

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045960**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.01.23(21) Номер заявки
202190964(22) Дата подачи заявки
2019.11.07(51) Int. Cl. **C07H 21/02** (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
A61K 31/712 (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)**(54) ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ ПОЛИМЕРЫ И СПОСОБЫ ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ
ТРАНСПОРТА S-АНТИГЕНА**(31) **62/757,632; 62/855,323; 62/907,845**(32) **2018.11.08; 2019.05.31; 2019.09.30**(33) **US**(43) **2022.02.10**(86) **PCT/US2019/060283**(87) **WO 2020/097342 2020.05.14**(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АЛИГОС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)**(72) Изобретатель:
**Бейгельман Леонид, Пандей
Раджендра, Раджванши Вивек
Кумар, Смит Дэвид Бернارد, Блатт
Лоуренс М., Хун Цзинь (US)**(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)(56) **WO-A1-2016004525**

ROEHL I. ET AL. "Nucleic Acid Polymers with Accelerated Plasma and Tissue Clearance for Chronic Hepatitis B Therapy", Molecular Therapy: Nucleic Acids, 2017, Vol. 8, pages 1-12, whole document, in particular, abstract, introduction, table 1-REP 2139, REP, 2154, REP 2155, REP 2156, REP 2157, REP 2164 and REP 2165, and REP 2055, and results

VAILLANT A. "Nucleic acid polymers; Broad spectrum antiviral activity, antiviral mechanisms and optimization for the treatment of hepatitis B and hepatitis D infection", Antiviral Research, 2016, Vol. 133, pages 32-40, whole document, in particular, figure 1 and table 1

BEILSTEIN F. ET AL. "Nucleic Acid Polymers Are Active against Hepatitis Delta Virus Infection In Vitro," Journal of Virology, 2018, Vol. 92 (4). pii: e01416-17, pages 1-13, whole document, in particular, abstract, results, table 1, and materials and methods, Synthesis of NAPs

US-A1-20130309201

KHVOROVA A. ET AL. "The Chemical Evolution of Oligonucleotide Therapies of Clinical Utility", Nature Biotechnology, 2017, Vol. 35 (3), pages 238-248, whole document

(57) В различных вариантах реализации предложены полимеры STOPSTTM, которые представляют собой олигонуклеотидные полимеры, ингибирующие транспорт S-антигена, способы их получения и способы их применения для лечения заболеваний и патологических состояний. В некоторых вариантах реализации указанные модифицированные олигонуклеотиды STOPSTTM содержат по меньшей мере частично тиофосфатированную последовательность из чередующихся фрагментов А и С с модификациями, описанными в настоящем документе. Независимая от последовательности активность вариантов реализации модифицированных олигонуклеотидов STOPSTTM против вируса гепатита В, определяемая с помощью анализа секреции HBsAg, превышает активность референсного соединения.

B1**045960****045960 B1**

Информация о родственных заявках

Настоящая заявка испрашивает приоритет патентной заявки США № 62/757632, поданной 8 ноября 2018 года; патентной заявки США № 62/855323, поданной 31 мая 2019 года; и патентной заявки США № 62/907845, поданной 30 сентября 2019 года. Каждый из вышеуказанных источников полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Уровень техники

Область изобретения.

Изобретение относится к противовирусным соединениям STOPS™, которые представляют собой олигонуклеотидные полимеры, ингибирующие транспорт S-антигена, способам их получения и способам их применения для лечения заболеваний и патологических состояний.

Описание.

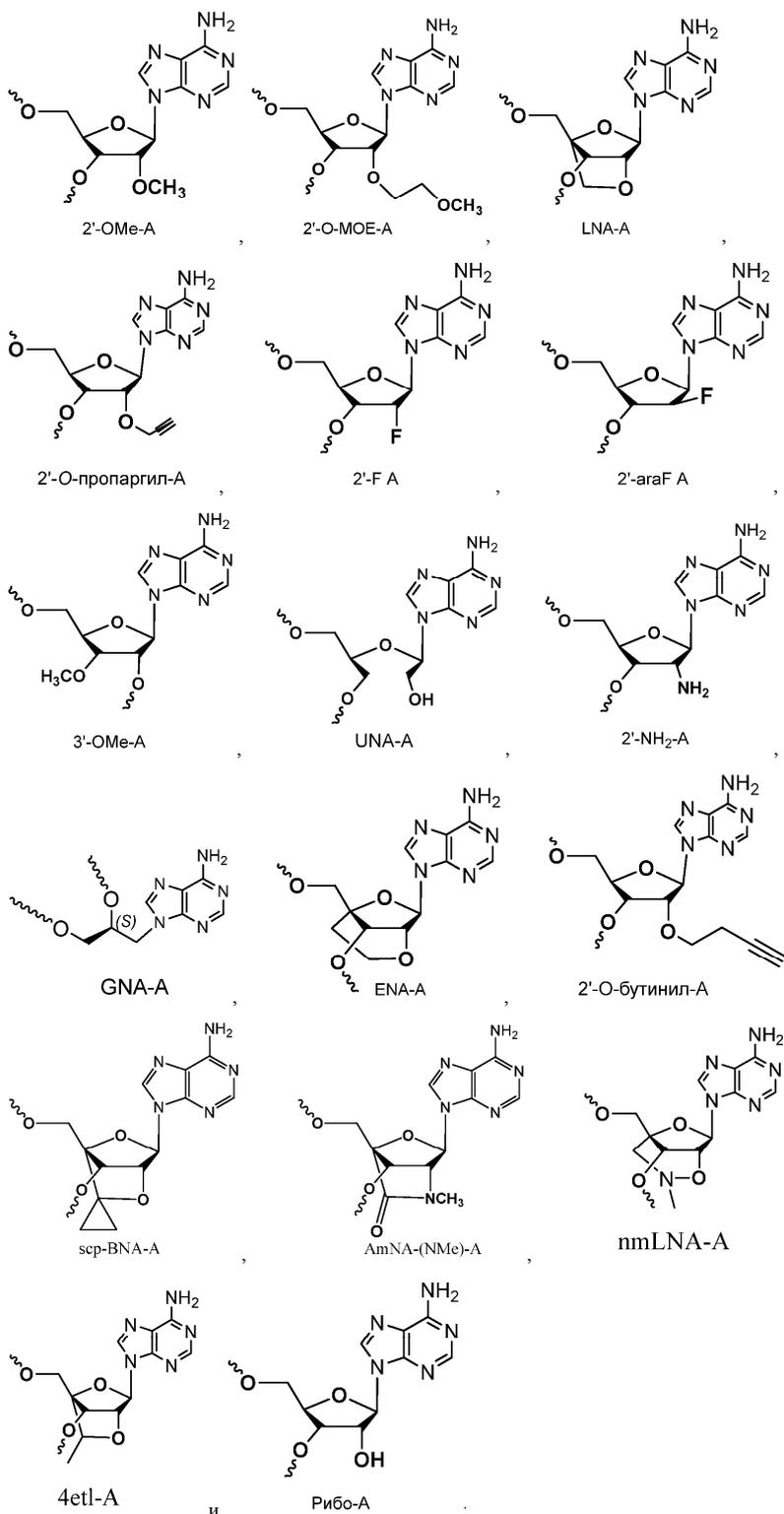
Соединения STOPS™, описанные в настоящем документе, представляют собой противовирусные олигонуклеотиды, которые могут быть по меньшей мере частично тиофосфатированы и проявляют свою противовирусную активность с использованием механизма, независимого от последовательности. См. A. Vaillant, "Nucleic acid polymers: Broad spectrum antiviral activity, antiviral mechanisms and optimization for the treatment of hepatitis B and hepatitis D infection", *Antiviral Research* 133, 32-40 (2016). Термин "нуклеотидный полимер" (NAP) используется в литературе по отношению к таким олигонуклеотидам, хотя этот термин не обязательно подразумевает наличие противовирусной активности. В ряде патентных заявок, поданных в начале 2000-х годов, описаны структуры некоторых конкретных соединений и выявлены различные структурные варианты в качестве потенциальных областей для экспериментов в будущем. См., например, патенты США № 7358068; 8008269; 8008270 и 8067385. Эти попытки привели к выявлению соединения, известного специалистам в данной области техники как REP 2139, тиофосфатированного 40-членного полимера, содержащего повторяющиеся фрагменты "аденозин-цистеин" (AC) с 5-метилированием всех оснований цитозина и 2'-О-метилированием всех молекул рибозы, а также соединения, известного как его клинический предшественник, REP 2055. См. I. Roehl et al., "Nucleic Acid Polymers with Accelerated Plasma and Tissue Clearance for Chronic Hepatitis B Therapy", *Molecular Therapy: Nucleic Acids* Vol. 8, 1-12 (2017). Авторы указанной публикации показали, что структурные особенности этих соединений оптимизированы для лечения гепатита В (ВГВ) и гепатита D (ВГД). См. также A. Vaillant, "Nucleic acid polymers: Broad spectrum antiviral activity, antiviral mechanisms and optimization for the treatment of hepatitis B and hepatitis D infection", *Antiviral Research* 133 (2016) 32-40. Согласно этим авторам и аналогичной литературе, такие соединения сохраняют противовирусную активность против ВГВ, предотвращая распознавание механизмами врожденного иммунного ответа, что позволяет безопасно применять его вместе с иммунотерапевтическими средствами, например пэгилированным интерфероном. В то же время уже в течение длительного времени существует потребность в более эффективных соединениях этого класса.

Краткое описание изобретения

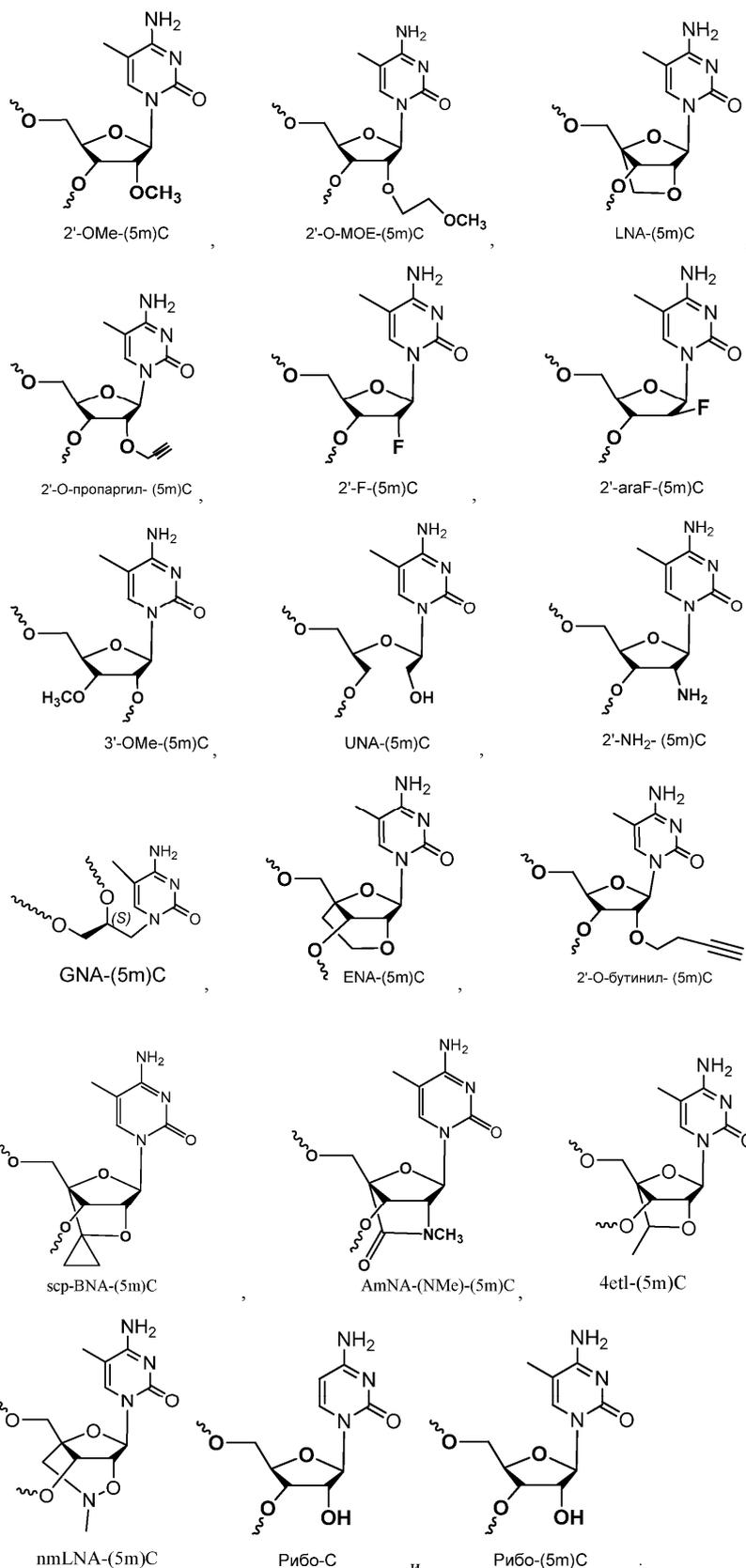
В настоящее время имеются данные, что в противоположность существующим представлениям об оптимальной комбинации желательных структурных особенностей противовирусных соединений можно значительно улучшить их свойства путем модификации и получения соединений STOPS™, описанных в настоящем документе. Например, в некоторых вариантах реализации независимая от последовательности противовирусная активность новых соединений STOPS™ против ВГВ, определяемая с помощью анализа секреции HBsAg, превышает активность референсного соединения. Учитывая многолетние исследования, завершившиеся разработкой признанной в данной области техники оптимизированной структуры REP 2139, специалисты в данной области техники не возлагают больших ожиданий на то, что варианты реализации модифицированных соединений STOPS™, описанных в настоящем документе, будут обладать такой улучшенной эффективностью. Таким образом, структуры новых соединений STOPS™ и способы их применения для лечения ВГВ и ВГД являются неожиданными и оригинальными.

Некоторые варианты реализации, описанные в настоящем документе, относятся к модифицированному олигонуклеотиду или его комплексу, обладающему независимой от последовательности активностью против вируса гепатита В, который может содержать по меньшей мере частично тиофосфатированную последовательность из чередующихся фрагментов А и С, причем

фрагменты А содержат одно или более из соединений, выбранных из



фрагменты С содержат одно или более из соединений, выбранных из



каждая концевая группа $\sim\text{O}$ независимо представляет собой гидроксил, O,O-дигидротиофосфат, дигидрофосфат, концевой кэп или связывающую группу;

каждая внутренняя группа $\sim\text{O}$ представляет собой фосфорсодержащую связь с соседним фрагментом А или С, причем указанная фосфорсодержащая связь представляет собой тиофосфатную связь или модифицированную связь, выбранную из фосфодиэфирной, дитиофосфатной, метилфосфонатной, тиодифосфатной, 5'-фосфорамидатной, 3',5'-фосфордиамидатной, 5'-тиофосфорамидатной, 3',5'-тиофосфор-

диамидатной или дифосфодиэфирной связи; и

независимая от последовательности активность против вируса гепатита В, определяемая с помощью анализа секреции HBsAg, превышает активность референсного соединения;

при том условии, что если последовательность из чередующихся фрагментов А и С содержит фрагмент рибо-А, то указанная последовательность дополнительно содержит по меньшей мере один фрагмент А, не являющийся фрагментом рибо-А; и

при том условии, что если последовательность из чередующихся фрагментов А и С содержит фрагмент рибо-С, то указанная последовательность дополнительно содержит по меньшей мере один фрагмент С, не являющийся фрагментом рибо-С.

Некоторые варианты реализации, описанные в настоящем документе, относятся к способу лечения инфекции ВГВ и/или ВГД, который может включать введение субъекту, который, как установлено, страдает от инфекции ВГВ и/или ВГД, эффективного количества модифицированного олигонуклеотида, описанного в настоящем документе, или фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество модифицированного олигонуклеотида, описанного в настоящем документе.

Некоторые варианты реализации, описанные в настоящем документе, относятся к способу ингибирования репликации ВГВ и/или ВГД, который может включать приведение клетки, инфицированной ВГВ и/или ВГД, в контакт с эффективным количеством модифицированного олигонуклеотида, описанного в настоящем документе, или фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество модифицированного олигонуклеотида, описанного в настоящем документе.

Другие варианты реализации подробно описаны ниже.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показан вариант реализации модифицированного олигонуклеотида, содержащего C₂₋₆-алкиленовую связывающую группу.

На фиг. 2 показан вариант реализации модифицированного олигонуклеотида, содержащего пропиленоксидную связывающую группу.

На фиг. 3А показан вариант реализации модифицированного олигонуклеотида, содержащего холестерин, присоединенный через 5'-тетраэтиленгликолевую (ТЕГ) связывающую группу.

На фиг. 3В показан вариант реализации модифицированного олигонуклеотида, содержащего 3'-ТЕГ связывающую группу.

На фиг. 3С показан вариант реализации модифицированного олигонуклеотида, содержащего токоферол (витамин Е), присоединенный через 5'-ТЕГ связывающую группу.

На фиг. 3Д показан вариант реализации модифицированного олигонуклеотида, содержащего токоферол (витамин Е), присоединенный через 3'-ТЕГ связывающую группу.

На фиг. 4А и 4В показаны варианты реализации модифицированных олигонуклеотидов, содержащих GalNac, присоединенный через связывающую группу.

На фиг. 5 показан вариант реализации схемы реакции для получения структурного элемента 5'-EP.

На фиг. 6А показаны варианты реализации модифицированных олигонуклеотидов и соответствующие значения независимой от последовательности активности против вируса гепатита В (определяемой посредством анализа секреции HBsAg) и цитотоксичности.

На фиг. 6В показаны варианты реализации модифицированных олигонуклеотидов и соответствующие значения независимой от последовательности активности против вируса гепатита В (определяемой посредством анализа секреции HBsAg) и цитотоксичности.

На фиг. 7 показан вариант реализации схемы реакции для получения соединения 5'-VP.

На фиг. 8 показан вариант реализации схемы реакции для получения соединений 8-5 и 8-6.

На фиг. 9А показан вариант реализации схемы реакции для получения соединения 9R.

На фиг. 9В показан вариант реализации схемы реакции для получения соединения 9S.

На фиг. 10 показан вариант реализации схемы реакции для получения соединений 10-5 и 10-6.

На фиг. 11А показан вариант реализации схемы реакции для получения соединения 11R.

На фиг. 11В показан вариант реализации схемы реакции для получения соединения 11S.

На фиг. 12 показаны результаты воздействия на печень после подкожного введения вариантов реализации модифицированных олигонуклеотидных соединений приматам, не являющимся человеком.

На фиг. 13 показаны результаты анализа МПК, демонстрирующие иммунный ответ на варианты реализации модифицированных олигонуклеотидных соединений.

На фиг. 14 показаны результаты анализа МПК, демонстрирующие иммунный ответ на варианты реализации модифицированных олигонуклеотидных соединений.

На фиг. 15 показаны результаты анализа МПК, демонстрирующие иммунный ответ на варианты реализации модифицированных олигонуклеотидных соединений.

На фиг. 16 показаны результаты анализа МПК, демонстрирующие иммунный ответ на варианты реализации модифицированных олигонуклеотидных соединений.

На фиг. 17 показаны результаты анализа МПК, демонстрирующие иммунный ответ на варианты реализации модифицированных олигонуклеотидных соединений.

На фиг. 18 показаны результаты анализа МПК, демонстрирующие иммунный ответ на варианты ре-

ализации модифицированных олигонуклеотидных соединений.

На фиг. 19 показаны результаты анализа МПК, демонстрирующие иммунный ответ на варианты реализации модифицированных олигонуклеотидных соединений.

На фиг. 20 показаны результаты анализа МПК, демонстрирующие иммунный ответ на варианты реализации модифицированных олигонуклеотидных соединений.

На фиг. 21 показаны результаты анализа МПК, демонстрирующие иммунный ответ на варианты реализации модифицированных олигонуклеотидных соединений.

На фиг. 22 показаны результаты анализа МПК, демонстрирующие иммунный ответ на варианты реализации модифицированных олигонуклеотидных соединений.

На фиг. 23 показан график, используемый в связи с анализом секреции HBsAg, описанным в примерах В3 и В4.

Подробное описание изобретения

Определения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, использованные в настоящем документе, имеют значение, совпадающее с общепринятым среди специалистов в данной области техники. Если не указано иное, все патенты, заявки, опубликованные заявки и другие публикации, ссылки на которые приведены в настоящем документе, полностью включены в настоящий документ посредством ссылок. При наличии множества определений для термина в настоящем документе приоритет имеют определения, указанные в данном разделе, если не указано иное.

Вирус гепатита В (ВГВ) представляет собой ДНК-содержащий вирус и является членом семейства *Hepadnaviridae*. ВГВ инфицирует более 300 миллионов человек во всем мире и является причиной рака печени и таких заболеваний печени, как хронический гепатит, цирроз и гепатоцеллюлярная карцинома. ВГВ может быть острым и/или хроническим. Острая инфекция ВГВ может протекать бессимптомно или проявляться в виде симптоматического острого гепатита. ВГВ подразделяется на восемь генотипов - от А до Н.

ВГВ содержит частично двуцепочечную кольцевую ДНК размером приблизительно 3,2 тысячи пар оснований (т.п.о.). Путь репликации ВГВ подробно изучен. T.J. Liang, *Heptaology* (2009) 49 (5 Suppl):S13-S21. Один этап репликации включает образование ковалентно замкнутой кольцевой формы (кзкДНК). Присутствие кзкДНК приводит к риску повторного появления вируса на протяжении жизни организма-хозяина. Носители ВГВ могут передавать данное заболевание в течение многих лет. Согласно оценкам, 257 миллионов человек живут с инфекцией вируса гепатита В, и более 750000 человек в мире умирают от гепатита В каждый год. Кроме того, у лиц с иммуносупрессией или у лиц, подвергающихся химиотерапии, имеется особый риск реактивации инфекции ВГВ.

ВГВ может передаваться с кровью, семенной жидкостью и/или другими биологическими жидкостями. Это может произойти при непосредственном контакте крови с кровью, незащищенном сексе, совместном использовании игл, а также от инфицированной матери младенцу во время родов. Поверхностный антиген ВГВ (HBsAg) наиболее часто применяют для скрининга на предмет наличия данной инфекции. Лекарственные средства, существующие в настоящее время, не излечивают инфекцию ВГВ и/или ВГД. Вместо этого эти лекарственные средства подавляют репликацию вируса.

Вирус гепатита D (ВГД) представляет собой ДНК-содержащий вирус и также относится к семейству вирусов *Hepadnaviridae*. ВГД может размножаться только в присутствии ВГВ. Пути передачи ВГД и ВГВ аналогичны. Передача ВГД может происходить посредством одновременной инфекции с ВГВ (совместной инфекции) или в дополнение к хроническому гепатиту В или состоянию носительства гепатита В (суперинфекция). Как суперинфекция, так и совместная инфекция ВГД приводит к более тяжелым осложнениям по сравнению с инфекцией только ВГВ. Эти осложнения включают повышенную вероятность печеночной недостаточности при острых инфекциях и быстрое прогрессирование состояния до цирроза печени, а также повышенный риск развития рака печени при хронических инфекциях. Для гепатита D в комбинации с гепатитом В характерен максимальный коэффициент смертности среди всех инфекционных гепатитов, составляющий 20%. В настоящее время не существует вакцины или способа излечить гепатит D.

Термин "противовирусный" в контексте олигонуклеотидов или других веществ имеет свое обычное значение, принятое среди специалистов в данной области техники, и, таким образом, включает эффект присутствия олигонуклеотидов или другого вещества, ингибирующий продукцию вирусных частиц, обычно путем снижения количества инфекционных вирусных частиц, образованных в системе, в других отношениях подходящей для образования инфекционных вирусных частиц по меньшей мере одного вируса. В некоторых вариантах реализации противовирусный олигонуклеотид обладает противовирусной активностью против множества различных вирусов, например, как ВГВ, так и ВГД.

В настоящем документе термин "олигонуклеотид" (или "олиго") имеет свое обычное значение, принятое среди специалистов в данной области техники, и, таким образом, относится к классу соединений, включающему олигодезоксирибонуклеотиды, олигодезоксирибонуклеотиды и олигорибонуклеотиды. Так, термин "олигонуклеотид" относится к олигомеру или полимеру рибонуклеиновой кислоты (РНК) или дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или веществ, имитирующих их, включая упоминание олиго-

нуклеотидов, состоящих из природных нуклеиновых оснований, углеводов и фосфодиэфирных (РО) межнуклеозидных (каркасных) связей, а также "модифицированных" или замещенных олигонуклеотидов, содержащих неприродные фрагменты, функционирующие аналогичным образом. Так, термин "модифицированный" (или "замещенный") олигонуклеотид имеет свое обычное значение, принятое среди специалистов в данной области техники и включает олигонуклеотиды, содержащие одну или более из различных модификаций, например, стабилизирующих модификаций, и, таким образом, может содержать по меньшей мере одну модификацию межнуклеозидной связи и/или рибозы и/или основания. Например, модифицированный олигонуклеотид может содержать модификации по 2'-положению рибозы, ацильные аналоги нуклеотидов, метилирование основания, тиофосфатированные (PS) связи, дитиофосфатные связи, метилфосфонатные связи, связи, соединяющиеся с углеводным кольцом через атом серы или азота и/или другие модификации, описанные в других разделах настоящего документа. Таким образом, модифицированный олигонуклеотид может содержать одну или более тиофосфатированных (PS) связей вместо или в дополнение к РО-связям. Как и немодифицированные олигонуклеотиды, модифицированные олигонуклеотиды, содержащие такие PS-связи, считаются относящимися к тому же классу соединений, поскольку даже если PS-связь содержит двойную связь фосфор-сера вместо двойной связи фосфор-кислород в РО-связи, как PS, так и РО-связи соединяются с углеводными кольцами через атомы кислорода.

В настоящем документе в контексте модифицированных олигонуклеотидов термин "тиофосфатированный" олигонуклеотид имеет свое обычное значение, принятое среди специалистов в данной области техники, и, таким образом, относится к модифицированному олигонуклеотиду, в котором все фосфодиэфирные межнуклеозидные связи замещены тиофосфатными связями. Специалисты в данной области техники, таким образом, понимают, что термин "тиофосфатированный" олигонуклеотид является синонимом "полностью тиофосфатированного" олигонуклеотида. Тиофосфатированный олигонуклеотид (или последовательность тиофосфатированных олигонуклеотидов внутри частично тиофосфатированного олигонуклеотида) можно модифицировать аналогичным образом, в том числе (например), заменив одну или более из тиофосфатированных межнуклеозидных связей фосфодиэфирными связями. Таким образом, термин "модифицированный тиофосфатированный" олигонуклеотид относится к тиофосфатированному олигонуклеотиду, модифицированному аналогично модификациям олигонуклеотидов, описанным в настоящем документе, например, путем замены тиофосфатированной связи модифицированной связью, например, фосфодиэфирной, дитиофосфатной, метилфосфонатной, тиодифосфатной, 5'-фосфорамидатной, 3',5'-фосфордиамидатной, 5'-тиофосфорамидатной, 3',5'-тиофосфордиамидатной или дифосфодиэфирной. По меньшей мере частично тиофосфатированную последовательность модифицированного олигонуклеотида можно модифицировать аналогичным образом и, таким образом, можно модифицировать так, чтобы она содержала нетиофосфатную связь, например, фосфодиэфирную, дитиофосфатную, метилфосфонатную, тиодифосфатную, 5'-фосфорамидатную, 3',5'-фосфордиамидатную, 5'-тиофосфорамидатную, 3',5'-тиофосфордиамидатную или дифосфодиэфирную связь. В контексте описания модификаций тиофосфатированного олигонуклеотида или по меньшей мере частично тиофосфатированной последовательности модифицированного олигонуклеотида можно считать, что модификация путем включения фосфодиэфирной связи приводит к получению модифицированного тиофосфатированного олигонуклеотида или модифицированной тиофосфатированной последовательности, соответственно. Аналогичным образом, в контексте описания модификаций олигонуклеотида или по меньшей мере частично фосфодиэтерифицированной последовательности модифицированного олигонуклеотида можно считать, что модификация путем включения тиофосфатированной связи приводит к получению модифицированного олигонуклеотида или модифицированной фосфодиэтерифицированной последовательности, соответственно.

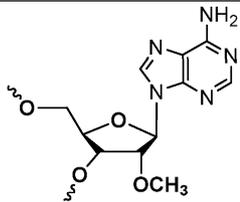
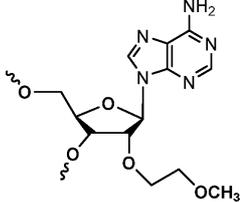
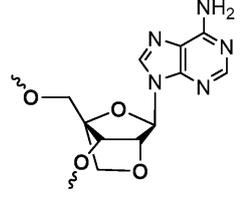
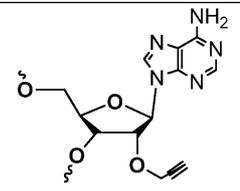
В контексте динуклеотидов или олигонуклеотидов термин "стереохимически заданная тиофосфатная связь" имеет свое обычное значение, принятое среди специалистов в данной области техники, и, таким образом, относится к тиофосфатной связи, содержащей фосфорный стереоцентр с выбранной хиральностью (R- или S-конфигурации). Композицию, содержащую динуклеотид или олигонуклеотид, можно обогатить молекулами выбранной хиральности. Стереочистота такой композиции может варьировать в широких пределах, например, от приблизительно 51% до приблизительно 100% стереочистоты. В различных вариантах реализации стереочистота превышает 55, 65, 75, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%; или находится в диапазоне, конечными точками которого являются любые два вышеуказанных значения стереочистоты.

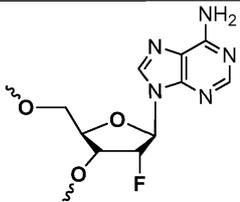
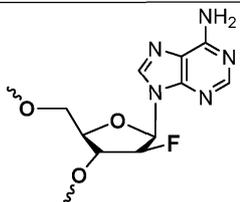
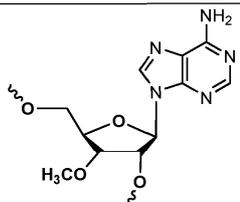
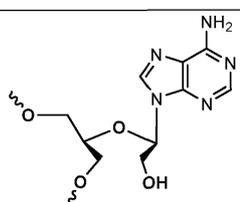
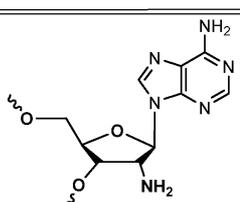
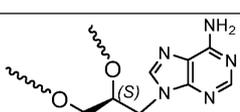
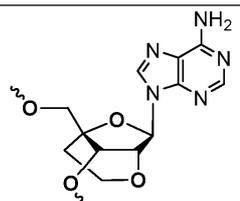
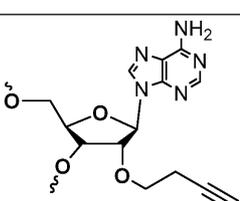
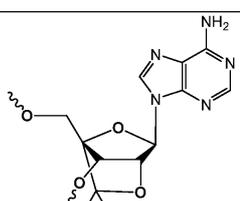
Термин "независимая от последовательности" противовирусная активность имеет свое обычное значение, принятое среди специалистов в данной области техники, и, таким образом, относится к противовирусной активности олигонуклеотида (например, модифицированного олигонуклеотида), независимой от последовательности этого олигонуклеотида. Способы определения того, является ли противовирусная активность олигонуклеотида независимой от последовательности, известны специалистам в данной области техники и включают тесты для определения возможности преимущественного действия олигонуклеотида за счет механизма действия, не использующего комплементарность последовательности, описанные в примере 10 патентов США № 7358068; 8008269; 8008270 и 8067385, включенных в на-

стоящий документ в качестве ссылок и для конкретной цели описания таких тестов.

В контексте описания модифицированных олигонуклеотидов, обладающих независимой от последовательности противовирусной активностью и содержащих последовательность (например, по меньшей мере частично тиофосфатированной последовательности) фрагментов А и С (например, из чередующихся фрагментов А и С или фрагментов АС), термины "А" и "С" относятся к модифицированным аденозин-содержащим (А) фрагментам и модифицированным цитозин-содержащим (С) фрагментам, приведенным ниже в табл. 1 и 2, соответственно.

Таблица 1. Фрагменты "А"

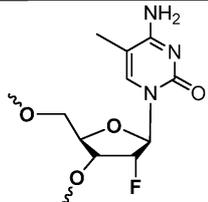
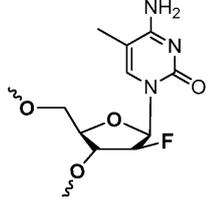
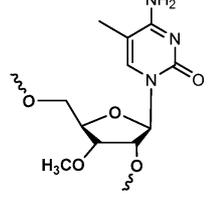
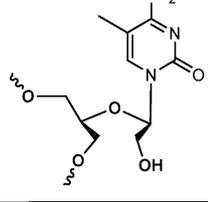
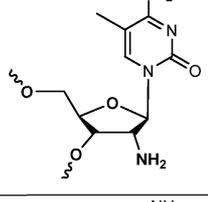
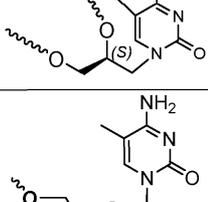
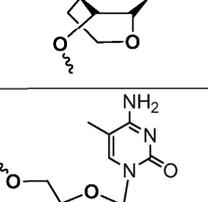
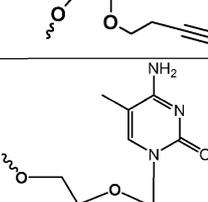
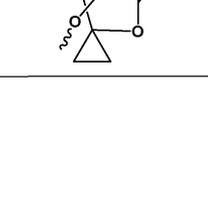
Сокращение (фрагмент А)	Структура (фрагмент А)
2'-ОМе-А	
2'-O-MOE-A	
LNA-A	
2'-O-пропаргил-А	

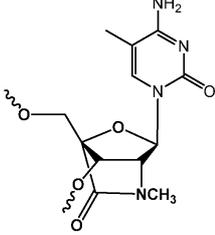
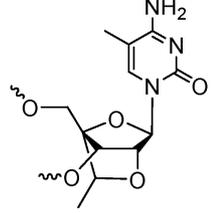
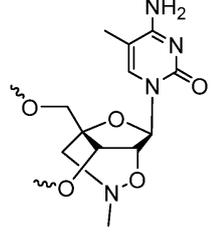
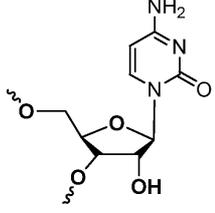
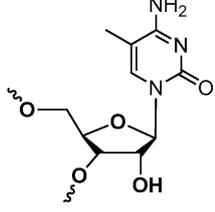
2'-F-A	
2'-araF-A	
3'-OMe-A	
UNA-A	
2'-NH ₂ -A	
GNA-A	
ENA-A	
2'-O-бутинил-A	
scp-BNA-A	

AmNA (NMe)-A	
nmLNA-A	
4etl-A	
Рибо-А	

Таблица 2. Фрагменты "С"

Сокращение (фрагмент С)	Структура (фрагмент С)
2'-ОМе- (5m)C	
2'-O-MOE- (5m)C	
LNA- (5m)C	
2'-O-пропаргил- (5m)C	

2'-F- (5m)C	
2'-araF- (5m)C	
3'-OMe- (5m)C	
UNA- (5m)C	
2'-NH2- (5m)C	
GNA- (5m)C	
ENA- (5m)C	
2'-O-бутинил- (5m)C	
scr-BNA- (5m)C	

AmNA- (NMe)- (5m)C	
4etl- (5m)C	
nmLNA- (5m)C	
Рибо-С	
Рибо- (5m)C	

Модифицированные олигонуклеотидные соединения.

В одном варианте реализации предложено модифицированное олигонуклеотидное соединение STOPS™, обладающее независимой от последовательности активностью против вируса гепатита В, содержащее по меньшей мере частично тиофосфатированную последовательность из чередующихся фрагментов А и С, причем фрагменты А представляют собой любое или любые соединения, выбранные из соединений, приведенных в табл. 1, а фрагменты С представляют собой любое или любые соединения, выбранные из соединений, приведенных в табл. 2. Различные комбинации фрагментов А и С, в том числе комбинации, описанные ниже в табл. 3, можно включать по меньшей мере в частично тиофосфатированную последовательность АС.

Таблица 3. Примеры фрагментов АС

№	Фрагмент А	Фрагмент С
1	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С
2	2'-ОМе-А	2'-О-МОЕ- (5m)С
3	2'-ОМе-А	LNA- (5m)С
4	2'-ОМе-А	ЕНА- (5m)С
5	2'-ОМе-А	scp-BNA- (5m)С
6	2'-ОМе-А	AmNA- (NMe)- (5m)С
7	2'-ОМе-А	2'-О-пропаргил- (5m)С
8	2'-ОМе-А	2'-О-бутинил- (5m)С

9	2'-OMe-A	2'-F- (5m)C
10	2'-OMe-A	2'-araF- (5m)C
11	2'-OMe-A	3'-OMe- (5m)C
12	2'-OMe-A	UNA- (5m)C
13	2'-OMe-A	2'-NH ₂ - (5m)C
14	2'-OMe-A	GNA- (5m)C
15	2'-OMe-A	4etl- (5m)C
16	2'-OMe-A	nmLNA- (5m)C
17	2'-O-MOE-A	2'-OMe- (5m)C
18	2'-O-MOE-A	2'-O-MOE- (5m)C
19	2'-O-MOE-A	LNA- (5m)C
20	2'-O-MOE-A	ENA- (5m)C
21	2'-O-MOE-A	scp-BNA- (5m)C
22	2'-O-MOE-A	AmNA- (NMe)- (5m)C
23	2'-O-MOE-A	2'-O-пропаргил- (5m)C
24	2'-O-MOE-A	2'-O-бутинил- (5m)C
25	2'-O-MOE-A	2'-F- (5m)C
26	2'-O-MOE-A	2'-araF- (5m)C
27	2'-O-MOE-A	3'-OMe- (5m)C
28	2'-O-MOE-A	UNA- (5m)C
29	2'-O-MOE-A	2'-NH ₂ - (5m)C
30	2'- O-MOE-A	GNA- (5m)C
31	2'-O-MOE-A	4etl- (5m)C
32	2'-O-MOE-A	nmLNA- (5m)C
33	LNA-A	2'-OMe- (5m)C
34	LNA-A	2'-O-MOE- (5m)C

35	LNA-A	LNA- (5m)C
36	LNA-A	ENA- (5m)C
37	LNA-A	scp-BNA- (5m)C
38	LNA-A	AmNA- (NMe)- (5m)C
39	LNA-A	2'-O-пропаргил- (5m)C
40	LNA-A	2'-O-бутинил- (5m)C
41	LNA-A	2'-F- (5m)C
42	LNA-A	2'-araF- (5m)C
43	LNA-A	3'-OMe- (5m)C
44	LNA-A	UNA- (5m)C
45	LNA-A	2'-NH ₂ - (5m)C
46	LNA-A	GNA- (5m)C
47	LNA-A	4etl- (5m)C
48	LNA-A	nmLNA- (5m)C
49	ENA-A	2'-OMe- (5m)C
50	ENA-A	2'- O-MOE- (5m)C
51	ENA-A	LNA- (5m)C
52	ENA-A	ENA- (5m)C
53	ENA-A	scp-BNA- (5m)C
54	ENA-A	AmNA- (NMe)- (5m)C
55	ENA-A	2'-O-пропаргил- (5m)C
56	ENA-A	2'-O-бутинил- (5m)C
57	ENA-A	2'-F- (5m)C
58	ENA-A	2'-araF- (5m)C
59	ENA-A	3'-OMe- (5m)C
60	ENA-A	UNA- (5m)C

61	ENA-A	2'-NH ₂ - (5m)C
62	ENA-A	GNA- (5m)C
63	ENA-A	4etl- (5m)C
64	ENA-A	nmLNA- (5m)C
65	scp-BNA-A	2'-OMe- (5m)C
66	scp-BNA-A	2'- O-MOE- (5m)C
67	scp-BNA-A	LNA- (5m)C
68	scp-BNA-A	ENA- (5m)C
69	scp-BNA-A	scp-BNA- (5m)C
70	scp-BNA-A	AmNA- (NMe)- (5m)C
71	scp-BNA-A	2'-O-пропаргил- (5m)C
72	scp-BNA-A	2'-O-бутинил- (5m)C
73	scp-BNA-A	2'-F- (5m)C
74	scp-BNA-A	2'-araF- (5m)C
75	scp-BNA-A	3'-OMe- (5m)C
76	scp-BNA-A	UNA- (5m)C
77	scp-BNA-A	2'-NH ₂ - (5m)C
78	scp-BNA-A	GNA- (5m)C
79	scp-BNA-A	4etl- (5m)C
80	scp-BNA-A	nmLNA- (5m)C
81	AmNA (N-Me)-A	2'-OMe- (5m)C
82	AmNA (N-Me)-A	2'- O-MOE- (5m)C
83	AmNA (N-Me)-A	LNA- (5m)C
84	AmNA (N-Me)-A	ENA- (5m)C
85	AmNA (N-Me)-A	scp-BNA- (5m)C
86	AmNA (N-Me)-A	AmNA- (NMe)- (5m)C

87	AmNA (N-Me)-A	2'-O-пропаргил- (5m)C
88	AmNA (N-Me)-A	2'-O-бутинил- (5m)C
89	AmNA (N-Me)-A	2'-F- (5m)C
90	AmNA (N-Me)-A	2'-ara-F- (5m)C
91	AmNA (N-Me)-A	3'-OMe- (5m)C
92	AmNA (N-Me)-A	UNA- (5m)C
93	AmNA (N-Me)-A	2'-NII ₂ - (5m)C
94	AmNA (N-Me)-A	GNA- (5m)C
95	AmNA (N-Me)-A	4etl- (5m)C
96	AmNA (N-Me)-A	nmLNA- (5m)C
97	2'-O-пропаргил-A	2'-OMe- (5m)C
98	2'-O-пропаргил-A	2'- O-MOE- (5m)C
99	2'-O-пропаргил-A	LNA- (5m)C
100	2'-O-пропаргил-A	ENA- (5m)C
101	2'-O-пропаргил-A	scp-BNA- (5m)C
102	2'-O-пропаргил-A	AmNA- (NMe)- (5m)C
103	2'-O-пропаргил-A	2'-O-пропаргил- (5m)C
104	2'-O-пропаргил-A	2'-O-бутин- (5m)C
105	2'-O-пропаргил-A	2'-F- (5m)C
106	2'-O-пропаргил-A	2'-araF- (5m)C
107	2'-O-пропаргил-A	3'-OMe- (5m)C
108	2'-O-пропаргил-A	UNA- (5m)C
109	2'-O-пропаргил-A	2'-NH ₂ - (5m)C
110	2'-O-пропаргил-A	GNA- (5m)C
111	2'-O-пропаргил-A	4etl- (5m)C
112	2'-O-пропаргил-A	nmLNA- (5m)C

113	2'-О-бутинил-А	2'-ОМе- (5m)C
114	2'-О-бутинил-А	2'- О-МОЕ- (5m)C
115	2'-О-бутинил-А	LNA- (5m)C
116	2'-О-бутинил-А	ENA- (5m)C
117	2'-О-бутинил-А	scp-BNA- (5m)C
118	2'-О-бутинил-А	AmNA- (NMe)- (5m)C
119	2'-О-бутинил-А	2'-О-пропаргил- (5m)C
120	2'-О-бутинил-А	2'-О-бутинил- (5m)C
121	2'-О-бутинил-А	2'-F- (5m)C
122	2'-О-бутинил-А	2'-araF- (5m)C
123	2'-О-бутинил-А	3'-ОМе- (5m)C
124	2'-О-бутинил-А	UNA- (5m)C
125	2'-О-бутинил-А	2'-NH ₂ - (5m)C
126	2'-О-бутинил-А	GNA- (5m)C
127	2'-О-бутинил-А	4etl- (5m)C
128	2'-О-бутинил-А	nmLNA- (5m)C
129	2'-F А	2'-ОМе- (5m)C
130	2'-F А	2'- О-МОЕ- (5m)C
131	2'-F А	LNA- (5m)C
132	2'-F А	ENA- (5m)C
133	2'-F А	scp-BNA- (5m)C
134	2'-F А	AmNA- (NMe)- (5m)C
135	2'-F А	2'-О-пропаргил- (5m)C
136	2'-F А	2'-О-бутинил- (5m)C
137	2'-F А	2'-F- (5m)C
138	2'-F А	2'-ara-F- (5m)C

139	2'-F A	3'-OMe- (5m)C
140	2'-F A	UNA- (5m)C
141	2'-F A	2'-NH ₂ - (5m)C
142	2'-F A	GNA- (5m)C
143	2'-F A	4etl- (5m)C
144	2'-F A	nmLNA- (5m)C
145	2'-araF A	2'-OMe- (5m)C
146	2'-araF A	2'- O-MOE- (5m)C
147	2'-araF A	LNA- (5m)C
148	2'-araF A	ENA- (5m)C
149	2'-araF A	scp-BNA- (5m)C
150	2'-araF A	AmNA- (NMe)- (5m)C
151	2'-araF A	2'-O-пропаргил- (5m)C
152	2'-araF A	2'-O-бутинил- (5m)C
153	2'-araF A	2'-F- (5m)C
154	2'-araF A	2'-araF- (5m)C
155	2'-araF A	3'-OMe- (5m)C
159	2'-araF A	UNA- (5m)C
157	2'-araF A	2'-NH ₂ - (5m)C
158	2'-araF A	GNA- (5m)C
159	2'-araF A	4etl- (5m)C
160	2'-araF A	nmLNA- (5m)C
161	3'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C
162	3'-OMe-A	2'- O-MOE- (5m)C
163	3'-OMe-A	LNA- (5m)C
164	3'-OMe-A	ENA- (5m)C

165	3'-OMe-A	scp-BNA- (5m)C
166	3'-OMe-A	AmNA- (NMe)- (5m)C
167	3'-OMe-A	2'-O-пропаргил- (5m)C
168	3'-OMe-A	2'-O-бутинил- (5m)C
169	3'-OMe-A	2'-F- (5m)C
170	3'-OMe-A	2'-ara-F- (5m)C
171	3'-OMe-A	3'-OMe- (5m)C
172	3'-OMe-A	UNA- (5m)C
173	3'-OMe-A	2'-NH ₂ - (5m)C
174	3'-OMe-A	GNA- (5m)C
175	3'-OMe-A	4etl- (5m)C
176	3'-OMe-A	nmLNA- (5m)C
177	UNA-A	2'-OMe- (5m)C
178	UNA-A	2'- O-MOE- (5m)C
179	UNA-A	LNA- (5m)C
180	UNA-A	ENA- (5m)C
181	UNA-A	scp-BNA- (5m)C
182	UNA-A	AmNA- (NMe)- (5m)C
183	UNA-A	2'-O-пропаргил- (5m)C
184	UNA-A	2'-O-бутинил- (5m)C
185	UNA-A	2'-F- (5m)C
186	UNA-A	2'-araF- (5m)C
187	UNA-A	3'-OMe- (5m)C
188	UNA-A	UNA- (5m)C
189	UNA-A	2'-NH ₂ - (5m)C
190	UNA-A	GNA- (5m)C

191	UNA-A	4etl- (5m)C
192	UNA-A	nmLNA- (5m)C
193	2'-NH ₂ -A	2'-OMe- (5m)C
194	2'-NH ₂ -A	2'-O-MOE- (5m)C
195	2'-NH ₂ -A	LNA- (5m)C
196	2'-NH ₂ -A	ENA- (5m)C
197	2'-NH ₂ -A	scp-BNA- (5m)C
198	2'-NH ₂ -A	AmNA- (NMe)- (5m)C
199	2'-NH ₂ -A	2'-O-пропаргил- (5m)C
200	2'-NH ₂ -A	2'-O-бутинил- (5m)C
201	2'-NH ₂ -A	2'-F- (5m)C
202	2'-NH ₂ -A	2'-ara-F- (5m)C
203	2'-NH ₂ -A	3'-OMe- (5m)C
204	2'-NH ₂ -A	UNA- (5m)C
205	2'-NH ₂ -A	2'-NH ₂ - (5m)C
206	2'-NH ₂ -A	GNA- (5m)C
207	2'-NH ₂ -A	4etl- (5m)C
208	2'-NH ₂ -A	nmLNA- (5m)C
209	GNA-A	2'-OMe- (5m)C
210	GNA-A	2'-O-MOE- (5m)C
211	GNA-A	LNA- (5m)C
212	GNA-A	ENA- (5m)C
213	GNA-A	scp-BNA- (5m)C
214	GNA-A	AmNA- (NMe)- (5m)C
215	GNA-A	2'-O-пропаргил- (5m)C
216	GNA-A	2'-O-бутинил- (5m)C

217	GNA-A	2'-F- (5m)C
218	GNA-A	2'-ara-F- (5m)C
219	GNA-A	3'-OMe- (5m)C
220	GNA-A	UNA- (5m)C
221	GNA-A	2'-NH ₂ - (5m)C
222	GNA-A	GNA- (5m)C
223	GNA-A	4etl- (5m)C
224	GNA-A	nmLNA- (5m)C
225	nmLNA-A	2'-OMe- (5m)C
226	nmLNA-A	2'-O-MOE- (5m)C
227	nmLNA-A	LNA- (5m)C
228	nmLNA-A	ENA- (5m)C
229	nmLNA-A	scp-BNA- (5m)C
230	nmLNA-A	AmNA- (NMe)- (5m)C
231	nmLNA-A	2'-O-пропаргил- (5m)C
232	nmLNA-A	2'-O-бутинил- (5m)C
233	nmLNA-A	2'-F- (5m)C
234	nmLNA-A	2'-ara-F- (5m)C
235	nmLNA-A	3'-OMe- (5m)C
236	nmLNA-A	UNA- (5m)C
237	nmLNA -A	2'-NH ₂ - (5m)C
238	nmLNA-A	GNA- (5m)C
239	nmLNA-A	4etl- (5m)C
240	nmLNA-A	nmLNA- (5m)C
241	4etl-A	2'-OMe- (5m)C
242	4etl-A	2'-O-MOE- (5m)C

243	4etl-A	LNA- (5m)C
244	4etl-A	ENA- (5m)C
245	4etl-A	scp-BNA- (5m)C
246	4etl-A	AmNA- (NMe)- (5m)C
247	4etl-A	2'-O-пропаргил- (5m)C
248	4etl-A	2'-O-бутинил- (5m)C
249	4etl-A	2'-F- (5m)C
250	4etl-A	2'-ara-F- (5m)C
251	4etl-A	3'-OMe- (5m)C
252	4etl-A	UNA- (5m)C
253	4etl-A	2'-NH ₂ - (5m)C
254	4etl-A	GNA- (5m)C
255	4etl-A	4etl- (5m)C
256	4etl-A	nmLNA- (5m)C

Длина модифицированного олигонуклеотида, описанного в настоящем документе, может варьировать в широком диапазоне. В различных вариантах реализации модифицированный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, содержит по меньшей мере частично тиофосфатированную последовательность из чередующихся фрагментов А и С, длина которой составляет приблизительно 8 фрагментов, приблизительно 10 фрагментов, приблизительно 12 фрагментов, приблизительно 14 фрагментов, приблизительно 16 фрагментов, приблизительно 18 фрагментов, приблизительно 20 фрагментов, приблизительно 24 фрагментов, приблизительно 30 фрагментов, приблизительно 34 фрагментов, приблизительно 36 фрагментов, приблизительно 38 фрагментов, приблизительно 40 фрагментов, приблизительно 44 фрагментов, приблизительно 50 фрагментов, приблизительно 60 фрагментов, приблизительно 76 фрагментов, приблизительно 100 фрагментов, приблизительно 122 фрагментов, приблизительно 124 фрагментов, приблизительно 150 фрагментов, приблизительно 172 фрагментов, приблизительно 200 фрагментов или находится в диапазоне между любыми двумя из вышеупомянутых значений. Например, в одном варианте реализации длина указанной по меньшей мере частично тиофосфатированной последовательности из чередующихся фрагментов А и С находится в диапазоне от 8 фрагментов до 200 фрагментов. В еще одном варианте реализации длина по меньшей мере частично тиофосфатированной последовательности из чередующихся фрагментов А и С находится в любом из одного или более (в соответствующих случаях) из следующих диапазонов: от приблизительно 8 фрагментов до приблизительно 36 фрагментов; от приблизительно 16 фрагментов до приблизительно 36 фрагментов; от 20 фрагментов до 36 фрагментов; от 16 фрагментов до 30 фрагментов; от 18 фрагментов до 60 фрагментов; от 20 фрагментов до 30 фрагментов; от 30 фрагментов до 50 фрагментов; от 34 фрагментов до 46 фрагментов, от 36 фрагментов до 44 фрагментов; от 44 фрагментов до 200 фрагментов; от 44 фрагментов до 150 фрагментов; от 44 фрагментов до 120 фрагментов; от 50 фрагментов до 200 фрагментов; от 50 фрагментов до 150 фрагментов; от 50 фрагментов до 120 фрагментов; от 60 фрагментов до 200 фрагментов; от 60 фрагментов до 150 фрагментов; и/или от 60 фрагментов до 120 фрагментов.

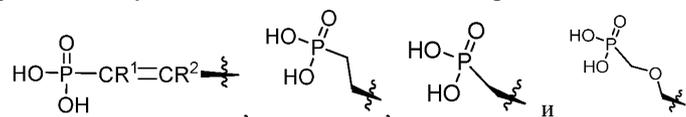
Как описано в других разделах настоящего документа, в некоторых вариантах реализации модифицированный олигонуклеотид может содержать одну по меньшей мере частично тиофосфатированную последовательность из чередующихся фрагментов А и С, либо в других вариантах реализации модифицированный олигонуклеотид может содержать множество частично тиофосфатированных последовательностей из чередующихся фрагментов А и С, соединенных друг с другом. Так, длина последовательности модифицированного олигонуклеотида, содержащего по меньшей мере частично тиофосфатированную последовательность из чередующихся фрагментов А и С, может быть такой же, как у указанной последовательности. Примеры таких длин последовательностей описаны в других разделах настоящего документа. Аналогичным образом, длину модифицированного олигонуклеотида, содержащего множество по меньшей мере частично тиофосфатированных последовательностей из чередующихся фрагментов А и С, можно получить в результате соединения этих последовательностей, описанных в других разделах настоящего документа. Примеры длин последовательностей модифицированного олигонуклеотида, содержащего множество по меньшей мере частично тиофосфатированных последовательностей из чере-

дующихся фрагментов А и С, выраженных в других разделах настоящего документа по отношению к длинам отдельных последовательностей, а также принимая во внимание длину связывающей группы.

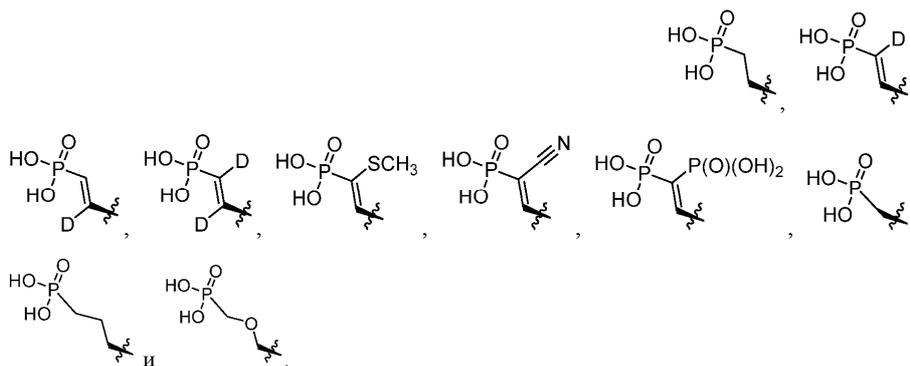
Модифицированный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, может содержать множество по меньшей мере частично тиофосфатированных последовательностей из чередующихся фрагментов А и С. В одном варианте реализации, если последовательность из чередующихся фрагментов А и С содержит фрагмент рибо-А, то указанная последовательность дополнительно содержит по меньшей мере один фрагмент А, не являющимся фрагментом рибо-А. Аналогичным образом, в одном варианте реализации, если последовательность из чередующихся фрагментов А и С содержит фрагмент рибо-С, то указанная последовательность дополнительно содержит по меньшей мере один фрагмент С, не являющимся фрагментом рибо-С. В одном варианте реализации модифицированный олигонуклеотид может содержать одну или более из различных нуклеотидных фрагментов (известны специалистам в данной области техники, например, тимин, цитозин, аденин, гуанин и их модифицированные версии), не являющихся фрагментами А или С, например, в качестве концевых(ой) групп(ы) и/или в качестве связывающих(ей) групп(ы) между двумя или более по меньшей мере из частично тиофосфатированных последовательностей из чередующихся фрагментов А и С. Например, в одном варианте реализации модифицированный олигонуклеотид содержит одну или более из цитозиновых фрагментов, соединяющих по меньшей мере две или более из по меньшей мере частично тиофосфатированных последовательностей из чередующихся фрагментов А и С. В одном варианте реализации две или более из по меньшей мере частично тиофосфатированных последовательностей из чередующихся фрагментов А и С, соединенные друг с другом связывающей группой, отличающейся от А/С, идентичны друг другу. Примером такого модифицированного олигонуклеотида является (АС)₈-цитозин- (АС)₈. Такой модифицированный олигонуклеотид, содержащий множество идентичных последовательностей, соединенных друг с другом, в настоящем документе может называться конкатемером. Две или более из по меньшей мере частично тиофосфатированных последовательностей из чередующихся фрагментов А и С, соединенные друг с другом, также могут отличаться друг от друга. Примером такого модифицированного олигонуклеотида является (АС)₈-цитозин-(АС)₁₆.

Модифицированный олигонуклеотид может содержать две или более из различных групп А и/или две или более из различных групп С. Если группа А или С замещена другой группой А или С, обычно считается, что такая замена не прерывает последовательность из чередующихся фрагментов А и С. Например, в одном варианте реализации по меньшей мере некоторые из фрагментов А не являются 2'О-метилованными по рибозному кольцу и/или по меньшей мере некоторые из фрагментов С не являются 2'О-метилованными по рибозному кольцу. Однако в некоторых вариантах реализации группа, связывающая две по меньшей мере частично тиофосфатированные последовательности из чередующихся фрагментов А и С, сама по себе представляет собой фрагмент А или С, прерывающую последовательность из чередующихся фрагментов А и С. Например, по меньшей мере частично тиофосфатированный 16-мер из чередующихся фрагментов А и С может быть соединен фрагментом А с еще одним таким 16-мером с образованием (АС)₈-А-(АС)₈. Аналогичным образом, такой 16-мер может быть соединен фрагментом С с еще одним таким 16-мером с образованием (АС)₈-А-(АС)₈. Как отмечено выше, если множество по меньшей мере частично тиофосфатированных последовательностей из чередующихся фрагментов А и С, идентичных друг другу, соединены друг с другом связывающей группой, модифицированный олигонуклеотид в настоящем документе может называться конкатемером. Как указано выше, две или более из по меньшей мере частично тиофосфатированных последовательностей из чередующихся фрагментов А и С, соединенные друг с другом, также могут отличаться друг от друга. Примеры таких модифицированных олигонуклеотидов включают (АС)₈-А-(АС)₁₆ и (АС)₈-С-(АС)₁₆.

В одном варианте реализации модифицированный олигонуклеотид содержит 5'-концевой кэп. В различных вариантах реализации указанный 5'-концевой кэп выбран из



В одном варианте реализации каждая из групп R¹ и R² по отдельности выбрана из атома водорода, дейтерия, фосфата, тиоC₁₋₆-алкила и цианогруппы; например, в одном варианте реализации обе группы R¹ и R² представляют собой атомы водорода, и модифицированный олигонуклеотид содержит винилфосфонатный концевой кэп. В других вариантах реализации обе группы R¹ и R² не являются атомами водорода. В некоторых вариантах реализации 5'-концевой кэп выбран из



В других вариантах реализации модифицированный олигонуклеотид содержит 3'- и/или 5'-связывающую группу. Например, по отношению к модифицированным олигонуклеотидным соединениям, содержащим фрагменты А и С, описанные в настоящем документе, например, фрагменты А и С из табл. 1 и 2, соответственно, по меньшей мере одна концевая группа $\sim\text{O}$ может представлять собой связывающую группу. Различные связывающие группы, известные специалистам в данной области техники, можно использовать для связывания модифицированного олигонуклеотида с еще одной группой (например, одним или более из вторых олигонуклеотидов и/или лигандов, обеспечивающих адресное воздействие). В одном варианте реализации связывающая группа включает связывающую группу, не являющуюся А/С, или фрагмент А или С, прерывающий последовательность из чередующихся фрагментов А и С, как обсуждалось выше, или связывающая группа содержит C_{2-6} -алкиленовую связывающую группу (фиг. 1), C_{2-6} -алкиленоксидную связывающую группу, например, пропиленоксидную связывающую группу (фиг. 2), или тетраэтиленгликолевую (ТЭГ) связывающую группу (фиг. 3А-Д).

В различных вариантах реализации два, три, четыре или более из модифицированных олигонуклеотидов могут быть соединены друг с другом различными способами. Например, модифицированные олигонуклеотиды можно соединить концами через 3'- и/или 5'-связывающие группы, и/или связывающие группы можно соединить с одним из 3'- или 5'-концом множественных модифицированных олигонуклеотидов, например, как показано на фиг. 1 и 2.

В различных вариантах реализации модифицированный олигонуклеотид дополнительно содержит лиганд, обеспечивающий адресное воздействие, присоединенный к модифицированному олигонуклеотиду посредством связывающей группы. Например, в различных вариантах реализации лиганд, обеспечивающий адресное воздействие, представляет собой или содержит N-ацетилгалактозамин (GalNac) (например, трехантенный GalNac), токоферол или холестерин. На фиг. 3А и 3В показаны варианты реализации модифицированных олигонуклеотидов, содержащих холестерин, присоединенный через 5'-ТЕГ связывающую группу и 3'-ТЕГ связывающую группу, соответственно. На фиг. 3С и 3Д показаны варианты реализации модифицированных олигонуклеотидов, содержащих токоферол (витамин Е), присоединенный через 5'-ТЕГ связывающую группу и 3'-ТЕГ связывающую группу, соответственно. На фиг. 4А и 4В показаны варианты реализации модифицированных олигонуклеотидов, содержащих GalNac, присоединенный через связывающую группу. В одном варианте воплощения GalNac представляет собой трехантенный GalNac.

В различных вариантах реализации указанная по меньшей мере частично тиофосфатированная последовательность из чередующихся фрагментов А и С может содержать модификацию(и) одной или более из тиофосфатированных связей. Обычно считается, что включение такой модифицированной связи не прерывает последовательность из чередующихся фрагментов А и С, поскольку специалисты в данной области техники понимают, что такая последовательность может быть лишь частично тиофосфатированной и, таким образом, может содержать одну или более из модификаций тиофосфатной связи. В различных вариантах реализации модификация тиофосфатной связи представляет собой модифицированную связь, выбранную из фосфодиэфирной, дитиофосфатной, метилфосфонатной, тиодифосфатной и дифосфодиэфирной связи. Например, в одном варианте реализации модифицированная связь представляет собой фосфодиэфирную связь.

В различных вариантах реализации указанная по меньшей мере частично тиофосфатированная последовательность из чередующихся фрагментов А и С может характеризоваться различной степенью тиофосфатирования. Например, в одном варианте реализации указанная по меньшей мере частично тиофосфатированная последовательность из чередующихся фрагментов А и С является по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% тиофосфатированной. В одном варианте реализации указанная по меньшей мере частично тиофосфатированная последовательность из чередующихся фрагментов А и С тиофосфатирована по меньшей мере на 85%. В одном варианте реализации указанная по меньшей мере частично тиофосфатированная последовательность из чередующихся фрагментов А и С полностью тиофосфатирована.

В различных вариантах реализации указанная по меньшей мере частично тиофосфатированная по-

В различных вариантах реализации модифицированный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, содержащий по меньшей мере частично тиофосфатированную последовательность из чередующихся фрагментов А и С, обладает независимой от последовательности активностью против вируса гепатита В, определяемой посредством анализа секреции HBsAg и находящейся в диапазоне активности "А" менее 30 наномоль (нМ); находящейся в диапазоне активности "В" от 30 нМ до менее чем 100 нМ; в диапазоне активности "С" от 100 нМ до менее чем 300 нМ; или в диапазоне активности "D", превышающем 300 нМ. В некоторых вариантах реализации модифицированный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, содержащий по меньшей мере частично тиофосфатированную последовательность из чередующихся фрагментов А и С, обладает независимой от последовательности активностью против вируса гепатита В, определяемой посредством анализа секреции HBsAg и составляющей менее 50 нМ.

Модифицированные олигонуклеотиды, описанные в настоящем документе, можно получать в форме различных комплексов. Так, в одном варианте реализации предложен хелатный комплекс модифицированного олигонуклеотида, описанного в настоящем документе. Например, в одном варианте реализации такой хелатный комплекс включает хелатный комплекс кальция, магния или цинка и модифицированного олигонуклеотида. Модифицированные олигонуклеотиды, описанные в настоящем документе, также можно получать в форме различных комплексов одновалентных противоионов. Например, в одном варианте реализации такой комплекс противоиона включает комплекс лития, натрия или калия и модифицированного олигонуклеотида.

В одном варианте реализации предложен модифицированный олигонуклеотид или его комплекс, обладающий независимой от последовательности активностью против вируса гепатита В, содержащий по меньшей мере частично тиофосфатированную последовательность из чередующихся фрагментов А и С, описанную в настоящем документе, причем

указанная по меньшей мере частично тиофосфатированная последовательность из чередующихся фрагментов А и С тиофосфатирована по меньшей мере на 85%;

длина указанной по меньшей мере частично тиофосфатированной последовательности из чередующихся фрагментов А и С находится в диапазоне от 36 фрагментов до 44 фрагментов;

фрагменты А содержат по меньшей мере 12 фрагментов 2'-ОМе-А (например, по меньшей мере 15 фрагментов 2'-ОМе-А) и по меньшей мере 1 фрагмент рибо-А (например, по меньшей мере 2 фрагмента рибо-А);

фрагменты С содержат по меньшей мере 15 фрагментов LNA-5mC; и

указанный модифицированный олигонуклеотид характеризуется значением EC_{50} , определяемым с помощью анализа секреции HBsAg и составляющим менее 100 нМ (например, менее 50 нМ или менее 30 нМ).

В одном варианте реализации предложен модифицированный олигонуклеотид или его комплекс, обладающий независимой от последовательности активностью против вируса гепатита В, содержащий по меньшей мере частично тиофосфатированную последовательность из чередующихся фрагментов А и С, описанную в настоящем документе, причем

указанная по меньшей мере частично тиофосфатированная последовательность из чередующихся фрагментов А и С тиофосфатирована по меньшей мере на 85%;

длина указанной по меньшей мере частично тиофосфатированной последовательности из чередующихся фрагментов А и С находится в диапазоне от 36 фрагментов до 44 фрагментов;

фрагменты А содержат по меньшей мере 15 фрагментов 2'-ОМе-А;

фрагменты С содержат по меньшей мере 7 фрагментов LNA-5mC; и

указанный модифицированный олигонуклеотид характеризуется значением EC_{50} , определяемым с помощью анализа секреции HBsAg и составляющим менее 100 нМ (например, менее 50 нМ или менее 30 нМ).

В одном варианте реализации предложен модифицированный олигонуклеотид или его комплекс, обладающий независимой от последовательности активностью против вируса гепатита В, содержащий по меньшей мере частично тиофосфатированную последовательность из чередующихся фрагментов А и С, описанную в настоящем документе, причем

указанная по меньшей мере частично тиофосфатированная последовательность из чередующихся фрагментов А и С тиофосфатирована по меньшей мере на 85%;

длина указанной по меньшей мере частично тиофосфатированной последовательности из чередующихся фрагментов А и С находится в диапазоне от 36 фрагментов до 44 фрагментов;

фрагменты А содержат по меньшей мере 15 фрагментов 2'-ОМе-А;

фрагменты С содержат по меньшей мере 3 фрагмента LNA-5mC; и

указанный модифицированный олигонуклеотид характеризуется значением EC_{50} , определяемым с помощью анализа секреции HBsAg и составляющим менее 100 нМ (например, менее 50 нМ или менее 30 нМ).

В одном варианте реализации предложен модифицированный олигонуклеотид или его комплекс, обладающий независимой от последовательности активностью против вируса гепатита В, содержащий по меньшей мере частично тиофосфатированную последовательность из чередующихся фрагментов А и

С, описанную в настоящем документе, причем

указанная по меньшей мере частично тиофосфатированная последовательность из чередующихся фрагментов А и С тиофосфатирована по меньшей мере на 85%;

длина указанной по меньшей мере частично тиофосфатированной последовательности из чередующихся фрагментов А и С находится в диапазоне от 36 фрагментов до 44 фрагментов;

фрагменты А содержат по меньшей мере 18 фрагментов 2'-ОМе-А;

фрагменты С содержат по меньшей мере 15 фрагментов LNA-5mC; и

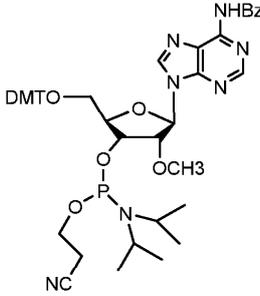
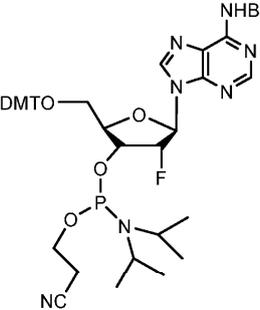
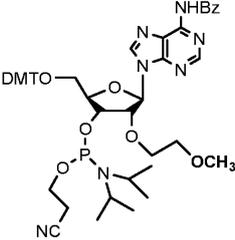
указанный модифицированный олигонуклеотид характеризуется значением EC_{50} , определяемым с помощью анализа секреции HBsAg и составляющим менее 100 нМ (например, менее 50 нМ или менее 30 нМ).

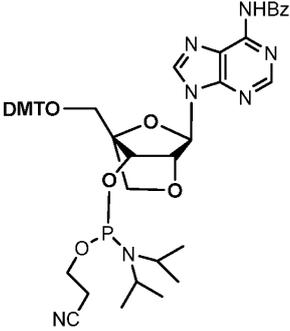
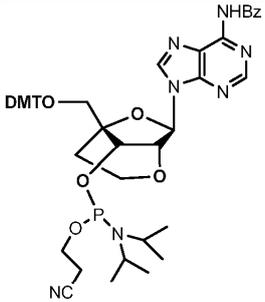
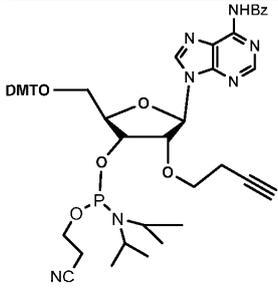
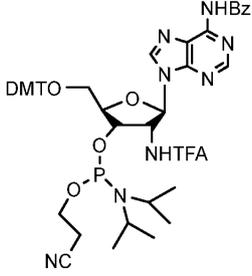
Синтез.

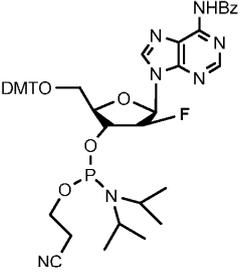
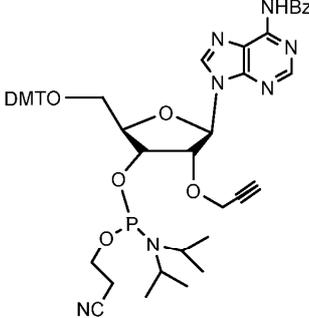
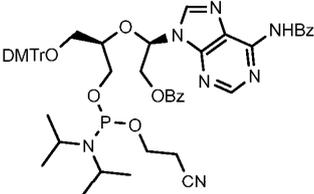
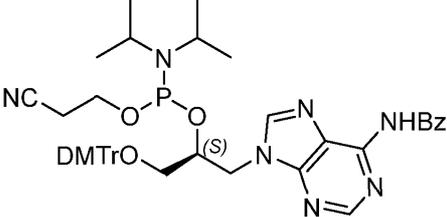
Модифицированные олигонуклеотиды, описанные в настоящем документе, можно получать различными способами. В одном варианте реализации мономеры-строительные блоки, описанные в табл. 4 и 5, используют для получения модифицированных олигонуклеотидов, описанных в настоящем документе, используя стандартную химию фосфорамидитов. Строительные блоки, описанные в табл. 4 и 5, и другие строительные блоки, представляющие собой фосфорамидитные мономеры, можно получить известными способами или получить из коммерческих источников (Thermo Fischer Scientific US, Hongene Biotechnology USA Inc., Chemgenes Corporation).

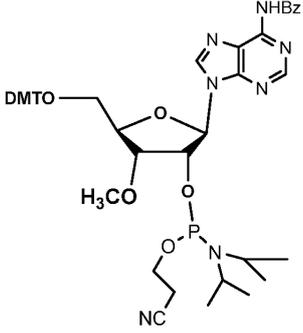
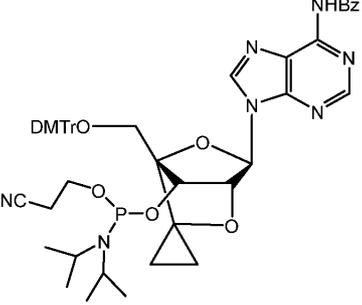
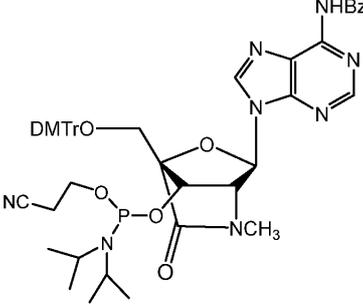
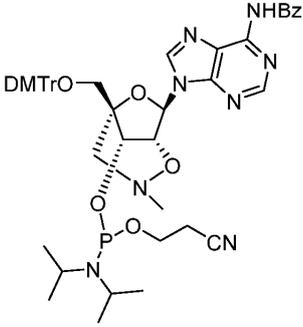
Типичные процедуры получения модифицированных олигонуклеотидов приведены ниже в разделе "Примеры".

Таблица 4. Строительные блоки для фрагментов "А"

Сокращение	Структура
2'-ОМе-А ФОСФОРАМИДИТ	
2'-F-А ФОСФОРАМИДИТ	
2'-O-МОЕ-А ФОСФОРАМИДИТ	

LNA-A ФОСФРАМИДИТ	
ENA-A ФОСФРАМИДИТ	
2'-О-бутин-А ФОСФРАМИДИТ	
2'-NH ₂ -А ФОСФРАМИДИТ	

<p>2'-F-Ara-A ФОСФОРАМИДИТ</p>	
<p>2'-O-пропаргил-А ФОСФОРАМИДИТ</p>	
<p>UNA-A ФОСФОРАМИДИТ</p>	
<p>GNA-A ФОСФОРАМИДИТ</p>	

<p>3'-O-метил-А ФОСФОРАМИДИТ</p>	
<p>scr-BNA-A ФОСФОРАМИДИТ</p>	
<p>AmNA- (N-Me)-A ФОСФОРАМИДИТ</p>	
<p>nmLNA-A ФОСФОРАМИДИТ</p>	

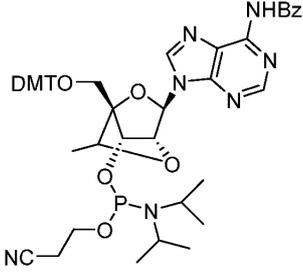
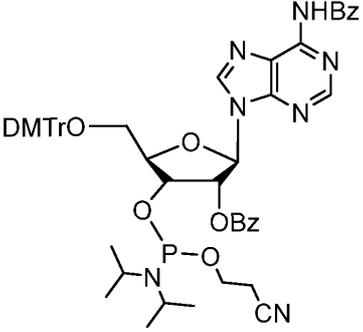
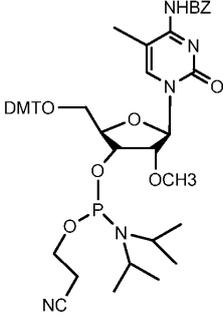
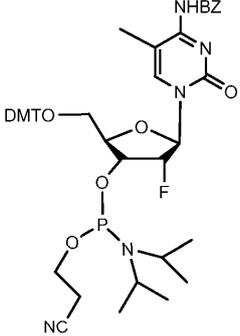
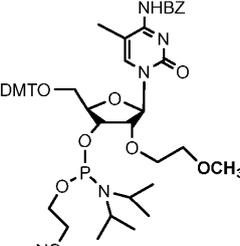
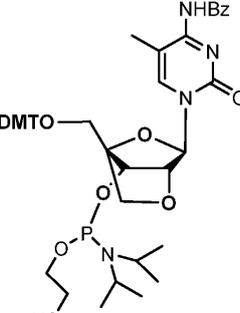
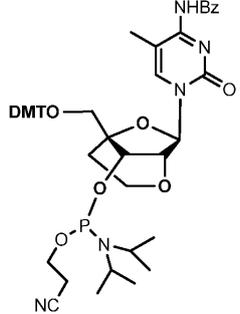
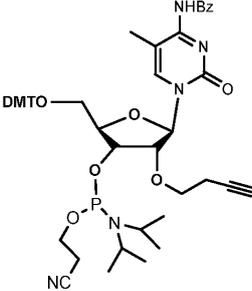
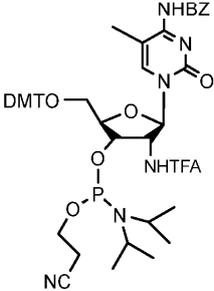
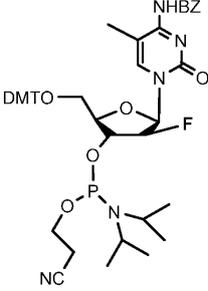
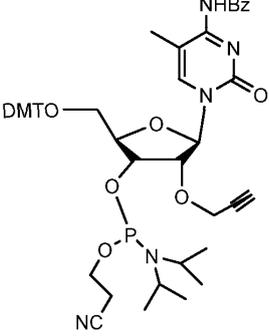
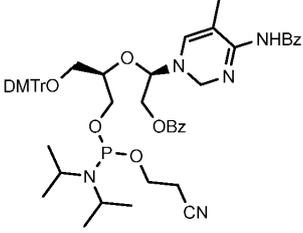
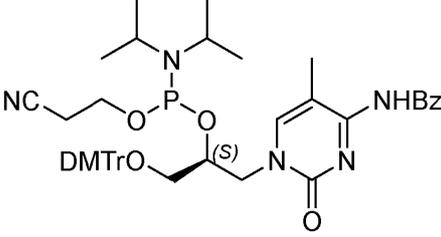
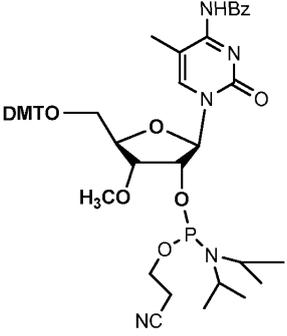
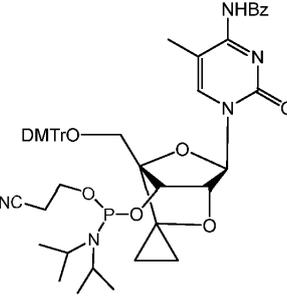
4etl-A ФОСФОРАМИДИТ	
Рибо-А ФОСФОРАМИДИТ	

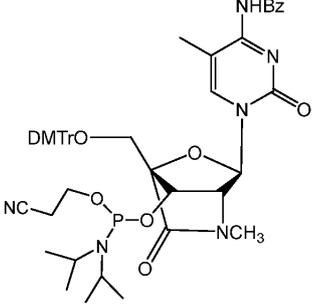
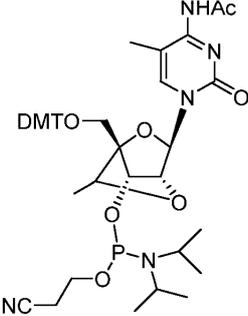
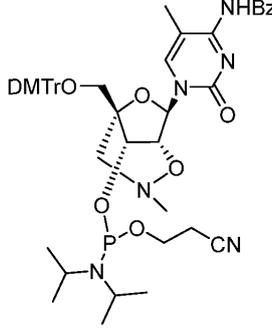
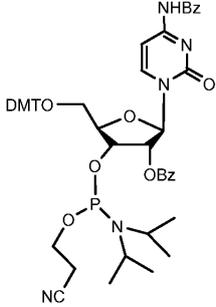
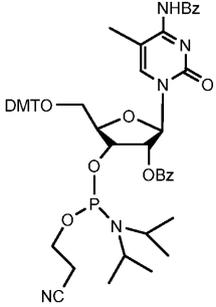
Таблица 5. Строительные блоки для фрагментов "С"

2'-ОМе- (5m)С ФОСФОРАМИДИТ	
-------------------------------	---

<p>2'-F- (5m)C ФОСФОРАМИДИТ</p>	 <p>The structure shows a ribose sugar with a fluorine atom at the 2' position and a DMTO group at the 3' position. The 5' carbon is attached to a phosphoramidite group. The phosphorus atom is bonded to a nitrogen atom which is substituted with a tert-butyl group and a cyanoethyl group. The nitrogen is also bonded to the 5' carbon of the ribose. The ribose is attached to a nucleobase, which is a pyrimidine ring with a methyl group at the 5-position and an NHBz group at the 1-position.</p>
<p>2'-O-MOE- (5m)C ФОСФОРАМИДИТ</p>	 <p>The structure is similar to the first one, but the fluorine atom at the 2' position is replaced by a methoxyethyl group (-OCH₂CH₂OCH₃).</p>
<p>LNA- (5m)C ФОСФОРАМИДИТ</p>	 <p>The structure shows a ribose sugar with a DMTO group at the 3' position and a phosphoramidite group at the 5' position. The phosphorus atom is bonded to a nitrogen atom which is substituted with a tert-butyl group and a cyanoethyl group. The nitrogen is also bonded to the 5' carbon of the ribose. The ribose is attached to a nucleobase, which is a pyrimidine ring with a methyl group at the 5-position and an NHBz group at the 1-position.</p>
<p>ENA- (5m)C ФОСФОРАМИДИТ</p>	 <p>The structure shows a ribose sugar with a DMTO group at the 3' position and a phosphoramidite group at the 5' position. The phosphorus atom is bonded to a nitrogen atom which is substituted with a tert-butyl group and a cyanoethyl group. The nitrogen is also bonded to the 5' carbon of the ribose. The ribose is attached to a nucleobase, which is a pyrimidine ring with a methyl group at the 5-position and an NHBz group at the 1-position.</p>

<p>2'-O-бутин- (5m)C ФОСФОРАМИДИТ</p>	
<p>2'-NH₂- (5m)C ФОСФОРАМИДИТ</p>	
<p>2'-F-Ara- (5m)C ФОСФОРАМИДИТ</p>	
<p>2'-O-пропаргил- (5m)C ФОСФОРАМИДИТ</p>	

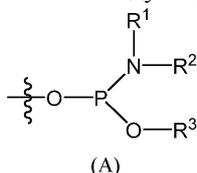
<p>UNA- (5m)C ФОСФОРАМИДИТ</p>	
<p>GNA- (5m)C ФОСФОРАМИДИТ</p>	
<p>3'-O-метил- (5m)C ФОСФОРАМИДИТ</p>	
<p>scp-BNA- (5m)C ФОСФОРАМИДИТ</p>	

<p>AmNA- (NMe)- (5m)C ФОСФОРАМИДИТ</p>	
<p>4etl- (5m)C ФОСФОРАМИДИТ</p>	
<p>nmLNA- (5m)C ФОСФОРАМИДИТ</p>	
<p>Рибо-С ФОСФОРАМИДИТ</p>	
<p>Рибо- (5m)C ФОСФОРАМИДИТ</p>	

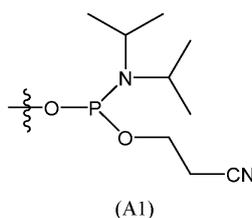
В различных вариантах реализации модифицированные олигонуклеотиды STOPS™, описанные в настоящем документе, также можно получать с использованием динуклеотидов, содержащих или состоящих из любых двух строительных блоков-мономеров, описанных в табл. 4 и 5. Типичные процедуры получения динуклеотидов и соответствующие модифицированные олигонуклеотиды приведены ниже в разделе "Примеры".

В одном варианте реализации предложен динуклеотид, содержащий или состоящий из фрагмента А или фрагмента С, соединенных стереохимически заданной тиофосфатной связью, причем фрагмент А

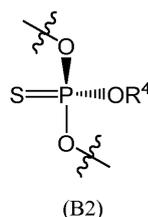
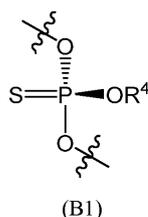
выбрана из любого из строительных блоков-мономеров, описанных в табл. 4, а фрагмент С выбрана из любого из строительных блоков-мономеров, описанных в табл. 5, каждая группа $\sim\text{O}$ независимо представляет собой гидроксил, О,О-дигидротиофосфат, О,О-дигидрофосфат, фосфорамидит, диметокситри-тиловый эфир или стереохимически заданную тиофосфатную связь. В одном варианте реализации группа $\sim\text{O}$ представляет собой фосфорамидит согласно следующей формуле (А):



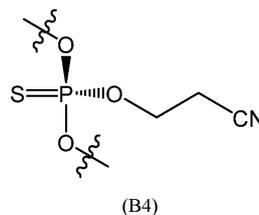
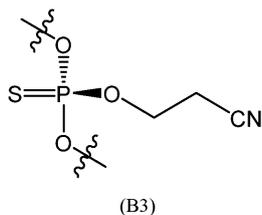
В различных вариантах реализации каждая из групп R^1 и R^2 согласно формуле (А) по отдельности представляют собой C_{1-6} -алкил, и R^3 представляет собой C_{1-6} -алкил или циано C_{1-6} -алкил. Например, в одном варианте реализации фосфорамидит согласно формуле (А) представляет собой фосфорамидит согласно следующей формуле (А1):



В различных вариантах реализации группа $\sim\text{O}$ представляет собой стереохимически заданную тиофосфатную связь, которая представляет собой тиофосфат. Например, в одном варианте реализации указанная стереохимически заданная тиофосфатная связь представляет собой тиофосфат согласно следующим формулам (В1) или (В2):



В различных вариантах реализации группа R^4 согласно формулам (В1) и (В2) представляет собой C_{1-6} -алкил или циано C_{1-6} -алкил. Например, в одном варианте реализации тиофосфаты согласно формулам (В1) и (В2) представляют собой тиофосфаты согласно следующим формулам (В3) и (В4), соответственно:



В различных вариантах реализации предложены способы получения модифицированного олигонуклеотида, описанного в настоящем документе, включающие присоединение одного или более из динуклеотидов, описанных в настоящем документе. Типичные способы выполнения такого присоединения описаны ниже в разделе "Примеры".

Фармацевтические композиции.

Некоторые варианты реализации, описанные в настоящем документе, относятся к фармацевтической композиции, которая может содержать соединение, описанное в настоящем документе (например, модифицированное олигонуклеотидное соединение STOPSTM или его комплекс, описанные в настоящем документе), и фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или их комбинацию. Фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, подходит для медицинского и/или ветеринарного применения.

В настоящем документе термин "носитель" относится к соединению, облегчающему внедрение соединения в клетки или ткани. Например, без ограничений, диметилсульфоксид (ДМСО) является часто используемым носителем, облегчающим поглощение многих органических соединений клетками или тканями субъекта.

В настоящем документе термин "разбавитель" относится к ингредиенту фармацевтической композиции, не обладающему фармакологической активностью, но являющемуся фармацевтически необходи-

мым или желательным. Например, разбавитель можно применять для увеличения объема мощного лекарственного средства, масса которого слишком мала для производства и/или введения. Он может также представлять собой жидкость для растворения лекарственного средства, вводимого посредством инъекции, проглатывания или ингаляции. Распространенной формой разбавителя в данной области техники является забуференный водный раствор, например, без ограничений, физиологический раствор с фосфатным буфером, имитирующий состав крови человека.

В настоящем документе термин "вспомогательное вещество" относится к инертному веществу, добавляемому в фармацевтическую композицию с целью придания композиции, без ограничений, нужного объема, консистенции, стабильности, связывающей стабильности, скольжения, способности к распаду и т.д. "Разбавитель" является типом вспомогательного вещества.

Надлежащий состав зависит от выбранного пути введения. Способы составления и введения соединений, описанных в настоящем документе, известны специалистам в данной области техники. В данной области техники существуют различные способы введения соединения, включая пероральную, ректальную, местную, аэрозольную, инъекционную и парентеральную доставку, в том числе внутримышечные, подкожные, внутривенные, интрамедуллярные инъекции, интраокулярные, интракаральные, прямые внутрижелудочковые, внутрибрюшинные, интраназальные и интраокулярные инъекции, но не ограничиваясь ими. Фармацевтические композиции обычно настраивают на конкретный заданный путь введения.

Можно вводить соединение местно, а не системно, например посредством инъекции соединения непосредственно в инфицированную область, необязательно в составе с пролонгированным или замедленным высвобождением. Кроме того, можно вводить соединение в составе системы адресной доставки лекарственного средства, например, в липосоме, покрытой тканеспецифичным антителом. Можно обеспечивать адресную доставку липосом, которые селективно поглощаются конкретным органом.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, можно производить способом, который сам по себе известен, например, посредством процессов обычного смешивания, растворения, гранулирования, изготовления драже, отмучивания, эмульгирования, инкапсулирования, включения или изготовления таблеток. В настоящем документе соединения, используемые в фармацевтической композиции, можно представить в виде солей с фармацевтически совместимыми противоионами.

Способы применения.

Некоторые варианты реализации, описанные в настоящем документе, относятся к способу лечения инфекции ВГВ и/или ВГД, который может включать введение субъекту, который, как установлено, страдает от инфекции ВГВ и/или ВГД, эффективного количества модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе, или фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе. Другие варианты реализации, описанные в настоящем документе, относятся к применению модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе, при производстве лекарственного средства для лечения инфекции ВГВ или ВГД. Другие варианты реализации, описанные в настоящем документе, относятся к применению модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе, или фармацевтической композиции, содержащей модифицированный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, для лечения инфекции ВГВ или ВГД.

Для введения модифицированного олигонуклеотида или его комплекса субъекту, нуждающемуся в этом, как указано в других разделах настоящего документа, можно использовать различные пути. В одном варианте реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс вводят субъекту парентеральным путем. Например, в одном варианте реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс вводят субъекту внутривенно. В еще одном варианте реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс вводят субъекту подкожно. Неожиданно оказалось, что варианты реализации модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанные в настоящем документе, можно подкожно вводить примату в количестве, обеспечивающем безопасное и эффективное лечение. Ранее считалось маловероятным, что подкожное введение модифицированного олигонуклеотида или его комплекса (например, REP 2139, REP 2055 или соединений, описанных в патентах США № 7358068; 8008269; 8008270 и 8067385) примату является безопасным и эффективным, поскольку считалось, что для достижения эффективности требуются относительно высокие дозировки, а также из-за сопутствующего увеличения возможного риска проблем с безопасностью, например, нежелательных реакций в области инъекции. Так, например, считалось, что предшествующие клинические исследования, включавшие введение REP 2139 людям, использовали только внутривенное введение. Считалось, что проблемы с безопасностью, например, нежелательные реакции в области инъекции при уровнях дозировки, которые считались необходимыми для достижения эффективности, не позволят использовать подкожное введение.

Неожиданно, как показано на фиг. 12 и в примере В5 ниже, оказалось, что воздействие на печень после подкожного введения приматам, не являющимся человеком, значительно превышает уровень, ожидаемый на основе уровней воздействия на печень при внутривенном введении дозировки, сопоставимой в иных отношениях. Этот результат означает, что варианты реализации модифицированных оли-

гонуклеотидов или их комплексов, описанных в настоящем документе, и, в частности, варианты реализации высокоэффективных соединений STOPS™ или комплексов, описанных в настоящем документе, можно безопасно и эффективно вводить приматам посредством подкожного введения в более низких дозировках, чем дозировки, ранее рассматривавшиеся как потенциально эффективные. Эти пониженные дозировки снижают профиль риска (например, снижают риск реакций в области инъекции) и, таким образом, обладают клинически приемлемым профилем безопасности для медицинского применения.

Некоторые варианты реализации, описанные в настоящем документе, относятся к способу лечения инфекции ВГВ и/или ВГД, который может включать приведение клетки, инфицированной ВГВ и/или ВГД, в контакт с эффективным количеством модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе, или фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе. В одном варианте реализации такой способ лечения инфекции ВГВ и/или ВГД включает безопасное и эффективное подкожное введение модифицированного олигонуклеотида или его комплекса человеку в дозировке, пониженной по сравнению с ожидаемой дозировкой на основе наблюдаемых уровней в печени после сопоставимого в иных отношениях внутривенного введения. Например, в одном варианте реализации такой способ лечения инфекции ВГВ и/или ВГД представляет собой РЕР-2139 или его комплекс. В еще одном варианте реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс содержит высокоэффективное соединение STOPS™ или его комплекса, описанные в настоящем документе. Например, в одном варианте реализации соединения STOPS™ или его комплекса представляют собой модифицированный олигонуклеотид или его комплекс, описанные в настоящем документе, содержащие по меньшей мере частично тиофосфатированную последовательность из чередующихся фрагментов А и С и обладающие независимой от последовательности активностью против вируса гепатита В, определяемой посредством анализа секреции HBsAg и входящее в диапазон активности "А" менее 30 нМ.

Другие варианты реализации, описанные в настоящем документе, относятся к применению модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе, при производстве лекарственного средства для лечения инфекции ВГВ и/или ВГД. Другие варианты реализации, описанные в настоящем документе, относятся к применению модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе, или фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе, для лечения инфекции ВГВ и/или ВГД. В одном варианте реализации такое применение включает безопасное и эффективное подкожное введение модифицированного олигонуклеотида или его комплекса человеку в дозировке, пониженной по сравнению с ожидаемой дозировкой на основе наблюдаемых уровней в печени после сопоставимого в иных отношениях внутривенного введения. Например, в одном варианте реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс представляют собой РЕР-2139 или его комплекс. В еще одном варианте реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс содержит высокоэффективное соединение STOPS™ или его комплекса, описанные в настоящем документе. Например, в одном варианте реализации соединения STOPS™ или его комплекса представляют собой модифицированный олигонуклеотид или его комплекс, описанные в настоящем документе, содержащие по меньшей мере частично тиофосфатированную последовательность из чередующихся фрагментов А и С и обладающие независимой от последовательности активностью против вируса гепатита В, определяемой посредством анализа секреции HBsAg и входящее в диапазон активности "А" менее 30 нМ.

Некоторые варианты реализации, описанные в настоящем документе, относятся к способу ингибирования репликации ВГВ и/или ВГД, который может включать приведение клетки, инфицированной ВГВ и/или ВГД, в контакт с эффективным количеством модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе, или фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе. В одном варианте реализации такой способ ингибирования репликации ВГВ и/или ВГД включает безопасное и эффективное подкожное введение модифицированного олигонуклеотида или его комплекса человеку в дозировке, пониженной по сравнению с ожидаемой дозировкой на основе наблюдаемых уровней в печени после сопоставимого в иных отношениях внутривенного введения. Например, в одном варианте реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс представляют собой РЕР-2139 или его комплекс. В еще одном варианте реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс содержит высокоэффективное соединение STOPS™ или его комплекса, описанные в настоящем документе. Например, в одном варианте реализации соединения STOPS™ или его комплекса представляют собой модифицированный олигонуклеотид или его комплекс, описанные в настоящем документе, содержащие по меньшей мере частично тиофосфатированную последовательность из чередующихся фрагментов А и С и обладающие независимой от последовательности активностью против вируса гепатита В, определяемой посредством анализа секреции HBsAg и входящее в диапазон активности "А" менее 30 нМ.

Другие варианты реализации, описанные в настоящем документе, относятся к применению моди-

фицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе, при производстве лекарственного средства для ингибирования репликации ВГВ и/или ВГД. Другие варианты реализации, описанные в настоящем документе, относятся к применению модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе, или фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе, для ингибирования репликации ВГВ и/или ВГД. В одном варианте реализации такое применение для ингибирования репликации ВГВ и/или ВГД включает безопасное и эффективное подкожное введение модифицированного олигонуклеотида или его комплекса человеку варианты применения сравнению с ожидаемой дозировкой на основе наблюдаемых уровней в печени после сопоставимого в иных отношениях внутривенного введения. Например, в одном варианте реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс представляют собой REP-2139 или его комплекс. В еще одном варианте реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс содержит высокоэффективное соединение STOPS™ или его комплекса, описанные в настоящем документе. Например, в одном варианте реализации соединение STOPS™ или его комплекс представляют собой модифицированный олигонуклеотид или его комплекс, описанные в настоящем документе, содержащие по меньшей мере частично тиофосфатированную последовательность из чередующихся фрагментов А и С и обладающие независимой от последовательности активностью против вируса гепатита В, определяемой посредством анализа секреции HBsAg и входящее в диапазон активности "А" менее 30 нМ.

В некоторых вариантах реализации инфекция ВГВ может являться острой инфекцией ВГВ. В некоторых вариантах реализации инфекция ВГВ может являться хронической инфекцией ВГВ.

Некоторые варианты реализации, описанные в настоящем документе, относятся к способу лечения цирроза печени, развившегося в результате инфекции ВГВ и/или ВГД, который может включать введение субъекту, страдающему от цирроза печени, и/или приведение клетки, инфицированной ВГВ и/или ВГД, в организме субъекта, страдающего от цирроза печени, в контакт с эффективным количеством модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе, или фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе. В одном варианте реализации такой способ лечения цирроза печени, развившегося в результате инфекции ВГВ и/или ВГД, включает безопасное и эффективное подкожное введение модифицированного олигонуклеотида или его комплекса человеку в дозировке, пониженной по сравнению с ожидаемой дозировкой на основе наблюдаемых уровней в печени после сопоставимого в иных отношениях внутривенного введения. Например, в одном варианте реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс представляют собой REP-2139 или его комплекс. В еще одном варианте реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс содержит высокоэффективное соединение STOPS™ или его комплекса, описанные в настоящем документе. Например, в одном варианте реализации соединение STOPS™ или его комплекс представляют собой модифицированный олигонуклеотид или его комплекс, описанные в настоящем документе, содержащие по меньшей мере частично тиофосфатированную последовательность из чередующихся фрагментов А и С и обладающие независимой от последовательности активностью против вируса гепатита В, определяемой посредством анализа секреции HBsAg и входящее в диапазон активности "А" менее 30 нМ.

Другие варианты реализации, описанные в настоящем документе, относятся к применению модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе, при производстве лекарственного средства для лечения цирроза печени, развившегося в результате инфекции ВГВ и/или ВГД, с использованием эффективного количества модифицированного(ых) олигонуклеотида(ов). Другие варианты реализации, описанные в настоящем документе, относятся к применению модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе, или фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе, для лечения цирроза печени, развившегося в результате инфекции ВГВ и/или ВГД. В одном варианте реализации такое применение для лечения цирроза печени включает безопасное и эффективное подкожное введение модифицированного олигонуклеотида или его комплекса человеку в дозировке, пониженной по сравнению с ожидаемой дозировкой на основе наблюдаемых уровней в печени после сопоставимого в иных отношениях внутривенного введения. Например, в одном варианте реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс представляют собой REP-2139 или его комплекс. В еще одном варианте реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс содержит высокоэффективное соединение STOPS™ или его комплекса, описанные в настоящем документе. Например, в одном варианте реализации соединение STOPS™ или его комплекс представляют собой модифицированный олигонуклеотид или его комплекс, описанные в настоящем документе, содержащие по меньшей мере частично тиофосфатированную последовательность из чередующихся фрагментов А и С и обладающие независимой от последовательности активностью против вируса гепатита В, определяемой посредством анализа секреции HBsAg и входящее в диапазон активности "А" менее 30 нМ.

Некоторые варианты реализации, описанные в настоящем документе, относятся к способу лечения

рака печени (например, гепатоцеллюлярной карциномы), развившегося в результате инфекции ВГВ и/или ВГД, который может включать введение субъекту, страдающему от рака печени, и/или приведение клетки, инфицированной ВГВ и/или ВГД, в организме субъекта, страдающего от рака печени, в контакт с эффективным количеством модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе, или фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе. В одном варианте реализации такой способ лечения рака печени (например, гепатоцеллюлярной карциномы), развившегося в результате инфекции ВГВ и/или ВГД, включает безопасное и эффективное подкожное введение модифицированного олигонуклеотида или его комплекса человеку в дозировке, пониженной по сравнению с ожидаемой дозировкой на основе наблюдаемых уровней в печени после сопоставимого в иных отношениях внутривенного введения. Например, в одном варианте реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс представляют собой REP-2139 или его комплекс. В еще одном варианте реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс содержит высокоэффективное соединение STOPS™ или его комплекса, описанные в настоящем документе. Например, в одном варианте реализации соединение STOPS™ или его комплекс представляют собой модифицированный олигонуклеотид или его комплекс, описанные в настоящем документе, содержащие по меньшей мере частично тиофосфатированную последовательность из чередующихся фрагментов А и С и обладающие независимой от последовательности активностью против вируса гепатита В

В, определяемой посредством анализа секреции HBsAg и входящее в диапазон активности "А" менее 30 нМ.

Другие варианты реализации, описанные в настоящем документе, относятся к применению модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе, при производстве лекарственного средства для лечения рака печени (например, гепатоцеллюлярной карциномы), развившегося в результате инфекции ВГВ и/или ВГД. Другие варианты реализации, описанные в настоящем документе, относятся к применению модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе, или фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе, для лечения рака печени (например, гепатоцеллюлярной карциномы), развившегося в результате инфекции ВГВ и/или ВГД. В одном варианте реализации такое применение для лечения рака печени (например, гепатоцеллюлярной карциномы) включает безопасное и эффективное подкожное введение модифицированного олигонуклеотида или его комплекса человеку в дозировке, пониженной по сравнению с ожидаемой дозировкой на основе наблюдаемых уровней в печени после сопоставимого в иных отношениях внутривенного введения. Например, в одном варианте реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс представляют собой REP-2139 или его комплекс. В еще одном варианте реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс содержит высокоэффективное соединение STOPS™ или его комплекса, описанные в настоящем документе. Например, в одном варианте реализации соединение STOPS™ или его комплекс представляют собой модифицированный олигонуклеотид или его комплекс, описанные в настоящем документе, содержащие по меньшей мере частично тиофосфатированную последовательность из чередующихся фрагментов А и С и обладающие независимой от последовательности активностью против вируса гепатита В, определяемой посредством анализа секреции HBsAg и входящее в диапазон активности "А" менее 30 нМ.

Некоторые варианты реализации, описанные в настоящем документе, относятся к способу лечения печеночной недостаточности, развившейся в результате инфекции ВГВ и/или ВГД, который может включать введение субъекту, страдающему от печеночной недостаточности, и/или приведение клетки, инфицированной ВГВ и/или ВГД, в организме субъекта, страдающего от печеночной недостаточности, в контакт с эффективным количеством модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе, или фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе. В одном варианте реализации такой способ лечения печеночной недостаточности, развившейся в результате инфекции ВГВ и/или ВГД, включает безопасное и эффективное подкожное введение модифицированного олигонуклеотида или его комплекса человеку в дозировке, пониженной по сравнению с ожидаемой дозировкой на основе наблюдаемых уровней в печени после сопоставимого в иных отношениях внутривенного введения. Например, в одном варианте реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс представляют собой REP-2139 или его комплекс. В еще одном варианте реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс содержит высокоэффективное соединение STOPS™ или его комплекса, описанные в настоящем документе. Например, в одном варианте реализации соединение STOPS™ или его комплекс представляют собой модифицированный олигонуклеотид или его комплекс, описанные в настоящем документе, содержащие по меньшей мере частично тиофосфатированную последовательность из чередующихся фрагментов А и С и обладающие независимой от последовательности активностью против вируса гепатита В, определяемой посредством анализа секреции HBsAg и входящее в диапазон активности "А" менее 30 нМ.

Другие варианты реализации, описанные в настоящем документе, относятся к применению модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе, при производстве лекарственного средства для лечения печеночной недостаточности, развившейся в результате инфекции ВГВ и/или ВГД. Другие варианты реализации, описанные в настоящем документе, относятся к применению модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе, или фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанного в настоящем документе, для лечения печеночной недостаточности, развившейся в результате инфекции ВГВ и/или ВГД. В одном варианте реализации такое применение для лечения печеночной недостаточности включает безопасное и эффективное подкожное введение модифицированного олигонуклеотида или его комплекса человеку в дозировке, пониженной по сравнению с ожидаемой дозировкой на основе наблюдаемых уровней в печени после сопоставимого в иных отношениях внутривенного введения. Например, в одном варианте реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс представляют собой REP-2139 или его комплекс. В еще одном варианте реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс содержит высокоэффективное соединение STOPS™ или его комплекса, описанные в настоящем документе. Например, в одном варианте реализации соединение STOPS™ или его комплекс представляют собой модифицированный олигонуклеотид или его комплекс, описанные в настоящем документе, содержащие по меньшей мере частично тиофосфатированную последовательность из чередующихся фрагментов А и С и обладающие независимой от последовательности активностью против вируса гепатита В, определяемой посредством анализа секретиции HBsAg и входящее в диапазон активности "А" менее 30 нМ.

Специалистам в данной области техники также известны различные индикаторы для определения эффективности способа лечения инфекции ВГВ и/или ВГД. Примеры подходящих индикаторов включают снижение вирусной нагрузки, на которое указывает снижение уровня ДНК (или нагрузки) ВГВ, поверхностного антигена ВГВ (HBsAg) и антигена HBV е (HBeAg), снижение вирусной нагрузки в плазме, снижение интенсивности репликации вируса, снижение времени до наступления сероконверсии (вирус не обнаруживается в сыворотке пациента), увеличение частоты устойчивой реакции вируса на лечение, улучшение функции печени и/или снижение заболеваемости или смертности в качестве исхода заболевания, но не ограничиваются ими.

В некоторых вариантах реализации эффективное количество модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанных в настоящем документе, представляет собой количество, позволяющее эффективно достигать устойчивой вирусологической реакции, например устойчивой вирусологической реакции через 12 месяцев после завершения лечения.

Субъекты с явным диагнозом инфекции ВГВ и/или ВГД включают "наивных" субъектов (т.е. субъектов, ранее не получавших лечения по поводу ВГВ и/или ВГД), и субъектов с неудачным предшествующим лечением ВГВ и/или ВГД (субъекты с "неудачным лечением"). Субъекты с неудачным лечением включают "не реагирующих" (субъектов, у которых не достигается достаточное снижение уровня АЛТ, например, субъект, у которого в течение 6 месяцев с начала терапии против ВГВ и/или ВГД не удалось достичь снижения более чем на 1 Ig по сравнению с исходным уровнем) и "субъектов с рецидивом" (субъектов, ранее получавших лечение по поводу ВГВ и/или ВГД, у которых наблюдается повышенное уровня АЛТ, например > двукратный уровень АЛТ по сравнению с верхним пределом нормального диапазона, и обнаружимую с помощью анализа гибридизации ДНК ВГВ в сыворотке). Дополнительные примеры субъектов включают субъектов с инфекцией ВГВ и/или ВГД и отсутствием симптомов.

В некоторых вариантах реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс, описанные в настоящем документе, можно вводить субъекту с неудачным лечением, страдающему от ВГВ и/или ВГД. В некоторых вариантах реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс, описанные в настоящем документе, можно вводить не реагирующему на лечение субъекту, страдающему от ВГВ и/или ВГД. В некоторых вариантах реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс, описанные в настоящем документе, можно вводить субъекту с рецидивом, страдающему от ВГВ или ВГД. В некоторых вариантах реализации у субъекта может быть HBeAg-положительный хронический гепатит В. В некоторых вариантах реализации у субъекта может быть HBeAg-отрицательный хронический гепатит В. В некоторых вариантах реализации у субъекта может быть цирроз печени. В некоторых вариантах реализации у субъекта могут отсутствовать симптомы, например, субъект может быть инфицирован ВГВ и/или ВГД, однако симптомы вирусной инфекции у него могут не проявляться. В некоторых вариантах реализации у субъекта может быть нарушение иммунитета. В некоторых вариантах реализации субъект может подвергаться химиотерапии.

Примеры агентов, применяемых для лечения ВГВ и/или ВГД, включают интерфероны (например, ИФН- α , и пэгилированные интерфероны, включающие ПЭГ-ИФН- α -2а), и нуклеозиды/нуклеотиды (например, ламивудин, телбивудин, адефовир дипивоксил, клебудин, энтекавир, тенофовир алафенамид и тенофовир дизопроксил). Однако некоторые недостатки, ассоциированные с лекарственными средствами на основе интерферона, представляют собой нежелательные побочные эффекты, необходимость подкожного введения и высокую стоимость. Недостатком лечения нуклеозидами/нуклеотидами является разви-

тие устойчивости.

Устойчивость может являться причиной неудачного лечения. В настоящем документе термин "устойчивость" относится к вирусному штамму, характеризующемуся отсроченной, ослабленной и/или отсутствующей реакцией на противовирусный агент. В некоторых вариантах реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс, описанные в настоящем документе, можно вводить субъекту, инфицированному штаммом ВГВ и/или ВГД, устойчивым к одному или более из агентов против ВГВ и/или ВГД. Примеры противовирусных агентов, к которым может развиваться устойчивость, включают ламивудин, телбивудин, адефовир дипивоксил, клевудин, энтекавир, тенофовир алафенамид и тенофовир дизопроксил. В некоторых вариантах реализации наблюдается задержка развития устойчивых штаммов ВГВ и/или ВГД, если субъект получает лечение с применением модифицированного олигонуклеотида, описанного в настоящем документе, по сравнению с развитием штаммов ВГВ и/или ВГД, устойчивых к другим агентам против ВГВ и/или ВГД, например, описанным в настоящем документе.

Комбинированные терапевтические средства.

В некоторых вариантах реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс, описанные в настоящем документе, можно применять в комбинации с одним или более из дополнительных агентов для лечения и/или ингибирования репликации ВГВ и/или ВГД. Дополнительные агенты включают интерферон, аналоги нуклеозидов/нуклеотидов, модулятор сборки капсида, олигонуклеотид, специфичный по отношению к последовательности (например, антисмысловой олигонуклеотид и/или миРНК), ингибитор проникновения в клетку и/или низкомолекулярный иммуномодулятор, но не ограничиваются ими. Например, одним вариантом реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс, описанные в настоящем документе, можно применять в качестве первого лекарственного средства в комбинации с одним или более из вторых средств для лечения ВГВ, причем указанное второе лекарственное средство содержит второй олигонуклеотид, обладающий независимой от последовательности активностью против вируса гепатита В, миРНК-олигонуклеотид (или нуклеотиды), антисмысловой олигонуклеотид, нуклеозид, интерферон, иммуномодулятор, модулятор сборки капсида или их комбинацию. Примеры дополнительных агентов включают рекомбинантный интерферон-альфа 2b, ИФН- α , ПЭГ-ИФН- α -2a, ламивудин, телбивудин, адефовир дипивоксил, клевудин, энтекавир, тенофовир алафенамид, тенофовир дизопроксил, JNJ-3989 (ARO-HBV), RG6004, GSK3228836, AB-729, VIR-2218, DCR-HBVS, JNJ-6379, GLS4, ABI-HO731, JNJ-440, NZ-4, RG7907, AB-423, AB-506 и ABI-H2158. В одном варианте реализации дополнительный агент представляет собой модулятор сборки капсида (CAM). В одном варианте реализации дополнительный агент представляет собой антисмысловой олигонуклеотид (ASO).

В некоторых вариантах реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс, описанные в настоящем документе, можно вводить вместе с одним или более из дополнительных агентов в составе одной фармацевтической композиции. В некоторых вариантах реализации модифицированный олигонуклеотид или его комплекс, описанные в настоящем документе, можно вводить с одним или более из дополнительных агентов в виде двух или более отдельных фармацевтических композиций. Кроме того, порядок введения модифицированного олигонуклеотида или его комплекса, описанных в настоящем документе, с одним или более из дополнительных агентов может меняться.

Примеры

Дополнительные варианты реализации подробнее описаны в следующих примерах, которые никоим образом не ограничивают сущность формулы изобретения.

Примеры 1-116.

Серию модифицированных олигонуклеотидов, содержащих тиофосфатированные последовательности из чередующихся фрагментов А и С, синтезировали на синтезаторе ABI 394 с использованием стандартных химических реакций, характерных для фосфорамидитов. Твердая подложка представляла собой стекло с контролируемым размером пор (CPG, 1000A, Glen Research, Стерлинг, штат Виргиния, США), а строительные блоки-мономеры описаны в табл. 4 и 5. Реагент (диметиламинометилен)амино-3Н-1,2,4-дитиазолин-3-тион (DDTT) использовали в качестве агента для переноса серы для синтеза тиофосфатов олигонуклеотидов (PS-связей). Интенсивное присоединение 0,1М раствора фосфорамидита в CH_3CN в присутствии активатора -5-(этилтио)-1Н-тетразола к олигонуклеотиду, связанному с твердой подложкой, с последующим копированием, окислением и снятием защиты позволяло получить модифицированные олигонуклеотиды. Эффективность поэтапного присоединения всех модифицированных фосфорамидитов составляла более 95%. Кроме того, получили несколько модифицированных олигонуклеотидов, содержавших последовательности из чередующихся фрагментов А и С, но несущих фосфодиэфирные (PO) связи вместо тиофосфатных (PS) связей.

Снятие защиты.

После завершения синтеза стекло с контролируемым размером пор (CPG) переносили во флакон с завинчивающейся крышкой или микроцентрифужную пробирку с завинчивающейся крышкой, не содержащую РНКаз. Олигонуклеотид отщепляли от подложки одновременно со снятием защиты с групп основания и фосфата с использованием 1,0 мл смеси аммиака с этанолом (аммиак: этанол (3:1) в течение 5-15 ч при 55°C. Флакон кратковременно охлаждали на льду, а затем смесь аммиака с этанолом переносили в

новую микроцентрифужную пробирку. СРГ промывал 2 порциями по 0,1 мл деионизованной воды, помещали в сухой лед на 10 мин, а затем высушивали в вакуумном испарителе.

Количественное определение неочищенного олигомера или анализ необработанного материала.

Образцы растворяли в деионизованной воде (1,0 мл) и подвергали количественному анализу следующим образом: вначале выполняли анализ холостого образца, представлявшего собой воду (1 мл). 20 мкл образца и 980 мкл воды тщательно перемешивали в микроцентрифужной пробирке, переносили в кювету и получали значения поглощения при 260 нм. Неочищенный материал высушивали и хранили при -20°C.

ВЭЖХ-очистка олигомера.

Сырые олигомеры анализировали и очищали посредством ВЭЖХ (Dionex PA 100). Буферная система представляла собой: А=вода, В=0,25 М трис-НСl рН 8, С: 0,375 М перхлорат натрия, скорость потока 5,0 мл/мин, длина волны 260 нм. Вначале вводили небольшое количество материала (~5 OD) и выполняли анализ посредством ЖХ-МС. После подтверждения подлинности данного материала неочищенный олигомер можно было очищать с использованием большего количества материала, например, 60 OD за цикл, скорость потока 5 мл/мин. Фракции, содержащие полноразмерные олигонуклеотиды, объединяли, выпаривали и в конечном итоге обессоливали, как описано ниже.

Обессоливание очищенного олигомера.

Затем очищенный сухой олигомер обессоливали с использованием Sephadex G-25M (Amersham Biosciences). Картридж кондиционировали в 10 мл воды. Очищенный олигомер тщательно растворяли в 2,5 мл воды, не содержащей РНКаз, а затем наносили на картридж с очень медленным капельным элюированием. Олигомер, не содержащий солей, элюировали с использованием 3,5 мл воды во флакон с завинчивающейся крышкой.

ВЭЖХ-анализ и ЖХ/МС с электрораспылением.

Приблизительно 0,2 OD олигомера высушивали, повторно растворяли в воде (50 мкл), а затем переносили пипеткой в специальные флаконы для ВЭЖХ и ЖХ-МС-анализа.

В табл. 6 приведена сводная информация о длине последовательности, из чередующихся фрагментов А и С и о тиофосфатной (PS) или фосфодиэфирной (PO) природе каркаса полученных типичных модифицированных олигонуклеотидов.

Таблица 6

№	Длина	Модификация А	Модификация С	Каркас
1	(AC)20	2'-ОМе	2'-ОМе	PS
2	(AC)15	2'-ОМе	2'-ОМе	PS
3	(AC)25	2'-ОМе	2'-ОМе	PS
4	(AC)30	2'-ОМе	2'-ОМе	PS
5	(AC)20	2'-О-МОЕ	2'-О-МОЕ	PS

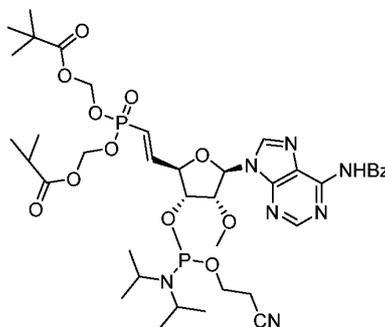
6	(AC)20	LNA	LNA	PS
7	(AC)20	2'-F	2'-F	PS
8	(AC)20	2'-O-пропаргил	2'-O-пропаргил	PS
9	(AC)20	2'-O-бутин	2'-O-бутин	PS
10	(AC)20	2'-F-Ara	2'-F-Ara	PS
11	(AC)20	UNA	UNA	PS
12	(AC)20	ENA	ENA	PS
13	(AC)20	2'-OMe	2'-O-MOE	PS
14	(AC)20	2'-OMe	LNA	PS
15	(AC)20	2'-OMe	2'-F	PS
16	(AC)20	2'-OMe	2'-O-пропаргил	PS
17	(AC)20	2'-OMe	2'-O-бутин	PS
18	(AC)20	2'-OMe	2'-F-Ara	PS
19	(AC)20	2'-OMe	UNA	PS
20	(AC)20	2'-OMe	ENA	PS
21	(AC)20	2'-OMe	2'-NH ₂	PS
22	(AC)20	2'-O-MOE	2'-OMe	PS
23	(AC)20	2'-O-MOE	LNA	PS
24	(AC)20	2'-O-MOE	2'-F	PS
25	(AC)20	2'-O-MOE	2'-O-пропаргил	PS
26	(AC)20	2'-O-MOE	2'-O-бутин	PS
27	(AC)20	2'-O-MOE	2'-F-Ara	PS
28	(AC)20	2'-O-MOE	UNA	PS
29	(AC)20	2'-O-MOE	ENA	PS
30	(AC)20	2'-O-MOE	2'-NH ₂	PS
31	(AC)20	LNA	2'-OMe	PS
32	(AC)20	LNA	2'-O-MOE	PS
33	(AC)20	LNA	2'-F	PS
34	(AC)20	LNA	2'-O-пропаргил	PS
35	(AC)20	LNA	2'-O-бутин	PS
36	(AC)20	LNA	2'-F-Ara	PS
37	(AC)20	LNA	UNA	PS
38	(AC)20	LNA	ENA	PS
39	(AC)20	LNA	2'-NH ₂	PS
40	(AC)20	2'-F	LNA	PS
41	(AC)20	2'-F	2'-OMe	PS
42	(AC)20	2'-F	2'-O-MOE	PS
43	(AC)20	2'-F	2'-O-пропаргил	PS

44	(AC)20	2'-F	2'-O-бутин	PS
45	(AC)20	2'-F	2'-F-Ara	PS
46	(AC)20	2'-F	UNA	PS
47	(AC)20	2'-F	ENA	PS
48	(AC)20	2'-F	2'-NH ₂	PS
49	(AC)20	2'-O-пропаргил	2'-OMe	PS
50	(AC)20	2'-O-пропаргил	2'-O-MOE	PS
51	(AC)20	2'-O-пропаргил	LNA	PS
52	(AC)20	2'-O-пропаргил	2'-F	PS
53	(AC)20	2'-O-пропаргил	2'-O-бутин	PS
54	(AC)20	2'-O-пропаргил	2'-F-Ara	PS
55	(AC)20	2'-O-пропаргил	UNA	PS
56	(AC)20	2'-O-пропаргил	ENA	PS
57	(AC)20	2'-O-пропаргил	2'-NH ₂	PS
58	(AC)20	2'-O-бутин	2'-OMe	PS
59	(AC)20	2'-O-бутин	2'-O-MOE	PS
60	(AC)20	2'-O-бутин	LNA	PS
61	(AC)20	2'-O-бутин	2'-F	PS
62	(AC)20	2'-O-бутин	2'-O-пропаргил	PS
63	(AC)20	2'-O-бутин	2'-F-Ara	PS
64	(AC)20	2'-O-бутин	UNA	PS
65	(AC)20	2'-O-бутин	ENA	PS
66	(AC)20	2'-O-бутин	2'-NH ₂	PS
67	(AC)20	2'-F-Ara	2'-OMe	PS
68	(AC)20	2'-F-Ara	2'-O-MOE	PS
69	(AC)20	2'-F-Ara	LNA	PS
70	(AC)20	2'-F-Ara	2'-F	PS
71	(AC)20	2'-F-Ara	2'-O-пропаргил	PS
72	(AC)20	2'-F-Ara	2'-O-бутин	PS
73	(AC)20	2'-F-Ara	UNA	PS
74	(AC)20	2'-F-Ara	ENA	PS
75	(AC)20	2'-F-Ara	2'-NH ₂	PS
76	(AC)20	UNA	2'-OMe	PS
77	(AC)20	UNA	2'-O-MOE	PS
78	(AC)20	UNA	LNA	PS
79	(AC)20	UNA	2'-F	PS
80	(AC)20	UNA	2'-O-пропаргил	PS
81	(AC)20	UNA	2'-O-бутин	PS

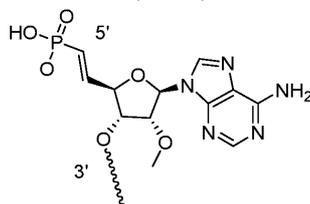
82	(AC)20	UNA	2'-F-Ara	PS
83	(AC)20	UNA	ENA	PS
84	(AC)20	UNA	2'-NH ₂	PS
85	(AC)20	ENA	2'-OMe	PS
86	(AC)20	ENA	2'-O-MOE	PS
87	(AC)20	ENA	LNA	PS
88	(AC)20	ENA	2'-F	PS
89	(AC)20	ENA	2'-O-пропаргил	PS
90	(AC)20	ENA	2'-O-бутин	PS
91	(AC)20	ENA	2'-F-Ara	PS
92	(AC)20	ENA	UNA	PS
93	(AC)20	ENA	2'-NH ₂	PS
94	(AC)20	LNA	2'-O-MOE	PS
95	(AC)20	2'-F	LNA	PS
96	(AC)25	2'-OMe	2'-OMe	PO
97	(AC)25	2'-OMe	2'-OMe	PS
98	(AC)20	2'-F	2'-OMe	PS
99	(AC)20	LNA	2'-O-Me	PS
100	(AC)20	2'-OMe	2'-F	PS
101	(AC)20	2'-OMe	2'-OMe	PO
102	(AC)20	2'-F	2'-O-MOE	PS
103	(AC)30	2'-OMe	2'-OMe	PS
104	(AC)15	2'-OMe	2'-OMe	PS
105	(AC)20	2'-OMe	LNA	PS
106	(AC)20	LNA	LNA	PS
107	(AC)20	2'-OMe	2'-O'MOE	PS
108	(AC)20	2'-O-MOE	2'-OMe	PS
109	(AC)20	2'-OMe	2'-OMe	PS
110	(AC)30	2'-OMe	2'-O-бутин	PO
111	(AC)20	2'-F	2'-F	PS
112	(AC)20	2'-OMe	2'-OMe	PS
113	(AC)15	2'-OMe	2'-OMe	PO
114	(AC)20	2'-O-MOE	2'-O-MOE	PS
115	(AC)20	2'-O-MOE	2'-F	PS
116	(AC)20	LNA	2'-F	PS

Примеры 117-130.

Влияние 5'-модификации оценивали, получив серию тиофосфатированных олигонуклеотидов в соответствии со способами, описанными выше в примерах 1-116. Олигонуклеотиды с концевым кэпом получали, используя 5'-винилфосфонатные строительные блоки для встраивания 5'-винилфосфонатных концевых кэпов:



5'-5'-винилфосфонатный строительный блок (5'-VP)



Модифицированный олигонуклеотид с 5'-винилфосфонатным концевым кэпом.

По отношению к фиг. 7, 5'-винилфосфонатный строительный блок (5'-VP) получали следующим образом.

Получение соединения 7-2. К раствору соединения 7-1 (15,0 г, 53,3 ммоль) в сухом пиридине (150 мл) добавляли TBSCl (20,0 г, 133,3 ммоль) и имидазол (10,8 г, 159,9 ммоль). Смесь перемешивали при к.т. в течение 15 ч. ТСХ показала полное потребление соединения 7-1. Реакционную смесь концентрировали в вакууме, получая остаток. Остаток блокировали ДХМ (500 мл). Слой ДХМ двукратно промывали H₂O (1 л×2) и насыщенным раствором NaCl. Слой ДХМ концентрировали в вакууме, получая неочищенное соединение 7-2 (27,2 г, 53,3 ммоль) в виде желтого масла. Неочищенное соединение 7-2 непосредственно использовали на следующем этапе. ЭР-ЖХ/МС m/z 510,5 [M+H]⁺.

Получение соединения 7-3. К раствору соединения 7-2 (26,2 г, 51,3 ммоль) в пиридине (183 мл) по каплям добавляли бензоилхлорид (15,8 г, 113,0 ммоль) при температуре 5°C. Реакционную смесь перемешивали при к.т. в течение 2 ч. ТСХ показала полное потребление соединения 7-2. Реакцию в смеси останавливали H₂O (4 мл). Затем в реакционную смесь добавляли NH₃·H₂O (20 мл) и перемешивали при к.т. в течение 30 мин. Затем пиридин удаляли из смеси концентрированием при пониженном давлении. Остаток добавляли к H₂O (100 мл), экстрагировали EA (150 мл×3) и объединяли слои EA. Слой EA промывали насыщенным раствором NaCl и высушивали над Na₂SO₄. Фильтровали и концентрировали, получая неочищенное соединение 7-3 (45,0 г). ЭР-ЖХ/МС m/z=614,5 [M+H]⁺.

Получение соединения 7-4. К раствору смеси 7-3 (44,0 г, неочищенная) в ТГФ (440 мл) добавляли H₂O (220 мл) и ТФУК (220 мл) при температуре 0°C. Затем реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 1,5 ч. ТСХ показала полное потребление соединения 7-3. pH реакционной смеси доводили до 7-8 с использованием NH₃·H₂O. Затем смесь экстрагировали EA (300 мл×7). Объединенный слой EtOAc промывали насыщенным раствором NaCl и концентрировали в вакууме, получая неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной хроматографии (EA: PE=1:5~1:1), получая соединение 7-4 (15,8 г) в виде белого твердого вещества. ¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ=11,24 (s, 1H, обменивали с D₂O), 8,77 (s, 2H), 8,04-8,06 (m, 2H), 7,64-7,66 (m, 2H), 7,54-7,58 (m, 2H), 6,14-6,16 (d, J=5,9 Гц, 1H), 5,20-5,23 (m, 1H), 4,58-4,60 (m, 1H), 4,52-4,55 (m, 1H), 3,99-4,01 (m, 1H), 3,69-3,75 (m, 1H), 3,57-3,61 (m, 1H), 3,34 (s, 4H), 0,93 (s, 9H), 0,14-0,15 (d, J=1,44 Гц, 6H). ЭР-ЖХ/МС m/z=500,3 [M+H]⁺.

Получение соединения 7-5. В 500-мл круглодонную колбу по очереди добавляли ДМСО (132 мл) и соединение 7-4 (13,2 г, 26,4 ммоль), EDCI (15,19 г, 79,2 ммоль) при к.т. Затем в реакционную смесь добавляли пиридин (2,09 г, 26,4 ммоль, 2,1 мл). После перемешивания в течение 5 мин в реакционную смесь добавляли ТФУК (1,51 г, 13,2 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при к.т. в течение 3 ч. ЖХ-МС показала полное потребление соединения 7-4. Реакционную смесь добавляли в воду со льдом (500 мл) и трижды экстрагировали EA (300 мл×3). Объединенный слой EA дважды промывали H₂O и однократно - насыщенным раствором NaCl. Продукт высушивали над Na₂SO₄ и фильтровали. Фильтрат концентрировали, получая неочищенное соединение 7-5 (14,6 г) в виде белого твердого вещества. ЭР-ЖХ/МС m/z=516,3 [M+H]⁺.

Получение соединения 7-6. Соединение 5A (24,4 г, 38,5 ммоль) добавляли к раствору смеси NaN (2,5 г, 64,3 ммоль, 60% чистоты) в ТГФ (50 мл) при температуре 0°C. После перемешивания в течение 15 мин в реакционную смесь добавляли соединение 7-5 (16,0 г, 32,1 ммоль) в ТГФ (60 мл). Затем реакционную смесь перемешивали при к.т. в течение 1 ч. ЖХ-МС показала полное потребление соединения 7-5. Затем реакцию в смеси останавливали насыщенным NH₄Cl (500 мл) и трижды экстрагировали EA (400 мл×3). Объединенный слой EA промывали насыщенным раствором NaCl, высушивали над Na₂SO₄ и фильтровали. Фильтрат концентрировали в вакууме, получая неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной хроматографии (EA: PE=1:5~1:1), получая соединение 7-6 (10,0 г, 12,4 ммоль, выход 38,6%) в виде белого твердого вещества. ЭР-ЖХ/МС m/z=804,4 [M+H]⁺; ³¹P ЯМР (162 МГц, ДМСО-d₆) δ 17,01.

Получение соединения 7-7. В 500-мл круглодонную колбу по очереди добавляли соединение 7-6 (9,0 г, 11,2 ммоль), H₂O (225 мл) и HCOOH (225 мл) Реакционную смесь перемешивали при 26°C в течение 15 ч. ЖХ-МС показала полное потребление соединения 7-6. pH реакционной смеси доводили до 6-7 с использованием NH₃·H₂O. Затем смесь трижды экстрагировали EA (300 мл×3). Объединенный слой EA высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали фильтрат, получая неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией (ДХМ/MeOH=100:1 ~ 60:1), получая продукт 7-7 (7,0 г, 10,1 ммоль, выход 90,6%). ¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ=11,11 (s, 1H, обменивали с D₂O), 8,71-8,75 (d, J=14,4, 2H), 8,04-8,06 (m, 2H), 7,64-7,65 (m, 1H), 7,54-7,58 (m, 2H), 6,88-7,00 (m, 1H), 6,20-6,22 (d, J=5,4, 2H), 6,06-6,16 (m, 1H), 5,74-5,75 (d, J=5,72, 2H), 5,56-5,64 (m, 4H), 4,64-4,67 (m, 1H), 4,58-4,59 (m, 1H), 4,49-4,52 (m, 1H), 3,37 (s, 3H), 1,09-1,10 (d, J=1,96, 18H). ³¹P ЯМР (162 МГц, ДМСО-d₆) δ 17,45. ЭР-ЖХ/МС m/z=690,4 [M+H]⁺.

Получение соединения 5'-VP. К раствору соединения 7-7 (5,5 г, 7,9 ммоль) добавляли DCI (750 мг, 6,3 ммоль), а затем добавляли CEP[N (iPr)₂]₂ (3,1 г, 10,3 ммоль). Смесь перемешивали при к.т. в течение 2 ч. ТСХ показала, что осталось 3,5% соединения 7,7 Реакционную смесь промывали H₂O (40 мл×2) и на-

сыщенным раствором NaCl (50 мл×2), высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали, получая неочищенный продукт. Остаток очищали препаративной флэш-ВЭЖХ в следующих условиях (IntelFlash-1): Колонка: C18 силикагель; подвижная фаза: CH₃CN/H₂O (0,5% NH₄HCO₃)=1/5, увеличение до CH₃CN/H₂O (0,5% NH₄HCO₃)=1/0 в течение 30 мин, элюированный продукт собирали при соотношении CH₃CN/H₂O (0,5% NH₄HCO₃)=3/1; детектор: УФ 254 нм. Продукт концентрировали и экстрагировали EA (50 мл×3). Объединенный слой EA промывали насыщенным раствором NaCl и высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали фильтрат, получая итоговое соединение 5'-VP (6,0 г, 98% чистоты) в виде белого твердого вещества. ¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ=11,27 (s, 1H, обменивали с D₂O), 8,72-8,75 (m, 2H), 8,04-8,06 (m, 2H), 7,54-7,68 (m, 3H), 6,85-7,05 (m, 1H), 6,09-6,26 (m, 2H), 5,57-5,64 (m, 4H), 4,70-4,87 (m, 3H), 3,66-3,88 (m, 4H), 3,37-3,41 (m, 3H), 2,82-2,86 (m, 2H), 1,20-1,21 (m, 12H), 1,08-1,09 (m, 18H). ³¹P-ЯМР (162 МГц, ДМСО-d₆): 149,99, 149,16, 17,05, 16,81. ЭР-ЖХ/МС m/z=890,8 [M+H]⁺.

В табл. 7 приведена сводная информация о длине последовательности, из чередующихся фрагментов А и С и о 5'-модификации полученных типичных модифицированных тиофосфатированных олигонуклеотидов.

Таблица 7

№	Длина	А	С	5'- модификация
117	(AC)17	LNA-A	LNA- (5m)C	ОН
118	(AC)18	LNA-A	LNA- (5m)C	ОН
119	(AC)19	LNA-A	LNA- (5m)C	ОН
120	(AC)17	LNA-A	LNA- (5m)C	Винилфосфонат-А
121	(AC)18	LNA-A	LNA- (5m)C	Винилфосфонат-А
122	(AC)19	LNA-A	LNA- (5m)C	Винилфосфонат-А
123	(AC)20	LNA-A	LNA- (5m)C	Винилфосфонат-А
124	(AC)17	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	ОН
125	(AC)18	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	ОН
126	(AC)19	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	ОН
127	(AC)17	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	Винилфосфонат-А
128	(AC)18	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	Винилфосфонат-А
129	(AC)19	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	Винилфосфонат-А
130	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	Винилфосфонат-А

Примеры 131-174.

Влияние длины последовательности, встраивания LNA и 5'-модификации оценивали, получив серию тиофосфатированных олигонуклеотидов в соответствии со способами, описанными выше в примерах 1-116. В табл. 8 приведена сводная информация о длине последовательности, из чередующихся фрагментов А и С, 5'-модификации и длине и положении фрагментов LNA для полученных типичных модифицированных тиофосфатированных олигонуклеотидов.

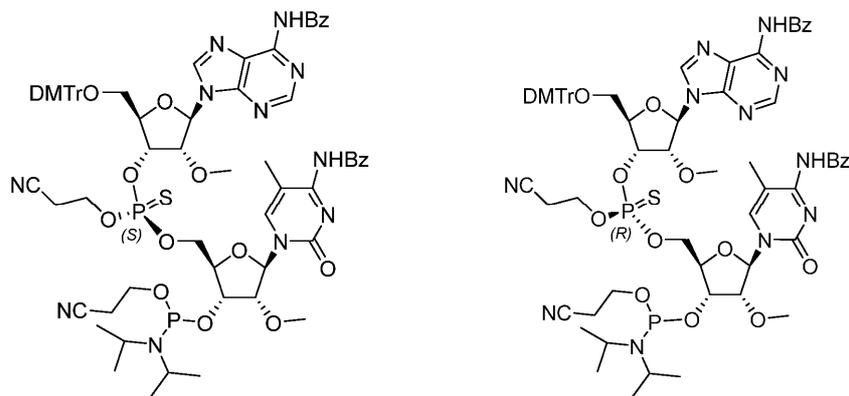
Таблица 8

№	Длина	А	С	5'- модификация	Модификация LNA
131	(AC)17	2'-OMe-A	LNA- (5m)C	ОН	
132	(AC)18	2'-OMe-A	LNA- (5m)C	ОН	
133	(AC)19	2'-OMe-A	LNA- (5m)C	ОН	
134	(AC)20	2'-OMe-A	LNA- (5m)C	ОН	
135	(AC)17	2'-OMe-A	LNA- (5m)C	Винилфосфонат-А	
136	(AC)18	2'-OMe-A	LNA- (5m)C	Винилфосфонат-А	
137	(AC)19	2'-OMe-A	LNA- (5m)C	Винилфосфонат-А	
138	(AC)20	2'-OMe-A	LNA- (5m)C	Винилфосфонат-А	
139	(AC)17	LNA-A	2'-OMe- (5m)C	ОН	
140	(AC)18	LNA-A	2'-OMe- (5m)C	ОН	
141	(AC)19	LNA-A	2'-OMe- (5m)C	ОН	
142	(AC)20	LNA-A	2'-OMe- (5m)C	ОН	
143	(AC)17	LNA-A	2'-OMe- (5m)C	Винилфосфонат-А	
144	(AC)18	LNA-A	2'-OMe- (5m)C	Винилфосфонат-А	
145	(AC)19	LNA-A	2'-OMe- (5m)C	Винилфосфонат-А	
146	(AC)20	LNA-A	2'-OMe- (5m)C	Винилфосфонат-А	
147	(AC)17	UNA-A	LNA- (5m)C	ОН	
148	(AC)18	UNA-A	LNA- (5m)C	ОН	
149	(AC)19	UNA-A	LNA- (5m)C	ОН	
150	(AC)20	UNA-A	LNA- (5m)C	ОН	
151	(AC)17	UNA-A	LNA- (5m)C	Винилфосфонат-А	
152	(AC)18	UNA-A	LNA- (5m)C	Винилфосфонат-А	
153	(AC)19	UNA-A	LNA- (5m)C	Винилфосфонат-А	
154	(AC)20	UNA-A	LNA- (5m)C	Винилфосфонат-А	
155	(AC)17	LNA-A	UNA- (5m)C	ОН	
156	(AC)18	LNA-A	UNA- (5m)C	ОН	
157	(AC)19	LNA-A	UNA- (5m)C	ОН	
158	(AC)20	LNA-A	UNA- (5m)C	ОН	

159	(AC)20	LNA-A	UNA- (5m)C	ОН	Блок из 4 LNA
160	(AC)17	LNA-A	UNA- (5m)C	Винилфосфонат-А	
161	(AC)18	LNA-A	UNA- (5m)C	Винилфосфонат-А	
162	(AC)19	LNA-A	UNA- (5m)C	Винилфосфонат-А	
163	(AC)20	LNA-A	UNA- (5m)C	Винилфосфонат-А	
164	(AC)20	2'-OMe-A LNA-A	2'-OMe- (5m)C LNA- (5m)C	ОН	Каждое 3 основание представляет собой LNA
165	(AC)20	2'-OMe-A LNA-A	2'-OMe- (5m)C LNA- (5m)C	Винилфосфонат-А	Каждое 3 основание представляет собой LNA
166	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C LNA- (5m)C	ОН	Каждое 4 основание представляет собой LNA
167	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C LNA- (5m)C	Винилфосфонат-А	Каждое 4 основание представляет собой LNA
168	(AC)17	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C LNA (5m)C	Винилфосфонат-А	5 (5m)InC в середине
169	(AC)18	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	Винилфосфонат-А	6 InAps (5m)C в середине
170	(AC)19	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C LNA (5m)C	Винилфосфонат-А	6 InAps (5m)C в середине
171	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C LNA (5m)C	ОН	5 (5m)InC в середине
172	(AC)20	LNA-A 2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C LNA (5m)C	ОН	10 InAps (5m)C в середине
173	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C LNA (5m)C	Винилфосфонат-А	5 (5m)InC в середине
174	(AC)20	2'-OMe-A LNA-A	2'-OMe- (5m)C LNA- (5m)C	Винилфосфонат-А	10 InAps (5m)C в середине

Примеры 175-216.

Влияние длины последовательности, встраивания LNA, стереохимической модификации и 5'-модификации оценивали, получив серию тиофосфатированных олигонуклеотидов в соответствии со способами, описанными выше в примерах 1-116, за исключением того, что указанные олигонуклеотиды получали модифицированным способом с использованием динуклеотидного строительного блока, состоящего из фрагмента А и фрагмента С, соединенных стереохимически заданной тиофосфатной связью, следующим образом:



2'-OMeApsR (5m)mC фосфорамидит (9R) 2'-OMeApsS (5m)mC фосфорамидит (9S) По отношению к фиг. 8, 9А и 9В динуклеотидные строительные блоки 9R и 9S получали следующим образом.

Получение соединения 8-2. К раствору соединения 8-1 (300,0 г, 445,1 ммоль) в 3000 мл безводного диоксана в инертной атмосфере азота по каплям добавляли левулиновую кислоту (309,3 г, 2,67 моль) при комнатной температуре. Затем по очереди добавляли дициклогексилкарбодиимид (274,6 г, 1,33 моль) и 4-диметиламинопиридин (27,1 г, 222,0 ммоль) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч, разбавляли 5000 мл дихлорметана и фильтровали. Органическую фазу промывали 2×3000 мл 2% водного раствора бикарбоната натрия и 1×3000 мл воды, соответственно. Органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и кон-

центрировали при пониженном давлении. Получили 345,0 г (неочищенного) соединения 8-2 в виде белого твердого вещества, которое использовали без дальнейшей очистки на следующем этапе. ЭР-ЖХ/МС: m/z 774 $[M+H]^+$.

Получение соединения 8-3. К раствору соединения 8-2 (345 г, 445,1 ммоль) в 3000 мл дихлорметана в инертной атмосфере азота по каплям добавляли *p*-толуолсульфоновую кислоту (84,6 г, 445,1 ммоль) при 0°C. Полученный раствор перемешивали при температуре 0°C в течение 0,5 ч, разбавляли 3000 мл дихлорметана и промывали 2×2000 мл насыщенного водного раствора бикарбоната натрия и 1×2000 мл насыщенного водного раствора хлорида натрия, соответственно. Органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия, концентрировали при пониженном давлении, а остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (SiO_2 , дихлорметан/метанол=30:1), получая соединение 8-3 (210,0 г, 90% за два этапа) в виде белого твердого вещества. ¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆) δ =12,88 (s, 1H), 8,17-8,10 (m, 3H), 7,62-7,60 (m, 1H), 7,58-7,48 (m, 2H), 5,97-5,91 (m, 1H), 5,42 (d, J=5,9 Гц, 1H), 5,25 (s, 1H), 4,21-4,08 (m, 2H), 3,78-3,59 (m, 2H), 2,75-2,74 (m, 2H), 2,57 (m, 2H), 2,13 (d, J=2,3 Гц, 3H), 2,02 (s, 3H), 1,81 (m, 1H), 1,77-1,56 (m, 1H), 1,33-0,98 (m, 1H). ЭР-ЖХ/МС: m/z 474 $[M+H]^+$.

Получение соединения 8-4. К раствору соединения 8-3 (210,0 г, 444,9 ммоль) в 2000 мл ацетонитрила в инертной атмосфере азота по очереди добавляли соединение 8-3а (360,0 г, 405,4 ммоль) и ЕТТ (58,0 г, 445,9 ммоль) при температуре 0°C. Полученный раствор перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем смесь фильтровали и использовали без дальнейшей очистки на следующем этапе. ЭР-ЖХ/МС: m/z 1258 $[M+H]^+$.

Получение соединений 8-5 и 8-6. К раствору соединения 8-4 (509,9 г, 405,4 ммоль) в 2000 мл ацетонитрила в инертной атмосфере азота по очереди добавляли пиридин (128,0 г, 1,62 моль) и 5-амино-3Н-1,2,4-дитиазол-3-тион (121,8 г, 810,9 ммоль) при комнатной температуре. Реакционный раствор перемешивали в течение 30 минут при комнатной температуре. Полученный раствор фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали препаративной флэш-ВЭЖХ в следующих условиях (IntelFlash-1): Колонка: С18 силикагель; подвижная фаза: CH_3CN/H_2O (0,5% NH_4HCO_3)=1/1, увеличение до CH_3CN/H_2O (0,5% NH_4HCO_3)=1/0 в течение 20 мин, элюированный продукт собирали при соотношении CH_3CN/H_2O (0,5% NH_4HCO_3)=3/1; детектор: УФ 254 нм. Это приводило к получению смеси соединений 8-5 и 8-6 (430,0 г, 90% за два этапа) в виде белого твердого вещества. Фракции разбавляли 3000 мл дихлорметана. Органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали SFC в следующих условиях: CHIRALPAK IB N-5 (IB50CD-VD008)/SFC 0,46 см в.д.×25 см L 10,0 мкл; подвижная фаза: (ДХМ/ЕтОАс=80/20 (об./об.)); детектор: УФ 254 нм. Фракции концентрировали до полного исчезновения остаточного растворителя при пониженном давлении. Получили 105,0 г (35,0%) соединения 8-5 в виде белого твердого вещества, которое использовали для получения соединения 9R, как описано ниже. ¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆) δ =12,88 (s, 1H), 11,26 (s, 1H), 8,62 (d, J=8,06 Гц, 2H), 8,18 (m, 2H), 8,05 (d, J=7,2 Гц, 2H), 7,79 (s, 1H), 7,67-7,48 (m, 6H), 7,40 (d, J=7,2 Гц, 2H), 7,28-7,18 (m, 7H), 6,86-6,83 (m, 4H), 6,21 (d, J=6,6 Гц, 1H), 5,91 (d, J=5,0 Гц, 1H), 5,44-5,41 (m, 1H), 5,28-5,26 (m, 1H), 5,06 (m, 1H), 4,45-4,24 (m, 7H), 3,71 (s, 6H), 3,39 (s, 4H), 3,31 (s, 3H), 2,98 (m, 2H), 2,75 (m, 2H), 2,56 (m, 2H), 2,01 (s, 3H). ³¹P-ЯМР (162 МГц, ДМСО-*d*₆) δ =67,17. ЭР-ЖХ/МС: m/z 1292 $[M+H]^+$; получили 170,0 г (56,6%) соединения 8-6 в виде белого твердого вещества и использовали для получения соединения 9S, как описано ниже. ¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆) δ =12,86 (s, 1H), 11,25 (s, 1H), 8,62 (d, J=16,6 Гц, 2H), 8,18 (d, J=7,2 Гц, 2H), 8,05 (m, 2H), 7,78 (s, 1H), 7,67-7,48 (m, 6H), 7,40 (d, J=7,2 Гц, 2H), 7,28-7,18 (m, 7H), 6,87-6,85 (m, 4H), 6,21 (d, J=6,8 Гц, 1H), 5,91 (d, J=5,2 Гц, 1H), 5,43-5,39 (m, 1H), 5,28-5,26 (m, 1H), 5,06 (m, 1H), 4,48-4,21 (m, 7H), 3,72 (s, 6H), 3,36 (s, 4H), 3,26 (s, 3H), 2,95 (m, 2H), 2,73 (m, 2H), 2,55 (m, 2H), 2,04 (s, 3H); ³¹P-ЯМР (162 МГц, ДМСО-*d*₆) δ =66,84; ЭР-ЖХ/МС: m/z 1292 $[M+H]^+$.

Получение соединения 9-1. К раствору соединения 8-5 (100,0 г, 77,4 ммоль) в 700 мл ацетонитрила в инертной атмосфере азота добавляли 0,5М гидрата гидразина (20,0 г, 0,4 моль) в пиридине/уксусной кислоте (3:2) при температуре 0°C. Полученный раствор перемешивали в течение 0,5 ч при температуре 0°C. Затем в реакционную смесь однократно добавляли 2,4-пентандион, смеси позволяли нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение еще 15 мин. Раствор разбавляли ДХМ (2000 мл) и дважды промывали насыщенным водным раствором NH_4Cl , затем насыщенным раствором $NaCl$ и высушивали над Na_2SO_4 . Затем раствор концентрировали при пониженном давлении, остаток очищали препаративной флэш-ВЭЖХ в следующих условиях (IntelFlash-1): Колонка: С18 силикагель; подвижная фаза: CH_3CN/H_2O (0,5% NH_4HCO_3)=1/1, увеличение до CH_3CN/H_2O (0,5% NH_4HCO_3)=1/0 в течение 20 мин, элюированный продукт собирали при соотношении CH_3CN/H_2O (0,5% NH_4HCO_3)=3/1; детектор: УФ 254 нм. Это приводило к получению 9-1 (67,0 г, 80%) в виде белого твердого вещества. ¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆) δ =12,97 (s, 1H), 11,26 (s, 1H), 8,62 (d, J=11,2 Гц, 2H), 8,19 (d, J=7,2 Гц, 2H), 8,05 (m, 2H), 7,74 (s, 1H), 7,67-7,48 (m, 6H), 7,40 (d, J=7,2 Гц, 2H), 7,28-7,18 (m, 7H), 6,85 (m, 4H), 6,21 (m, 1H), 5,90 (d, J=3,2 Гц, 1H), 5,49-5,43 (m, 2H), 5,05 (m, 1H), 4,45 (m, 1H), 4,40-4,30 (m, 4H), 4,18-4,11 (m, 2H), 3,93 (m, 1H), 3,71 (s, 6H), 3,40-3,32 (m, 8H), 2,98 (m, 2H), 2,04 (s, 3H). ³¹P-ЯМР (162 МГц, ДМСО-*d*₆) δ =67,30. ЭР-ЖХ/МС: m/z 1194 $[M+H]^+$.

Получение соединения 9R. К раствору соединения 9-1 (58,0 г, 48,6 ммоль) в 600 мл дихлорметана в инертной атмосфере азота по очереди добавляли $\text{SEP}[\text{N}(\text{iPr})_2]_2$ (18,7 г, 62,1 ммоль) и DCI (5,1 г, 43,7 ммоль) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре, разбавляли 1000 мл дихлорметана и промывали 2×1000 мл насыщенного водного раствора бикарбоната натрия и 1×1000 мл насыщенного водного раствора хлорида натрия, соответственно. Органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали до полного исчезновения остаточного растворителя при пониженном давлении. Остаток очищали препаративной флэш-ВЭЖХ в следующих условиях (IntelFlash-1): Колонка: C18 силикагель; подвижная фаза: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (0,5% NH_4HCO_3)=1/1, увеличение до $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (0,5% NH_4HCO_3)=1/0 в течение 20 мин, элюированный продукт собирали при соотношении $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (0,5% NH_4HCO_3)=3/1; детектор: УФ 254 нм. Это приводило к получению соединения 9R (51,2 г, 70%) в виде белого твердого вещества. ^1H -ЯМР (400 МГц, DMCO-d_6) δ =12,94 (m, 1H), 11,26 (s, 1H), 8,62 (m, 2H), 8,19 (d, J =7,2 Гц, 2H), 8,05 (m, 2H), 7,77 (m, 1H), 7,69-7,46 (m, 6H), 7,39 (d, J =6,6 Гц, 2H), 7,26-7,20 (m, 7H), 6,84 (m, 4H), 6,20 (m, 1H), 5,90 (m, 1H), 5,43 (m, 1H), 5,06 (s, 1H), 4,46-4,17 (m, 7H), 4,12 (m, 1H), 3,82-3,80 (m, 2H), 3,73-3,66 (s, 6H), 3,64-3,58 (m, 2H), 3,48-3,29 (m, 8H), 2,98 (s, 2H), 2,82-2,77 (m, 2H), 2,03 (s, 3H), 1,24-1,15 (m, 12H). ^{31}P -ЯМР (162 МГц, DMCO-d_6) δ =149,87, 149,80, 67,43, 67,33. ЭР-ЖХ/МС: m/z 1394 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Получение соединения 9-2. К раствору соединения 8-6 (110,0 г, 85,1 ммоль) в 700 мл ацетонитрила в инертной атмосфере азота добавляли 0,5М гидрата гидразина (21,1 г, 423,6 ммоль) в пиридине/уксусной кислоте (3:2) при температуре 0°C. Полученный раствор перемешивали в течение 0,5 ч при температуре 0°C. Затем в реакционную смесь однократно добавляли 2,4-пентандион, смеси позволяли нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение еще 15 мин. Раствор разбавляли ДХМ (2000 мл) и дважды промывали насыщенным водным раствором NH_4Cl , а затем насыщенным раствором NaCl и высушивали над Na_2SO_4 . Затем раствор концентрировали при пониженном давлении, остаток очищали препаративной флэш-ВЭЖХ в следующих условиях (IntelFlash-1): Колонка: C18 силикагель; подвижная фаза: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (0,5% NH_4HCO_3)=1/1, увеличение до $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (0,5% NH_4HCO_3)=1/0 в течение 20 мин, элюированный продукт собирали при соотношении $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (0,5% NH_4HCO_3)=3/1; детектор: УФ 254 нм. Это приводило к получению соединения 9-2 (72,0 г, 80%) в виде белого твердого вещества. ^1H -ЯМР (400 МГц, DMCO-d_6) δ =12,94 (s, 1H), 11,24 (s, 1H), 8,61-8,57 (m, 2H), 8,18 (d, J =7,6 Гц, 2H), 8,03 (d, J =7,6 Гц, 2H), 7,74 (s, 1H), 7,66-7,47 (m, 6H), 7,40 (d, J =7,1 Гц, 2H), 7,27-7,20 (m, 7H), 6,86 (m, 4H), 6,20 (d, J =6,6 Гц, 1H), 5,87 (d, J =4,0 Гц, 1H), 5,42 (m, 2H), 5,05 (m, 1H), 4,45 (m, 2H), 4,40-4,24 (m, 1H), 4,22-4,06 (m, 4H), 3,92 (m, 1H), 3,71 (s, 6H), 3,40-3,32 (m, 8H), 2,94 (m, 2H), 2,03 (m, 3H). ^{31}P -ЯМР (162 МГц, DMCO-d_6) δ =66,87. ЭР-ЖХ/МС: m/z 1194 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Получение соединения 9S. К раствору соединения 9-2 (62,0 г, 51,9 ммоль) в 600 мл дихлорметана в инертной атмосфере азота по очереди добавляли $\text{SEP}[\text{N}(\text{iPr})_2]_2$ (19,0 г, 63,1 ммоль) и DCI (5,55 г, 47,0 ммоль) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре, разбавляли 1000 мл дихлорметана и промывали 2×1000 мл насыщенного водного раствора бикарбоната натрия и 1×1000 мл насыщенного водного раствора хлорида натрия, соответственно. Органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали до полного исчезновения остаточного растворителя при пониженном давлении. Остаток очищали препаративной флэш-ВЭЖХ в следующих условиях (IntelFlash-1): Колонка: C18 силикагель; подвижная фаза: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (0,5% NH_4HCO_3)=1/1, увеличение до $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (0,5% NH_4HCO_3)=1/0 в течение 20 мин, элюированный продукт собирали при соотношении $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (0,5% NH_4HCO_3)=3/1; детектор: УФ 254 нм. Это приводило к получению соединения 9S (51,5 г, 70%) в виде белого твердого вещества. ^1H -ЯМР (400 МГц, DMCO-d_6) δ =12,90 (s, 1H), 11,25 (s, 1H), 8,60 (m, 2H), 8,19 (d, J =6,6 Гц, 2H), 8,04 (m, 2H), 7,77 (s, 1H), 7,67-7,48 (m, 6H), 7,41 (d, J =8,0 Гц, 2H), 7,29-7,19 (m, 7H), 6,85 (m, 4H), 6,21 (d, J =6,8 Гц, 1H), 5,91-5,87 (m, 1H), 5,41 (m, 1H), 5,06 (m, 1H), 4,46-4,21 (m, 7H), 4,10 (m, 1H), 3,83-3,75 (m, 2H), 3,73-3,68 (s, 6H), 3,68-3,59 (m, 2H), 3,40-3,32 (m, 8H), 2,93 (m, 2H), 2,80 (m, 2H), 2,02 (s, 3H), 1,18-1,13 (m, 12H). ^{31}P -ЯМР (162 МГц, DMCO-d_6) δ =149,96, 149,73, 66,99, 66,86. ЭР-ЖХ/МС: m/z 1394 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

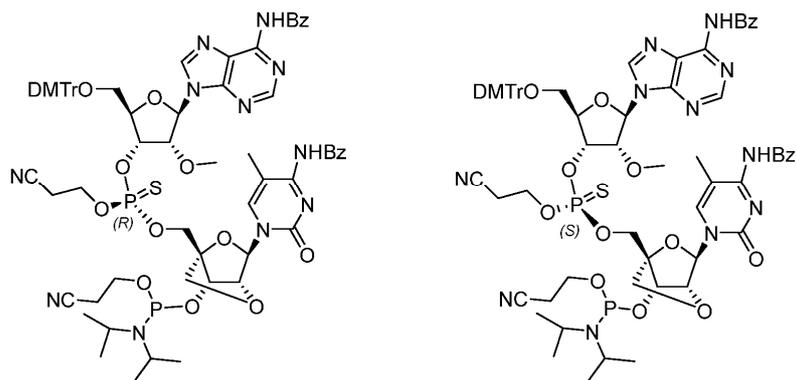
При модифицированном способе также использовали более продолжительное время присоединения (8 мин) и большее количество эквивалентов амидитов (8 эквивалентов). В табл. 9 приведена сводная информация о длине последовательности, из чередующихся фрагментов А и С, количестве и типе (R или S) стереохимически заданных тиофосфатных (PS) связей и 5'-модификации для полученных типичных модифицированных тиофосфатированных олигонуклеотидов.

Таблица 9

№	Длина	А	С	Модификация PS	5'- модификация
175	(AC)17	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	5 R-изомер	ОН
176	(AC)18	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	6 R-изомер	ОН
177	(AC)19	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	4 R-изомер	ОН
178	(AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	4 R-изомер	ОН
179	(AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	5 R-изомер	ОН
180	(AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	6 R-изомер	ОН
181	(AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	6 R-изомер	Винилфосфонат-А
182	(AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	7 R-изомер	ОН
183	(AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	13 R-изомер	ОН
184	(AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	20 R-изомер	ОН
185	(AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	20 R-изомер	Винилфосфонат-А
186	(AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	19 R-изомер	Винилфосфонат-А
187	(AC)17	LNA-А	LNA- (5m)С	5 R-изомер	ОН
188	(AC)18	LNA-А	LNA- (5m)С	6 R-изомер	ОН
189	(AC)19	LNA-А	LNA- (5m)С	6 R-изомер	ОН
190	(AC)20	LNA-А	LNA- (5m)С	4 R-изомер	ОН
191	(AC)20	LNA-А	LNA- (5m)С	5 R-изомер	ОН
192	(AC)20	LNA-А	LNA- (5m)С	6 R-изомер	ОН
193	(AC)20	LNA-А	LNA- (5m)С	6 R-изомер,	Винилфосфонат-А
194	(AC)20	LNA-А	LNA- (5m)С	13 R-изомер	ОН
195	(AC)20	LNA-А	LNA- (5m)С	20 R-изомер	ОН
196	(AC)20	LNA-А	LNA- (5m)С	20 R-изомер	Винилфосфонат-А
197	(AC)17	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	5 S-изомер	ОН
198	(AC)18	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	6 S-изомер	ОН
199	(AC)19	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	6 S-изомер	ОН
200	(AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	4 S-изомер	ОН
201	(AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	5 S-изомер	ОН
202	(AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	6 S-изомер	ОН
203	(AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	7 S-изомер	ОН
204	(AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	13 S-изомер	ОН
205	(AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	20 S-изомер	ОН
206	(AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	20 S-изомер	Винилфосфонат-А
207	(AC)17	LNA-А	LNA- (5m)С	5 S-изомер	ОН
208	(AC)18	LNA-А	LNA- (5m)С	6 S-изомер	ОН
209	(AC)19	LNA-А	LNA- (5m)С	6 S-изомер	ОН
210	(AC)20	LNA-А	LNA- (5m)С	4 S-изомер	ОН
211	(AC)20	LNA-А	LNA- (5m)С	5 S-изомер	ОН
212	(AC)20	LNA-А	LNA- (5m)С	6 S-изомер	ОН
213	(AC)20	LNA-А	LNA- (5m)С	6 S-изомер	Винилфосфонат-А
214	(AC)20	LNA-А	LNA- (5m)С	13 S-изомер	ОН
215	(AC)20	LNA-А	LNA- (5m)С	20 S-изомер	ОН
216	(AC)20	LNA-А	LNA- (5m)С	20 S-изомер	Винилфосфонат-А

Примеры 217-234.

Влияние длины последовательности, встраивания LNA, стереохимической модификации и 5'-модификации оценивали, получив серию тиофосфатированных олигонуклеотидов в соответствии со способами, описанными выше в примерах 175-216, за исключением того, что указанные олигонуклеотиды получали модифицированным способом с использованием динуклеотидного строительного блока, состоящего из фрагмента А и фрагмента С, соединенных стереохимически заданной тиофосфатной связью, следующим образом:



2'-OMeApsR (5m)InC фосфорамидит (11R) 2'-OMeApsS (5m)InC фосфорамидит (US).

По отношению к фиг. 10, 11A и 11B динуклеотидные строительные блоки 11R и 11S получали следующим образом.

Получение соединения 10-2. К раствору соединения 10-1 (50,0 г, 74,0 ммоль) в 500 мл безводного диоксана в инертной атмосфере азота по каплям добавляли левулиновую кислоту (51,5 г, 44,4 моль) при комнатной температуре. Затем по очереди добавляли дициклогексилкарбодимид (45,7 г, 0,2 моль) и 4-диметиламинопиридин (4,6 г, 37,0 ммоль) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч, разбавляли 3000 мл дихлорметана и фильтровали. Органическую фазу промывали 2×1000 мл 2% водного раствора бикарбоната натрия и 1×1000 мл воды, соответственно. Органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Получили 53,0 г (неочищенного) соединения 10-2 в виде белого твердого вещества, которое использовали без дальнейшей очистки на следующем этапе. ЭР-ЖХ/МС: m/z 774 $[M+H]^+$.

Получение соединения 10-3. К раствору соединения 10-2 (52,0 г, 67,0 ммоль) в 400 мл дихлорметана в инертной атмосфере азота по каплям добавляли *p*-толуолсульфоновую кислоту (51,5 г, 0,4 моль) при температуре 0°C. Полученный раствор перемешивали при температуре 0°C в течение 0,5 ч, разбавляли 2000 мл дихлорметана и промывали 2×1000 мл насыщенного водного раствора бикарбоната натрия и 1×1000 мл насыщенного водного раствора хлорида натрия, соответственно. Органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия, концентрировали при пониженном давлении, а остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (SiO_2 , дихлорметан/метанол=30:1), получая соединение 10-3 (32,0 г, 80% за два этапа) в виде белого твердого вещества. 1H -ЯМР (400 МГц, $DMCO-d_6$) δ =13,05 (s, 1H), 8,20-7,91 (m, 4H), 7,60-7,49 (m, 4H), 5,57 (m, 2H), 5,32 (d, J =10,8 Гц, 1H), 4,88 (s, 1H), 4,49 (s, 1H), 4,18 (s, 1H), 3,91-3,78 (m, 5H), 2,74-2,69 (m, 4H), 2,59-2,49 (m, 7H), 2,10 (s, 5H), 2,06 (s, 4H), 1,74-1,49 (m, 3H), 1,26-1,02 (m, 3H). ЭР-ЖХ/МС: m/z 472 $[M+H]^+$.

Получение соединения 10-4. К раствору соединения 10-3 (28,0 г, 59,4 ммоль) в 300 мл ацетонитрила в инертной атмосфере азота по очереди добавляли соединение 8-3а (50,0 г, 56,3 ммоль) и ЕТТ (7,9 г, 59,4 ммоль) при температуре 0°C. Полученный раствор перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем смесь фильтровали и использовали без дальнейшей очистки на следующем этапе. ЭР-ЖХ/МС: m/z 1258 $[M+H]^+$.

Получение соединений 10-5 и 10-6. К раствору соединения 10-4 (70,9 г, 56,3 ммоль) в 300 мл ацетонитрила в инертной атмосфере азота по очереди добавляли пиридин (17,8 г, 225,2 ммоль) и 5-амино-3Н-1,2,4-дитиазол-3-тион (16,9 г, 112,6 ммоль) при комнатной температуре. Реакционный раствор перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре. Полученный раствор фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали препаративной флэш-ВЭЖХ в следующих условиях (IntelFlash-1): Колонка: C18 силикагель; подвижная фаза: CH_3CN/H_2O (0,5% NH_4HCO_3)=1/1, увеличение до CH_3CN/H_2O (0,5% NH_4HCO_3)=1/0 в течение 20 мин, элюированный продукт собирали при соотношении CH_3CN/H_2O (0,5% NH_4HCO_3)=3/1; детектор: УФ 254 нм. Это приводило к получению смеси соединений 10-5 и 10-6. Фракции разбавляли 3000 мл дихлорметана. Органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали SFC в следующих условиях: CHIRAL CEL OD-H/SFC 20 мм×250 мм L 5 мкм (фаза А: CO_2 ; фаза В: 50% этанол-50% ацетонитрил), детектор: УФ 220 нм. Фракции концентрировали до полного исчезновения остаточного растворителя при пониженном давлении. Получили 9,0 г (25,7%) соединения 10-5 в виде белого твердого вещества, которое использовали для получения соединения 11R, как описано ниже. 1H -ЯМР (400 МГц, $DMCO-d_6$) δ =13,06 (s, 1H), 11,28 (s, 1H), 8,63 (d, J =20 Гц, 2H), 8,20 (m, 2H), 8,05 (d, J =8 Гц, 2H), 7,84 (s, 1H), 7,67-7,39 (m, 8H), 7,28-7,19 (m, 7H), 6,86-6,83 (m, 4H), 6,24 (d, J =6,6 Гц, 1H), 5,66 (s, 2H), 5,45-5,43 (m, 1H), 5,10-5,03 (m, 2H), 4,82-4,76 (m, 1H), 4,60 (s, 1H), 4,50-4,33 (m, 4H), 4,03-3,96 (m, 2H), 3,72 (s, 6H), 3,41-3,35 (m, 7H), 3,03-3,00 (m, 2H), 2,75-2,72 (m, 2H), 2,56-2,53 (m, 2H), 2,08-2,05 (m, 6H). ^{31}P -ЯМР (162 МГц, $DMCO-d_6$) δ =67,02. ЭР-ЖХ/МС: m/z 1290 $[M+H]^+$. Получили 15,0 г (42,8%) со-

единения 10-6 в виде белого твердого вещества, которое использовали для получения соединения 11S, как описано ниже. ¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ=13,05 (s, 1H), 11,26 (s, 1H), 8,63 (d, J=24 Гц, 2H), 8,7,96 (m, 4H), 7,76 (s, 1H), 7,67-7,39 (m, 8H), 7,28-7,19 (m, 7H), 6,86 (d, J=7,2 Гц, 4H), 6,24 (d, J=6,4 Гц, 1H), 5,76 (s, 1H), 5,63 (s, 1H), 5,43-5,41 (m, 1H), 5,12 (m, 1H), 4,97 (s, 1H), 4,82-4,79 (m, 1H), 4,57-4,49 (m, 3H), 4,27-4,25 (m, 2H), 4,07-4,03 (m, 2H), 3,72 (s, 6H), 3,44-3,36 (m, 6H), 2,96 (m, 2H), 2,74-2,71 (m, 2H), 2,55-2,53 (m, 2H), 2,08 (s, 3H), 1,94 (s, 3H). ³¹P-ЯМР (162 МГц, ДМСО-d₆) δ=66,58. ЭР-ЖХ/МС: m/z 1290 [M+H]⁺.

Получение соединения 11-1. К раствору соединения 10-5 (10,0 г, 7,7 ммоль) в 100 мл ацетонитрила в инертной атмосфере азота добавляли 0,5М гидрата гидразина (1,8 г, 37,5 ммоль) в пиридине/уксусной кислоте (3:2) при температуре 0°C. Полученный раствор перемешивали в течение 0,5 ч при температуре 0°C. Затем в реакционную смесь однократно добавляли 2,4-пентандион, смеси позволяли нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение еще 15 мин. Раствор разбавляли ДХМ (500 мл) и дважды промывали насыщенным водным раствором NH₄Cl, затем насыщенным раствором NaCl и высушивали над Na₂SO₄. Затем раствор концентрировали при пониженном давлении, остаток очищали препаративной флэш-ВЭЖХ в следующих условиях (IntelFlash-1): Колонка: C18 силикагель; подвижная фаза: CH₃CN/H₂O (0,5% NH₄HCO₃)=1/1, увеличение до CH₃CN/H₂O (0,5% NH₄HCO₃)=1/0 в течение 20 мин, элюированный продукт собирали при соотношении CH₃CN/H₂O (0,5% NH₄HCO₃)=3/1; детектор: УФ 254 нм. Это приводило к получению соединения 11-1 (6,0 г, 65%) в виде белого твердого вещества. ¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ=13,13 (s, 1H), 11,28 (s, 1H), 8,63 (d, J=20 Гц, 2H), 8,21 (d, J=8 Гц, 2H), 8,06-7,95 (m, 3H), 7,80 (s, 1H), 7,67-7,48 (m, 8H), 7,40 (d, J=7,6 Гц, 2H), 7,32-7,19 (m, 10H), 6,85 (m, 5H), 6,24 (d, J=8 Гц, 1H), 6,04 (d, J=4,0 Гц, 1H), 5,57 (s, 2H), 5,44-5,42 (m, 1H), 5,19-5,17 (m, 2H), 5,10-5,08 (m, 1H), 4,80-4,76 (m, 2H), 4,50 (d, J=5,6 Гц, 1H), 4,37-4,32 (m, 4H), 4,06-3,99 (m, 2H), 3,81 (m, 1H), 3,72 (s, 7H), 3,40-3,36 (m, 8H), 3,03-3,00 (m, 2H), 2,05 (m, 3H). ³¹P-ЯМР (162 МГц, ДМСО-d₆) δ=67,21. ЭР-ЖХ/МС: m/z 1192 [M+H]⁺.

Получение соединения 11R. К раствору соединения 11-1 (6,0 г, 5,0 ммоль) в 60 мл дихлорметана в инертной атмосфере азота по очереди добавляли SEP[N(iPr)₂]₂ (1,9 г, 6,5 ммоль) и DCI (0,6 г, 5,0 ммоль) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре, разбавляли 1000 мл дихлорметана и промывали 2×250 мл насыщенного водного раствора бикарбоната натрия и 1×250 мл насыщенного водного раствора хлорида натрия, соответственно. Органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали до полного исчезновения остаточного растворителя при пониженном давлении. Остаток очищали препаративной флэш-ВЭЖХ в следующих условиях (IntelFlash-1): Колонка: C18 силикагель; подвижная фаза: CH₃CN/H₂O (0,5% NH₄HCO₃)=1/1, увеличение до CH₃CN/H₂O (0,5% NH₄HCO₃)=1/0 в течение 20 мин, элюированный продукт собирали при соотношении CH₃CN/H₂O (0,5% NH₄HCO₃)=3/1; детектор: УФ 254 нм. Это приводило к получению соединения 11R (5,0 г, 70%) в виде белого твердого вещества. ¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ=13,10 (s, 1H), 11,28 (s, 1H), 8,20 (d, J=8,0 Гц, 2H), 8,04 (d, J=7,2 Гц, 2H), 7,79 (d, J=14 Гц, 2H), 7,67-7,48 (m, 6H), 7,39 (d, J=7,2 Гц, 2H), 7,27-7,18 (m, 7H), 6,85-6,82 (m, 4H), 6,23-6,20 (m, 1H), 5,64 (d, J=6,0 Гц, 1H), 5,44-5,41 (m, 1H), 5,08-5,07 (m, 1H), 4,82-4,77 (m, 1H), 4,56-4,46 (m, 3H), 4,36-4,30 (m, 2H), 4,22 (d, J=7,2 Гц, 1H), 3,98 (m, 1H), 3,89 (m, 1H), 3,71 (s, 7H), 3,59-3,55 (m, 2H), 3,40-3,34 (m, 10H), 3,02-2,98 (m, 2H), 2,77-2,72 (m, 2H), 2,08-2,05 (m, 3H), 1,13-1,08 (m, 12H). ³¹P-ЯМР (162 МГц, ДМСО-d₆) δ=148,71, 148,11, 67,51, 67,44. ЭР-ЖХ/МС: m/z 1392 [M+H]⁺.

Получение соединения 11-2. К раствору соединения 10-6 (10,0 г, 7,7 ммоль) в 100 мл ацетонитрила в инертной атмосфере азота добавляли 0,5М гидрата гидразина (1,8 г, 37,5 ммоль) в пиридине/уксусной кислоте (3:2) при температуре 0°C. Полученный раствор перемешивали в течение 0,5 ч при температуре 0°C. Затем в реакционную смесь однократно добавляли 2,4-пентандион, смеси позволяли нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение еще 15 мин. Раствор разбавляли ДХМ (500 мл) и дважды промывали насыщенным водным раствором NH₄Cl, а затем насыщенным раствором NaCl и высушивали над Na₂SO₄. Затем раствор концентрировали при пониженном давлении, остаток очищали препаративной флэш-ВЭЖХ в следующих условиях (IntelFlash-1): Колонка: C18 силикагель; подвижная фаза: CH₃CN/H₂O (0,5% NH₄HCO₃)=1/1, увеличение до CH₃CN/H₂O (0,5% NH₄HCO₃)=1/0 в течение 20 мин, элюированный продукт собирали при соотношении CH₃CN/H₂O (0,5% NH₄HCO₃)=3/1; детектор: УФ 254 нм. Это приводило к получению соединения 11-2 (7,5 г, 80%) в виде белого твердого вещества. ¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ=13,11 (s, 1H), 11,26 (s, 1H), 8,63 (d, J=20 Гц, 2H), 8,20 (d, J=7,2 Гц, 2H), 8,15 (m, 3H), 7,73 (s, 1H), 7,66-7,47 (m, 8H), 7,41 (d, J=7,6 Гц, 2H), 7,32-7,19 (m, 10H), 6,85 (m, 5H), 6,24 (m, 1H), 5,99 (s, 1H), 5,54 (s, 1H), 5,41 (m, 1H), 5,10 (m, 1H), 4,79-4,75 (m, 1H), 4,57-4,49 (m, 3H), 4,30-4,24 (m, 4H), 4,02 (m, 2H), 3,85 (m, 1H), 3,72 (s, 7H), 3,38-3,35 (m, 7H), 2,95 (m, 2H), 1,98 (m, 3H). ³¹P-ЯМР (162 МГц, ДМСО-d₆) δ=66,79. ЭР-ЖХ/МС: m/z 1192 [M+H]⁺.

Получение соединения 11S. К раствору соединения 11-2 (7,0 г, 5,0 ммоль) в 70 мл дихлорметана в инертной атмосфере азота по очереди добавляли SEP[N(iPr)₂]₂ (2,0 г, 6,5 ммоль) и DCI (0,6 г, 5,0 ммоль) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре, разбавляли 1000 мл дихлорметана и промывали 2×250 мл насыщенного водного раствора бикарбо-

ната натрия и 1×250 мл насыщенного водного раствора хлорида натрия, соответственно. Органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали до полного исчезновения остаточного растворителя при пониженном давлении. Остаток очищали препаративной флэш-ВЭЖХ в следующих условиях (IntelFlash-1): Колонка: C18 силикагель; подвижная фаза: CH₃CN/H₂O (0,5% NH₄HCO₃)=1/1, увеличение до CH₃CN/H₂O (0,5% NH₄HCO₃)=1/0 в течение 20 мин, элюированный продукт собирали при соотношении CH₃CN/H₂O (0,5% NH₄HCO₃)=3/1; детектор: УФ 254 нм. Это приводило к получению соединения 11S (6,3 г, 70%) в виде белого твердого вещества. ¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ=13,10 (s, 1H), 11,27 (s, 1H), 8,65 (s, 1H), 8,61 (s, 1H), 8,19 (m, 2H), 8,02 (d, J=7,2 Гц, 2H), 7,76-7,73 (m, 1H), 7,66-7,47 (m, 6H), 7,40 (d, J=7,2 Гц, 2H), 7,28-7,19 (m, 7H), 6,86-6,85 (m, 4H), 6,24 (d, J=6,8 Гц, 1H), 5,62 (m, 1H), 5,43-5,41 (m, 1H), 5,10 (s, 1H), 4,84-4,78 (m, 1H), 4,66-4,49 (m, 3H), 4,30-4,18 (m, 3H), 4,04-3,95 (m, 2H), 3,83-3,77 (m, 1H), 3,72 (s, 7H), 3,62-3,54 (m, 2H), 3,44-3,32 (m, 6H), 2,96-2,92 (m, 2H), 2,77-2,72 (m, 2H), 1,98-1,97 (m, 3H), 1,12-1,11 (m, 12H). ³¹P-ЯМР (162 МГц, ДМСО-d₆) δ=148,53, 148,09, 67,04. ЭР-ЖХ/МС: m/z 1392 [M+H]⁺.

Как и в примерах 175-216, при модифицированном способе также использовали более продолжительное время присоединения (8 мин) и большее количество эквивалентов амидитов (8 эквивалентов). В табл. 10 приведена сводная информация о длине последовательности, из чередующихся фрагментов А и С, количестве и типе (R или S) стереохимически заданных тиофосфатных (PS) связей и 5'-модификации для полученных типичных модифицированных тиофосфатированных олигонуклеотидов.

Таблица 10

№	Длина	А	С	Модификация PS	5'- модификация
217	(AC)17	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	5; 2'-ОМеApsR (5m)lnC	ОН
218	(AC)18	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	6; 2'-ОМеApsR (5m)lnC	ОН
219	(AC)19	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	6; 2'-ОМеApsR (5m)lnC	ОН
220	(AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	6; 2'-ОМеApsR (5m)lnC	ОН
221	(AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	20; 2'-ОМеApsR (5m)lnC	ОН
222	(AC)17	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	5; 2'-ОМеApsR (5m)lnC	Винилфосфонат-А
223	(AC)18	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	6; 2'-ОМеApsR (5m)lnC	Винилфосфонат-А
224	(AC)19	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	6; 2'-ОМеApsR (5m)lnC	Винилфосфонат-А
225	(AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	6; 2'-ОМеApsR (5m)lnC	Винилфосфонат-А
226	(AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	20; 2'-ОМеApsR (5m)lnC	Винилфосфонат-А
227	(AC)17	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	5; 2'-ОМеApsS (5m)lnC	ОН
228	(AC)18	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	6; 2'-ОМеApsS (5m)lnC	ОН
229	(AC)19	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	6; 2'-ОМеApsS (5m)lnC	ОН
230	(AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	6; 2'-ОМеApsS (5m)lnC	ОН
231	(AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	20; 2'-ОМеApsS (5m)lnC	ОН
232	(AC)17	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	5; 2'-ОМеApsS (5m)lnC	Винилфосфонат-А
233	(AC)18	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	6; 2'-ОМеApsS (5m)lnC	Винилфосфонат-А
234	(AC)19	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	6; 2'-ОМеApsS (5m)lnC	Винилфосфонат-А

Примеры 235-240.

Влияние ветвления оценивали, получив серию тиофосфатированных олигонуклеотидов, обладающих разветвленной дублирующей структурой, в которой два из олигонуклеотидов присоединены друг к другу через связывающую группу. Пример тиофосфатированного олигонуклеотида с дублирующей структурой приведен на фиг. 1. В табл. 11 приведена сводная информация о длине последовательности, из чередующихся фрагментов А и С и о 5'-модификации полученных типичных тиофосфатированных олигонуклеотидов.

Таблица 11

№	Длина	А	С	5'- модификация
235	(AC)9- (5m)lnC	LNA-A	LNA- (5m)C	5' ОН, 19-членный
236	(AC)15- (5m)lnC	LNA-A	LNA- (5m)C	5' ОН, 31-членный
237	(AC)20- (5m)lnC	LNA-A	LNA- (5m)C	5' ОН, 41-членный
238	(AC)9- (5m)mC	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)C	5' ОН, 19-членный
239	(AC)15- (5m)mC	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)C	5' ОН, 31-членный
240	(AC)20- (5m)mC	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)C	5' ОН, 41-членный

Примеры 241-246.

Влияние ветвления оценивали, получив серию тиофосфатированных олигонуклеотидов, обладающих разветвленной тройной структурой, в которой три олигонуклеотида присоединены друг к другу че-

рез связывающую группу. Пример тиофосфатированного олигонуклеотида с тройной структурой приведен на фиг. 2. В табл. 12 приведена сводная информация о длине последовательности, из чередующихся фрагментов А и С и о 5'-модификации полученных типичных тиофосфатированных олигонуклеотидов.

Таблица 12

№	Длина	А	С	5'-модификация
241	(AC)10-TREB-(5m)mC	LNA-A	LNA-(5m)C	5' OH, 31-членный
242	(AC)13-TREB-(5m)mC	LNA-A	LNA-(5m)C	5' OH, 40-членный
243	(AC)15-TREB-(5m)mC	LNA-A	LNA-(5m)C	5' OH, 46-членный
244	(AC)10-TREB-(5m)mC	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	5' OH, 31-членный
245	(AC)13-TREB-(5m)mC	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	5' OH, 40-членный
246	(AC)15-TREB-(5m)mC	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	5' OH, 46-членный

Примеры 247-252.

Влияние модификации "нуклеиновая кислота с аминостиком" (AmNA- (N-Me)) и модификации "нуклеиновая кислота со спироциклопропиленовым мостиком" (scp-BNA) оценивали, получив серию модифицированных тиофосфатированных олигонуклеотидов. AmNA-N-Me 6-N-бензоиладенозин (A^{Bz}), 4-N-бензоил-5-метилцитидин получили из Luxna Biotech Co, Ltd, а scp-BNA-фосфорамидитные мономеры с 6-N-бензоиладенозином (A^{Bz}), 4-N-бензоил-5-метилцитидином синтезировали с использованием процедуры, описанной в источниках Takao Yamaguchi, Masahiko Horiba and Satoshi Obika; Chem. Commun. 2015, 51, 9737-9740, и Masahiko Horiba, Takao Yamaguchi, and Satoshi Obika; Journal of Organic Chemistry, 2016, 81, 11000-11008. Мономеры высушивали в вакуумном эксикаторе с осушителем (P_2O_5) при комнатной температуре в течение 24 ч). Синтез модификаций AmNA и scp-BNA выполняли в масштабе 1 мкМ в направлении от 3' к 5' путем присоединения фосфорамидитных мономеров, разбавленных до концентрации 0,12М в безводном CH_3CN в присутствии 0,3М активатора 5- (бензилтио)-1Н-тетразола (время присоединения 16-20 мин) к олигонуклеотиду, связанному с твердой подложкой, с последующим экпированием, окислением и снятием защиты, что позволяло получить модифицированные олигонуклеотиды. Эффективность поэтапного присоединения всех модифицированных фосфорамидитов составляла более 97%. DDTT (диметиламинометилен)амино)-3Н-1,2,4-дитиазолин-3-тион использовали в качестве агента для переноса серы для синтеза тиофосфатов олигонуклеотидов. Твердый материал подложки, несущий олигонуклеотиды, промывали 20% раствором ДЭА в ацетонитриле в течение 15 мин, а затем колонку тщательно промывали AcCN. Подложку нагревали до 65°C в смеси диизопропиламин:вода:метанол (1:1:2) в течение 5 ч в термоблоке для отщепления продукта от подложки и снятия лабильных защитных групп с основания. В табл. 13 приведена сводная информация о длине последовательности, из чередующихся фрагментов А и С и о 5'-модификации полученных типичных модифицированных тиофосфатированных олигонуклеотидов.

Таблица 13

№	Длина	А	С	5'-модификация
247	(AmAps (5m)AmC)20	AmNA (NMe)-A	AmNA (NMe)-(5m)C	5' OH, 40-членный, полностью AmNA
248	(ScpAps (5m)scpC)20	Scp-BNA-A	Scp-BNA-(5m)C	5' OH, 40-членный, полностью Scp-BNA
249	AmAps (5m)mC (AC)19	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	Один AmNA на 5'-конце, 40-членный
250	(AC)19-mAps (5m)AmC	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	Один AmNA на 3'-конце, 40-членный
251	ScpAps (5m)mC (AC)19	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	Один ScpA на 5'-конце, 40-членный
252	(AC)19-mAps (5m)ScpC	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	Один ScpC на 3'-конце, 40-членный

Примеры 253-256.

Влияние присоединения лиганда, обеспечивающего адресное воздействие, оценивали, получив серию модифицированных тиофосфатированных олигонуклеотидов. Лиганды, обеспечивавшие адресное воздействие, холестерин и токоферол (витамин Е), присоединяли к тиофосфатированным олигонуклеотидам через алкиленоксидную связывающую группу (тетраэтиленгликоль, ТЭГ) в соответствии со способами, описанными выше в примерах 1-116, за исключением того, что твердофазный синтез выполняли на подложках из холестерина и токоферола с присоединением ТЭГ-линкера для 3'-конъюгирования, в то время как конечное присоединение фосфорамидита позволяло получить 5'-конъюгированные олигонуклеотиды. На фиг. 3А-Д и в табл. 14 приведены структуры и сводная информация о длине последовательности, из чередующихся фрагментов А и С и о лигандах, обеспечивающих адресное воздействие, для полученных типичных модифицированных тиофосфатированных олигонуклеотидов.

Таблица 14

№	Длина	А	С	Лиганд, обеспечивающий адресное воздействие
253	Chol- (AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	5'-холестерин, 40-членный
254	(AC)20- Chol	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	3'-холестерин, 40-членный
255	Тосо- (AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	5'-токоферол, 40-членный
256	(AC)20-Тосо	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	3'-токоферол, 40-членный

Примеры 257-268.

Влияние присоединения лиганда, обеспечивающего адресное воздействие, оценивали, получив серию модифицированных тиофосфатированных олигонуклеотидов. N-ацетилгалактозамин (GalNac) присоединяли к тиофосфатированным олигонуклеотидам через различные связывающие группы посредством реакции со строительным блоком GalNac, как показано на фиг. 4А. GalNac-3 и GalNac-5-амидиты приобрели в AM Chemicals LLC и Glen Research, соответственно. GalNac-4 и GalNac-6 получили в AM Chemicals LLC. В табл. 15 приведены структуры и сводная информация о длине последовательности, из чередующихся фрагментов А и С и о лигандах, обеспечивающих адресное воздействие, для полученных типичных модифицированных тиофосфатированных олигонуклеотидов.

Таблица 15

№	Длина	А	С	Лиганд, обеспечивающий адресное воздействие
257	GalNac3ps-GalNac3ps-GalNac3po- (AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	5'-GalNac-3; 40-членный
258	(AC)20-po-GalNac3ps-GalNac3ps-GalNac3	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	3'-GalNac-3; 40-членный

259	GalNAc3ps-GalNAc3ps-GalNAc3po- (AC)20	LNA-A	LNA- (5m)C	5'-GalNAc-3; 40-членный
260	(AC)20-po-GalNAc3ps-GalNAc3ps-GalNAc3	LNA-A	LNA- (5m)C	3'-GalNAc-3; 40-членный
261	GalNAc4ps-GalNAc4ps-GalNAc4po- (AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	5'-GalNAc-4; 40-членный
262	(AC)20-po-GalNAc4ps-GalNAc4ps-GalNAc4	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	3'-GalNAc-4; 40-членный
263	GalNAc4ps-GalNAc4ps-GalNAc4po- (AC)20	LNA-A	LNA- (5m)C	5'-GalNAc-4; 40-членный
264	(AC)20-po-GalNAc4ps-GalNAc4ps-GalNAc4	LNA-A	LNA- (5m)C	3'-GalNAc-4; 40-членный
265	GalNAc5ps-GalNAc5ps-GalNAc5po- (AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	5'-GalNAc-5; 40-членный
266	(AC)20-po-GalNAc5ps-GalNAc5ps-GalNAc5	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	3'-GalNAc-5; 40-членный
267	GalNAc5ps-GalNAc5ps-GalNAc5po- (AC)20	LNA-A	LNA- (5m)C	5'-GalNAc-5; 40-членный
268	(AC)20-po-GalNAc5ps-GalNAc5ps-GalNAc5	LNA-A	LNA- (5m)C	3'-GalNAc-5; 40-членный

Примеры 269-272.

Влияние присоединения лиганда, обеспечивающего адресное воздействие, оценивали, получив серию модифицированных тиофосфатированных олигонуклеотидов. N-ацетилгалактозамин (GalNAc) присоединяли к тиофосфатированным олигонуклеотидам через связывающую группу, получая начальные олигонуклеотиды и формируя предшественник путем присоединения C₆-NH₂-связывающей группы к 5'-концу, а затем выполняя реакцию предшественника со сложным эфиром GalNAc. Последовательности синтезировали в масштабе 10 мкмоль с использованием универсальной подложки (загрузка 65 мкмоль/г). Линкер C₆-NH₂ присоединяли к 5'-концу с образованием предшественника посредством реакции с 6-(4-монометокситритиламино)гексил(2-цианэтил)(N,N-диизопропил)фосфорамидитом в 0,1M ацетонитриле с временем присоединения 10 мин. Твердые подложки, несущие тиофосфатированные олигонуклеотиды, нагревали до комнатной температуры в растворе водный аммиак/метиламин (1:1) в течение 3 ч на шейкере для отщепления продукта от подложки и снятия лабильных защитных групп с основания.

После ионообменной очистки и обессоливания предшественники растворяли в 0,2M натрий-бикарбонатном буфере, pH 8,5 (0,015 мМ), и добавляли 5-7 моль-эквивалентов сложного эфира GalNAc, растворенного в ДМСО. Структуры сложных эфиров GalNAc показаны на фиг. 4B. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Образец анализировали с целью подтверждения отсутствия предшественника. Для этого добавляли раствор аммиака в воде (28 мас. %) (5× объемов реакции) и перемешивали при комнатной температуре в течение 2-3 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении, полученный остаток растворяли в воде и очищали посредством ВЭЖХ на анионообменной колонке на основе сильного аниона.

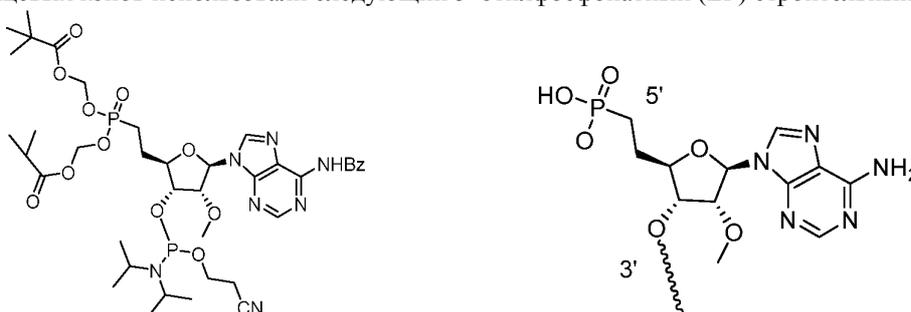
В табл. 16 приведены структуры и сводная информация о длине последовательности, из чередующихся фрагментов А и С и о лигандах, обеспечивающих адресное воздействие, для полученных типичных модифицированных тиофосфатированных олигонуклеотидов. GalNAc-1 и GalNAc-2 получали в соответствии с процедурами, описанными в J. Med. Chem. 2016 59 (6) 2718-2733 и WO 2017/021385A1, соответственно.

Таблица 16

№	Длина	А	С	Лиганд, обеспечивающий адресное воздействие
269	GalNAc1-NH-C6-po- (AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	5'-GalNAc-1; 40-членный
270	GalNAc1-NH-C6-po- (AC)20	LNA-A	LNA- (5m)C	5'-GalNAc-1; 40-членный
271	GalNAc2-NH-C6-po- (AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	5'-GalNAc-2; 40-членный
272	GalNAc2-NH-C6-po- (AC)20	LNA-A	LNA- (5m)C	5'-GalNAc-2; 40-членный

Примеры 273-281.

Влияние 5'-модификации оценивали, получив серию тиофосфатированных олигонуклеотидов в соответствии со способами, описанными выше, за исключением того, что для встраивания 5'-этилфосфонатных концевых экзпов использовали следующий 5'-этилфосфонатный (EP) строительный блок:



5'-Этилфосфонатный (5'-EP) строительный блок 5'-этилфосфонатный концевой экзп.

По отношению к фиг. 5, 5'-этилфосфонатный строительный блок получали следующим образом.

К смеси соединения 5-1 (3,0 г, 4,35 ммоль, 1 экв.) в MeOH (5 мл) добавляли Pd/C (900 мг, 72,50 мкмоль, 10% чистота) в атмосфере N₂. Суспензию дегазировали в вакууме и несколько раз продували H₂. Смесь перемешивали в атмосфере H₂ (15 фунтов/кв.дюйм) при температуре 20°C в течение 12 ч. ¹H-ЯМР и ³¹P-ЯМР продемонстрировали полное потребление соединения 5-1 с образованием желательного продукта. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали, получая [2-[(2R,3R,4R,5R)-5-(6-бензамидопурин-9-ил)-3-гидрокси-4-метокситетрагидрофуран-2-ил]этил-(2,2-диметилпропаноилоксиметокси)фосфорил]оксиметил-2,2-диметилпропаноат, соединение 5-2, (2,8 г, 4,05 ммоль, выход 93,06%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ=8,75 (s, 1H), 8,53 (s, 1H), 8,08 (d, J=7,5 Гц, 2H), 7,68 - 7,61 (m, 1H), 7,59 - 7,50 (m, 2H), 7,23 - 7,17 (m, 1H), 7,15 - 7,10 (m, 1H), 6,15 (d, J=4,2 Гц, 1H), 5,71 - 5,61 (m, 4H), 4,57 (t, J=4,7 Гц, 1H), 4,41 (t, J=5,3 Гц, 1H), 4,09 - 3,99 (m, 1H), 3,49 (s, 3H), 2,16 - 1,97 (m, 4H), 1,17 (d, J=3,5 Гц, 18 H); ³¹P ЯМР (162 МГц, CD₃CN) δ=32,91 (s, 1P).

К раствору соединения 5-2 (2,3 г, 3,33 ммоль, 1 экв.) в ДХМ (30 мл) добавляли 1H-имидазол-4,5-дикарбонитрил (589,06 мг, 4,99 ммоль, 1,5 экв.), а затем 3-бис (диизопропиламино)фосфаноилоксипропаннитрил (2,00 г, 6,65 ммоль, 2,11 экв.), и перемешивали смесь при температуре 25°C в течение 2 ч. ТСХ показала потребление большей части соединения 5-2 и образование одного крупного нового пятна. Реакционную смесь промывали H₂O (50 мл×2) и насыщенным раствором NaCl (50 мл×2), высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали, получая остаток. Остаток очищали на колонке Flash-C-18 в следующих условиях: Колонка: силикагель C18; подвижная фаза: вода и ацетонитрил (0%-70% ацетонитрила), что позволяло получить [2-[(2R,3R,4R,5R)-5-(6-бензамидопурин-9-ил)-3-[2-цианэтокси(диизопропиламино)фосфанил]окси-4-метокситетрагидрофуран-2-ил]этил-(2,2-диметилпропаноилоксиметокси)фосфорил]оксиметил-2,2-диметилпропаноат, строительный блок (5'-EP), (1,4 г, 1,53 ммоль, выход 45,88%, 97,2% чистота) в виде светло-желтого твердого вещества. ЖХ/МС (ЭР): ВУ=3,785 мин, m/z расч. для C₄₀H₆₀N₇O₁₂P₂ 892,37 [M+H]⁺, обнаруженное 892,0. ВЭЖХ: Подвижная фаза: 10 ммоль NH₄Ac в воде (растворитель C) и ацетонитрил (растворитель D), формирование градиента элюции 80%-100% (растворитель D) на 10 мин и выдерживание при 100% в течение 5 минут при скорости потока 1,0 мл/мин; колонка 30: Waters Xbridge C18 3,5 мкм, 150×4,6 мм; ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃CN) δ=δ=9,40 (s, 1H), 8,67 (s, 1H), 8,27 (d, J=1,8 Гц, 1H), 8,01 (d, J=7,5 Гц, 2H), 7,68 - 7,60 (m, 1H), 7,58 - 7,52 (m, 2H), 6,05 (dd, J=5,1, 8,4 Гц, 1H), 5,62 - 5,54 (m, 4H), 4,68 (t, J=1,8, 5,0 Гц, 1H), 4,64 - 4,55 (m, 1H), 4,25 - 4,11 (m, 1H), 3,93 - 3,66 (m, 4H), 3,40 (d, J=19,2 Гц, 3H), 2,75 - 2,67 (m, 2H), 2,14 - 1,95 (m, 4H), 1,25 - 1,20 (m, 12H), 1,15 - 1,11 (m, 18H); ³¹P ЯМР (162 МГц, CD₃CN) δ=149,95, 149,27, 32,29, 32,05.

В табл. 17 приведена сводная информация о длине последовательности, из чередующихся фрагментов A и C, количестве и типе (R или S) стереохимически заданных тиофосфатных (PS) связей и модификации LNA для полученных типичных модифицированных олигонуклеотидов с 5'-EP-концевым экзпом.

Таблица 17

№	Длина	A	C	Модификация PS	Комментарии
273	(AC)20	2'-O-Me-A	2'-OMe-(5m)C	PS	40-членный
274	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	PS	40-членный

275	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	20; 2'-OMeApsR (5m)lnC	20 R-изомер, 41- членный
276	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	19; 2'-OMeApsR (5m)lnC	19 R-изомер, 40-членный
277	(AC)20	2'-OMe-A	LNA- (5m)C	PS	40-членный Чередующиеся 2'- OMe/ LNA
278	(AC)20	2'-OMe-A LNA-A	2'-OMe- (5m)C LNA- (5m)C	PS	Каждое 3 основание представляет собой LNA
279	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C LNA- (5m)C	PS	Каждое 4 основание представляет собой LNA
280	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C LNA- (5m)C	PS	5 LNA в середине
281	(AC)20	2'-OMe-A LNA-A	2'-OMe- (5m)C LNA- (5m)C	PS	10 LNA в середине

Примеры 282-298.

На фиг. 6А описаны соединения № 282-295, полученные в соответствии с вышеописанными способами.

Примеры 296-304.

Влияние длины последовательности, встраивания LNA и встраивания РНК оценивали, получив серию тиофосфатированных олигонуклеотидов в соответствии со способами, описанными выше. Сводные результаты приведены в табл. 18.

Таблица 18

№	Длина	А	С	Модификация РНК
296	(AC)20	2'-OMe-A	LNA- (5m)C	5 РНК
297	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	7 РНК
298	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	14 РНК
299	(AC)15	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	5 РНК
300	(AC)15	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	10 РНК
301	(AC)20	LNA-A	LNA- (5m)C	7 РНК
302	(AC)20	LNA-A	LNA- (5m)C	14 РНК
303	(AC)15	LNA-A	LNA- (5m)C	5 РНК
304	(AC)15	LNA-A	LNA- (5m)C	10 РНК

Примеры 305-313.

Влияние длины последовательности, встраивания LNA и каркаса оценивали, получив серию тиофосфатированных олигонуклеотидов в соответствии со способами, описанными выше. Сводные результаты приведены в табл. 19.

Таблица 19

№	Длина	А	С	Каркас
305	(AC)20	LNA-A	LNA- (5m)C	40-членный; 20 PO; 19 PS
306	(AC)20	LNA-A	LNA- (5m)C	40-членный; 7 PO; 32 PS
307	(AC)20	LNA-A	LNA- (5m)C	40-членный; 14 PO; 25 PS
308	(AC)15	LNA-A	LNA- (5m)C	30-членный; 5 PO; 24 PS
309	(AC)15	LNA-A	LNA- (5m)C	30-членный; 10 PO; 19 PS
310	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	40-членный; 7 PO; 32 PS
311	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	40-членный; 14 PO; 25 PS
312	(AC)15	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	30-членный; 5 PO; 24 PS
313	(AC)15	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	30-членный; 10 PO; 19 PS

Примеры 314-322.

Влияние длины последовательности, встраивания LNA и этилфосфонатного концевого кэпа оценивали, получив серию тиофосфатированных олигонуклеотидов в соответствии со способами, описанными выше. Сводные результаты приведены в табл. 20.

Таблица 20

№	Длина	А	С	Модификация
314	(AC)20	2'-OMe-A	LNA-(5m)C	Этилфосфонат-A
315	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	19 R-димерный блок; Этилфосфонат-A
316	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	5 LNA, этилфосфонат-A
317	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	40-членный; каждое 4 основание представляет собой LNA Этилфосфонат-A
318	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	40-членный; каждое 3 основание представляет собой LNA Этилфосфонат-A
319	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	40-членный; этилфосфонат-A
320	(AC)18	2'-OMe-A	LNA-(5m)C	36-членный; чередующиеся 2'-OMe и LNA
321	(AC)20	2'-OMe-A LNA-A	2'-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	36-членный; каждое 3 основание представляет собой LNA
322	(AC)20	2'-OMe-A	LNA-(5m)C	36-членный; каждое 4 основание представляет собой LNA

Примеры 323-324.

Влияние встраивания LNA и фосфатного концевого кэпа оценивали, получив тиофосфатированные олигонуклеотиды в соответствии со способами, описанными выше. Сводные результаты приведены в табл. 21.

Таблица 21

№	Длина	А	С	Концевой кэп
323	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	5'-фосфат
324	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	5'-фосфат

Примеры 325-338.

Влияние уровня встраивания LNA оценивали, получив серию тиофосфатированных олигонуклеотидов в соответствии со способами, описанными выше. Сводные результаты приведены в табл. 22.

Таблица 22

№	Длина	А	С	Модификация
325	(AC)20	2'-OMe-A LNA-A	2'-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	40-членный; 75% 2'-OMe, 25% LNA

326	(AC)20	2'-OMe-A LNA-A	2'-OMe- (5m)C LNA- (5m)C	40-членный; 67,5% 2'- OMe 37,5% LNA
327	(AC)20	2'-O-MOE-A LNA-A	2'-O-MOE- (5m)C LNA- (5m)C	40-членный; 75% 2'-O- MOE, 25% LNA
328	(AC)20	2'-O-MOE-A LNA-A	2'-O-MOE- (5m)C LNA- (5m)C	40-членный; 67,5% 2'-O- MOE 37,5% LNA
329	(AC)20	2'-OMe-A LNA-A	2'-OMe- (5m)C LNA- (5m)C	40-членный; 75% LNA, 25% 2'-OMe (10-членный блок)
330	(AC)20	2'-OMe-A LNA-A	2'-OMe- (5m)C LNA- (5m)C	40-членный; 50% LNA; 50% 2'-OMe (20-членный блок)
331	(AC)20	2'-O-MOE-A LNA-A	2'-O-MOE- (5m)C LNA- (5m)C	40-членный; 75% LNA, 25% 2'-O-MOE (10- членный блок)
332	(AC)20	2'-O-MOE-A LNA-A	2'-O-MOE- (5m)C LNA- (5m)C	40-членный; 50% LNA; 50% 2'-O-MOE (20-членный блок)
333	(AC)20	LNA-A ДНК-A	LNA- (5m)C ДНК- (5m)C	40-членный; 7 ДНК
334	(AC)20	LNA-A ДНК-A	LNA- (5m)C ДНК- (5m)C	40-членный; 14 ДНК
335	(AC)20	LNA-A ДНК-A	LNA- (5m)C ДНК- (5m)C	30-членный; 5 ДНК
336	(AC)20	LNA-A ДНК-A	LNA- (5m)C ДНК- (5m)C	30-членный; 10 ДНК
337	(AC)20	LNA-A ДНК-A	LNA- (5m)C ДНК- (5m)C	40-членный; 50% LNA; 50% ДНК (10-членный ДНК-блок)
338	(AC)20	LNA-A ДНК-A	LNA- (5m)C ДНК- (5m)C	40-членный; 50% LNA; 50% ДНК (20-членный ДНК- блок)

Примеры 339-340.

Влияние встраивания ScrA и AmNA оценивали, получив тиофосфатированные олигонуклеотиды в соответствии со способами, описанными выше. Сводные результаты приведены в табл. 23.

Таблица 23

№	Длина	A	C	Модификация
339	(AC)20	2'-OMe-A	LNA- (5m)C	Один ScrA на 3'-конце, 40-членный
340	(AC)20	2'-OMe-A	LNA- (5m)C	Один AmNA на 3'-конце, 40-членный

Примеры 341-346.

Влияние встраивания GNA и UNA оценивали, получив серию тиофосфатированных олигонуклеотидов в соответствии со способами, описанными выше. Сводные результаты приведены в табл. 24.

Таблица 24

№	Длина	A	C
341	(AC)20	LNA-A	GNA- (5m)C
342	(AC)20	GNA-A	2'-OMe- (5m)C
343	(AC)20	2'-OMe-A	GNA- (5m)C
345	(AC)20	UNA-A	UNA- (5m)C
346	(AC)20	UNA-A	UNA- (5m)C

Примеры 347-350.

Влияние присоединения лиганда, обеспечивающего адресное воздействие, оценивали, получив серию модифицированных тиофосфатированных олигонуклеотидов в соответствии со способами, описан-

ными выше. Сводные результаты приведены в табл. 25.

Таблица 25

№	Длина	А	С	Модификация
347	GalNAc5ps-GalNAc5ps-GalNAc5po- (AC)20	2'-ОМе-А	LNA- (5m)C	40-членный, чередующиеся 2'-ОМе- LNA; 5'-GalNAc
348	GalNAc5ps-GalNAc5ps-GalNAc5po- (AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)C LNA- (5m)C	40-членный, каждое 4 основание представляет собой LNA; 5'-GalNAc
349	GalNAc5ps-GalNAc5ps-GalNAc5po- (AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)C LNA-А	40-членный, 5 LNA; 5'-GalNAc
350	GalNAc5ps-GalNAc5ps-GalNAc5po- (AC)20	2'-ОМе-А	LNA- (5m)C	40-членный, чередующиеся 2'-ОМе- LNA 5 PHK; 5'-GalNAc

Примеры 351-355.

Влияние присоединения лиганда-холестерина или токоферола, обеспечивающего адресное воздействие, оценивали, получив серию модифицированных тиофосфатированных олигонуклеотидов в соответствии со способами, описанными выше. Сводные результаты приведены в табл. 26.

Таблица 26

№	Длина	А	С	Лиганд, обеспечивающий адресное воздействие
351	Chol- (AC)20	2'-ОМе-А	(5m)- пропаргил-С	3'-холестерин, 40-членный
352	(AC)20- Chol	2'-ОМе-А	(5m)- пропаргил-С	3'-пальмитоил, 40-членный
353	(AC)20	3'-ОМе-А	3'-ОМе- (5m)C	3'-ОМе, 40-членный
354	(AC)20- Chol	3'-ОМе-А	3'-ОМе- (5m)C	3'-холестерин, 40-членный
355	(AC)20- Тосо	3'-ОМе-А	3'-ОМе- (5m)C	3'-токоферол, 40-членный

Примеры 356-358.

Влияние структуры концевого кэпа (метил, аллил, цитозин) оценивали, получив тиофосфатированные олигонуклеотиды в соответствии со способами, описанными выше. Сводные результаты приведены в табл. 27.

Таблица 27

№	Длина	А	С	Концевой кэп
356	(AC)20	2'-ОМе-А	LNA- (5m)C	40-членный, 4'-Ме на 5'-конце
357	(AC)20	2'-ОМе-А	LNA-А LNA- (5m)C	40-членный, 5 3'-С-аллил-А
		3'-С-аллил-А		
358	(AC)20	LNA-А	LNA- (5m)C	40-членный, Су-5 на 3'-конце

Примеры 359-362.

Влияние включения оснований G и U оценивали, получив тиофосфатированные олигонуклеотиды в соответствии со способами, описанными выше. Сводная информация о соединениях приведена в табл. 28.

Таблица 28

№	Длина	Основание 1	Основание 2	Модификация
359	(AG)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе-G	Повтор AG
360	(GA)20	2'-ОМе-G	2'-ОМе-А	Повтор GA
361	(CA)20	2'-ОМе- (5m)C	2'-ОМе-А	Повтор CA
362	(AU)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе-U	Повтор AU

Примеры 363-376.

Влияние длины последовательности оценивали, получив серию тиофосфатированных олигонуклеотидов в соответствии со способами, описанными выше. Сводная информация о соединениях приведена в табл. 29.

Таблица 29

№	Длина	А	С	Модификация
363	(AC)14	2'-ОМе-А	2'-ОМе-С	28-членный
364	(AC)15-А	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	31-членный
365	(AC)17	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	34-членный
366	(AC)18-А	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	37-членный
367	(AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе-С	20-членный
368	(AC)9	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	18-членный
369	(AC)9-А	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	19-членный
370	(AC)10	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	20-членный
371	(AC)9-А	LNA-А	LNA- (5m)С	19-членный
372	(AC)9	LNA-А	LNA- (5m)С	18-членный
373	(AC)15	LNA-А	LNA- (5m)С	30-членный
374	(AC)12-А	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	25-членный
375	(AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С	40-членный, 5 S-изомеров
376	(AC)10	LNA-А	LNA- (5m)С	20-членный

Примеры 377-380 и 384.

Влияние встраивания РНК оценивали, получив серию тиофосфатированных олигонуклеотидов в соответствии со способами, описанными выше. Сводные результаты приведены в табл. 30.

Таблица 30

№	Длина	А	С	Модификация
377	(AC)20	2'-ОМе-А Рибо-А	LNA- (5m)С	40-членный, 4 РНК
378	(AC)20	2'-ОМе-А Рибо-А	LNA- (5m)С	40-членный, 3 РНК
379	(AC)20	2'-ОМе-А Рибо-А	LNA- (5m)С	40-членный, 2 РНК
380	(AC)20	2'-ОМе-А UNA-А	2'-ОМе- (5m)С UNA- (5m)С	40-членный, 4-членные блоки из 2'-ОМе и UNA
384	(AC)20	2'-ОМе-А Рибо-А	LNA- (5m)С	40-членный, 1 РНК

Примеры 381-383.

Влияние встраивания 4etl (4-этил-LNA) оценивали, получив серию тиофосфатированных олигонуклеотидов в соответствии со способами, описанными выше. Мономеры 4etl получали в соответствии с известными способами (Seth, P.P., J. Org. Chem. 2010, 75, (5), 1569-1581). Сводные результаты приведены в табл. 31.

Таблица 31

№	Длина	А	С	Модификация
381	(AC)20	4etl-А	4etl- (5m)С	40-членный, 100% 4etl
382	(AC)20	2'-ОМе-А	4etl- (5m)С	40-членный, 50% 4etl
383	(AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)С 4etl- (5m)С	40-членный, 25% 4etl

Примеры 385-389.

Влияние встраивания nmLNA (N-метил-LNA) А и С оценивали, получив серию тиофосфатированных олигонуклеотидов в соответствии со способами, описанными выше. Мономеры nmLNA получили из коммерческих источников (Bio-Synthesis Inc., Льюисвилл, штат Техас, США). Сводные результаты приведены в табл. 32.

Таблица 32

№	Длина	А	С	Модификация
385	(AC)20	2'-ОМе-А nmLNA-А	LNA- (5m)C	40-членный, 1 nmLNA
386	(AC)20	2'-ОМе-А nmLNA-А	LNA- (5m)C	40-членный, 3 nmLNA
387	(AC)20	2'-ОМе-А nmLNA-А	LNA- (5m)C nmLNA (5m)-C	40-членный, 3 nmLNA
388	(AC)20	2'-ОМе-А	LNA- (5m)C nmLNA (5m)-C	40-членный, 3 nmLNA
389	(AC)20	2'-ОМе-А nmLNA-А	LNA- (5m)C nmLNA (5m)-C	40-членный, 4 nmLNA

Примеры 390-392.

Влияние встраивания AmNA и Scp-BNA А и С оценивали, получив серию тиофосфатированных олигонуклеотидов в соответствии со способами, описанными выше. Сводные результаты приведены в табл. 33 (также см. табл. 23).

Таблица 33

№	Длина	А	С	Модификация
390	(AC)20	2'-ОМе-А	AmNA- (5m)C	40-членный, 20 AmNA (50%)
391	(AC)20	2'-ОМе-А	2'-ОМе- (5m)C Scp- (5m)C	40-членный, 10 scp- BNA (25%)
392	(AC)20	2'-ОМе-А Scp-А	2'-ОМе- (5m)C	40-членный, 5 scp- BNA (12,5%)

Пример В1.

Анализ секреции hbsag и анализ цитотоксичности.

Независимую от последовательности активность против вируса гепатита В (определяемую с помощью анализа секреции HBsAg) и цитотоксичность ряда типичных модифицированных олигонуклеотидов определяли, как описано ниже; сводные данные о них приведены в табл. 34-35 и на фиг. 6А и 6В.

Протокол анализа высвобождения HBsAg.

Культура клеток.

Клетки HepG2.2.15 поддерживали в среде DMEM с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) и 1% пенициллина/стрептомицина, 1% глутамина, 1% неосновных аминокислот, 1% пирувата натрия и 380 мкг/мл G418. Клетки поддерживали при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Анализ секреции HBsAg.

Клетки HepG2.2.15 растили в среде DMEM, как описано выше. Клетки высевали в концентрации 45000 клеток/луночку в 96-луночные планшеты, покрытые коллагеном-I. Непосредственно после внесения клеток добавляли тестируемые соединения.

Выбранные соединения также можно было тестировать после трансфекции с Lipofectamine® RNAiMAX. Реагент для трансфекции Lipofectamine® RNAiMAX (Thermo Fisher) использовали в соответствии с инструкциями производителя.

50% ингибирующую концентрацию (EC₅₀) и 50% цитотоксическую концентрацию (CC₅₀; см. ниже) оценивали путем растворения в 1× PBS до 100× желательной конечной тестируемой концентрации. Каждое соединение последовательно разбавляли (1:3), получая до 8 различных концентраций до 10× желательной конечной тестируемой концентрации в среде DMEM с 10% FBS. 10-мкл образец соединений в 10× концентрации в среде для культивирования клеток использовали для обработки клеток HepG2.2.15 в 96-луночном формате. Вначале клетки инкубировали с соединениями в течение 3 дней при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Через трое суток после добавления соединения/трансфекции среду и соединение заменяли свежими средой/соединением с RNAiMax и инкубировали в течение еще 3 суток; общее время инкубирования составило 6 суток. Для количественного определения HBsAg собирали как супернатант, так и лизат клеток (см. ниже).

Секретируемый HBsAg количественно измеряли, используя набор для твердофазного ИФА HBsAg (Autobio-CL0310).

EC₅₀, концентрацию лекарственного средства, необходимую для снижения секреции HBsAg на 50% по сравнению со значением для необработанных контрольных клеток рассчитывали по графику процентного снижения уровня HBsAg от концентрации лекарственного вещества с использованием Microsoft Excel (функция прогноза).

Получали параллельный набор планшетов, которые планировали использовать для тестирования цитотоксичности, индуцированной соединением (см. ниже).

Анализ цитотоксичности.

Клетки HepG2.2.15 культивировали и обрабатывали, как указано выше. На 6 день измеряли цитотоксичность с использованием анализа пролиферации клеток (анализ жизнеспособности люминесцирующих клеток CellTiter-Glo; Promega) в соответствии с инструкциями производителя или подходящего альтернативного способа.

CC₅₀, концентрацию лекарственного средства, необходимую для снижения жизнеспособности клеток на 50% по сравнению со значением для необработанных контрольных клеток рассчитывали по графику процентного уменьшения количества жизнеспособных клеток от концентрации лекарственного вещества с использованием Microsoft Excel (функция прогноза).

Таблица 34. Эффективность и цитотоксичность

№ соединения	EC₅₀ (мкМ)	CC₅₀ (мкМ)
3	В	А
6	А	В
8	В	А
9	А	А
10	А	А
12	А	А
13	В	А
18	С	А

045960

20	B	B
23	B	B
26	C	A
34	B	A
36	B	A
38	A	A
39	B	C
44	A	A
45	A	A
63	B	A
97	B	A
98	B	A
99	B	A
105	B	A
106	B	A
120	C	A
121	B	A
122	B	A
127	B	A
128	D	A
129	D	A
130	B	A
134	A	A
142	C	A
147	D	A
148	D	A
149	B	A
150	A	A
151	D	A
152	D	A
153	B	A
158	B	A
159	C	A
178	A	A
179	A	A
180	A	A
182	A	A
183	A	A
184	A	A
190	B	A
191	B	A
192	A	A
199	B	A
200	C	A

201	B	A
202	B	A
204	B	A
205	B	A
220	C	A
221	A	A
223	C	A
235	D	B
236	D	B
237	A	B
238	D	A
239	D	A
240	B	A
241	B	A
242	A	A
243	A	A
244	C	A
245	D	A

Эффективность: A: ≥ 5 -кратно более высокая по сравнению с (2'-ОМе-А; 2'-ОМе-С); B: ≥ 2 -кратно более высокая по сравнению с (2'-ОМе-А; 2'-ОМе-С) и < 5 -кратно более высокая по сравнению с (2'-ОМе-А; 2'-ОМе-С); C: более высокая или равная по сравнению с (2'-ОМе-А; 2'-ОМе-С) и < 2 -кратно более высокая по сравнению с (2'-ОМе-А; 2'-ОМе-С); D: более низкая по сравнению с (2'-ОМе-А; 2'-ОМе-С).

Цитотоксичность: A: ≥ 2 мкМ; B: < 2 мкМ.

Таблица 35. Эффективность и цитотоксичность

№ соединения ¹	EC ₅₀	CC ₅₀
6, 274, 283	A	B
376	D	A
371	D	A
372	D	A
273, 282	D	A
367	C	A
368	D	A
369	D	A
370	D	A
345	B	A
346	A	A
351	D	B

045960

352	D	B
373	B	B
308	C	A
239	D	A
235	D	B
236	D	B
237	A	B
301	A	B
303	B	B
305	C	A
315	C	A
309	D	B
297	C	A
298	D	A
300	D	A
312	D	A
313	D	A
299	D	A
304	D	A
302	D	A
307	D	A
375	B	A
201	C	A
202	C	A
203	B	A
204	D	A
205	D	A
353	B	A
351	D	A
352	D	A
178	A	A
179	A	A
180	C	A
182	A	A
183	D	A
184, 290	A	A
177	B	A
374	D	A
363	D	A
364	D	A

045960

365	D	A
366	D	A
238	D	A
240	B	A
241	B	A
242	A	A
243	A	A
130	A	A
380	D	A
310	D	A
311	D	A
254	D	A
325	D	A
326	D	A
327	D	A
328	D	A
158	B	A
150	A	A
159	C	A
341	D	A
342	B	A
244	C	A
245	C	A
343	B	A
329	C	A
330	B	B
331	D	A
332	D	A
333	B	A
334	B	A
335	C	A
336	C	A
337	A	B
338	B	B
117	B	A
118	B	A
134, 277, 284	A	A
142	C	A
190	B	A
191	B	A

045960

192	B	A
210	B	A
211	B	A
212	B	A
218	C	A
223	C	A
221	A	A
127	D	A
128	C	A
129	C	A
120	B	A
121	B	A
122	A	A
181	C	A
147	D	A
148	D	A
149	B	A
151	D	A
152	D	A
153	B	A
294	B	A
276, 291	A	A
275, 295	A	B
173, 293	A	A
165, 287	B	A
167, 289	B	A
164, 286	C	A
166, 288	A	A
171, 280, 292	B	A
314	A	B
281, 316	A	A
296	A	A
285	A	B
251	A	A
356	A	A
320	A	A
321	A	B
322	B	A
317	A	B
318	B	B

319	A	B
357	A	A
339	A	A
252	A	A
340	A	A
250	A	A
359	D	A
360	D	A
361	D	A
362	D	A
12	A	A
20	B	A
38	A	A
385	A	A
386	A	A
387	A	A
388	A	A
389	A	A
376	A	A
377	A	A
378	A	A
379	A	A
384	A	A
381	A	A
382	A	A
383	B	A
390	A	B
391	A	B
392	B	B

¹Ряду соединений, описанных в настоящем документе, присвоено более одного номера соединения, как описано в настоящем документе.

Эффективность: A: $EC_{50} < 30$ нМ; B: $EC_{50} \geq 30$ нМ и $EC_{50} < 100$ нМ; C: $EC_{50} \geq 100$ нМ и $EC_{50} < 300$ нМ; D: $EC_{50} > 300$ нМ.

Цитотоксичность: A: $CC_{50} \geq 1000$ нМ; B: $CC_{50} < 1000$ нМ.

Пример В2.

Анализ реальной инфекции.

Клетки HepG2-NTCP поддерживали в среде DMEM/F12 с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) и 1% пенициллина/стрептомицина, 1% глутамина, 1% неосновных аминокислот, 1% пирувата натрия. Клетки поддерживали при 37°C атмосфере 5% CO₂.

Клетки HepG2-NTCP ресуспендировали в вышеупомянутой среде и высевали в концентрации 15000 клеток/лунку в 96-луночные планшеты, покрытые коллагеном-I. На вторые сутки (день 0) клетки инфицировали ВГВ (очищенным ВГВ из клеток HepAD38) из расчета множественности заражения 200 (гэ) в присутствии 4% ПЭГ8000 и 2% ДМСО и инкубировали при температуре 37°C в течение ночи. Инокулят обрабатывали вакуумом, клетки трижды промывали DMEM/F12 с 2% FBS, а затем среду заменяли средой HepG2-NTCP.

Клетки обрабатывали на 5 сутки. На 5 сутки тестируемые соединения 3-кратно разбавляли средой Opti-MEM I и смешивали с реагентом для трансфекции Lipofectamine® RNAiMAX, следуя инструкции производителя. После замены среды на 8 сутки выполняли трансфекцию тестируемых соединений в соответствии с описанием. После инкубирования в течение еще 3 суток собирали супернатант и измеряли HBsAg с помощью твердофазного ИФА (Diasino). Жизнеспособность клеток измеряли с помощью CellTiter-Glo (Promega).

EC_{50} , концентрацию лекарственного средства, необходимую для снижения секреции HBsAg на 50% по сравнению со значением для необработанных контрольных клеток рассчитывали по графику процентного снижения уровня HBsAg от концентрации лекарственного вещества с использованием функции прогноза Microsoft Excel или GraphPad Prism; сводные данные о ней приведены в табл. 36.

Таблица 36. Эффективность и цитотоксичность

№ соединения	EC ₅₀	CC ₅₀
6, 274, 283	A	A
273, 282	C	A
315	D	A
290	A	A
184		
134, 277, 284	A	A
192	A	A
221	A	A
294	C	A
291	A	A
276		
295	B	A
275		
173, 293	B	A
165, 287	A	A
167, 289	B	A
164, 286	B	A
166, 288	B	A
171, 280, 292	B	A
314	A	A
281, 316	C	A
296	A	A
285	A	A
251	B	A
356	A	A
320	A	A

Эффективность: A: EC₅₀ < 30 нМ; B: EC₅₀ ≥ 30 нМ и EC₅₀ < 100 нМ; C: EC₅₀ ≥ 100 нМ и EC₅₀ < 300 нМ; D: EC₅₀ > 300 нМ.

Цитотоксичность: A: CC₅₀ ≥ 1000 нМ; B: CC₅₀ < 1000 нМ.

Пример В3.

Анализ секреции HBsAg для комбинаций.

Независимую от последовательности активность против вируса гепатита В (определяемую с помощью анализа секреции HBsAg) типичных модифицированных олигонуклеотидных соединений в комбинациях с антисмысловыми олигонуклеотидами (ASO) определяли, как описано ниже; сводные данные приведены в табл. 37.

Культура клеток.

Клетки HepG2 2.15 поддерживали в среде DMEM/F12 с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) и 1% пенициллина/стрептомицина, 1% глутамина, 1% неосновных аминокислот, 1% пирувата натрия. Клетки поддерживали при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Анализ секреции HBsAg.

Клетки HepG2.2.15 растили в среде DMEM/F12, как описано выше. Клетки высевали в концентрации 35000 клеток/лунку в 96-луночные планшеты, покрытые коллагеном-I. Непосредственно после внесения клеток добавляли тестируемые соединения. Выполняли двойную трансфекцию в 0 и 3 сутки.

Способ трансфекции.

Трансфекция с Lipofectamine® RNAiMAX. Реагент для трансфекции Lipofectamine® RNAiMAX (Thermo Fisher, № в каталоге: 13778-150) использовали в соответствии с инструкциями производителя.

A: смешивали RNAiMAX (0,3 мкл/лунку для 96-луночных планшетов) с Opti-MEM I (с 20% избытком), инкубировали в течение 5 мин при к.т.

B: разбавляли комбинации ASO и модифицированных олигонуклеотидов в Opti-MEM I, получая 40× конечную концентрацию (8 точек, 3-кратное разбавление, включая концентрации 0 нМ). Максимальная концентрация приблизительно в 100-200 раз превышала значение EC₅₀. Затем смешивали равные объемы разбавленных соединения 1 и соединения 2 в противоположном направлении, как показано на графике, изображенном на фиг. 23.

Смешивали A и B в равных объемах (с 20% избытком объема), инкубировали еще в течение 5-10 мин. Затем добавляли смесь A и B в соотношении 1/10 от конечного объема культуры в каждую лунку и вручную вращали планшет в течение 10 с. Планшеты получали по меньшей мере в трех повторностях. Инкубировали при 37°C в течение 3 суток, меняли среду на свежую, повторяли процесс трансфекции. На 6 сутки после обработки собирали супернатант для твердофазного ИФА, измеряли жизнеспособность

клеток с помощью CellTiter-Glo (Promega).

Анализ данных.

Для анализа синергизма рассчитывали процент снижения HBsAg (или ДНК) для каждой лунки. Процент снижения=(1-лунка/среднее для контроля без лекарственного вещества)×100. Эти числа вводили в программное обеспечение MacSynergy II и получали объем синергизма/антагонизма, следуя инструкции к программному обеспечению.

Объем синергизма <25 указывал на отсутствие синергизма/антагонизма.

Объем синергизма 25-50 указывал на незначительный синергизм/антагонизм.

Объем синергизма 50-100 указывал на умеренный синергизм/антагонизм.

Объем синергизма > 100 указывал на сильный синергизм/антагонизм.

Объем синергизма > 1000 указывал на возможную ошибку (требовалась проверка данных).

Процент жизнеспособности клеток=(лунка/среднее для контроля без лекарственного вещества)×100.

Цитотоксичность отслеживали, как описано ранее. Количественное определение HBsAg.

Секретируемый HBsAg количественно измеряли, используя набор для твердофазного ИФА HBsAg (Autobio-CL0310). Значения синергизма для комбинаций модифицированных олигонуклеотидов с ASO приведены в табл. 37.

Таблица 37. Синергизм комбинаций

№ соединения	ASO ¹	95% объем синергизма HBsAg
166, 288	ASO-1	335,08
134, 277, 284	ASO-2	52,98
296	ASO-2	43,05

¹ASO-1 представлял собой неконъюгированный ASO ВГВ SS0-1, описанный в источнике Javanbakht, H. et al. Molecular Therapy: Nucleic Acids Vol. 11 June 2018, обладавший следующей структурой: 5-InApsInGpsIn (5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps (5m)CpsAps (5m)CpsApsIn (5m)CpsInGpsInG-3. ASO-2 представлял собой ASO, обладавший структурой, описанной для ASO, названного последовательностью № 9 в заявке США с серийным номером 62/855793, полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки, в частности, в целях описания структуры последовательности № 9.

Пример В4.

Анализ секреции HBSAG для комбинаций.

Независимую от последовательности активность против вируса гепатита В (определяемую с помощью анализа секреции HBsAg) типичных модифицированных олигонуклеотидных соединений в комбинациях с ASO, модуляторами сборки капсида (соединением CAM 1 или соединением CAM 2) или аналогом нуклеозида (энтекавир, ETV) определяли, как описано ниже; сводные данные приведены в табл. 38.

Культура клеток.

В следующей процедуре анализа описана активность против ВГВ. В этом анализе использовали клетки HepG2.2.15, трансфицированные геномом ВГВ, и количественное определение внеклеточной ДНК ВГВ в качестве конечного показателя. Жизнеспособность клеток оценивали параллельно с измерением внутриклеточного содержания АТФ с использованием реагента CellTiter-Glo® производства Promega.

Анализ секреции HBsAg.

Клетки HepG2.2.15 растили в среде DMEM/F12, как описано выше. Клетки высевали в концентрации 35000 клеток/лунку в 96-луночные планшеты, покрытые коллагеном-I. Непосредственно после внесения клеток добавляли тестируемые соединения. Выполняли двойную трансфекцию в 0 и 3 сутки.

Количественный анализ ДНК ВГВ.

Внеклеточную ДНК выделяли с помощью набора QIAamp 96 DNA Blood Kit согласно руководству производителя. Затем ДНК ВГВ количественно анализировали посредством кПЦП с ВГВ-специфичными праймерами и зондами, указанными ниже, с использованием универсального мастер-микса FastStart производства Roche на ABI-7900HT. Программа ПЦП-цикла состояла из 95°C в течение 10 мин с последующими 40 циклами при 95°C в течение 15 с и 60°C в течение 1 мин.

Элементы	Название	Последовательность (5' → 3')
Праймер ВГВ	Прямой праймер ВГВ	GTGTCTGCGGCGTTTTATCA
	Обратный праймер ВГВ	GACAAACGGGCAACATACCTT
Зонд ВГВ	Зонд ВГВ	FAM-CCTCTKCATCCTGCTGCTATGCCTCATC-TAMRA

Способ трансфекции.

Трансфекция с Lipofectamine® RNAiMAX. Реагент для трансфекции Lipofectamine® RNAiMAX (Thermo Fisher, № в каталоге: 13778-150) использовали в соответствии с инструкциями производителя.

А: смешивали RNAiMAX (0,3 мкл/лунку для 96-луночных планшетов) с Opti-MEM I (с 20% избыт-

ком), инкубировали в течение 5 мин при к.т.

В: разбавляли комбинации CAM, ASO и ETV с модифицированными олигонуклеотидами в Opti-MEM I, получая 40× конечную концентрацию (8 точек, 3-кратное разбавление, включая концентрации 0 нМ). Максимальная концентрация приблизительно в 100-200 раз превышала значение EC₅₀. Затем смешивали равные объемы разбавленного соединения 1 и соединения 2 в противоположном направлении, как показано на графике, изображенном на фиг. 23.

Смешивали А и В в равных объемах (с 20% избытком объема), инкубировали еще в течение 5-10 мин. Затем добавляли смесь А и В в соотношении 1/10 от конечного объема культуры в каждую лунку и вручную вращали планшет в течение 10 с. Планшеты получали по меньшей мере в трех повторностях. Инкубировали при температуре 37°C в течение 4 ч, а затем добавляли ASO, ETV или CAM и давали клеткам восстановиться после трансфекции. На 3 сутки после обработки собирали супернатант для твердофазного ИФА, измеряли жизнеспособность клеток с помощью CellTiter-Glo (Promega).

Анализ данных.

Данные о синергизме анализировали, как описано выше в примере В3.

Количественное определение HBsAg.

Секретируемый HBsAg количественно измеряли, используя набор для твердофазного ИФА HBsAg (Autobio-CL0310). Значения синергизма для комбинаций модифицированных олигонуклеотидов с ASO приведены в табл. 38.

Таблица 38. Синергизм комбинаций

№ соединения	ASO, CAM или ETV ¹	ДНК ВГВ	95% объем синергизма ДНК ВГВ
166, 288	ASO-1	Аддитивность	23,99
134, 277, 284	ETV	Синергизм	25,91
134, 277, 284	Соединение CAM 1	Аддитивность	1,35
134, 277, 284	Соединение CAM 2	Синергизм	41,86

Соединение CAM 1 представляло собой CAM, обладавший структурой, описанной для соединения CAM, названного соединением 3 в заявке WO 2017/181141, полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки, в частности в целях описания структуры соединения 3. Соединение CAM 2 представляло собой CAM, обладавший структурой, описанной для соединения CAM, названного соединением 1 в заявке США с последовательным номером 62/805725, полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки, в частности, в целях описания структуры соединения 1. ASO-1 описан выше в табл. 37.

Пример В5. Воздействие на печень приматов, не являющихся человеком.

Конечные значения воздействия на печень приматов, не являющихся человеком, оценивали путем введения типичных модифицированных олигонуклеотидных соединений самкам яванских макаков внутривенным (в/в) или подкожным (п/к) путем. Для в/в пути соединение вводили в среде-носителе - стерильном физиологическом растворе с фосфатным буфером (PBS) и вливали в течение 2 ч в дозировке 1 мл/кг. Для подкожного введения среда-носитель также представляла собой стерильный PBS, а соединение вводили путем разового болюса в дозировке 1 мл/кг. В группах дозы было по два животных, показанные данные представляют собой среднее значение по этим двум животным. Уровни в печени определяли в момент времени, соответствовавший 24 ч. Дозы, использованные для данного исследования, и полученные данные показаны на фиг. 12. Неожиданно оказалось, что воздействие на печень после подкожного введения приматам, не являющимся человеком, значительно превышает уровень, ожидаемый на основе уровней воздействия на печень при внутривенном введении дозировки, сопоставимой в иных отношениях.

Пример В6.

Анализ МПК.

Влияние типичных модифицированных олигонуклеотидных соединений на высвобождение цитокинов из мононуклеаров периферической крови (МПК) оценивали, как описано ниже; сводная информация приведена в табл. 39 и на фиг. 13-22.

Лейкоцитарную массу (N=3) получали из Стэнфордского центра крови и обрабатывали для выделения МПК в соответствии со стандартным протоколом Agagen с использованием центрифугирования в градиенте плотности фиколла. МПК (1 миллион/мл) суспендировали в полной культуральной среде (RPMI с добавлением 10% термически инактивированной FBS с низким содержанием IgG и PSG) и помещали в 96-луночный круглодонный планшет из расчета 100 мкл/лунку. МПУ обрабатывали тестируемыми соединениями (перечисленными на следующем слайде) (диапазон концентраций: от 10 до 0 мкМ - 3-кратное разбавление) и РНА и полиIC (диапазон концентраций: от 10 до 0 мкМ -3-кратное разбавление). Все эксперименты выполняли в трех повторностях. После 24-часового инкубирования при темпера-

туре 37°C/5%CO₂ в увлажняемом стандартном инкубаторе для культивирования клеток собирали супернатанты и хранили их при -80°C до анализа цитокинов. Цитокины (ГМКСФ, ИЛ-1b, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-8, ИЛ-12p70, ИФН γ , ФНО α) тестировали на Intellicyt iQue Screener и анализировали с использованием аналитического программного обеспечения ForeCyt. Цитокин (ИФН α) анализировали с помощью стандартного твердофазного ИФА. Результаты выражены в значениях в пг/мл, рассчитанных на основе стандартной кривой.

Таблица 39

№ соединения	Фиг. №	Иммунная реакция ¹
Контроль РНА	13	Сильная
REP-2139	14	Слабая
171, 280, 292	15	Слабая
296	16	Отсутствует
134, 277, 284	17	Слабая
166, 288	18	Отсутствует
167, 289	19	Отсутствует
281, 316	20	Отсутствует
294	21	Слабая
276, 291	22	Слабая

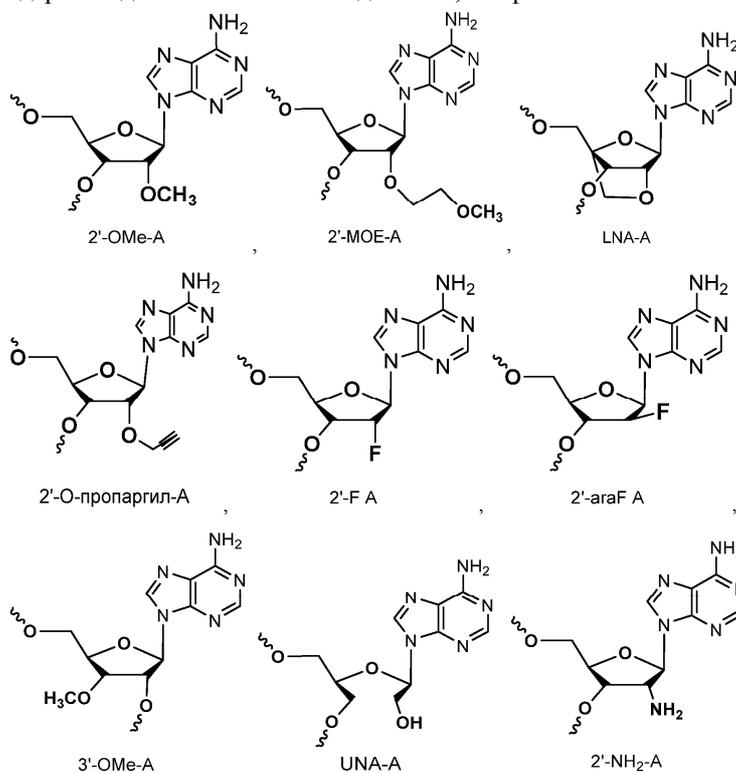
Сильная: значимая индукция, наблюдаемая более чем для двух типов цитокинов протестированной панели;

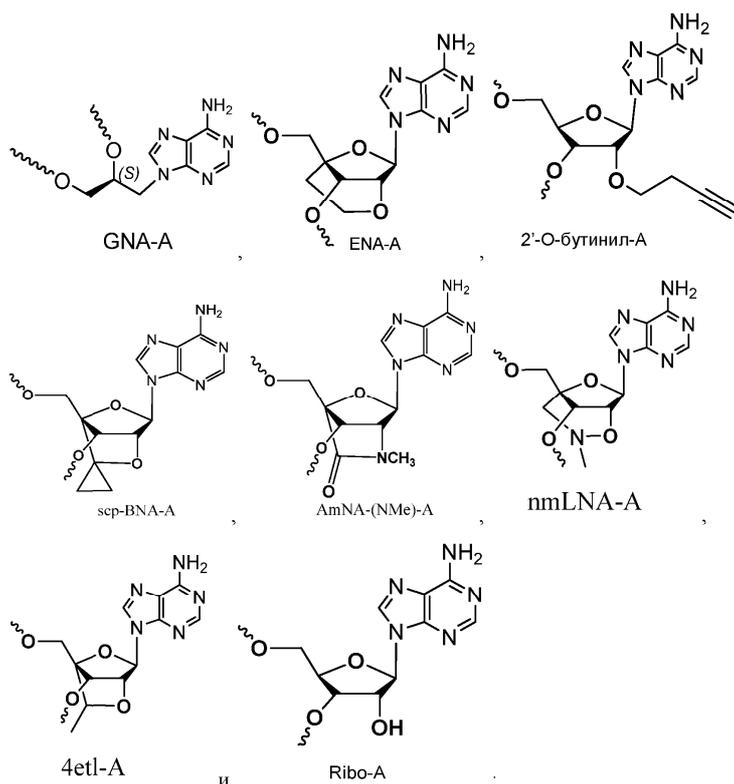
слабая: индукцию наблюдали для одного или двух типов цитокинов протестированной панели;

отсутствует: ни для одного цитокина протестированной панели не наблюдали индукции.

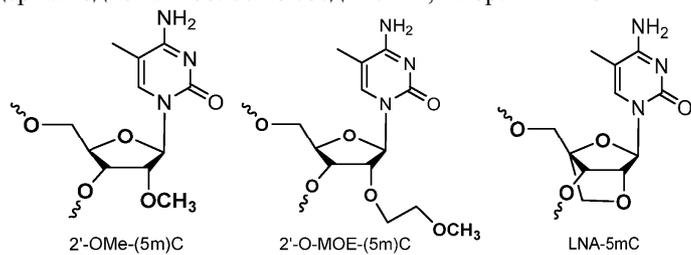
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

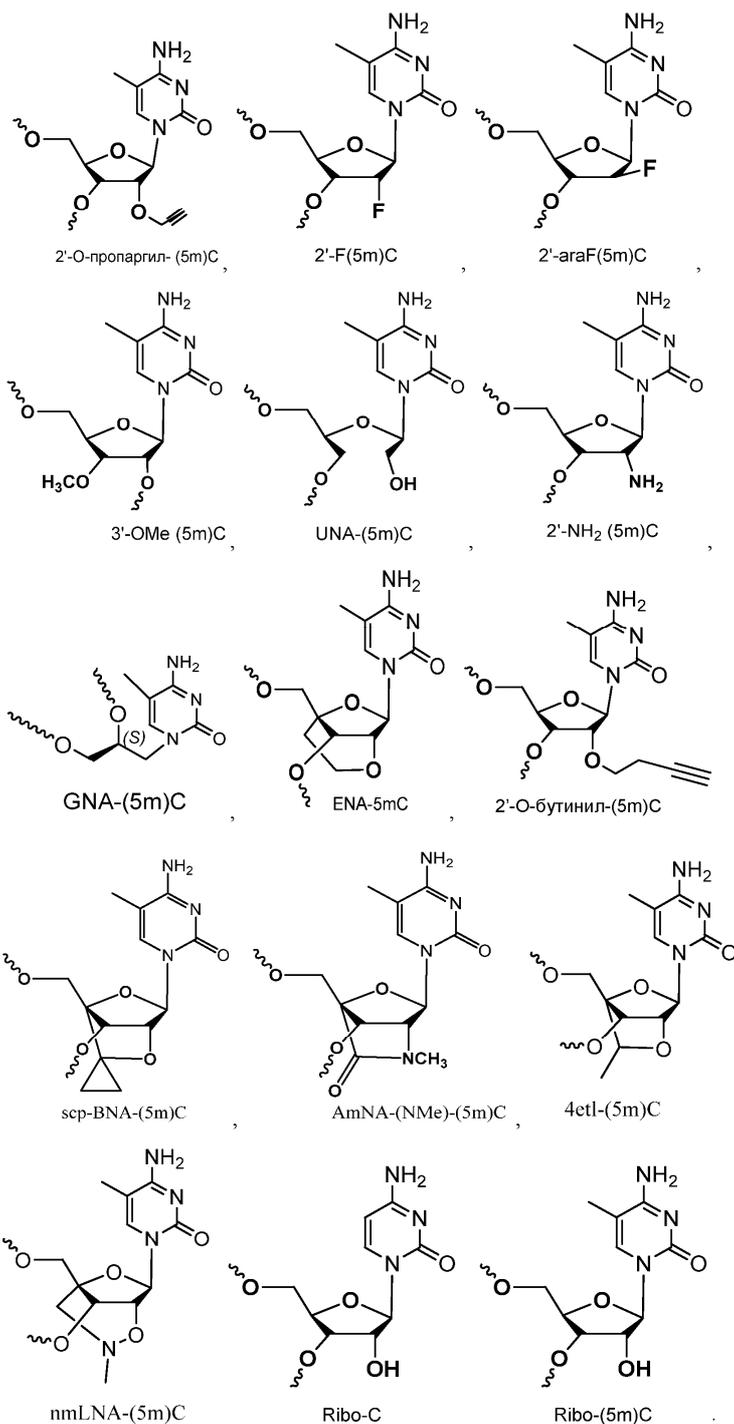
1. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс, обладающий независимой от последовательности активностью против вируса гепатита В, содержащий по меньшей мере частично тиофосфатированную последовательность из чередующихся фрагментов А и С, причем фрагменты А содержат одно или более из соединений, выбранных из





фрагменты С содержат одно или более из соединений, выбранных из





каждая концевая группа $\sim\text{O}$ независимо представляет собой гидроксил, O,O-дигидротиофосфат, дигидрофосфат, концевой кэп или связывающую группу;

каждая внутренняя группа $\sim\text{O}$ представляет собой фосфорсодержащую связь с соседним фрагментом А или С, причем указанная фосфорсодержащая связь представляет собой тиофосфатную связь или модифицированную связь, выбранную из фосфодиэфирной, дитиофосфатной, метилфосфонатной, тиодифосфатной, 5'-фосфорамидатной, 3',5'-фосфордиамидатной, 5'-тиофосфорамидатной, 3',5'-тиофосфордиамидатной или дифосфодиэфирной связи; и

независимая от последовательности активность против вируса гепатита В, определяемая с помощью анализа секреции HBsAg, превышает активность референсного соединения, причем указанное референсное соединение представляет собой тиофосфатированный 40-членный АС-олигонуклеотид, известный как REP 2139;

при том условии, что если последовательность из чередующихся фрагментов А и С содержит фрагмент рибо-А, то указанная последовательность дополнительно содержит по меньшей мере один фрагмент А, не являющийся фрагментом рибо-А; и

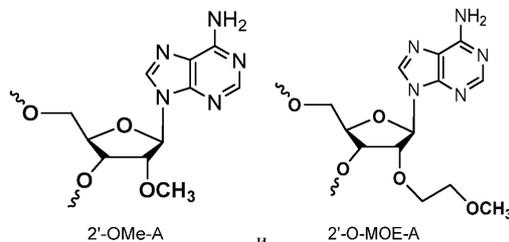
при том условии, что если последовательность из чередующихся фрагментов А и С содержит фрагмент рибо-С, то указанная последовательность дополнительно содержит по меньшей мере один фрагмент С, не являющийся фрагментом рибо-С; и

при этом указанная последовательность из чередующихся фрагментов А и С имеет длину последовательности в диапазоне от 36 фрагментов до 44 фрагментов;

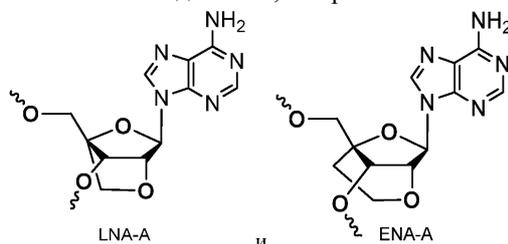
фрагменты А содержат по меньшей мере 15 фрагментов 2'-ОМе-А; и

фрагменты С содержат по меньшей мере 3 фрагмента LNA-5mC.

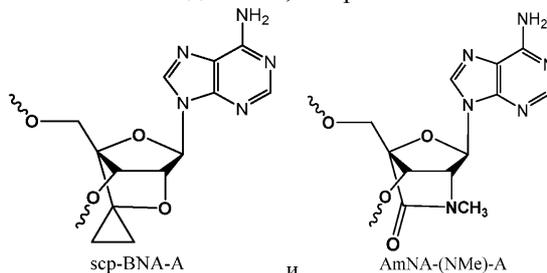
2. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.1, отличающийся тем, что фрагмент А представляет собой одно или более из соединений, выбранных из



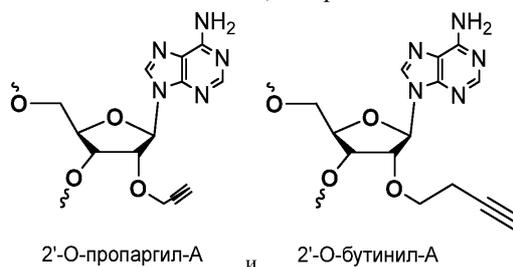
3. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.1, отличающийся тем, что фрагмент А представляет собой одно или более из соединений, выбранных из



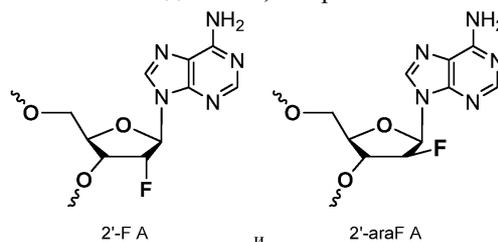
4. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.1, отличающийся тем, что фрагмент А представляет собой одно или более из соединений, выбранных из



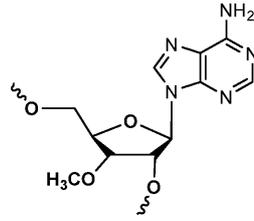
5. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.1, отличающийся тем, что фрагмент А представляет собой одно или более из соединений, выбранных из



6. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.1, отличающийся тем, что фрагмент А представляет собой одно или более из соединений, выбранных из

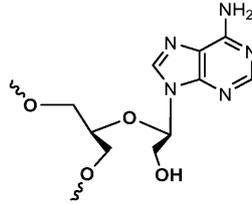


7. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.1, отличающийся тем, что по меньшей мере один из фрагментов А представляет собой



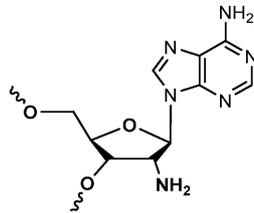
3'-OMe-A

8. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.1, отличающийся тем, что по меньшей мере один из фрагментов А представляет собой

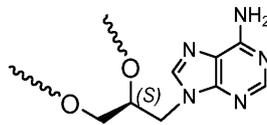


UNA-A

9. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.1, отличающийся тем, что по меньшей мере один из фрагментов А представляет собой

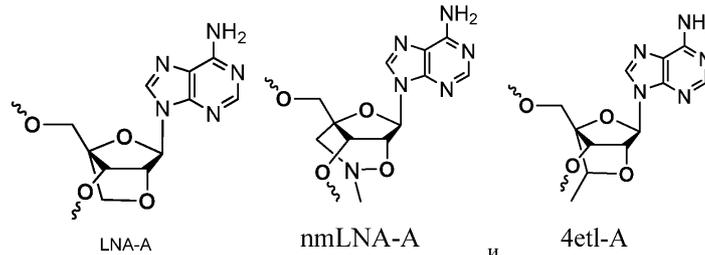
2'-NH₂-A

10. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.1, отличающийся тем, что по меньшей мере один из фрагментов А представляет собой



GNA-A

11. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.1, отличающийся тем, что фрагмент А представляет собой одно или более из соединений, выбранных из

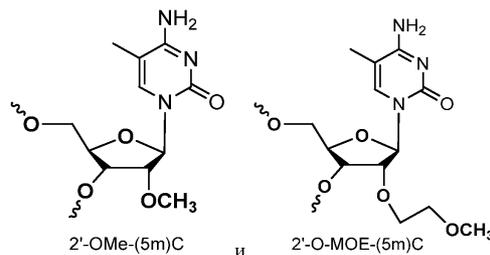


LNA-A

nmLNA-A

и 4etl-A

12. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что фрагмент С представляет собой одно или более из соединений, выбранных из

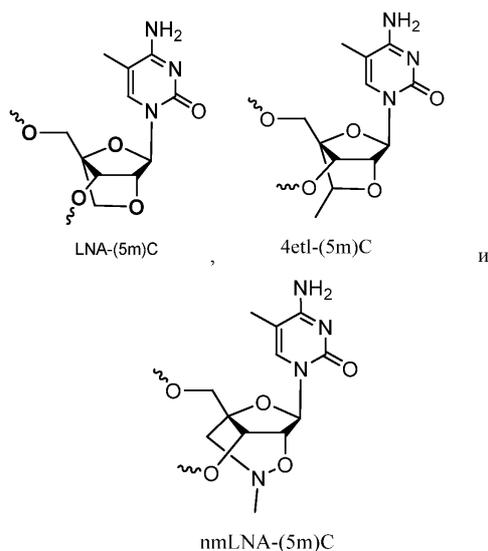


2'-OMe-(5m)C

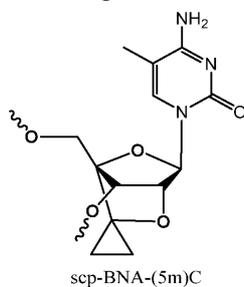
и

2'-O-MOE-(5m)C

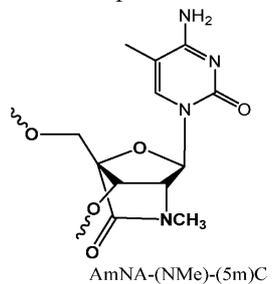
13. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что фрагмент С представляет собой одно или более из соединений, выбранных из



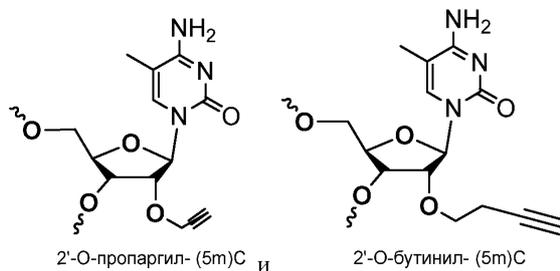
14. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что по меньшей мере один из фрагментов С представляет собой



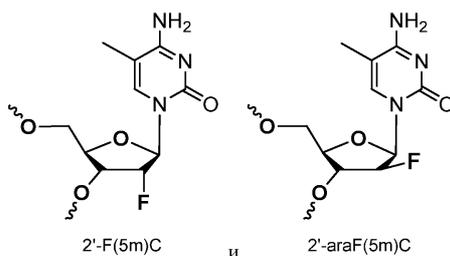
15. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что по меньшей мере один из фрагментов С представляет собой



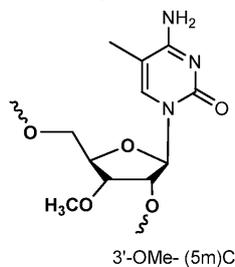
16. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что фрагмент С представляет собой одно или более из соединений, выбранных из



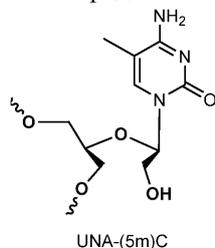
17. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что фрагмент С представляет собой одно или более из соединений, выбранных из



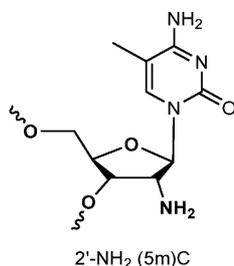
18. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что по меньшей мере один из фрагментов С представляет собой



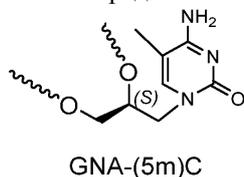
19. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что по меньшей мере один из фрагментов С представляет собой



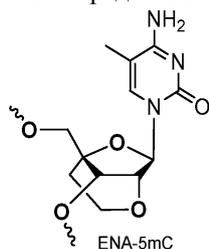
20. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что по меньшей мере один из фрагментов С представляет собой



21. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что по меньшей мере один из фрагментов С представляет собой



22. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что по меньшей мере один из фрагментов С представляет собой



23. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по любому из пп.1-22, являющийся частично тиофосфатированным.

24. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.23, являющийся тиофосфатированным по меньшей мере приблизительно на 85%.

25. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по любому из пп.1-22, являющийся полностью тиофосфатированным.

26. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по любому из пп.23-25, содержащий по меньшей мере одну стереохимически заданную тиофосфатную связь.

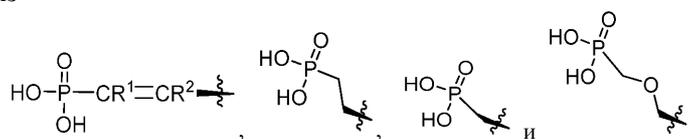
27. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.26, содержащий по меньшей мере 6 стереохимически заданных тиофосфатных связей.

28. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.26 или 27, отличающийся тем, что указанная по меньшей мере одна стереохимически заданная тиофосфатная связь находится в R-конфигурации.

29. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.26 или 27, отличающийся тем, что указанная по меньшей мере одна стереохимически заданная тиофосфатная связь находится в S-конфигурации.

30. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по любому из пп.1-29, содержащий 5'-концевой кэп.

31. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.30, отличающийся тем, что 5'-концевой кэп выбран из

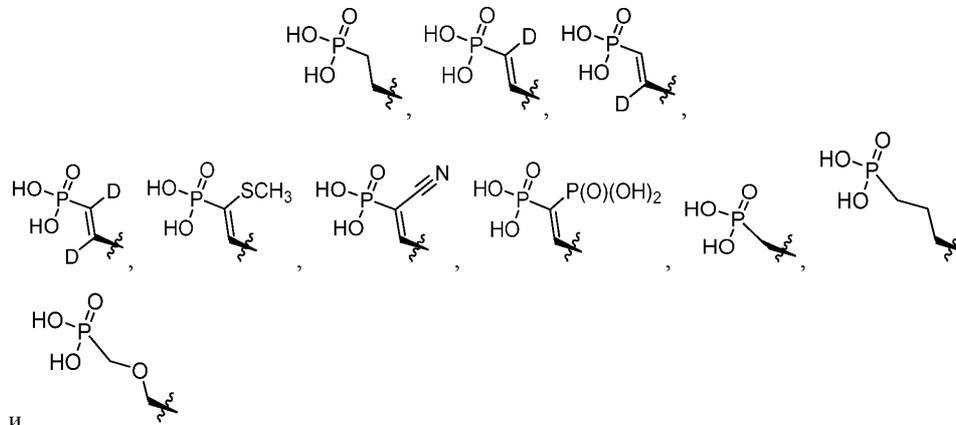


причем каждая из групп R¹ и R² независимо выбрана из атома водорода, атома дейтерия, фосфата, тиоC₁₋₆-алкила и цианогруппы.

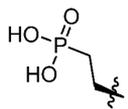
32. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.31, отличающийся тем, что как группа R¹, так и группа R² представляют собой атомы водорода.

33. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.31, отличающийся тем, что как группа R¹, так и группа R² не являются атомами водорода.

34. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.31, отличающийся тем, что 5'-концевой кэп выбран из



35. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.31, отличающийся тем, что 5'-концевой кэп представляет собой



36. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по любому из пп.1-35, отличающийся тем, что по меньшей мере одна концевая группа $\sim\text{O}$ представляет собой связывающую группу.

37. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.36, дополнительно содержащий по меньшей мере один второй олигонуклеотид, присоединенный к модифицированному олигонуклеотиду посредством связывающей группы.

38. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.36, дополнительно содержащий лиганд для адресного воздействия, присоединенный к модифицированному олигонуклеотиду посредством связывающей группы.

39. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.38, отличающийся тем, что указанный лиганд для адресного воздействия содержит N-ацетилгалактозамин (GalNac), трехантенный GalNac, токоферол или холестерин.

40. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по любому из пп.1-39, отличающийся тем, что по меньшей мере некоторые из фрагментов А не являются 2'О-метилированными по рибозному кольцу.

41. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по любому из пп.1-40, отличающийся тем, что по меньшей мере некоторые из фрагментов С не являются 2'О-метилированными по рибозному кольцу.

42. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по любому из пп.1-41, отличающийся тем, что указанная по меньшей мере частично тиофосфатированная последовательность чередующихся фрагментов А и С дополнительно содержит одну или более модификаций тиофосфатной связи.

43. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.42, отличающийся тем, что модификация тиофосфатной связи представляет собой модифицированную связь, выбранную из фосфодиэфирной, дитиофосфатной, метилфосфонатной, тиодифосфатной, 5'-фосфорамидатной, 3',5'-фосфордиамидатной, 5'-тиофосфорамидатной, 3',5'-тиофосфордиамидатной или дифосфодиэфирной связи.

44. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.43, отличающийся тем, что указанная модифицированная связь представляет собой фосфодиэфирную связь.

45. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по любому из пп.1-41, дополнительно содержащий по меньшей мере две частично тиофосфатированных последовательности чередующихся фрагментов А и С, соединенных друг с другом с образованием конкатемера.

46. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по любому из пп.1-45, отличающийся тем, что независимая от последовательности активность против вируса гепатита В по меньшей мере в 2 раза превышает активность референсного соединения.

47. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.46, отличающийся тем, что независимая от последовательности активность против вируса гепатита В по меньшей мере в 5 раз превышает активность референсного соединения.

48. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по любому из пп.1-47, отличающийся тем, что указанный модифицированный олигонуклеотид характеризуется значением EC_{50} менее 30 нМ, определяемым с помощью анализа секреции HBsAg.

49. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по любому из пп.1-47, отличающийся тем, что указанный модифицированный олигонуклеотид характеризуется значением EC_{50} , определяемым с помощью анализа секреции HBsAg и находящимся в диапазоне от 30 нМ до менее чем 100 нМ.

50. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по любому из пп.1-47, отличающийся тем, что указанный модифицированный олигонуклеотид характеризуется значением EC_{50} , определяемым с помощью анализа секреции HBsAg и находящимся в диапазоне от 100 нМ до менее чем 300 нМ.

51. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.1, отличающийся тем, что длина указанной по меньшей мере частично тиофосфатированной последовательности и чередующиеся фрагменты А и С выбраны из любой из SEQ ID NO: 6, 201-205, 210-212, 218, 221, 223, 235-245, 250-252, 254, 273-277, 281-320, 322-343, 345-353, 356-357, 359-392; и/или где указанная последовательность имеет длину последовательности, выбранную из группы, состоящей из: (AC)20, (AC)15, (AC)25, (AC)30, (AC)17, (AC)18, (AC)19, (AC)9-(5m)lnC, (AQ15-(5m)lnC, (AC)20-(5m)lnC, (AC)9-(5m)mC, (AC)15-(5m)mC, (AC)20-(5m)mC, (AC)10-TREB-(5m)mC, (AC)13-TREB-(5m)mC, (AC)15-TREB-(5m)mC, (AmAps(5m)AmC)20, (ScpAps(5m)scpC)20, AmAps(5m)mC(AC)19, (AC)19-mAps(5m)AmC, ScpAps(5m)mC(AC)19, (AC)19-mAps(5m)ScpC, Chol-(AC)20, (AC)20-Chol, Toco-(AC)20, (AC)20-Toco, GalNAc3ps-GalNAc3ps-GalNAc3po-(AC)20, (AC)20-po-GalNAc3ps-GalNAc3ps-GalNAc3, GalNAc4ps-GalNAc4ps-GalNAc4po-(AC)20, (AC)20-po-GalNAc4ps-GalNAc4ps-GalNAc4, GalNAc5ps-GalNAc5ps-GalNAc5po-(AC)20, (AC)20-po-GalNAc5ps-GalNAc5ps-GalNAc5, GalNAc1-NH-C6-po-(AC)20, GalNAc2-NH-C6-po-(AC)20, (CA)20, (AC)14, (AC)15-A, (AC)18-A, (AC)9, (AC)9-A, (AC)10 и (AC)12-A; и/или где чередующиеся фрагменты А и С содержат любой из фрагментов А и С, выбранный из группы, состоящей из: 2'-OMe, 2'-O-MOE, LNA, 2'-F, 2'-O-пропаргил, 2'-O-бутин, 2'-F-Ara, UNA, ENA, LNA-A, 2'-OMe-A, UNA-A, 2'-OMe-ALNA-A, LNA-A, AmNA(NMe)-A, Scp-BNA-A, 2'-O-Me-A, 2'-O-MOE-A, DNA-A, GNA-A, 3'-OMe-A, 3'-C-allyl-A, 2'-OMe-G, 2'-OMe-(5m)C, Рибо-А, 4etl-A, nmLNA-A, Scp-A, 2'-NH₂, LNA-(5m)C, UNA-(5m)C, AmNA(NMe)-(5m)C, Scp-BNA-(5m)C, 2'-OMe-(5m)C, 2'-O-MOE-(5m)C, DNA-(5m)C, GNA-(5m)C, (5m)-пропаргил-С, 3'-OMe-(5m)C, 2'-OMe-U, 2'-OMe-C, 4etl-(5m)C, nmLNA (5m)-C, AmNA-(5m)C и Scp-(5m)C.

52. Комплекс модифицированного олигонуклеотида по любому из пп.1-51, отличающийся тем, что указанный комплекс является хелатным комплексом.

53. Комплекс по п.52, отличающийся тем, что указанный комплекс является хелатным комплексом кальция, магния или цинка и модифицированного олигонуклеотида.

54. Комплекс модифицированного олигонуклеотида по любому из пп.1-52, отличающийся тем, что указанный комплекс является комплексом одновалентного противоиона.

55. Комплекс по п.54, отличающийся тем, что указанный комплекс является комплексом лития, натрия или калия и модифицированного олигонуклеотида.

56. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.1, отличающийся тем, что

указанная по меньшей мере частично тиофосфатированная последовательность чередующихся фрагментов А и С тиофосфатирована по меньшей мере на 85%;

длина указанной по меньшей мере частично тиофосфатированной последовательности чередующихся фрагментов А и С находится в диапазоне от 36 фрагментов до 44 фрагментов;

фрагменты А содержат по меньшей мере 15 фрагментов 2'-ОМе-А и по меньшей мере 1 фрагмент рибо-А;

фрагменты С содержат по меньшей мере 15 фрагментов LNA-5mC; и

указанный модифицированный олигонуклеотид характеризуется значением EC_{50} менее 30 нМ, определяемым с помощью анализа секреции HBsAg.

57. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.1, отличающийся тем, что

указанная по меньшей мере частично тиофосфатированная последовательность чередующихся фрагментов А и С тиофосфатирована по меньшей мере на 85%;

длина указанной по меньшей мере частично тиофосфатированной последовательности чередующихся фрагментов А и С находится в диапазоне от 36 фрагментов до 44 фрагментов;

фрагменты А содержат по меньшей мере 15 фрагментов 2'-ОМе-А;

фрагменты С содержат по меньшей мере 7 фрагментов LNA-5mC; и

указанный модифицированный олигонуклеотид характеризуется значением EC_{50} менее 50 нМ, определяемым с помощью анализа секреции HBsAg.

58. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.1, отличающийся тем, что

указанная по меньшей мере частично тиофосфатированная последовательность чередующихся фрагментов А и С тиофосфатирована по меньшей мере на 85%; и

указанный модифицированный олигонуклеотид характеризуется значением EC_{50} менее 100 нМ, определяемым с помощью анализа секреции HBsAg.

59. Модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по п.1, отличающийся тем, что

указанная по меньшей мере частично тиофосфатированная последовательность чередующихся фрагментов А и С тиофосфатирована по меньшей мере на 85%;

длина указанной по меньшей мере частично тиофосфатированной последовательности чередующихся фрагментов А и С находится в диапазоне от 36 фрагментов до 44 фрагментов;

фрагменты А содержат по меньшей мере 18 фрагментов 2'-ОМе-А;

фрагменты С содержат по меньшей мере 15 фрагментов LNA-5mC; и

указанный модифицированный олигонуклеотид характеризуется значением EC_{50} менее 30 нМ, определяемым с помощью анализа секреции HBsAg.

60. Комплекс модифицированного олигонуклеотида по любому из пп.57-59, отличающийся тем, что указанный комплекс является комплексом одновалентного противоиона, содержащим комплекс натрия или калия и модифицированного олигонуклеотида.

61. Фармацевтическая композиция, содержащая количество модифицированного олигонуклеотида или его комплекса по любому из пп.1-60, эффективное для лечения субъекта, инфицированного гепатитом В, и фармацевтически приемлемый носитель.

62. Фармацевтическая композиция, содержащая количество модифицированного олигонуклеотида или его комплекса по любому из пп.1-60, эффективное для лечения субъекта, инфицированного гепатитом D, и фармацевтически приемлемый носитель.

63. Средство для лечения гепатита В и/или гепатита D, содержащее эффективное количество модифицированного олигонуклеотида или его комплекса по любому из пп.1-60 или фармацевтической композиции по п.61 или 62.

64. Способ лечения гепатита В, включающий введение в организм субъекта, нуждающегося в этом, эффективного количества модифицированного олигонуклеотида или его комплекса по любому из пп.1-60 или фармацевтической композиции по п.61 или 62 или средства для лечения по п.63.

65. Способ по п.64, отличающийся тем, что модифицированный олигонуклеотид или его комплекс вводят субъекту парентеральным путем.

66. Способ по п.64, отличающийся тем, что модифицированный олигонуклеотид или его комплекс вводят субъекту внутривенно.

67. Способ по п.64, отличающийся тем, что модифицированный олигонуклеотид или его комплекс вводят субъекту подкожно.

68. Способ по любому из пп.64-67, дополнительно включающий введение субъекту эффективного количества второго средства для лечения гепатита В.

69. Способ по п.68, отличающийся тем, что указанное второе средство для лечения гепатита В содержит второй олигонуклеотид, обладающий независимой от последовательности активностью против вируса гепатита В, миРНК-олигонуклеотид, антисмысловый олигонуклеотид, нуклеозид, интерферон, иммуномодулятор, модулятор сборки капсида или их комбинацию.

70. Способ по п.69, отличающийся тем, что указанное второе средство для лечения гепатита В содержит антисмысловый олигонуклеотид.

71. Способ по п.69, отличающийся тем, что указанное второе средство для лечения гепатита В со-

держит модулятор сборки капсида.

72. Способ лечения гепатита D, включающий введение в организм субъекта, нуждающегося в этом, эффективного количества модифицированного олигонуклеотида или его комплекса по любому из пп.1-60 или фармацевтической композиции по п.61 или 62 или средства для лечения по п.63.

73. Способ по п.72, отличающийся тем, что модифицированный олигонуклеотид или его комплекс вводят субъекту парентеральным путем.

74. Способ по п.72, отличающийся тем, что модифицированный олигонуклеотид или его комплекс вводят субъекту внутривенно.

75. Способ по п.72, отличающийся тем, что модифицированный олигонуклеотид или его комплекс вводят субъекту подкожно.

76. Способ по любому из пп.72-78, дополнительно включающий введение субъекту эффективного количества второго средства для лечения гепатита D.

77. Способ по п.76, отличающийся тем, что указанное второе средство для лечения гепатита D содержит второй олигонуклеотид, обладающий независимой от последовательности активностью против вируса гепатита D, антисмысловой олигонуклеотид, нуклеозид, интерферон, модулятор сборки капсида или их комбинацию.

78. Способ по п.77, отличающийся тем, что указанное второе средство для лечения гепатита D содержит антисмысловой олигонуклеотид.

79. Способ по п.77, отличающийся тем, что указанное второе средство для лечения гепатита D содержит модулятор сборки капсида.

80. Способ лечения гепатита В или гепатита D, включающий подкожное введение эффективного количества противовирусного олигонуклеотида или его комплекса субъекту, нуждающемуся в этом, причем механизм противовирусной активности указанного олигонуклеотида в основном не зависит от последовательности, и причем указанный противовирусный олигонуклеотид представляет собой модифицированный олигонуклеотид или его комплекс по любому из пп.1-60, фармацевтическую композицию по п.61 или 62 или средство для лечения по п.63; и при этом независимая от последовательности противовирусная активность выше по сравнению с референсным олигонуклеотидом.

81. Способ по п.80, отличающийся тем, что референсный олигонуклеотид представляет собой REP 2139, REP 2055, REP 2165 или их хелатный комплекс.

82. Способ по п.81, включающий подкожное введение безопасного и эффективного количества противовирусного олигонуклеотида или его комплекса субъекту-человеку, нуждающемуся в этом, в дозировке, пониженной по сравнению с ожидаемой дозировкой на основе наблюдаемых уровней в печени после сопоставимого в иных отношениях внутривенного введения, и при этом независимая от последовательности противовирусная активность выше по сравнению с референсным олигонуклеотидом.

83. Применение модифицированного олигонуклеотида или его комплекса по любому из пп.1-60 при лечении гепатита В.

84. Применение модифицированного олигонуклеотида или его комплекса по любому из пп.1-60 при лечении гепатита D.

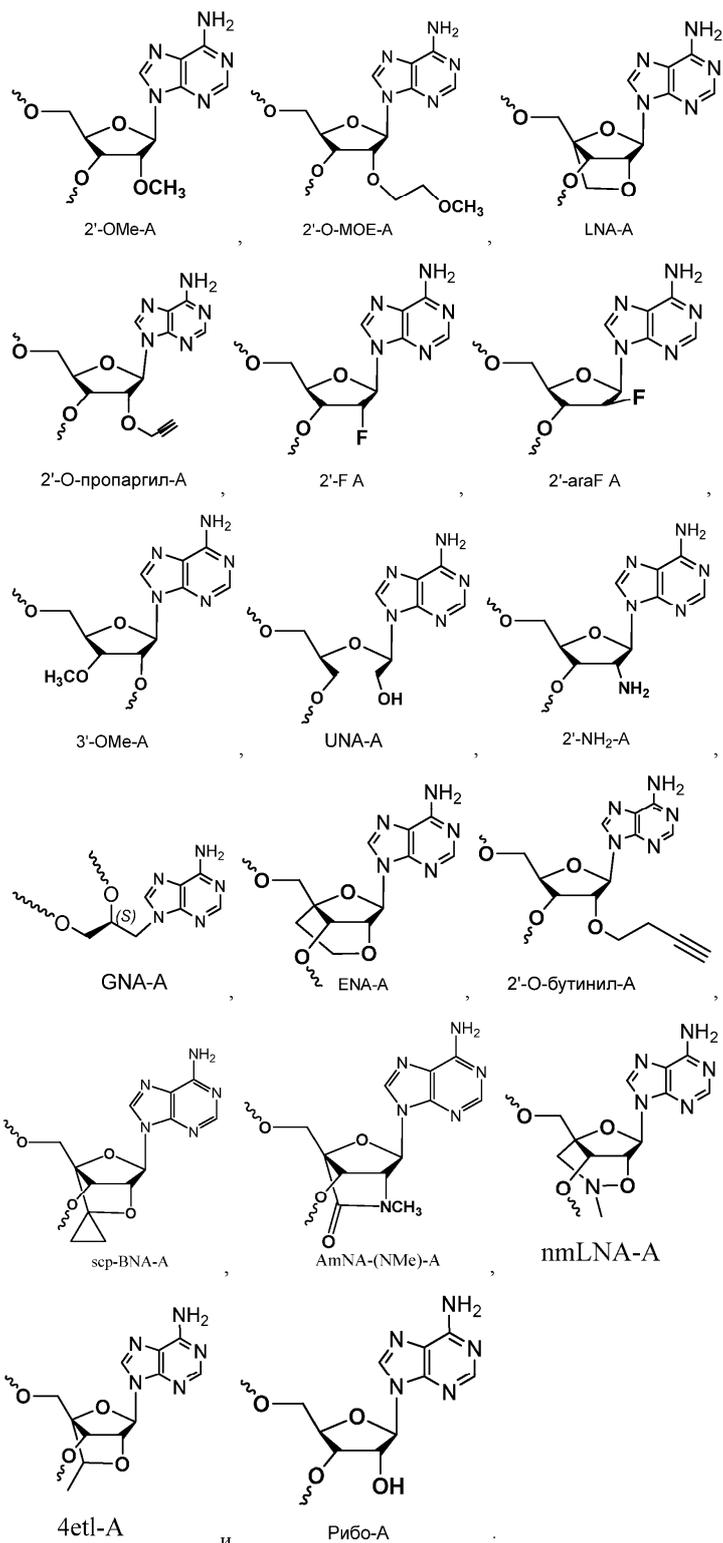
85. Применение модифицированного олигонуклеотида или его комплекса по любому из пп.1-60 при получении лекарственного средства для лечения гепатита В.

86. Применение модифицированного олигонуклеотида или его комплекса по любому из пп.1-60 при получении лекарственного средства для лечения гепатита D.

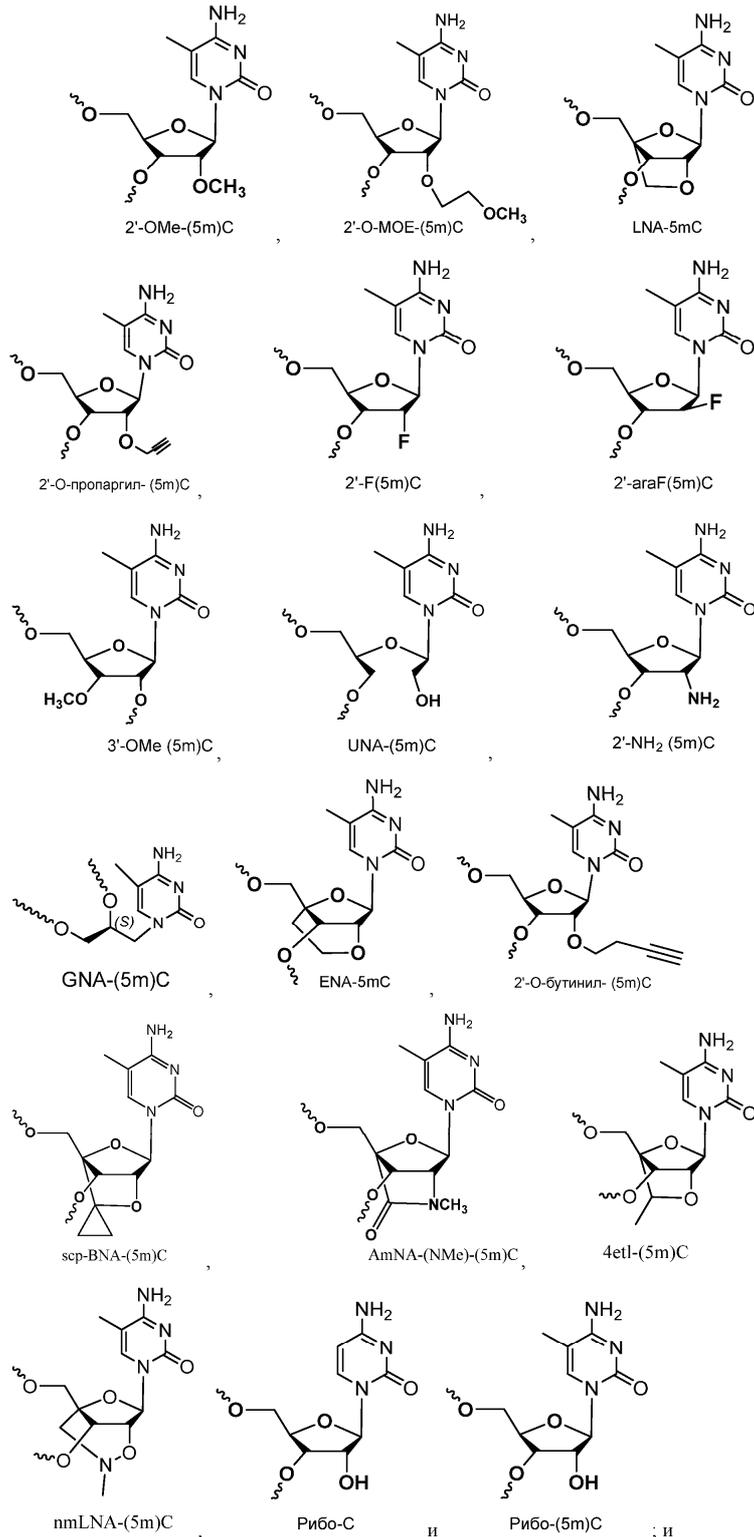
87. Применение по любому из пп.85-86, отличающееся тем, что указанное применение включает подкожное введение безопасного и эффективного количества противовирусного олигонуклеотида или его комплекса субъекту-человеку, нуждающемуся в этом, в дозировке, пониженной по сравнению с ожидаемой дозировкой на основе наблюдаемых уровней в печени после сопоставимого в иных отношениях внутривенного введения.

88. Динуклеотид, состоящий из фрагмента А и фрагмента С, соединенных стереохимически заданной тиофосфатной связью, причем

фрагменты А содержат одно или более из соединений, выбранных из



фрагменты С содержат одно или более из соединений, выбранных из



каждая группа $\sim\text{O}$ независимо представляет собой гидроксил, O,O-дигидротиофосфат, фосфорамидит, диметокситритиловый эфир или стереохимически заданную тиофосфатную связь.

89. Динуклеотид по п.88, при условии, что указанный динуклеотид не содержит ни фрагмент рибо-А, ни фрагмент рибо-С.

90. Динуклеотид по п.89, отличающийся тем, что группа $\sim\text{O}$ представляет собой фосфорамидит согласно следующей формуле (А):

102. Способ по п.101, отличающийся тем, что модифицированный олигонуклеотид или его комплекс вводят субъекту внутривенно.

103. Способ по п.101, отличающийся тем, что модифицированный олигонуклеотид или его комплекс вводят субъекту подкожно.

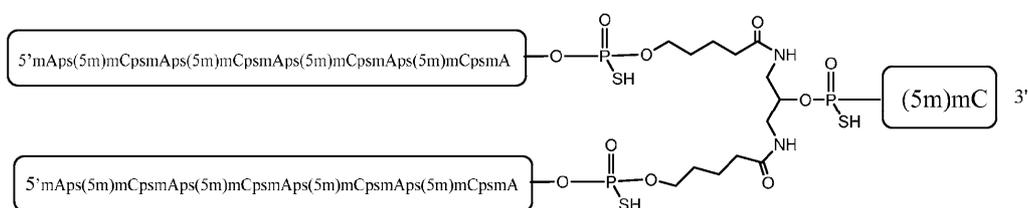
104. Способ по п.100, дополнительно включающий введение субъекту эффективного количества одного или более второго средства для лечения гепатита В.

105. Способ по п.104, отличающийся тем, что указанное второе средство для лечения гепатита В содержит миРНК-олигонуклеотид, антисмысловый олигонуклеотид, нуклеозид, интерферон, иммуномодулятор, модулятор сборки капсида или их комбинацию.

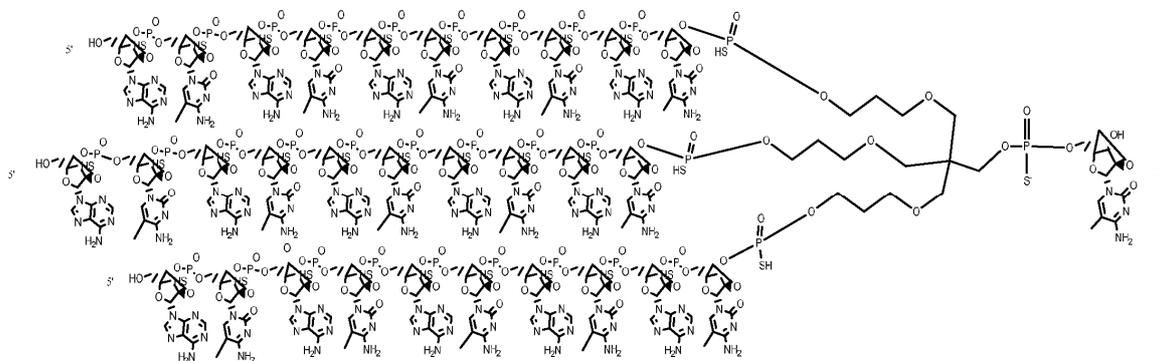
106. Способ по п.105, отличающийся тем, что указанное второе средство для лечения гепатита В содержит антисмысловый олигонуклеотид.

107. Способ по п.105, отличающийся тем, что указанное второе средство для лечения гепатита В содержит модулятор сборки капсида.

108. Способ по п.100, включающий подкожное введение модифицированного олигонуклеотида или его комплекса субъекту-человеку, нуждающемуся в этом, в дозировке, пониженной по сравнению с дозировкой, которая была бы необходима для референсного соединения, на основе уровней в печени, наблюдаемых после сопоставимого в иных отношениях внутривенного введения, где указанное референсное соединение представляет собой тиофосфатированный 40-членный АС-олигонуклеотид, известный как REP 2139.

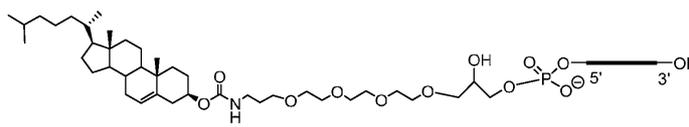


Фиг. 1



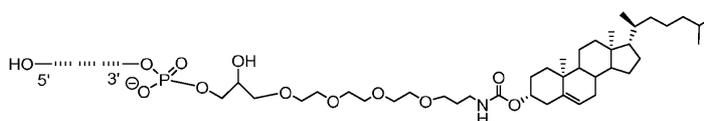
Фиг. 2

5'-холестерин, присоединенный через ТЭГ-линкер



Фиг. 3А

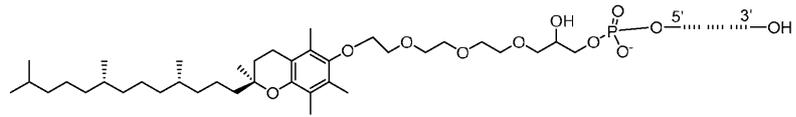
3'-холестерин, присоединенный через ТЭГ-линкер



Фиг. 3В

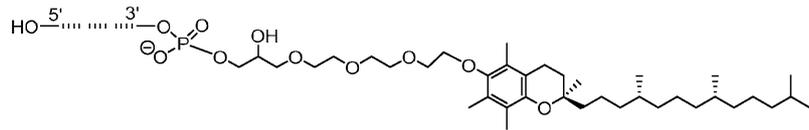
045960

5'-витамин Е, присоединенный через ТЭГ-линкер



Фиг. 3С

3'-витамин Е, присоединенный через ТЭГ-линкер



Фиг. 3D

Строительный блок GalNAc	Структура после присоединения
<p>GalNAc-3-фосфорамидит</p>	
<p>GalNAc-4-фосфорамидит</p>	
<p>GalNAc-5-фосфорамидит</p>	
<p>GalNAc-6-фосфорамидит</p>	

Фиг. 4А

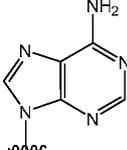
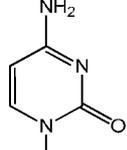
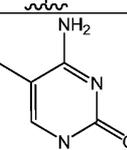
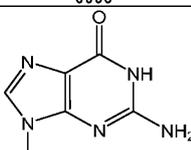
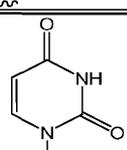
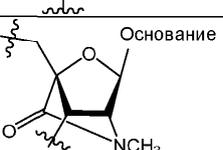
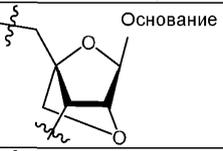
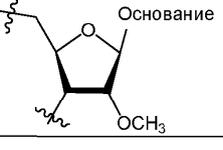
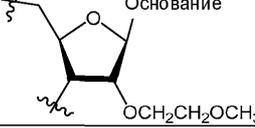
286	5' mApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)C 3'	AAA		PS, 40-членный 2'-ОМе; 13 LNA (каждое 3-е основание)
287	5' VPm Apsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)C 3'	AAAA	A	PS, 40-членный 2'-ОМе; 13 LNA (кажд. 3-е основ.) 5'-VP концевой кэп
288	5' mApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)C 3'	AAAA	A	PS, 40-членный 2'-ОМе; 10 LNA (каждое 4-е основание)
289	5' -VP-mApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)C 3'	AAAA	A	PS, 40-членный 2'-ОМе; 10 LNA (каждое 4-е основание) 5'-VP концевой кэп
290	5' mApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)C 3'	AA	A	PS, 40-членный 20 димерных блоков R-изомера
291	5' VPm Apsm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)C 3'	AAAA	A	PS, 40-членный 19 димерных блоков R-изомера; 1 m(5m)C 5'-VP концевой кэп
292	5' mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)C 3'	AAA	A	PS, 40-членный 2'-ОМе; 5 LNA
293	5' VPm Apsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)C 3'	AAAA	A	PS, 40-членный 2'-ОМе; 5 LNA 5'-VP концевой кэп

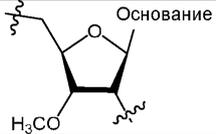
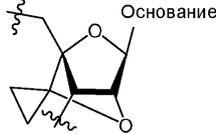
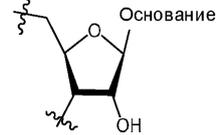
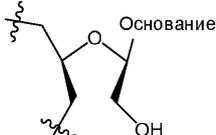
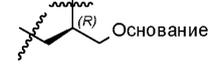
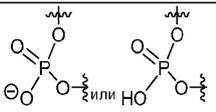
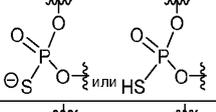
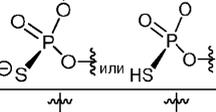
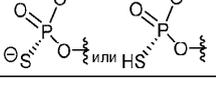
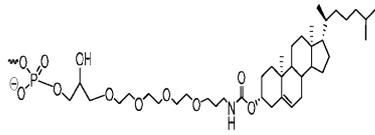
308	5' In Apsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApoln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpolnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApoln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApoln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)C 3'	C	A
239	5' m Apsm(5m)Cpsm Apsm(5m)Cpsm Apsm(5m)Cpsm Apsm(5m)Cpsm Aps DBLR-ps-c4-CONH-c2-psm(5m)C 3' m Apsm(5m)Cpsm Apsm(5m)Cpsm Apsm(5m)Cpsm Apsm(5m)Cpsm A 5'	D	A
235	5' In Apsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps-DBLR-ps-c4-CONH-c2-psln(5m)C 3' In Apsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnA 5'	D	B
236	5' In Apsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps-DBLR-ps-c4-CONH-c2-psm(5m)C 3' In Apsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps 5'	D	B
237	5' In Apsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)Cps-DBLR-ps-c4-CONH-c2-psm(5m)C 3' 5' In Apsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)C 5'	A	B
301	5' In Apsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsrCps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsrCps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsrCps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)C 3'	A	B
303	5' In Apsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsrCps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsrCps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)C 3'	B	B
305	5' In Apsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnAps ln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)C polnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnAps ln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)C polnApsln(5m)CpolnApsln(5m)C 3'	C	A
309	5' In Apsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApoln(5m)CpolnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpolnApoln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApoln(5m)CpolnApsln(5m)C pslnApsln(5m)CpolnApoln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApoln(5m)CpolnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)C 3'	D	B
297	5' m Apsm(5m)Cpsm Apsm(5m)CpsrApsm(5m)Cpsm Apsm(5m)Cpsm ApsrCps m Apsm(5m)Cpsm Apsm(5m)CpsrApsm(5m)Cpsm Apsm(5m)Cpsm ApsrCps m Apsm(5m)Cpsm Apsm(5m)CpsrApsm(5m)Cpsm Apsm(5m)Cpsm ApsrCps m Apsm(5m)Cpsm Apsm(5m)CpsrApsm(5m)Cpsm Apsm(5m)Cpsm Aps m(5m)C 3'	C	A
298	5' m Apsm(5m)Cpsm Apsm(5m)CpsrApsrCpsm Apsm(5m)Cpsm Apsr(5m)CpsrApsm(5m) Cpsm Apsm(5m)CpsrApsrCpsm Apsm(5m)Cpsm ApsrCpsrAps m(5m)Cpsm Apsm(5m)CpsrApsrCpsm Apsm(5m)Cpsm ApsrCporApsm(5m)Cpsm Aps m(5m)CpsrApsrCpsm Apsm(5m)Cpsm Apsm(5m)C 3'	D	A
300	5' m Apsm(5m)Cpsm Apsm(5m)CpsrApsrCpsm Apsm(5m)Cpsm ApsrCpsrAps m(5m)Cpsm Apsm(5m)CpsrApsrCpsm Apsm(5m)Cpsm ApsrCpsrApsm(5m)Cpsm Aps m(5m)CpsrApsrCpsm Apsm(5m)Cpsm Apsm(5m)C 3'	D	A

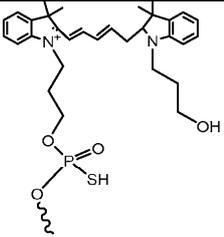
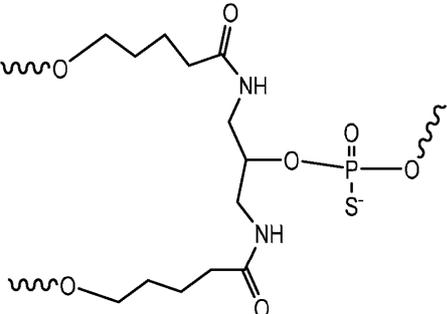
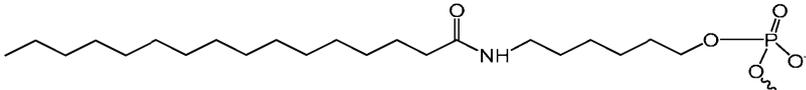
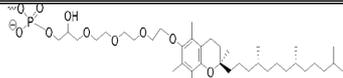
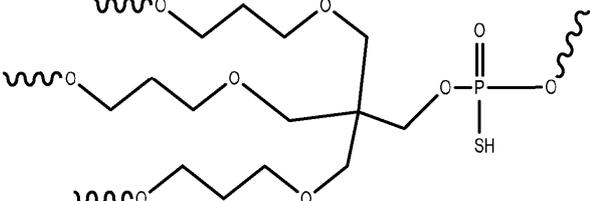
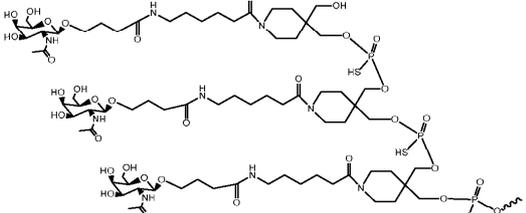
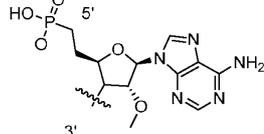
329	5° In Apsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cpsln Apsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsm(5m)Cpsm Apsm(5m)Cpsm Apsm(5m)Cpsm Apsm(5m)Cpsm Apsm(5m)C 3°	C	A
330	5° In Apsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cpsln Apsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)Cpsm Apsm(5m)Cpsm Apsm(5m)Cpsm Apsm(5m)Cpsm Aps m(5m)Cpsm Apsm(5m)Cpsm Apsm(5m)Cpsm Apsm(5m)Cpsm Apsm(5m)Cpsm Apsm(5m)Cpsm Apsm(5m)C 3°	B	B
331	5° In Apsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cpsln Apsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)Cps moeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5 m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)C 3°	D	A
332	5° In Apsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cpsln Apsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeAps moe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeAps moe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeAps moe(5m)C 3°	D	A
333	5° InApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps(5m)CpslnApsl n(5m)CpslnApsln(5m)CpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps (5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps(5m)C pslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)C 3°	B	A
334	5° InApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps(5m)CpsApsln(5 m)CpslnApsln(5m)CpsAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnA psln(5m)CpsAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)C psrAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)C 3°	B	A
335	5° InApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps(5m)CpslnApsl n(5m)CpslnApsln(5m)CpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps (5m)CpoInApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m) C 3°	C	A
336	5° InApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps(5m)CpsApsln(5 m)CpslnApsln(5m)CpsAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnA psln(5m)CpsAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)C 3°	C	A
337	5° In Apsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cpsln Apsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnApsln(5m) CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsAps(5m)CpsA ps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)C 3°	A	B
338	5° In Apsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cpsln Apsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5 m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)C 3°	B	B
117	5° In Apsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cpsln Apsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)C 3°	B	A

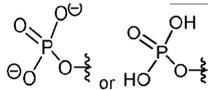
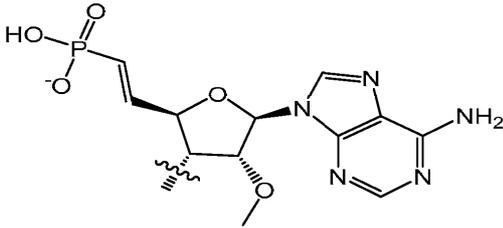
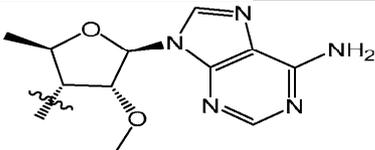
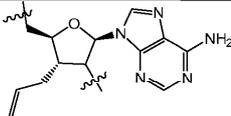
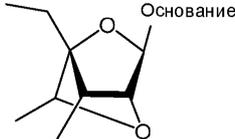
На фиг. 6В использованы следующие сокращения, каждое из которых описано в табл. А.

Таблица А

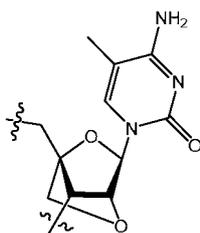
Сокращение	Название	Структура
A	Аденин	
C	Цитозин	
(5m)C	5-метилцитозин	
G	Гуанин	
U	Урацил	
am	AmNA	
In	LNA	
m	2'-OMe	
moe	2'-MOE	

3m	3'-OMe	
cp	scp-BNA	
r	PHK	
un	ациклический	
gn	GNA	
po	Фосфат	
ps	Тиофосфат	
psR	Тиофосфат с (R)-стереохимией	
psS	Тиофосфат с (S)-стереохимией	
3'-холестерин (CHOL)		

Cy5		
DBLR-ps-c4-CONH-c2		
Пальмитоил		
Токоферол		
TREB-ps-c3-O-C3		
GalNAc5		
EP	5'-этилфосфонатный концевой кэп	

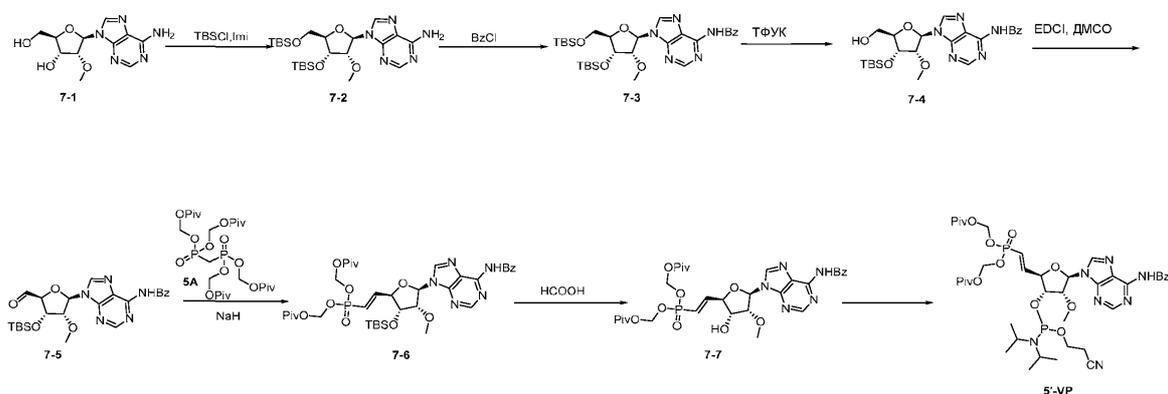
P		
VP		
4'-Me	4'-Me-2-OMe-A	
3cal	3'-C-аллил-А	
4etl		

Например, с использованием этих сокращений и структур из табл. А специалист в данной области техники поймет, что сокращение "In(5m)C" представляет собой следующее соединение:

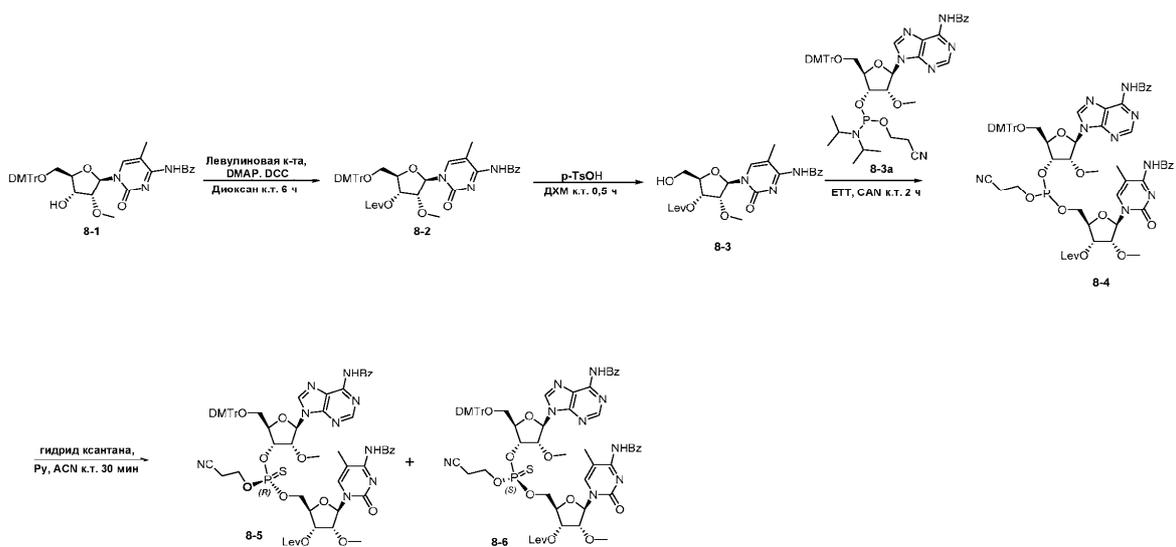


Фиг. 6В

Получение (((E)-2-((2R,3R,4R,5R)-5-(6-бензамидо-9H-пурин-9-ил)-3-(((2-цианэтокси)(диизопропиламино)фосфин)окси)-4-метокситетрагидрофуран-2-ил)винил)фосфорилбис(окси)бис(метилен)бис(2,2-диметилпропаноата) (5VP)

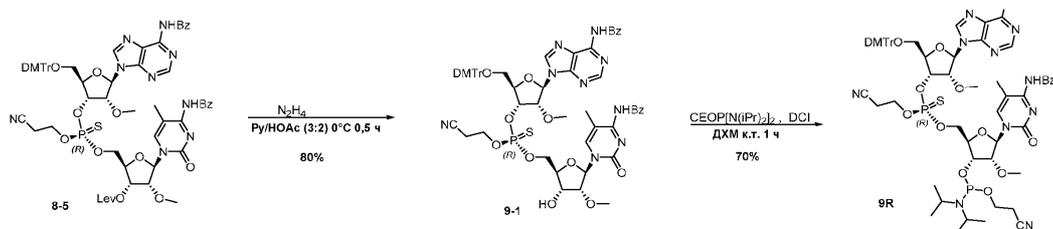


Фиг. 7



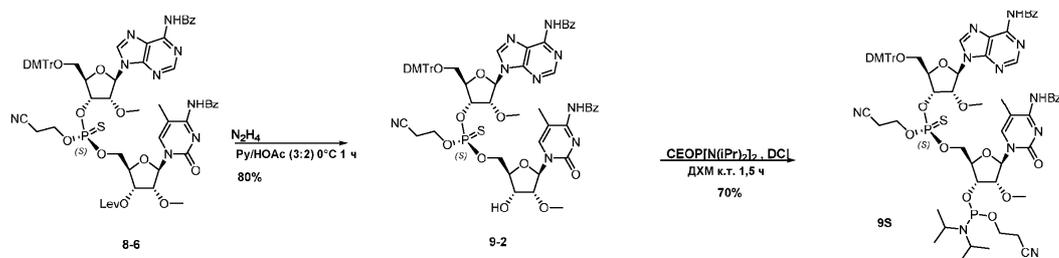
Фиг. 8

Получение (2R,3R,4R,5R)-5-(4-бензамидо-5-метил-2-оксопиримидин-1(2H)-ил)-2-(((R)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(6-бензамидо-9H-пурин-9-ил)-2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-4-метокситетрагидрофуран-3-ил)окси)(2-цианэтокси)фосфортиоил)метил)-4-метокситетрагидрофуран-3-ил(2-цианэтил)диизопропилфосфорамидита (9R)

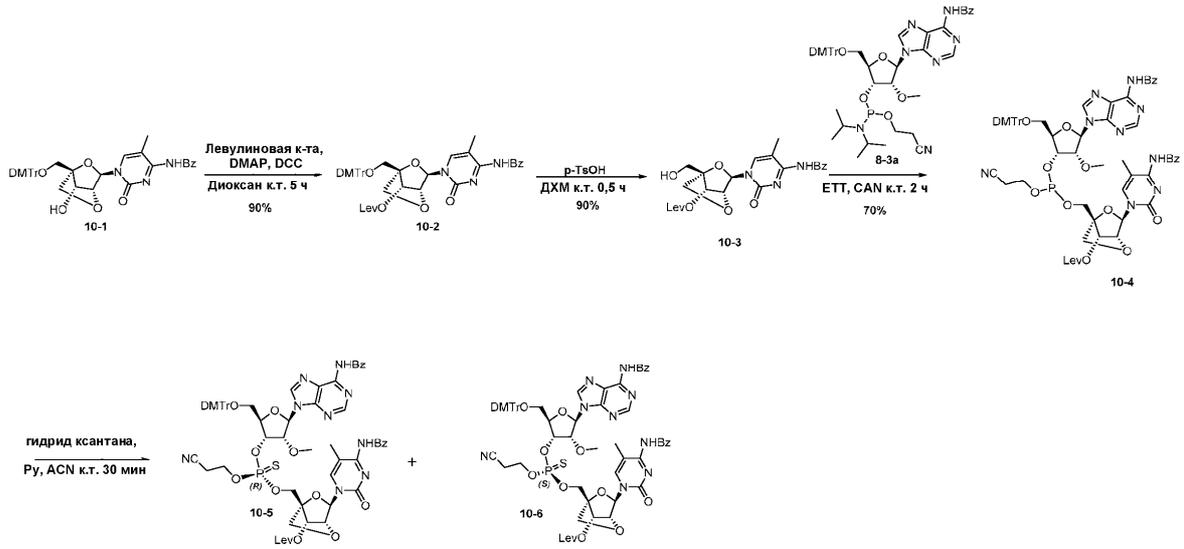


Фиг. 9А

Получение (2R,3R,4R,5R)-5-(4-бензамидо-5-метил-2-оксопиримидин-1(2H)-ил)-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(6-бензамидо-9H-пурин-9-ил)-2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-4-метокситетрагидрофуран-3-ил)окси)(2-цианэтокси)фосфортиоил)метил)-4-метокситетрагидрофуран-3-ил(2-цианэтил)диизопропилфосфорамидита (9S)

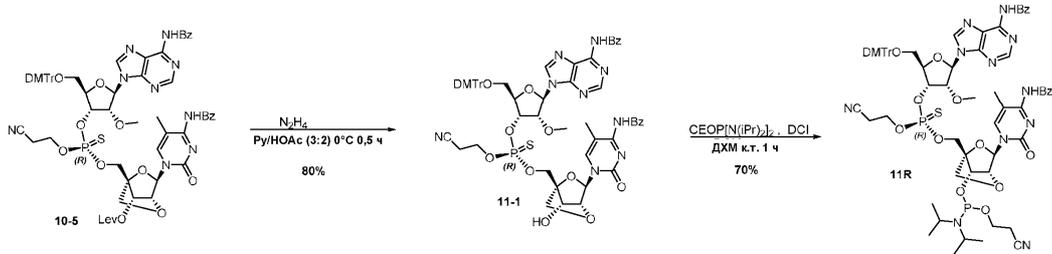


Фиг. 9В



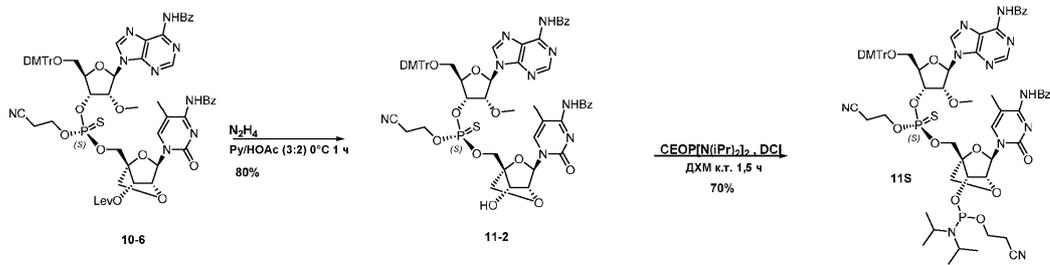
Фиг. 10

Получение (1R,3R,4R,7S)-3-(4-бензамидо-5-метил-2-оксопиримидин-1(2H)-ил)-1-(((R)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(6-бензамидо-9H-пурин-9-ил)-2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-4-метокситетрагидрофуран-3-ил)окси)(2-цианэтокси)фосфортиоил)оксиметил)-2,5-диоксабицикло[2.2.1]гептан-7-ил (2-цианэтил) диэнопропилфосфорамидита (11R)

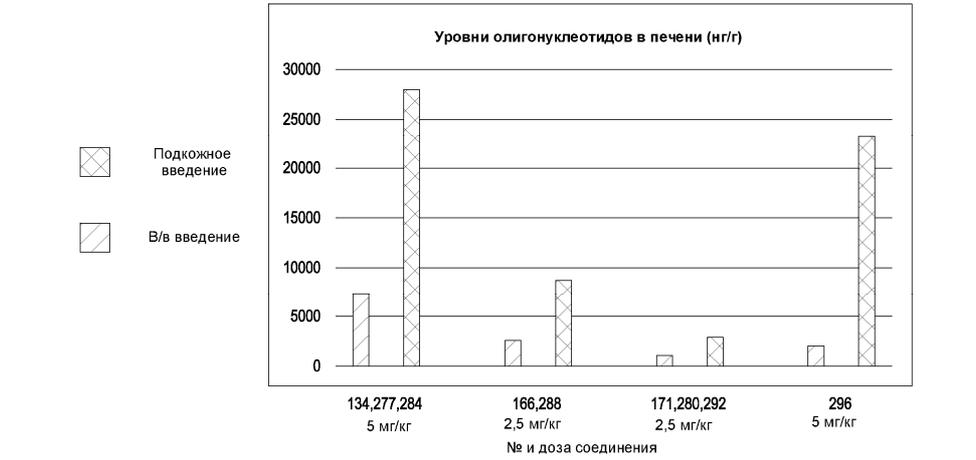


Фиг. 11А

Получение (1R,3R,4R,7S)-3-(4-бензамидо-5-метил-2-оксопиримидин-1(2H)-ил)-1-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(6-бензамидо-9H-пурин-9-ил)-2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-4-метокситетрагидрофуран-3-ил)окси)(2-цианэтокси)фосфортиоил)оксиметил)-2,5-диоксабицикло[2.2.1]гептан-7-ил (2-цианэтил) диэнопропилфосфорамидита (11S)

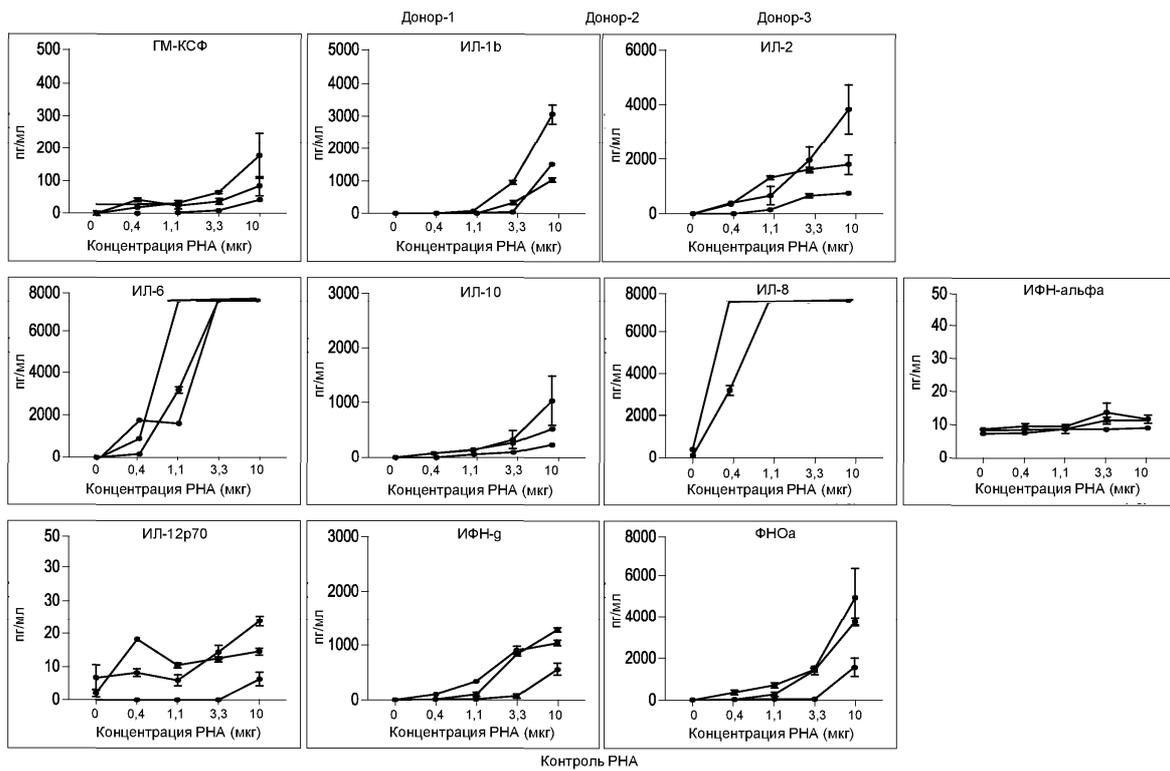


Фиг. 11В

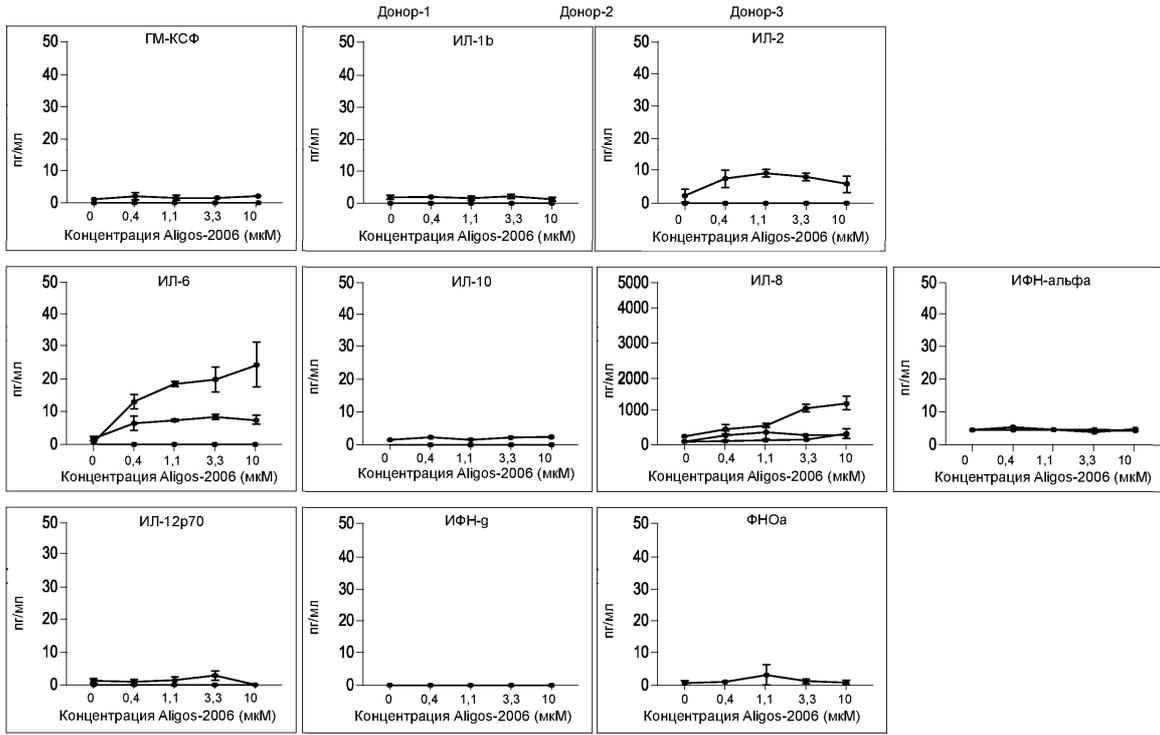


№ соединения (доза)	134,277,284 5 мг/кг		166,288 2,5 мг/кг		171,280,292 2,5 мг/кг		296 5 мг/кг	
Путь введения	В/в	П/к	В/в	П/к	В/в	П/к	В/в	П/к
Уровни в печени (нг/г)	7350.5	27,942.5	2603	8711	1024.5	2938.5	1995.5	23,191.5

Фиг. 12

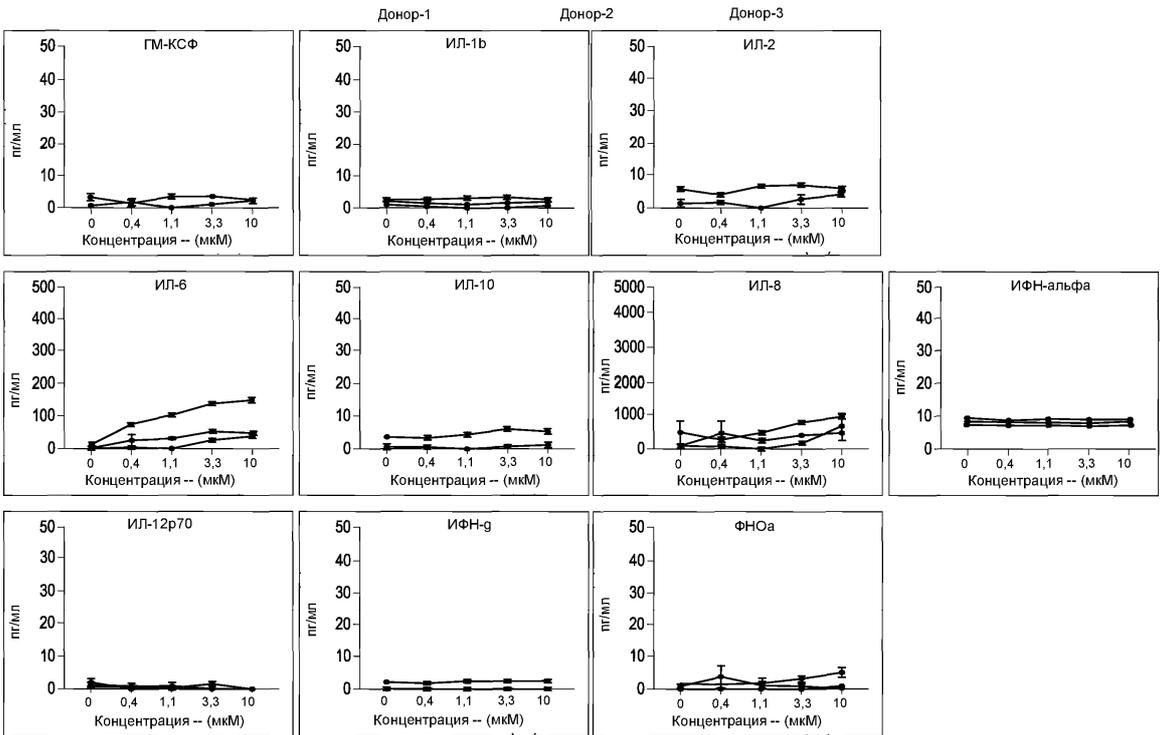


Фиг. 13



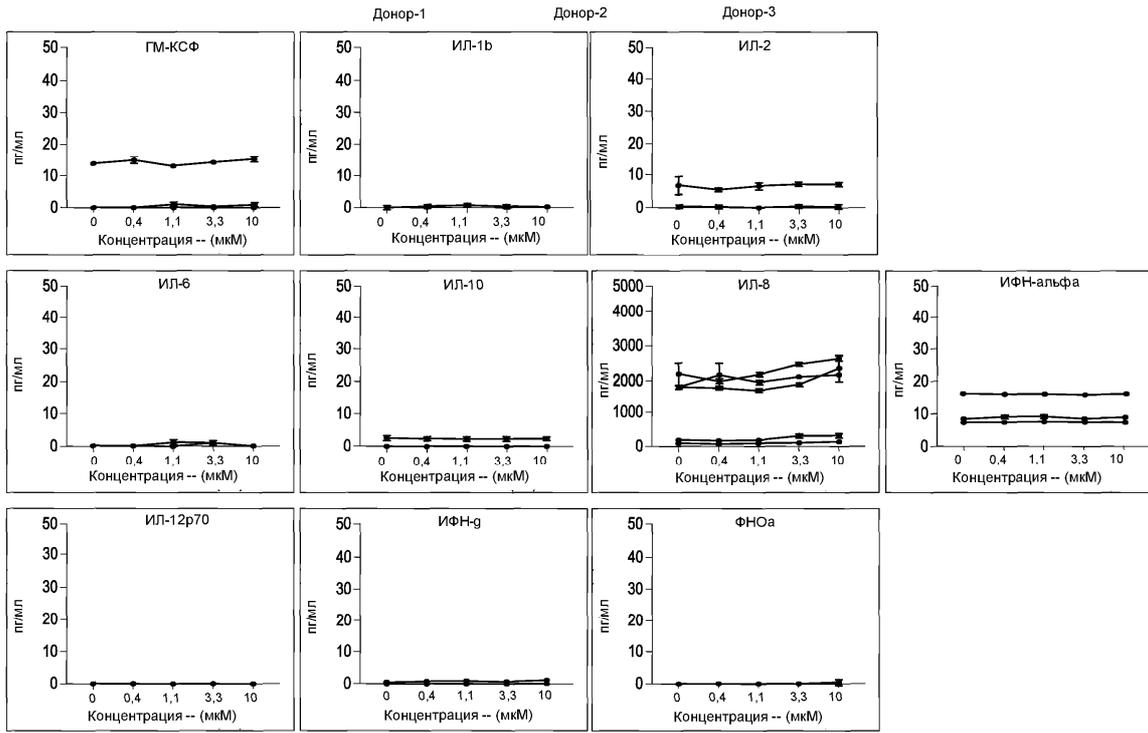
Соединение № 1 (REP-2139)

Фиг. 14



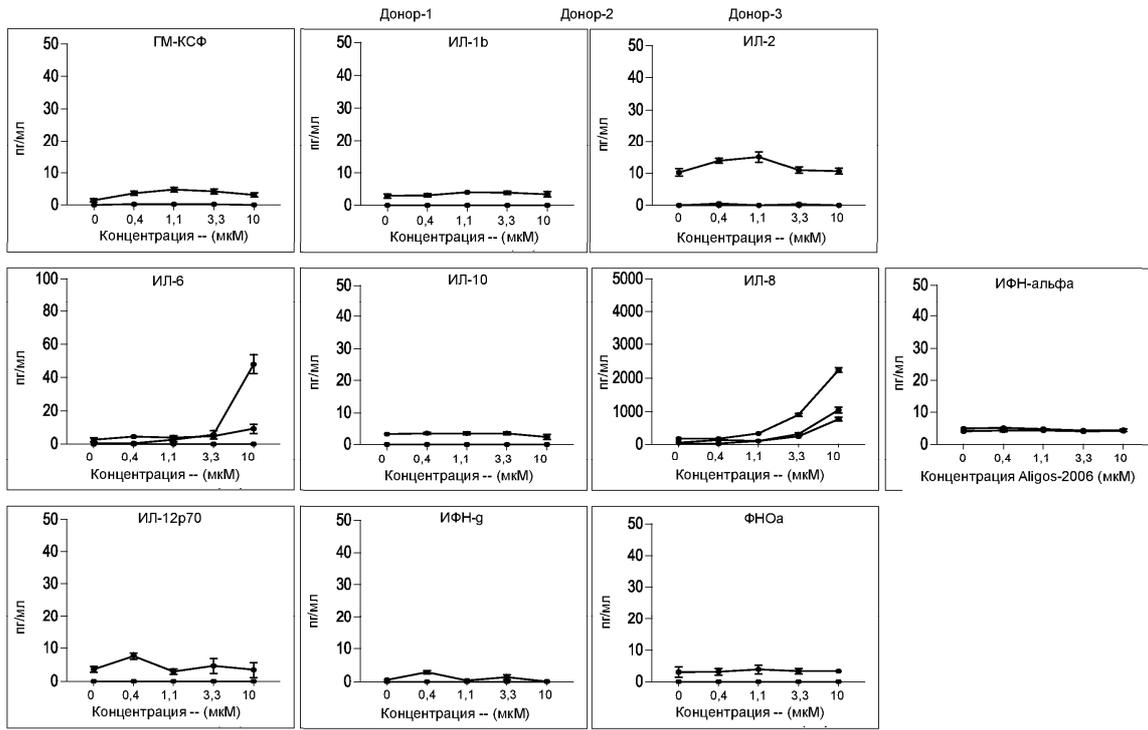
Соединения № 1 171, 280, 292

Фиг. 15



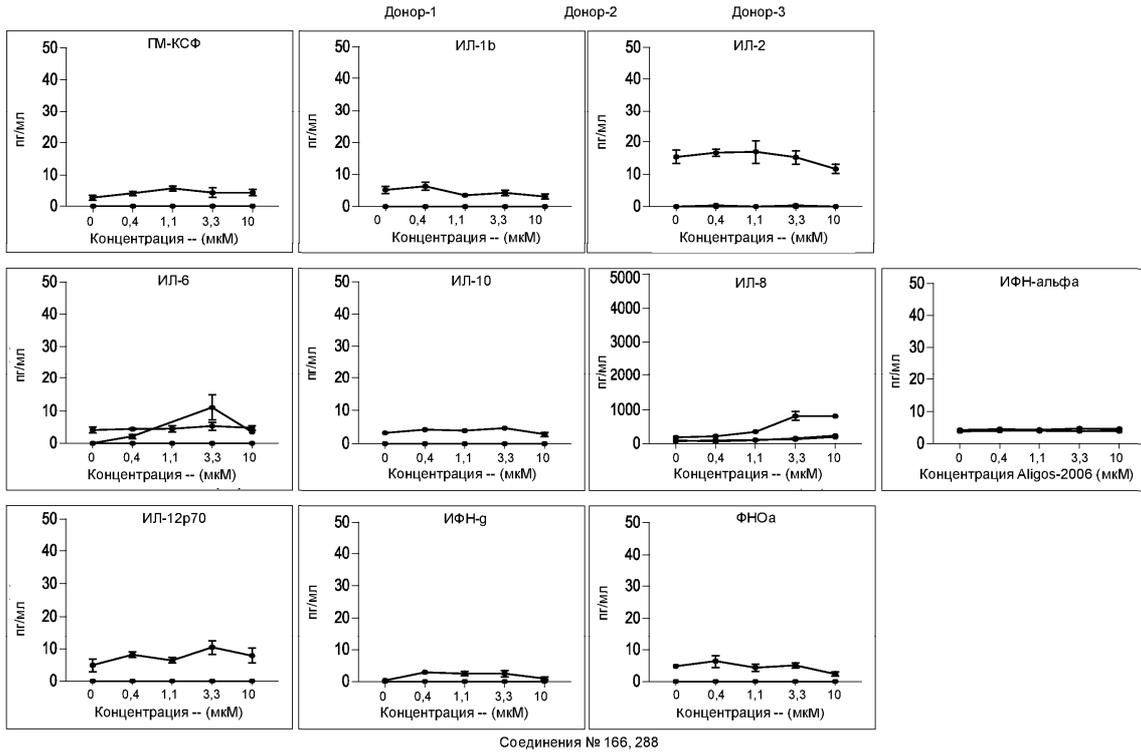
Соединения № 171, 280, 292

Фиг. 16

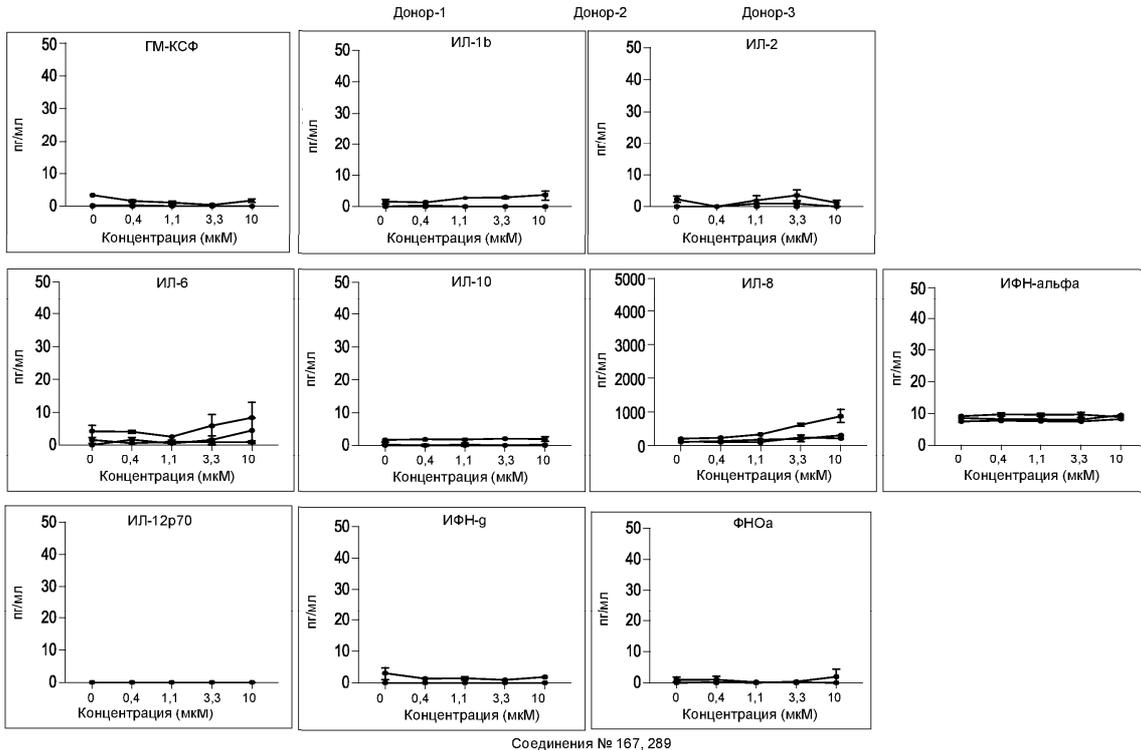


Соединения № 134, 277, 284

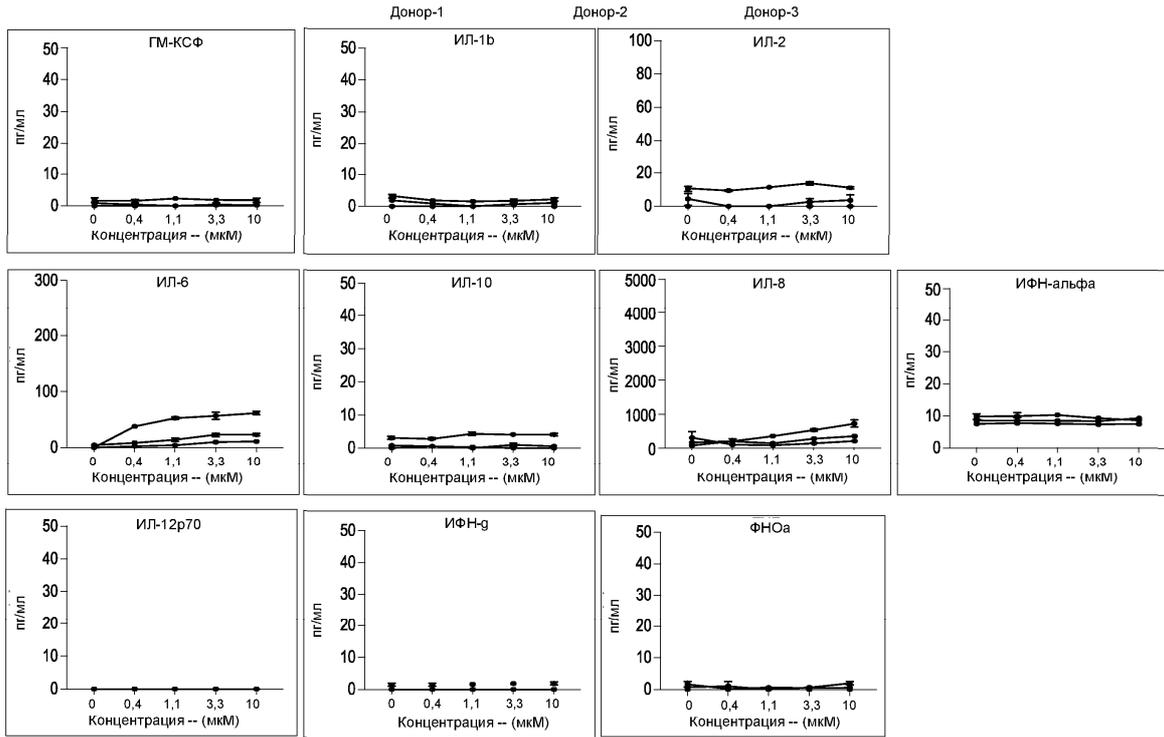
Фиг. 17



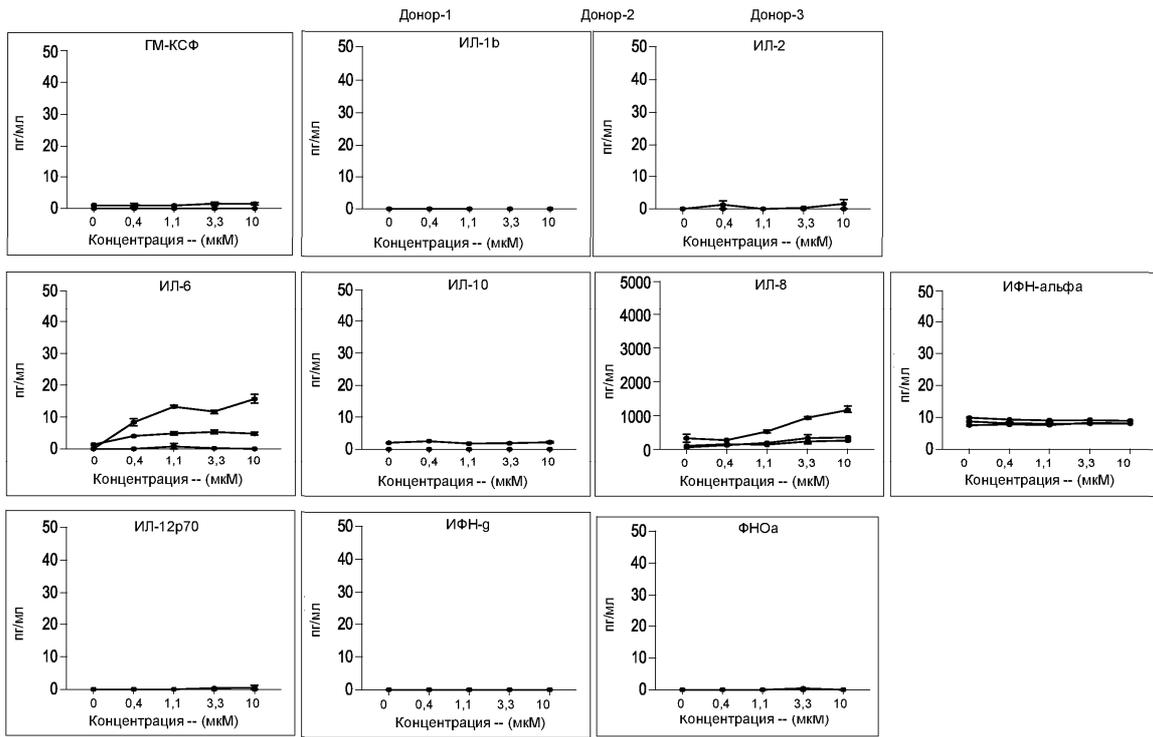
Фиг. 18



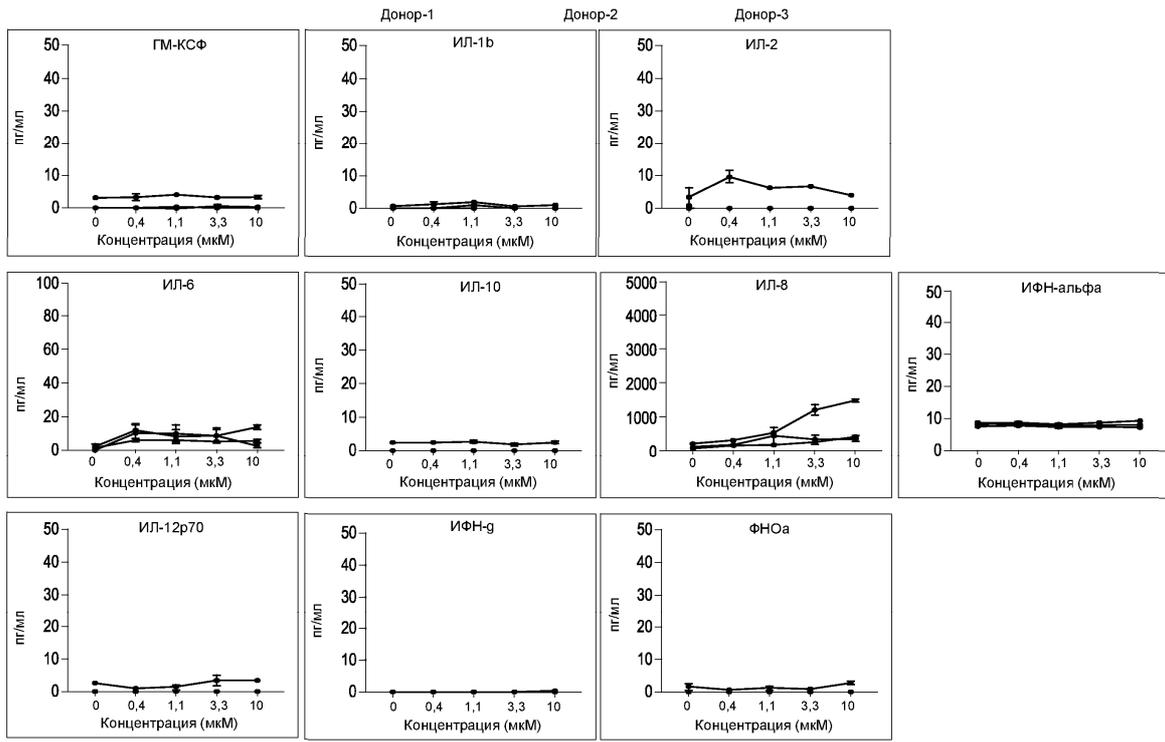
Фиг. 19



Фиг. 20

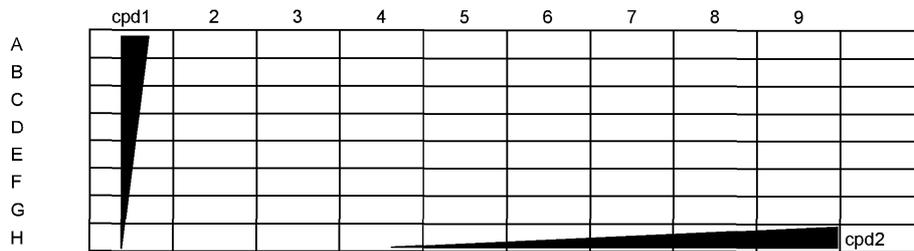


Фиг. 21



Соединения № 276, 291

Фиг. 22



Фиг. 23



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2