств заместительной терапии эстрогенами (например, тамоксифена) и противовоспалительных средств (например, глюкокортикоидов). Комбинации со статинами могут быть особенно предпочтительными.

#### Конкретные воплощения изобретения

1. Конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, содержащий
  - а) антисмысловой олигомер (А) из 12-22 нуклеотидов в длину, содержащий непрерывную последовательность из 10-16 нуклеотидов, комплементарную соответствующему отрезку длины SEQ ID NO: 30, или 31, или 32, или 33, или 34, или 45; и
  - б) по меньшей мере одну нуклеотидную или неполинуклеотидную конъюгатную группировку (С), ковалентно присоединенную к олигомеру (А).
2. Конъюгат олигонуклеотида согласно воплощению 1, где антисмысловой олигомер содержит непрерывную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29 и 44.
3. Конъюгат олигонуклеотида согласно любому одному из воплощений 1 или 0, где антисмысловой олигомер направлен на PCSK9.
4. Конъюгат олигонуклеотида согласно любому одному из 1-3, где антисмысловой олигомер содержит усиливающие средство аналоги нуклеотидов.
5. Конъюгат олигонуклеотида согласно воплощению 1, где аналоги нуклеотидов представляют собой нуклеотиды с модифицированным сахаром, такие как нуклеотиды с модифицированным сахаром, независимо или зависимо выбранные из группы, состоящей из звеньев запертой нуклеиновой кислоты (ЗНК); звеньев 2'-О-алкил-РНК, звеньев 2'-ОМе-РНК, звеньев 2'-амино-ДНК и звеньев 2'-фтор-ДНК.
6. Конъюгат олигонуклеотида согласно воплощению 4 или 5, где аналоги нуклеотидов содержат или представляют собой звенья запертой нуклеиновой кислоты (ЗНК).
7. Конъюгат олигонуклеотида согласно любому одному из воплощений 1-6, где антисмысловой олигомер представляет собой гэпмер.
8. Конъюгат олигонуклеотида согласно воплощению 7, где гэпмер содержит сегмент-крыло на каждой стороне (5' и 3') из аналогов нуклеотидов, предпочтительно аналогов ЗНК, в количестве от 2 до 4.
9. Конъюгат олигонуклеотида согласно воплощению 7 или 8, где конструкция гэпмера выбрана из группы, состоящей из 2-8-2, 3-8-3, 2-8-3, 3-8-2, 4-8-2, 2-8-4, 2-9-2, 2-9-3, 3-9-2, 3-9-3, 3-9-4, 4-9-3, 2-10-2, 2-10-3, 3-10-2, 3-10-3, 3-10-4, 4-10-3, 2-11-2, 2-11-3, 3-11-2, 3-11-3, 3-11-4, 4-11-3 и 4-11-4.
10. Конъюгат олигонуклеотида согласно любому одному из воплощений 0-0, где конструкция гэпмера выбрана из группы, состоящей из 2-8-3, 3-8-3, 3-9-4, 3-10-3, 2-11-2, 2-11-3 и 3-11-2.
11. Конъюгат олигонуклеотида согласно любому одному из воплощений 1-0, где олигомер содержит непрерывную последовательность из 13, 14, 15 или 16 нуклеотидов.
12. Конъюгат олигонуклеотида согласно любому одному из воплощений 1-11, где олигомер содержит одну или более нуклеозидных связей, выбранных из группы, состоящей из фосфоротиоатной, фосфородитиоатной и боранофосфатной.
13. Конъюгат олигонуклеотида согласно любому одному из воплощений 1-12, где олигомер содержит или состоит из фосфоротиоатных нуклеозидных связей.
14. Конъюгат олигонуклеотида согласно любому одному из воплощений 1-13, где олигомер содержит непрерывную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8.
15. Конъюгат олигонуклеотида согласно любому одному из воплощений 1-14, где конъюгатная группировка (С) выбрана из группы, состоящей из углевода, такого как GalNAc или кластер GalNAc, липофильная группа, такая как липид, жирная кислота; стерин, такой как холестерин или токоферол; или статин.
16. Конъюгат антисмыслового олигонуклеотида согласно любому одному из воплощений 1-15, где конъюгатная группировка (С) усиливает доставку и/или захват в клетки печени.
17. Конъюгат антисмыслового олигонуклеотида согласно любому одному из воплощений 1-16, где конъюгатная группировка (С) содержит стерин, такой как токоферол, холестерин, например конъюгаты, показанные как Conj 5, Conj 5a, Conj 6 или Conj 6a.
18. Конъюгат антисмыслового олигонуклеотида согласно воплощению 1-17, где конъюгатная группировка (С) содержит углевод, например GalNAc или трехвалентных GalNAc, например конъюгаты, показанные как Conj 1, 2, 3 или 4 либо 1a, 2a, 3a или 4a.
19. Конъюгат антисмыслового олигонуклеотида согласно воплощению 18, где конъюгатная группировка (С) содержит Conj 2a.
20. Конъюгат антисмыслового олигонуклеотида согласно любому одному из воплощений 1-19, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24.
21. Конъюгат антисмыслового олигонуклеотида согласно любому одному из воплощений 1-20, где

антисмысловой олигомер (А) конъюгирован с конъюгатной группировкой (С) посредством линкерного участка, расположенного между непрерывной последовательностью олигомера и конъюгатной группировкой (В и/или Y).

22. Конъюгат антисмыслового олигонуклеотида согласно воплощению 21, где линкер выбран из группы, состоящей из аминокильных линкеров, нуклеотидфосфатных линкеров и пептидных линкеров.

23. Конъюгат антисмыслового олигонуклеотида согласно воплощению 21 или 22, где линкер выбран из C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> аминокильных групп.

24. Конъюгат антисмыслового олигонуклеотида согласно воплощению 21 или 22, где линкер представляет собой биорасщепляемый нуклеотидфосфатный линкер, содержащий от 1 до 6 нуклеотидов.

25. Конъюгат антисмыслового олигонуклеотида согласно любому из воплощений 21-24, где линкер (В) представляет собой фосфодиэфирную нуклеотидную связь, содержащую один или более смежных нуклеотидов ДНК, связанных фосфодиэфирной связью, например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 смежных нуклеотидов ДНК, связанных фосфодиэфирной связью, которые являются смежными с 5'- или 3'-концом непрерывной последовательности олигомера и которые могут формировать или не формировать спаривание комплементарных оснований с последовательностью-мишенью PCSK9.

26. Конъюгат антисмыслового олигонуклеотида согласно воплощению 24 или 25, где фосфодиэфирная нуклеотидная связь (или биорасщепляемый линкер) содержит 1, 2 или 3 нуклеотида ДНК, связанных фосфодиэфирной связью, например два нуклеотида ДНК, связанных фосфодиэфирной связью, например, динуклеотид 5' CA 3'.

27. Олигомер из 12-22 нуклеотидов в длину, который содержит либо

а) непрерывную последовательность из 16 нуклеотидов, комплементарную соответствующему отрезку длины SEQ ID NO: 31, либо

б) непрерывную последовательность из 10-16 нуклеотидов, комплементарную соответствующему отрезку длины SEQ ID NO: 33, или 34, или 45.

28. Олигомер согласно воплощению 27, который содержит непрерывную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29 и 44.

29. Олигомер согласно любому одному из воплощений 27 или 28, где олигомер направлен на PCSK9.

30. Олигомер согласно любому одному из воплощений 27-29, где непрерывная последовательность содержит усиливающие средство аналоги нуклеотидов.

31. Олигомер согласно воплощению 30, где аналоги нуклеотидов представляют собой нуклеотиды с модифицированным сахаром, такие как нуклеотиды с модифицированным сахаром, независимо или независимо выбранные из группы, состоящей из звеньев запертой нуклеиновой кислоты (ЗНК), звеньев 2'-О-алкил-РНК, звеньев 2'-ОМе-РНК, звеньев 2'-амино-ДНК и звеньев 2'-фтор-ДНК.

32. Олигомер согласно воплощению 30 или 31, где аналоги нуклеотидов включают или представляют собой звенья запертой нуклеиновой кислоты (ЗНК).

33. Олигомер согласно любому одному из воплощений 30-32, представляющий собой гэммер, такой как гэммерный олигонуклеотид запертой нуклеиновой кислоты.

34. Конъюгат олигонуклеотида согласно воплощению 33, где гэммер содержит сегмент-крыло на каждой стороне (5' и 3') из 2-4 аналогов нуклеотидов, предпочтительно аналогов ЗНК.

35. Конъюгат олигонуклеотида согласно воплощению 32 или 33, где конструкция гэммера выбрана из группы, состоящей из 2-8-2, 3-8-3, 2-8-3, 3-8-2, 4-8-2, 2-8-4, 2-9-2, 2-9-3, 3-9-2, 3-9-3, 3-9-4, 4-9-3, 2-10-2, 2-10-3, 3-10-2, 3-10-3, 3-10-4, 4-10-3, 2-11-2, 2-11-3, 3-11-2, 3-11-3, 3-11-4, 4-11-3 и 4-11-4.

36. Конъюгат олигонуклеотида согласно любому одному из воплощений 33-35, где конструкция гэммера выбрана из группы, состоящей из 2-8-3, 3-8-3, 3-9-4, 3-10-3, 2-11-2, 2-11-3 и 3-11-2.

37. Олигомер согласно любому одному из воплощений 27-36, где олигомер содержит непрерывную последовательность из 13, 14, 15 или 16 нуклеотидов.

38. Олигомер согласно любому одному из воплощений 27-37, где олигомер содержит одну или более нуклеозидных связей, выбранных из группы, состоящей из фосфоротиоатной, фосфородитиоатной и боранофосфатной.

39. Олигомер согласно любому одному из воплощений 27-38, где олигомер содержит фосфоротиоатные нуклеозидные связи или состоит из них.

40. Олигомер согласно любому одному из воплощений 27-39, содержащий непрерывную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8.

41. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат олигомера или антисмыслового олигонуклеотида согласно любому одному из воплощений 1-40 и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель, соль или адьювант.

42. Конъюгат олигомера или антисмыслового олигонуклеотида или фармацевтическая композиция согласно любому одному из воплощений 1-40 для применения в качестве лекарственного средства для лечения, например, гиперхолестеринемии или родственного расстройства, такого как расстройство, выбранное из группы, состоящей из атеросклероза, гиперлипидемии, гиперхолестеринемии, семейной гиперхолестеринемии, например накопления функциональных мутаций в PCSK9, дисбаланса ЛПВП/ЛПНП

холестерина, дислипидемий, например, семейной гиперлипидемии (СГХС) или семейной гиперхолестеринемии (СКГ), приобретенной гиперлипидемии, статин-резистентной гиперхолестеринемии, болезни коронарных артерий (КАБ) и ишемической болезни сердца (ИБС).

43. Применение конъюгата олигомера или антисмыслового олигонуклеотида или фармацевтической композиции согласно любому одному из воплощений 1-40 для получения лекарственного средства для лечения гиперхолестеринемии или родственного расстройства, такого как расстройство, выбранное из группы, состоящей из атеросклероза, гиперлипидемии, гиперхолестеринемии, семейной гиперхолестеринемии, например накопления функциональных мутаций в PCSK9, дисбаланса ЛПВП/ЛПНП холестерина, дислипидемий, например семейной гиперлипидемии (СГХС) или семейной гиперхолестеринемии (СКГ), приобретенной гиперлипидемии, статин-резистентной гиперхолестеринемии, болезни коронарных артерий (КАБ) и ишемической болезни сердца (ИБС).

44. Способ лечения гиперхолестеринемии или родственного расстройства, такого как расстройство, выбранное из группы, состоящей из атеросклероза, гиперлипидемии, гиперхолестеринемии, семейной гиперхолестеринемии, например накопления функциональных мутаций в PCSK9, дисбаланса ЛПВП/ЛПНП холестерина, дислипидемий, например семейной гиперлипидемии (СГХС) или семейной гиперхолестеринемии (СКГ), приобретенной гиперлипидемии, статин-резистентной гиперхолестеринемии, болезни коронарных артерий (КАБ) и ишемической болезни сердца (ИБС), где способ включает введение эффективного количества конъюгата олигомера или антисмыслового олигонуклеотида или фармацевтической композиции согласно любому одному из воплощений 1-40 пациенту, страдающему или вероятно страдающему гиперхолестеринемией или родственным расстройством.

45. Способ ингибирования PCSK9 *in vivo* или *in vitro* в клетке, экспрессирующей PCSK9, где способ включает введение в клетку конъюгата олигомера или антисмыслового олигонуклеотида или фармацевтической композиции согласно любому одному из воплощений 1-40 так, чтобы ингибировать PCSK9 в этой клетке.

#### Примеры

Олигонуклеотиды синтезировали на уридиновых универсальных носителях с использованием фосфорамидитного метода на синтезаторе Expedite 8900/MOSS (Multiple Oligonucleotide Synthesis System) или Oligomaker 48 в масштабе синтеза 4 или 1 мкмоль соответственно. В конце синтеза олигонуклеотиды отщепляли от твердого носителя с использованием водного аммиака в течение 5-16 ч при 60°C. Олигонуклеотиды очищали с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (ОФ-ВЭЖХ) или с помощью твердофазных экстракций и характеризовали с помощью сверхэффективной жидкостной хроматографии (СВЭЖХ) и молекулярную массу дополнительно подтверждали с помощью масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ИЭР-МС). Дополнительные подробности см. ниже.

Элонгация олигонуклеотида.

Сочетание β-цианоэтил-фосфорамидитов (ДНК-A(Bz), ДНК-G(ibu), ДНК-C(Bz), ДНК-T, ЗНК-5-метил-C(Bz), ЗНК-A(Bz), ЗНК-G(dmf), ЗНК-T или линкера C6-S-S-C6) выполняют с использованием раствора 0,1 М 5'-O-DMT-защищенного амидита в ацетонитриле и DCI (4,5-дицианоимидазола) в ацетонитриле (0,25 М) в качестве активатора. Для конечного цикла использовали имеющийся в продаже C<sub>6</sub>-связанный холестерин с фосфорамидитом при 0,1 М в ДХМ. Включение тиоловых групп для введения фосфоротиоатных связей выполняют путем использования гидрида ксантана (0,01 М в смеси ацетонитрил/пиридин 9:1). Фосфодиэфирные связи вводят с использованием 0,02 М йода в смеси ТГФ/пиридин/вода 7:2:1. Остальные реагенты представляют собой реагенты, в характерном случае применяемые для олигонуклеотидного синтеза. Для конъюгации после твердофазного синтеза используют имеющийся в продаже C<sub>6</sub>-аминолинкер-фосфорамидит на последнем цикле твердофазного синтеза и после удаления защиты и отщепления от твердого носителя выделяют аминоксвязанный незащищенный олигонуклеотид. Конъюгаты вводят посредством активации функциональной группы с использованием стандартных способов синтеза.

Очистка с помощью ОФ-ВЭЖХ.

Неочищенные соединения очищали с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ на колонке Phenomenex Jupiter C18 10 мкм, 150×10 мм. В качестве буферов использовали 0,1 М ацетат аммония pH 8 и ацетонитрил при скорости тока 5 мл/мин. Собранные фракции лиофилизировали с получением очищенного соединения в характерном случае в виде белого твердого вещества.

Сокращения.

DCI: 4,5-дицианоимидазол;

ДХМ: дихлорметан;

ДМФ: диметилформамид;

ДМТ: 4,4'-диметокситритил;

ТГФ: тетрагидрофуран;

Bz: бензоил;

Ibu: изобутирил;

ОФ-ВЭЖХ: высокоэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой.

Соединения синтезировали, как показано в табл. 1, а также проиллюстрировано на фигурах.

Пример 1. Открытие нового мотива-мишени PCSK9.

Был сконструирован и синтезирован 521 антисмысловый олигонуклеотид против PCSK9, где все они содержали три замкнутые нуклеиновые кислоты, фланкирующие десять ДНК, т.е. конструкцию 16-мерного гэмпера ЗНК, где олигонуклеотид специфичен к PCSK9 человека и приматов. Линию 15PC3 клеток человека инкубировали в течение трех суток либо с ложномодифицированными олигонуклеотидами, либо с олигонуклеотидами, модифицированными запертой нуклеиновой кислотой, направленными на PCSK9 человека, при концентрации 0,3 мкМ. Каждый олигонуклеотид против PCSK9 тестировали в трех независимых экспериментах. Уровни мРНК PCSK9 количественно определяли из экстрагированной РНК с использованием ПЦР в реальном времени, как описано, и представляли в нормализованном виде по мРНК  $\beta$ -актина и относительно средних уровней в двенадцати ложно-обработанных образцах на фиг. 8, где подгруппа наиболее эффективных молекул подробно рассмотрена на фиг. 9.

Пример 2. Нокдаун мРНК *in vitro*.

Линию 15PC3 клеток человека инкубировали в течение 3 суток либо с ложно-модифицированными олигонуклеотидами, либо с олигонуклеотидами, модифицированными запертой нуклеиновой кислотой, последовательности SEQ ID 1-8, направленными на PCSK9 человека, при концентрациях 0,0012, 0,06, 0,3 и 1,5 мкМ. Уровни мРНК PCSK9 количественно определяли из экстрагированной РНК, используя ПЦР в реальном времени, как описано, и представляли относительно средних уровней в четырех ложнообработанных образцах на фиг. 10. Для каждого олигонуклеотида эффективность, определенную как половинную максимальную эффективную концентрацию (EC50), определяли методом наименьших квадратов по соответствию уравнению Хилла в двухпараметрической логистической форме с фиксированным нижним пределом 0% и фиксированным верхним пределом 100% как  $EC50 = \text{оценка} \pm \text{стандартное отклонение}$ .

Пример 3. Уровни ALT *in vivo*.

Четыре самки мышей NMRI в возрасте четырех недель (компания Taconic, Дания), весящих приблизительно 20 г по прибытии, инъецировали внутривенно один раз либо физиологическим раствором, либо олигонуклеотидами, модифицированными запертой нуклеиновой кислотой, конъюгированными с холестерином, последовательности SEQ ID 9-16, направленными на PCSK9 человека при дозах 7,5 и 15 мг/кг. Мышей умерщвляли через 7 суток после введения и определяли сывороточные уровни аланинаминотрансферазы (ALT) с использованием ферментативного анализа (Horiba ABX Diagnostics). Для каждой экспериментальной группы из пяти мышей вычисляли средние значения и стандартные отклонения и представляли на фиг. 11 относительно средних уровней у мышей, обработанных физиологическим раствором. Подъемы ALT были отмечены при обеих концентрациях для некоторых, но не для всех молекул, конъюгированных с холестерином. Несколько из соединений, таких как SEQ ID NO: 9 и 10, клинически значимо не увеличивали ALT у мышей даже в случае использования холестерина в качестве конъюгата для усиления захвата соединений в печени.

Пример 4. Исследование на нечеловекообразных приматах.

Первоочередная цель данного исследования состояла в изучении выбранных липидных маркеров через 7 недель после однократной болюсной инъекции соединений ЗНК против PCSK9 яванским макаком и в оценке потенциальной токсичности соединений у обезьян. Соединения, используемые в данном исследовании, имели последовательности SEQ ID NO: 10, 13, 18, 19, 20 и 21, приготовленные в стерильном физиологическом растворе (0,9%) при исходной концентрации 0,625 и 2,5 мг/мл.

Использовали самцов обезьян в возрасте по меньшей мере 24 месяцев и предоставляли им свободный доступ к проточной воде и распределяли по 180 г увеличенного рациона MVVM(E) SQC SHORT (Dietex France, SDS, Сен-Гратьен, Франция) на животное в сутки. Суммарное количество корма, распределенное в каждую клетку, вычисляют в соответствии с числом животных в клетке на данные сутки. Кроме того, каждому животному ежедневно давали фрукты или овощи. Животных акклиматизировали к условиям исследования в течение периода по меньшей мере 14 суток до начала экспериментального периода обработки. В течение этого периода проводили предварительные исследования. Животных дозировали внутривенно (*i.v.*) в однократной дозе 0,25, 1,0 или 2,5 мг/кг (SEQ ID NO: 10, 13, 18 и 21) или в однократной дозе 1,0 или 2,5 мг/кг (SEQ ID NO: 19 и 20). Объем дозы составлял 0,4 мл/кг. Использовали 2 животных на группу.

Дозы препаратов вводили один раз на сутки 1. Животных наблюдали в течение периода 7 недель после обработки и выводили из исследования на сутки 51. Сутки 1 соответствуют первым суткам периода эксперимента. Клинические наблюдения, массу тела и потребление пищи (на группу) регистрируют до и во время исследования.

Забор образцов крови и анализы выполняли в следующие моменты времени.

Сутки исследования	Параметры
-8	RCP, L, Apo-B, PCSK9*, OA
-1	L, Apo-B, PCSK9*, PK, OA
1	Дозирование
4	LSB, L, Apo-B, PCSK9*, OA
8	LSB, L, Apo-B, PCSK9*, PK, OA
15	RCP, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
22	LSB, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
29	L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
36	LSB, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
43	L, PK, Apo-B, PCSK9* PK, OA
50	RCP, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA

RCP (routine clinical pathology): стандартная клиническая патология.

LSB (liver safety biochemistry): биохимические показатели безопасности для печени.

PK: фармакокинетика.

OA (other analysis): другие анализы.

L (Lipids): липиды.

В указанных ниже случаях для всех выживших животных определяли следующие параметры.

Полная биохимическая панель (полный перечень ниже) - на сутки -8, 15 и 50.

Безопасность для печени (только аспаратаминотрансфераза (АСТ), щелочная фосфатаза (ЩФ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), общий билирубин и гамма-глутамилтрансфераза (ГГТ)) - на сутки 4, 8, 22 и 36.

Липидограмма (общий холестерин, Х-ЛПВП, Х-ЛПНП и триглицериды) и только Apo-B - на сутки -1, 4, 8, 22, 29, 36 и 43.

Кровь (приблизительно 1,0 мл) брали в пробирки с литием-гепарином (используя биохимический анализатор крови ADVIA 1650): Apo-B, натрий, калий, хлорид, кальций, неорганический фосфор, глюкоза, Х-ЛПВП, Х-ЛПНП, мочевины, креатинин, общий билирубин, общий холестерин, триглицериды, щелочная фосфатаза (ЩФ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспаратаминотрансфераза (АСТ), креатининкиназа, гамма-глутамилтрансфераза (ГГТ), лактатдегидрогеназа, общий белок, альбумин, отношение альбумин/глобулин.

Анализ PCSK9 в крови: Образцы крови на анализ PCSK9 собирали на сутки -8, -1, 4, 8, 15, 22, 29, 36, 43 и 50. Венозную кровь (приблизительно 2 мл) собирали из соответствующей вены каждого животного в пробирку для отделения сыворотки (SST; Serum Separating Tube) и давали возможность свернуться в течение по меньшей мере 60±30 мин при комнатной температуре. Кровь центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин в условиях охлаждения (установлено на поддержание +4°C). Сыворотку переносили в 3 индивидуальные пробирки и хранили при -80°C до анализа в компании CitoxLAB, Франция, используя способ твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) (набор для ИФА Circulex Human PCSK9, CY-8079, подтвержден для образцов от яванского макака).

Другие анализы. В WO 2011009697 предложены способы следующего анализа: анализ мРНК PCSK9 с помощью количественной ПЦР (qПЦР). Другой анализ включал ИФА белка PCSK9, анализ Lp(a) сыворотки с помощью ИФА (Merckodia No. 10-1106-01), анализ олигонуклеотидов в ткани и плазме (содержание лекарственного средства), экстракция образцов, стандартные образцы и образцы контроля качества, определение содержания олигонуклеотидов с помощью ИФА.

Данные для соединений, направленных на PCSK9, приведены в следующей таблице.

Значения для дозы 2,5 мг/кг			Макс. воздействие PCSK9 (данные представляют собой процент от значения перед дозированием)	Макс. воздействие X-ЛПВП (данные представляют собой процент от значения перед дозированием)
Соединение SEQ ID	Белок PCSK9 сутки 4 (процент от значения перед дозированием)	Белок PCSK9 сутки 29 (процент от значения перед дозированием)		
10	86	71,5	69% (d15)	87% (d29)
13	81	71	71% (d29)	84% (d22)
18	57	42	42% (d29)	71% (d15)
21	80,5	56	55% (d29)	84% (d15)
20	51	53	48% (d4)	94% (D8)
19	55	60	55% (d4)	89% (D4)

Указания на гепатотоксичность или нефротоксичность при соединениях, направленных на PCSK9, отсутствовали. Следует отметить, что соединения PCSK9-GalNAc приводили к быстрой и высокоэффективной понижающей регуляции PCSK9, которая поддерживалась в течение продолжительного периода времени (вся длительность исследования), иллюстрируя, что соединения, конъюгированные с GalNAc, более эффективны, как в отношении быстрого исходного нокдауна, так и в отношении продолжительного периода, что указывает на то, что их можно дозировать сравнительно нечасто и в более низкой дозе, как по сравнению с неконъюгированными исходными соединениями, так и по сравнению с соединениями, полученными с использованием альтернативной технологии конъюгации, такой как конъюгация с холестерином. SEQ ID NO: 18 приводила к быстрой и согласованной понижающей регуляции PCSK9 и X-ЛПВП на протяжении всего исследования (наблюдаемой на сутки 34 при дозе 2,5 мг/кг при значительной понижающей регуляции PCSK9, наблюдаемой через 48 суток после введения однократной дозы 2,5 мг/кг, где уровень белка PCSK9 в плазме составлял 71% от уровня перед дозированием).

Пример 5. Оценка печеночной и почечной токсичности у крыс.

Соединения по изобретению можно оценивать на их профиль токсичности у грызунов, например у мышей или крыс. Можно использовать приведенный ниже протокол. Использовали самцов крыс линии Wistar Han Crl:WI(Han) в возрасте приблизительно 8 недель. В этом возрасте самцы весили приблизительно 250 г. Все животные имели свободный доступ к гранулированному сбалансированному корму SSNIFF R/M-N (SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Зост, Германия) и к проточной воде (профильтрованной через фильтр 0,22 мкм), содержащейся в бутылках. Использовали уровень дозы 10 и 40 мг/кг/доза (подкожное введение) и дозировали на сутки 1 и 8. Животных подвергали эвтаназии на сутки 15. Образцы мочи и крови собирали на сутки 7 и 14. Обследование на клиническую патологию проводили на сутки 14. Массу тела определяют перед исследованием, на первые сутки введения и за 1 неделю до аутопсии. Потребление пищи на группу определяли ежесуточно. Образцы крови брали из хвостовой вены после 6 ч голодания. Проводили следующий анализ образцов крови: количество эритроцитов, средний объем эритроцитов, объем осажденных эритроцитов, гемоглобин, средняя концентрация гемоглобина в клетке, количество тромбоцитов, количество лейкоцитов, дифференциальное количество лейкоцитов с морфологией клетки, количество ретикулоцитов, натрий, калий, хлорид, кальций, неорганический фосфор, глюкоза, мочевины, креатинин, общий билирубин, общий холестерин, триглицериды, щелочная фосфатаза, аланинаминотрансфераза, аспаратаминотрансфераза, общий белок, альбумин, отношение альбумин/глобулин. Проводили анализ мочи:  $\alpha$ -глутатион-S-трансфераза (GST),  $\beta$ -2 микроглобулин, кальбиндин, кластерин, цистатин С, KIM-1, остеопонтин, тканевой ингибитор металлопротеиназы (TIMP; Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF; vascular endothelial growth factor) и нейтрофильный желатиназо-ассоциированный липокалин (NGAL; neutrophil gelatinase-associated lipocalin). Семь аналитов (кальбиндин, кластерин, GST- $\alpha$ , KIM-1, остеопонтин, TIMP-1, VEGF) количественно определяли на панели 1 (панель 1 почечной токсичности у крыс на магнитных микроносителях MILLIPLEX® MAP, RKTX1MAG-37K). Три аналита (P-2 микроглобулин, цистатин С, липокалин-2/NGAL) количественно определяли на панели 2 (панель 2 почечной токсичности у крыс на магнитных микроносителях

MILLIPLEX® MAP, RKTХ2MAG-37K). Анализ на определение концентрации этих биомаркеров в моче крыс была основана на технологии Luminex xMAP®. Микроносители, покрытые антителами против  $\alpha$ -GST/ $\beta$ -2 микроглобулина/кальбиндина/кластерина/цистатина C/KIM-1/остеопонтина/TIMP-1/VEGF/NGAL кодировали по цвету двумя различными флуоресцентными красителями. Определяли следующие параметры (моча с использованием ADVIA 1650): белок в моче, креатинин в моче. Количественные параметры: объем, pH (с использованием тестерных полосок 10-Multistix SG/анализатора мочи Clinitek 500), удельная плотность (с использованием рефрактометра). Полуколичественные параметры (с использованием тестерных полосок 10-Multistix SG/анализатора мочи Clinitek 500): белки, глюкоза, кетоны, билирубин, нитрилы, кровь, уробилиноген, цитология осадка (с помощью микроскопического исследования). Качественные параметры: внешний вид, цвет. После умерщвления определяют массу тела и массу почек, печени и селезенки и вычисляют отношение массы тела к массе органов. Образцы почек и печени брали и либо замораживали, либо хранили в формалине. Проводили микроскопический анализ. Данные для экспрессии Kim-1 показаны на фиг. 15, где продемонстрировано, что все молекулы за исключением SEQ ID NO: 4 имеют более низкий сигнал kim-1 в моче, чем SEQ ID NO: 1, что демонстрирует более низкую почечную недостаточность по сравнению с оригинальной и ранее охарактеризованной неконъюгированной молекулой.

Пример 6. Анализ расщепляемых линкеров.

Антисмысловые олигомеры (АСО), меченые FAM, с различными линкерами ДНК/РО подвергали расщеплению *in vitro*, либо в нуклеазном экстракте S1 (таблица ниже), либо в гомогенатах печени или почек, либо в сыворотке.

№	Seq (5'-3')	Расщепляемый линкер (В)	Конъюгат (С)
35	GCattggtatTCA	3РО-ДНК (5'tca3')	FAM
36	GCattggtatTCA	2РО-ДНК (5'ca3')	FAM
37	GCattggtatTCA	1РО-ДНК (5'a3')	FAM
38	GCattggtatTCA	3РО-ДНК (5'gac3')	FAM
39	GCattggtatTCA	Нет	FAM

Заглавные буквы представляют собой нуклеозиды ЗНК (такие как бета-D-окси ЗНК), строчные буквы представляют собой нуклеозиды ДНК. Нижний индекс s представляет собой фосфоротиоатные межнуклеозидные связи. Цитозины ЗНК необязательно представляют собой 5-метил цитозин. Конъюгатная группировка FAM показана на фиг. 6, и молекулы показаны на фиг. 7.

Меченые FAM АСО 100 мкМ с различными линкерами ДНК/РО подвергали расщеплению *in vitro* нуклеазой S1 в нуклеазном буфере (60 ед. на 100 мкл) в течение 20 и 120 мин (А). Ферментативную активность останавливали добавлением этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) в буферном растворе.

Затем растворы подвергали анализу с помощью ВЭЖХ АIE на приборе Dionex Ultimate 3000, используя колонку Dionex DNAras p-100 и градиент в диапазоне от 10 mM до 1 M перхлората натрия при pH 7,5. Содержание расщепленных и нерасщепленных олигонуклеотидов определяли против стандарта, используя оба детектора, детектор флуоресценции при 615 нм и детектор УФ при 260 нм.

SEQ ID NO	Линкерная последовательность	% расщепления после 20 мин с S1	% расщепления после 120 мин с S1
39	--	2	5
37	a	29,1	100
36	ca	40,8	100
35	tca	74,2	100
38	gac	22,9	НО

Вывод. Результатом включения линкеров РО (или участка В, на который ссылаются в настоящем документе) является отщепление конъюгата (или группы С), и оба параметра из длины и/или последовательности композиции линкера можно использовать для модулирования чувствительности к нуклеолитическому расщеплению участка В. Последовательность линкеров ДНК/РО может модулировать скорость расщепления, что наблюдают после 20 мин в нуклеазном экстракте S1. Выбор последовательности для участка В (например, для линкера ДНК/РО) можно, таким образом, также использовать для модулирования уровня расщепления в сыворотке и в клетках тканей-мишеней.

К гомогенатам печени и почек добавляли точное количество соединения SEQ ID NO: 35 до концентраций 200 мкг/г ткани. Образцы печени и почек, собранные от мышей NMRI, гомогенизировали в буфере гомогенизации (0,5% Igepal CA-630, 25 mM Трис pH 8,0, 100 mM NaCl, pH 8,0 (доведенный 1 н. NaOH)). Гомогенаты инкубировали в течение 24 ч при 37°C, а затем гомогенаты экстрагировали фенолом - хлороформом. Содержание расщепленных и нерасщепленных олигонуклеотидов в экстракте из печени и почек и из сыворотки определяли против стандарта, используя описанный выше способ ВЭЖХ.

Seq ID	Линкерная последовательность	% расщепления после 24 ч с гомогенатом печени	% расщепления после 24 ч с гомогенатом почки	% расщепления после 24 ч в сыворотке
35	tca	83	95	0

Вывод. Результатом включения линкеров PO (или участка В, на который ссылаются в настоящем документе) является отщепление конъюгата (или группы С) в гомогенате печени или почек, но не в сыворотке. Чувствительность к расщеплению в анализах, показанных в примере 6, можно использовать для определения, является ли линкер биорасщепляемым или физиологически лабильным. Следует отметить, что расщепление в описанных выше анализах относится к расщеплению расщепляемого линкера, при этом олигомер или участок А должен оставаться функционально интактным.

Пример 7. Нокдаун мРНК PCSK9 конъюгатами холестерина in vivo PCSK9 - соединения, специфичные для мыши.

№	Seq (5'-3') (A)	Расщепляемый линкер (B)	Конъюгат (C)
40	GTctgtggaaGCG	нет	нет
41	GTctgtggaaGCG	нет	Холестерин
42	GTctgtggaaGCG	2PO-ДНК (5'ca3')	Холестерин
43	GTctgtggaaGCG	2PO-ДНК (5'ct3')	Холестерин

Мышам NMRI инъектировали однократную дозу физиологического раствора, либо 10 мг/кг неконъюгированного антисмыслового олигонуклеотида ЗНК (SEQ ID 40), либо эквивалентные количества антисмысловых олигонуклеотидов ЗНК, конъюгированных с холестерином с различными линкерами и умерщвляли на сутки 1-10 в соответствии с табл. 3.

РНК выделяли из печени и почек и подвергали qПЦР с праймерами, специфичными к PCSK9, и зондом для анализа нокдауна мРНК PCSK9. Результаты показаны на фиг. 14.

Выводы. Холестерин, конъюгированный с антисмысловым олигонуклеотидом ЗНК к PCSK9 с линкером, состоящим из 2 ДНК с фосфодиэфирным каркасом (SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 43), показал повышенный нокдаун PCSK9 в печени (фиг. 14) по сравнению с неконъюгированным соединением (SEQ ID NO: 40), а также по сравнению с конъюгатами холестерина со стабильным линкером (SEQ ID NO: 41).

Материалы и методы.

Таблица 3

Схема эксперимента

Часть	Группа №	Животное №	Число животных	Линия/пол/питание животного	Уровень дозы соединения в сутки	Конц. при объеме дозы 10 мл/кг	Путь введения	Сутки дозирования	Масса тела, сутки	Сутки умерщвления
А	1	1-3	3	NMRI/♀/Сухой корм	Физиологический раствор	-	iv	0	0, 1	1
	2	4-6	3	NMRI/♀/Сухой корм	SEQ ID NO 40 10 мг/кг	1 мг/мл	iv	0	0, 1	1
	3	7-9	3	NMRI/♀/Сухой корм	SEQ ID NO 41 эквимолярно 11,3 мг/кг	1,13 мг/мл	iv	0	0, 1	1
	5	13-15	3	NMRI/♀/Сухой корм	SEQ ID NO 42 эквимолярно 12,7 мг/кг	1,27 мг/мл	iv	0	0, 1	1
	6	16-18	3	NMRI/♀/Сухой корм	SEQ ID NO 43 эквимолярно 12,7 мг/кг	1,27 мг/мл	iv	0	0, 1	1

B	7	19-21	3	NMRI/♀/Сухой корм	Физиологический раствор	-	iv	0	0, 3	3
	8	22-24	3	NMRI/♀/Сухой корм	SEQ ID NO 40 10мг/кг	1 мг/мл	iv	0	0, 3	3
	9	25-27	3	NMRI/♀/Сухой корм	SEQ ID NO 41 эквимолярно 11,3 мг/кг	1,13 мг/мл	iv	0	0, 3	3
	11	31-33	3	NMRI/♀/Сухой корм	SEQ ID NO 42 эквимолярно 12,7 мг/кг	1,27 мг/мл	iv	0	0, 3	3
	12	34-36	3	NMRI/♀/Сухой корм	SEQ ID NO 43 эквимолярно 12,7 мг/кг	1,27 мг/мл	iv	0	0, 3	3
C	13	37-39	3	NMRI/♀/Сухой корм	Физиологический раствор	-	iv	0	0, 7	7
	14	40-42	3	NMRI/♀/Сухой корм	SEQ ID NO 40 10 мг/кг	1 мг/мл	iv	0	0, 7	7
	15	43-45	3	NMRI/♀/Сухой корм	SEQ ID NO 41 эквимолярно 11,3 мг/кг	1,13 мг/мл	iv	0	0, 7	7
	17	49-51	3	NMRI/♀/Сухой корм	SEQ ID NO 42 эквимолярно 12,7 мг/кг	1,27 мг/мл	iv	0	0, 7	7
	18	52-54	3	NMRI/♀/Сухой корм	SEQ ID NO 43 эквимолярно 12,7 мг/кг	1,27 мг/мл	iv	0	0, 7	7
D	19	55-57	3	NMRI/♀/Сухой корм	Физиологический раствор	-	iv	0	0, 7, 10	10
	20	58-60	3	NMRI/♀/Сухой корм	SEQ ID NO 40 10 мг/кг	1 мг/мл	iv	0	0, 7, 10	10
	21	61-63	3	NMRI/♀/Сухой корм	SEQ ID NO 41 эквимолярно 11,3 мг/кг	1,13 мг/мл	iv	0	0, 7, 10	10
	24	70-72	3	NMRI/♀/Сухой корм	SEQ ID NO 42 эквимолярно 12,7 мг/кг	1,27 мг/мл	iv	0	0, 7, 10	10
A	25	73-75	3	NMRI/♀/Сухой корм	Физиологический раствор	-	iv	0	0, 1	1

Введение дозы. Самкам животных NMRI, приблизительно 20 г по прибытии, дозировали 10 мл на кг массы тела (BW) (в соответствии с массой тела (bodyweight) на сутки 0) внутривенно (i.v.) соединения, включенного в физиологический раствор, или одного физиологического раствора в соответствии с приведенной выше таблицей.

Взятие образцов ткани печени и почек. Животных анестезировали 70% CO<sub>2</sub>-30% O<sub>2</sub> и умерщвляли цервикальной дислокацией в соответствии с таблицей. Половину большой доли печени и одну почку измельчали и погружали в раствор для стабилизации РНК RNAlater.

Суммарную РНК экстрагировали из максимум 10 мг ткани, гомогенизированной с помощью шаровой мельницы в присутствии буфера для выделения РНК из тканей MagNA Pure LC (Roche, № по каталогу 03604721001), с использованием набора для выделения клеточной РНК большого объема MagNa Pure 96 (Roche, № по каталогу 5467535001) согласно инструкциям изготовителя. Синтез первой нити выполняли, используя реагенты для обратной транскриптазы от компании Ambion согласно инструкциям изготовителя.

Для каждого образца 0,5 мкм суммарной РНК доводили до (10,8 мкл) H<sub>2</sub>O, не содержащей РНКаз, и смешивали с 2 мкл случайных декамеров (50 мкМ) и 4 мкл смеси dNTP (2,5 мМ каждого dNTP) и нагревали до 70°C в течение 3 мин, после чего образцы быстро охлаждали на льду. К каждому образцу добавляли 2 мкл 10× буфера обратной транскрипции (ОТ), 1 мкл обратной транскриптазы MMLV (100 ед./мкл) и 0,25 мкл ингибитора РНКаз (10 ед./мкл) с последующей инкубацией при 42°C в течение 60 мин, термической инактивацией фермента при 95°C в течение 10 мин, а затем образец охлаждали до 4°C. Образцы кДНК разводили 1:5 и подвергали ОТ-кПЦР, используя основную универсальную смесь для быстрой

ПЦР Taqman 2× (компания Applied Biosystems № по каталогу 4364103) и анализ экспрессии генов Taqman (mPCSK9, Mm00463738\_m1 и mActin #4352341E), следуя протоколу изготовителей, и проводили реакции в приборе компании Applied Biosystems RT-qPCR (7500/7900 или ViiA7) в быстром режиме.

Пример 8. Исследование на нечеловекообразных приматах; многократные подкожные (s.c.) инъекции.

Цель данного исследования на нечеловекообразных приматах состояла в оценке эффективности и безопасности соединений, направленных против PCSK9, в условиях многократного введения при введении соединений путем подкожной инъекции (s.c). Соединения, используемые в данном исследовании, имели последовательности SEQ ID NO: 2, 3, 18 и 19, приготовленные в стерильном физиологическом растворе (0,9%) при исходной концентрации 0,625 и 2,5 мг/мл.

Использовали самок яванского макака в возрасте по меньшей мере 24 месяца и предоставляли им свободный доступ к проточной воде и распределяли по 180 г увеличенного рациона MVVM(E) SQC SHORT (Dietex France, SDS, Сен-Гратьен, Франция) на животное в сутки. Кроме того, каждому животному ежедневно давали фрукты или овощи. Животных акклиматизировали к условиям исследования в течение периода по меньшей мере 14 суток до начала экспериментального периода обработки. В течение этого периода проводили предварительные исследования. Животных дозировали s.c. один раз в неделю в течение четырех недель в дозе 0,5 мг/кг (SEQ ID NO: 2, 3, 18 и 19) или 1,5 мг/кг/инъекция (SEQ ID NO: 18 и 19), суммарно четыре инъекции за период четыре недели. Объем дозы составлял 0,4 мл/кг/инъекция. Использовали шесть животных на группу. После четвертой и последней дозы животных наблюдали в течение недели, после чего половину животных умерщвляли с целью изучения регуляции транскрипта аРоВ в печени, параметров липидов, гистологического исследования печени и почек и тканевого распределения в печени и почках. Сутки 1 соответствуют первым суткам экспериментального периода. Клинические наблюдения, массу тела и потребление пищи (на группу) регистрировали до и во время исследования.

Образцы крови и тканей отбирали и анализировали в следующие моменты времени.

Сутки исследования	Параметры
-10	L, Аро-В, ОА
-5	LSB, L, Аро-В, ОА
-1	RCP, L, Аро-В, PK, ОА
1	Дозирование
8 перед дозированием	LSB, L, Аро-В, PK, ОА
8	Дозирование
15 перед дозированием	LSB, L, Аро-В, PK, ОА
15	Дозирование
22 перед дозированием	LSB, L, Аро-В, PK, ОА
22	Дозирование
29	RCP, PK, ОА + основная аутопсия
36 (выздоровевшие животные)	LSB, L, Аро-В, PK, ОА
43 (выздоровевшие животные)	RCP, PK, Аро-В, PK, ОА
50 (выздоровевшие животные)	LSB, L, Аро-В, PK, ОА
57 (выздоровевшие животные)	LSB, L, Аро-В, PK, ОА
64 (выздоровевшие животные)	LSB, L, Аро-В, PK, ОА
71 (выздоровевшие животные)	LSB, L, Аро-В, PK, ОА
78 (выздоровевшие животные)	RCP, L, Аро-В, PK, ОА + necropsy recovery

RCP: стандартная клиническая патология.

LSB: биохимические показатели безопасности для печени.

PK: фармакокинетика.

ОА: другие анализы.

L: липиды.

Кровь (приблизительно 1,0 мл) брали в пробирки с литием-гепарином (используя биохимический анализатор крови ADVIA 1650): Аро-В, натрий, калий, хлорид, кальций, неорганический фосфор, глюкоза, Х-ЛПВП, Х-ЛПНП, мочевины, креатинин, общий билирубин, общий холестерин, триглицериды, щелочная фосфатаза (ЩФ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспаратаминотрансфераза (АСТ), креатининкиназа, гамма-глутамилтрансфераза (ГГТ), лактатдегидрогеназа, общий белок, альбумин, отношение альбумин/глобулин.

Анализ крови. Образцы крови для анализа АроВ брали только у животных групп 1-16 (т.е. животных, обработанных соединениями, направленными против АроВ) на сутки -8, -1, 4, 8, 15, 22, 29, 36, 43 и 50. Венозную кровь (приблизительно 2 мл) собирали из соответствующей вены у каждого животного в

пробирку для отделения сыворотки (SST) и давали возможность свернуться в течение по меньшей мере 60±30 мин при комнатной температуре. Кровь центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин в условиях охлаждения (установленных на поддержание +4°C). Сыворотку переносили в 3 индивидуальные пробирки и хранили при -80°C до анализа белка ApoB с помощью ИФА.

Другой анализ. В WO 2010142805 предложены способы следующего анализа: qПЦР, анализ мРНК ApoB. Другие анализы включают анализ сывороточного Lp(a) с помощью ИФА (MercoDia № 10-1106-01), анализ олигонуклеотида в ткани и сыворотке (содержание лекарственного средства), экстракцию образцов, стандартные образцы и образцы контроля качества, определение содержания олигонуклеотида с помощью ИФА.

Предназначенным фармакологическим действием для олигонуклеотида, направленного против PCSK9, является снижение холестерина ЛПНП путем уменьшения содержания PCSK9 в кровообращении ("PCSK9 в сыворотке"). Конъюгированные молекулы GalNAc продемонстрировали усиленную эффективность по сравнению с неконъюгированными молекулами при исследовании обоих из PCSK9 в сыворотке и холестерина ЛПНП (фиг. 16 и 17). На фиг. 16 проиллюстрировано, что четыре еженедельные инъекции 0,5 мг/кг/инъекция неконъюгированной SEQ ID NO: 2 обладает лишь незначительными воздействиями на PCSK9 в сыворотке и холестерин ЛПНП, тогда как конъюгаты с GalNAc того же гэмпера ЗНК (SEQ ID 18) обладали сильным понижающим воздействием на оба из PCSK9 в сыворотке и холестерина ЛПНП. Такое же соотношение было отмечено при сравнении данных для многократных инъекций SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 19 (фиг. 17): лишь незначительные воздействия неконъюгированной молекулы и сильная понижающая регуляция PCSK9 и холестерина ЛПНП в сыворотке соответствующим конъюгатом GalNAc (SEQ ID NO: 19). Следует отметить, что воздействия SEQ ID 18 и 19 на PCSK9 в сыворотке и холестерина ЛПНП было дозозависимым при большой продолжительности действия, при этом уровни PCSK9 в сыворотке и холестерина ЛПНП были ниже средних базовых уровней в течение по меньшей мере семи недель после последней инъекции (последняя инъекция на сутки 22, данные проиллюстрированы для восстановительного периода вплоть до суток 71).

Содержание олигонуклеотидов в печени и почках анализировали через одну неделю после последней инъекции, т.е. на сутки 29 исследования. Содержание олигонуклеотидов анализировали, используя ИФА с гибридизацией (по существу, как описано в статье Lindholm et al., Mol Ther., 2012 Feb, 20(2): 376-81), используя SEQ ID NO: 2 для получения стандартной кривой для образцов от животных, обработанных SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 18, после контроля, что изменения в результатах не происходит, если для получения стандартной кривой используют (конъюгированную) SEQ ID NO: 18. Таким же путем использовали SEQ ID NO: 3 для получения стандартной кривой для SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 19 после контроля отсутствия различия результатов при использовании SEQ ID NO: 19 для получения стандартной кривой для анализа ИФА этих образцов.

Содержание олигонуклеотидов в тканях через одну неделю после последней инъекции					
	Печень (мкг олигонуклеотида/г свежей ткани)		Почка (мкг олигонуклеотида/г свежей ткани)		Отношение печень/почка
	Среднее	SD	Среднее	SD	
SEQ ID NO 2, 4x0,5 мг/кг	0,260	0,14	30,3	4,8	0,008
SEQ ID NO 18, 4x0,5 мг/кг	3,57	0,61	11,5	2,5	0,310
SEQ ID NO 18, 4x1,5 мг/кг	18,8	1,7	26,8	6,6	0,701
SEQ ID NO 3, 4x0,5 мг/кг	0,149	0,059	38,2	0,72	0,004
SEQ ID NO 19, 4x0,5 мг/кг	2,72	0,69	16,3	1,5	0,167
SEQ ID NO 19, 4x1,5 мг/кг	12,2	3,44	41,2	6,5	0,296

Как проиллюстрировано в таблице выше, конъюгация SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 приводила в результате к более высоким отношениям печень/почка для конъюгированных молекул (SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19), чем для соответствующих неконъюгированных молекул через одну неделю после последней инъекции, когда животных инъецировали s.c. один раз в неделю в течение четырех недель. С учетом того, что признаки тубулотоксичности продемонстрированы с другими неконъюгированными молекулами, направленными против PCSK9 (такими как SEQ ID NO: 1, как проиллюстрировано на фиг. 15), и с учетом того, что печень является органом-мишенью для лечения, направленного против PCSK9, ожидают, что сдвиг к более высокому отношению печень/почка приведет в результате к повышенной безопасности конъюгированных SEQ ID NO: 18 и 19 по сравнению с неконъюгированными SEQ ID NO: 2 и 3.

Как проиллюстрировано на фиг. 16 и 18, SEQ ID NO: 18 и 19 дозировали при фармакологически релевантных уровнях. Профили клинической химии одних и тех же животных в течение эксперименталь-

ного периода и фазы выздоровления продемонстрировали отсутствие релевантного повышения параметров безопасности в печени или почках.

### Перечень последовательностей

<110> Santaris Pharma A/S

<120> АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОМЕРЫ И ИХ КОНЪЮГАТЫ, НАПРАВЛЕННЫЕ НА ПРОПРОТЕИН КОНВЕРТАЗУ СУБТИЛИЗИН/КЕКСИН ТИПА 9 (PCSK9)

<130> 1141WO

<160> 46

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 14

<212> ДНК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> LNA антисмысловой гепмерный олигонуклеотид

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(14)

<223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(3)

<223> LNA нуклеозиды, LNA C представляют собой 5-метил C

<220>

<221> misc\_feature

<222> (12)..(14)

<223> LNA нуклеозиды, LNA C представляют собой 5-метил C

<400> 1

tgctaca aaa ccca

14

<210> 2

<211> 16

<212> ДНК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> LNA антисмысловой гепмерный олигонуклеотид

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(16)

<223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(3)

<223> LNA нуклеозиды

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (13)..(16)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляют собой 5-метил C

<400> 2  
 aatgctacaа аассса 16

<210> 3  
 <211> 16  
 <212> ДНК  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>  
 <223> LNA антисмысловой гепмерный олигонуклеотид

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(16)  
 <223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(3)  
 <223> LNA нуклеозиды

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (14)..(16)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляют собой 5-метил C

<400> 3  
 aatgctacaа аассса 16

<210> 4  
 <211> 15  
 <212> ДНК  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>  
 <223> LNA антисмысловой гепмерный олигонуклеотид

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(15)  
 <223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляют собой 5-метил C

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (14)..(15)  
 <223> LNA нуклеозиды

<400> 4  
gctgtgtgag cttgg 15

<210> 5  
<211> 16  
<212> ДНК  
<213> ИСКУССТВЕННАЯ  
  
<220>  
<223> LNA антисмысловой гепмерный олигонуклеотид

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(2)  
<223> LNA нуклеозиды  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(16)  
<223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (14)..(16)  
<223> LNA нуклеозиды  
<400> 5  
tgctgtgtga gcttgg 16

<210> 6  
<211> 16  
<212> ДНК  
<213> ИСКУССТВЕННАЯ  
  
<220>  
<223> LNA антисмысловой гепмерный олигонуклеотид

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(16)  
<223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(3)  
<223> LNA нуклеозиды, LNA C представляют собой 5-метил C

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (14)..(16)  
<223> LNA нуклеозиды  
<400> 6  
tgctgtgtga gcttgg 16

<210> 7  
<211> 16  
<212> ДНК  
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>  
 <223> LNA антисмысловой гепмерный олигонуклеотид

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(16)  
 <223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(3)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляют собой 5-метил C

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (14)..(16)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляют собой 5-метил C

<400> 7  
 tcctggctctg tgttcc

16

<210> 8  
 <211> 16  
 <212> ДНК  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ  
 <220>  
 <223> LNA антисмысловой гепмерный олигонуклеотид

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(16)  
 <223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(3)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляют собой 5-метил C

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15)..(16)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляют собой 5-метил C

<400> 8  
 tcctggctctg tgttcc

16

<210> 9  
 <211> 16  
 <212> ДНК  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ  
 <220>  
 <223> конъюгат LNA антисмыслового гепмерного олигонуклеотида

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> холестерин-С6

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2)  
 <223> фосфодиэфирные межнуклеозидные связи  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(16)  
 <223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(5)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (14)..(16)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C

<400> 9  
 catgctacaа аассса

16

<210> 10  
 <211> 18  
 <212> ДНК  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>  
 <223> конъюгат LNA антисмыслового гепмерного олигонуклеотида

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> холестерин-С6

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2)  
 <223> фосфодиэфирные межнуклеозидные связи

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(18)  
 <223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(5)  
 <223> LNA нуклеозиды

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15)..(18)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C

<400> 10  
 caaatgctac аааассса

18

<210> 11  
 <211> 18  
 <212> ДНК  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>  
 <223> конъюгат LNA антисмыслового гепмерного олигонуклеотида

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> холестерин-С6

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2)  
 <223> фосфодиефирные межнуклеозидные связи

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(18)  
 <223> фосфоритоатные межнуклеозидные связи

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(5)  
 <223> LNA нуклеозиды

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(18)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C

<400> 11  
 caaatgctac aaaaccca

18

<210> 12  
 <211> 17  
 <212> ДНК  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>  
 <223> конъюгат LNA антисмыслового гепмерного олигонуклеотида

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> холестерин-С6

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2)  
 <223> фосфодиефирные межнуклеозидные связи

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(17)

<223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(4)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(17)  
 <223> LNA нуклеозиды  
 <400> 12  
 cagctgtgtg agcttgg 17  
 <210> 13  
 <211> 18  
 <212> ДНК  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ  
 <220>  
 <223> конъюгат LNA антисмыслового гепмерного олигонуклеотида  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> холестерин-С6  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2)  
 <223> фосфодизэфирные межнуклеозидные связи  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(4)  
 <223> LNA нуклеозиды  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(18)  
 <223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(18)  
 <223> LNA нуклеозиды  
 <400> 13  
 catgctgtgt gagcttgg 18  
 <210> 14  
 <211> 18  
 <212> ДНК  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ  
 <220>  
 <223> конъюгат LNA антисмыслового гепмерного олигонуклеотида  
 <220>  
 <221> misc\_feature

<222> (1)..(1)  
 <223> холестерин-С6  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2)  
 <223> фосфодиэфирные межнуклеозидные связи  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(18)  
 <223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(5)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(18)  
 <223> LNA нуклеозиды  
  
 <400> 14  
 catgctgtgt gagcttgg 18  
  
 <210> 15  
 <211> 18  
 <212> ДНК  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ  
  
 <220>  
 <223> конъюгат LNA антисмыслового гепмерного олигонуклеотида  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> холестерин-С6  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2)  
 <223> фосфодиэфирные межнуклеозидные связи  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(18)  
 <223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(5)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(18)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C  
  
 <400> 15

catcctggtc tgtgttcc

18

<210> 16  
 <211> 18  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная  
 <220>  
 <223> конъюгат LNA антисмыслового гепмерного олигонуклеотида

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> холестерин-С6

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2)  
 <223> фосфодиефирные межнуклеозидные связи

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(18)  
 <223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(5)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (17)..(18)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C

<400> 16

catcctggtc tgtgttcc

18

<210> 17  
 <211> 14  
 <212> ДНК  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>  
 <223> конъюгат LNA антисмыслового гепмерного олигонуклеотида

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> GalNAc Conj2a

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(14)  
 <223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(3)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (12)..(14)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C

<400> 17  
 tgctacaaaa ccca 14

<210> 18  
 <211> 16  
 <212> ДНК  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>  
 <223> конъюгат LNA антисмыслового гепмерного олигонуклеотида

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> GalNAc Conj2a

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(16)  
 <223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(3)  
 <223> LNA нуклеозиды

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (13)..(16)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C

<400> 18  
 aatgctacaa aaccca 16

<210> 19  
 <211> 16  
 <212> ДНК  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>  
 <223> конъюгат LNA антисмыслового гепмерного олигонуклеотида

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> GalNAc Conj2a

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(16)  
 <223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи

<220>  
 <221> misc\_feature

<222> (1)..(3)  
 <223> LNA нуклеозиды

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (14)..(16)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C

<400> 19  
 aatgctaca aaccca 16

<210> 20  
 <211> 15  
 <212> ДНК  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>  
 <223> конъюгат LNA антисмыслового гепмерного олигонуклеотида

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> GalNAc Conj2a

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(15)  
 <223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (14)..(15)  
 <223> LNA нуклеозиды

<400> 20  
 gctgtgtgag cttgg 15

<210> 21  
 <211> 16  
 <212> ДНК  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>  
 <223> конъюгат LNA антисмыслового гепмерного олигонуклеотида

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> GalNAc Conj2a

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2)  
 <223> LNA нуклеозиды

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(16)  
 <223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (14)..(16)  
 <223> LNA нуклеозиды

<400> 21  
 tgctgtgtga gcttgg 16

<210> 22  
 <211> 16  
 <212> ДНК  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ  
 <220>  
 <223> конъюгат LNA антисмыслового гепмерного олигонуклеотида

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> GalNAc Conj2a

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(16)  
 <223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(3)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (14)..(16)  
 <223> LNA нуклеозиды

<400> 22  
 tgctgtgtga gcttgg 16

<210> 23  
 <211> 16  
 <212> ДНК  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>  
 <223> конъюгат LNA антисмыслового гепмерного олигонуклеотида

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> GalNAc Conj2a

<220>  
 <221> misc\_feature

- <222> (1)..(16)  
 <223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(3)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (14)..(16)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C
- <400> 23  
 tcctgggtctg tgttcc 16
- <210> 24  
 <211> 16  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная
- <220>  
 <223> конъюгат LNA антисмыслового гепмерного олигонуклеотида
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> GalNAc Conj2a
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(16)  
 <223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(3)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15)..(16)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C
- <400> 24  
 tcctgggtctg tgttcc 16
- <210> 25  
 <211> 14  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная последовательность
- <220>  
 <223> мотив нуклеинового основания
- <400> 25  
 tgctacaaaa ccca 14
- <210> 26

<211> 16  
 <212> ДНК  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ  
  
 <220>  
 <223> МОТИВ НУКЛЕИНОВОГО ОСНОВАНИЯ  
  
 <400> 26  
 aatgctacaа аассса 16

<210> 27  
 <211> 15  
 <212> ДНК  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ  
  
 <220>  
 <223> МОТИВ НУКЛЕИНОВОГО ОСНОВАНИЯ  
 <400> 27  
 gctgtgtgag cttgg 15

<210> 28  
 <211> 16  
 <212> ДНК  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ  
  
 <220>  
 <223> МОТИВ НУКЛЕИНОВОГО ОСНОВАНИЯ  
  
 <400> 28  
 tgctgtgtga gcttgg 16

<210> 29  
 <211> 16  
 <212> ДНК  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ  
  
 <220>  
 <223> МОТИВ НУКЛЕИНОВОГО ОСНОВАНИЯ  
  
 <400> 29  
 tcctggtctg tgttcc 16

<210> 30  
 <211> 14  
 <212> РНК  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 30  
 uggguuuugu agca 14

<210> 31  
 <211> 16  
 <212> РНК  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 31  
 uggguuuugu agcauu 16

<210> 32  
 <211> 15  
 <212> РНК  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 32  
 ссаагсусас асагс 15  
  
 <210> 33  
 <211> 16  
 <212> РНК  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 33  
 ссаагсусас асагса 16  
  
 <210> 34  
 <211> 16  
 <212> РНК  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 34  
 ггаасасага ссагга 16  
  
 <210> 35  
 <211> 16  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная  
  
 <220>  
 <223> конъюгат LNA антисмыслового гепмерного олигонуклеотида  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(3)  
 <223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> FAM конъюгат  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (4)..(16)  
 <223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (4)..(5)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (14)..(16)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C  
  
 <400> 35

tcagcattgg tattca

16

<210> 36  
 <211> 15  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная  
  
 <220>  
 <223> конъюгат LNA антисмыслового гепмерного олигонуклеотида

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2)  
 <223> фосфодиэфирные межнуклеозидные связи

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> FAM конъюгат

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(15)  
 <223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(4)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (13)..(15)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C

<400> 36  
 cagcattggt attca

15

<210> 37  
 <211> 14  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная  
  
 <220>  
 <223> конъюгат LNA антисмыслового гепмерного олигонуклеотида

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> фосфодиэфирные межнуклеозидные связи

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> FAM конъюгат

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2)..(14)

<223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи

<220>

<221> misc\_feature

<222> (2)..(3)

<223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C

<220>

<221> misc\_feature

<222> (12)..(14)

<223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C

<400> 37

agcattggta ttca

14

<210> 38

<211> 16

<212> ДНК

<213> искусственная

<220>

<223> конъюгат LNA антисмыслового гепмерного олигонуклеотида

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(3)

<223> фосфодиэфирные межнуклеозидные связи

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(1)

<223> FAM конъюгат

<220>

<221> misc\_feature

<222> (4)..(16)

<223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи

<220>

<221> misc\_feature

<222> (4)..(5)

<223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C

<220>

<221> misc\_feature

<222> (14)..(16)

<223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C

<400> 38

gacgcattgg tattca

16

<210> 39

<211> 13

<212> ДНК

<213> искусственная

<220>

<223> конъюгат LNA антисмыслового гепмерного олигонуклеотида

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(13)  
 <223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> FAM конъюгат

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (11)..(13)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C

<400> 39  
 gcattggtat tca

13

<210> 40  
 <211> 13  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная

<220>  
 <223> LNA антисмысловой гепмерный олигонуклеотид

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(13)  
 <223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2)  
 <223> LNA нуклеозиды

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (11)..(13)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C

<400> 40  
 gtctgtggaа gсg

13

<210> 41  
 <211> 13  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная

<220>  
 <223> конъюгат LNA антисмыслового гепмерного олигонуклеотида

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> холестерин-С6  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(13)  
 <223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2)  
 <223> LNA нуклеозиды  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (11)..(13)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA С представляет собой 5-метил С  
  
 <400> 41  
 gtctgtggaа gсg 13  
  
 <210> 42  
 <211> 15  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная  
 <220>  
 <223> конъюгат LNA антисмыслового гепмерного олигонуклеотида  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> холестерин-С6  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2)  
 <223> фосфодиаэфирные межнуклеозидные связи  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(4)  
 <223> LNA нуклеозиды  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(15)  
 <223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (13)..(15)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA С представляет собой 5-метил С  
  
 <400> 42  
 cagtctgtgg aagcg 15  
  
 <210> 43  
 <211> 15  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная

<220>  
 <223> конъюгат LNA антисмыслового гепмерного олигонуклеотида

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> холестерин-С6

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2)  
 <223> фосфодиефирные межнуклеозидные связи

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(4)  
 <223> LNA нуклеозиды

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(15)  
 <223> фосфоротиоатные межнуклеозидные связи

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (13)..(15)  
 <223> LNA нуклеозиды, LNA C представляет собой 5-метил C

<400> 43  
 ctgtctgtgg aagcg 15

<210> 44  
 <211> 13  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная

<220>  
 <223> мотив нуклеинового основания

<400> 44  
 gtctgtggaа gcg 13

<210> 45  
 <211> 13  
 <212> РНК  
 <213> Homo sapiens

<400> 45  
 cgcucссаса gac 13

<210> 46  
 <211> 3731  
 <212> ДНК  
 <213> homo sapiens

<400> 46  
 gtccgatggg gctctggtgg cgtgatctgc gcgccccagg cgtcaagcac ccacacccta 60  
 gaaggtttcc gcagcgacgt cgaggcgctc atggttgсag gcgggсgсcg ccgttcagtt 120

cagggctctga	gcctggagga	gtgagccagg	cagtgagact	ggctcgggcg	ggccgggacg	180
cgtcgttgca	gcagcggctc	ccagctccca	gccaggattc	cgcgcgcccc	ttcacgcgcc	240
ctgctcctga	acttcagctc	ctgcacagtc	ctccccaccg	caaggetcaa	ggcgccgccc	300
gcgtaggaccg	cgcacggcct	ctaggtctcc	tcgccaggac	agcaacctct	cccctggccc	360
tcatgggcac	cgtcagctcc	aggcggctct	ggtggccgct	gccactgctg	ctgctgctgc	420
tgctgctcct	gggtcccgcg	ggcgcccgtg	cgcaggagga	cgaggacggc	gactacgagg	480
agctggtgct	agccttgctg	tccgaggagg	acggcctggc	cgaagcacc	gagcacggaa	540
ccacagccac	cttccaccgc	tgcgccaaag	atccgtggag	gttgctggc	acctacgtgg	600
tggtgctgaa	ggaggagacc	cacctctcgc	agtcagagcg	cactgcccgc	cgctgcagg	660
cccaggctgc	ccgccgggga	tacctacca	agatcctgca	tgtcttccat	ggccttcttc	720
ctggcttct	ggtgaagatg	agtggcgacc	tgctggagct	ggccttgaag	ttgccccatg	780
tcgactacat	cgaggaggac	tcctctgtct	ttgccagag	catcccgtgg	aacctggagc	840
ggattacccc	tccacggtac	cgggcggatg	aataccagcc	ccccgacgga	ggcagcctgg	900
tggaggtgta	tctcctagac	accagcatac	agagtgacca	ccgggaaatc	gagggcaggg	960
tcatggtcac	cgacttcgag	aatgtgccc	aggaggacgg	gacccgcttc	cacagacagg	1020
ccagcaagtg	tgacagtcac	ggcaccacc	tggcaggggt	ggtcagcggc	cgggatgccg	1080
gcgtaggcca	gggtgccagc	atgocagcc	tgcgcgtgct	caactgcca	gggaagggca	1140
cggtagcgg	cacctcata	ggcctggagt	ttattcggaa	aagccagctg	gtccagcctg	1200
tggggccact	ggtggtgctg	ctgcccctgg	cgggtgggta	cagccgcgtc	ctcaacgccc	1260
cctgccagcg	cctggcgagg	gctggggctg	tgctggtcac	cgctgccggc	aaacttccggg	1320
acgatgctg	cctctactcc	ccagcctcag	ctcccagggt	catcacagtt	ggggccacca	1380
atgcccaaga	ccagccggtg	accctgggga	ctttggggac	caactttggc	cgctgtgtgg	1440
acctcttgc	cccaggggag	gacatcattg	gtgcctccag	cgactgcagc	acctgctttg	1500
tgtcacagag	tgggacatca	caggctgctg	cccacgtggc	tggcattgca	gccatgatgc	1560
tgtctgccga	gccggagctc	accctggccg	agttgaggca	gagactgatc	cacttctctg	1620
caaagatgt	catcaatgag	gcctggttcc	ctgaggacca	gcgggtactg	accccccaacc	1680
tggtggccgc	cctgcccccc	agcaccatg	gggcagggtg	gcagctgttt	tgccaggactg	1740
tatggtcagc	acactcgggg	cctacacgga	tggccacagc	cgtcgccccg	tgccgcccag	1800
atgaggagct	gctgagctgc	tccagtttct	ccaggagtgg	gaagcggcgg	ggcgagcgca	1860
tggaggccca	agggggcaag	ctggtctgcc	gggcccaca	cgcttttggg	ggtgaggggtg	1920
tctacgccat	tgccaggtgc	tgctgctac	cccaggccaa	ctgcagcgtc	cacacagctc	1980

caccagctga ggccagcatg gggacccgtg tccactgcca ccaacagggc cacgtcctca 2040  
caggctgcag ctcccactgg gaggtggagg accttggcac ccacaagccg cctgtgctga 2100  
ggccacgagg tcagcccaac cagtgcgtgg gccacagggga ggccagcatc cacgcttcct 2160  
gctgccatgc cccaggtctg gaatgcaaag tcaaggagca tggaatcccg gccctcagg 2220  
agcaggtgac cgtggcctgc gaggagggct ggaccctgac tggctgcagt gccctccctg 2280  
ggacctcca cgtcctgggg gcctacgccc tagacaacac gtgtgtagtc aggagccggg 2340  
acgtcagcac tacaggcagc accagcgaag gggccgtgac agccgttgcc atctgctgcc 2400  
ggagccggca cctggcgcag gcctcccagg agctccagtg acagcccat cccaggatgg 2460  
gtgtctgggg agggctcaagg gctggggctg agctttaaa tggttccgac ttgtccctct 2520  
ctcagccctc catggcctgg cacgagggga tgggatgct tccgcctttc cggggctgct 2580  
ggcctggccc ttgagtgggg cagcctcctt gcctggaact cactcactct gggcgcctcc 2640  
tccccaggtg gaggtgccag gaagctccct ccctcactgt ggggcatttc accattcaaa 2700  
caggtcgagc tgtgctcggg tgctgccagc tgctccaat gtgccgatgt ccgtgggcag 2760  
aatgactttt attgagctct tgttccgtgc caggcattca atcctcaggt ctccaccaag 2820  
gaggcaggat tcttcccatg gataggggag ggggcggtag gggctgcagg gacaaacatc 2880  
gttggggggg gagtgtgaaa ggtgctgatg gccctcatct ccagctaact gtggagaagc 2940  
ccctgggggc tcctgatta atggaggctt agctttctgg atggcatcta gccagaggct 3000  
ggagacaggt gcgcccctgg tggtcacagg ctgtgccttg gtttctgag ccacctttac 3060  
tctgctctat gccaggctgt gctagcaaca ccaaagggtg gcctgcgggg agccatcacc 3120  
taggactgac tcggcagtgat gcagtggtgc atgcactgtc tcagccaacc cgctccacta 3180  
cccggcaggg tacacattcg caccctact tcacagagga agaaacctgg aaccagaggg 3240  
ggcgtgcctg ccaagctcac acagcaggaa ctgagccaga aacgcagatt gggctggctc 3300  
tgaagccaag cctcttctta cttcaccogg ctgggctcct catttttacg ggtaacagtg 3360  
aggctgggaa ggggaacaca gaccaggaag ctcggtgagt gatggcagaa cgatgcctgc 3420  
aggcatggaa ctttttccgt tatcaccag gcctgattca ctggcctggc ggagatgctt 3480  
ctaaggcatg gtcgggggag agggccaaca actgtccctc cttgagcacc agccccacc 3540  
aagcaagcag acatttatct tttgggtctg tcctctctgt tgccttttta cagccaactt 3600  
ttctagacct gttttgcttt tgtaacttga agatatttat tctgggtttt gtagcatttt 3660  
tattaatatg gtgacttttt aaaataaaaa caaacaacg ttgtcctaac aaaaaaaaaa 3720  
aaaaaaaaa a 3731

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, состоящее из антисмыслового олигомера, длина которого составляет 16-22 смежных нуклеотида, где последовательность антисмыслового олигомера содержит непрерывную последовательность длиной 16 нуклеотидов, комплементарную на 100% последовательности SEQ ID NO: 31, при этом антисмысловый олигомер представляет собой гэммер, содержащий по меньшей мере одно звено запертой нуклеиновой кислоты (ЗНК), при этом антисмысловый олигомер направлен на мРНК, кодирующую протеин конвертазу субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9), и где указанные 16-22 смежных нуклеотида на 100% комплементарны мРНК, кодирующей PCSK9.

2. Соединение по п.1, где запертая нуклеиновая кислота (ЗНК) представляет собой окси-ЗНК, тио-ЗНК, амино-5 ЗНК, 5'-метил-ЗНК, ENA, сЕТ, сМОЕ или их комбинацию.

3. Соединение по п.1, где ЗНК представляет собой стереоизомер в бета-D-конфигурации или альфа-L-конфигурации.

4. Соединение по п.1, где антисмысловый олигомер содержит по меньшей мере одно звено сЕТ.

5. Соединение по п.1, где антисмысловый олигомер содержит 2, 3, 4, 5, 6 или 7 звеньев ЗНК.

6. Соединение по п.5, где каждое звено ЗНК в антисмысловом олигомере представляет собой стереоизомер в одной и той же конфигурации.

7. Соединение по п.5, где каждое звено ЗНК в антисмысловом олигомере представляет собой звено бета-D-окси-ЗНК или каждое звено ЗНК в антисмысловом олигомере представляет собой звено альфа-L-окси-ЗНК.

8. Соединение по п.1, где последовательность антисмыслового олигомера содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную, фосфородитиоатную или боранофосфатную межнуклеозидную связь.

9. Соединение по п.8, где все межнуклеозидные связи являются фосфоротиоатными.

10. Соединение по п.8, где одна или более межнуклеозидных связей содержит хиральный центр в R-конформации и/или в S-конформации.

11. Соединение по п.1, где соединение и олигомер последовательности SEQ ID NO: 31 могут образовывать дуплекс с повышенной термостабильностью по сравнению с соответствующим дуплексом, содержащим соответствующий антисмысловый олигомер без ЗНК.

12. Конъюгат антисмыслового олигонуклеотида, содержащий

(i) антисмысловый олигомер, включающий 16-22 смежных нуклеотида, где последовательность антисмыслового олигомера содержит непрерывную последовательность длиной 16 нуклеотидов, комплементарную на 100% последовательности SEQ ID NO: 31, при этом антисмысловый олигомер представляет собой гэммер, содержащий по меньшей мере одно звено запертой нуклеиновой кислоты (ЗНК), и где указанные 16-22 смежных нуклеотида на 100% комплементарны мРНК, кодирующей PCSK9; и

(ii) по меньшей мере одну конъюгатную группировку, направленную на рецептор асиалогликопротеина, ковалентно присоединенную к указанному антисмысловому олигомеру непосредственно или через линкер, расположенный между непрерывной последовательностью олигомера и указанной группировкой,

при этом конъюгат антисмыслового нуклеотида направлен на мРНК, кодирующую PCSK9.

13. Конъюгат антисмыслового олигонуклеотида по п.12, где конъюгатная группировка, направленная на рецептор асиалогликопротеина, содержит кластер моновалентного, двухвалентного, трехвалентного или четырехвалентного GalNAc.

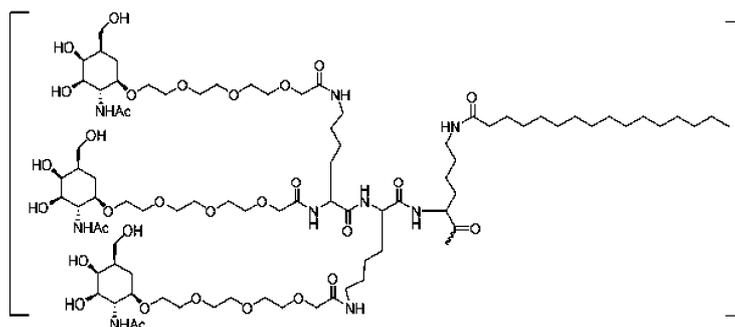
14. Конъюгат антисмыслового олигонуклеотида по п.13, где каждый GalNAc в кластере GalNAc присоединен к группе точки разветвления посредством спейсера.

15. Конъюгат антисмыслового олигонуклеотида по п.14, где группа точки разветвления содержит ди-лизин.

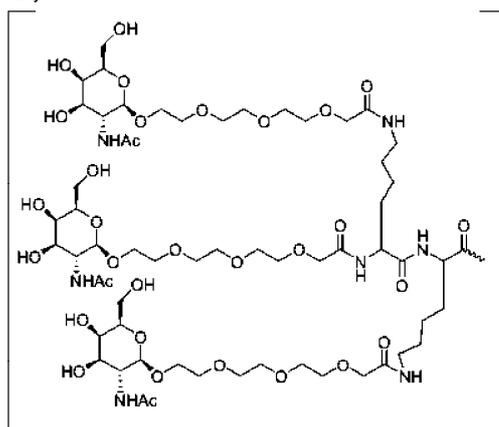
16. Конъюгат антисмыслового олигонуклеотида по п.14, где спейсер включает в себя полиэтиленгликолевый (ПЭГ)-спейсер.

17. Конъюгат антисмыслового олигонуклеотида по п.12, где линкер включает в себя C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> аминокильную группу или биорасщепляемый нуклеотидфосфатный линкер, содержащий от 1 до 6 нуклеотидов.

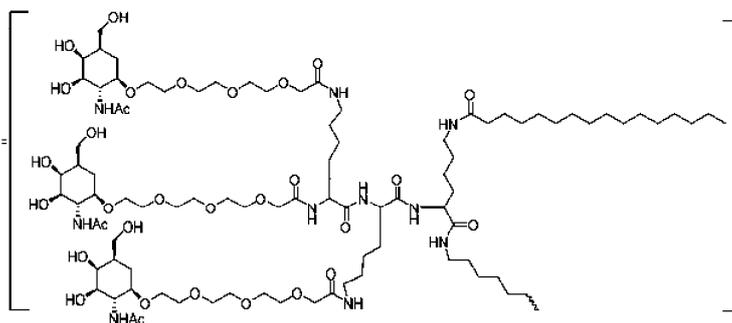
18. Конъюгат антисмыслового олигонуклеотида по п.13, где кластер трехвалентного GalNAc содержит Conj 1, Conj 2, Conj 1a или Conj 2a



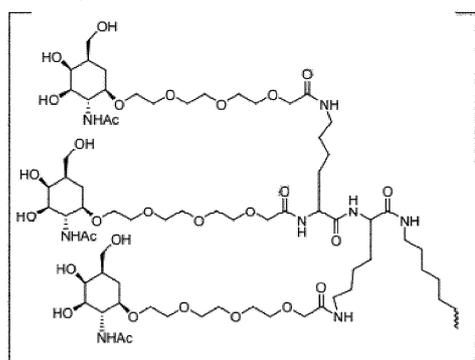
Conj 1



Conj 2



Conj1a



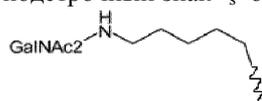
Conj 2a.

19. Конъюгат антисмыслового олигонуклеотида по п.12, где указанная группировка ковалентно присоединена к антисмысловому олигомеру посредством ковалентной связи.

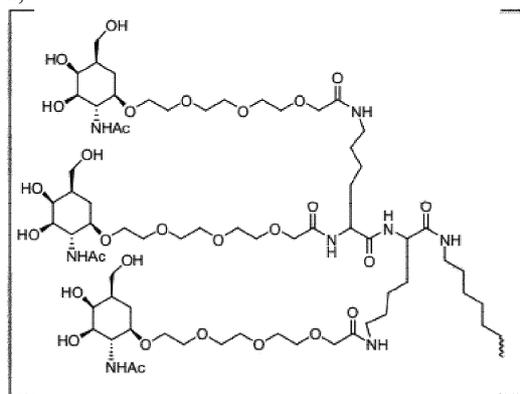
20. Конъюгат антисмыслового олигонуклеотида последовательности SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19



где надстрочный знак "L" обозначает звено бета-D-окси-3НК;  
надстрочный знак "Me", предшествующий заглавной букве С, обозначает 5-метилцитозинное звено;  
подстрочный знак "s" обозначает фосфорогидратную межнуклеозидную связь; и



представляет собой конъюгатную группировку Conj 2a, направленную на рецептор асиалогликопротеина,



и при этом конъюгат антисмыслового нуклеотида направлен на мРНК, кодирующую PCSK9.

21. Фармацевтическая композиция, обладающая ингибиторной активностью в отношении пропротеин конвертазы субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9), содержащая соединение по п.1 или конъюгат антисмыслового олигонуклеотида по п.12 и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель, соль или адьювант.

22. Способ лечения заболевания или состояния, вызванного аномальными уровнями экспрессии и/или активностью PCSK9 у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества соединения по любому из пп.1-11, конъюгата антисмыслового олигонуклеотида по любому из пп.12-20 или фармацевтической композиции по п.21, где аномальные уровни и/или активность PCSK9 вызваны геном, белковый продукт которого ассоциирован с или взаимодействует с PCSK9, при этом введение соединения, конъюгата антисмыслового олигонуклеотида или фармацевтической композиции снижает уровень PCSK9 в сыворотке и/или снижает уровень холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) в сыворотке.

23. Способ по п.22, где PCSK9 представляет собой

- (i) аллельный вариант PCSK9;
- (ii) мутант приобретения функции PCSK9; или
- (iii) продукт экспрессии мутантного гена PCSK9.

24. Способ по п.22, где заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из атеросклероза, гиперхолестеринемии, дисбаланса холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП)/липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), дислипидемии, болезни коронарных артерий (КАБ) и ишемической болезни сердца (ИБС).

25. Способ по п.24, где дислипидемия представляет собой семейную гиперлипидемию (семейную комбинированную гиперлипидемию (СКГЛ)) или приобретенную гиперлипидемию.

26. Способ по п.24, где гиперхолестеринемия представляет собой семейную гиперхолестеринемию или статин-резистентную гиперхолестеринемию.

27. Способ по п.22, дополнительно включающий введение второго терапевтического агента, выбранного из группы, состоящей из статина, смолы-секвестранта желчных кислот, никотиновой кислоты, производного фибриновой кислоты, пробукола, неомицина, декстротироксина, сложного эфира растительных станолов, ингибитора абсорбции холестерина, имплитапида, ингибитора транспортеров желчной кислоты, регулятора печеночного СYP7a (холестерин-7-альфа гидроксилазы), средства заместительной терапии эстрогенами и противовоспалительного средства.

28. Способ по п.27, где статин выбран из группы, состоящей из ловастатина, церивастатина, правастатина, аторвастатина, симвастатина, розувастатина и флувастатина.

29. Способ по п.22, где соединение, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида или фармацевтическую композицию вводят внутривенно или подкожно.

30. Способ по п.22, где соединение, конъюгат антисмыслового олигонуклеотида или фармацевтическую композицию вводят в форме однократной дозы или в форме многократных доз.

31. Способ лечения расстройства, выбранного из группы, состоящей из атеросклероза, гиперлипидемии, гиперхолестеринемии, дисбаланса холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП)/липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), болезни коронарных артерий (КАБ) или ишемической болезни сердца (ИБС) у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества соединения по любому из пп.1-11, конъюгата антисмыслового олигонуклеотида по любому из пп.12-20 или фармацевтической композиции по п.21.

32. Способ *in vitro* снижения уровней экспрессии и/или активности PCSK9 в клетке, включающий введение в клетку эффективного количества соединения по любому из пп.1-11, конъюгата антисмыслового олигонуклеотида по любому из пп.12-20 или фармацевтической композиции по п.21.

33. Способ снижения уровней экспрессии и/или активности PCSK9 у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества соединения по любому из пп.1-11, конъюгата антисмыслового олигонуклеотида по любому из пп.12-20 или фармацевтической композиции по п.21.

34. Способ снижения уровня холестерина у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту эффективного количества соединения по любому из пп.1-11, конъюгата антисмыслового олигонуклеотида по любому из пп.12-20 или фармацевтической композиции по п.21.

35. Способ получения соединения, состоящего из антисмыслового олигомера длиной 16-26 смежных нуклеотидов, включающий химический синтез соединения с использованием последовательного твердофазного синтеза олигонуклеотидов, где последовательность антисмыслового олигомера содержит непрерывную последовательность длиной 16 нуклеотидов, которая на 100% комплементарна последовательности SEQ ID NO: 31, при этом антисмысловый олигомер представляет собой гэммер, содержащий по меньшей мере одно звено ЗНК, при этом антисмысловый олигомер направлен на мРНК, кодирующую PCSK9, и где указанные 16-22 смежных нуклеотида на 100% комплементарны мРНК, кодирующей PCSK9.

36. Способ получения конъюгата антисмыслового олигонуклеотида, включающий ковалентное присоединение по меньшей мере одной нуклеотидной или неполинуклеотидной группировки к антисмысловому олигомеру длиной 16-26 смежных нуклеотидов непосредственно или через линкер, расположенный между последовательностью антисмыслового олигомера и нуклеотидной или неполинуклеотидной группировкой, при этом последовательность антисмыслового олигомера содержит непрерывную последовательность из 16 нуклеотидов в длину, которая на 100% комплементарна последовательности SEQ ID NO: 31, при этом антисмысловый олигомер представляет собой гэммер, содержащий по меньшей мере одно звено ЗНК, при этом конъюгат антисмыслового нуклеотида направлен на мРНК, кодирующую PCSK9, и где указанные 16-22 смежных нуклеотида на 100% комплементарны мРНК, кодирующей PCSK9.

37. Способ по п.36, где ковалентное присоединение по меньшей мере одной нуклеотидной или неполинуклеотидной группировки к антисмысловому олигомеру включает

(i) химический синтез антисмыслового олигомера; и

(ii) присоединение посредством химического синтеза или конъюгации по меньшей мере одной нуклеотидной или неполинуклеотидной группировки к конъюгату антисмыслового олигонуклеотида.

38. Способ по п.37, где присоединение посредством химического синтеза или конъюгации по меньшей мере одной нуклеотидной или неполинуклеотидной группировки к конъюгату антисмыслового олигонуклеотида включает

(i) включение посредством химического синтеза или конъюгации по меньшей мере одной нуклеотидной или неполинуклеотидной группировки в конъюгат антисмыслового олигонуклеотида;

(ii) включение посредством химического синтеза или конъюгации по меньшей мере одного линкера в конъюгат антисмыслового олигонуклеотида;

(iii) включение посредством химического синтеза или конъюгации по меньшей мере одной точки разветвления в конъюгат антисмыслового олигонуклеотида;

(iv) включение посредством химического синтеза или конъюгации по меньшей мере одного спейсера в конъюгат антисмыслового олигонуклеотида; или

(v) некоторую комбинацию вышеуказанного.

39. Способ по п.38, где

(i) по меньшей мере один линкер расположен между антисмысловым олигомером и точкой разветвления;

(ii) по меньшей мере одна точка разветвления расположена между линкером и по меньшей мере одной нуклеотидной или неполинуклеотидной группировкой;

(iii) по меньшей мере одна, две или три нуклеотидных или неполинуклеотидных группировки присоединены к точке разветвления;

(iv) по меньшей мере один ПЭГ-спейсер расположен между ненуклеотидной или неполинуклеотидной группировками и точкой разветвления; или

(v) любая комбинация вышеуказанного.

40. Соединение по любому из пп.1-11, где антисмысловый олигомер представляет собой промежуточное соединение в синтезе конъюгата антисмыслового олигонуклеотида, содержащего антисмысловый олигомер.

41. Способ по п.35, где антисмысловый олигомер представляет собой промежуточное соединение в синтезе конъюгата антисмыслового олигонуклеотида, содержащего антисмысловый олигомер.

42. Соединение по любому из пп.1-11 или фармацевтическая композиция по п.21, где последовательность антисмыслового олигомера содержит или состоит из SEQ ID NO: 26.

43. Конъюгат антисмыслового олигонуклеотида по любому из пп.12-20, где последовательность антисмыслового олигомера содержит или состоит из SEQ ID NO: 26.

44. Способ по любому из пп.22-39, где последовательность антисмыслового олигомера содержит или состоит из SEQ ID NO: 26.

45. Соединение по любому из пп.1-11 или фармацевтическая композиция по п.21, где последовательность антисмыслового олигомера содержит или состоит из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

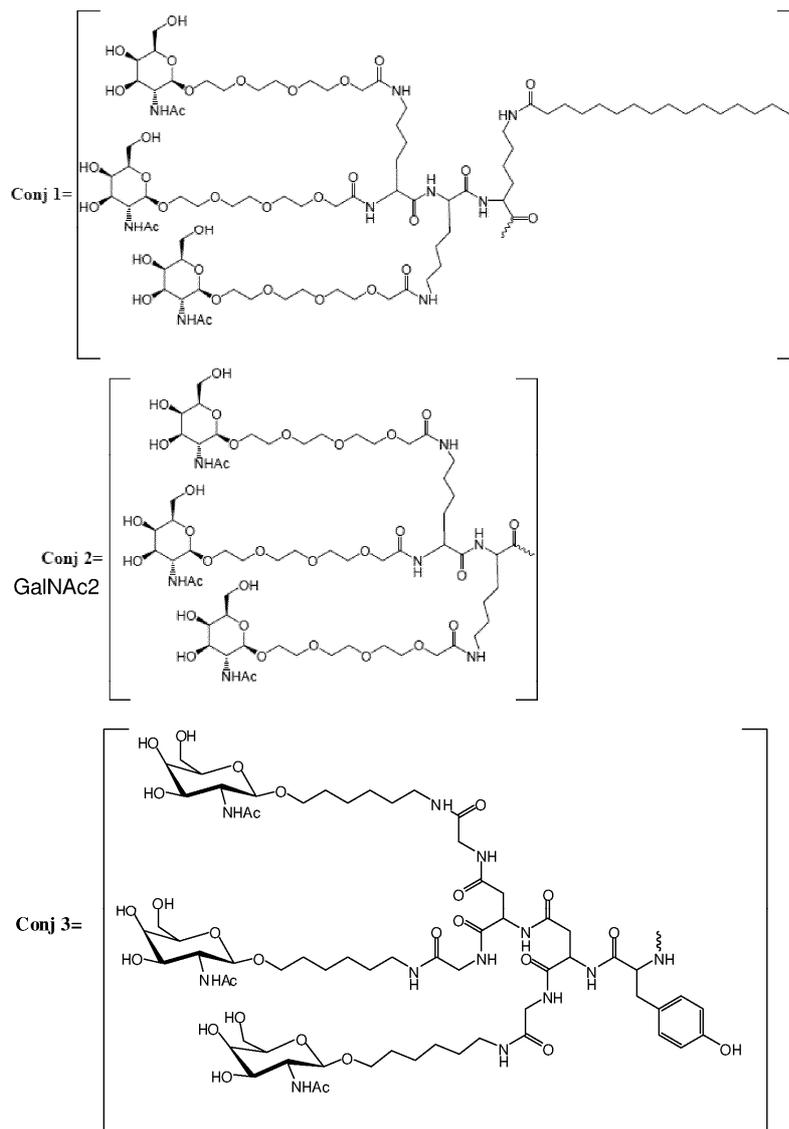
46. Конъюгат антисмыслового олигонуклеотида по любому из пп.12-20, где последовательность антисмыслового олигомера содержит или состоит из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

47. Способ по любому из пп.22-39, где последовательность антисмыслового олигомера содержит или состоит из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

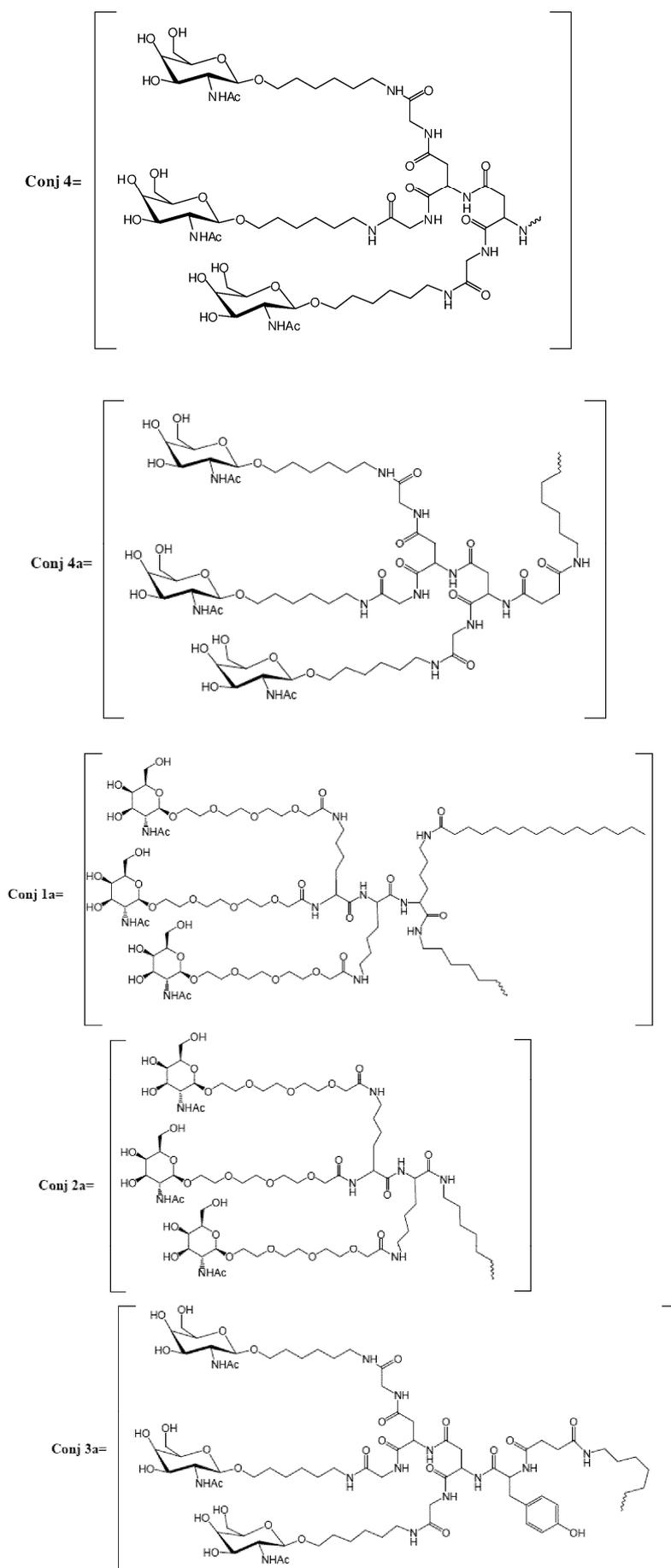
48. Конъюгат антисмыслового олигонуклеотида по любому из пп.12-20, где конъюгат антисмыслового олигонуклеотида состоит из SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19.

49. Фармацевтическая композиция по п.21, где конъюгат антисмыслового олигонуклеотида состоит из SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19.

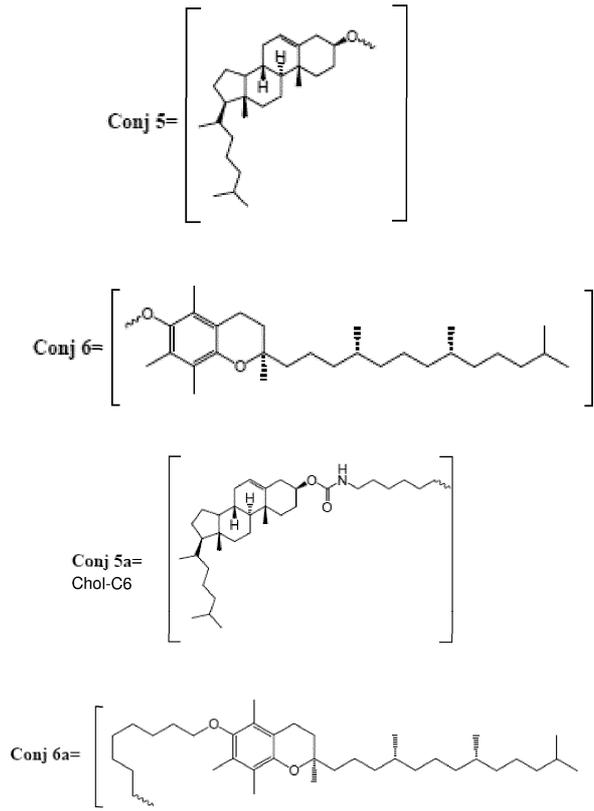
50. Способ по любому из пп.22-39, где конъюгат антисмыслового олигонуклеотида состоит из SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19.



Фиг. 1



Фиг. 1 (продолжение)



Фиг. 2

5'-T<sub>s</sub><sup>L</sup>G<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>T<sub>s</sub>A<sub>s</sub>C<sub>s</sub>A<sub>s</sub>A<sub>s</sub>A<sub>s</sub>A<sub>s</sub>C<sub>s</sub>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>A<sub>s</sub><sup>L</sup>-3'  
SEQ ID 1

5'-A<sub>s</sub><sup>L</sup>A<sub>s</sub><sup>L</sup>T<sub>s</sub><sup>L</sup>G<sub>s</sub>C<sub>s</sub>T<sub>s</sub>A<sub>s</sub>C<sub>s</sub>A<sub>s</sub>A<sub>s</sub>A<sub>s</sub>A<sub>s</sub>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>A<sub>s</sub><sup>L</sup>-3'  
SEQ ID 2

5'-A<sub>s</sub><sup>L</sup>A<sub>s</sub><sup>L</sup>T<sub>s</sub><sup>L</sup>G<sub>s</sub>C<sub>s</sub>T<sub>s</sub>A<sub>s</sub>C<sub>s</sub>A<sub>s</sub>A<sub>s</sub>A<sub>s</sub>A<sub>s</sub>C<sub>s</sub>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>A<sub>s</sub><sup>L</sup>-3'  
SEQ ID 3

5'-G<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>A<sub>s</sub>G<sub>s</sub>C<sub>s</sub>T<sub>s</sub>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub><sup>L</sup>G<sub>s</sub><sup>L</sup>-3'  
SEQ ID 4

5'-T<sub>s</sub><sup>L</sup>G<sub>s</sub><sup>L</sup>C<sub>s</sub>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>A<sub>s</sub>G<sub>s</sub>C<sub>s</sub>T<sub>s</sub>T<sub>s</sub><sup>L</sup>G<sub>s</sub><sup>L</sup>G<sub>s</sub><sup>L</sup>-3'  
SEQ ID 5

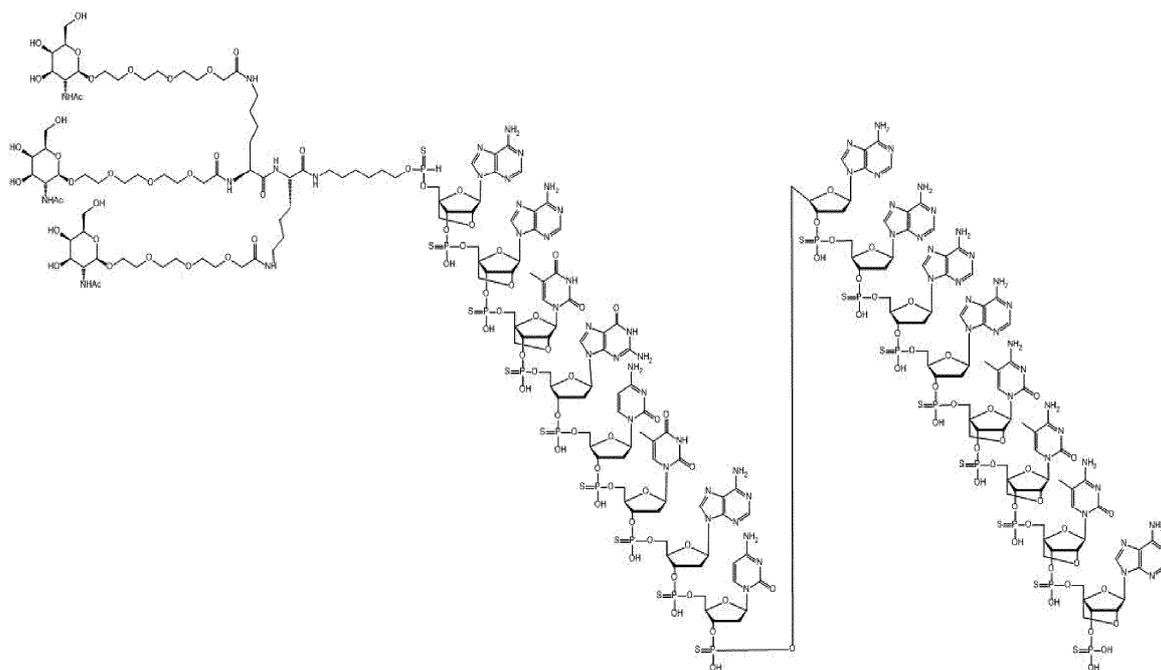
5'-T<sub>s</sub><sup>L</sup>G<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>A<sub>s</sub>G<sub>s</sub>C<sub>s</sub>T<sub>s</sub><sup>L</sup>G<sub>s</sub><sup>L</sup>G<sub>s</sub><sup>L</sup>-3'  
SEQ ID 6

5'-T<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>T<sub>s</sub>C<sub>s</sub>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>T<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>-3'  
SEQ ID 7

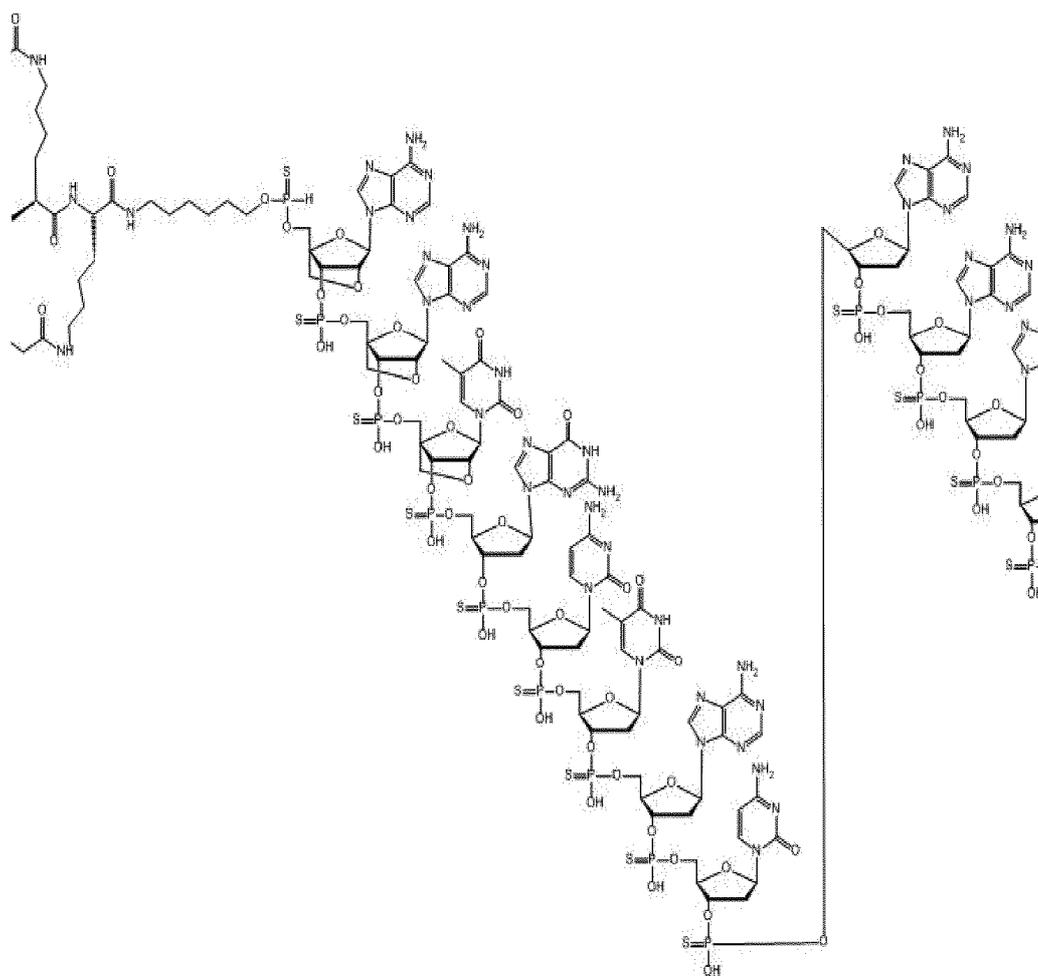
5'-T<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>T<sub>s</sub>C<sub>s</sub>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>T<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>-3'  
SEQ ID 8

Фиг. 3



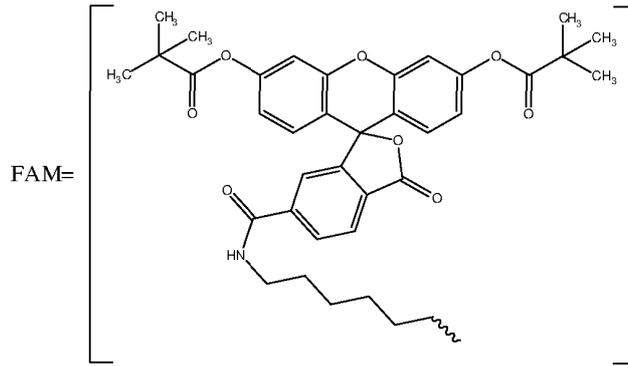


Фиг. 5А

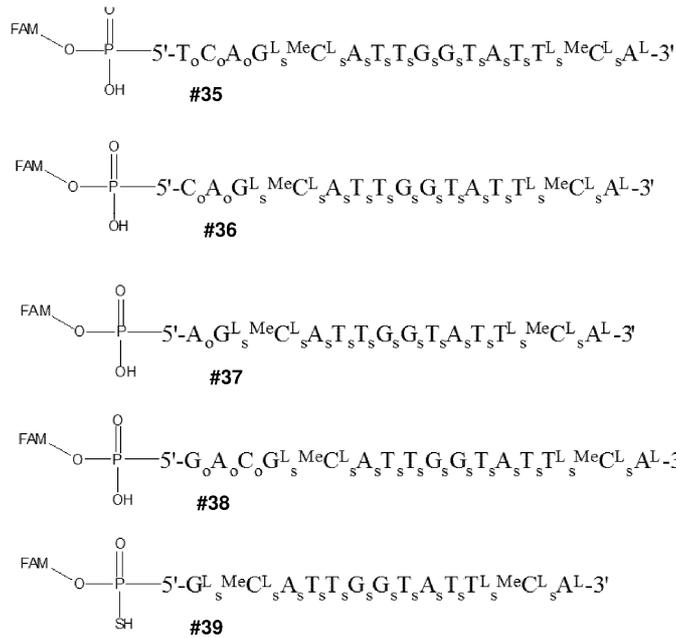


Фиг. 5В

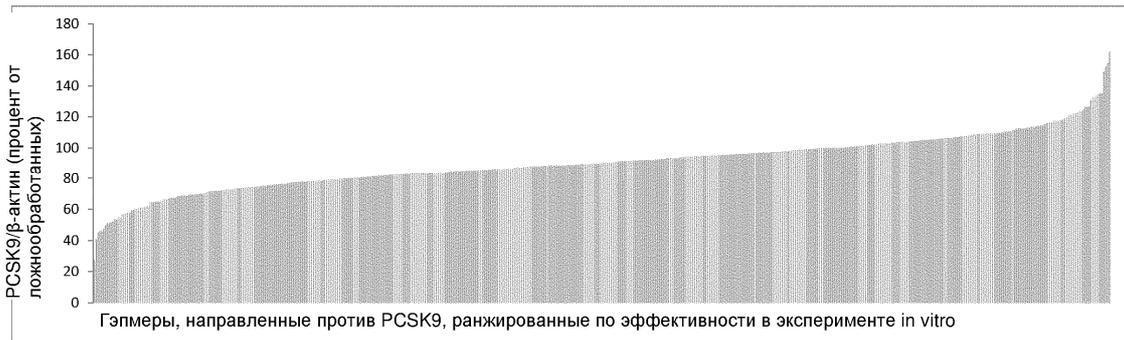
043736



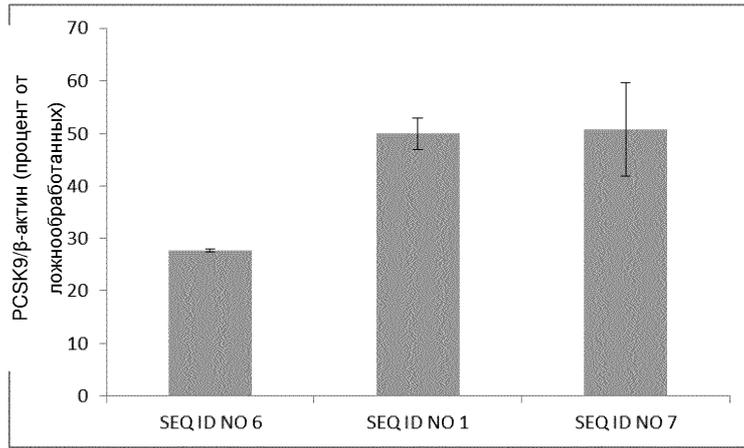
Фиг. 6



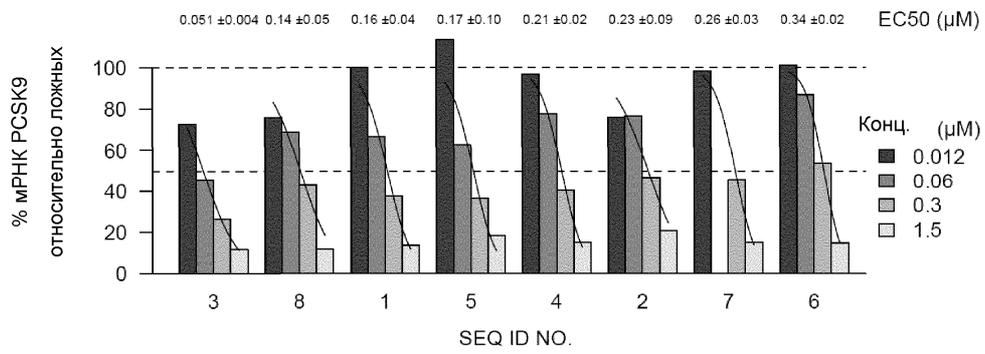
Фиг. 7



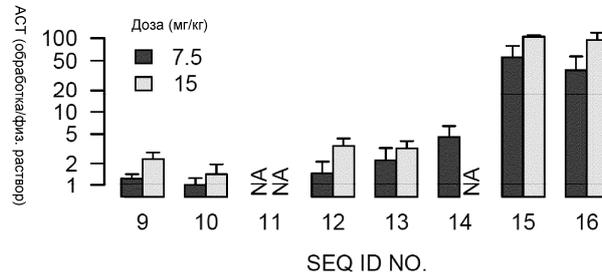
Фиг. 8



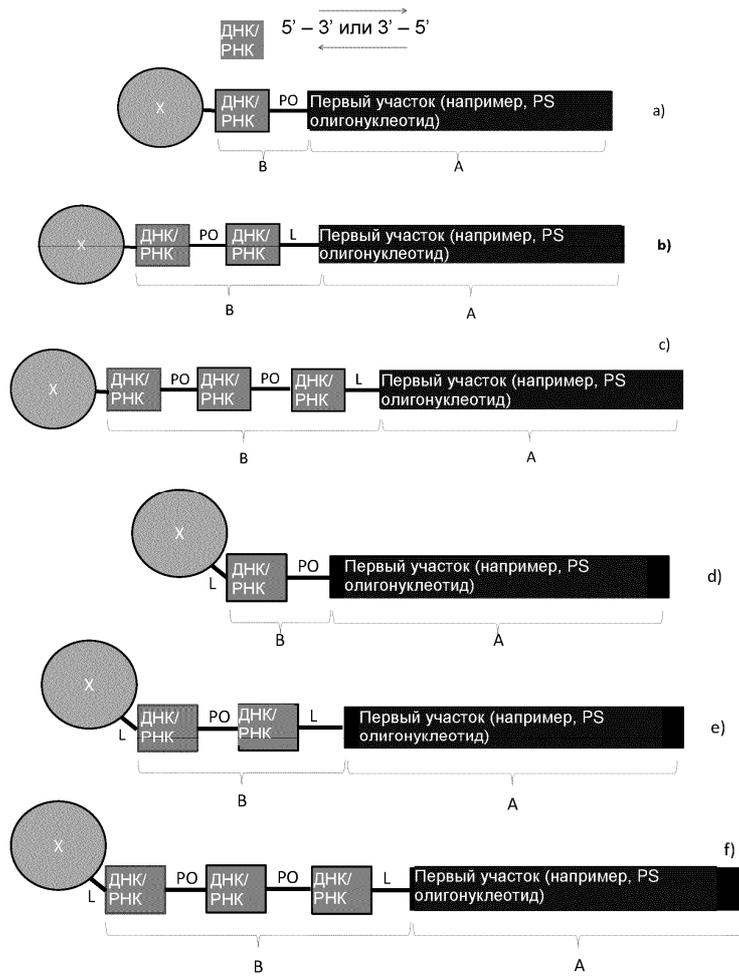
Фиг. 9



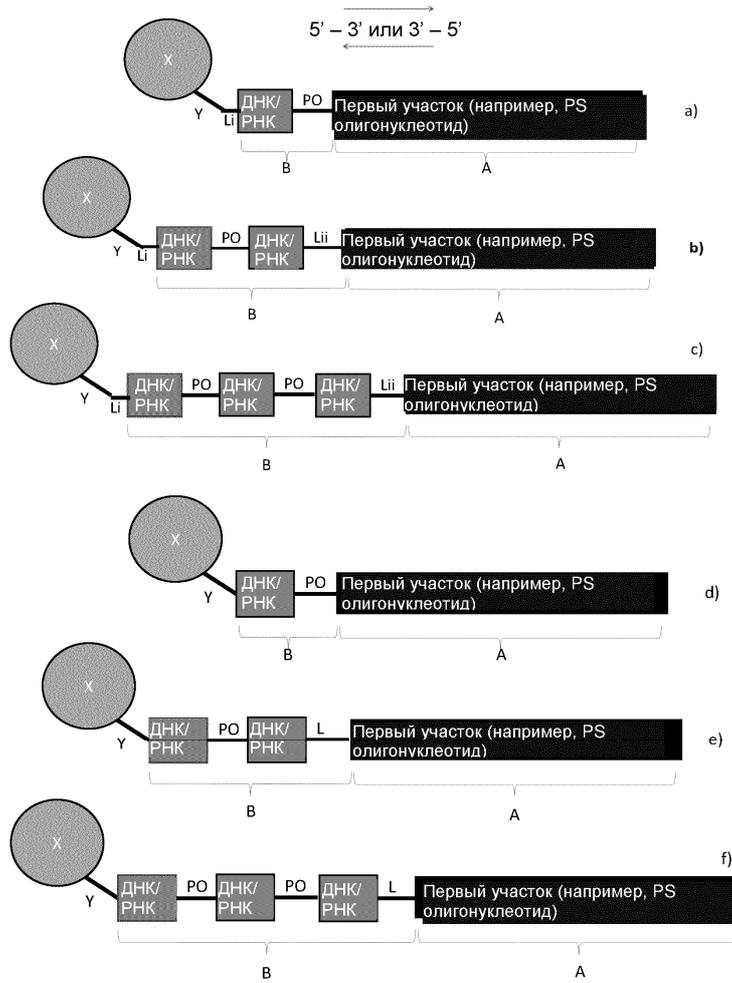
Фиг. 10



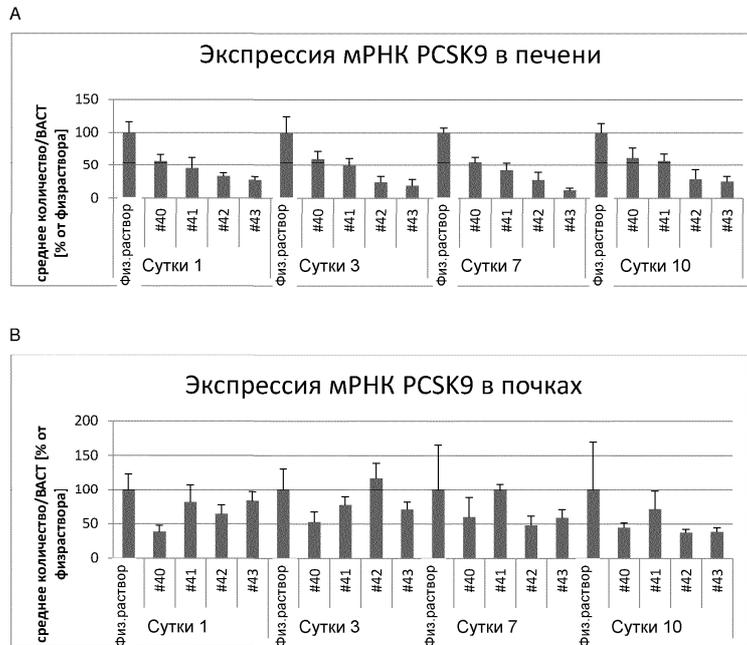
Фиг. 11



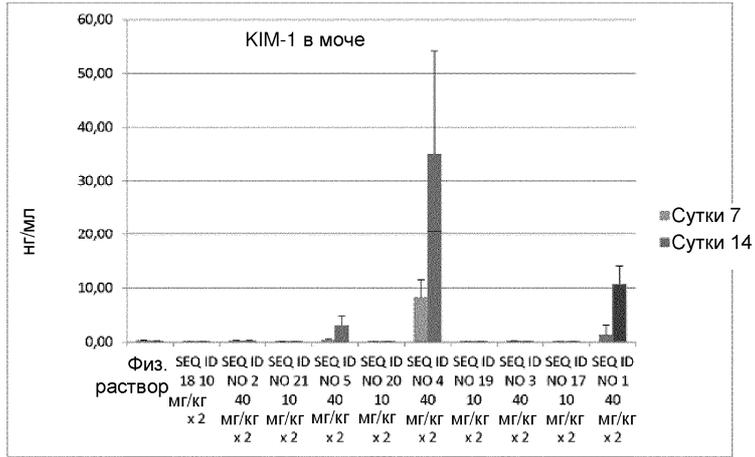
Фиг. 12



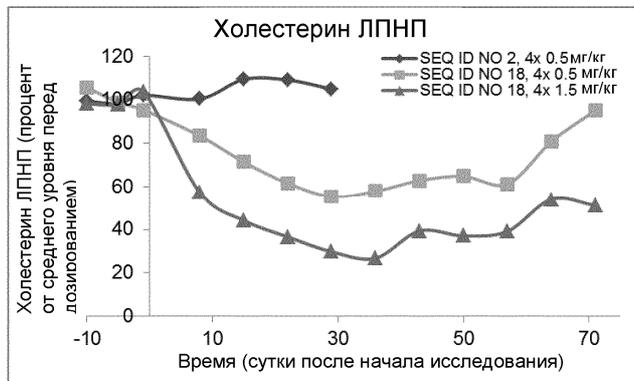
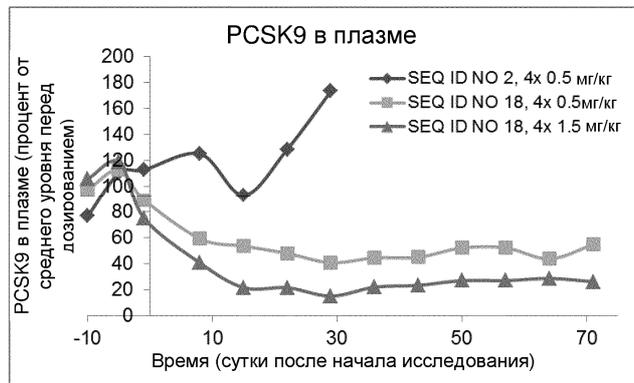
Фиг. 13



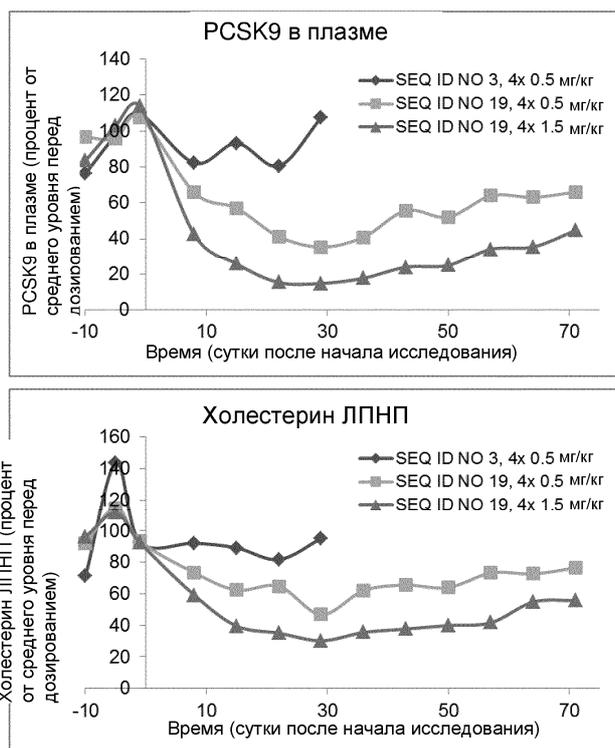
Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17

