

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390363** (13) **A2**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.03.29

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2017.09.29

(54) **СОЕДИНЕНИЯ И СПОСОБЫ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ТАУ**

(31) **62/401,723; 62/450,469**

(32) **2016.09.29; 2017.01.25**

(33) **US**

(62) **201990635; 2017.09.29**

(71) Заявитель:
БИОГЕН МА ИНК. (US)

(74) Представитель:

**Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Костюшенкова М.Ю., Гизатуллин
Ш.Ф. (RU)**

(57) Предложены соединения, способы и фармацевтические композиции для снижения количества или активности мРНК тау в клетке или организме животного и в некоторых случаях снижения количества тау белка в клетке или организме животного. Такие соединения, способы и фармацевтические композиции можно применять для устранения по меньшей мере одного симптома нейродегенеративного заболевания. Такие симптомы включают потерю памяти, потерю двигательной функции и повышение числа и/или объема нейрофибриллярных включений. Такие нейродегенеративные заболевания включают таупатии, болезнь Альцгеймера, лобно-височную деменцию (ЛВД), лобно-височную деменцию с паркинсонизмом-17 (FTDP-17), прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП), хроническую травматическую энцефалопатию (ХТЭ), кортикобазальную ганглиозную дегенерацию (КГД), эпилепсию и синдром Драве.

A2

202390363

202390363

A2

СОЕДИНЕНИЯ И СПОСОБЫ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ТАУ

Перечень последовательностей

5 Данная заявка была подана вместе с Перечнем последовательностей в электронном формате. Перечень последовательностей предоставлен в виде файла под названием BIOL0285WOSEQ_ST25, созданного 7 сентября 2017 г., размер которого составляет 176 Кбайт. Информация, содержащаяся в электронном формате перечня последовательностей, в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

Область техники

10 Предложены соединения, способы и фармацевтические композиции для снижения количества или активности мРНК тау в клетке или организме животного и, в некоторых случаях, снижения количества белка тау в клетке или организме животного. Такие соединения, способы и фармацевтические композиции можно применять для устранения по меньшей мере одного симптома нейродегенеративного заболевания. Такие симптомы включают потерю памяти, потерю
15 двигательной функции и повышение числа и/или объема нейрофибриллярных включений. Такие нейродегенеративные заболевания включают таупатии, болезнь Альцгеймера, лобно-височную деменцию (ЛВД), ЛВДП-17, прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП), хроническую травматическую энцефалопатию (ХТЭ), кортикобазальную ганглиозную дегенерацию (КГД), эпилепсию и синдром Драве.

20 Уровень техники

Первичной функцией тау является связывание и стабилизация микротрубочек, которые представляют собой важные структурные компоненты цитоскелета, вовлеченные в митоз, цитокинез и везикулярный транспорт. Тау можно обнаружить во многих тканях, но особенно он распространен в аксонах нейронов. У людей существует шесть изоформ тау, которые образуются
25 посредством альтернативного сплайсинга экзонов 2, 3 и 10. Сплайсинг экзонов 2 и 3 в N-конце белка приводит к включению нуля, одного или двух 29-аминокислотных кислых доменов и называется 0N, 1N и 2N тау соответственно. Влияние этих доменов на функцию тау полностью не выяснено, хотя они могут играть роль во взаимодействиях с плазматической мембраной. Включение экзона 10 в C-конце приводит к включению связывающего микротрубочки домена,
30 кодируемого экзоном 10. Так как в целом в тау существует 3 связывающих микротрубочки домена, эта изоформа тау (с включенным экзоном 10) называется 4R-тау, при этом «R» относится к числу повторов связывающих микротрубочки доменов. Тау без экзона 10 называется 3R-тау. Так как большее количество связывающих микротрубочки доменов (4R по сравнению с 3R) повышает связывание с микротрубочками, 4R-тау предположительно существенно повышает связывание и
35 сборку микротрубочек. Соотношение 3R/4R-тау регулируется в процессе развития, при этом ткани плода экспрессируют исключительно 3R-тау, а ткани взрослого человека экспрессируют приблизительно одинаковые уровни 3R/4R-тау. Отклонения от нормального соотношения 3R/4R-

тау характерны для нейродегенеративных ЛВД таупатий. Неизвестно, как изменение соотношения 3R/4R-тау на более поздней стадии у взрослого животного повлияет на патогенез тау.

Направленное на серин-треонин фосфорилирование регулирует способность тау связывать микротрубочки. Гиперфосфорилирование стимулирует отделение тау от микротрубочек. Были описаны другие посттрансляционные модификации тау; однако их значимость не выяснена. Фосфорилирование тау также регулируется в процессе развития с более высоким уровнем фосфорилирования в тканях плода и намного меньшим уровнем фосфорилирования у взрослого. Одной из характеристик нейродегенеративных расстройств является aberrantное повышение фосфорилирования тау. Сеть микротрубочек вовлечена во многие важные процессы в клетке, включая структурную целостность, необходимую для поддержания морфологии клеток и работы транспортного аппарата. Так как связывание тау стабилизирует микротрубочки, вероятно, тау является ключевым медиатором некоторых из этих процессов, а разрушение нормального тау при нейродегенеративных заболеваниях может нарушать некоторые из этих ключевых клеточных процессов. Одним из первых показателей того, что тау может быть важен при нейродегенеративных синдромах, было понимание того, что тау является ключевым компонентом нейрофибриллярных включений при болезни Альцгеймера. По существу нейрофибриллярные включения представляют собой агрегаты гиперфосфорилированного белка тау. Наряду с содержащими амилоид бета бляшками нейрофибриллярные включения являются отличительным признаком болезни Альцгеймера и в значительной мере коррелируют с когнитивным нарушением. 95% накоплений тау при БА обнаруживаются в нейрональных процессах, что называется нейритической дистрофией. Процесс (ы), посредством которого (ых) этот связанный с микротрубочками белок отсоединяется от микротрубочек и образует накопления белков, а также то, как это связано с нейрональной токсичностью, до конца не понятны.

Нейрональные включения тау являются патологической характеристикой не только болезни Альцгеймера, но также подгруппы из лобно-височной деменции (ЛВД), ПНП и КГД. Связь между тау и нейродегенерацией была укреплена открытием, что мутации в гене тау приводят к подгруппе ЛВД. Эти генетические данные также подчеркнули важность 3R:4R соотношения тау. Многие из мутаций тау, которые вызывают ЛВД, приводят к изменению сплайсинга тау, который приводит к преимущественному включению экзона 10 и, таким образом, к повышению 4R-тау. Общие уровни тау остаются нормальными. Неизвестно, вызывает ли нейродегенерацию изменение изоформы тау или аминокислотное изменение, или же они оба. Появившиеся недавно данные позволяют предположить, что ПНП также может быть связан с повышением 4R:3R соотношения тау.

Чтобы помочь в понимании влияния соотношения тау на нейродегенерацию была создана мышьяная модель на основании одной и мутаций сплайсинга тау (N279K) с применением минигена, который содержит промотор тау и фланкирующие интронные последовательности экзона 10. Как и люди, эти мыши демонстрировали повышенные уровни 4R-тау по сравнению с трансгенными животными, экспрессирующими тау ДТ, и у них развивались поведенческие и

двигательные аномалии, а также наблюдалось накопление агрегированного тау в головном мозге и спинном мозге.

Белок так был связан с многими заболеваниями головного мозга, включая болезнь Альцгеймера, ЛВД, ПНП, КГД, деменцию боксеров, паркинсонизм, сцепленный с хромосомой, 5 болезнь Литико-Бодига, деменцию с преобладанием сплетений, ганглиоглиому, ганглиоцитому, менингиоангиоматоз, подострый склерозирующий панэнцефалит, свинцовую энцефалопатию, туберозный склероз, болезнь Галлервордена-Шпатца, болезнь Пика, болезнь аргирофильных гранул, кортикобазальную дегенерацию или лобно-височную лобарную дегенерацию и другие. Тау-ассоциированные расстройства, такие как БА, являются наиболее частой причиной деменции 10 у людей старшего возраста. По оценкам БА поражено 15 миллионов людей по всему миру, при этом 40% этой популяции находится в возрасте более 85 лет. БА характеризуется двумя патологическими признаками: нейрофибриллярными включениями тау (НФТ) и бляшками амилоида- β (А β).

На сегодняшний день отсутствуют приемлемые варианты лечения таких 15 нейродегенеративных заболеваний. Следовательно, целью этого изобретения является обеспечение способов лечения таких заболеваний.

Краткое описание сущности изобретения

В данном документе предложены соединения и способы для снижения количества или 20 активности мРНК тау в клетке или организме животного и, в определенных вариантах реализации изобретения, снижения количества белка тау в клетке или организме животного. В определенных вариантах реализации изобретения животное имеет нейродегенеративное заболевание. В определенных вариантах реализации изобретения животное имеет таупатию, болезнь Альцгеймера, лобно-височную деменцию (ЛВД), ЛВДП-17, прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП), хроническую травматическую энцефалопатию (ХТЭ), кортикобазальную 25 ганглиозную дегенерацию (КГД), эпилепсию и синдром Драве. В определенных вариантах реализации изобретения соединения, применимые для снижения экспрессии мРНК тау, представляют собой олигомерные соединения. В определенных вариантах реализации изобретения соединение № 814907 применимо для снижения экспрессии мРНК тау и/или белка тау. 30

Также предложены способы, применимые для предотвращения или уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома нейродегенеративного заболевания. В определенных вариантах реализации изобретения такие симптомы включают потерю памяти, потерю двигательной функции и повышение числа и/или объема нейрофибриллярных включений. 35 В определенных вариантах реализации изобретения предотвращение или уменьшение интенсивности приводит к поддержанию или улучшению памяти, поддержанию или улучшению двигательной функции и/или сохранению или снижению числа и/или объема нейрофибриллярных включений. В определенных вариантах реализации изобретения такое предотвращение или

уменьшение интенсивности симптомов представляет собой снижение скорости прогрессирования или замедления появления таких симптомов.

Подробное описание изобретения

5 Следует понимать, что как вышеприведенное общее описание, так и нижеприведенное подробное описание являются исключительно примерными и пояснительными и не являются ограничительными. В данном документе применение формы единственного числа включает множественное, если специально не указано иное. В контексте данного документа употребление «или» означает «и/или», если не указано иное. Кроме того, употребление термина «включая», а также других его форм, таких как «включает» и «включал», не является ограничивающим. Также, 10 такие термины как «элемент» или «компонент» включают элементы и компоненты, содержащие одну единицу, и элементы и компоненты, содержащие, которые содержат более одной субъективности, если специально не указано иное.

15 Применяемые в данном документе заголовки разделов предназначены для целей упорядочения и не должны восприниматься, как ограничение описываемого предмета изобретения. Все документы или части документов, цитируемые в этой заявке, включая, но не ограничиваясь этим, патенты, патентные заявки, статьи, книги и трактаты, явным образом включены в данный документ посредством ссылки в отношении обсуждаемых частей этих документов, а также их полного содержания.

20 *Определения*

Если не приведены конкретные определения, описанные в данном документе процедуры и способы аналитической химии, синтетической органической химии и медицинской и фармацевтической химии, а также используемая в связи с ними номенклатура, широко известны и обычно используются в данной области техники. В разрешенных случаях все патенты, заявки, опубликованные заявки и другие публикации, а также другие данные, на которые приведены ссылки в тексте описания, в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

Если не указано иное, нижеприведенные термины имеют следующие значения:

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

30 В контексте данного документа «2'-дезоксинуклеозид» означает нуклеозид, содержащий 2'-Н(Н) фуранозильный сахарный фрагмент, встречающийся в дезоксирибонуклеиновых кислотах (ДНК) природного происхождения. В определенных вариантах реализации изобретения 2'-дезоксинуклеозид может содержать модифицированное нуклеоснование или может содержать нуклеоснование РНК (урацил).

35 В контексте данного документа «2'-замещенный нуклеозид» означает нуклеозид, содержащий 2'-замещенный сахарный фрагмент. В контексте данного документа «2'-замещенный» в отношении сахарного фрагмента означает сахарный фрагмент, содержащий по меньшей мере одну группу 2'-заместителей, отличную от Н или ОН.

В контексте данного документа «введение» означает применение фармацевтического агента к животному.

В контексте данного документа «животное» означает человека или отличное от человека животное.

5 В контексте данного документа «антисмысловая активность» означает любое выявляемое и/или измеряемое изменение, связанное с гибридизацией антисмыслового соединения со своей целевой нуклеиновой кислотой. В определенных вариантах реализации изобретения антисмысловая активность представляет собой снижение количества экспрессии целевой нуклеиновой кислоты или белка, кодируемого такой целевой нуклеиновой кислотой, по
10 сравнению с уровнями целевой нуклеиновой кислоты или уровнями целевого белка в отсутствие антисмыслового соединения.

В контексте данного документа «антисмысловое соединение» означает олигомерное соединение или олигомерную двойную спираль, способную осуществлять по меньшей мере один вид антисмысловой активности.

15 В контексте данного документа «уменьшать интенсивность» в отношении лечения означает улучшение по меньшей мере одного симптома относительно того же самого симптома в отсутствие лечения. В определенных вариантах реализации изобретения уменьшение интенсивности представляет собой снижение тяжести или частоты симптомов, или замедление появления или замедление прогрессирования в отношении тяжести или частоты симптомов. В
20 определенных вариантах реализации изобретения симптом представляет собой потерю памяти, потерю двигательной функции или повышение числа и/или объема нейрофибриллярных включений. В определенных вариантах реализации изобретения уменьшение интенсивности этих симптомов приводит к поддержанию или улучшению памяти, поддержанию или улучшению двигательной функции и/или сохранению или снижению числа и/или объема нейрофибриллярных
25 включений.

В контексте данного документа «по меньшей мере один симптом нейродегенеративного заболевания» включает потерю памяти, потерю двигательной функции или повышение числа и/или объема нейрофибриллярных включений.

В контексте данного документа «бициклический нуклеозид» или «БНК» означает
30 нуклеозид, содержащий бициклический сахарный фрагмент. В контексте данного документа «бициклический сахар» или «бициклический сахарный фрагмент» означает модифицированный сахарный фрагмент, содержащий два кольца, причем второе кольцо образовано посредством мостика, соединяющего два атома в первом кольце, образуя, тем самым, бициклическую структуру. В определенных вариантах реализации изобретения первое кольцо бициклического
35 сахарного фрагмента представляет собой фуранозильный фрагмент. В определенных вариантах реализации изобретения бициклический сахарный фрагмент не содержит фуранозильный фрагмент.

В контексте данного документа «хирально обогащенная популяция» означает множество молекул с идентичной молекулярной формулой, причем число или процентное содержание молекул в популяции, которые имеют конкретную стереохимическую конфигурацию в конкретном хиральном центре, больше, чем число или процентное содержание молекул, которые
5 ожидаемо могут иметь такую же конкретную стереохимическую конфигурацию в том же конкретном хиральном центре в популяции в случае, если конкретный хиральный центр был бы стереослучайным. Хирально обогащенные популяции молекул, имеющих несколько хиральных центров в каждой молекуле, могут содержать один или более стереослучайных хиральных центров. В определенных вариантах реализации изобретения молекулы представляют собой
10 модифицированные олигонуклеотиды. В определенных вариантах реализации изобретения молекулы представляют собой соединения, содержащие модифицированные олигонуклеотиды.

В контексте данного документа «отщепляемый фрагмент» означает связь или группу атомов, которые отщепляются в физиологических условиях, например, внутри клетки, организма животного или человека.

15 В контексте данного документа «комплементарный» в отношении олигонуклеотида означает, что по меньшей мере 70% нуклеоснований олигонуклеотида или одна или более его областей и нуклеоснований другой нуклеиновой кислоты или одна или более ее областей способны образовывать водородные связи друг с другом при расположении последовательности нуклеоснований олигонуклеотида и другой нуклеиновой кислоты в противоположных
20 направлениях. Комплементарные нуклеоснования означают нуклеоснования, которые способны образовывать водородные связи друг с другом. Пары комплементарных нуклеоснований включают аденин (A) и тимин (T), аденин (A) и урацил (U), цитозин (C) и гуанин (G), 5-метилцитозин (mC) и гуанин (G). Комплементарные олигонуклеотиды и/или нуклеиновые кислоты не обязательно должны характеризоваться комплементарностью нуклеоснований в
25 каждом нуклеозиде. Скорее допустимы некоторые несовпадения. В контексте данного документа «полностью комплементарный» или «на 100% комплементарный» в отношении олигонуклеотидов означает, что олигонуклеотиды комплементарны другому олигонуклеотиду или нуклеиновой кислоты в каждом нуклеозиде олигонуклеотида.

В контексте данного документа «сопряженная группа» означает группу атомов, которая
30 прямым или непрямым образом присоединена к олигонуклеотиду. Сопряженные группы включают сопряженный фрагмент и сопряженный линкер, которые присоединяет сопряженный фрагмент к олигонуклеотиду.

В контексте данного документа «сопряженный линкер» означает группу атомов, содержащую по меньшей мере одну связь, которая соединяет сопряженный фрагмент с
35 олигонуклеотидом.

В контексте данного документа «сопряженный фрагмент» означает группу атомов, которая присоединена к олигонуклеотиду посредством сопряженного линкера.

В данном документе «непрерывный» в контексте олигонуклеотида относится к нуклеозидам, нуклеосообразованиям, сахарным фрагментам или межнуклеозидным связям, которые непосредственно прилегают друг к другу. Например, выражение «непрерывные нуклеосообразования» означает нуклеосообразования, которые непосредственно прилегают друг к другу в последовательности.

В контексте данного документа «гэпмер» означает модифицированный олигонуклеотид, содержащий внутреннюю область, содержащую некоторое количество нуклеозидов, которые поддерживают расщепление РНКазой H, расположенную между внешними областями, содержащими один или более нуклеозидов, причем нуклеозиды, составляющие внутреннюю область, химически отличаются от нуклеозида или нуклеозидов, составляющих внешние области. Внутренняя область может называться «гэпом», а внешние области могут называться «крыльями». Если не указано иное, «гэпмер» относится к сахарному мотиву. Если не указано иное, сахарные фрагменты нуклеозидов гэпа гэпмера представляют собой немодифицированный 2'-дезоксифуранозил. Таким образом, термин «гэпмер МОЭ» указывает на гэпмер, содержащий сахарный мотив из 2'-МОЭ нуклеозидов в обоих крыльях и гэп из 2'-дезоксинуклеозидов. Если не указано иное, гэпмер МОЭ может содержать одну или более модифицированных межнуклеозидных связей и/или одно или более модифицированных нуклеосообразований, и такие модификации не обязательно соответствуют структуре гэпмера сахарных модификаций.

В контексте данного документа «гибридизация» означает спаривание или отжиг комплементарных олигонуклеотидов и/или нуклеиновых кислот. Не ограничиваясь конкретным механизмом, наиболее обычный механизм гибридизации включает водородное связывание, которое может представлять собой Уотсон-Криковское, Хугстеновское или обратное Хугстеновское водородное связывание между комплементарными нуклеосообразованиями.

В контексте данного документа термин «межнуклеозидная связь» представляет ковалентную связь между смежными нуклеозидами в олигонуклеотиде. В контексте данного документа «модифицированная межнуклеозидная связь» означает любую межнуклеозидную связь, отличную от фосфодиэфирной межнуклеозидной связи. «Тиофосфатная связь» представляет собой межнуклеозидную связь, в которой один из немостиговых атомов кислорода фосфодиэфирной межнуклеозидной связи замещен атомом серы.

В контексте данного документа «линкер-нуклеозид» означает нуклеозид, который соединяет, прямо или непрямо, олигонуклеотид и сопряженный фрагмент. Линкер-нуклеозиды расположены в пределах сопряженного линкера олигомерного соединения. Линкер-нуклеозиды не считаются частью олигонуклеотидного фрагмента олигомерного соединения, даже если они являются непрерывными с олигонуклеотидом.

В контексте данного документа «не бициклический модифицированный сахарный фрагмент» означает модифицированный сахарный фрагмент, который содержит модификацию, такую как заместитель, который не образует мостик между двумя атомами сахара с образованием второго кольца.

В контексте данного документа «несовпадение» или «некомплементарность» означает нуклеосодержащее основание первого олигонуклеотида, которое не является комплементарным с соответствующим нуклеосодержащим основанием второго олигонуклеотида или целевой нуклеиновой кислоты при выравнивании первого и второго олигомерного соединения.

5 В контексте данного документа «МОЭ» означает метоксиэтил. «2'-МОЭ» означает группу $-OCH_2CH_2OCH_3$ в 2' позиции фуранозильного кольца.

В контексте данного документа «мотив» означает структуру немодифицированных и/или модифицированных сахарных фрагментов, нуклеосодержащих оснований и/или межнуклеозидных связей в олигонуклеотиде.

10 В контексте данного документа «мРНК» означает РНК-транскрипт, который кодирует белок, и включает пре-мРНК и зрелую мРНК, если не указано иное.

В контексте данного документа «нуклеосодержащее основание» означает немодифицированное нуклеосодержащее основание или модифицированное нуклеосодержащее основание. В контексте данного документа «немодифицированное нуклеосодержащее основание» представляет собой аденин (A), тимин (T), цитозин (C), урацил (U) и гуанин (G). В контексте данного документа «модифицированное нуклеосодержащее основание» представляет собой группу атомов, отличную от немодифицированных A, T, C, U или G, способную спариваться по меньшей мере с одним немодифицированным нуклеосодержащим основанием. «5-метилцитозин» представляет собой модифицированное нуклеосодержащее основание. Универсальное основание представляет собой модифицированное нуклеосодержащее основание, которое может спариваться с любым из пяти немодифицированных нуклеосодержащих оснований. В контексте данного документа «последовательность нуклеосодержащих оснований» означает порядок непрерывных нуклеосодержащих оснований в нуклеиновой кислоте или олигонуклеотиде, независимо от любых модификаций сахаров или межнуклеозидных связей.

15

20

В контексте данного документа «нуклеозид» означает соединение, содержащее нуклеосодержащее основание и сахарный фрагмент. Нуклеосодержащее основание и сахарный фрагмент независимо являются немодифицированными или модифицированными. В контексте данного документа «модифицированный нуклеозид» означает нуклеозид, содержащий модифицированное нуклеосодержащее основание и/или модифицированный сахарный фрагмент. Модифицированные нуклеозиды включают абазические нуклеозиды, в которых отсутствует нуклеосодержащее основание. «Связанные нуклеозиды» представляют собой нуклеозиды, которые соединены в непрерывной последовательности (т. е. между связанными нуклеозидами нет дополнительных нуклеозидов).

25

30

В контексте данного документа «олигомерное соединение» означает олигонуклеотид и, необязательно, один или более дополнительных элементов, таких как сопряженная группа или концевая группа. Олигомерное соединение может быть спарено со вторым олигомерным соединением, которое является комплементарным первому олигомерному соединению, или может оставаться неспаренным. «Одноцепочечное олигомерное соединение» представляет собой неспаренное олигомерное соединение. Термин «олигомерная двойная спираль» означает двойную спираль, образованную двумя олигомерными соединениями, имеющими комплементарные

35

последовательности нуклеоснований. Каждое олигомерное соединение олигомерной двойной спирали может называться «дулексным олигомерным соединением».

В контексте данного документа «олигонуклеотид» означает цепь из связанных нуклеозидов, соединенных межнуклеозидными связями, причем каждый нуклеозид и каждая межнуклеозидная связь могут быть модифицированными или немодифицированными. Если не
5 указано иное, олигонуклеотиды состоят из 8-50 связанных нуклеозидов. В контексте данного документа «модифицированный олигонуклеотид» означает олигонуклеотид, в котором по меньшей мере один нуклеозид или по меньшей мере одна межнуклеозидная связь были модифицированы. В контексте данного документа «немодифицированный олигонуклеотид»
10 означает олигонуклеотид, который не содержит никаких нуклеозидных модификаций или межнуклеозидных модификаций.

В контексте данного документа «фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель» означает любое вещество, подходящее для применения при введении животному. Некоторые такие носители дают возможность готовить фармацевтические композиции в виде,
15 например, таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, взвесей, суспензий и леденцов для перорального проглатывания субъектом. В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель представляет собой стерильную воду; стерильный солевой раствор; или стерильный буферный раствор.

В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемые соли» означает
20 физиологически и фармацевтически приемлемые соли соединений, таких как олигомерные соединения, т. е. соли, которые сохраняют необходимую биологическую активность родительского соединения и не придают ему нежелательных токсикологических эффектов.

В контексте данного документа термин «фармацевтическая композиция» означает смесь веществ, подходящую для введения субъекту. Например, фармацевтическая композиция может
25 содержать антисмысловое соединение и стерильный водный раствор. В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция демонстрирует активность в анализе свободного поглощения в определенных линиях клеток.

В контексте данного документа «фосфорный фрагмент» означает группу атомов, содержащую атом фосфора. В определенных вариантах реализации изобретения фосфорный
30 фрагмент включает моно-, ди- или трифосфат или тиофосфат.

В контексте данного документа «пролекарственный препарат» означает терапевтический агент в такой форме за пределами организма, которая преобразуется в другую форму в организме животного или его клетках. Как правило, преобразование пролекарственного препарата в
организме животного облегчается действием ферментов (например, эндогенного или вирусного
35 фермента) или химических веществ, присутствующих в клетках или тканях, и/или физиологическими условиями.

В контексте данного документа «снижение или ингибирование количества активности» относится к снижению или блокированию транскрипционной экспрессии или активности

относительно транскрипционной экспрессии или активности в необработанном или контрольном образце и необязательно указывает на полное устранение транскрипционной экспрессии или активности.

В контексте данного документа «соединение РНКи» означает антисмысловое соединение, которое действует, по меньшей мере частично, посредством RISC или Ago2, модулируя целевую нуклеиновую кислоту и/или белок, кодируемый целевой нуклеиновой кислотой. Соединения РНКи включают, но не ограничиваются этим, двухцепочечную миРНК, одноцепочечную РНК (оцРНК) и микроРНК, включая миметики микроРНК. В определенных вариантах реализации изобретения соединение РНКи модулирует количество, активность и/или сплайсинг целевой нуклеиновой кислоты. Термин соединение РНКи исключает антисмысловые соединения, которые действуют посредством РНКазы H.

В контексте данного документа «самокомплементарный» в отношении олигонуклеотида означает олигонуклеотид, который по меньшей мере частично гибридизируется сам с собой.

В контексте данного документа «стандартный клеточный анализ» означает анализ, описанный в примере 1 и его целесообразные вариации.

В данном документе «стереослучайный хиральный центр» в контексте популяции молекул с идентичной молекулярной формулой означает хиральный центр, имеющий случайную стереохимическую конфигурацию. Например, в популяции молекул, содержащих стереослучайный хиральный центр, число молекул, имеющих (*S*)-конфигурацию стереослучайного хирального центра, может, но не обязательно, быть таким же, как и число молекул, имеющих (*R*)-конфигурацию стереослучайного хирального центра. Стереохимическая конфигурация хирального центра считается случайной, когда она является результатом синтетического способа, который не предназначен для контроля стереохимической конфигурации. В определенных вариантах реализации изобретения стереослучайный хиральный центр представляет собой стереослучайную тиофосфатную межнуклеозидную связь.

В контексте данного документа «сахарный фрагмент» означает немодифицированный сахарный фрагмент или модифицированный сахарный фрагмент. В контексте данного документа «немодифицированный сахарный фрагмент» означает 2'-ОН(Н) фуранозильный фрагмент, встречающийся в РНК («немодифицированный сахарный фрагмент РНК»), или 2'-Н(Н) фрагмент, встречающийся в ДНК («немодифицированный сахарный фрагмент ДНК»). Немодифицированные сахарные фрагменты имеют по одному атому водорода в каждой из 1', 3' и 4' позиций, кислород в 3' позиции и два водорода в 5' позиции. В контексте данного документа «модифицированный сахарный фрагмент» или «модифицированный сахар» означает модифицированный фуранозильный сахарный фрагмент или сахарный суррогат. В контексте данного документа модифицированный фуранозильный сахарный фрагмент означает фуранозильный сахар, содержащий отличный от водорода заместитель на месте по меньшей мере одного водорода немодифицированного сахарного фрагмента. В определенных вариантах реализации изобретения модифицированный фуранозильный сахарный фрагмент представляет собой 2'-замещенный

сахарный фрагмент. Такие модифицированные фуранозильные сахарные фрагменты включают бициклические сахара и небциклические сахара.

5 В контексте данного документа «сахарный суррогат» означает модифицированный сахарный фрагмент, содержащий отличный от фуранозильного фрагмент, который может связывать нуклеосодержащую группу с другой группой, такой как межнуклеозидная связь, сопряженная группа или концевая группа в олигонуклеотиде. Модифицированные нуклеозиды, содержащие сахарные суррогаты, могут быть внесены в одну или более позиций в олигонуклеотиде, и такие олигонуклеотиды способны гибридизироваться с комплементарными олигомерными соединениями или нуклеиновыми кислотами.

10 В контексте данного документа «целевая нуклеиновая кислота» и «целевая РНК» означают нуклеиновую кислоту, на которую должно влиять антисмысловое соединение.

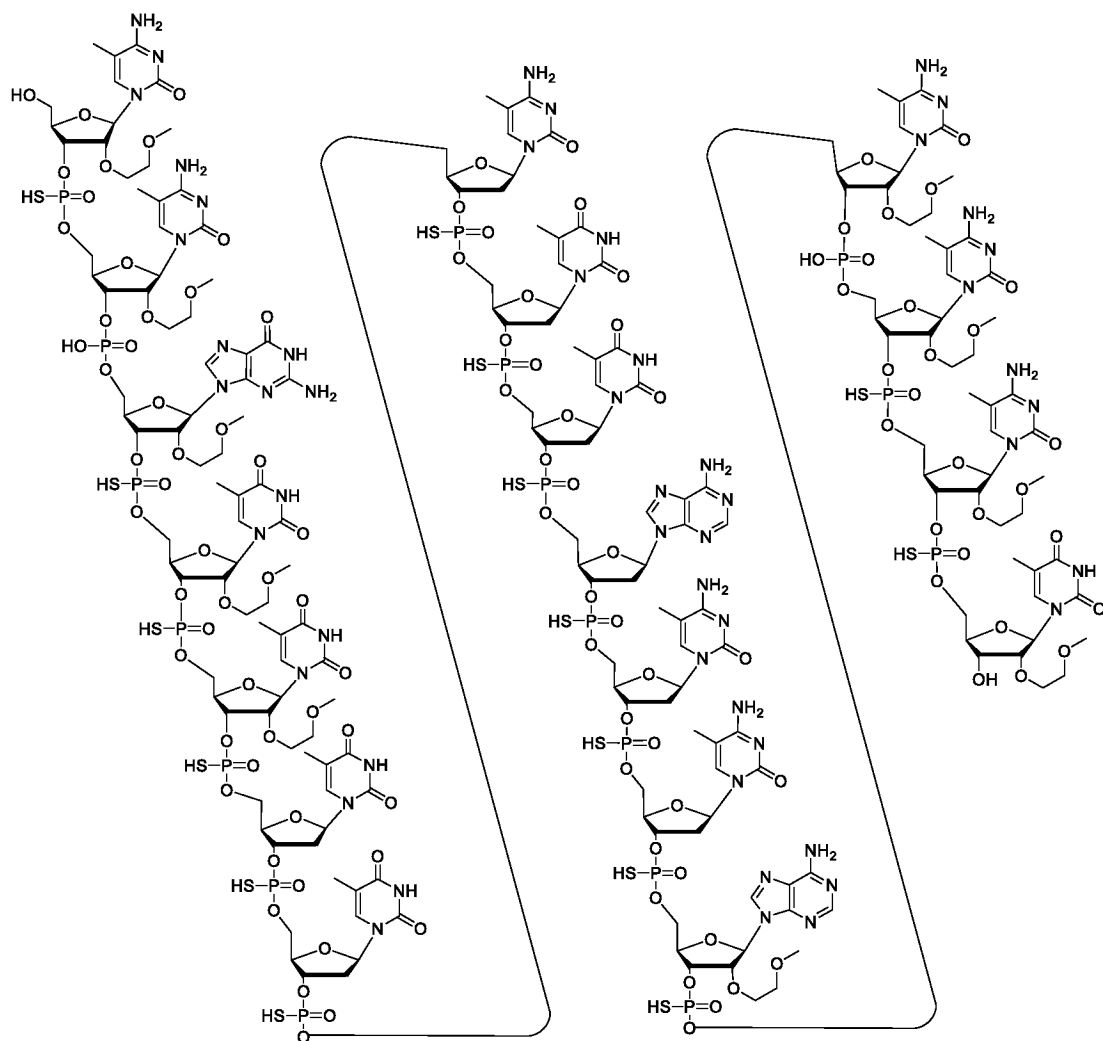
В контексте данного документа «целевая область» означает часть целевой нуклеиновой кислоты, с которой должно гибридизироваться олигомерное соединение.

15 В контексте данного документа «концевая группа» означает химическую группу или группу атомов, которая ковалентно связана с концом олигонуклеотида.

В контексте данного документа «терапевтически эффективное количество» означает количество фармацевтического агента, которое обеспечивает терапевтическое благоприятное действие для животного. Например, терапевтически эффективное количество улучшает симптом заболевания.

20 В данном изобретении предложены следующие неограничивающие пронумерованные варианты реализации:

Вариант реализации изобретения 1: Модифицированный нуклеотид в соответствии со следующей формулой:



(SEQ ID NO: 8).

5

В соответствии с приведенными в данном документе определениями и описанием, соединения варианта реализации изобретения 1 можно получать, преднамеренно контролируя стереохимию любых, всех или ни одной из связей.

Вариант реализации изобретения 2: Олигомерное соединение, содержащее

10 модифицированный нуклеотид в соответствии со следующей формулой: mCes mCeo Ges Tes Tes Tds Tds mCds Tds Tds Ads mCds mCds Aes mCeo mCes mCes Te; где

A = аденин,

mC = 5-метилцитозин,

G = гуанин,

15 T = тимин,

e = 2'-МОЭ нуклеозид,

d = 2'-дезоксинуклеозид,
s = тиофосфатная межнуклеозидная связь и
o = фосфодиэфирная межнуклеозидная связь.

5 Вариант реализации изобретения 3: Олигомерное соединение по варианту реализации изобретения 2, содержащее сопряженную группу.

Вариант реализации изобретения 4: Олигомерная двойная спираль, содержащая олигомерное соединение по варианту реализации изобретения 2 или варианту реализации изобретения 3.

10 Вариант реализации изобретения 5: Антисмысловое соединение, содержащее или состоящее из модифицированного олигонуклеотида в соответствии с вариантом реализации изобретения 1, олигомерного соединения в соответствии с вариантом реализации изобретения 2 или вариантом реализации изобретения 3, или олигомерной двойной спирали в соответствии с вариантом реализации изобретения 4.

15 Вариант реализации изобретения 6: Фармацевтическая композиция, содержащая модифицированный олигонуклеотид в соответствии с вариантом реализации изобретения 1, олигомерное соединение в соответствии с вариантом реализации изобретения 2 или вариантом реализации изобретения 3, или олигомерную двойную спираль в соответствии с вариантом реализации изобретения 4, или их соль и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

20 Вариант реализации изобретения 7: Композиция по варианту реализации изобретения 6, отличающаяся тем, что соль является натриевой.

Вариант реализации изобретения 8: Способ, включающий введение животному фармацевтической композиции в соответствии с вариантом реализации изобретения 6 или вариантом реализации изобретения 7.

25 Вариант реализации изобретения 9: Способ лечения заболевания, связанного с тау, включающий введение индивиду с повышенным риском развития заболевания, связанного с тау, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции в соответствии с вариантом реализации изобретения 6 или вариантом реализации изобретения 7; и лечение, таким образом, заболевания, связанного с тау.

30 Вариант реализации изобретения 10: Способ по варианту реализации изобретения 9, отличающийся тем, что заболевание, связанное с тау, представляет собой нейродегенеративное заболевание.

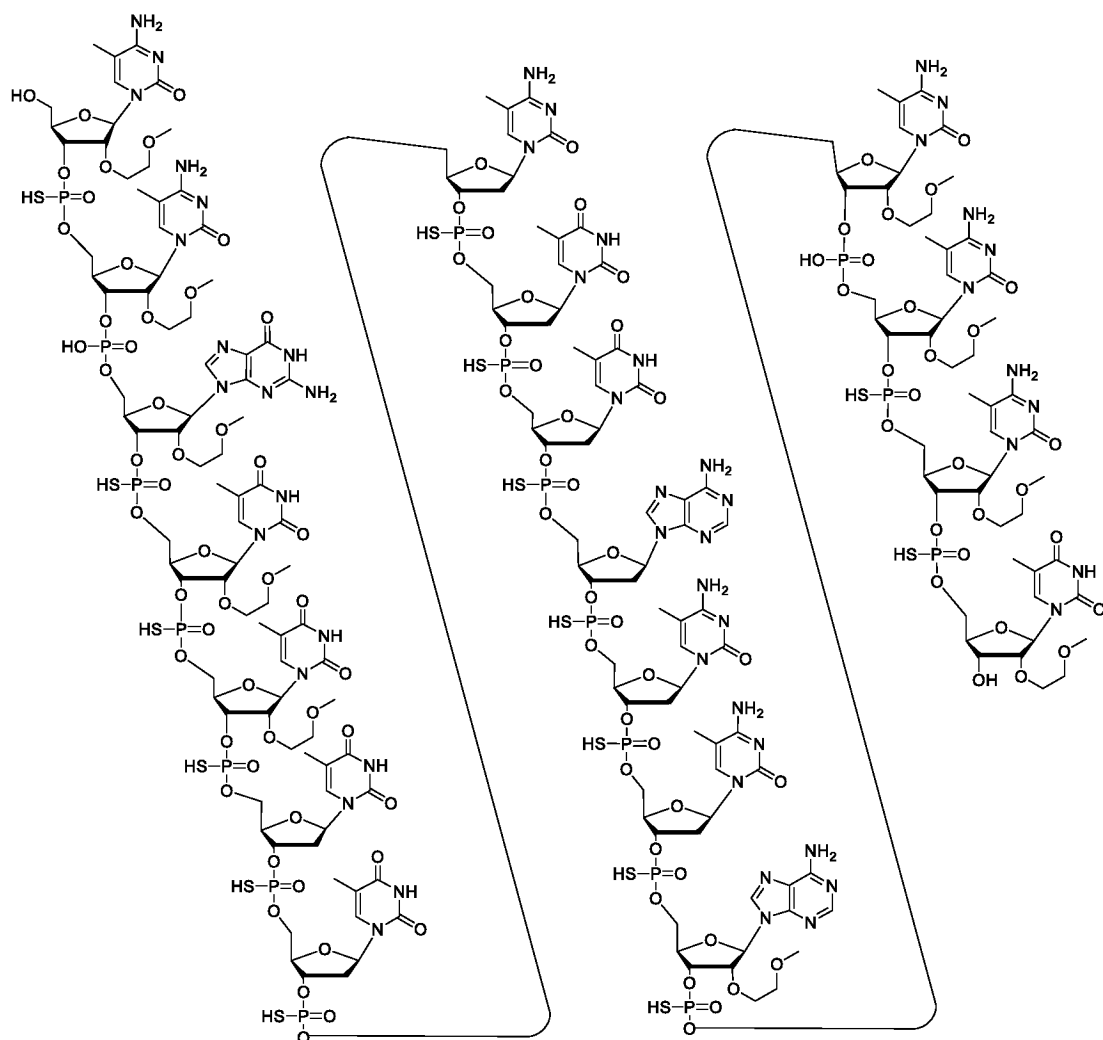
Вариант реализации изобретения 11: Способ по варианту реализации изобретения 10, отличающийся тем, что нейродегенеративное заболевание представляет собой любое из таупатии,

болезни Альцгеймера, лобно-височной деменции (ЛВД), ЛВДП-17, прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП), хронической травматической энцефалопатии (ХТЭ), кортикобазальной ганглиозной дегенерации (КГД), эпилепсии и синдрома Драве.

5 Вариант реализации изобретения 12: Способ по варианту реализации изобретения 10 или варианту реализации изобретения 11, отличающийся тем, что происходит уменьшение интенсивности по меньшей мере одного симптома нейродегенеративного заболевания.

Вариант реализации изобретения 13: Способ по варианту реализации изобретения 12, отличающийся тем, что симптом представляет собой любой из потери памяти, потери двигательной функции и повышения числа и/или объема нейрофибриллярных включений.

10 Вариант реализации изобретения 14: Модифицированный нуклеотид в соответствии с формулой:



(SEQ ID NO: 8)

или его соль.

Вариант реализации изобретения 15: Модифицированный олигонуклеотид по варианту реализации изобретения 14, который представляет собой натриевую соль формулы.

Вариант реализации изобретения 16: Соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид, отличающееся тем, что модифицированный олигонуклеотид представляет собой гэмпер, состоящий из сегмента 5' крыла, сегмента центрального гэта и сегмента 3' крыла, где:

5 сегмент 5' крыла состоит из пяти 2'-МОЭ нуклеозидов,
сегмент центрального гэта состоит из восьми 2'-дезоксинуклеозидов, а
сегмент 3' крыла состоит из пяти 2'-МОЭ нуклеозидов;

при этом модифицированный олигонуклеотид имеет последовательность нуклеоснований 5'-CCGTTTCTTACCACCCT-3' (SEQ ID NO: 8), где каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин; и где межнуклеозидные связи модифицированного олигонуклеотида представляют собой, от 5' к 3', sosssooooooooooss, где каждый s представляет собой тиофосфатную связь, а каждый o представляет собой фосфодиэфирную связь.

10

Вариант реализации изобретения 17: Модифицированный олигонуклеотид, отличающийся тем, что модифицированный олигонуклеотид представляет собой гэмпер, состоящий из сегмента 5' крыла, сегмента центрального гэта и сегмента 3' крыла, где:

сегмент 5' крыла состоит из пяти 2'-МОЭ нуклеозидов,
сегмент центрального гэта состоит из восьми 2'-дезоксинуклеозидов, а
сегмент 3' крыла состоит из пяти 2'-МОЭ нуклеозидов;

при этом модифицированный олигонуклеотид имеет последовательность нуклеоснований 5'-CCGTTTCTTACCACCCT-3' (SEQ ID NO: 8), где каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин; и где межнуклеозидные связи модифицированного олигонуклеотида представляют собой, от 5' к 3', sosssooooooooooss, где каждый s представляет собой тиофосфатную связь, а каждый o представляет собой фосфодиэфирную связь.

15

20

25

Вариант реализации изобретения 18: Хирально обогащенная популяция модифицированных олигонуклеотидов по любому из вариантов реализации изобретения 14, 15 или 17, отличающаяся тем, что популяция обогащена в отношении модифицированных олигонуклеотидов, содержащих по меньшей мере одну конкретную тиофосфатную межнуклеозидную связь, имеющую конкретную стереохимическую конфигурацию.

30

Вариант реализации изобретения 19: Хирально обогащенная популяция по варианту реализации изобретения 18, отличающаяся тем, что популяция обогащена в отношении модифицированных олигонуклеотидов, содержащих по меньшей мере одну конкретную тиофосфатную межнуклеозидную связь, имеющую (*S*p)-конфигурацию.

Вариант реализации изобретения 20: Хирально обогащенная популяция по варианту реализации изобретения 18, отличающаяся тем, что популяция обогащена в отношении модифицированных олигонуклеотидов, содержащих по меньшей мере одну конкретную тиофосфатную межнуклеозидную связь, имеющую (*Rp*)-конфигурацию.

5 Вариант реализации изобретения 21: Хирально обогащенная популяция по варианту реализации изобретения 18, отличающаяся тем, что популяция обогащена в отношении модифицированных олигонуклеотидов, имеющих конкретную, независимо выбранную стереохимическую конфигурацию в каждой тиофосфатной межнуклеозидной связи.

10 Вариант реализации изобретения 22: Хирально обогащенная популяция по варианту реализации изобретения 21, отличающаяся тем, что популяция обогащена в отношении модифицированных олигонуклеотидов, имеющих (*Sp*)-конфигурацию в каждой тиофосфатной межнуклеозидной связи.

15 Вариант реализации изобретения 23: Хирально обогащенная популяция по варианту реализации изобретения 21, отличающаяся тем, что популяция обогащена в отношении модифицированных олигонуклеотидов, имеющих (*Rp*)-конфигурацию в каждой тиофосфатной межнуклеозидной связи.

20 Вариант реализации изобретения 24: Хирально обогащенная популяция по варианту реализации изобретения 21, отличающаяся тем, что популяция обогащена в отношении модифицированных олигонуклеотидов, имеющих (*Rp*)-конфигурацию в одной конкретной тиофосфатной межнуклеозидной связи и (*Sp*)-конфигурацию в каждой из оставшихся тиофосфатных межнуклеозидных связей.

25 Вариант реализации изобретения 25: Хирально обогащенная популяция по варианту реализации изобретения 18 или варианту реализации изобретения 21, отличающаяся тем, что популяция обогащена в отношении модифицированных олигонуклеотидов, имеющих по меньшей мере 3 смежные тиофосфатные межнуклеозидные связи в *Rp*-, *Sp*- и *Sp*-конфигурациях в направлении от 5' к 3'.

30 Вариант реализации изобретения 26: Хирально обогащенная популяция модифицированных олигонуклеотидов по любому из вариантов реализации изобретения 1-17, отличающаяся тем, что все тиофосфатные межнуклеозидные связи модифицированного олигонуклеотида являются стереослучайными.

Вариант реализации изобретения 27: Фармацевтическая композиция, содержащая модифицированный олигонуклеотид по любому из вариантов реализации изобретения 14, 15 или 17 и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

Вариант реализации изобретения 28: Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию модифицированных олигонуклеотидов по любому из вариантов реализации изобретения 18-26 и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

5 Вариант реализации изобретения 29: Фармацевтическая композиция по варианту реализации изобретения 27 или варианту реализации изобретения 28, отличающаяся тем, что фармацевтически приемлемый разбавитель представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ) или искусственный CSF (aCSF).

10 Вариант реализации изобретения 30: Фармацевтическая композиция по варианту реализации изобретения 27 или варианту реализации изобретения 28, отличающаяся тем, что фармацевтическая композиция состоит преимущественно из модифицированного олигонуклеотида и фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ) или искусственного CSF (aCSF).

15 **I. Определенные олигонуклеотиды**

В определенных вариантах реализации изобретения в данном документе предложены олигонуклеотиды, которые состоят из связанных нуклеозидов. Олигонуклеотиды могут представлять собой немодифицированные олигонуклеотиды (РНК или ДНК) или могут представлять собой модифицированные олигонуклеотиды. Модифицированные олигонуклеотиды содержат по меньшей мере одну модификацию относительно немодифицированной РНК или ДНК. Это означает, что модифицированные олигонуклеотиды содержат по меньшей мере один модифицированный нуклеозид (содержащий модифицированный сахарный фрагмент и/или модифицированное нуклеоснование) и/или по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь.

20 **A. Определенные модифицированные нуклеозиды**

Модифицированные нуклеозиды содержат модифицированный сахарный фрагмент или модифицированное нуклеоснование, или как модифицированный сахарный фрагмент, так и модифицированное нуклеоснование.

25 **1. Определенные сахарные фрагменты**

В определенных вариантах реализации изобретения модифицированные сахарные фрагменты представляют собой не-бициклические модифицированные сахарные фрагменты. В определенных вариантах реализации изобретения модифицированные сахарные фрагменты представляют собой бициклические или трициклические сахарные фрагменты. В определенных вариантах реализации изобретения модифицированные сахарные фрагменты представляют собой сахарные суррогаты. Такие сахарные суррогаты могут содержать одну или более замен, соответствующих другим типам модифицированных сахарных фрагментов.

В определенных вариантах реализации изобретения модифицированные сахарные фрагменты представляют собой не-бициклические модифицированные сахарные фрагменты,

содержащие фуранозильное кольцо с одной или более группами заместителей, ни одна из которых не соединяет два атома фуранозильного кольца с образованием бициклической структуры. Такие немостиковые заместители могут находиться в любой позиции фуранозила, включая, но не ограничиваясь этим, заместители в 2', 4' и/или 5' позициях. В определенных вариантах реализации изобретения один или более немостиковых заместителей не-бициклических модифицированных сахарных фрагментов являются разветвленными. Примеры групп 2'-заместителей, подходящих для не-бициклических модифицированных сахарных фрагментов, включают, но не ограничиваются этим: 2'-F, 2'-OCH₃ («ОМе» или «О-метил») и 2'-O(CH₂)₂OCH₃ («МОЭ»). В определенных вариантах реализации изобретения группы 2'-заместителей выбраны из: галогена, аллила, amino, азидо, SH, CN, OCN, CF₃, OCF₃, O-C₁-C₁₀ алкокси, O-C₁-C₁₀ замещенного алкокси, O-C₁-C₁₀ алкила, O-C₁-C₁₀ замещенного алкила, S-алкила, N(R_m)-алкила, O-алкенила, S-алкенила, N(R_m)-алкенила, O-алкинила, S-алкинила, N(R_m)-алкинила, O-алкилаенила, O-алкила, алкинила, алкарила, аралкила, O-алкарила, O-аралкила, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂ON(R_m)(R_n) или OCH₂C(=O)-N(R_m)(R_n), где каждый R_m и R_n независимо представляет собой H, аминозащитную группу или замещенный или незамещенный C₁-C₁₀ алкил, и групп 2'-заместителей, описанных в Cook et al., США 6531584; Cook et al., США 5859221; и Cook et al., США 6005087. Определенные варианты реализации этих групп 2'-заместителей могут быть дополнительно замещены одной или более группами заместителей, независимо выбранными из: гидроксила, amino, алкокси, карбокси, бензила, фенила, нитро (NO₂), тиола, тиоалкокси, тиоалкила, галогена, алкила, арила, алкенила и алкинила. Примеры групп 4'-заместителей, подходящих для не-бициклических модифицированных сахарных фрагментов, включают, но не ограничиваются этим, алкокси (*например*, метокси), алкил и группы, описанные в Manoharan et al., WO 2015/106128. Примеры групп 5'-заместителей, подходящих для не-бициклических модифицированных сахарных фрагментов, включают, но не ограничиваются этим: 5'-метил (R или S), 5'-винил и 5'-метокси. В определенных вариантах реализации изобретения не-бициклические модифицированные сахарные фрагменты содержат более одного немостикового сахарного заместителя, например, 2'-F-5'-метил сахарные фрагменты, а также модифицированные сахарные фрагменты и модифицированные нуклеозиды, описанные в Migawa et al., WO 2008/101157 и Rajeev et al., US2013/0203836.

В определенных вариантах реализации изобретения 2'-замещенный не-бициклический модифицированный нуклеозид содержит сахарный фрагмент, содержащий немостиковую группу 2'-заместителей, выбранную из: F, NH₂, N₃, OCF₃, OCH₃, O(CH₂)₃NH₂, CH₂CH=CH₂, OCH₂CH=CH₂, OCH₂CH₂OCH₃, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂ON(R_m)(R_n), O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂ и N-замещенного ацетамида (OCH₂C(=O)-N(R_m)(R_n)), где каждый R_m и R_n независимо представляет собой H, аминозащитную группу или замещенный или незамещенный C₁-C₁₀ алкил.

В определенных вариантах реализации изобретения 2'-замещенный не-бициклический модифицированный нуклеозид содержит сахарный фрагмент, содержащий немостиковую группу

2'-заместителей, выбранную из: F, OCF₃, OCH₃, OCH₂CH₂OCH₃, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂, и OCH₂C(=O)-N(H)CH₃ («NMA»).

В определенных вариантах реализации изобретения 2'-замещенный не-бициклический модифицированный нуклеозид содержит сахарный фрагмент, содержащий немостиговую группу 2'-заместителей, выбранную из: F, OCH₃ и OCH₂CH₂OCH₃.

Определенные модифицированные сахарные фрагменты содержат заместитель, который соединяет два атома фуранозильного кольца с образованием второго кольца, что приводит к получению бициклического сахарного фрагмента. В определенных таких вариантах реализации изобретения бициклический сахарный фрагмент содержит мостик между 4' и 2' атомами фуранозного кольца. Примеры таких 4' – 2' мостиковых сахарных заместителей включают, но не ограничиваются этим: 4'-CH₂-2', 4'-(CH₂)₂-2', 4'-(CH₂)₃-2', 4'-CH₂-O-2' («LNA»), 4'-CH₂-S-2', 4'-(CH₂)₂-O-2' («ENA»), 4'-CH(CH₃)-O-2' (называемый «этилом с ограниченной конформационной свободой» или «Et»), 4'-CH₂-O-CH₂-2', 4'-CH₂-N(R)-2', 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' («МОЭ с ограниченной конформационной свободой» или «МОЕ») и его аналоги (смотрите, например, Seth et al., США 7399845, Bhat et al., США 7569686, Swayze et al., США 7741457 и Swayze et al., США 8,022,193), 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' и его аналоги (смотрите, например, Seth et al., США 8278283), 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' и его аналоги (смотрите, например, Prakash et al., США 8278425), 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (смотрите, например, Allerson et al., США 7696345 и Allerson et al., США 8124745), 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (смотрите, например, Zhou, et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134), 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' и его аналоги (смотрите, например, Seth et al., США 8278426), 4'-C(R_aR_b)-N(R)-O-2', 4'-C(R_aR_b)-O-N(R)-2', 4'-CH₂-O-N(R)-2' и 4'-CH₂-N(R)-O-2', где каждый R, R_a и R_b независимо представляет собой H, защитную группу или C₁-C₁₂ алкил (смотрите, например Imanishi et al., США 7427672).

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

где:

x представляет собой 0, 1 или 2;

n представляет собой 1, 2, 3 или 4;

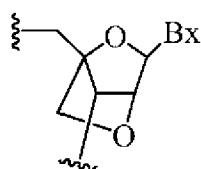
каждый из R_a и R_b независимо представляет собой H, защитную группу, гидроксил, C₁-C₁₂ алкил, замещенный C₁-C₁₂ алкил, C₂-C₁₂ алкенил, замещенный C₂-C₁₂ алкенил, C₂-C₁₂ алкинил, замещенный C₂-C₁₂ алкинил, C₅-C₂₀ арил, замещенный C₅-C₂₀ арил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал, гетероарил, замещенный гетероарил, C₅-C₇ алициклический радикал, замещенный C₅-C₇ алициклический радикал, галоген, OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, COOJ₁, ацил (C(=O)-H), замещенный ацил, CN, сульфонил (S(=O)₂-J₁) или сульфоксил (S(=O)-J₁); и

каждый из J₁ и J₂ независимо представляет собой, H, C₁-C₁₂ алкил, замещенный C₁-C₁₂ алкил, C₂-C₁₂ алкенил, замещенный C₂-C₁₂ алкенил, C₂-C₁₂ алкинил, замещенный C₂-C₁₂ алкинил,

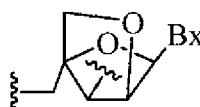
C₅-C₂₀ арил, замещенный C₅-C₂₀ арил, ацил (C(=O)-H), замещенный ацил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал, C₁-C₁₂ аминоксил, замещенный C₁-C₁₂ аминоксил или защитную группу.

Дополнительные бициклические сахарные фрагменты известны в данной области техники, смотрите, например: Freier *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22), 4429-4443, Albaek *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2006, 71, 7731-7740, Singh *et al.*, *Chem. Commun.*, 1998, 4, 455-456; Koshkin *et al.*, *Tetrahedron*, 1998, 54, 3607-3630; Kumar *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 2219-2222; Singh *et al.*, *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 10035-10039; Srivastava *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 20017, 129, 8362-8379; Wengel *et al.*, США 7053207; Imanishi *et al.*, США 6268490; Imanishi *et al.* США 6770748; Imanishi *et al.*, США RE44779; Wengel *et al.*, США 6794499; Wengel *et al.*, США 6670461; Wengel *et al.*, США 7034133; Wengel *et al.*, США 8080644; Wengel *et al.*, США 8034909; Wengel *et al.*, США 8153365; Wengel *et al.*, США 7572582; и Ramasamy *et al.*, США 6525191; Torsten *et al.*, WO 2004/106356; Wengel *et al.*, WO 1999/014226; Seth *et al.*, WO 2007/134181; Seth *et al.*, США 7547684; Seth *et al.*, США 7666854; Seth *et al.*, США 8088746; Seth *et al.*, США 7750131; Seth *et al.*, США 8030467; Seth *et al.*, США 8268980; Seth *et al.*, США 8546556; Seth *et al.*, США 8530640; Migawa *et al.*, США 9012421; Seth *et al.*, США 8501805; и патентные публикации США № Allerson *et al.*, US2008/0039618 и Migawa *et al.*, US2015/0191727.

В определенных вариантах реализации изобретения бициклические сахарные фрагменты и нуклеозиды, содержащие такие бициклические сахарные фрагменты, дополнительно определяются изомерной конфигурацией. Например, нуклеозид ЗНК (описанной в данном документе) может находиться в α -L-конфигурации или в β -D-конфигурации.



LNA (β -D-конфигурация)
мостик = 4'-CH₂-O-2'



α -L-LNA (α -L-конфигурация)
мостик = 4'-CH₂-O-2'

Бициклические нуклеозиды α -L-метиленокси (4'-CH₂-O-2') или α -L-ЗНК были включены в олигонуклеотиды, которые демонстрировали антисмысловую активность (Frieden *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 2003, 21, 6365-6372). В данном документе общее описание бициклических нуклеозидов включает обе изомерные конфигурации. Когда позиции конкретных бициклических нуклеозидов (например, ЗНК или сEt) определены в данном документе в типовых вариантах реализации изобретения, они находятся в β -D-конфигурации, если не указано иное.

В определенных вариантах реализации изобретения модифицированные сахарные фрагменты содержат один или более немостиковых сахарных заместителей и один или более мостиковых сахарных заместителей (например, 5'-замещенные и 4'-2' мостиковые сахара).

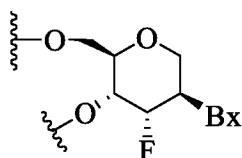
В определенных вариантах реализации изобретения модифицированные сахарные фрагменты представляют собой сахарные суррогаты. В определенных таких вариантах реализации изобретения атом кислорода сахарного фрагмента замещен, *например*, атомом серы, углерода или азота. В определенных таких вариантах реализации изобретения такие

5 модифицированные сахарные фрагменты также содержат мостиковые и/или немостиковые заместители, описанные в данном документе. Например, определенных сахарные суррогаты содержат 4'-атом серы и замену в 2'-позиции (*смотрите, например*, Bhat et al., США 7875733 и Bhat et al., США 7939677) и/или 5'-позиции.

В определенных вариантах реализации изобретения сахарные суррогаты содержат кольца,

10 имеющие количество атомов, отличное от 5. Например, в определенных вариантах реализации изобретения сахарный суррогат содержит шестичленный тетрагидропиран («ТПП»). Такие тетрагидропираны могут дополнительно быть модифицированы или замещены. Нуклеозиды, содержащие такие тетрагидропираны, включают, но не ограничиваются этим, гексит-нуклеиновую кислоту («ГНК»), анитол-нуклеиновую кислоту («АНК»), маннит-нуклеиновую кислоту («МНК»)

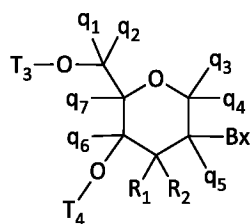
15 (*смотрите, например*, Leumann, *CJ. Bioorg. & Med. Chem.* 2002, 10, 841-854), фтор-ГНК:



F-HNA

(«Ф-ГНК», *смотрите, например*. Swayze et al., США 8088904; Swayze et al., США 8440803; Swayze et al., США 8796437; и Swayze et al., США 9005906; Ф-ГНК также может называться Ф-ТПП 3'-фтор-тетрагидропираном), и нуклеозиды, содержащие дополнительные

20 модифицированные соединения ТПП, имеющие формулу:



где, независимо, в случае каждого из указанных модифицированных ТПП-нуклеозидов:

Вх представляет собой фрагмент нуклеоснования;

каждый из T₃ и T₄ независимо представляет собой межнуклеозидную связующую группу, связывающую модифицированный ТПП-нуклеозид с оставшейся частью олигонуклеотида, или же

25 один из T₃ и T₄ представляет собой межнуклеозидную связующую группу, связывающую модифицированный ТПП-нуклеозид с оставшейся частью олигонуклеотида, в другой из T₃ и T₄

представляет собой H, гидроксил-защитную группу, связанную сопряженную группу или 5' или 3'-концевую группу;

каждый из q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ и q₇ независимо представляет собой H, C₁-C₆ алкил, замещенный C₁-C₆ алкил, C₂-C₆ алкенил, замещенный C₂-C₆ алкенил, C₂-C₆ алкинил или замещенный C₂-C₆

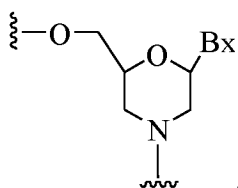
5 алкинил; и

каждый из R₁ и R₂ независимо выбран из: водорода, галогена, замещенного или незамещенного алкокси, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, OC(=X)J₁, OC(=X)NJ₁J₂, NJ₃C(=X)NJ₁J₂ и CN, где X представляет собой O, S или NJ₁, а каждый J₁, J₂ и J₃ независимо представляет собой H или C₁-C₆ алкил.

10 В определенных вариантах реализации изобретения предложены модифицированные ТПП-нуклеозиды, в которых каждый q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ и q₇ представляет собой H. В определенных вариантах реализации изобретения по меньшей мере один из q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ и q₇ отличается от H. В определенных вариантах реализации изобретения по меньшей мере один из q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ и q₇ представляет собой метил. В определенных вариантах реализации изобретения предложены

15 модифицированные ТПП-нуклеозиды, в которых один из R₁ и R₂ представляет собой F. В определенных вариантах реализации изобретения R₁ представляет собой F, а R₂ представляет собой H, а определенных вариантах реализации изобретения R₁ представляет собой метокси, а R₂ представляет собой H, и в определенных вариантах реализации изобретения R₁ представляет собой метоксиэтокси, а R₂ представляет собой H.

20 В определенных вариантах реализации изобретения сахарные суррогаты содержат кольца, имеющие более 5 атомов и более одного гетероатома. Например, сообщалось о нуклеозидах, содержащих морфолино-сахарные фрагменты, и их применению в олигонуклеотидах (*смотрите, например*, Braasch et al., *Biochemistry*, 2002, 41, 4503-4510 и Summerton et al., США 5698685; Summerton et al., США 5166315; Summerton et al., США 5185444; и Summerton et al., США 5,034,506). В контексте данного документа термин «морфолино» означает сахарный суррогат, имеющий следующую структуру:



В определенных вариантах реализации изобретения морфолино могут быть модифицированы, например, посредством добавления или изменения различных групп заместителей относительно

30 вышеуказанной структуры морфолино. Такие сахарные суррогаты называются в данном документе «модифицированными морфолино».

В определенных вариантах реализации изобретения сахарные суррогаты содержат ациклические фрагменты. Примеры нуклеозидов и олигонуклеотидов, содержащих такие ациклические сахарные суррогаты, включают, но не ограничиваются этим: пептидную

35 нуклеиновую кислоту («ПНК»), ациклическую бутильную нуклеиновую кислоту (*смотрите,*

например, Kumar et al., *Org. Biomol. Chem.*, 2013, 11, 5853-5865), а также нуклеозиды и олигонуклеотиды, описанные в Manoharan et al., WO2011/133876.

В данной области техники известно много других бициклических и трициклических сахарных и суррогатных сахарных кольцевых систем, которые можно использовать в модифицированных нуклеозидах.

2. Определенные модифицированные нуклеос основания

В определенных вариантах реализации изобретения модифицированные олигонуклеотиды содержат один или более нуклеозидов, содержащих немодифицированное нуклеос основание. В определенных вариантах реализации изобретения модифицированные олигонуклеотиды содержат один или более нуклеозидов, содержащих модифицированное нуклеос основание. В определенных вариантах реализации изобретения модифицированные олигонуклеотиды содержат один или более нуклеозидов, которые не содержат нуклеос основание, называемое абазическими нуклеозидом.

В определенных вариантах реализации изобретения модифицированные нуклеос основания выбраны из: 5-замещенных пиримидинов, 6-азапиримидинов, алкил- или алкинил-замещенных пиримидинов, алкил-замещенных пуринов и N-2, N-6 и O-6 замещенных пуринов. В определенных вариантах реализации изобретения модифицированные нуклеос основания выбраны из: 2-аминопропиладенина, 5-гидроксиметилцитозина, ксантина, гипоксантина, 2-аминоаденина, 6-N-метилгуанина, 6-N-метиладенина, 2-пропиладенина, 2-тиоурацила, 2-тиотимина и 2-тиоцитозина, 5-пропинил (-C≡C-CH₃) урацила, 5-пропинилцитозина, 6-азоурацила, 6-азоцитозина, 6-азотимина, 5-рибозилурацила (псевдоурацила), 4-тиоурацила, 8-галоген-, 8-амино-, 8-тиол-, 8-тиоалкил-, 8-гидроксил-, 8-аза- и других 8-замещенных пуринов, 5-галоген, в частности 5-бром, 5-трифторметил, 5-галоурацила и 5-галоцитозина, 7-метилгуанина, 7-метиладенина, 2-F-аденина, 2-аминоаденина, 7-деазагуанина, 7-дезааденина, 3-деазагуанина, 3-дезааденина, 6-N-бензоиладенина, 2-N-изобутирилгуанина, 4-N-бензоилцитозина, 4-N-бензоилурацила, 5-метил 4-N-бензоилцитозина, 5-метил 4-N-бензоилурацила, универсальных оснований, гидрофобных оснований, смешанных оснований, увеличенных в размере оснований и фторированных оснований. Дополнительные модифицированные нуклеос основания включают трициклические пиримидины, такие как 1,3-диазафеноксазин-2-он, 1,3-диазафенотиазин-2-он и 9-(2-аминоэтокси)-1,3-диазафеноксазин-2-он (G-зажим). Модифицированные нуклеос основания также могут включать те, в которых пуриновое или пиримидиновое основание заменено другими гетероциклами, например, 7-дезааденин, 7-дезагуанин, 2-аминопиридин и 2-пиридон. Дополнительные нуклеос основания включают описанные в Merigan et al., США 3687808, описанные в *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, Kroschwitz, J.I., Ed., John Wiley & Sons, 1990, 858-859; Englisch et al., *Angewandte Chemie*, International Edition, 1991, 30, 613; Sanghvi, Y.S., главе 15, *Antisense Research and Applications*, Crooke, S.T. and Lebleu, B., Eds., CRC Press, 1993, 273-288; и описанные в главах 6 и 15, *Antisense Drug Technology*, Crooke S.T., Ed., CRC Press, 2008, 163-166 и 442-443.

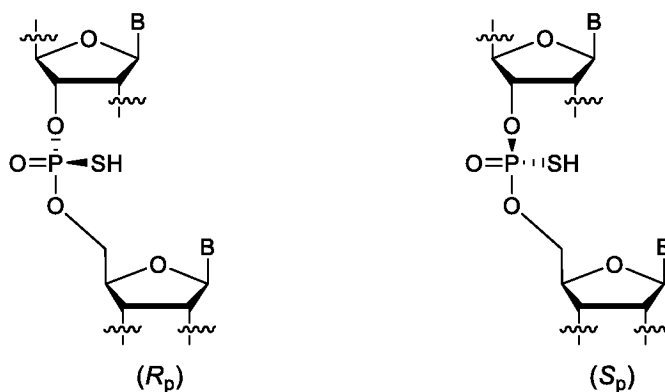
Публикации, в которых описано приготовление некоторых из вышеприведенных модифицированных нуклеоснований, а также других модифицированных нуклеоснований, включают, без ограничений, Manohara et al., US2003/0158403; Manoharan et al., US2003/0175906; Dinh et al., США 4845205; Spielvogel et al., США 5130302; Rogers et al., США 5134066; 5 Bischofberger et al., США 5175273; Urdea et al., США 5367066; Benner et al., США 5432272; Matteucci et al., США 5434257; Gmeiner et al., США 5457187; Cook et al., США 5459255; Froehler et al., США 5484908; Matteucci et al., США 5502177; Hawkins et al., США 5525711; Haralambidis et al., США 5552540; Cook et al., США 5587469; Froehler et al., США 5594121; Switzer et al., США 5596091; Cook et al., США 5614617; Froehler et al., США 5645985; Cook et al., США 5681941; Cook 10 et al., США 5811534; Cook et al., США 5750692; Cook et al., США 5948903; Cook et al., США 5587470; Cook et al., США 5457191; Matteucci et al., США 5763588; Froehler et al., США 5830653; Cook et al., США 5808027; Cook et al., 6166199; и Matteucci et al., США 6005096.

3. Определенные модифицированные межнуклеозидные связи

В определенных вариантах реализации изобретения нуклеозиды модифицированных олигонуклеотидов могут быть связаны вместе с помощью любой межнуклеозидной связи. Два 15 основных класса межнуклеозидных связующих групп определяются присутствием или отсутствием атома фосфора. Типовые содержащие фосфор межнуклеозидные связи включают, но не ограничиваются этим, фосфаты, которые содержат фосфодиэфирную связь («P=O») (также называемые немодифицированными или природными связями), фосфотриэфиры, 20 метилфосфонаты, фосфорамидаты и тиофосфаты («P=S») и дитиофосфаты («HS-P=S»). Типовые не содержащие фосфор межнуклеозидные связующие группы включают, но не ограничиваются этим, метиленметилено (-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-), дитиоэфир, тионокарбамат (-O-C(=O)(NH)-S-); силоксан (-O-SiH₂-O-); и N,N'-диметилгидразин (-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-). Модифицированные межнуклеозидные связи по сравнению с природными фосфатными связями можно использовать 25 для изменения, как правило, повышения устойчивости олигонуклеотида к нуклеазам. Способы получения содержащих фосфор и не содержащих фосфор межнуклеозидных связей хорошо известны специалистам в данной области техники.

Типовые межнуклеозидные связи, имеющие хиральный центр, включают, но не ограничиваются этим, алкилфосфонаты и тиофосфаты. Модифицированные олигонуклеотиды, 30 содержащие межнуклеозидные связи, имеющие хиральный центр, можно получать в виде популяций модифицированных олигонуклеотидов, содержащих стереослучайные межнуклеозидные связи, или в виде популяций модифицированных олигонуклеотидов, содержащих тиофосфатные связи в конкретной стереохимической конфигурации. В определенных вариантах реализации изобретения популяции модифицированных 35 олигонуклеотидов содержат тиофосфатные межнуклеозидные связи, при этом все тиофосфатные межнуклеозидные связи являются стереослучайными. Такие модифицированные олигонуклеотиды можно получать, используя способы синтеза, которые приводят к случайному выбору стереохимической конфигурации каждой тиофосфатной связи. При этом, как хорошо

известно специалистам в данной области техники, каждый отдельный тиофосфат каждой отдельной молекулы олигонуклеотида имеет определенную стереоконфигурацию. В определенных вариантах реализации изобретения популяция модифицированных олигонуклеотидов обогащена в отношении модифицированных олигонуклеотидов, содержащих одну или более конкретных тиофосфатных межнуклеозидных связей в конкретной, независимо выбранной стереохимической конфигурации. В определенных вариантах реализации изобретения конкретная конфигурация конкретной тиофосфатной связи присутствует по меньшей мере в 65% молекул в популяции. В определенных вариантах реализации изобретения конкретная конфигурация конкретной тиофосфатной связи присутствует по меньшей мере в 70% молекул в популяции. В определенных вариантах реализации изобретения конкретная конфигурация конкретной тиофосфатной связи присутствует по меньшей мере в 80% молекул в популяции. В определенных вариантах реализации изобретения конкретная конфигурация конкретной тиофосфатной связи присутствует по меньшей мере в 90% молекул в популяции. В определенных вариантах реализации изобретения конкретная конфигурация конкретной тиофосфатной связи присутствует по меньшей мере в 99% молекул в популяции. Такие хирально обогащенные популяции модифицированных олигонуклеотидов можно получать, используя способы синтеза, известные в данной области техники, *например*, способы, описанные в Oka et al., *JACS* 125, 8307 (2003), Wan et al. *Nuc. Acid. Res.* 42, 13456 (2014), и WO 2017/015555. В определенных вариантах реализации изобретения популяция модифицированных олигонуклеотидов обогащена в отношении модифицированных олигонуклеотидов, имеющих по меньшей мере один указанный тиофосфат в (*Sp*)-конфигурации. В определенных вариантах реализации изобретения популяция модифицированных олигонуклеотидов обогащена в отношении модифицированных олигонуклеотидов, имеющих по меньшей мере один тиофосфат в (*Rp*)-конфигурации. В определенных вариантах реализации изобретения модифицированные олигонуклеотиды, содержащие (*Rp*) и/или (*Sp*) тиофосфаты, содержат одну или более из следующих формул, соответственно, где «В» обозначает нуклеобазу:



Если не указано иное, хиральные межнуклеозидные связи модифицированных олигонуклеотидов, описанных в данном документе, могут быть стереослучайными или находиться в конкретной стереохимической конфигурации.

Нейтральные межнуклеозидные связи включают, без ограничений, фосфотриэфиры, метилфосфонаты, MMI (3'-CH₂-N(CH₃)-O-5'), амид-3 (3'-CH₂-C(=O)-N(H)-5'), амид-4 (3'-CH₂-N(H)-C(=O)-5'), формацеталь(3'-O-CH₂-O-5'), метоксипропил и тиоформацеталь(3'-S-CH₂-O-5').

Дополнительные нейтральные межнуклеозидные связи включают неионные связи, содержащие
5 силоксан (диалкилсилоксан), эфир карбоновой кислоты, карбоксамид, сульфид, эфир сульфоновой кислоты и амиды (смотрите, например: *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*; Y.S. Sanghvi and P.D. Cook, Eds., ACS Symposium Series 580; главы 3 и 4, 40-65). Дополнительные нейтральные межнуклеозидные связи включают неионные связи, содержащие смешанные компонентные части N, O, S и CH₂.

10 **В. Определенные мотивы**

В определенных вариантах реализации изобретения модифицированные олигонуклеотиды содержат один или более модифицированных нуклеозидов, содержащих модифицированный сахарный фрагмент. В определенных вариантах реализации изобретения модифицированные олигонуклеотиды содержат один или более модифицированных нуклеозидов, содержащих
15 модифицированное нуклеоснование. В определенных вариантах реализации изобретения модифицированные олигонуклеотиды содержат одну или более модифицированных межнуклеозидных связей. В таких вариантах реализации изобретения модифицированные, немодифицированные и по-разному модифицированные сахарные фрагменты, нуклеоснования и/или межнуклеозидные связи модифицированного олигонуклеотида определяют структуру
20 мотива. В определенных вариантах реализации изобретения структуры сахарных фрагментов, нуклеоснований и межнуклеозидных связей не зависят друг от друга. Таким образом, модифицированный олигонуклеотид может быть описан в контексте своего сахарного мотива, мотива нуклеоснования и/или мотива межнуклеозидной связи (в контексте данного документа мотив нуклеоснования описывает модификации в нуклеоснованиях независимо от
25 последовательности нуклеоснований).

1. Определенные сахарные мотивы

В определенных вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды содержат один или более типов модифицированных сахарных и/или немодифицированных сахарных фрагментов, расположенных вдоль олигонуклеотида или его области в определенном структурном порядке или
30 сахарном мотиве. В определенных случаях такие сахарные мотивы включают, но не ограничиваются этим, любые сахарные модификации, обсуждаемые в данном документе.

В определенных вариантах реализации изобретения модифицированные олигонуклеотиды содержат или состоят из области, имеющей мотив гэпмера, который определяется двумя
35 внешними областями или «крыльями» и центральной или внутренней областью или «гэпом». Три области мотива гэпмера (5'-крыло, гэп и 3'-крыло) образуют непрерывную последовательность нуклеозидов, в которой по меньшей мере некоторые сахарные фрагменты нуклеозидов каждого из крыльев отличаются от по меньшей мере некоторых сахарных фрагментов нуклеозидов гэпа. В частности, по меньшей мере сахарные фрагменты нуклеозидов каждого крыла, которые наиболее

близко расположены к гэпу (крайний 3'-нуклеозид 5'-крыла и крайний 5'-нуклеозид 3'-крыла), отличаются от сахарных фрагментов соседних нуклеозидов гэта, определяя, таким образом, границу между крыльями и гэпом (т. е. соединение крыло/гэп). В определенных вариантах реализации изобретения сахарные фрагменты в гэпе являются одинаковыми. В определенных вариантах реализации изобретения гэп содержит один или более нуклеозидов, имеющих сахарные фрагменты, которые отличаются от сахарных фрагментов одного или более других нуклеозидов гэта. В определенных вариантах реализации изобретения сахарные мотивы двух крыльев являются одинаковыми (симметричный гэпмер). В определенных вариантах реализации изобретения сахарный мотив 5'-крыла отличается от сахарного мотива 3'-крыла (асимметричный гэпмер).

В определенных вариантах реализации изобретения крылья гэпера содержат 1-5 нуклеозидов. В определенных вариантах реализации изобретения каждый нуклеозид каждого крыла в гэпере представляет собой модифицированный нуклеозид.

В определенных вариантах реализации изобретения гэпмер содержит 7-12 нуклеозидов. В определенных вариантах реализации изобретения каждый нуклеозид гэта в гэпере представляет собой немодифицированный 2'-дезоксинуклеозид.

В определенных вариантах реализации изобретения гэпмер представляет собой дезоксигэпмер. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеозиды со стороны гэта каждого соединения крыло/гэп представляют собой немодифицированные 2'-дезоксинуклеозиды, а нуклеозиды со стороны крыльев каждого соединения крыло/гэп представляют собой модифицированные нуклеозиды. В определенных вариантах реализации изобретения каждый нуклеозид гэта представляет собой немодифицированный 2'-дезоксинуклеозид. В определенных вариантах реализации изобретения каждый нуклеозид каждого крыла в гэпере представляет собой модифицированный нуклеозид.

В определенных вариантах реализации изобретения модифицированные олигонуклеотиды содержат или состоят из области, имеющей полностью модифицированный сахарный мотив. В таких вариантах реализации изобретения каждый нуклеозид полностью модифицированной области модифицированного олигонуклеотида содержит модифицированный сахарный фрагмент. В определенных вариантах реализации изобретения каждый нуклеозид полностью модифицированного олигонуклеотида содержит модифицированный сахарный фрагмент. В определенных вариантах реализации изобретения модифицированные олигонуклеотиды содержат или состоят из области, имеющей полностью модифицированный сахарный мотив, при этом каждый нуклеозид в полностью модифицированной области содержит один и тот же модифицированный сахарный фрагмент, что называется в данном документе равномерно модифицированным сахарным мотивом. В определенных вариантах реализации изобретения полностью модифицированный олигонуклеотид представляет собой равномерно модифицированный олигонуклеотид. В определенных вариантах реализации изобретения каждый

нуклеозид равномерно модифицированного олигонуклеотида содержит одну и ту же 2'-модификацию.

В данном документе длины (число нуклеозидов) трех областей гэтамера могут быть приведены с помощью обозначения [# нуклеозидов в 5'-крыле] – [# нуклеозидов в гэтае] – [# нуклеозидов в 3'-крыле]. Таким образом, 5-8-5 гэтамер состоит из 5 связанных нуклеозидов в каждом крыле и 8 связанных нуклеозидов в гэтае. Если такая номенклатура сопровождается конкретной модификацией, эта модификация представляет собой модификацию в крыльях, а нуклеозиды гэта содержат немодифицированные сахара дезоксинуклеозидов. Таким образом, 5-8-5 МОЭ-гэтамер состоит из 5 связанных МОЭ-модифицированных нуклеозидов в 5'-крыле, 8 связанных дезоксинуклеозидов в гэтае и 5 связанных МОЭ-нуклеозидов в 3'-крыле. В определенных вариантах реализации изобретения модифицированные олигонуклеотиды представляют собой 5-8-5 МОЭ-гэтамеры.

2. Определенные мотивы нуклеоснований

В определенных вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды содержат модифицированные и/или немодифицированные нуклеоснования, расположенные вдоль олигонуклеотида или его области в определенном структурном порядке или мотиве. В определенных вариантах реализации изобретения каждое нуклеоснование является модифицированным. В определенных вариантах реализации изобретения ни одно из нуклеоснований не является модифицированным. В определенных вариантах реализации изобретения каждый пурин или каждый пиримидин является модифицированным. В определенных вариантах реализации изобретения каждый аденин является модифицированным. В определенных вариантах реализации изобретения каждый гуанин является модифицированным. В определенных вариантах реализации изобретения каждый тимин является модифицированным. В определенных вариантах реализации изобретения каждый урацил является модифицированным. В определенных вариантах реализации изобретения каждый цитозин является модифицированным. В определенных вариантах реализации изобретения некоторые или все цитозиновые нуклеоснования в модифицированном олигонуклеотиде представляют собой 5-метилцитозины. В определенных вариантах реализации изобретения все цитозиновые нуклеоснования представляют собой 5-метилцитозины, а все другие нуклеоснования модифицированного олигонуклеотида представляют собой немодифицированные нуклеоснования.

В определенных вариантах реализации изобретения модифицированные олигонуклеотиды содержат блок из модифицированных нуклеоснований. В определенных таких вариантах реализации изобретения блок находится в 3'-конце олигонуклеотида. В определенных вариантах реализации изобретения блок находится в пределах 3 нуклеозидов 3'-конца олигонуклеотида. В определенных вариантах реализации изобретения блок находится в 5'-конце олигонуклеотида. В определенных вариантах реализации изобретения блок находится в пределах 3 нуклеозидов 5'-конца олигонуклеотида.

В определенных вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды, имеющие мотив гэмпера, содержат нуклеозид, содержащий модифицированное нуклеоснование. В определенных таких вариантах реализации изобретения один нуклеозид, содержащий модифицированное нуклеоснование, находится в центральном гэле олигонуклеотида, имеющего мотив гэмпера. В

5 определенных таких вариантах реализации изобретения сахарный фрагмент указанного нуклеозида представляет собой 2'-дезоксирибозильный фрагмент. В определенных вариантах реализации изобретения модифицированное нуклеоснование выбрано из: 2-тиопиримидина и 5-пропинпиримидина.

3. Определенные мотивы межнуклеозидных связей

10 В определенных вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды содержат модифицированные и/или немодифицированные межнуклеозидные связи, расположенные вдоль олигонуклеотида или его области в определенном структурном порядке или мотиве. В

определенных вариантах реализации изобретения каждая межнуклеозидная связующая группа представляет собой фосфодиэфирную межнуклеозидную связь (P=O). В определенных вариантах

15 реализации изобретения каждая межнуклеозидная связующая группа модифицированного олигонуклеотида представляет собой тиофосфатную межнуклеозидную связь (P=S). В определенных вариантах реализации изобретения каждая межнуклеозидная связь модифицированного олигонуклеотида независимо выбрана из тиофосфатной межнуклеозидной

связи и фосфодиэфирной межнуклеозидной связи. В определенных вариантах реализации

20 изобретения каждая тиофосфатная межнуклеозидная связь независимо выбрана из стереослучайного тиофосфата, (*Sp*)-тиофосфата и (*Rp*)-тиофосфата. В определенных вариантах реализации изобретения сахарный мотив модифицированного олигонуклеотида представляет собой гэмпер, а все межнуклеозидные связи в гэле являются модифицированными. В

определенных таких вариантах реализации изобретения некоторые или все межнуклеозидные

25 связи в крыльях представляют собой немодифицированные фосфатные связи. В определенных вариантах реализации изобретения концевые межнуклеозидные связи являются модифицированными. В определенных вариантах реализации изобретения сахарный мотив модифицированного олигонуклеотида представляет собой гэмпер, а мотив межнуклеозидной

связи содержит по меньшей мере одну фосфодиэфирную межнуклеозидную связь по меньшей

30 мере в одном крыле, при этом по меньшей мере одна фосфодиэфирная межнуклеозидная связь не является концевой межнуклеозидной связью, а оставшиеся межнуклеозидные связи представляют собой тиофосфатные межнуклеозидные связи. В определенных таких вариантах реализации изобретения все тиофосфатные связи являются стереослучайными. В определенных вариантах реализации изобретения все тиофосфатные связи в крыльях представляют собой (*Sp*)-тиофосфаты,

35 а гэм содержит по меньшей мере один *Sp*-, *Sp*-, *Rp*-мотив. В определенных вариантах реализации изобретения популяции модифицированных олигонуклеотидов обогащены в отношении модифицированных олигонуклеотидов, содержащих такие мотивы межнуклеозидных связей.

C. Определенные длины

Существует возможность увеличивать или уменьшать длину олигонуклеотида, не устроя его активность. Например, в Woolf et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7305-7309, 1992) исследовали ряд нуклеотидов длиной 13-25 нуклеоснований в отношении их способности индуцировать расщепление целевой РНК в модели инъекции ооцитов. Олигонуклеотиды длиной 25 нуклеоснований с 8 или 11 несовпадающими основаниями вблизи концов олигонуклеотидов были способны управлять специфическим расщеплением целевой мРНК, хотя и в меньшей степени, чем олигонуклеотиды, которые не содержали несовпадений. Аналогично, целевое специфическое расщепление было достигнуто при применении олигонуклеотидов из 13 нуклеоснований, включая содержащие 1 или 3 несовпадений.

В определенных вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды (включая модифицированные олигонуклеотиды) могут иметь широкий диапазон значений длины. В определенных вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды состоят из от X до Y связанных нуклеозидов, где X представляет наименьшее число нуклеозидов в диапазоне, а Y представляет наибольшее число нуклеозидов в диапазоне. В определенных таких вариантах реализации изобретения каждый из X и Y независимо выбран из 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 и 50; при условии, что $X \leq Y$. Например, в определенных вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды состоят из 12-13, 12-14, 12-15, 12-16, 12-17, 12-18, 12-19, 12-20, 12-21, 12-22, 12-23, 12-24, 12-25, 12-26, 12-27, 12-28, 12-29, 12-30, 13-14, 13-15, 13-16, 13-17, 13-18, 13-19, 13-20, 13-21, 13-22, 13-23, 13-24, 13-25, 13-26, 13-27, 13-28, 13-29, 13-30, 14-15, 14-16, 14-17, 14-18, 14-19, 14-20, 14-21, 14-22, 14-23, 14-24, 14-25, 14-26, 14-27, 14-28, 14-29, 14-30, 15-16, 15-17, 15-18, 15-19, 15-20, 15-21, 15-22, 15-23, 15-24, 15-25, 15-26, 15-27, 15-28, 15-29, 15-30, 16-17, 16-18, 16-19, 16-20, 16-21, 16-22, 16-23, 16-24, 16-25, 16-26, 16-27, 16-28, 16-29, 16-30, 17-18, 17-19, 17-20, 17-21, 17-22, 17-23, 17-24, 17-25, 17-26, 17-27, 17-28, 17-29, 17-30, 18-19, 18-20, 18-21, 18-22, 18-23, 18-24, 18-25, 18-26, 18-27, 18-28, 18-29, 18-30, 19-20, 19-21, 19-22, 19-23, 19-24, 19-25, 19-26, 19-29, 19-28, 19-29, 19-30, 20-21, 20-22, 20-23, 20-24, 20-25, 20-26, 20-27, 20-28, 20-29, 20-30, 21-22, 21-23, 21-24, 21-25, 21-26, 21-27, 21-28, 21-29, 21-30, 22-23, 22-24, 22-25, 22-26, 22-27, 22-28, 22-29, 22-30, 23-24, 23-25, 23-26, 23-27, 23-28, 23-29, 23-30, 24-25, 24-26, 24-27, 24-28, 24-29, 24-30, 25-26, 25-27, 25-28, 25-29, 25-30, 26-27, 26-28, 26-29, 26-30, 27-28, 27-29, 27-30, 28-29, 28-30 или 29-30 связанных нуклеозидов.

D. Определенные модифицированные олигонуклеотиды

В определенных вариантах реализации изобретения вышеуказанные модификации (сахаров, нуклеоснований, межнуклеозидных связей) внесены в модифицированный олигонуклеотид. В определенных вариантах реализации изобретения модифицированные олигонуклеотиды характеризуются своими мотивами модификаций и общей длиной. В определенных вариантах реализации изобретения такие параметры являются независимыми друг от друга. Таким образом, если не указано иное, каждая межнуклеозидная связь олигонуклеотида, имеющего гэммерный сахарный мотив, может быть модифицированной или немодифицированной

или может соответствовать или не соответствовать гэтамерному профилю модификаций сахарных модификаций. Например, межнуклеозидные связи в областях крыльев сахарного гэтамера могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга и могут быть такими же или отличаться от межнуклеозидных связей области гэта сахарного мотива. Аналогично, такие олигонуклеотиды с сахарным гэтамером могут содержать одно или более нуклеоснований независимо от гэтамерного профиля сахарных модификаций. Если не указано иное, все модификации не зависят от последовательности нуклеоснований.

Е. Определенные популяции модифицированных олигонуклеотидов

Популяции модифицированных олигонуклеотидов, в которых все из модифицированных олигонуклеотидов популяции имеют одинаковую молекулярную формулу, могут представлять собой стереослучайные популяции или хирально обогащенные популяции. Все хиральные центры модифицированных олигонуклеотидов являются стереослучайными в стереослучайной популяции. В хирально обогащенной популяции по меньшей мере один конкретный хиральный центр не является стереослучайным в модифицированных олигонуклеотидах популяции. В определенных вариантах реализации изобретения модифицированные олигонуклеотиды хирально обогащенной популяции обогащены в отношении β -D рибозильных сахарных фрагментов, а все тиофосфатные межнуклеозидные связи являются стереослучайными. В определенных вариантах реализации изобретения модифицированные олигонуклеотиды хирально обогащенной популяции обогащены в отношении β -D рибозильных сахарных фрагментов, а по меньшей мере одна конкретная тиофосфатная межнуклеозидная связь находится в конкретной стереохимической конфигурации.

Г. Последовательность нуклеоснований

В определенных вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды (немодифицированные или модифицированные олигонуклеотиды) дополнительно описаны посредством их последовательности нуклеоснований. В определенных вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды имеют последовательность нуклеоснований, которая является комплементарной со вторым олигонуклеотидом или определенной эталонной нуклеиновой кислотой, такой как целевая нуклеиновая кислота. В определенных таких вариантах реализации изобретения область олигонуклеотида имеет последовательность нуклеоснований, которая является комплементарной со вторым олигонуклеотидом или определенной эталонной нуклеиновой кислотой, такой как целевая нуклеиновая кислота. В определенных вариантах реализации изобретения последовательность нуклеоснований области или всего олигонуклеотида является по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% комплементарной со вторым олигонуклеотидом или нуклеиновой кислотой, такой как целевая нуклеиновая кислота.

II. Определенные олигомерные соединения

В определенных вариантах реализации в этом изобретении предложены олигомерные

соединения, которые состоят из олигонуклеотида (модифицированного или немодифицированного) и, необязательно, одной или более сопряженных групп и/или концевых групп. Сопряженные группы состоят из одного или более сопряженных фрагментов и сопряженного линкера, который связывает сопряженный фрагмент с олигонуклеотидом.

5 Сопряженные группы могут быть присоединены в любом из двух концов олигонуклеотида и/или в любой внутренней позиции. В определенных вариантах реализации изобретения сопряженные группы присоединены в 2'-позиции нуклеозида модифицированного олигонуклеотида. В определенных вариантах реализации изобретения сопряженные группы, которые присоединены в любом из двух концов олигонуклеотида, представляют собой концевые группы. В определенных
10 таких вариантах реализации изобретения сопряженные группы или концевые группы присоединены в 3' и/или 5'-конце олигонуклеотидов. В определенных таких вариантах реализации изобретения сопряженные группы (или концевые группы) присоединены в 3'-конце олигонуклеотидов. В определенных вариантах реализации изобретения сопряженные группы присоединены вблизи 3'-конца олигонуклеотидов. В определенных вариантах реализации
15 изобретения сопряженные группы (или концевые группы) присоединены в 5'-конце олигонуклеотидов. В определенных вариантах реализации изобретения сопряженные группы присоединены вблизи 5'-конца олигонуклеотидов.

Примеры концевых групп включают, но не ограничиваются этим, сопряженные группы, кэппирующие группы, фосфатные фрагменты, защитные группы, модифицированные или немодифицированные нуклеозиды и два или более нуклеозидов, которые независимо
20 модифицированы или не модифицированы.

А. Определенные сопряженные группы

В определенных вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды ковалентно присоединены к одной или более сопряженным группам. В определенных вариантах реализации
25 изобретения сопряженные группы модифицируют одно или более свойств присоединенного олигонуклеотида, включая, но не ограничиваясь этим, фармакодинамику, фармакокинетику, стабильность, связывание, всасывание, тканевое распределение, клеточное распределение, клеточное поглощение, заряд и выведение. В определенных вариантах реализации изобретения сопряженные группы обеспечивают новое свойство присоединенному олигонуклеотиду,
30 *например*, флуорофоры или репортерные группы, которые делают возможным выявление олигонуклеотида. Определенные сопряженные группы и сопряженные фрагменты были описаны ранее, например: холестеринный фрагмент (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), холевая кислота (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4, 1053-1060), тиоэфир, *например*, гексил-S-третилтиол (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660, 306-309);
35 Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3, 2765-2770), тиохолестерин (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20, 533-538), алифатическая цепь, *например*, додекандиол или остатки ундецила (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.*, 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75, 49-54), фосфолипид, например, дигексадецил-

рац-глицерин или триэтиламмоний 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-Н-фосфонат (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18, 3777-3783), цепь полиамина или полиэтиленгликоля (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14, 969-973), или адамантановая уксусная кислота или пальмитиловый фрагмент (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264, 229-237), фрагмент октадециламина или гексиламинокарбонилкоксистерина (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277, 923-937), токофероловая группа (Nishina et al., *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2015, 4, e220; и Nishina et al., *Molecular Therapy*, 2008, 16, 734-740), или кластер GalNAc (*например*, WO2014/179620).

1. Сопряженные фрагменты

10 Сопряженные фрагменты включают, без ограничений, интеркаляторы, репортерные молекулы, полиамины, полиамиды, пептиды, углеводы, витамины, полиэтиленгликоли, тиозфиры, полиэферы, холестерин, тиохолестерин, фрагменты хелевой кислоты, фолат, липиды, фосфолипиды, биотин, феназин, фенантридин, антрахинон, адамантан, акридин, флуоресцеины, родамины, кумарины, флуорофоры и красители.

15 В определенных вариантах реализации изобретения сопряженный фрагмент содержит активное лекарственное вещество, например, аспирин, варфарин, фенилбутазон, ибупрофен, супрофен, фенбуфен, кетопрофен, (S)-(+)-пранопрофен, капрофен, дансилсаркозин, 2,3,5-триодбензойная кислота, финголимод, флуфенамовая кислота, фолиновая кислота, бензотиадиазид, хлортиазид, диазепин, индометин, барбитурат, цефалоспорин, сульфаниламид, антидиабетическое средство, антибактериальное средство или антибиотик.

2. Сопряженные линкеры

25 Сопряженные фрагменты присоединены к олигонуклеотидам посредством сопряженных линкеров. В определенных олигомерных соединениях сопряженный линкер представляет собой одинарную химическую связь (т. е. сопряженный фрагмент присоединен непосредственно к олигонуклеотиду посредством одинарной связи). В определенных вариантах реализации изобретения сопряженный линкер содержит цепочечную структуру, такую как гидрокарбильная цепь, или олигомер из повторяющихся единиц, таких как этиленгликоль, нуклеозиды или аминокислотные единицы.

30 В определенных вариантах реализации изобретения сопряженный линкер содержит одну или более групп, выбранных из алкила, амино, оксо, амида, дисульфида, полиэтиленгликоля, простого эфира, тиоэфира и гидроксилламино. В определенных таких вариантах реализации изобретения сопряженный линкер содержит группы, выбранные из алкильных, амино-, оксо-, амидных и эфирных групп. В определенных вариантах реализации изобретения сопряженный линкер содержит группы, выбранные из алкильных и амидных групп. В определенных вариантах реализации изобретения сопряженный линкер содержит группы, выбранные из алкильных и эфирных групп. В определенных вариантах реализации изобретения сопряженный линкер содержит по меньшей мере один фосфорный фрагмент. В определенных вариантах реализации изобретения сопряженный линкер содержит по меньшей мере одну фосфатную группу. В

определенных вариантах реализации изобретения сопряженный линкер включает по меньшей мере одну нейтральную связующую группу.

В определенных вариантах реализации изобретения сопряженные линкеры, включая вышеописанные сопряженные линкеры, представляют собой бифункциональные связующие фрагменты, *например*, которые, как известно в данной области техники, можно использовать для присоединения сопряженных групп к родительским соединениям, таким как предложенные в данном документе олигонуклеотиды. В целом, бифункциональный связующий фрагмент содержит по меньшей мере две функциональные группы. Одна из функциональных групп выбрана так, чтобы связываться с конкретным участком на родительском соединении, а вторая выбрана, чтобы связываться с сопряженной группой. Примеры функциональных групп, применяемых в бифункциональных связующих фрагментах, включают, но не ограничиваются этим, электрофилы для вступления в реакцию с нуклеофильными группами и нуклеофилы для вступления в реакцию с электрофильными группами. В определенных вариантах реализации изобретения бифункциональные связующие фрагменты содержат одну или более групп, выбранных из амино, гидроксила, карбоновой кислоты, тиола, алкила, алкенила и алкинила.

Примеры сопряженных линкеров включают, но не ограничиваются этим, пирролидин, 8-амино-3,6-диоксаоктановую кислоту (ADO), сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC) и 6-аминогексановую кислоту (АНЕХ или АНА). Другие сопряженные линкеры включают, но не ограничиваются этим, замещенный или незамещенный C₁-C₁₀ алкил, замещенный или незамещенный C₂-C₁₀ алкенил или замещенный или незамещенный C₂-C₁₀ алкинил, при этом неограничивающий перечень предпочтительных групп заместителей включает гидроксил, амино, алкокси, карбокси, бензил, фенил, нитро, тиол, тιοалкокси, галоген, алкил, арил, алкенил и алкинил.

В определенных вариантах реализации изобретения сопряженные линкеры содержат 1-10 линкерных нуклеозидов. В определенных вариантах реализации изобретения сопряженные линкеры содержат 2-5 линкерных нуклеозидов. В определенных вариантах реализации изобретения сопряженные линкеры содержат точно 3 линкерных нуклеозида. В определенных вариантах реализации изобретения сопряженные линкеры содержат мотив ТСА. В определенных вариантах реализации изобретения такие линкерные нуклеозиды являются модифицированными нуклеозидами. В определенных вариантах реализации изобретения такие линкерные нуклеозиды содержат модифицированный сахарный фрагмент. В определенных вариантах реализации изобретения линкерные нуклеозиды являются немодифицированными. В определенных вариантах реализации изобретения линкерные нуклеозиды содержат необязательно защищенное гетероциклическое основание, выбранное из пурина, замещенного пурина, пиримидина или замещенного пиримидина. В определенных вариантах реализации изобретения отщепляемый фрагмент представляет собой нуклеозид, выбранный из урацила, тимина, цитозина, 4-N-бензоилцитозина, 5-метилцитозина, 4-N-бензоил-5-метилцитозина, аденина, 6-N-бензоиладенина, гуанина и 2-N-изобутирилгуанина. Обычно необходимо, чтобы линкерные нуклеозиды могли

отщепляться от олигомерного соединения после того, как оно достигнет целевой ткани.

Соответственно, линкерные нуклеозиды, как правило, связаны друг с другом и с оставшейся частью олигомерного соединения посредством расщепляемых связей. В определенных вариантах реализации изобретения такие расщепляемые связи являются фосфодиэфирными связями.

5 В данном документе линкерные нуклеозиды не считаются частью олигонуклеотида. Соответственно, в вариантах реализации изобретения, в которых олигомерное соединение содержит олигонуклеотид, состоящий из конкретного числа или диапазона связанных нуклеозидов и/или имеющий определенный процент комплементарности с эталонной нуклеиновой кислотой, и олигомерное соединение также содержит сопряженную группу, содержащую сопряженный
10 линкер, содержащий линкерные нуклеозиды, эти линкерные нуклеозиды не учитываются в длине олигонуклеотида и не используются при определении процента комплементарности олигонуклеотида с эталонной нуклеиновой кислотой. Например, олигомерное соединение может содержать (1) модифицированный олигонуклеотид, состоящий из 8-30 нуклеозидов, и (2)
15 сопряженную группу, содержащую 1-10 линкерных нуклеозидов, которые являются непрерывными с нуклеозидами модифицированного олигонуклеотида. Общее число непрерывных связанных нуклеозидов в таком олигомерном соединении превышает 30. В альтернативном варианте олигомерное соединение может содержать модифицированный олигонуклеотид, состоящий из 8-30 нуклеозидов, и не содержать сопряженную группу. Общее число непрерывных связанных нуклеозидов в таком олигомерном соединении не превышает 30. Если не указано иное,
20 сопряженные линкеры содержат не более 10 линкерных нуклеозидов. В определенных вариантах реализации изобретения сопряженные линкеры содержат не более 5 линкерных нуклеозидов. В определенных вариантах реализации изобретения сопряженные линкеры содержат не более 3 линкерных нуклеозидов. В определенных вариантах реализации изобретения сопряженные линкеры содержат не более 2 линкерных нуклеозидов. В определенных вариантах реализации изобретения сопряженные линкеры содержат не более 1 линкерного нуклеозида.

 В определенных вариантах реализации изобретения необходимо, чтобы сопряженная группа могла отщепляться от олигонуклеотида. Например, в некоторых случаях олигомерные соединения, содержащие конкретный сопряженный фрагмент, лучше поглощаются конкретным типом клеток, но после поглощения олигомерного соединения необходимо, чтобы сопряженная
30 группа отщеплялась с высвобождением несопряженного или родительского олигонуклеотида. Таким образом, определенные сопряженные линкеры могут содержать один или более отщепляемых фрагментов. В определенных вариантах реализации изобретения отщепляемый фрагмент представляет собой расщепляемую связь. В определенных вариантах реализации изобретения отщепляемый фрагмент представляет собой группу атомов, содержащую по меньшей
35 мере одну расщепляемую связь. В определенных вариантах реализации изобретения отщепляемый фрагмент содержит группу атомов, имеющую одну, две, три, четыре или более четырех расщепляемых связей. В определенных вариантах реализации изобретения отщепляемый фрагмент избирательно отщепляется внутри клетки или субклеточного компартмента, такого как

лизосома. В определенных вариантах реализации изобретения отщепляемый фрагмент избирательно отщепляется эндогенными ферментами, такими как нуклеазы.

В определенных вариантах реализации изобретения расщепляемая связь выбрана из: амидной, сложноэфирной, эфирной, одного или обоих сложных эфиров фосфодиэфира, фосфатно-эфирной, карбаматной или дисульфидной. В определенных вариантах реализации изобретения расщепляемая связь является одним или обоими сложными эфирами фосфодиэфира. В определенных вариантах реализации изобретения отщепляемый фрагмент содержит фосфат или фосфодиэфир. В определенных вариантах реализации изобретения отщепляемый фрагмент представляет собой фосфатную связь между олигонуклеотидом и сопряженным фрагментом или сопряженной группой.

В определенных вариантах реализации изобретения отщепляемый фрагмент содержит или состоит из одного или более линкерных нуклеозидов. В определенных таких вариантах реализации изобретения один или более линкерных нуклеозидов связаны друг с другом и/или с оставшейся частью олигомерного соединения посредством расщепляемых связей. В определенных вариантах реализации изобретения такие расщепляемые связи являются немодифицированными фосфодиэфирными связями. В определенных вариантах реализации изобретения отщепляемый фрагмент представляет собой 2'-дезоксинуклеозид, который присоединен к 3'- или 5'-концевому нуклеозиду олигонуклеотида фосфатной межнуклеозидной связью и ковалентно присоединен к оставшейся части сопряженного линкера или сопряженного фрагмента фосфатной или тиофосфатной связью. В определенных таких вариантах реализации изобретения отщепляемый фрагмент представляет собой 2'-дезоксиаденозин.

В. Определенные концевые группы

В определенных вариантах реализации изобретения олигомерные соединения содержат одну или более концевых групп. В определенных таких вариантах реализации изобретения олигомерные соединения содержат стабилизированный 5'-фосфат. Стабилизированные 5'-фосфаты включают, но не ограничиваются этим, 5'-фосфанаты, включая, но не ограничиваясь этим, 5'-винилфосфонаты. В определенных вариантах реализации изобретения концевые группы содержат один или более абазических нуклеозидов и/или инвертированных нуклеозидов. В определенных вариантах реализации изобретения концевые группы содержат один или более 2'-связанных нуклеозидов. В определенных таких вариантах реализации изобретения 2'-связанный нуклеозид является абазическим нуклеозидом.

III. Олигомерные двойные спирали

В определенных вариантах реализации изобретения описанные в данном документе олигомерные соединения содержат олигонуклеотид, имеющий последовательность нуклеоснований, комплементарную последовательности целевой нуклеиновой кислоты. В определенных вариантах реализации изобретения олигомерное соединение спарено со вторым олигомерным соединением с образованием олигомерной двойной спирали. Такие олигомерные двойные спирали содержат первое олигомерное соединение, имеющее область

комплементарности с целевой нуклеиновой кислотой, и второе олигомерное соединение, имеющее область комплементарности с первым олигомерным соединением. В определенных вариантах реализации изобретения первое олигомерное соединение олигомерной двойной спирали содержит или состоит из (1) модифицированного или немодифицированного олигонуклеотида и, 5 необязательно, сопряженной группы и (2) второго модифицированного или немодифицированного олигонуклеотида и, необязательно, сопряженной группы. Любое или оба олигомерных соединения олигомерной двойной спирали могут содержать сопряженную группу. Олигонуклеотиды каждого олигомерного соединения олигомерной двойной спирали могут включать некомплементарные выступающие нуклеозиды.

10 **IV. Антисмысловая активность**

В определенных вариантах реализации изобретения олигомерные соединения и олигомерные двойные спирали способны гибридизироваться с целевой нуклеиновой кислотой, что приводит по меньшей мере к одному виду антисмысловой активности; такие олигомерные соединения и олигомерные двойные спирали являются антисмысловыми соединениями. В 15 определенных вариантах реализации изобретения антисмысловые соединения имеют антисмысловую активность, если они снижают или ингибируют количество активности целевой нуклеиновой кислоты на 25% или более в стандартном клеточном анализе. В определенных вариантах реализации изобретения антисмысловые соединения избирательно влияют на одну или более целевых нуклеиновых кислот. Такие антисмысловые соединения содержат 20 последовательность нуклеоснований, которая гибридизуется с одной или более целевыми нуклеиновыми кислотами, что приводит к одному или более видам необходимой антисмысловой активности, и не гибридизуется с одной или более нецелевыми нуклеиновыми кислотами или не гибридизуется с одной или более нецелевыми нуклеиновыми кислотами так, чтобы это приводило к существенной нежелательной антисмысловой активности.

25 При определенных видах антисмысловой активности гибридизация антисмыслового соединения с целевой нуклеиновой кислотой приводит к привлечению белка, который расщепляет целевую нуклеиновую кислоту. Например, определенные антисмысловые соединения приводят к опосредованному РНКазой H расщеплению целевой нуклеиновой кислоты. РНКазы H представляет собой клеточную эндонуклеазу, которая расщепляет цепь РНК или двойную спираль 30 РНК:ДНК. ДНК в такой двойной спирали РНК:ДНК не обязательно должна быть немодифицированной ДНК. В определенных вариантах реализации изобретения в данном документе описаны антисмысловые соединения, которые являются по существу «ДНК-подобными» для того, чтобы вызывать активность РНКазы H. В определенных вариантах реализации изобретения допустим один или более не-ДНК-подобный нуклеозид в гэпе гэнмера.

35 При определенных видах антисмысловой активности антисмысловое соединение или часть антисмыслового соединения загружают в индуцированный РНК комплекс сайленсинга (RISC (от англ. «RNA-induced silencing complex»)), что в конечном итоге приводит к расщеплению целевой нуклеиновой кислоты. Например, определенные антисмысловые соединения приводят к

расщеплению целевой нуклеиновой кислоты Argonaute. Антисмысловые соединения, которые загружают в RISC, являются соединениями РНКи. Соединения РНКи могут быть двухцепочечными (миРНК) или одноцепочечными (оцРНК).

5 В определенных вариантах реализации изобретения гибридизация антисмыслового соединения с целевой нуклеиновой кислотой не приводит к привлечению белка, который расщепляет эту целевую нуклеиновую кислоту. В определенных вариантах реализации изобретения гибридизация антисмыслового соединения с целевой нуклеиновой кислотой приводит к изменению сплайсинга целевой нуклеиновой кислоты. В определенных вариантах реализации изобретения гибридизация антисмыслового соединения с целевой нуклеиновой кислотой приводит к ингибированию связывающего взаимодействия между целевой нуклеиновой кислотой и белком или другой нуклеиновой кислотой. В определенных вариантах реализации изобретения гибридизация антисмыслового соединения с целевой нуклеиновой кислотой приводит к изменению трансляции целевой нуклеиновой кислоты.

15 Антисмысловую активность можно наблюдать прямым или непрямым образом. В определенных вариантах реализации изобретения наблюдение или выявление антисмысловой активности включает наблюдение или выявление изменения в количестве целевой нуклеиновой кислоты или белка, кодируемого такой целевой нуклеиновой кислотой, изменения в соотношении сплайс-вариантов нуклеиновой кислоты или белка и/или фенотипического изменения в клетке или организме животного.

20 **V. Определенные целевые нуклеиновые кислоты**

В определенных вариантах реализации изобретения олигомерные соединения содержат или состоят из олигонуклеотида, содержащего область, которая является комплементарной с целевой нуклеиновой кислотой. В определенных вариантах реализации изобретения целевая нуклеиновая кислота представляет собой эндогенную молекулу РНК. В определенных вариантах реализации изобретения целевая нуклеиновая кислота кодирует белок. В определенных таких вариантах реализации изобретения целевая нуклеиновая кислота выбрана из: зрелой мРНК и пре-мРНК, включая интронные, экзонные и нетранслируемые области. В определенных таких вариантах реализации изобретения целевая РНК представляет собой зрелую мРНК. В определенных вариантах реализации изобретения целевая нуклеиновая кислота представляет собой пре-мРНК. В определенных таких вариантах реализации изобретения целевая область полностью находится в интроне. В определенных вариантах реализации изобретения целевая область простирается на соединение интрон/экзон. В определенных вариантах реализации изобретения целевая область по меньшей мере на 50% находится в интроне.

35 **A. Комплементарность/несовпадения в целевой нуклеиновой кислоте**

Существует возможность внесения несовпадающих оснований без устранения активности. Например, Gautschi et al (J. Natl. Cancer Inst. 93:463-471, March 2001) продемонстрировали способность олигонуклеотида, имеющего 100% комплементарности с мРНК bcl-2 mRNA и имеющего 3 несовпадения с мРНК bcl-xL снижать экспрессию как bcl-2, так и bcl-xL in vitro и in

vivo. Кроме того, этот олигонуклеотид демонстрировал эффективную противоопухолевую активность in vivo. Maher and Dolnick (Nuc. Acid. Res. 16:3341-3358, 1988) исследовали ряд тандемных олигонуклеотидов из 14 нуклеоснований и олигонуклеотидов из 28 и 42 нуклеоснований, состоящих из последовательности двух или трех тандемных олигонуклеотидов соответственно, в отношении их способности прекращать трансляцию человеческого DHFR в анализе кроличьих ретикулоцитов. Каждый из трех олигонуклеотидов из 14 нуклеоснований в отдельности был способен ингибировать трансляцию, хотя и на намного более умеренном уровне, чем олигонуклеотиды из 28 или 42 нуклеоснований.

В определенных вариантах реализации изобретения олигомерные соединения содержат олигонуклеотиды, которые являются комплементарными с целевой нуклеиновой кислотой на протяжении всей длины олигонуклеотида. В определенных вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды являются на 99%, 95%, 90%, 85% или 80% комплементарными с целевой нуклеиновой кислотой. В определенных вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды являются по меньшей мере на 80% комплементарными с целевой нуклеиновой кислотой на протяжении всей длины олигонуклеотида и содержат область, которая является на 100% или полностью комплементарной с целевой нуклеиновой кислотой. В определенных вариантах реализации изобретения длина области полной комплементарности составляет 6-20, 10-18 или 18-20 нуклеоснований.

В определенных вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды содержат одно или более несовпадающих нуклеоснований относительно целевой нуклеиновой кислоты. В определенных вариантах реализации изобретения антисмысловая активность против мишени снижается таким несовпадением, но активность против не-мишени снижается больше. Таким образом, в определенных вариантах реализации изобретения улучшается избирательность олигомерного соединения, содержащего олигонуклеотид. В определенных вариантах реализации изобретения несовпадение конкретным образом размещено в олигонуклеотиде, имеющем мотив гэтмера. В определенных вариантах реализации изобретения несовпадение находится в позиции 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 от 5'-конца области гэта. В определенных вариантах реализации изобретения несовпадение находится в позиции 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 от 3'-конца области гэта. В определенных вариантах реализации изобретения несовпадение находится в позиции 1, 2, 3 или 4 от 5'-конца области крыла. В определенных вариантах реализации изобретения несовпадение находится в позиции 4, 3, 2 или 1 от 3'-конца области крыла.

В. Тау

В определенных вариантах реализации изобретения олигомерные соединения содержат или состоят из олигонуклеотида, содержащего область, которая является комплементарной с целевой нуклеиновой кислотой, при этом целевая нуклеиновая кислота представляет собой тау. В определенных вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота тау имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1 (номер доступа GENBANK № NT_010783.14, усеченная от нуклеотида 2624000 до 2761000).

В определенных вариантах реализации изобретения приведение клетки в контакт с олигомерным соединением, комплементарным с SEQ ID NO: 1, снижает количество мРНК тау, а в определенных вариантах реализации изобретения – снижает количество белка тау. В определенных вариантах реализации изобретения приведение клетки в организме животного в контакт с олигомерным соединением, комплементарным с SEQ ID NO: 1, уменьшает интенсивность одного или более симптомов нейродегенеративного заболевания. В определенных вариантах реализации изобретения симптом представляет собой потерю памяти, потерю двигательной функции или повышение числа и/или объема нейрофибриллярных включений. В определенных вариантах реализации изобретения приведение клетки в организме животного в контакт с олигонуклеотидом, комплементарным с SEQ ID NO: 1, приводит к поддержанию или улучшению памяти, поддержанию или улучшению двигательной функции и/или сохранению или снижению числа и/или объема нейрофибриллярных включений.

С. Определенные целевые нуклеиновые кислоты в определенных тканях

В определенных вариантах реализации изобретения олигомерные соединения содержат или состоят из олигонуклеотида, содержащего область, которая является комплементарной с целевой нуклеиновой кислотой, при этом целевая нуклеиновая кислота экспрессируется в центральной нервной системе (ЦНС).

VI. Определенные фармацевтические композиции

В определенных вариантах реализации изобретения в данном документе описаны фармацевтические композиции, содержащие одно или более олигомерных соединений или их солей. В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит стерильный солевой раствор и одно или более олигомерных соединений. В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция состоит из стерильного солевого раствора и одного или более олигомерных соединений. В определенных вариантах реализации изобретения стерильный солевой раствор представляет собой солевой раствор фармацевтической степени чистоты. В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит одно или более олигомерных соединений и стерильную воду. В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция состоит из одного олигомерного соединения и стерильной воды. В определенных вариантах реализации изобретения стерильная вода представляет собой стерильную воду фармацевтической степени чистоты. В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит одно или более олигомерных соединений и фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ). В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция состоит из одного или более олигомерных соединений и стерильного ФСБ. В определенных вариантах реализации изобретения стерильный ФСБ представляет собой ФСБ фармацевтической степени чистоты.

В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит одно или более олигомерных соединений и одно или более вспомогательных веществ. В определенных вариантах реализации изобретения вспомогательные вещества выбраны из воды, растворов солей, спирта, полиэтиленгликолей, желатина, лактозы, амилазы, стеарата магния, талька, кремниевой кислоты, вязкого парафина, гидроксиметилцеллюлозы и поливинилпирролидона.

В определенных вариантах реализации изобретения олигомерные соединения можно смешивать с фармацевтически приемлемыми активными и/или инертными веществами для получения фармацевтических композиций или готовых форм. Композиции и способы для составления фармацевтических композиций зависят от большого числа критериев, включая, но не ограничиваясь этим, путь введения, степень заболевания или предназначенную для введения дозу.

В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции, содержащие олигомерное соединение, включают любые фармацевтически приемлемые соли олигомерного соединения, сложные эфиры олигомерного соединения или соли таких сложных эфиров. В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции, содержащие олигомерные соединения, содержащие один или более олигонуклеотидов, после введения животному, включая человека, способны обеспечивать наличие (прямо или непрямо) биологически активного метаболита или его остатка. Соответственно, например, это изобретение также относится к фармацевтически приемлемым солям олигомерных соединений, пролекарственным препаратам, фармацевтически приемлемым солям таких пролекарственных препаратов и другим биоэквивалентам. Подходящие фармацевтически приемлемые соли включают, но не ограничиваются этим, натриевые и калиевые соли. В определенных вариантах реализации изобретения пролекарственные препараты содержат одну или более сопряженных групп, присоединенных к олигонуклеотиду, причем сопряженная группа отщепляется эндогенными нуклеазами в организме.

Липидные фрагменты использовали в терапии на основе нуклеиновых кислот в различных способах. В определенных таких способах нуклеиновую кислоту, такую как олигомерное соединение, вносят в предварительно сформированные липосомы или липоплексы, созданные из смеси катионных липидов и нейтральных липидов. В определенных способах ДНК-комплексы с моно- или поликатионными липидами образуются без наличия нейтрального липида. В определенных вариантах реализации изобретения липидный фрагмент выбран так, чтобы повышать распределение фармацевтического агента в конкретной клетке или ткани. В определенных вариантах реализации изобретения липидный фрагмент выбран так, чтобы повышать распределение фармацевтического агента в жировой ткани. В определенных вариантах реализации изобретения липидный фрагмент выбран так, чтобы повышать распределение фармацевтического агента в мышечной ткани.

В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат систему доставки. Примеры систем доставки включают, но не ограничиваются этим,

липосомы и эмульсии. Определенные системы доставки применяют для приготовления определенных фармацевтических композиций, включая содержащие гидрофобные соединения. В определенных вариантах реализации изобретения используют определенные органические растворители, такие как диметилсульфоксид.

5 В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат одну или более тканеспецифических молекул доставки, сконструированных для доставки одного или более фармацевтических агентов согласно данному изобретению в конкретные ткани или типы клеток. Например, в определенных вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат липосомы, покрытые тканеспецифическими антителами.

10 В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат систему соразтворителя. Определенные такие системы соразтворителей содержат, например, бензиловый спирт, неполярное поверхностно-активное вещество, водорастворимый органический полимер и водную фазу. В определенных вариантах реализации изобретения такие системы соразтворителей используют для гидрофобных соединений. Неограничивающим примером такой системы соразтворителя является система соразворителя VPD, которая представляет собой раствор абсолютного этанола, содержащий 3% масс./об. бензинового спирта, 8% масс./об. неполярного поверхностно-активного вещества полисорбата 80™ и 65% масс./об. полиэтиленгликоля 300. Соотношения в таких системах соразворителей могут варьироваться без

15 существенного изменения их характеристик растворимости и токсичности. Кроме того, может варьироваться природа компонентов соразворителя: например, вместо полисорбата 80™ можно использовать другие поверхностно-активные вещества; может варьироваться размер фракций полиэтиленгликоля; полиэтиленгликоль может быть замещен другими биосовместимыми полимерами, например, поливинилпирролидоном; а декстроза может быть замещена другими

20 сахарами или полисахаридами.

25 В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции готовят для перорального введения. В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции готовят для буккального введения. В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции готовят для введения путем инъекции (например, внутривенной, подкожной, внутримышечной, интратекальной, интрацеребровентрикулярной и т. д.). В определенных таких вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит носитель и приготовлена в водном растворе, таком как вода или физиологически совместимые буферы, такие как раствор Хенкса, раствор Рингера или физиологический солевой буферный раствор. В определенных вариантах реализации изобретения

30 включены другие ингредиенты (например, ингредиенты которые способствуют растворимости или служат консервантами). В определенных вариантах реализации изобретения готовят инъекционные суспензии, используя соответствующие жидкие носители, суспендирующие агенты и т. п. Определенные фармацевтические композиции для инъекций представлены в единичной

дозированной форме, например, в ампулах или многодозовых контейнерах. Определенные фармацевтические композиции для инъекций представляют собой суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных средах, и могут содержать формообразующие агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Определенные растворители, 5 подходящие для применения в фармацевтических композициях для инъекций, включают, но не ограничиваются этим, липофильные растворители и жирные масла, такие как кунжутное масло, синтетические сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеат или триглицериды, и липосомы. Водные инъекционные суспензии могут содержать.

VII. Определенные соединения

10 В определенных вариантах реализации изобретения соединение № 814907 представляет собой 5-8-5 МОЭ-гэпмер, имеющий последовательность (от 5' к 3') CCGTTTTCTTACCACCT (включенную в данный документ как SEQ ID NO: 8), где каждый из нуклеозидов 1-5 и 14-18 15 представляют собой 2'-МОЭ нуклеозиды, а каждый из нуклеозидов 6-13 представляют собой 2'-дезоксинуклеозиды, при этом межнуклеозидные связи между нуклеозидом 2 и нуклеозидом 3 и нуклеозидом 15 и нуклеозидом 16 представляют собой фосфодиэфирные межнуклеозидные связи, а оставшиеся межнуклеозидные связи представляют собой тиофосфатные межнуклеозидные связи, а каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

В определенных вариантах реализации изобретения соединение № 814907 характеризуется 20 следующим химическим обозначением: mCes mCeo Ges Tes Tes Tds Tds mCds Tds Tds Ads mCds mCds Aes mCeo mCes mCes Te; где

A = аденин,

mC = 5-метилцитозин,

G = гуанин,

T = тимин,

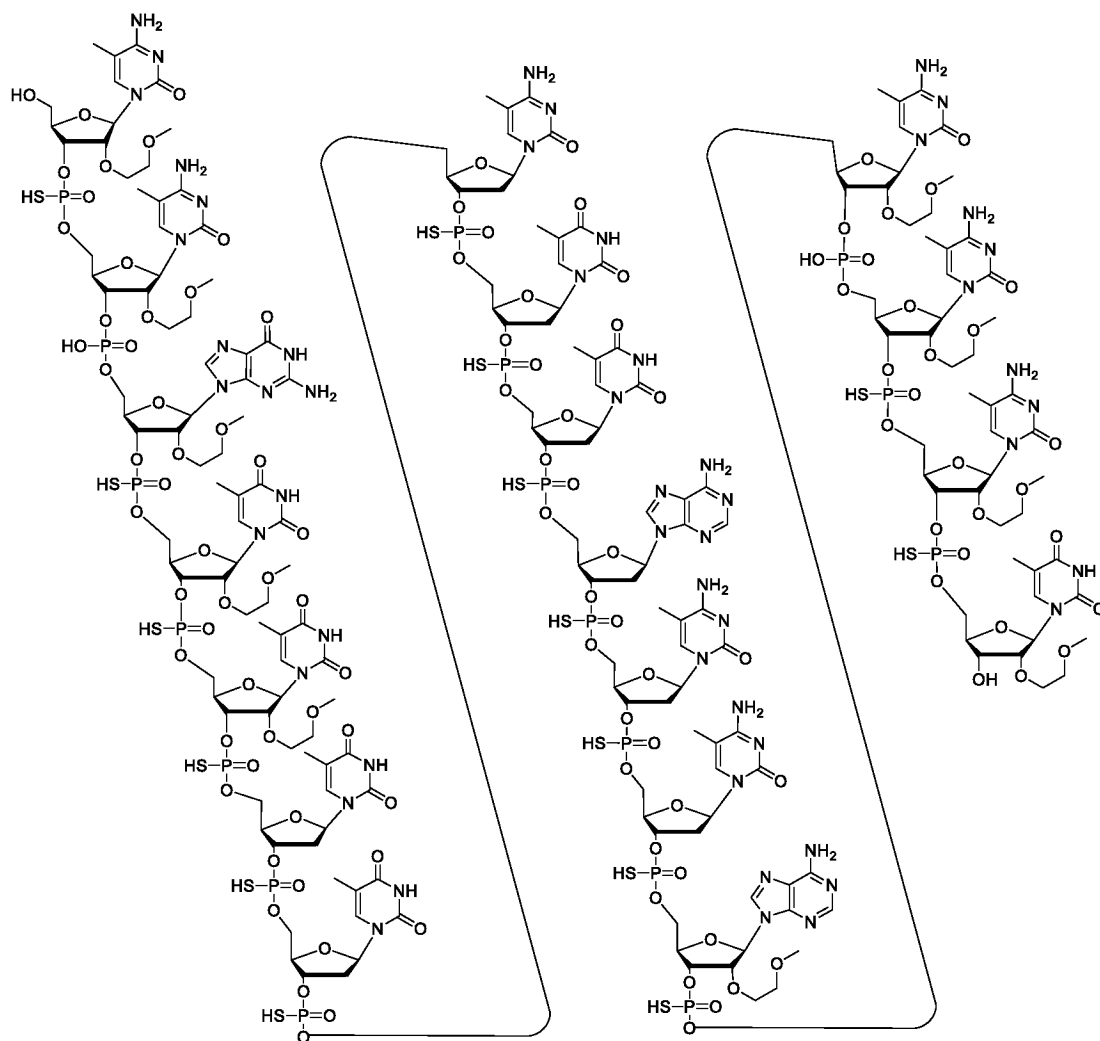
25 e = 2'-МОЭ нуклеозид,

d = 2'-дезоксинуклеозид,

s = тиофосфатная межнуклеозидная связь и

o = фосфодиэфирная межнуклеозидная связь.

В определенных вариантах реализации изобретения соединение № 814907 характеризуется следующей химической структурой:



(SEQ ID NO: 8).

5 Структура 1. Соединение № 814907

VIII. Определенные критерии сравнения

В определенных вариантах реализации изобретения соединение № 623782 (характеристики которого приведены ниже в примере 1), впервые описанное в WO 2015/010135, является критерием сравнения. Соединение № 623782 имело наилучшие показатели среди соединений, описанных в WO 2015/010135, в терминах действенности, эффективности и переносимости. Соединение № 623782 приведено как сравнительный критерий, чтобы продемонстрировать превосходство по эффективности и переносимости соединения № 814907 (характеристики которого приведены ниже в примере 1) по сравнению с соединением № 623782 в сравнительных исследованиях, описанных ниже в примере 1 и примере 2.

15 Как продемонстрировано в примере 1, соединение № 814907 обеспечивало ED₅₀ 25 мкг у тау-трансгенных мышей, обрабатываемых 30 мкг, 100 мкг, 500 мкг, тогда как соединение № 623782

обеспечивало ED₅₀ 94 мкг у тау-трансгенных мышей, обрабатываемых 10 мкг, 30 мкг, 100 мкг, 300 мкг, 700 мкг. Таким образом, соединение № 814907 является более эффективным, чем соединение № 623782.

5 Как продемонстрировано в примере 2, введение соединения № 814907 мышам дикого типа не приводило к потере клеток Пуркинье, тогда как введение соединения № 623782 приводило к потере клеток Пуркинье в окрашенных кальбиндином срезах мозжечка 3 из 11 животных. Следовательно, соединение № 814907 является более переносимым, чем соединение № 623782.

Неограничивающее описание и включение посредством ссылки

10 Каждая из литературных и патентных публикаций, перечисленных в данном документе, в полном объеме включена посредством ссылки.

Хотя определенные описанные в данном документе соединения, композиции и способы были описаны специально в соответствии с определенными вариантами реализации изобретения, следующие примеры служат исключительно для иллюстрации описанных в данном документе
15 соединений и не подразумевают их ограничения. Все ссылки, номера доступа и т. п., перечисленные в данной заявке, в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

Хотя в прилагающемся к этому описанию перечне последовательности каждая последовательность определена как «РНК» или «ДНК», как это необходимо, в реальности эти
20 последовательности можно модифицировать с помощью любой комбинации химических модификаций. Специалисту в данной области техники понятно, что такие обозначения как «РНК» или «ДНК», используемые для описания модифицированных олигонуклеотидов, являются в некоторых случаях произвольными. Например, олигонуклеотид, содержащий нуклеозид, содержащий 2'-ОН сахарный фрагмент и тиминовое основание, можно описать как ДНК,
25 имеющую модифицированный сахар (2'-ОН вместо одного 2'-Н ДНК), или как РНК, имеющую модифицированное основание (тимин (метилированный урацил) вместо урацила РНК). Соответственно, подразумевается, что приведенные в данном документе последовательности нуклеиновых кислот, включая, но не ограничиваясь этим, приведенные в перечне последовательностей, включают нуклеиновые кислоты, содержащие любую комбинацию
30 природных или модифицированных РНК и/или ДНК, включая, но не ограничиваясь этим, такие нуклеиновые кислоты, имеющие модифицированные нуклеос основания. В качестве дополнительного примера и без ограничений, олигомерное соединение, имеющее последовательность нуклеос оснований «ATCGATCG» включает любые олигомерные соединения, имеющие такую последовательность нуклеос оснований, модифицированных или
35 немодифицированных, включая, но не ограничиваясь этим, такие соединения, содержащие основания РНК, такие как имеющие последовательность «AUCGAUCG», и имеющие некоторые основания ДНК и некоторые основания РНК, такие как «AUCGATCG», и олигомерные

соединения, имеющие другие модифицированные нуклеосахариды, такие как «AT^mCGAUCG», где ^mC означает основание цитозина, содержащее метильную группу в 5-позиции.

5 Определенные описанные в данном документе соединения (например, модифицированные олигонуклеотиды) имеют один или более центров асимметрии и, таким образом, являются источником энантиомеров, диастереомеров и других стереоизомерных конфигураций, которые могут быть определены в терминах абсолютной стереохимии как (*R*) или (*S*), как α или β , например, как в случае сахарных аномеров, или как (*D*) или (*L*), например, как в случае аминокислот, и т. д. Предложенные в данном документе соединения, которые приведены или описаны как имеющие определенные стереоизомерные конфигурации, включают только 10 указанные соединения. Предложенные в данном документе соединения, которые приведены или описаны с неопределенной стереохимией, включают все такие возможные изомеры, включая из стереослучайные и оптически чистые формы, если не указано иное. Аналогично, также включены таутомерные формы соединений согласно данному документу, если не указано иное. Если не 15 указано иное, подразумевается, что описанные в данном документе олигомерные соединения и модифицированные олигонуклеотиды включают соответствующие формы солей.

Описанные в данном документе соединения включают вариации, в которых один или более атомов замещены нерадиоактивным изотопом или радиоактивным изотопом указанного элемента. Например, соединения согласно данному документу, которые содержат атомы водорода, охватывают все возможные замены дейтерием для каждого из атомов водорода ¹H. Изотопные 20 замены, охватываемые соединениями согласно данному документу, включают, но не ограничиваются этим: ²H или ³H вместо ¹H, ¹³C или ¹⁴C вместо ¹²C, ¹⁵N вместо ¹⁴N, ¹⁷O или ¹⁸O вместо ¹⁶O и ³³S, ³⁴S, ³⁵S или ³⁶S вместо ³²S. В определенных вариантах реализации изобретения нерадиоактивные изотопные замены могут обеспечивать новые свойства олигомерного соединения, которые являются благоприятными для применения в качестве терапевтических 25 средств или исследовательских инструментов. В определенных вариантах реализации изобретения радиоактивные изотопные замены могут делать соединение подходящим для исследовательских или диагностических целей, например, для визуализации.

ПРИМЕРЫ

30 Следующие примеры иллюстрируют определенные варианты реализации данного изобретения и не являются ограничивающими. Кроме того, если приведены конкретные варианты реализации изобретения, авторы изобретения предполагают наличие типичного применения этих конкретных вариантов реализации изобретения. Например, описание олигонуклеотида, имеющего конкретный мотив, обеспечивает достаточное основание для применения дополнительных олигонуклеотидов, имеющих такой же или сходный мотив. И, например, в случае наличия в 35 конкретной позиции конкретной высокоаффинной модификации, считаются подходящими и другие высокоаффинные модификации в той же самой позиции, если не указано иное.

Пример 1: Действие модифицированных олигонуклеотидов на мРНК человеческого тау у трансгенных мышей

Модифицированные олигонуклеотиды, приведенные в таблице ниже, являются на 100% комплементарными с пре-мРНК человеческого тау (номер доступа GENBANK « NT_010783.14, усеченная от нуклеотида 2624000 до 2761000, обозначаемая в данном документе как SEQ ID NO: 1). Эффективность модифицированных олигонуклеотидов исследовали на трансгенных в отношении человеческого тау мышцах (Duff et al., *Neurobiology of Disease* 7:87-98, 2000). Каждая мышшь получала дозу модифицированного олигонуклеотида, указанную в таблице ниже, или только базовый раствор ФСБ путем ИЦВ болюсной инъекции. Каждая группа обработки состояла из 2-4 мышшь. Через несколько дней после введения олигонуклеотида мышшь умерщвляли и получали образцы тканей. Выделяли РНК из коры головного мозга и анализировали методом РВ-кПЦР, чтобы определить уровни мРНК человеческого тау. Использовали набор праймеров и зондов RTS3104 со следующими последовательностями: прямой праймер 5'-AAGATTGGGTCCCTGGACAAT-3', обозначенный в данном документе SEQ ID NO: 5; обратный праймер 5'-AGCTTGTGGGTTTCAATCTTTTATT-3', обозначенный в данном документе SEQ ID NO: 6; зонд 5'-CACCCACGTCCCTGGCGGA-3', обозначенный в данном документе SEQ ID NO: 7. Результаты представлены в таблице ниже в виде среднего процента ингибирования экспрессии мРНК человеческого тау для каждой группы обработки по сравнению с группой, обработанной базовым раствором. Полумаксимальную эффективную дозу (ED₅₀) для каждого модифицированного олигонуклеотида рассчитывали, используя нелинейный регрессионный анализ.

Таблица 1

Процент ингибирования уровней мРНК человеческого тау у hТау-мышшь

№ соединения	Последовательность	Доза (мкг)	мРНК тау человека (% ингибирования)	ED ₅₀ (мкг)	SEQ ID NO.
623782	^m C _{es} ^m C _{eo} G _{eo} T _{eo} T _{es} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} T _e	10	10	94	8
		30	17		
		100	54		
		300	79		
		700	90		
814907	^m C _{es} ^m C _{eo} G _{es} T _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{es} ^m C _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} T _e	30	48	25	8
		100	79		
		500	88		

Индексы: «e» представляет 2'-МОЭ нуклеозид; «d» представляет 2'-дезоксинуклеозид; «o» представляет фосфодиэфирную межнуклеозидную связь; и «s» представляет тиофосфатную

межнуклеозидную связь. Индекс «m» перед «С» указывает, что цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

Пример 2: Переносимость модифицированных олигонуклеотидов, нацеленных на человеческий тау

Переносимость модифицированных олигонуклеотидов, описанных в примере 1, исследовали на мышах дикого типа. Каждая мышь получала 700 мкг инъекцию соединения № 623782 или соединение № 814907 в дозе 700 мкг, или один базовый раствор ФСБ. Через восемь недель после введения модифицированного олигонуклеотида мышей умерщвляли и получали образцы тканей. Гистопатологические исследования проводили для срезов мозжечка, используя красители Н&Е, IBA1, GFAP и кальбиндин, при этом для обработанных соединением № 814907 мышей не наблюдали никаких аномалий относительно обработанных базовым раствором мышей. В схожем эксперименте наблюдали потерю клеток Пуркинью в окрашенных кальбиндином срезах мозжечка 3 из 11 животных, обработанных соединением № 623782.

Пример 3: Действие соединения № 814907 у яванских макаков после интратекальных инъекций с повторяемой дозой в течение 13 недель

Яванских макаков обрабатывали соединением № 814907, чтобы определить местную и системную переносимость и фармакокинетику для трех уровней дозы после повторных интратекальных болюсных инъекций в поясничную область в течение 13 недель. Соединение № 814907 обладает полной гомологией последовательности с мРНК обезьяньего тау и продемонстрировало фармакологическую активность у животных этого вида.

Обработка

Яванских макаков возрастом в диапазоне 2-4 лет обрабатывали контрольным базовым раствором (n = 12) или соединением № 814907 интратекальным образом (между L3-L4). Животные получали дозу на 1, 14, 28, 56 и 84 сутки. Группы обработки получали 4 мг (n = 6), 12 мг (n = 6) или 35 мг (n = 14) соединения № 814907. Животных умерщвляли на 98 или 155 сутки (4 животных из группы обработки контрольным базовым раствором и 4 животных из группы обработки 35 мг).

Переносимость

Оценка переносимости была основана на клинических наблюдениях, массе тела, потреблении пищи, физических и нейробиологических исследованиях, нейроповеденческих наблюдениях (модифицированный тест Ирвина (Irwin, 1968)), электрокардиограмме (ЭКГ) и оценке кровяного давления, офтальмологии, коагуляции, гематологии, клинической химии (крови и цереброспинальной жидкости [ЦСЖ]), подсчете клеток (только ЦСЖ), оценке газов крови, анализе мочи и оценках анатомических патологий. Полное вскрытие проводили, записывая любые

макроскопические аномалии. Проводили взвешивание органов и микроскопические исследования. Кровь брали для двух взаимодополняющих анализов. Кроме того, кровь, ЦСЖ и ткани (при вскрытии) брали для токсикологических оценок.

5 Интратекальное введение 4 мг, 12 мг или 35 мг соединения 814907 в течение 13 недель (раз в две недели в течение первого месяца, затем ежемесячно) продемонстрировало хорошую местную и системную переносимость у самцов и самок яванских макаков при всех исследованных схемах дозирования.

Активность

10 Ткани головного и спинного мозга анализировали в отношении ингибирования мРНК тау яванского макака. Получали срезы образцов головного и спинного мозга и быстро замораживали в жидком азоте и хранили замороженными (от -60°C до -90°C). Во время сбора образцов использовали 2 мм образцы биопсии для получения образцов для анализа РНК из замороженных срезов головного мозга. Образцы брали из нескольких участков спинного и головного мозга.

15 Общую РНК из образцов спинного и головного мозга от яванских макаков, обработанных контролем или соединением № 814907, очищали, используя мини-набор для очистки РНК от Life Technologies и проводили анализ ПЦР в режиме реального времени. Набор обезьяньих праймеров и зондов rhMATPT LTS01278 (прямая последовательность AGGACAGAGTGCAGTCGAAGATC, обозначаемая в данном документе SEQ ID NO: 9; обратная последовательность

20 AGGTCAGCTTGTGGGTTTCAA, обозначаемая в данном документе SEQ ID NO: 10; последовательность зонда CACCCATGTCCCTGGCGGAGG, обозначаемая в данном документе SEQ ID NO: 11) использовали для измерения уровней мРНК. Затем РНК тау нормировали относительно конститутивного гена циклофилина А. Все реакции кПЦР проводили в трех повторях. Данные представлены относительно уровней мРНК у животных, обработанных искусственной ЦСЖ.

25 Как показано в таблице ниже, наблюдалось существенное и дозозависимое снижение в уровнях мРНК тау в спинном мозге и нескольких участках ЦНС после обработки соединением № 814907 по сравнению с обработанными контролем обезьянами.

Таблица 2

30 **Процент ингибирования уровней мРНК яванского макака у яванских макаков**

Обработка	Участки головного мозга						
	Грудной отдел спинного мозга	Поясничной отдел спинного мозга	Кортикальный отдел спинного мозга	Лобная кора	Височная кора	Гиппокамп	Варолиев мост
иЦСЖ	0	0	0	0	0	0	0

4 мг 814907	51	63	31	41	29	18	29
12 мг 814907	60	60	47	60	56	52	43
35 мг 814907	58	71	60	77	70	74	66

Пример 4: Клиническое исследование фазы I-IIa на людях с применением соединения № 814907

Несколько возрастающих доз соединения № 814907 оценивают в рандомизированном, двойном слепом, плацебо-контролируемом исследовании для оценки безопасности, переносимости, фармакокинетики и фармакодинамики у пациентов с умеренной болезнью Альцгеймера (БА) возрастом 50-74 лет. Подходящие пациенты имеют подтвержденные показаниями биомаркера БА в ЦСЖ свидетельства амилоидной и тау-патологии кроме того, что они соответствуют клиническим критериям для БА. Группы пациентов с умеренной БА с четырьмя повышениями уровня дозы будут последовательно включены и рандомизированы 3:1 для получения соединения № 814907 или плацебо. Каждый пациент будет получать 4 дозы соединения № 814907 или плацебо с 28-суточным интервалом между дозами. Пациенты будут получать 4 интратекальные (ИТ) болюсные дозы соединения № 814907 с 4-недельными интервалами во время 3-месячного периода лечения (на 1, 29, 57, 85 сутки). Каждую дозу соединения № 814907 или плацебо будут вводить в виде одной 20 мл ИТ болюсной инъекции. Введение будет происходить посредством поясничной пункции с применением малокалиберной иглы в L3/L4 области.

Оценки безопасности и переносимости

Безопасность пациентов будут тщательно отслеживать во время исследования. Оценки безопасности и переносимости включают: физикальный осмотр и стандартную неврологическую оценку (включая глазное дно), показатели жизнедеятельности (ЧС, КД, ортостатические изменения, масса), ЭКГ, НЯ и сопутствующие медикаменты, Шкалу Колумбийского университета для оценки степени тяжести суицидальных проявлений (C-SSRS), лабораторные исследования ЦСЖ в целях безопасности (число клеток, белок, глюкоза), лабораторные исследования плазмы (клиническая химия, гематология), анализ мочи и оценки нейровизуализации, которые будут проводиться с помощью МРТ-сканера 3Т. Клинические и волюметрические нейровизуальные измерения будут использовать для отслеживания неожиданного ухудшения.

Фармакокинетические оценки

Образцы ЦСЖ будут получать перед дозированием на каждые сутки введения (на 1, 29, 57, 85 сутки) и во время периода после лечения для анализа ФК.

Диагностические оценки

Будут оценивать биохимические, нейровизуальные параметры, параметры функциональности/способности осуществлять деятельность, связанную с повседневной жизнью, когнитивные и нейропсихиатрические параметры.

Биохимические параметры включают потенциальные биомаркеры ЦСЖ и крови/плазмы, включая задействование мишени, маркеры нейронального и синаптического поражения, маркеры активации врожденного иммунитета, компоненты комплемента и липидные биомаркеры.

Нейровизуальные параметры включают структурную МРТ (гиппокампа, всего мозга и объема желудочков), артериальные спиновые метки (АСМ), диффузионно-тензорную томографию (ДТТ) и FDG-PET (только группы C и D).

Параметры функциональности/способности осуществлять деятельность, связанную с повседневной жизнью, включают оценку по опроснику по функциональной активности (FAQ).

Когнитивные параметры включают оценку по повторяемой батарее тестов по оценке нейропсихологического состояния (RBANS) и краткой шкале оценки психического статуса (MMSE).

Нейропсихиатрические параметры включают оценку по опроснику для оценки нейропсихиатрического состояния (NPI-Q).

Измененная формула изобретения

1. Хирально обогащенная популяция модифицированных олигонуклеотидов, где популяция обогащена в отношении модифицированных олигонуклеотидов, содержащих по меньшей мере одну конкретную тиофосфатную межнуклеозидную связь, имеющую конкретную стереохимическую конфигурацию.
2. Хирально обогащенная популяция по п.1, отличающаяся тем, что популяция обогащена в отношении модифицированных олигонуклеотидов, содержащих по меньшей мере одну конкретную тиофосфатную межнуклеозидную связь, имеющую (*S*p)-конфигурацию.
3. Хирально обогащенная популяция по п.1 или п.2, отличающаяся тем, что популяция обогащена в отношении модифицированных олигонуклеотидов, содержащих по меньшей мере одну конкретную тиофосфатную межнуклеозидную связь, имеющую (*R*p)-конфигурацию.
4. Хирально обогащенная популяция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что популяция обогащена в отношении модифицированных олигонуклеотидов, имеющих конкретную, независимо выбранную стереохимическую конфигурацию в каждой тиофосфатной межнуклеозидной связи.
5. Хирально обогащенная популяция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что популяция обогащена в отношении модифицированных олигонуклеотидов, имеющих (*S*p)-конфигурацию в каждой тиофосфатной межнуклеозидной связи.
6. Хирально обогащенная популяция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что популяция обогащена в отношении модифицированных олигонуклеотидов, имеющих (*R*p)-конфигурацию в каждой тиофосфатной межнуклеозидной связи.