

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392584** (13) **A2**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.06.28

(51) Int. Cl. *A61K 31/713* (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2017.03.07

(54) **НАЦЕЛИВАЮЩИЕ ЛИГАНДЫ ДЛЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ**

(31) **62/304,652; 62/370,754; 62/426,916**

(32) **2016.03.07; 2016.08.04; 2016.11.28**

(33) **US**

(62) **201891427; 2017.03.07**

(71) Заявитель:
**ЭРРОУХЭД ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Розема Дэвид Б., Вэйкфилд
Даррен Х., Блохин Андрей В., Бенсон
Джонатан Д., Ли Чжэнь, Пэй Тао,
Флейц Фред (US)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Описаны новые нацеливающие лиганды, которые могут быть связаны с соединениями, такими как терапевтические соединения, которые могут быть полезны для направления соединений к мишени *in vivo*. Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, могут служить для нацеливания ингибирующих экспрессию олигомерных соединений, таких как агенты РНКи, в клетки печени для модуляции экспрессии генов. Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, при конъюгировании с терапевтическим соединением, могут применяться в различных приложениях, включая применение в терапевтических, диагностических, связанных с валидацией мишеней, и в приложениях, связанных с геномными исследованиями. Композиции, включающие нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, будучи связанными с ингибирующими экспрессию олигомерными соединениями способны опосредовать экспрессию нуклеотидных последовательностей-мишеней в клетках печени, таких как гепатоциты, что можно применять в ингибировании активности или экспрессии гена в клетке, ткани или организме.

A2

202392584

202392584

A2

НАЦЕЛИВАЮЩИЕ ЛИГАНДЫ ДЛЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

5 Эта заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США под серийным номером 62/304,652, поданной 7 марта 2016 г., и предварительной заявки на патент США № 62/370754, поданной 4 августа 2016 г., и предварительной заявки на патент США № 62/426,916, поданной 28 ноября 2016 г., содержание каждой из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

10

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Для получения терапевтического эффекта или возможности применения в диагностических целях многие соединения необходимо доставлять в определенные места (например, в клетку-мишень (клетки)). Это часто бывает при попытках доставки
15 терапевтического соединения *in vivo*. Кроме того, возможность эффективно доставлять соединение в определенное место может ограничить или в значительной степени устранить нецелевые последствия (такие как побочные эффекты), которые могут быть вызваны введением соединения. Один из способов осуществления доставки соединения, такого как терапевтическое соединение, в желаемое место *in vivo*, основан
20 на связывании или присоединении этого соединения к нацеливающему лиганду.

Одним из классов терапевтических соединений, которые можно нацеливать с применением нацеливающих лигандов, являются олигомерные соединения. Было показано, что олигомерные соединения, которые включают нуклеотидные
25 последовательности, по меньшей мере частично комплементарные нуклеотидной последовательности-мишени, изменяют функцию и активность мишени как *in vitro*, так и *in vivo*. Было показано, что при доставке в клетку, содержащую нуклеотидную последовательность - мишень (такую как мРНК), олигомерные соединения модулируют экспрессию мишени, что приводит к изменению транскрипции или трансляции
30 нуклеиновой кислоты-мишени. В некоторых случаях олигомерное соединение может снижать экспрессию гена за счет ингибирования нуклеиновой кислоты - мишени и/или запуска разрушения нуклеиновой кислоты-мишени.

Если нуклеиновая кислота-мишень представляет собой мРНК, один из механизмов, по которым ингибирующее экспрессию олигомерное соединение может модулировать экспрессию мРНК-мишени, представляет собой РНК-интерференцию. РНК-интерференция представляет собой биологический процесс, позволяющий РНК или РНК-подобным молекулам (таким как химически модифицированные РНК-молекулы) “глушить” экспрессию генов (осуществлять сайленсинг) путем разрушения. Считается, что посттрансляционный сайленсинг генов является эволюционно консервативным механизмом защиты клеток для предотвращения экспрессии чужеродных генов.

10 Было показано, что синтетические молекулы РНК и РНК-подобные молекулы вызывают РНК-интерференцию *in vivo*. Например, Elbashir et al. (*Nature* **2000**, *411*, 494-98) описывают РНКи, осуществляемую путем введения дуплексов синтетических 21-нуклеотидных молекул РНК в культивируемые клетки млекопитающих. Типы синтетических молекул РНК и РНК-подобных молекул, которые могут запускать ответный механизм РНКи, могут включать модифицированные нуклеотиды и/или одну или более связей, отличных от фосфодиэфирной связи.

Дополнительно, одноцепочечные молекулы РНК и РНК-подобные молекулы, которые могут также включать модифицированные нуклеотиды и/или одну или более связей, отличных от фосфодиэфирной связи, также могут изменять экспрессию нуклеиновой кислоты-мишени, такой как мРНК-мишень.

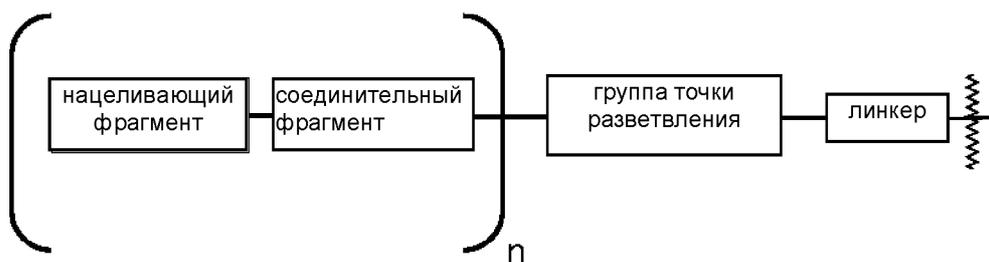
КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

В настоящем документе раскрыты нацеливающие лиганды, которые могут улучшать доставку терапевтических соединений в конкретный сайт, например, конкретный орган или ткань в организме субъекта, такого как пациент-человек или животное. В некоторых вариантах реализации нацеливающие лиганды, описанные в настоящем документе, могут улучшать нацеленную доставку ингибирующих экспрессию олигомерных соединений. В некоторых вариантах реализации нацеливающие лиганды могут улучшать доставку ингибирующих экспрессию олигомерных соединений в печень.

Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, включают или состоят из одного или более нацеливающих фрагментов, одного или более соединительных фрагментов (tethers), одной или более групп, содержащих точку ветвления, и одного или более линкеров.

5

В настоящем документе раскрыты нацеливающие лиганды, которые включают, состоят из или состоят по существу из общей структуры Формулы А:

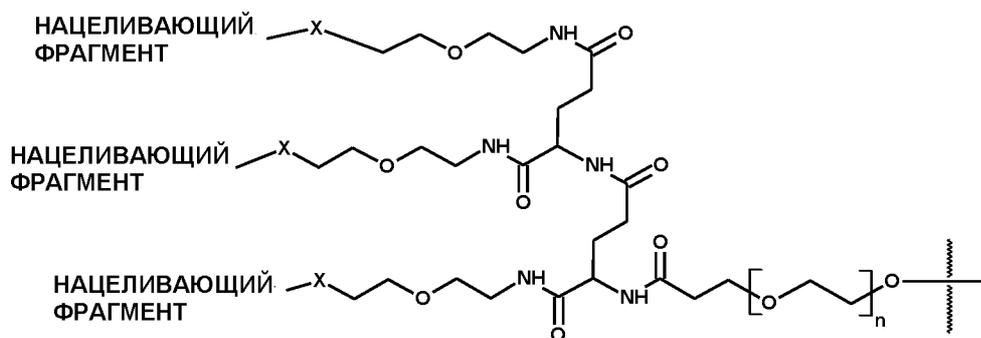


, где n

представляет собой целое число от 1 до 4 (например, 1, 2, 3 или 4).

10

В некоторых вариантах реализации нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, включают, состоят из или состоят по существу из общей структуры Формулы В:



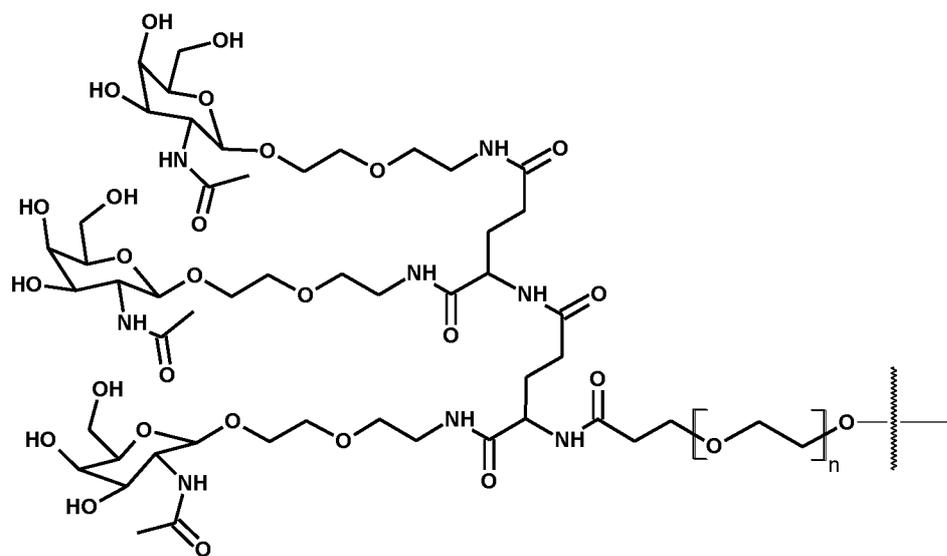
15

, где n

представляет собой целое число от 1 до 20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20); X представляет собой O, S или NH; и нацеливающий фрагмент выбран из группы, состоящей из: N-ацетилгалактозамина, галактозы, галактозамина, N-формилгалактозамина, N-пропионилгалактозамина, N-н-бутаноилгалактозамина и N-изо-бутаноилгалактозамина.

20

В некоторых вариантах реализации нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, включают, состоят из или состоят по существу из следующей структуры :

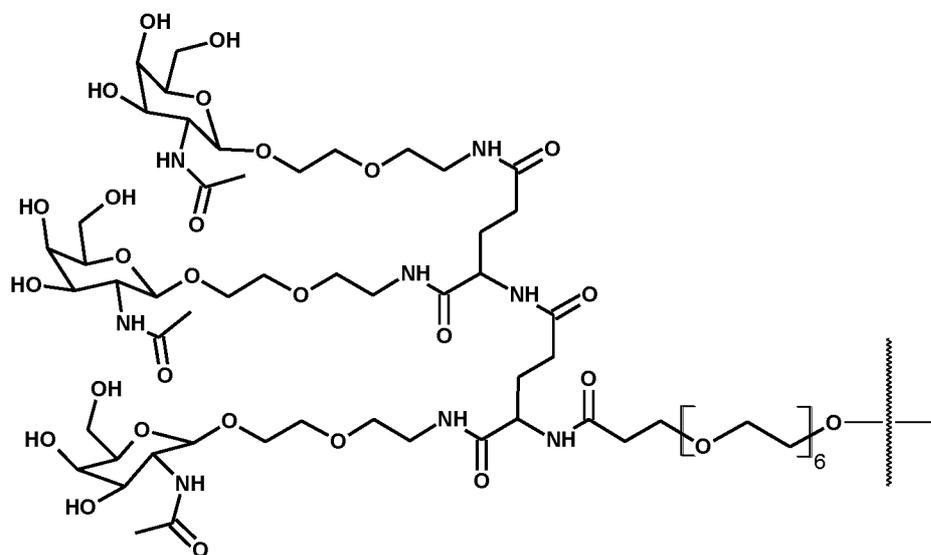


, где n

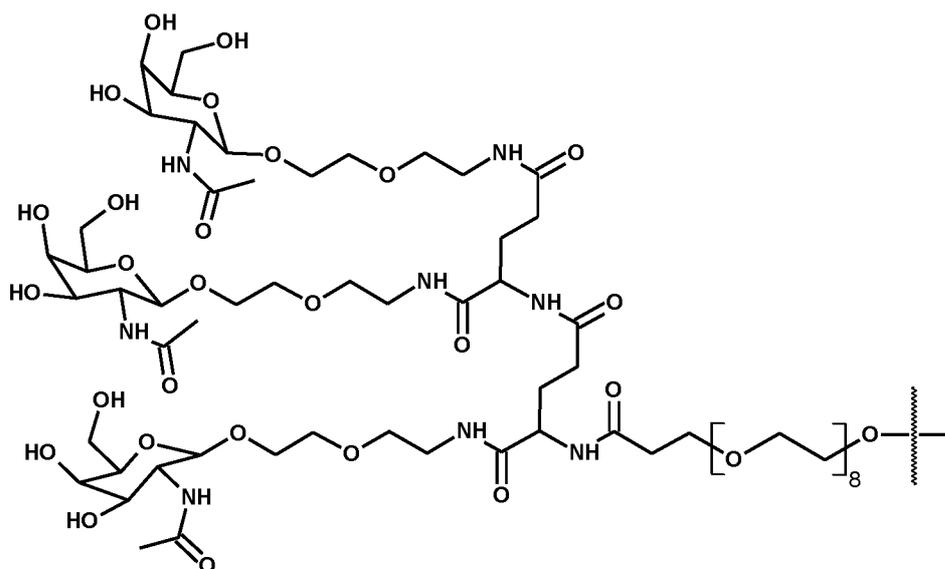
представляет собой целое число от 1 до 20 (Структура 1).

5

В некоторых вариантах реализации раскрытые нацеливающие лиганды включают, состоят из или состоят по существу из структуры, выбранной из:

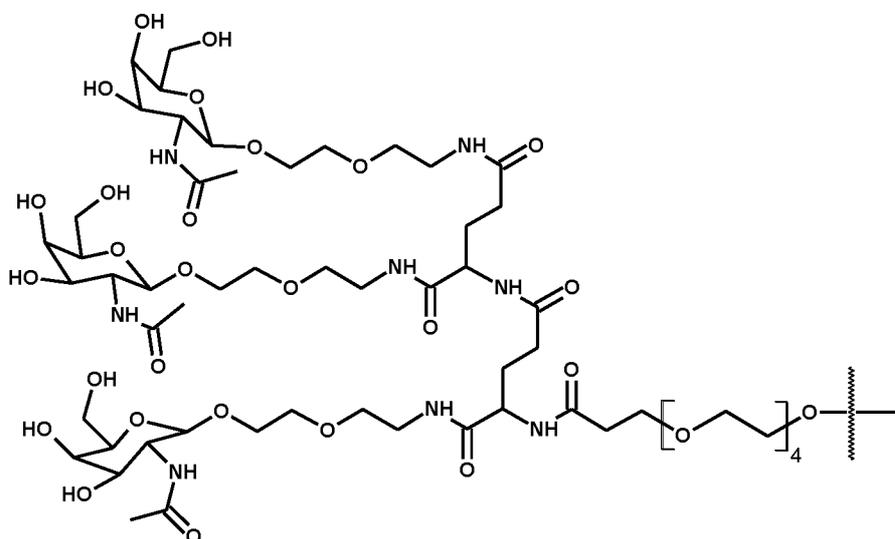


(Структура 101);



(Структура 102);

и



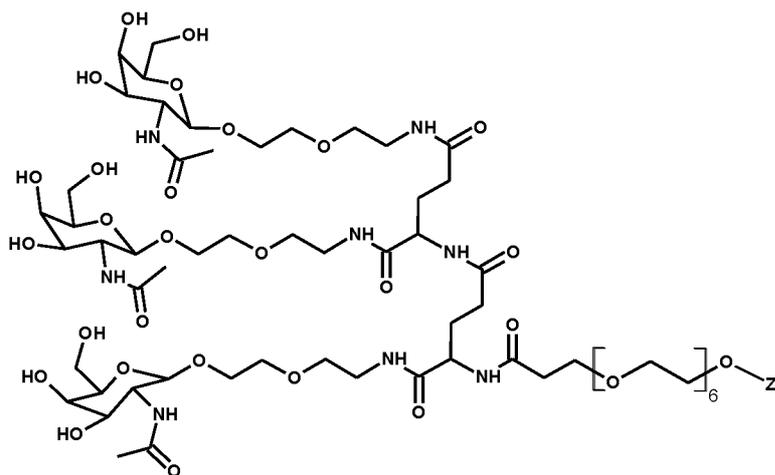
(Структура 103).

- 5 Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, включают один или более нацеливающих фрагментов. В некоторых вариантах реализации нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, включают N-ацетилгалактозамин в качестве нацеливающего фрагмента.
- 10 Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, могут быть соединены, напрямую или опосредовано, с соединением, таким как терапевтическое соединение, например, ингибирующее экспрессию олигомерное соединение, например, с 3'- или 5'-концом ингибирующего экспрессию олигомерного соединения. В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение включает один или
- 15 более модифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации

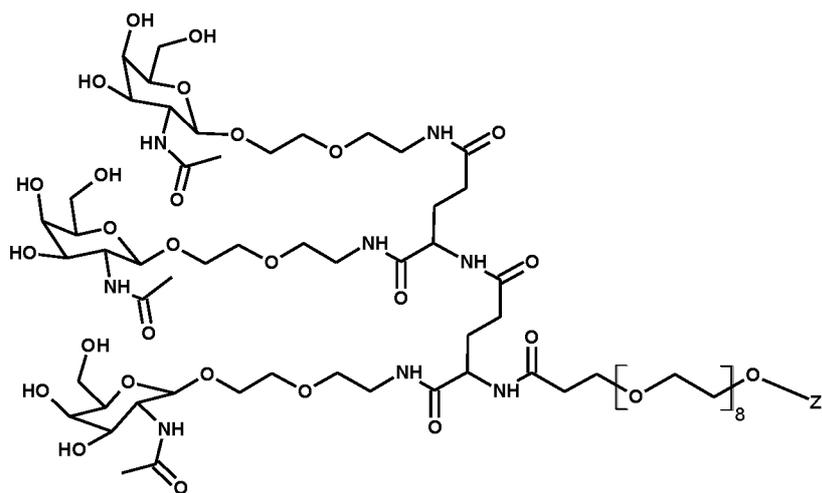
ингибирующее экспрессию олигомерное соединение представляет собой агент РНКи, такой как двунитевый агент РНКи. В некоторых вариантах реализации нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, соединены с 5'-концом смысловой ниде двунитевого агента РНКи. В некоторых вариантах реализации нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, соединены с агентом РНКи фосфатной, фосфотиоатной или фосфонатной группой на 5'-конце смысловой нити двунитевого агента РНКи.

В настоящем документе раскрыты композиции, содержащие нацеливающий лиганд и ингибирующее экспрессию олигомерное соединение. В настоящем документе раскрыты композиции, содержащие нацеливающий лиганд и агент РНКи.

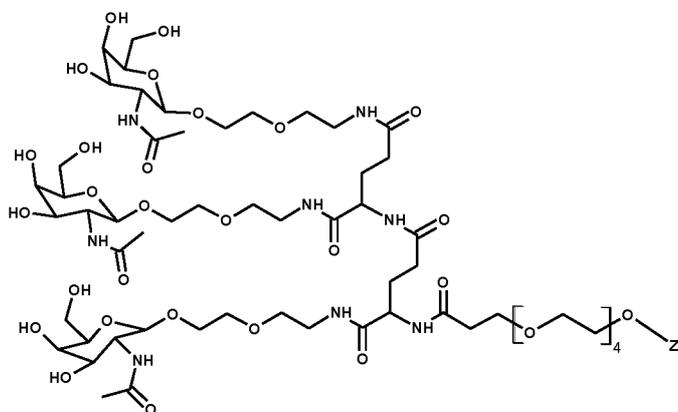
В некоторых вариантах реализации раскрытые в настоящем документе композиции, содержащие нацеливающий лиганд и агент РНКи, имеют структуру, представленную:



15 , где Z включает или состоит из ингибирующего экспрессию олигомерного соединения (Структура 101a);



, где Z включает или состоит из ингибирующего экспрессию олигомерного соединения (Структура 102a); и

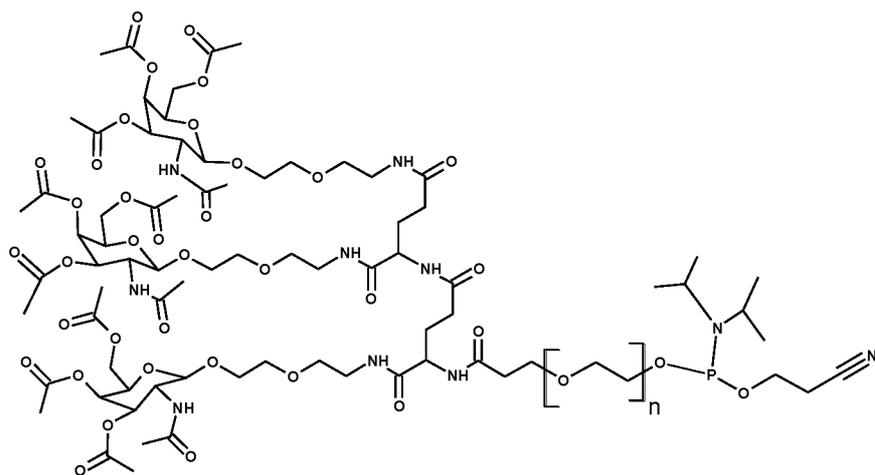


, где Z включает или состоит из ингибирующего экспрессию олигомерного соединения (Структура 103a).

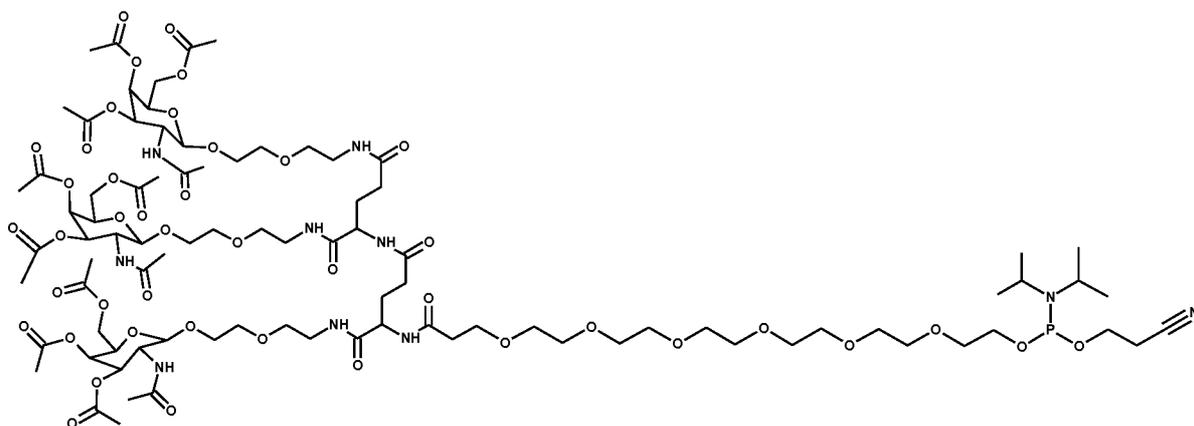
5

В настоящем документе раскрыты соединения - фосфорамидиты, включающие нацеливающие лиганды.

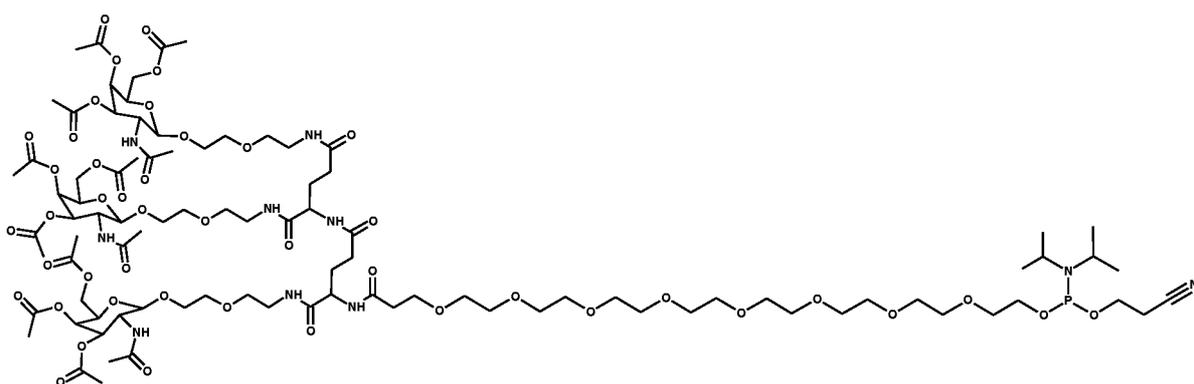
10 В некоторых вариантах реализации соединения - фосфорамидиты, включающие нацеливающие лиганды, раскрыты в настоящем документе, имеют структуру, представленную:



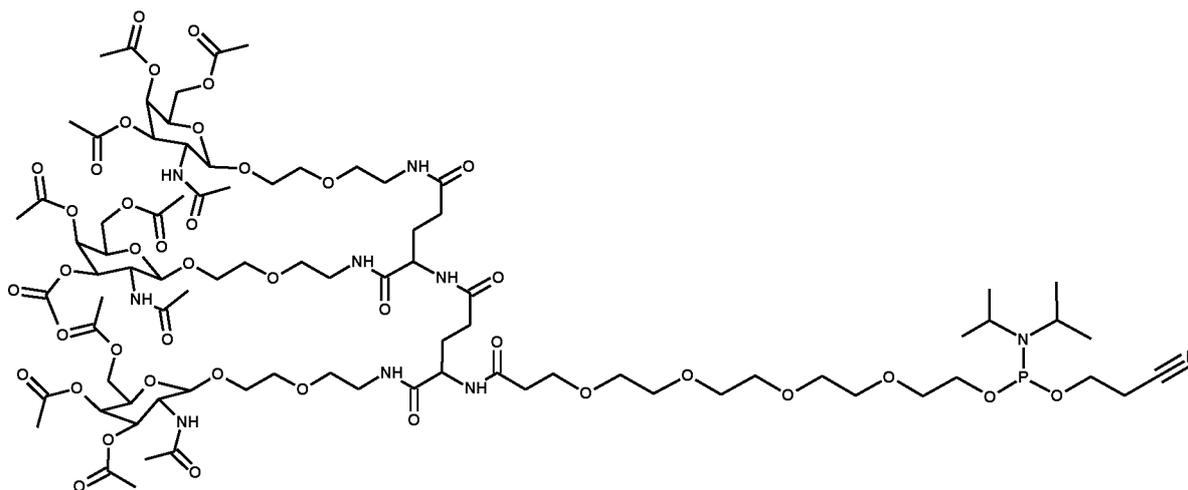
, где n представляет собой целое число от 1 до 20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) (Структура 1d);



5 (Структура 101d);



(Структура 102d); или



(Структура 103d).

Также раскрыты фармацевтические композиции, которые включают раскрытые в
5 настоящем документе нацеливающие лиганды.

Раскрыты способы лечения заболевания или нарушения, при котором было бы полезно
введение терапевтического олигомерного соединения, включающий введение субъекту
терапевтического олигомерного соединения, связанного с нацеливающим лигандом,
10 раскрытым в настоящем документе.

В настоящем документе раскрыты способы ингибирования экспрессии нуклеиновой
кислоты-мишени у субъекта, включающий введение терапевтического количества
ингибирующего экспрессию олигомерного соединения, соединенного с раскрытыми в
15 настоящем документе нацеливающими лигандами.

В настоящем документе раскрыты способы доставки ингибирующего экспрессию
олигомерного соединения в печень *in vivo*, включающий введение ингибирующего
экспрессию олигомерного соединения, связанного нацеливающим лигандом,
20 раскрытым в настоящем документе, субъекту.

В настоящем тексте термин “связанный” применительно к соединению между двумя
молекулами означает, что две молекулы соединены ковалентной связью или что две
молекулы объединены нековалентными связями (например, водородными связями или
25 ионными связями). В некоторых примерах, где термин “связанный” относится к

объединению двух молекул нековалентными связями, это объединение (ассоциация) двух разных молекул характеризуется K_D ниже 1×10^{-4} М (например, ниже 1×10^{-5} М, ниже 1×10^{-6} М или ниже 1×10^{-7} М) в физиологически приемлемом буфере (например, фосфатном буферном растворе).

5

В настоящем тексте термин “связан напрямую” относится к первому соединению или группе, связанным со вторым соединением или группой без каких-либо расположенных между ними атомов или групп атомов. В настоящем тексте термин “связан опосредовано” относится к первому соединению, связанному со вторым соединением или группой через промежуточную группу, соединение или молекулу, такие как, например, линкерная (связывающая) группа. Если не указано иное, термин “связанный” в настоящем документе включает и “связанный напрямую” и “связанный опосредовано” в том виде как эти термины определены в настоящем документе.

10

15 В настоящем тексте “олигомерное соединение” представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую примерно 10-50 нуклеотидов или пар нуклеотидных оснований. В некоторых вариантах реализации олигомерное соединение имеет последовательность нуклеотидных оснований, которая по меньшей мере частично комплементарна кодирующей последовательности в экспрессируемой нуклеиновой кислоте-мишени или гене-мишени в клетке. В некоторых вариантах реализации олигомерные соединения, после доставки в клетку, экспрессирующую ген, способны ингибировать экспрессию соответствующего гена и называются в настоящем документе “ингибирующими экспрессию олигомерными соединениями”. Экспрессия гена может ингибироваться *in vitro* или *in vivo*. “Олигомерные соединения” включают следующие, но не ограничиваются ими: олигонуклеотиды, одонитевые олигонуклеотиды, одонитевые антисмысловые олигонуклеотиды, короткие интерферирующие RNA (киRNA, siRNA), двунитевые RNA (dsRNA, днРНК), микроРНК (miRNA, микроРНК), короткие шпилечные РНК (shRNA, кшРНК), рибозимы, молекулы, опосредующие РНК-интерференцию и дайсер-себстраты.

20

25

30

В настоящем тексте термин “олигонуклеотид” обозначает полимер из связанных нуклеозидов, каждый из которых может быть модифицированным или немодифицированным.

В настоящем тексте термин “однонитевый олигонуклеотид” обозначает однонитевое олигомерное соединение, имеющее последовательность, которая по меньшей мере частично комплементарна мРНК-мишени, которое способно гибридизоваться с мРНК-мишени за счет водородных связей в нормальных физиологических условиях

5 организме млекопитающего (или в сравнимых условиях *in vitro*). В некоторых вариантах реализации однонитевый олигонуклеотид представляет собой однонитевой антисмысловой олигонуклеотид.

В настоящем тексте “Агент РНКи” обозначает агент, который содержит молекулу РНК- или РНК-подобного олигонуклеотида (например, химически модифицированного РНК- олигонуклеотида), которая способна нарушать или подавлять трансляцию матричной РНК-транскриптов (мРНК) мРНК-мишени последовательность-специфическим

10 образом. В настоящем тексте агенты РНКи могут действовать по механизму РНК-интерференции (т.е., вызывая РНК-интерференцию за счет взаимодействия с компонентами пути РНК-интерференции (РНК-индуцируемы комплексом выключения (сайленсинга) гена или RISC) клеток млекопитающего), или за счет любого альтернативного механизма(механизмов) или пути(путей). Хотя считается, что агенты РНКи, в том смысле как этот термин используется в настоящем документе, действуют

15 в первую очередь по механизму РНК-интерференции, раскрытые агенты РНКи не связаны с и не ограничены каким-либо конкретным путем или механизмом действия. Агенты РНКи включают следующие, но не ограничиваются ими: однонитевые олигонуклеотиды, однонитевые антисмысловые олигонуклеотиды, короткие интерферирующие RNA (киRNA, siRNA), двунитевые RNA (dsRNA, днРНК), микроРНК (miRNA, микроРНК), короткие шпилечные РНК (shRNA, кшРНК) и дайсер-себстраты. Агенты РНКи, описанные в настоящем документе, состоят из

20 олигонуклеотида, нить которого по меньшей мере частично комплементарна мРНК, на которую происходит нацеливание. В некоторых вариантах реализации агенты РНКи, описанные в настоящем документе, являются двунитевыми, и состоят из антисмысловой нити и смысловой нити, которая по меньшей мере частично комплементарна смысловой нити. Агенты РНКи могут включать модифицированные

30 нуклеотиды и/или одну или более связей, отличных от фосфодиэфирной связи. В некоторых вариантах реализации агенты РНКи, описанные в настоящем документе, являются однонитевыми.

В настоящем тексте термины “выключать”(сайленсинг), “снижать”, “ингибировать”, “подавлять” или “нокдаун” применительно к экспрессии данного гена, обозначают, что экспрессия этого гена, измеряемая по уровню РНК, транскрибируемой с гена, или уровню полипептида, белка или субъединицы белка, транслируемых с этой мРНК в клетке, группе клеток, ткани, органе или организме субъекта, в которых транскрибируется данный ген, снижается, когда эту клетку, группу клеток, орган или субъекта обрабатывают олигомерными соединениями, связанными с нацеливающими лигандами, описанными в настоящем документе, по сравнению со второй клеткой, группой клеток, тканью, органом или субъектом, которые не подвергали такой обработке.

В настоящем тексте термин “последовательность” или “нуклеотидная последовательность” обозначает последовательность или порядок нуклеотидных оснований или нуклеотидов, описываемых последовательностью букв с использованием стандартной номенклатуры для нуклеотидов.

В настоящем тексте и если нет других указаний, термин “комплементарный” применительно к описанию первой нуклеотидной последовательности (например, Смысловой нити Агент РНКиа или мРНК-мишени) по отношению ко второй нуклеотидной последовательности (например, одноцепочечного антисмыслового олигонуклеотида или антисмысловой нити двухцепочечного Агент РНКиа), обозначает способность олигонуклеотида или полинуклеотида, включающего указанную первую нуклеотидную последовательность, гибридизоваться (образовывать водородные связи в паре оснований в физиологических условиях организма млекопитающего (или в сравнимых условиях *in vitro*)) и образовывать дуплекс или структуру типа двойной спирали в определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, включающим вторую нуклеотидную последовательность. Комплементарные последовательности включают пары оснований по Уотсону-Крику и не Уотсон-Криковские пары оснований и включают природные или модифицированные нуклеотидов или миметики нуклеотидов, по меньшей мере, при условии выполнения приведенных выше требований к способности гибридизоваться.

В настоящем тексте “абсолютно комплементарный” или “полностью комплементарный” означает, что все (100%) нуклеотиды в непрерывной

последовательности первого полинуклеотида будут гибридизоваться с таким же числом оснований в непрерывной последовательности второго полинуклеотида. Непрерывная последовательность может включать всю первую или вторую нуклеотидную последовательность или ее часть.

5

В настоящем тексте “частично комплементарный” означает, что в гибридизованной паре последовательностей нуклеотидных оснований по меньшей мере 70%, но не все основания в непрерывной последовательности первого полинуклеотида будут гибридизоваться с таким же числом оснований в непрерывной последовательности второго полинуклеотида.

10

В настоящем тексте “по существу комплементарный” означает, что в гибридизованной паре последовательностей нуклеотидных оснований, по меньшей мере 85%, но не все основания в непрерывной последовательности первого полинуклеотида будут гибридизоваться с таким же числом оснований в непрерывной последовательности второго полинуклеотида. Термины “комплементарный”, “полностью комплементарный” и “по существу комплементарный” в настоящем тексте могут применяться в отношении соответствия между смысловой нитью и антисмысловой нитью двунитевого агента РНКи, между антисмысловой нитью двунитевого агента РНКи и последовательностью мРНК-мишени или между последовательностью одонитевого антисмыслового олигонуклеотида и последовательностью мРНК-мишени.

15

20

В настоящем тексте термины “лечить”, “лечение” и т.п., обозначают способы и меры, предпринимаемые для обеспечения снижения числа, тяжести и/или частоты одного или более симптомов заболевания у субъекта.

25

В настоящем тексте фраза “введение в клетку” применительно к олигомерному соединению обозначает функциональную доставку этого олигомерного соединения в клетку. Фраза “функциональная доставка” означает, процесс доставки олигомерного соединения в клетку способом, который дает возможность олигомерному соединению проявлять ожидаемую биологическую активность, например, последовательность-специфичное ингибирование экспрессии гена.

30

Если не указано иное, использование символа  в настоящем документе означает, что с ним могут быть связаны любая группа или группы, которые входят в объем раскрытого в настоящем документе соединения.

- 5 В настоящем тексте термин “изомеры” относится к соединениям, имеющим одинаковую молекулярную формулу, но различающимся по природе или последовательности связей между атомами или расположением атомов в пространстве. Изомеры, которые различаются расположением атомов в пространстве, называются “стереоизомеры”. Стереоизомеры, которые не являются зеркальными отражениями друг друга, называются “диастереоизомеры”, а стереоизомеры, которые являются несовмещаемыми зеркальными отражениями, называются “энантиомерами”, или иногда оптическими изомерами. Атом углерода, связанный с четырьмя неидентичными заместителями, называется “хиральным центром”.
- 10
- 15 В настоящем тексте если для асимметричного центра не указано конкретно, что структура имеет определенную конформацию, для каждой структуры, в которой асимметричные центры присутствуют и могут порождать энантиомеры, диастереомеры, или другие стереоизомерные конфигурации, предполагается, что каждая раскрытая в настоящем документе структура представляет все такие возможные
- 20 изомеры, включая их оптически чистые и рацемические формы. Например, подразумевается, что раскрытые в настоящем документе структуры охватывают смеси диастереомеров, а также отдельные стереоизомеры.

Термин “замещенный” (содержащий заместители) в настоящем тексте означает, что

25 любые один или более водородов на обозначенном атоме, обычно, атоме углерода, кислорода или азота, заменено любой группой, обозначенной в настоящем документе, при условии, что при этом не превышает обычная валентность обозначенного атома, и что эта замена дает стабильное соединение. Неограничивающие примеры заместителей включают C1-C6 алкил, C2-C6 алкенил, C2-C6 алкинил, циано,

30 гидроксил, оксо, карбоксил, циклоалкил, циклоалкенил, гетероциклил, гетероарил, арил, кето, алкоксикарбонил, арилоксикарбонил, гетероарилоксикарбонил или галоген (например, F, Cl, Br, I). Если заместитель представляет собой кето или оксо (*m.e.*, =O), то заменены два (2) водорода на указанном атоме. Двойные связи в кольце в

настоящем тексте представляют собой двойные связи, образованные между двумя соседними атомами в кольце (например, C=C, C=N, N=N и т.д.).

5 Некоторые соединения, описанные в настоящем документе, могут существовать в таутомерной форме, которая также включена в объем настоящего описания. “Таутомеры” представляют собой соединения, структуры которых значительно различаются по расположению атомов, но которые существуют в легко и быстро устанавливаемом равновесии. Следует понимать, что соединения согласно настоящему описанию, могут быть изображены в виде различных таутомеров. Также
10 следует понимать, что если соединения имеют таутомерные формы, предполагается, что все таутомерные формы включены в объем настоящего описания, и присвоенные соединениям названия не исключают никакую из таутомерных форм.

Соединения и фармацевтически приемлемые соли, раскрытые в настоящем документе,
15 могут существовать в одной или более таутомерных формах, включая кетон - енол, амид - нитрил, лактам - лактим, амид – имидиновая кислотав гетероциелических кольцах (например, в азотистых основаниях гуанине, тимине и цитозине), амин - енамин и енамин - енамин, а также виде геометрических изомеров и их смесей. Кольцевая таутомерия, проявляемая глюкозой и другими сахарами, возникает в
20 результате взаимодействия альдегидной группы (-CHO) в молекуле сахара с одной из гидроксигрупп (-OH) в той же молекуле, что приводит к образованию циклической (кольцевой) формы. Все такие таутомерные формы включены в объем настоящего изобретения. Таутомеры существуют в виде смесей группы таутомеров в растворе. Даже несмотря на то, что может быть приведено описание одного таутомера,
25 настоящее изобретение включает все таутомеры соединения, раскрытого в настоящем документе. Концепцию таутомеров, которые могут превращаться друг в друга в результате таутомеризации, называют таутомерий. При таутомерии происходит одновременный сдвиг электронов и атома водорода.

30 Различные виды таутомеризации катализируются: Основанием: 1. депротонирование; 2. образование делокализованного аниона (например, енолят); 3. протонирование по различным положениям аниона; Кислотой: 1. протонирование; 2. образование делокализованного катиона; 3. депротонирование по различным соседним с катионом положениям.

В настоящем тексте термин “алкил” относится к насыщенной алифатической углеводородной группе, линейной или разветвленной, содержащей от 1 до 10 атомов углерода, если не указано иное. Например, “С1-С6 алкил” включает алкильные группы, содержащие 1, 2, 3, 4, 5 или 6 атомов углерода в линейной или разветвленной конфигурации. В настоящем тексте термин “аминоалкил” относится к алкильной группе, такой как определено выше, замещенной по любому положению одной или более аминогруппами, если это допускается правилами валентности. Аминогруппы могут быть незамещенными, монозамещенными или дизамещенными.

10

В настоящем тексте термин “циклоалкил” обозначает насыщенную или ненасыщенную неароматическую углеводородную кольцевую группу, содержащую от 3 до 14 атомов углерода, если не указано иное. Примеры циклоалкильных групп включают, но не ограничиваются ими, циклопропил, метилциклопропил, 2,2-диметилциклобутил, 2-этилциклопентил или циклогексил и т.д. Циклоалкилы могут включать несколько спиро- или конденсированных колец. Циклоалкильные группы необязательно являются моно-, ди-, три-, тетра- или пентазамещенными по любому положению, если это допускается правилами валентности.

15

В настоящем тексте термин “алкенил” относится к неароматическому углеводородному радикалу, который может быть линейным или разветвленным, содержащему по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь и от 2 до 10 атомов углерода если не указано иное. В таких группах может содержаться до пяти углерод-углеродных двойных связей. Например, “С2-С6” определяется как алкенильный радикал, содержащий от 2 до 6 атомов углерода. Примеры алкенильных групп включают, но не ограничиваются ими, этенил, пропенил, бутенил и циклогексенил. Линейный, разветвленный или циклический фрагмент алкенильной группы может содержать двойные связи и необязательно является моно-, ди-, три-, тетра- или пентазамещенным по любому положению, если это допускается обычной валентностью. Термин “циклоалкенил” обозначает моноциклическую углеводородную группу, содержащую указанное количество атомов углерода и по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь.

25

30

В настоящем тексте термин “алкинил” относится к углеводному радикалу, линейному или разветвленному, содержащему от 2 до 10 атомов углерода, если конкретно не указано иное, и по меньшей мере одну углерод-углеродную тройную связь. Может присутствовать до 5 углерод-углеродных тройных связей. Соответственно, “С2-С6 алкинил” обозначает алкинильный радикал, содержащий от 2 до 6 атомов углерода. Примеры алкинильных групп включают следующие, но не ограничиваются ими: этинил, 2-пропинил и 2-бутинил. Линейная или разветвленная часть алкинильной группы может содержать тройные связи, как это допускают обычные требования валентности, и необязательно могут быть моно-, ди-, три-, тетра- или пентазамещенными в любом положении, как это допускает обычная валентность.

В настоящем тексте “алкоксил” или “алкокси” относится к алкильной группе, определенной выше, с указанным числом атомов углерода, присоединенной кислородным мостиком. Подразумевается, что С₁₋₆ алкокси включают С₁, С₂, С₃, С₄, С₅ и С₆ алкокси-группы. Подразумевается, что С₁₋₈ алкокси включают С₁, С₂, С₃, С₄, С₅, С₆, С₇ и С₈ алкокси-группы. Примеры алкокси включают следующие, но не ограничиваются ими: метокси, этокси, н-пропокси, и-пропокси, н-бутокси, сек-бутокси, трет-бутокси, н-пентокси, сек-пентокси, н-гептокси и н-октокси.

В настоящем тексте “кето” относится к любой алкильной, алкенильной, алкинильной, циклоалкильной, циклоалкенильной, гетероциклической, гетероарильной или арильной группе, определенной в настоящем документе, присоединенной карбонильным мостиком. Примеры кето-группы включают следующие, но не ограничиваются ими: алканоил (например, ацетил, пропионил, бутаноил, пентаноил, гексаноил), акленоил (например, акрилоил) алкиноил (например, этиноил, пропиноил, бутиноил, пентиноил, гексиноил), арилоил (например, бензоил), гетероарилоил (например, пирролоил, имидазолил, хинолиноил, пиридиноил).

В настоящем тексте “алкоксикарбонил” относится к любой алкокси-группе, определенной выше, присоединенной карбонильным мостиком (т.е., -C(O)O-алкилу). Примеры алкоксикарбонильных групп включают следующие, но не ограничиваются ими: метоксикарбонил, этоксикарбонил, изо-пропоксикарбонил, н-пропоксикарбонил, трет-бутоксикарбонил, бензилоксикарбонил или н-пентоксикарбонил.

В настоящем тексте “арилоксикарбонил” относится к любой арильной группе, определенной в настоящем документе, присоединенной через оксикарбонильный мостик (т.е., -C(O)O-арил). Примеры арилоксикарбонильных групп включают следующие, но не ограничиваются ими: феноксикарбонил и нафтилоксикарбонил.

В настоящем тексте “гетероарилоксикарбонил” относится к любой гетероарильной группе, определенной в настоящем документе, присоединенной через оксикарбонильный мостик (т.е., к -C(O)O-гетероарилу). Примеры гетероарилоксикарбонильных групп включают следующие, но не ограничиваются ими: 2-пиридилоксикарбонил, 2-оксазолилоксикарбонил, 4-тиазолилоксикарбонил, и пиримидинилоксикарбонил.

В настоящем тексте “арил” или “ароматический” обозначает любое стабильное моноциклическое или полициклическое углеводное кольцо, содержащее до 7 атомов в каждом кольце, причем по меньшей мере одно кольцо является ароматическим. Примеры арильных групп включают следующие, но не ограничиваются ими: фенил, нафтил, антраценил, тетрагидронафтил, инданил и бифенил. В случае, когда арильный заместитель является бициклическим и одно кольцо является неароматическим, предполагается, что присоединение происходит через ароматическое кольцо. Арильные группы необязательно являются моно-, ди-, три-, тетра- или пентазамещенными в любом положении, как это допускает обычная валентность.

В настоящем тексте термин “гетероарил” представляет стабильное моноциклическое или полициклическое кольцо, включающие до 7 атомов в каждом кольце, причем по меньшей мере одно кольцо является ароматическим и содержит от 1 до 4 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из O, N и S. Примеры гетероарильных групп включают следующие, но не ограничиваются ими: акридинил, карбазолил, циннолинил, хиноксалинил, пирразолил, индолил, бензотриазолил, фуранил, тиенил, бензотиенил, бензофуранил, бензимидазолонил, бензоксазолонил, хинолинил, изохинолинил, дигидроизоиндолинил, имидазопиридинил, изоиндолинил, индазолил, оксазолил, оксадиазолил, изоксазолил, индолил, пиразинил, пиридазинил, пиридинил, пиримидинил, пирролил, тетрагидрохинолинил. Также подразумевается, что “гетероарил” включает N-оксидное производное любого азот-содержащего

гетероарила. В случаях, когда гетероарильный заместитель является бициклическим и одно кольцо является неароматическим или не содержит гетероатомов, предполагается, что присоединение происходит через ароматическое кольцо или кольцо, содержащее гетероатом. Гетероарильные группы необязательно являются моно-, ди-, три-, тетра-
5 или пентазамещенными в любом положении, как это допускает обычная валентность.

В настоящем тексте термин “гетероцикл”, “гетероциклический” или “гетероциклил” обозначает 3-14-членный ароматический или неароматический гетероцикл, содержащий от 1 до 4 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из O, N и S,
10 включая полициклические группы. В настоящем тексте термин “гетероциклический” также считается синонимом терминов “гетероцикл” и “гетероциклил”, и подразумевается, что они соответствуют определению, приведенному в настоящем документе. “Гетероциклил” включает вышеупомянутые гетероарилы, а также их дигидро- и тетрагидро-аналоги. Примеры гетероциклильных групп включают
15 следующие, но не ограничиваются ими: азетидинил, бензимидазолил, бензофуранил, бензофуразанил, бензопиразолил, бензотриазолил, бензотиофенил, бензоксазолил, карбазолил, карболинил, циннолинил, фуранил, имидазолил, индолинил, индолил, индолазинил, индазолил, изобензофуранил, изоиндолил, изохинолил, изотиазолил, изоксазолил, нафтпиридинил, оксадиазолил, оксооксазолидинил, оксазолил, оксазолин,
20 оксопиперазинил, оксопирролидинил, оксоморфолинил, изоксазолин, оксетанил, пиранил, пиразинил, пиразолил, пиридазинил, пиридопиридинил, пиридазинил, пиридил, пиридинонил, пиримидил, пиримидинонил, пирролил, хиназолинил, хинолил, хиноксалинил, тетрагидропиранил, тетрагидрофуранил, тетрагидротииопиранил, тетрагидроизохинолинил, тетразолил, тетразолопиридил, тиadiaзолил, тиазолил,
25 тиенил, триазолил, 1,4-диоксанил, гексагидроазепенил, пиперазинил, пиперидинил, пиридин-2-онил, пирролидинил, морфолинил, тиоморфолинил, дигидробензимидазолил, дигидробензофуранил, дигидробензотиофенил, дигидробензоксазолил, дигидрофуранил, дигидроимидазолил, дигидроиндолил, дигидроизоксазолил, дигидроизотиазолил, дигидрооксадиазолил, дигидрооксазолил,
30 дигидропиразинил, дигидропиразолил, дигидропиридинил, дигидропиримидинил, дигидропирролил, дигидрохинолинил, дигидротетразолил, дигидротиадиазолил, дигидротиазолил, дигидротиенил, дигидротриазолил, дигидроазетидинил, диоксидотиоморфолинил, метилendiоксибензоил, тетрагидрофуранил и тетрагидротиенил и их N-оксиды. Заместитель гетероциклила может присоединяться

через атом углерода или через гетероатом. Гетероциклические группы необязательно являются моно-, ди-, три-, тетра- или пентазамещенными в любом положении, как это допускает обычная валентность.

5 Средний специалист в данной области легко поймет и оценит, что соединения и композиции, раскрытые в настоящем документе, могут содержать некоторые атомы (например, Атомы N, O или S) в протонированном или депротонированном состоянии, в зависимости от среды, в которые помещены это соединение или композиция. Соответственно в настоящем тексте раскрытые в нем структуры предусматривают, что
10 некоторые функциональные группы, такие, как например, OH, SH или NH, могут быть протонированы или депротонированы. Предусматривается, что настоящее раскрытие охватывает раскрытые соединения и композиции вне зависимости от их статуса протонирования, определяемого рН среды; специалист в данной области легко это поймет.

15 В настоящем документе выражение “состоящий из” исключает любые элементы, этапы или ингредиенты, не указанные в пункте формулы изобретения. При применении в формуле изобретения настоящего документа выражение “состоящий по существу из” ограничивает объем пункта формулы изобретения указанными материалами или
20 этапами и материалами или этапами, которые не оказывают значительного влияния на основные и новые характеристики или характеристики заявленного изобретения.

Если не определено иначе, все технические и научные термины, применяемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое им обычно придает средний
25 специалист в области, к которой принадлежит изобретение. Несмотря на то, что для реализации или исследования настоящего изобретения можно применять способы и материалы, схожие с теми, что описано в настоящем документе, или эквивалентные им, подходящие способы и материалы описаны ниже. Содержание всех публикаций, патентных заявок, патентов и других ссылок, отмеченных в настоящем описании,
30 включено в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылок. В случае противоречий настоящее описание, включая определения, является более предпочтительным. Кроме того, материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными, но не ограничивающими.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут понятны из нижеследующих подробного описания и формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

5 **ФИГ. 1** представляет собой ^1H -ЯМР-спектр соединения **3** (как описано ниже в Примере 1).

ФИГ. 2 представляет собой ^1H -ЯМР-спектр соединения **4** (как описано ниже в Примере 1).

10

ФИГ. 3 представляет собой ^1H -ЯМР-спектр соединения **6** (как описано ниже в Примере 1)

15

ФИГ. 4 представляет собой ^1H -ЯМР-спектр соединения **7** (как описано ниже в Примере 1)

ФИГ. 5 представляет собой ^1H -ЯМР-спектр соединения **9** (как описано ниже в Примере 1).

20

ФИГ. 6 представляет собой ^1H -ЯМР-спектр соединения **10** (которое представляет собой Структуру 101d согласно настоящему документу и описано ниже в Примере 1).

25

ФИГ. 7 представляет собой ^1H -ЯМР-спектр соединения **13** (которое представляет собой Структуру 103d согласно настоящему документу и описано ниже в Примере 2).

30

ФИГ. 8 представляет собой ^1H -ЯМР-спектр соединения **16** (которое представляет собой Структуру 102d согласно настоящему документу и описано ниже в Примере 3).

ФИГ. 9 представляет собой ВЭЖХ-хроматограмму для AM03704, конъюгированного со Структурой 103d (как описано ниже в Примере 5).

- ФИГ. 10** представляет собой ВЭЖХ-хроматограмму для АМ03704, конъюгированного со Структурой 101d (как описано ниже в Примере 5).
- 5 **ФИГ. 11** представляет собой ВЭЖХ-хроматограмму для АМ03704, конъюгированного со Структурой 102d (как описано ниже в Примере 5).
- ФИГ. 12** представляет собой график, иллюстрирующий нормированные уровни белка мышиноного Фактора 12 (F12) у мышей дикого типа (как описано ниже в Примере
10 6).
- ФИГ. 13** представляет собой график, иллюстрирующий нормированные уровни белка мышиноного Фактора 12 (F12) у мышей дикого типа (как описано ниже в Примере
15 7).
- ФИГ. 14** представляет собой график, иллюстрирующий нормированные уровни частиц липопротеина (а) (Lp(a)) у трансгенных мышей Lp(a) Tg (как описано ниже в
Примере 8).
- 20 **ФИГ. 15** представляет собой график, иллюстрирующий нормированные уровни частиц липопротеина (а) (Lp(a)) у трансгенных мышей Lp(a) Tg (как описано ниже в
Примере 9).
- ФИГ. 16** представляет собой график, иллюстрирующий нормированные уровни apo(a)
25 in apo(a) transgenic (Tg) mice (как описано ниже в Примере 10).
- ФИГ. 17** представляет собой график, иллюстрирующий нормированные уровни белка cF12 у яванских макаков (как описано ниже в Примере 12).
- 30 **ФИГ. 18** представляет собой график, иллюстрирующий нормированные уровни белка ААТ (Z-ААТ) у трансгенных машей PiZ (как описано ниже в Примере 13).

ФИГ. 19 представляет собой график, иллюстрирующий нормированные уровни белка мышинового Фактора 12 (F12) у мышей дикого типа (как описано ниже в Примере 14).

5

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Описаны новые нацеливающие лиганды, которые связаны с соединениями, такими как терапевтические или диагностические ингибирующие экспрессию олигомерные соединения. В некоторых вариантах реализации соединения, которые связаны с нацеливающими лигандами, описанными в настоящем документе, включают или
10 состоят из терапевтических соединений, которые представляют собой агенты РНКи. Нацеливающие лиганды можно применять для нацеливания терапевтических соединений в желаемое положение нуклеиновой кислоты-мишени или гена-мишени. Также в настоящем документе раскрыты композиции, включающие нацеливающие лиганды и терапевтические соединения, такие как композиции, включающие или
15 состоящие из нацеливающих лигандов и ингибирующих экспрессию олигомерных соединений.

Новые нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, обеспечивают эффективное нацеливание или биораспределение, достаточную стабильность *in vivo* и
20 *in vitro*, и могут быть синтезированы в виде фосфорамидитов, что снижает затраты и трудоемкость изготовления, и может повысить эффективность относительно рассмотренных ранее нацеливающих лигандов, связанных с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, таким как агент РНКи.

25 **Нацеливающие лиганды**

Нацеливающие лиганды состоят из одной или более нацеливающей группы(групп) или нацеливающего фрагмента(фрагментов), которые могут служить для улучшения свойств фармакокинетики и биораспределения соединения, с которым они связаны, и улучшать клетко- или тканеспецифичное распределение и клетка-специфическое
30 поглощение конъюгированной композиции. В целом, нацеливающий лиганд способствует направленной доставке терапевтического соединения, с которым он связан, в нужный сайт-мишень. В некоторых случаях, нацеливающий фрагмент может связываться с клеткой или клеточным рецептором и инициировать эндоцитоз,

способствуя попаданию терапевтического соединения в клетку. Нацеливающий фрагмент может включать соединения, обладающие аффинностью к клеточным рецепторам или молекулам клеточной поверхности или антитела. Различные нацеливающие лиганды, которые содержат нацеливающие фрагменты, могут быть
5 связаны с терапевтическими агентами и другими соединениями для нацеливания агентов на клетки и конкретные (специфические) клеточные рецепторы. Типы нацеливающих фрагментов включают углеводы, холестерин и холестерильные группы, а также стероиды. Нацеливающие фрагменты, которые могут связываться с клеточными рецепторами, включают сахараиды, такие как галактоза, производные
10 галактозы (такие как N-ацетилгалактозамин), манноза и производные маннозы; другие углеводами; гликаны; гаптены, витамины, фолат; биотин, аптамеры; и пептиды, такие как RGD-содержащие пептиды, инсулин, ЭФР и трансферрин.

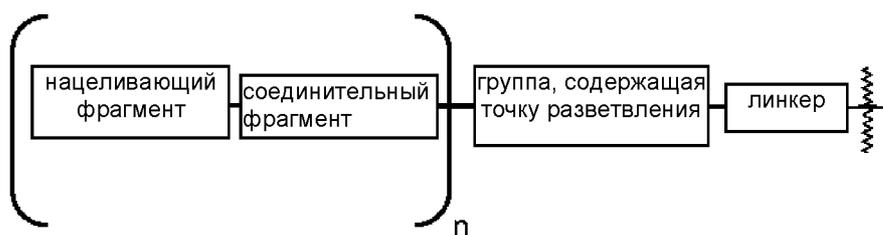
Нацеливающие фрагменты, о которых известно, что они связываются с
15 асиалогликопротеиновым рецептором (ASGPR), особенно полезны для направления доставки олигомерных соединений в печень. Асиалогликопротеиновые рецепторы в больших количествах экспрессируются на клетках печени, включая гепатоциты. Нацеливающие фрагменты для клеточных рецепторов, которые нацеливают на ASGPR, включают галактозу и производные галактозы. В частности, кластеры производных
20 галактозы, включая кластеры, состоящие из двух, трех или четырех N-ацетилгалактозаминов, (GalNAc или NAG), могут облегчать поглощение некоторых соединений клетками печени. Кластеры GalNAc, конъюгированные с олигомерными соединениями, служат для направления композиции в печень, где N-ацетилгалактозаминовые сахара могут связываться с асиалогликопротеиновыми
25 рецепторами на поверхности клетки печени. Считается, что связывание с асиалогликопротеиновым рецептором запускает опосредуемый рецепторами эндоцитоз, облегчая таким образом попадание соединения внутрь клетки.

Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, могут включать один, два,
30 три, четыре или более четырех нацеливающих фрагментов. В некоторых вариантах реализации нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, могут содержать один, два, три, четыре или более четырех нацеливающих фрагментов, связанных с группой точки разветвления. В некоторых вариантах реализации нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, могут содержать один,

два, три, четыре или более четырех нацеливающих фрагментов, связанных с группой точки разветвления, причем каждый нацеливающий фрагмент связан с группой точки разветвления соединительным фрагментом.

- 5 В некоторых вариантах реализации нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, могут содержать один, два, три, четыре или больше четырех нацеливающих фрагментов для асиалогликопротеинового рецептора (ASGPR), связанных с группой точки разветвления. В некоторых вариантах реализации нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, могут содержать ASGPR), связанных с группой
- 10 точки разветвления, причем каждый нацеливающий фрагмент для ASGPR связан с группой точки разветвления соединительным фрагментом.

Нацеливающие лиганды, описанные в настоящем документе, представлены приведенной ниже Формулой I:



15 , где n

представляет собой целое число от 1 до 4 (например, 1, 2, 3 или 4) (Формула I). В некоторых вариантах реализации n в формуле I представляет собой целое число от 1-3, 1-2, 2-4, 2-3 или 3-4.

- 20 Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, могут быть соединены с терапевтическими соединениями, такими как олигомерные соединения. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд связан с терапевтическим соединением дополнительным линкером и/или расщепляемым фрагментом, который в свою очередь связан с терапевтическим соединением.
- 25 нацеливающие лиганды лигированы (связаны) с самим терапевтическим соединением.

В некоторых вариантах реализации терапевтическое соединение представляет собой ингибирующее экспрессию олигомерное соединение. В некоторых вариантах

реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение представляет собой агент РНКи. В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение представляет собой двунитевый агент РНКи.

5 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд соединен, непосредственно или опосредованно, с 5'-концом смысловой нити двунитевого агента РНКи. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд соединен, непосредственно или опосредованно, с 3'-концом смысловой нити двунитевого агента РНКи. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд соединен, непосредственно
10 или опосредованно, с 5'-концом или 3'-концом антисмысловой нити двунитевого агента РНКи. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд соединен, непосредственно или опосредованно, с 5'-концом или 3'-концом одонитевого агента РНКи.

15 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд связан с двунитевым агентом РНКи через фосфатную, фосфонатную, фосфоротиоатную или межнуклеозидную связывающую группу, на 5'-конце концевой нуклеозида смысловой нити двунитевого агента РНКи.

20 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд, раскрытый в настоящем документе, включает расщепляемый фрагмент. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент включает или состоит из фосфатной или другой межнуклеозидной соединительной группы, которая может расщепляться. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд связан с терапевтическим соединением
25 расщепляемым фрагментом.

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд, раскрытый в настоящем документе, связан с дополнительными группой или группами, которые включают расщепляемый фрагмент. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд
30 связан с расщепляемым фрагментом, который, в свою очередь, связан с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением.

В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидитное соединение (также называемое в настоящем документе

“фосфорамидит-содержащим соединением”). Фосфорамидитное соединение, включающее нацеливающий лиганд, описанный в настоящем документе, может применяться для легкого присоединения нацеливающего лиганда к терапевтическому соединению или другим группам, с применением широко известных в данной области способов синтеза фосфорамидитов. В некоторых вариантах реализации фосфорамидитное соединение, включающее связывающий лиганд, связано с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением с применением способов, общеизвестных в данной области. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд-содержащий фосфорамидит связан с 5'-концом смысловой нити двунитевого агента РНКи.

В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение, связанное с нацеливающим лигандом, включает одонитевый олигонуклеотид. В некоторых вариантах реализации одонитевый олигонуклеотид представляет собой одонитевый антисмысловый олигонуклеотид. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд связан непосредственно с одонитевым антисмысловым олигонуклеотидом. В некоторых вариантах реализации дополнительные группы встроены между нацеливающим лигандом и одонитевым олигонуклеотидом.

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд, связанный с агентом РНКи, включает один или более N-ацетилгалактозаминовых сахаров в качестве нацеливающего фрагмента или нацеливающих фрагментов.

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд, связанный с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, включает соединительный фрагмент, который включает полиэтиленгликоль (ПЭГ). В некоторых вариантах реализации соединительный фрагмент состоит из ПЭГ. В некоторых вариантах реализации соединительный фрагмент включает ПЭГ, содержащий от 1 до 10 этиленгликолевых звеньев. В некоторых вариантах реализации соединительный фрагмент включает ПЭГ, содержащий от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 этиленгликолевых звеньев.

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд, связанный с агентом РНКи, содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ) в качестве линкера. В некоторых вариантах реализации линкер содержит ПЭГ. В некоторых вариантах реализации линкер состоит из ПЭГ. В некоторых вариантах реализации линкер содержит ПЭГ, содержащий от 1 до 5 20 этиленгликолевых звеньев. В некоторых вариантах реализации соединительный фрагмент содержит ПЭГ, содержащий от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 этиленгликолевых звеньев.

В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение, связанное с любым из нацеливающих лигандов, раскрытых в настоящем документе, включает агент РНКи. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд, раскрытый в настоящем документе, связан, напрямую либо опосредованно, с агентом РНКи.

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд, раскрытый в настоящем документе, связан напрямую с агентом РНКи. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд, раскрытый в настоящем документе, связан опосредованно с агентом РНКи, поскольку между агентом РНКи и линкером нацеливающего лиганда встроены дополнительная группа или группы. В некоторых вариантах реализации второй линкер включен между линкером и терапевтическим соединением.

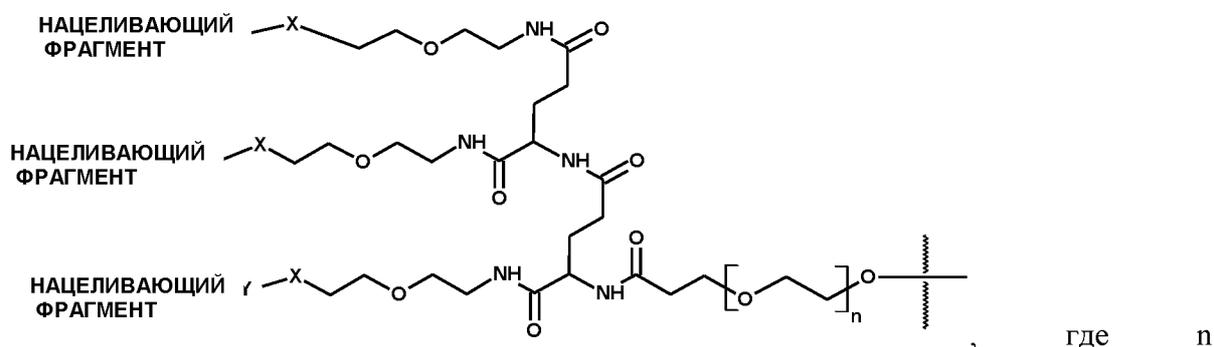
Структуры нацеливающих лигандов и фосфорамидитные соединения, включающие нацеливающие лиганды.

Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, могут состоять из одного или более нацеливающих фрагментов, соединительных фрагментов (tethers), групп, содержащих точку ветвления, и линкеров. Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, могут содержать один, два, три, четыре или более четырех нацеливающих фрагментов.

В некоторых вариантах реализации нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, синтезируют таким образом, чтобы они имели форму фосфорамидитного соединения. Фосфорамидиты широко применяются в химическом синтезе РНК и ДНК. В некоторых вариантах реализации фосфорамидит-содержащие нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, соединяют с 5'-концом смысловой нити

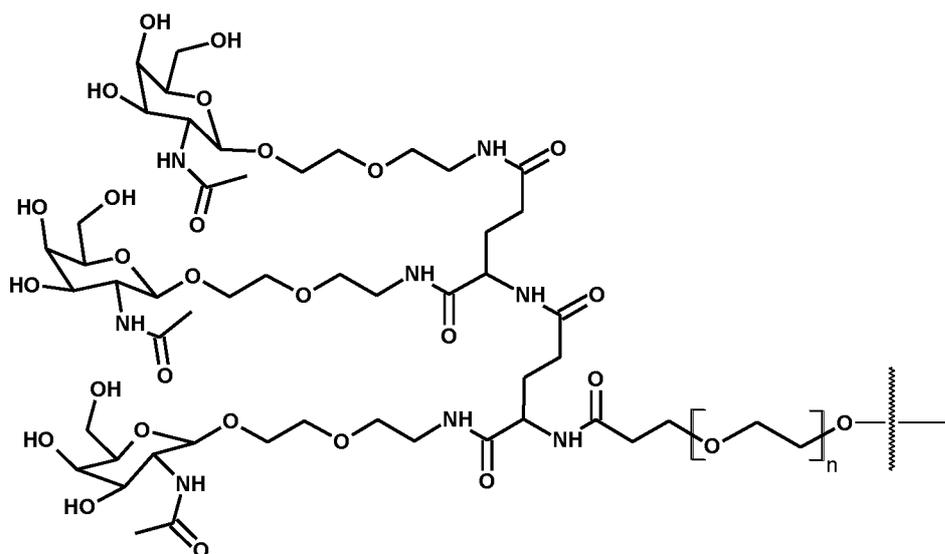
двунитевого агента РНКи. Особенно полезным может быть получение нацеливающего лиганда в форме фосфоамидита, если нацеливающий лиганд связывают с 5'-концом ингибирующего экспрессию олигомерного соединения. Без намерения ограничения теорией, полагают, что получение нацеливающего лиганда в виде фосфоамидита, где нацеливающий лиганд связан с 5'-концом ингибирующего экспрессию олигомерного соединения, не только дает возможность присоединения нацеливающего лиганда как последнего компонента (что снижает стоимость изготовления), но также потенциально позволяет нацеливающим лиганду блокировать попадание смысловой нити в RISC, если нацеливающий лиганд присоединен к 5'-концу смысловой нити двунитевого агента РНКи. Если ингибирующее экспрессию олигомерное соединение представляет собой двунитевый агент РНКи, нацеливающий лиганд можно получить в форме фосфоамидитного соединения, при этом нацеливающий лиганд связывают с 5'-концом смысловой нити агента РНКи.

15 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд представлен Формулой В:



представляет собой целое число от 1 до 20; X представляет собой O, S или NH; и Нацеливающий фрагмент выбран из группы, состоящей из галактозы, галактозамина, N-формилгалактозамина, N-ацетилгалактозамина, N-пропионилгалактозамина, N-н-бутаноилгалактозамина или N-изо-бутаноилгалактозамина. (Формула В). В некоторых вариантах реализации n равен 6. В некоторых вариантах реализации n равен 8. В некоторых вариантах реализации n равен 4.

25 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:

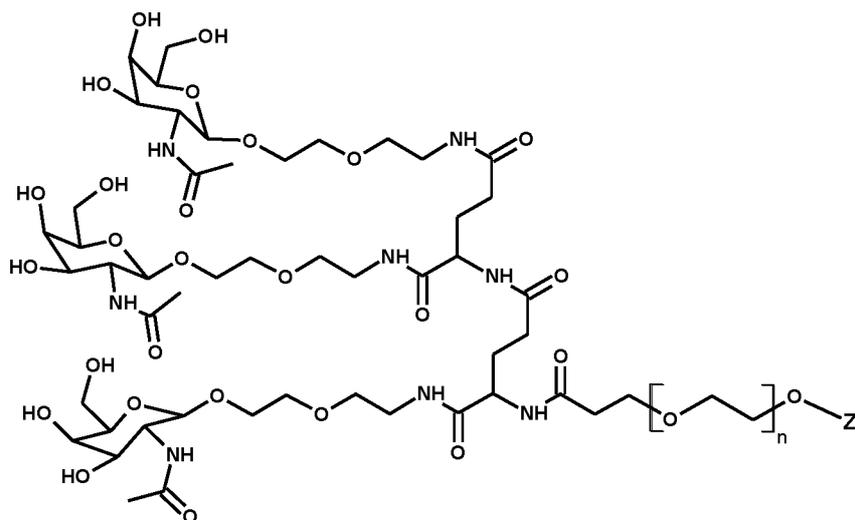


, где n представляет собой целое число от 1 до 20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) (Структура 1).

- 5 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную Структурой 1, где $n = 6$. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную Структурой 1, где $n = 8$. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную Структурой 1, где $n = 4$.

10

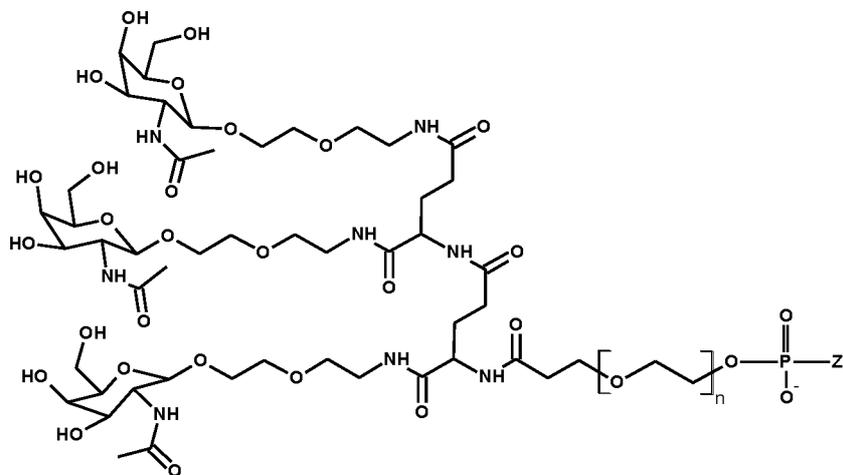
В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд связан с ингибирующей экспрессией олигомерным соединением, и имеет структуру, представленную ниже:



, где Z включает или состоит из ингибирующей экспрессию олигомерного соединения (Структура 1a).

15

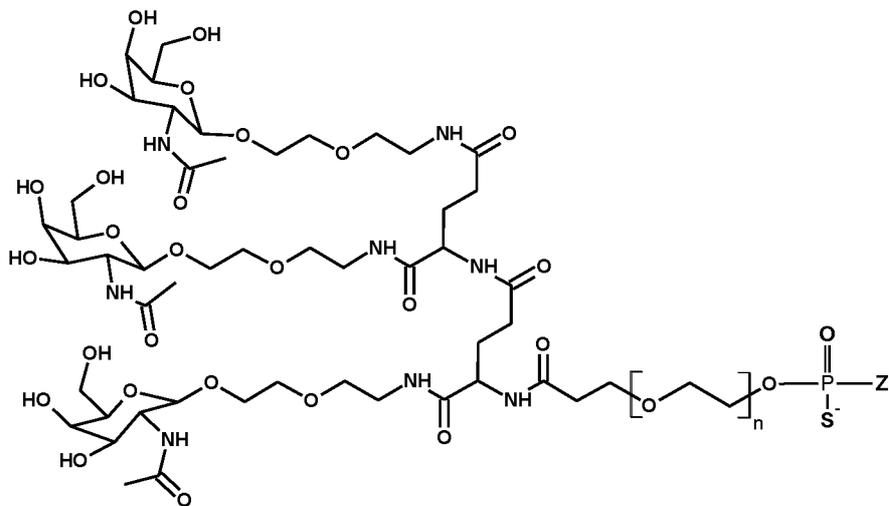
В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд связан с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, и имеет структуру, представленную ниже:



, где Z состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение (Структура 1b).

5

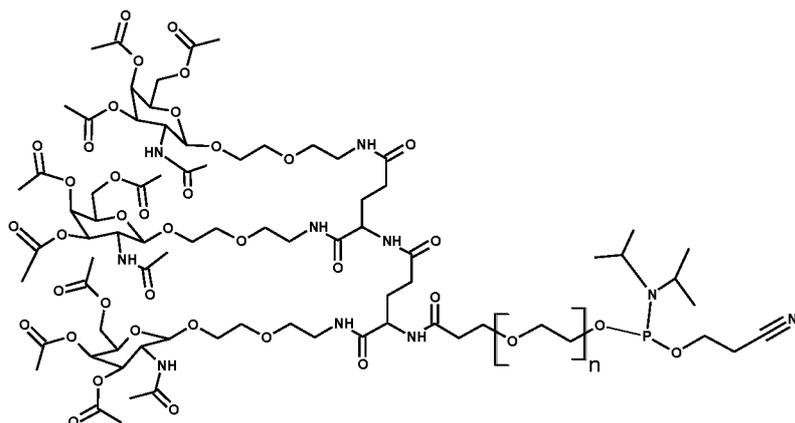
В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд связан с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, и имеет структуру, представленную ниже:



, где Z состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение (Структура 1c).

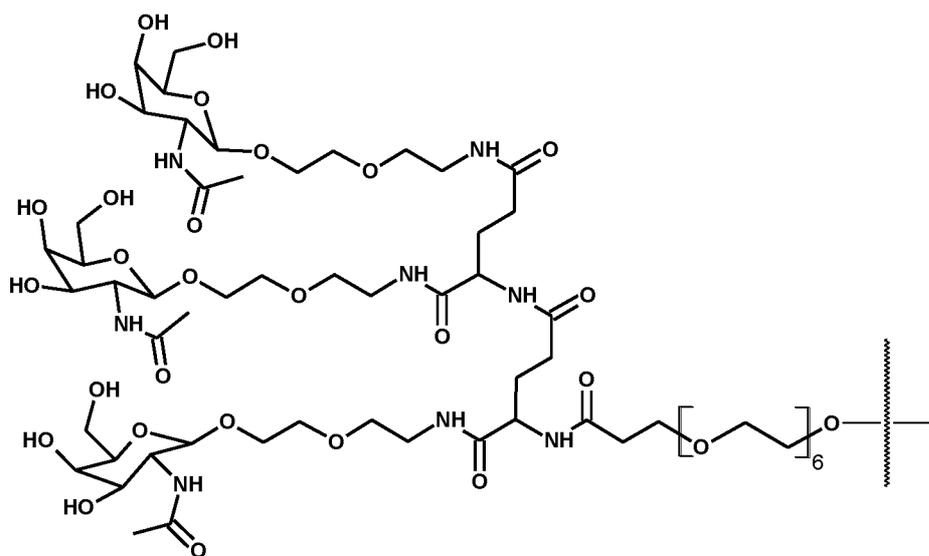
10

В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



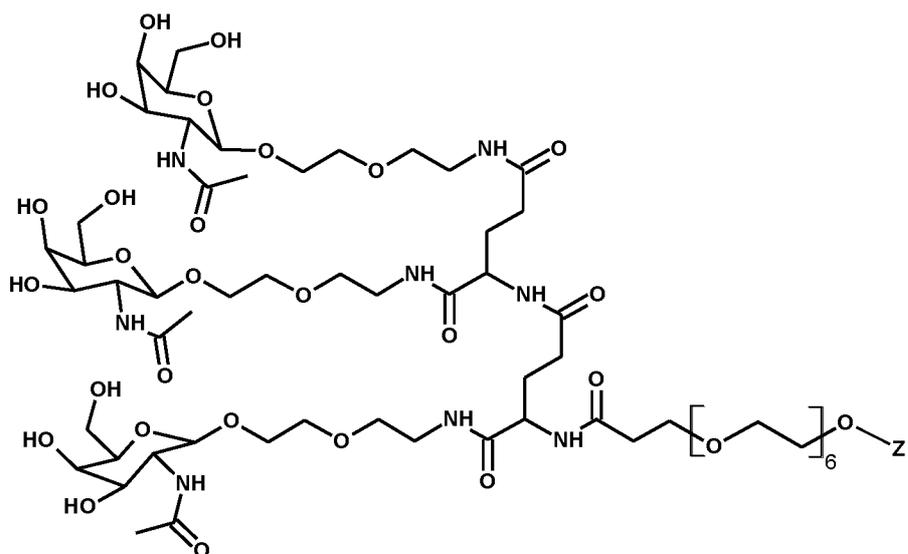
, где n представляет собой целое число от 1 до 20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) (Структура 1d).

- 5 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд содержит или состоит из структуры, представленной как показано далее:



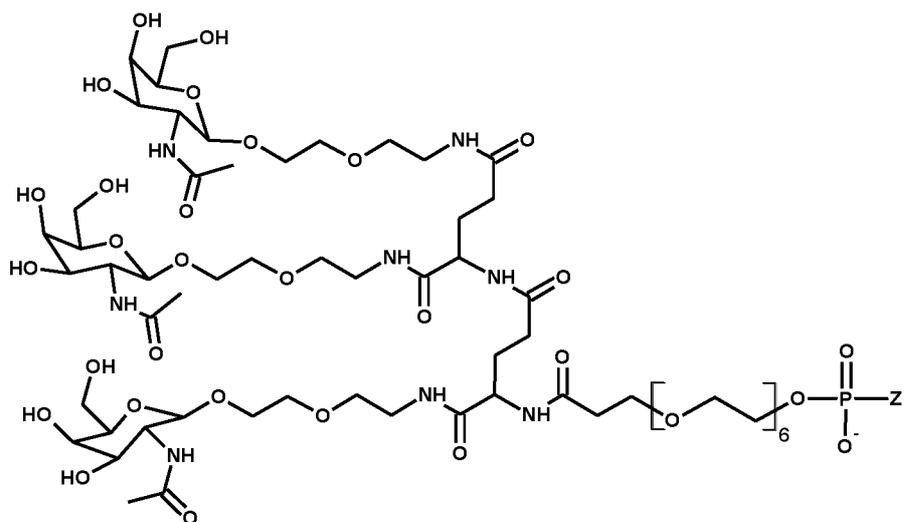
(Структура 101).

- 10 В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд связан с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, и имеет структуру, представленную ниже:



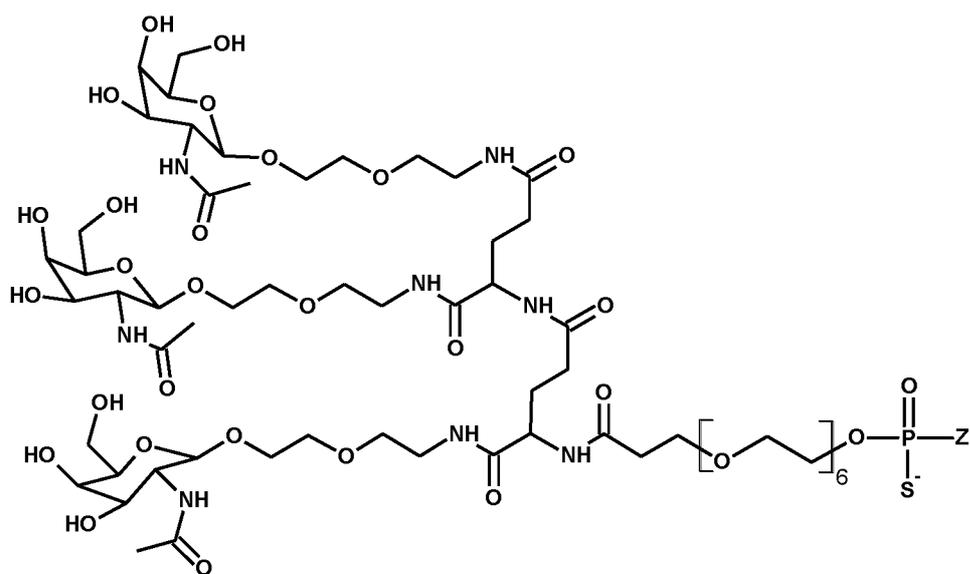
, где Z включает или состоит из ингибирующего экспрессию олигомерного соединения (Структура 101a).

В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд связан с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, и имеет структуру, представленную ниже:



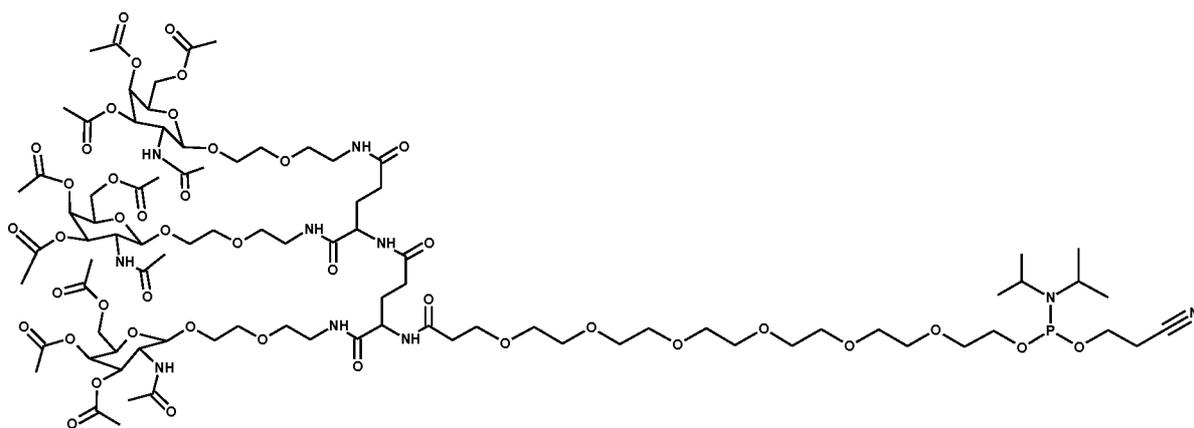
, где Z состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение (Структура 101b).

В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд связан с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, и имеет структуру, представленную ниже:



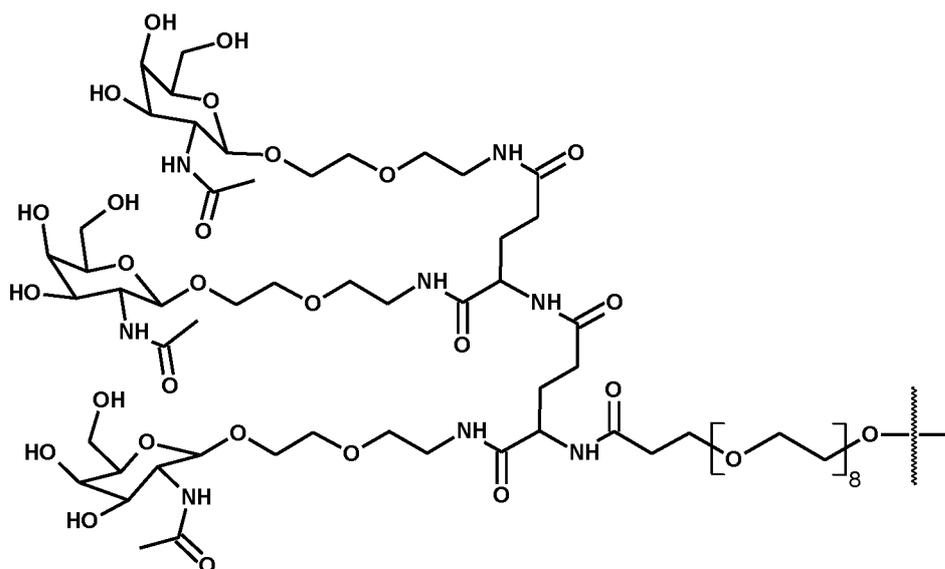
, где Z состоит из
или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение (Структура 101c).

В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой
5 фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



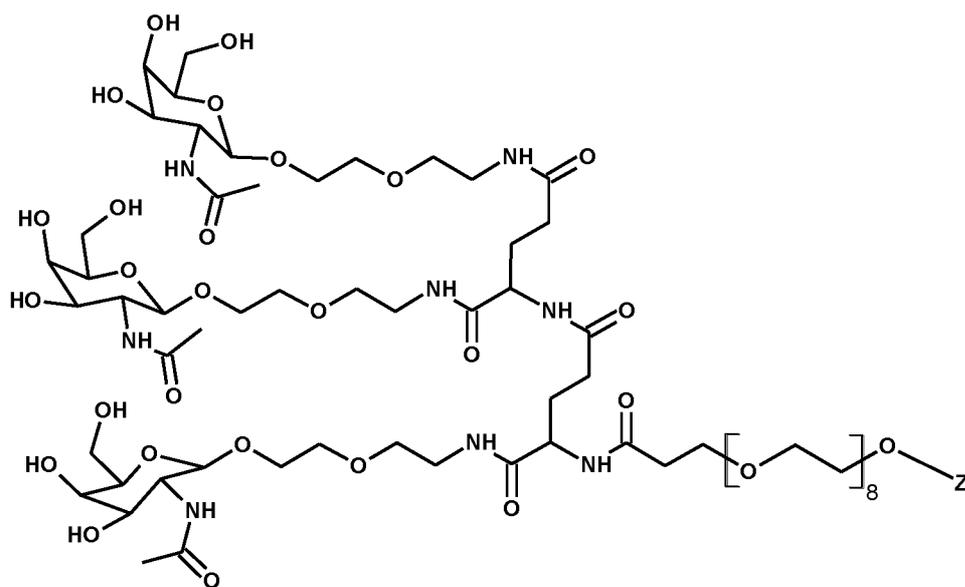
(Структура 101d).

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд содержит или состоит из
10 структуры, представленной как показано далее:



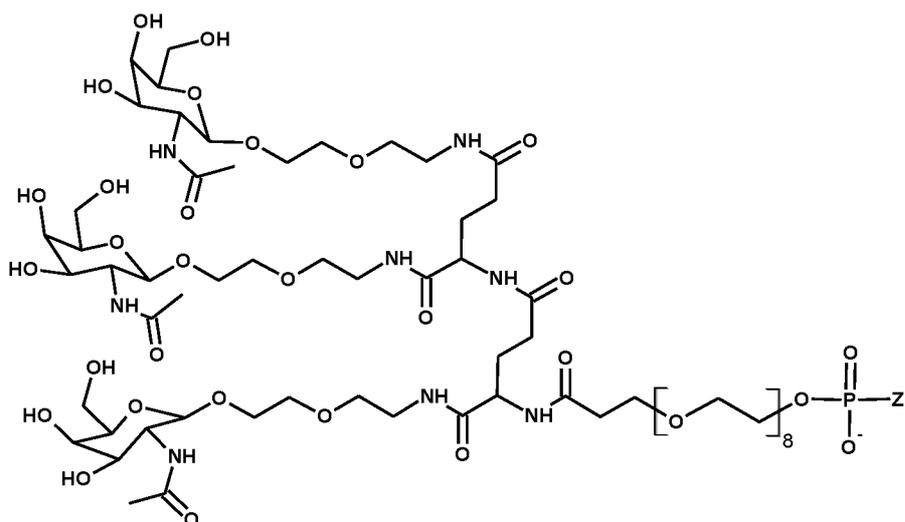
(Структура 102).

В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд связан с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, и имеет структуру, представленную ниже:



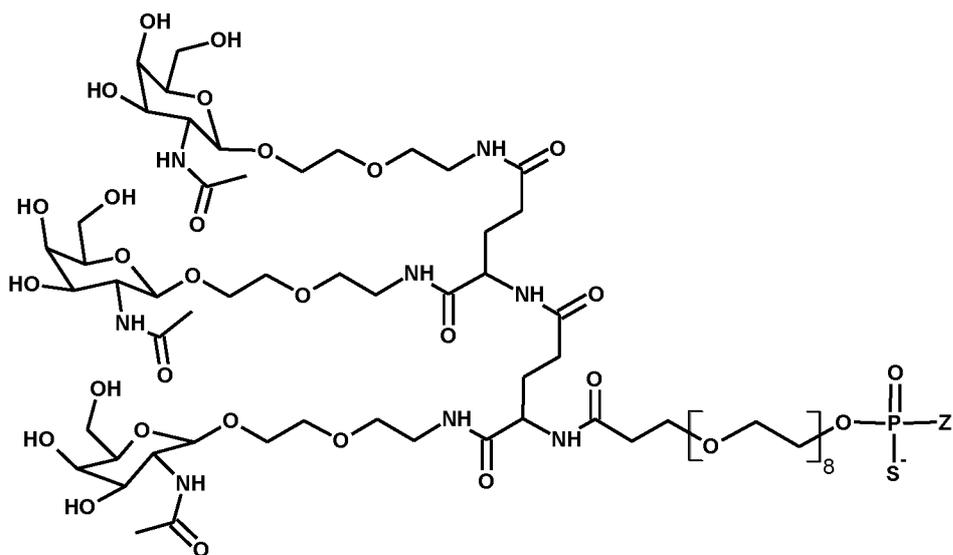
5 , где Z включает или состоит из ингибирующего экспрессию олигомерного соединения (Структура 102a).

10 В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд связан с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, и имеет структуру, представленную ниже:



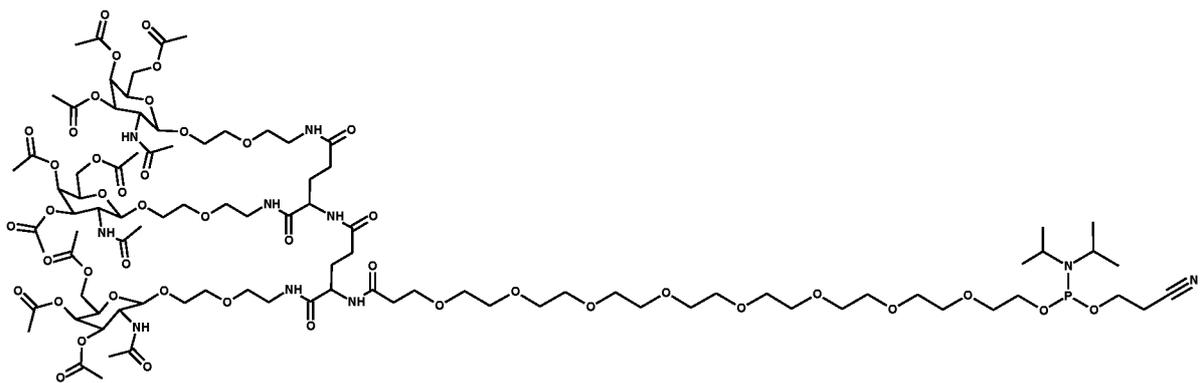
, где Z состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение (Структура 102b).

В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд связан с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, и имеет структуру, представленную ниже:



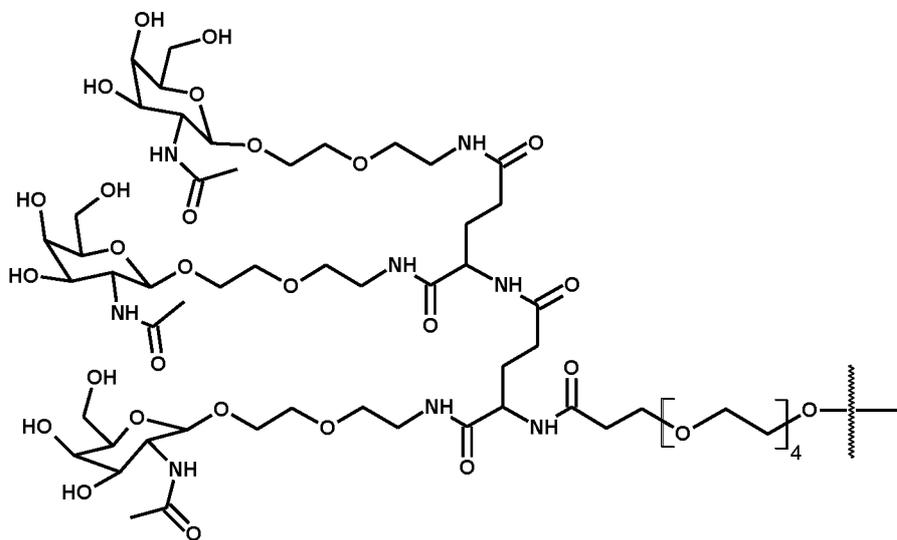
, где Z состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение (Структура 102c).

В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



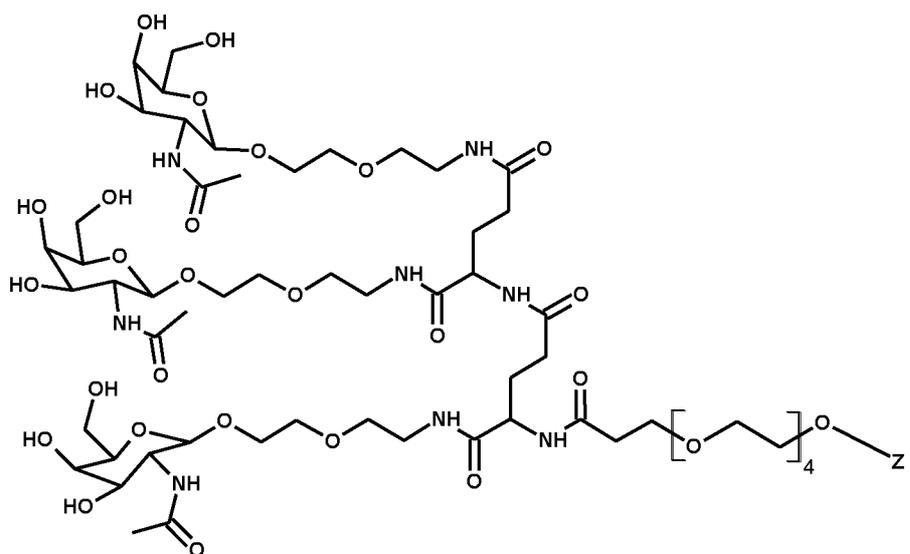
(Структура 102d).

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд содержит или состоит из 5 структуры, представленной как показано далее:



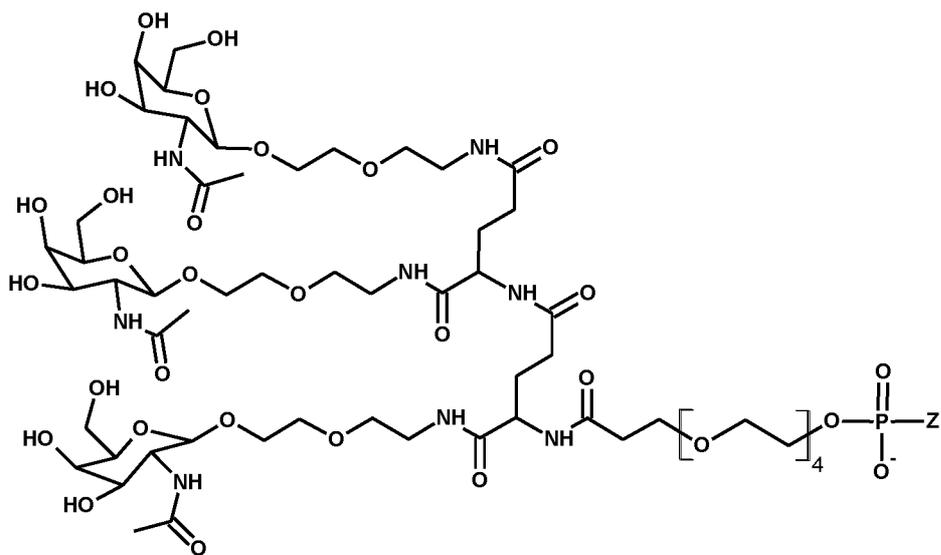
(Структура 103).

В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд связан с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, и имеет структуру, представленную ниже:



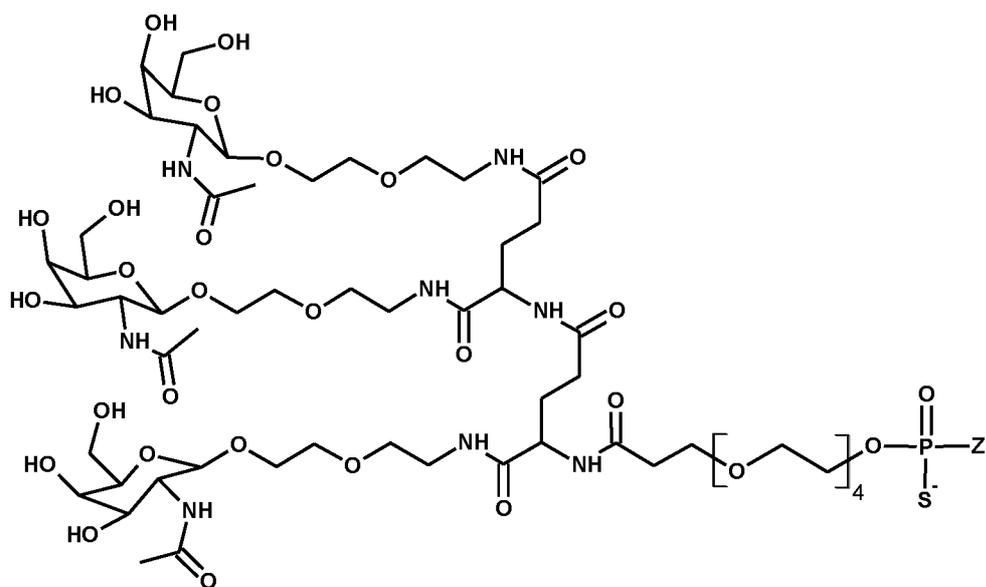
, где Z включает или состоит из ингибирующего экспрессию олигомерного соединения (Структура 103a).

5 В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд связан с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, и имеет структуру, представленную ниже:



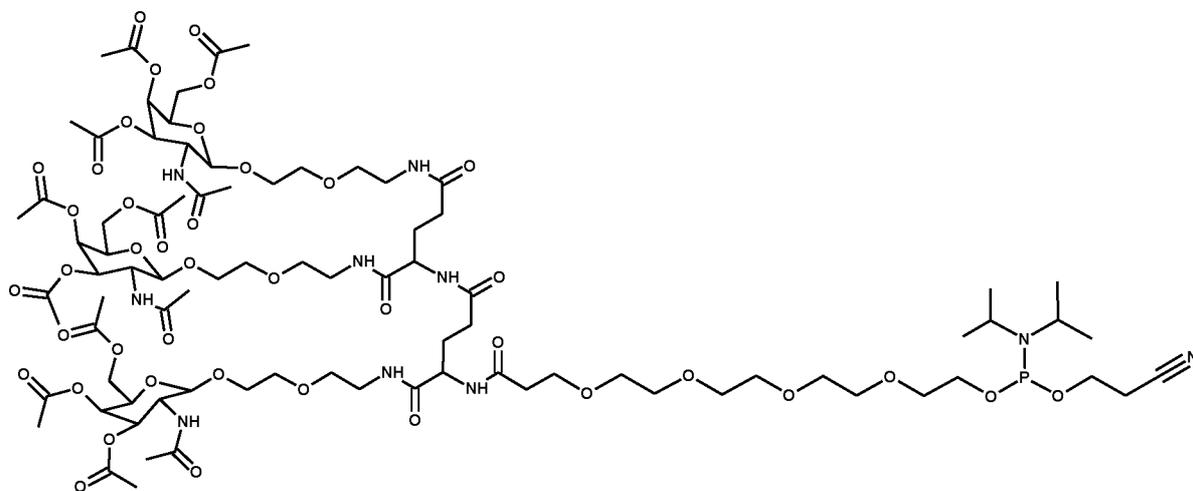
, где Z состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение (Структура 103b).

10 В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд связан с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, и имеет структуру, представленную ниже:



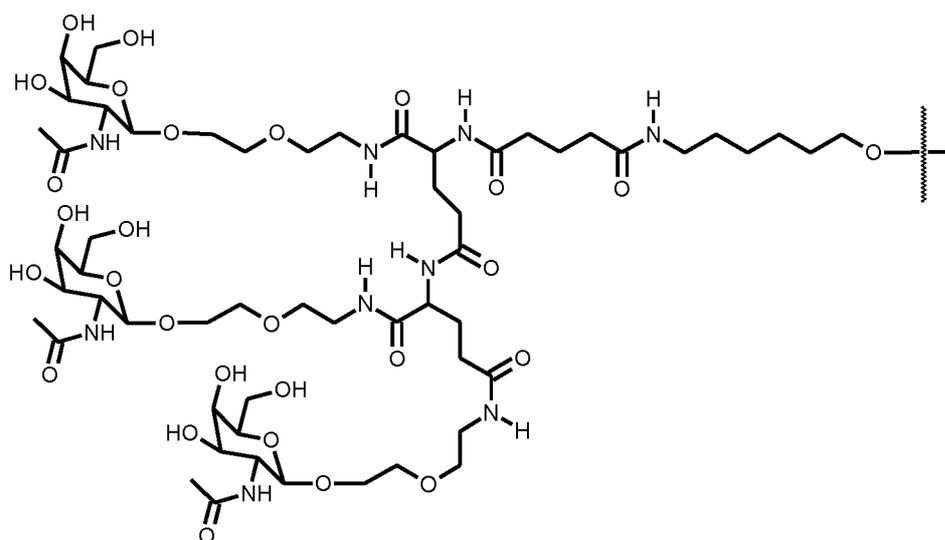
, где Z состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение (Структура 103c).

- 5 В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



(Структура 103d).

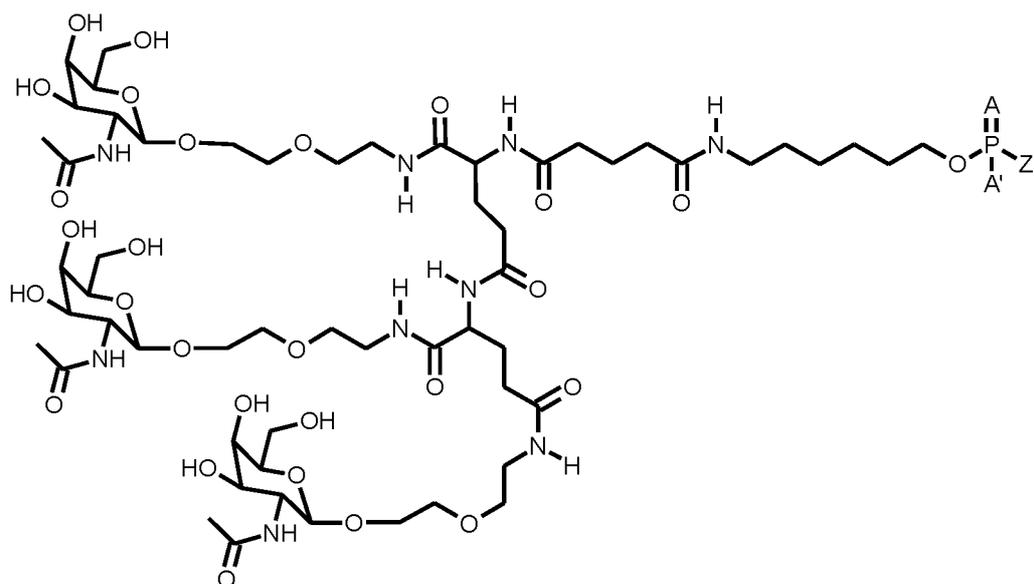
- 10 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:



(Структура 2)

В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную

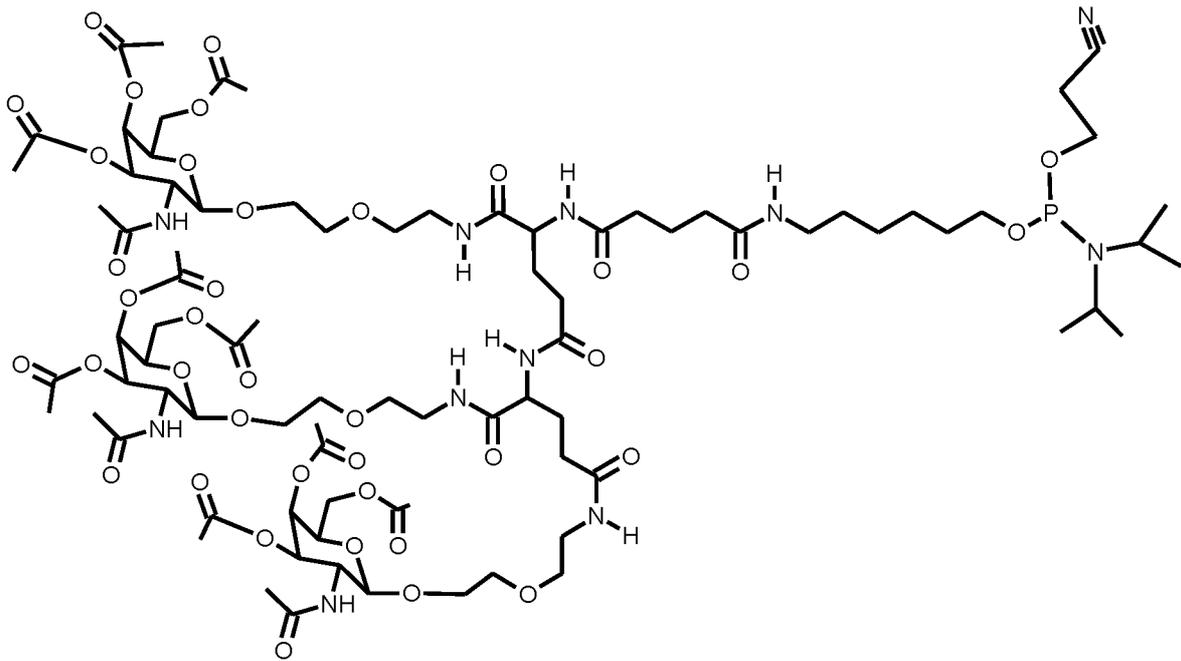
5 ниже:



, где Z

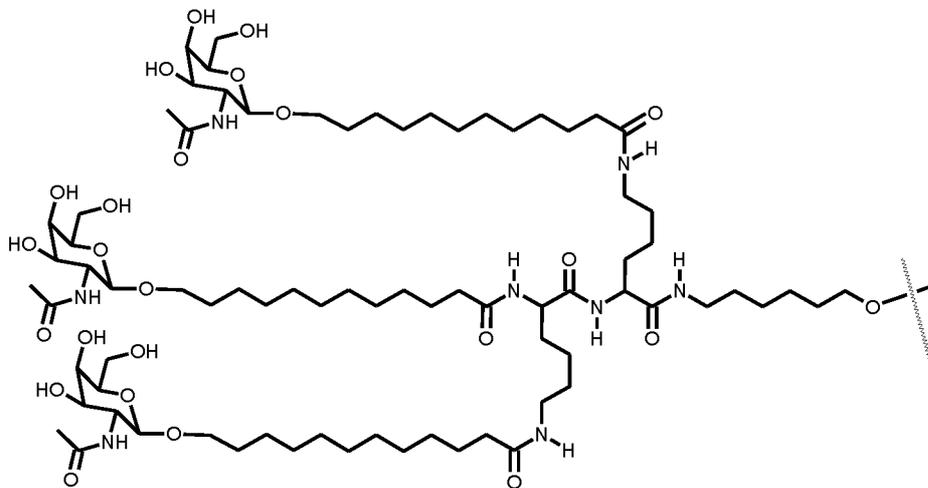
состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; A представляет собой O или S; и A' представляет собой O⁻, S⁻ или NH⁻ (Структура 2b).

10 В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



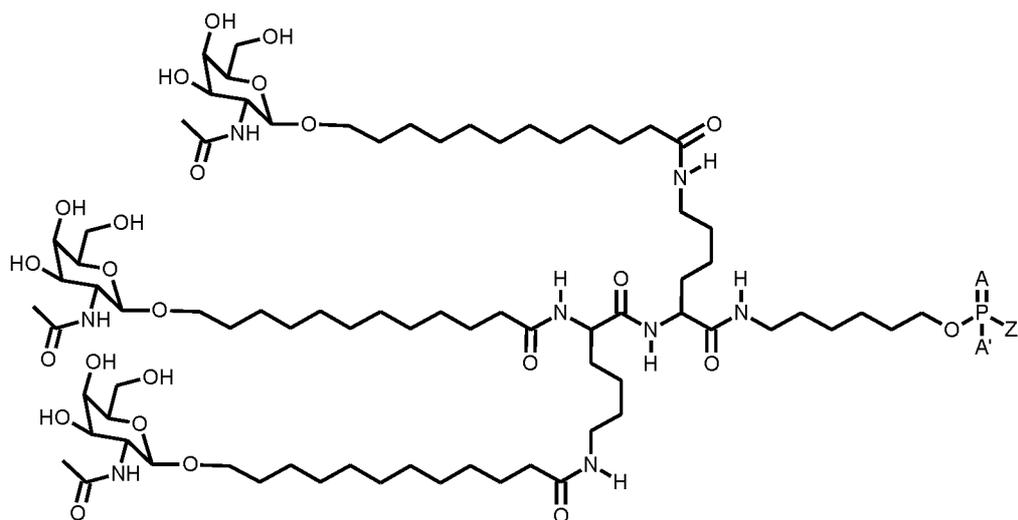
(Структура 2d).

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:



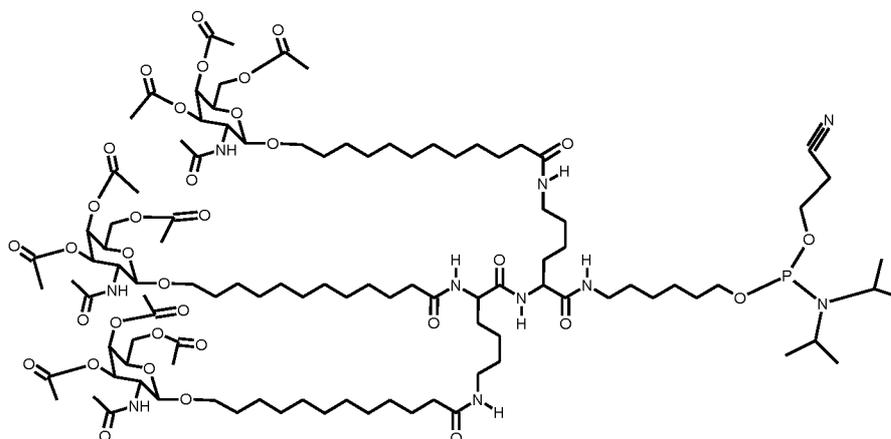
(Структура 3)

В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



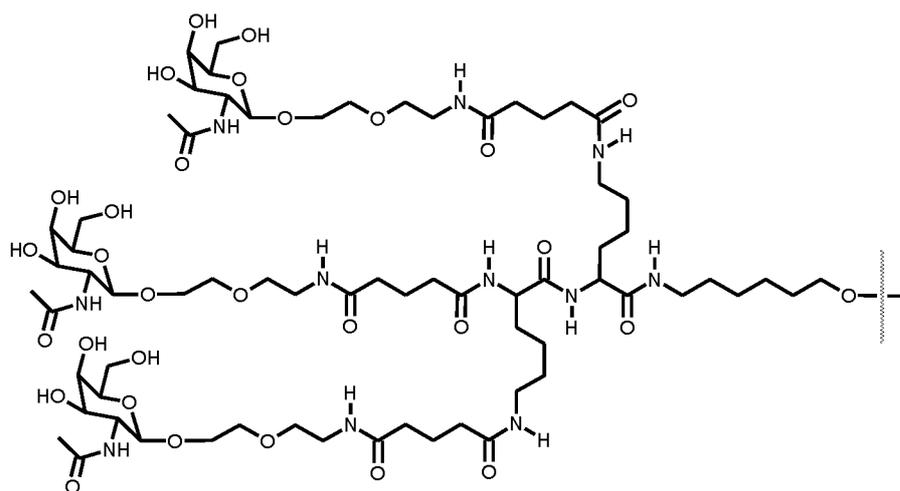
, где Z состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; A представляет собой O или S; и A' представляет собой O⁻, S⁻ или NH⁻ (Структура 3b).

- 5 В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



(Структура 3d).

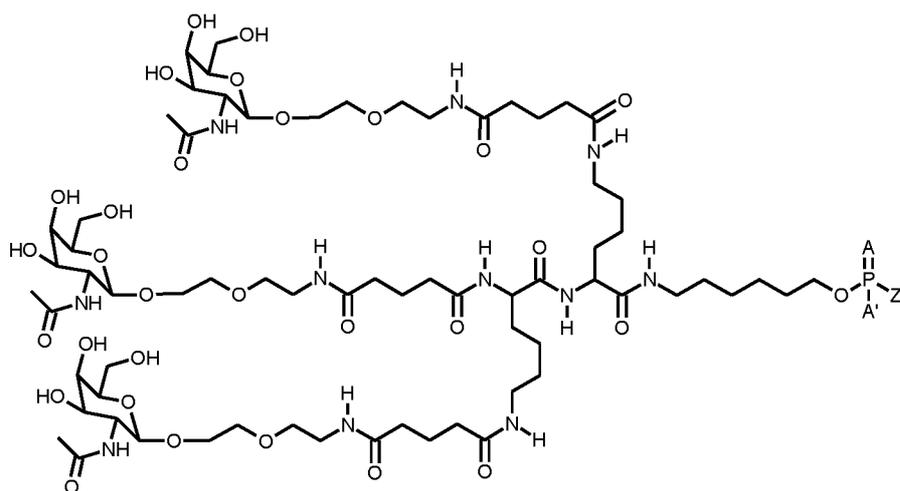
- 10 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:



(Структура 4).

В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную

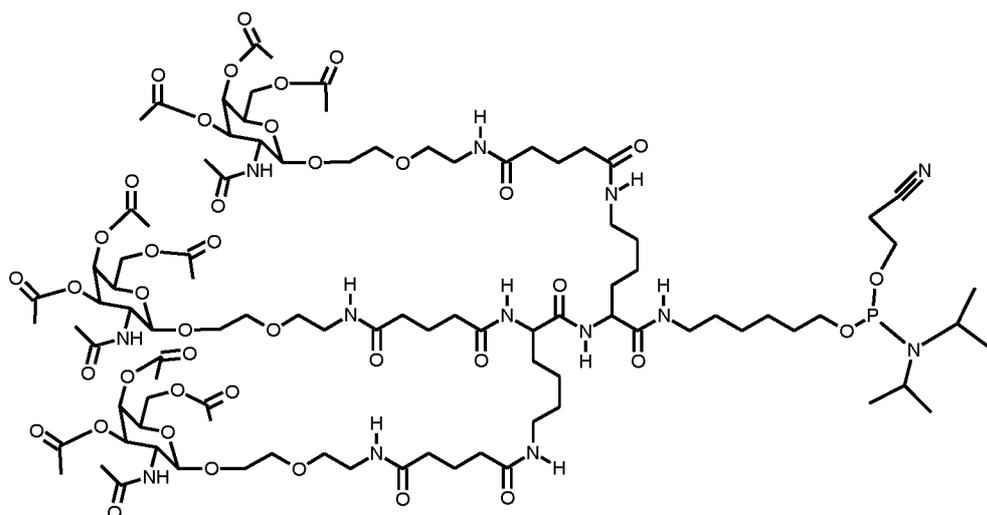
5 ниже:



, где Z состоит из или

включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; A представляет собой O или S; и A' представляет собой O⁻, S⁻ или NH (Структура 4b).

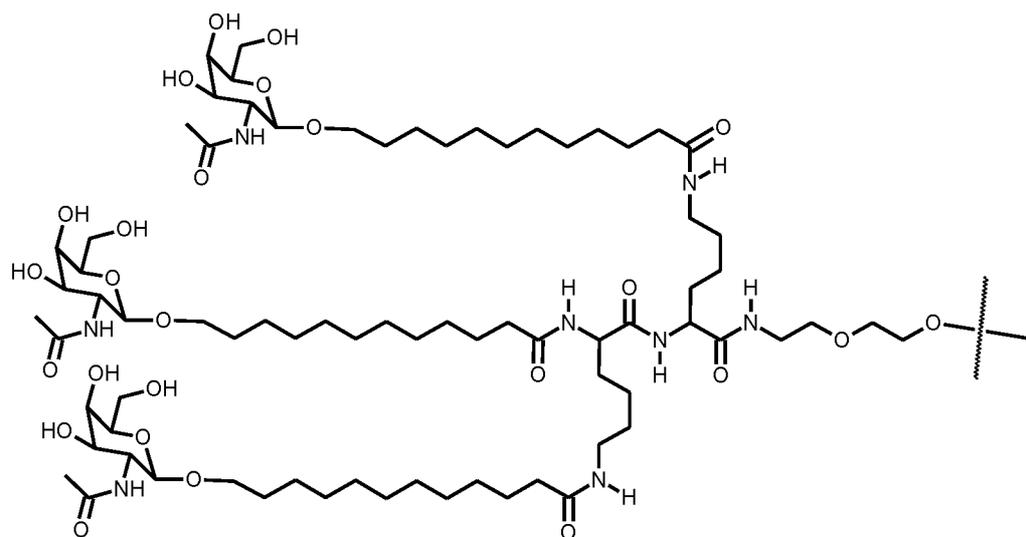
10 В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



(Структура

4d).

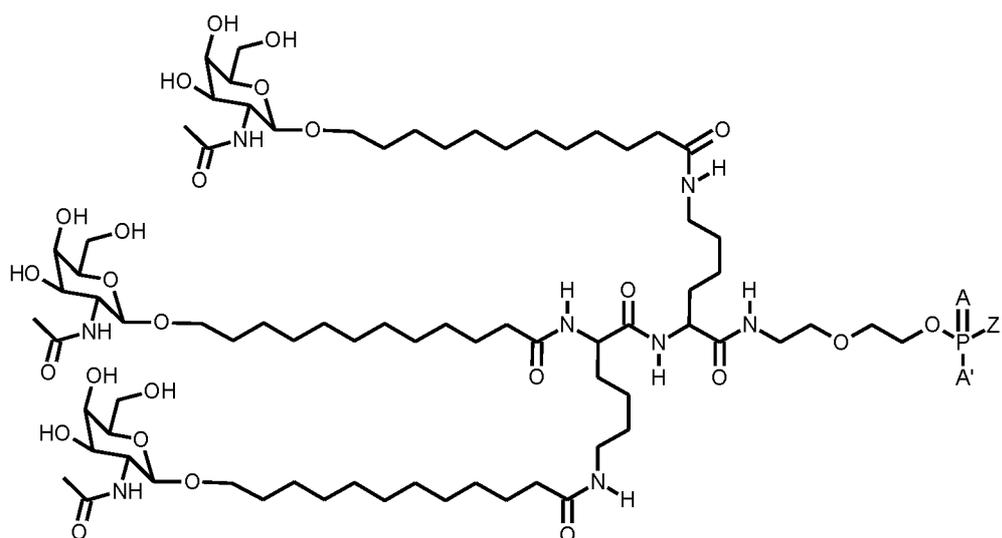
В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:



(Структура

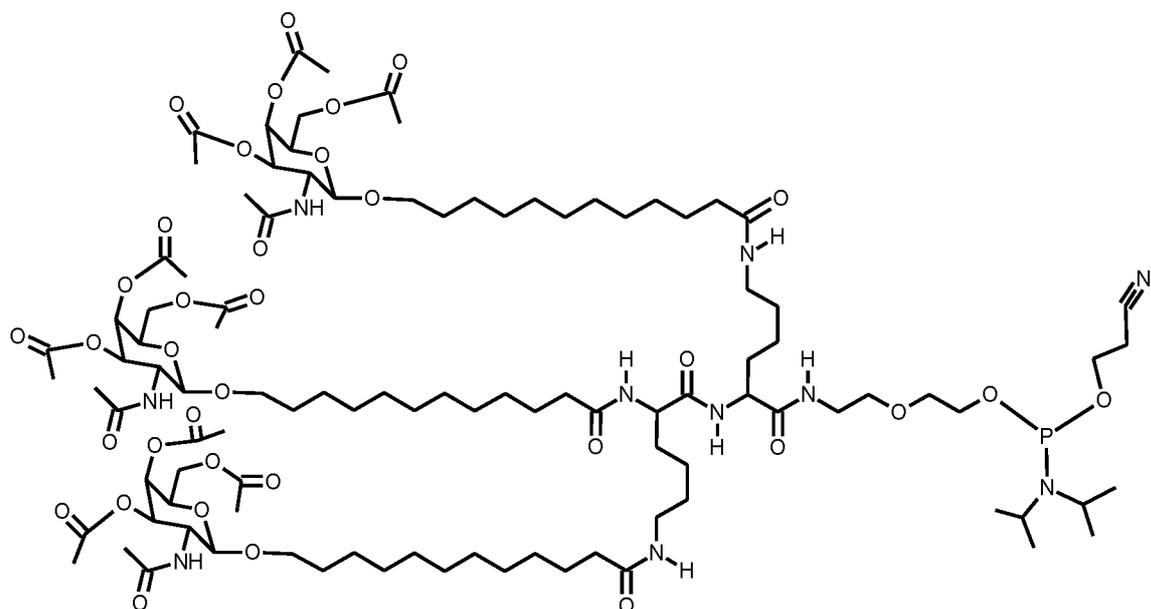
5).

В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



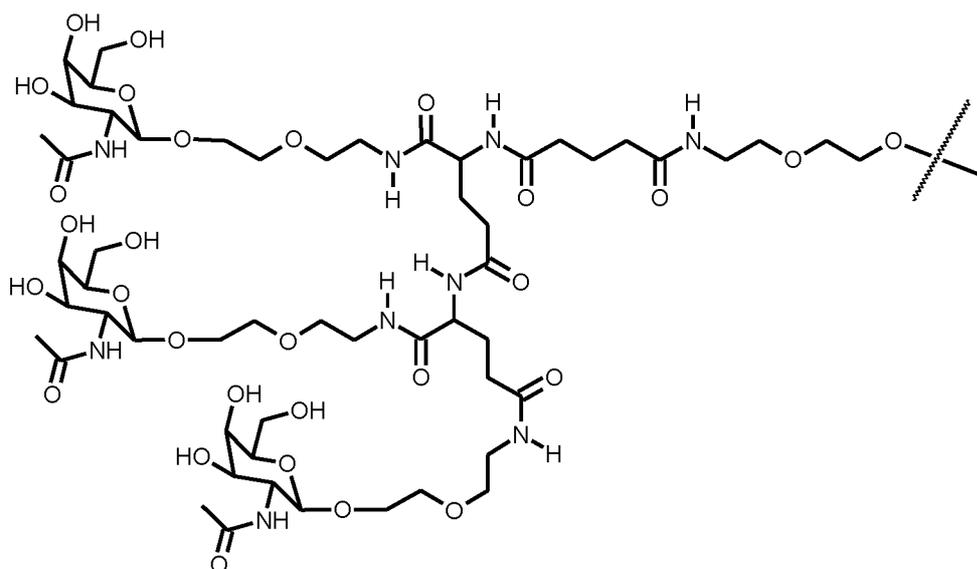
, где Z состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; A представляет собой O или S; и A' представляет собой O⁻, S⁻ или NH⁻ (Структура 5b).

- 5 В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



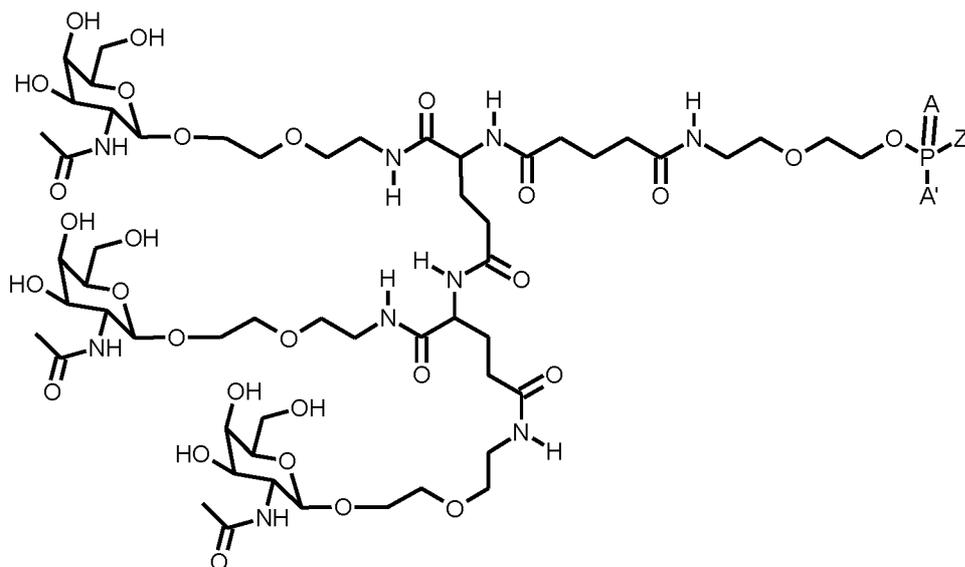
(Структура 5d).

- 10 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:



(Структура б).

В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



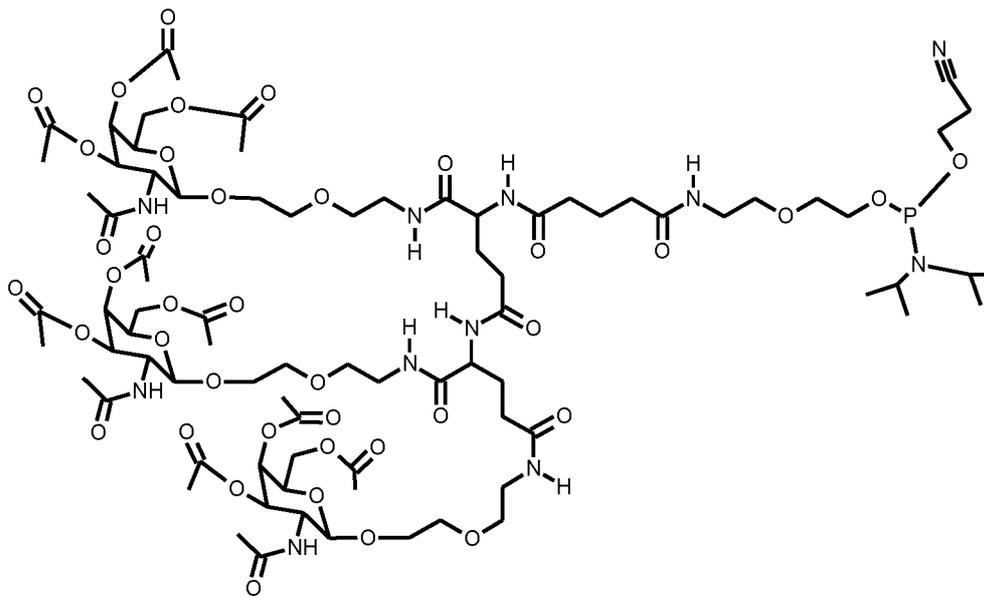
5

, где Z состоит из

или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; А представляет собой О или S; и А' представляет собой О⁻, S⁻ или NH⁻ (Структура бб).

10

В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



(Структура 6d).

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет форму галактозного кластера. В настоящем тексте галактозный кластер включает нацеливающий лиганд, содержащих от двух до четырех производных галактозы на конце. В настоящем тексте термин производное галактозы включает и галактозу, и производные галактозы, характеризующиеся аффинностью к рецептору асиалогликопротеинов, равную или большую, чем аффинность галактозы. Производное галактозы представляет собой сахаридный сахар, представляющий собой один из видов нацеливающего фрагмента. Концевое производное галактозы может быть связан с соединительным фрагментом через С-1 углерод сахара.

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд состоит из трех концевых галактозаминов или производных галактозамина (таких как N-ацетилгалактозамин), каждый из которых обладает аффинностью к асиалогликопротеиновому рецептору. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает три концевых N-ацетилгалактозамина (GalNAc или NAG) в качестве нацеливающих фрагментов.

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд состоит из четырех концевых галактозаминов или производных галактозамина (таких как N-ацетилгалактозамин), каждый из которых обладает аффинностью к асиалогликопротеиновому рецептору. В некоторых вариантах реализации

нацеливающий лиганд включает четыре концевых N-ацетилгалактозамина (GalNAc или NAG) в качестве нацеливающих фрагментов.

- 5 В некоторых вариантах реализации каждый нацеливающий фрагмент включает производное галактозамина, которое представляет собой N-ацетилгалактозамин. Другие сахараиды, обладающие аффинностью к асиалогликопротеиновому рецептору, которые могут применяться в качестве нацеливающих фрагментов, могут быть выбраны из списка, включающего: галактозу, галактозамин, N-формилгалактозамин, N-ацетилгалактозамин, N-пропионилгалактозамин, N-н-бутаноилгалактозамин и N-изо-бутаноилгалактозамин. Аффинности многочисленных производных галактозы к асиалогликопротеиновому рецептору изучены (см., например: Iobst, S.T., Drickamer, K. *J.B.C.* 1996, 271, 6686) или могут быть легко определены с использованием методов, хорошо известных и широко применяемых в данной области.
- 10
- 15 Термины, обычно применяемые в данной области к трем концевым N-ацетилгалактозаминам, включают трехантенный, трехвалентный и тримерный (тример).

Линкеры

- 20 Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, содержат линкер.

Линкер представляет собой группу атомов, связанную с группой точки разветвления на одном конце (или с атомом фомфора фосфорамидита посредством реакции фосфотилирования с фосфорамидит-образующим реагентом, если нацеливающий лиганд синтезируют в виде фосфорамидитного соединения) на другом конце. В некоторых вариантах реализации линкер связан с группой точки разветвления на одном конце, и лигирован на другом конце с группой или группами, которые далее лигированы с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением. В некоторых вариантах реализации линкер напрямую связан с олигомерным соединением. В некоторых вариантах реализации линкер связан с расщепляемым фрагментом, который, в свою очередь, связан с олигомерным соединением. Примеры расщепляемых фрагментов включают, например, фосфатные группы, группы, включающие дисульфидный фрагмент, и/или другие межнуклеотидные связи, которые могут расщепляться. В некоторых вариантах реализации линкер не связан с расщепляемым

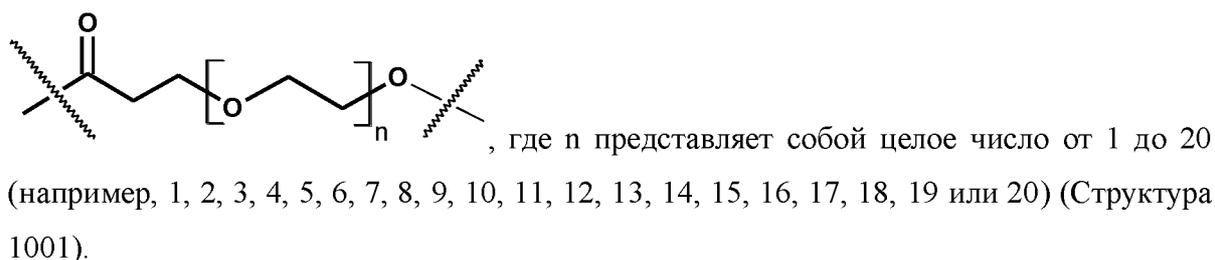
25

30

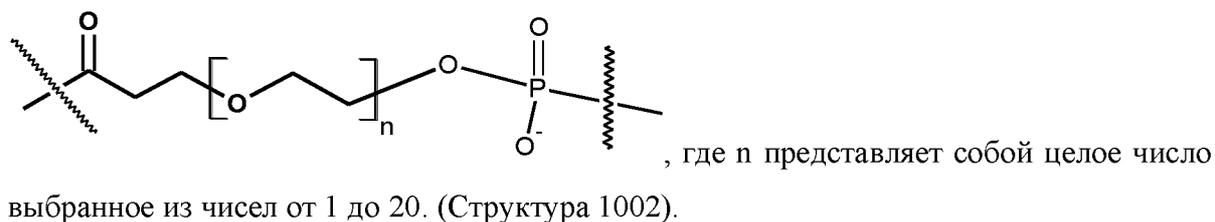
фрагментом. В некоторых вариантах реализации линкер связан с фосфоротиоатной или фосфонатной группой.

5 В некоторых вариантах реализации линкер состоит из или включает фрагмент полиэтиленгликоля (“PEG”, “ПЭГ”). Включение фрагмент ПЭГ в линкер придает определенные преимущественные свойства относительно других линкеров, таких как линкеры, которые состоят из или включают замещенные или незамещенные алкильные цепи. Например, включение фрагмента ПЭГ в линкер повышает растворимость нацеливающего лиганд-содержащего фосфорамидитного соединения в растворителях, обычно применяемых в синтезе нуклеотидов, по сравнению с соединениями, которые содержат линкеры на основе алкильных цепей, что может обеспечить упрощенные способы изготовления.

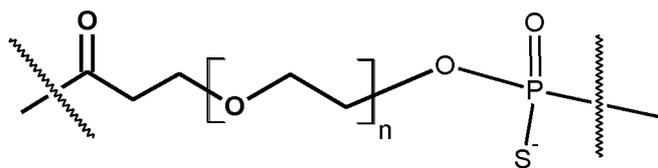
15 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд содержит линкер, имеющий следующую структуру:



20 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд содержит линкер, связанный с фосфатной группой, имеющий следующую структуру:

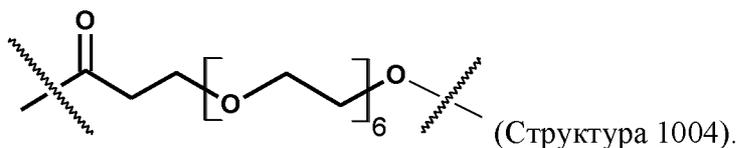


25 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд содержит линкер, связанный с фосфоротиоатной группой, имеющий следующую структуру:

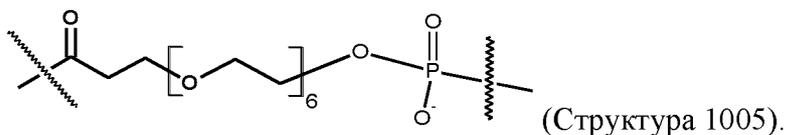


, где n представляет собой целое число выбранное из чисел от 1 до 20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) (Структура 1003).

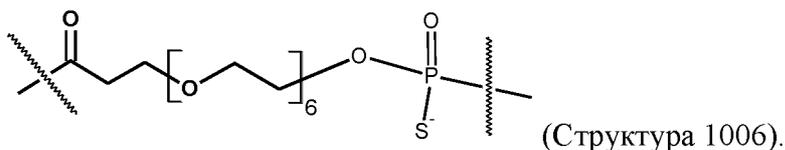
- 5 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд содержит линкер, имеющий следующую структуру:



- 10 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд содержит линкер, связанный с фосфатной группой, имеющий следующую структуру:



- 15 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд содержит линкер, связанный с фосфотиоатной группой, имеющий следующую структуру:



- 20 В некоторых вариантах реализации линкер связан с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, которое представляет собой двунитевый агент РНКи. В некоторых вариантах реализации линкер связан с 5'-концом смысловой нити двунитевого агента РНКи. В некоторых вариантах реализации линкер связан с 3'-концом смысловой нити двунитевого агента РНКи. В некоторых вариантах реализации линкер связан с 3'-концом антисмысловой нити двунитевого агента РНКи. В некоторых

вариантах реализации линкер связан с 5'-концом антисмысловой нити двунитевого агента РНКи.

5 В некоторых вариантах реализации линкер связан с расщепляемым фрагментом. В некоторых вариантах реализации концевая фосфатная группа ингибирующего экспрессию олигомерного соединения может служить расщепляемым фрагментом. В некоторых вариантах реализации независимо выбранный расщепляемый фрагмент связан с линкером. В настоящем тексте расщепляемый фрагмент представляет собой группу, которая стабильна вне клетки, но после попадания в клетку-мишень 10 расщепляется. Расщепляемые фрагменты расщепляются в определенных условиях, таких как рН, или в присутствии определенных расщепляющих агентов, таких как молекулы, которые стимулируют деградацию, или окислительно-восстановительные агенты.

15 В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент может быть чувствительным к рН. Например, известно, что что эндосомы и лизосомы в целом имеют более кислотный рН (рН приблизительно от 4.5 до 6.5), чем кровь человека (рН приблизительно от 7.35 до 7.45), и таким образом стимулируют расщепление расщепляемого фрагмента.

20 В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент представляет собой фосфатную группу. Фосфатные группы могут расщепляться агентами, которые, как известно, разрешают или гидролизуют фосфатные группы.

25 **Группы точки разветвления**

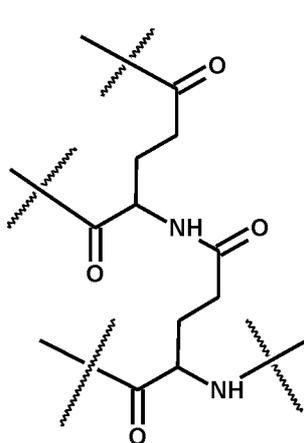
Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, содержат по меньшей мере одну группу точки разветвления. Группа точки разветвления нацеливающих лигандов, раскрытых в настоящем документе, присоединена к линкеру. В некоторых вариантах реализации группа точки разветвления нацеливающих лигандов, раскрытых 30 в настоящем документе, связана с линкером на одном конце, и группа точки разветвления связана с одним или более соединительных фрагментов на другом конце(концах). В некоторых вариантах реализации группа точки разветвления присоединен к линкеру и одному или более соединительным фрагментам. В некоторых вариантах реализации группа точки разветвления связана опосредованно (например,

линкером) с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением. В некоторых вариантах реализации группа точки разветвления связана с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением через дополнительную группу или группы.

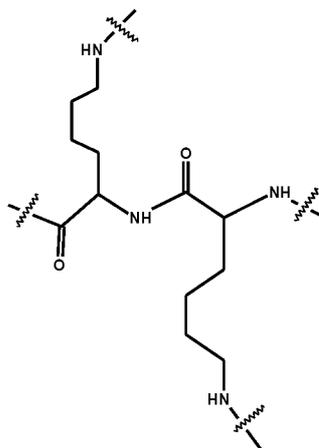
- 5 Группы точки разветвления, раскрытые в настоящем документе, может представлять собой любую группу, которая допускает присоединение одного или более нацеливающих фрагментов и дополнительно допускает присоединение к линкеру.

- 10 Группы точки разветвления, раскрытые в настоящем документе, может представлять собой любую группу, которая допускает присоединение двух, трех или четырех производных галактозы и дополнительно допускает соединение точки разветвления с линкером.

- 15 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд содержит точку разветвления, имеющую следующие структуры:



(Структура 2001),



(Структура 2002).

Соединительные фрагменты (Tethers)

- 20 Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, содержат один или более дополнительных фрагментов. Соединительный фрагмент расположен в качестве связи между группой точки разветвления и каждым нацеливающим фрагментом. В некоторых вариантах реализации соединительный фрагмент связан напрямую с нацеливающим лигандом на одном конце и напрямую с группой точки разветвления на другом конце. В некоторых вариантах реализации соединительный фрагмент связан
- 25 напрямую с нацеливающим лигандом на одном конце, и опосредованно с группой точки разветвления на другом конце. В некоторых вариантах реализации

соединительный фрагмент связан опосредованно с нацеливающим лигандом на одном конце и опосредованно с группой точки разветвления на другом конце. В некоторых вариантах реализации Нацеливающий лиганд, описанный в настоящем документе, включает три соединительных фрагмента и три нацеливающих фрагмента. В
5 некоторых вариантах реализации Нацеливающий лиганд, описанный в настоящем документе, включает четыре соединительных фрагмента и четыре нацеливающих фрагмента. В некоторых вариантах реализации Нацеливающий лиганд, описанный в настоящем документе, включает один соединительный фрагмент и один нацеливающий фрагмент. В некоторых вариантах реализации Нацеливающий лиганд, описанный в
10 настоящем документе, включает множество соединительных фрагментов и множество нацеливающих фрагментов.

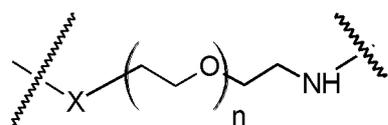
В некоторых вариантах реализации дополнительные соединительные фрагменты и другие группы встроены между соединительным фрагментом и нацеливающим
15 фрагментом. В некоторых вариантах реализации второй соединительный фрагмент встроен между соединительным фрагментом и нацеливающим фрагментом. В некоторых вариантах реализации второй соединительный фрагмент и третий соединительный фрагмент встроены между соединительным фрагментом и нацеливающим фрагментом. В некоторых вариантах реализации второй, третий и
20 четвертый соединительный фрагменты встроены между соединительным фрагментом и нацеливающим фрагментом. Как раскрыто в настоящем документе, присутствует по меньшей мере один соединительный фрагмент на каждый нацеливающий фрагмент. В некоторых вариантах реализации присутствует более одного соединительного фрагмента на каждый нацеливающий фрагмент. Предполагается, что нацеливающие
25 лиганды, раскрытые в настоящем документе, охватывают все такие композиции.

В некоторых вариантах реализации дополнительные группы могут быть встроены между соединительным фрагментом и группой точки разветвления.

30 Как раскрыто в настоящем документе, соединительный фрагмент служит спейсером, который может дополнительно увеличивать гибкость и/или длину связи между нацеливающим фрагментом и группой точки разветвления, линкером и терапевтическим соединением. В некоторых вариантах реализации соединительный фрагмент включает алкильные группы (включая циклоалкильные группы),

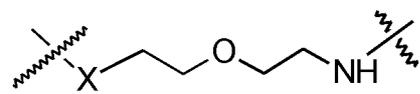
алкенильные группы (включая циклоалкенильные группы), алкинильные группы, арильные группы, аралкильные группы, аралкенильные группы или аралкинильные группы. В некоторых вариантах реализации соединительный фрагмент включает один или более гетероатомов, гетероциклов, гетероариллов, аминокислот, нуклеотидов или сахаридов.

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает соединительный фрагмент, имеющий следующую структуру:



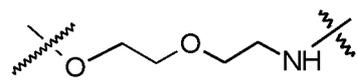
10 , где n представляет собой целое число от 1 до 20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20), и X представляет собой O, S или NH (Структура 301).

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает соединительный фрагмент, имеющий следующую структуру:



15 , где X представляет собой O, S или NH (Структура 302).

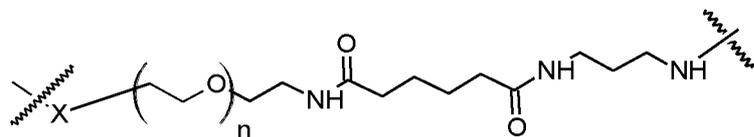
В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает соединительный фрагмент, имеющий следующую структуру:



(Структура 302a).

20

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает соединительный фрагмент, имеющий следующую структуру:

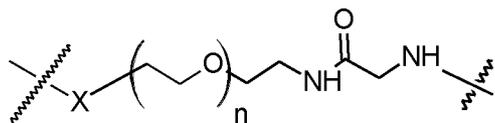


, где n представляет собой целое

число от 1 до 20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20), и X представляет собой O, S или NH. (Структура 303).

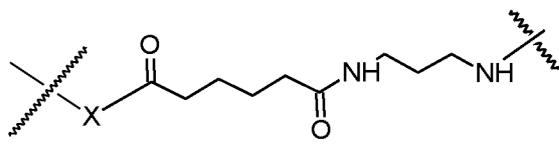
25

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает соединительный

фрагмент, имеющий следующую структуру: , где n представляет собой целое число от 1 до 20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20), и X представляет собой O, S или NH. (Структура 304).

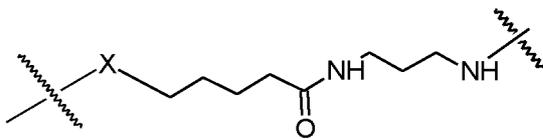
5

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает соединительный фрагмент, имеющий следующую структуру:

, где X представляет собой O, S или NH (Структура 305).

10

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает соединительный фрагмент, имеющий следующую структуру:

, где X представляет собой O, S или NH (Структура 306).

15

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает более одного типа соединительных фрагментов. В некоторых вариантах реализации соединительный фрагмент действует как гибкий гидрофильный спейсер (см., например, U.S. 5,885,968; и Biessen et al. *J. Med. Chem.* **1995**, 39, 1538-1546, оба эти источника полностью включены в настоящий текст посредством ссылки) и включает ПЭГ-спейсер. В других вариантах реализации ПЭГ-спейсер содержит от 1 до 20 этиленовых звеньев (ПЭГ₁ - ПЭШ₂₀). Например, ПЭГ-спейсер содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 этиленовых звеньев.

20

Нацеливающие фрагменты:

Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, могут содержать от одного до четырех, или более четырех нацеливающих фрагментов.

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд может представлять собой галактозный кластер. В настоящем тексте галактозный кластер включает нацеливающий лиганд, содержащих от двух до четырех производных галактозы на конце. В настоящем тексте термин производное галактозы включает и галактозу, и производные галактозы, характеризующиеся аффинностью к рецептору асиалогликопротеинов, равную или большую, чем аффинность галактозы. Производное галактозы представляет собой сахаридный сахар, представляющий собой один из видов нацеливающего фрагмента. Концевое производное галактозы связано с соединительным фрагментом через С-1 углерод сахара.

10

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд состоит из трех концевых галактозаминов или производных галактозамина (таких как N-ацетилгалактозамин), каждый из которых обладает аффинностью к асиалогликопротеиновому рецептору. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает три концевых N-ацетилгалактозамина (GalNAc или NAG) в качестве нацеливающих фрагментов. Например, каждая из Структур 1, 101, 102 и 103 представляют собой нацеливающие лиганды, содержащие три концевых N-ацетилгалактозамина в качестве нацеливающих фрагментов.

15

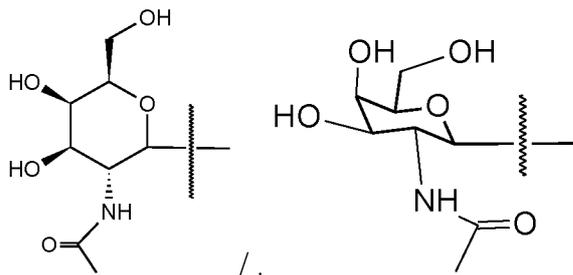
В некоторых вариантах реализации каждый нацеливающий фрагмент включает производное галактозамина, которое представляет собой N-ацетилгалактозамин. Другие сахараиды, обладающие аффинностью к асиалогликопротеиновому рецептору, которые могут применяться в качестве нацеливающих фрагментов, могут быть выбраны из списка, включающего: галактозу, галактозамин, N-формилгалактозамин, N-пропионилгалактозамин, N-н-бутаноилгалактозамин и N-изо-бутаноилгалактозамин. Аффинности многочисленных производных галактозы к асиалогликопротеиновому рецептору изучены (см., например, Iobst, S.T., Drickamer, K. *J.B.C.* 1996, 271, 6686, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки) или могут быть легко определены с использованием методов, хорошо известных и широко применяемых в данной области.

25

30

В некоторых вариантах реализации нацеливающий фрагмент представляет собой фрагмент нацеливания на клетку.

В некоторых вариантах реализации нацеливающий фрагмент включает N-ацетилгалактозамин:



В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает три
5 нацеливающих фрагмента. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд
включает четыре нацеливающих фрагмента. В некоторых вариантах реализации
нацеливающий лиганд включает один нацеливающий фрагмент. В некоторых
вариантах реализации нацеливающий лиганд включает два нацеливающих фрагмента.
В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает четыре или более
10 нацеливающих фрагментов.

В некоторых вариантах реализации нацеливающий фрагмент включает одно или более
из галактозы, галактозамина, N-формилгалактозамина, N-ацетилгалактозамина, N-
пропионилгалактозамина, N-н-бутаноилгалактозамина или N-изо-
15 бутаноилгалактозамина.

Например, в некоторых вариантах реализации N-ацетилгалактозаминовые
нацеливающие фрагменты в любой из Структур с 1 по 6 могут быть заменены
альтернативными нацеливающими фрагментами. В некоторых вариантах реализации
20 N-ацетилгалактозаминовые нацеливающие фрагменты в любой из Структур 101, 102
или 103 могут быть заменены альтернативными нацеливающими фрагментами. Такие
альтернативные нацеливающие фрагменты включают, например, галактозу,
галактозамин, N-формилгалактозамин, N-ацетилгалактозамин, N-
пропионилгалактозамин, N-н-бутаноилгалактозамин или N-изо-бутаноилгалактозамин.
25

Дополнительно, в некоторых вариантах реализации нацеливающие фрагменты в
Структурах с 1 по 6 могут быть заменены, например, другими углеводами; гликанами;
гаптенами, витаминами, фолатом; биотином, аптамерами; и/или пептидами, такими как
RGD-содержащие пептиды, инсулин, ЭФР и/или трансферрин. В некоторых вариантах

реализации нацеливающие фрагменты в Структурах 101, 102 или 103 могут быть заменены, например, другими углеводами; гликанами; гаптенами, витаминами, фолатом; биотином, аптамерами; и/или пептидами, такими как RGD-содержащие пептиды, инсулин, ЭФР и/или трансферрин.

5

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет форму N-ацетилгалактозаминового тримера. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет форму N-ацетилгалактозаминового тетрамера.

10 **Олигомерные соединения**

Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, могут быть связаны с олигомерным соединением. В некоторых вариантах реализации олигомерное соединение представляет собой ингибирующее экспрессию олигомерное соединение. В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение представляет собой агент РНКи. В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение представляет собой двунитевый агент РНКи. В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение представляет собой одонитевый олигонуклеотид. Ингибирующие экспрессию олигомерные соединения можно синтезировать с применением способов, обычно применяемых в данной области.

Ингибирующие экспрессию олигомерные соединения могут включать один или более модифицированных нуклеотидов. Нуклеотидное основание (или азотистое основание) представляет собой гетероциклическое пиримидиновое или пуриновое соединение, которое является составным компонентом всех нуклеиновых кислот, и включает аденин (А), гуанин (Г), цитозин (Ц), тимин (Т) и урацил (У). В настоящем тексте термин “нуклеотид” может включать модифицированный нуклеотид или миметик нуклеотида, участок без азотистого основания или суррогатный заменяющий фрагмент. В настоящем тексте “модифицированный нуклеотид” представляет собой нуклеотид, миметик нуклеотида, участок без азотистого основания или суррогатный заменяющий фрагмент, отличный от рибонуклеотида (2'-гидроксилнуклеотида). В некоторых вариантах реализации модифицированный нуклеотид включает 2'-модифицированный нуклеотид (т.е., нуклеотид с группой, отличной от гидроксильной группы, в положении 2' пятичленного кольца сахара). Модифицированные нуклеотиды включают следующие, но не ограничиваются ими: 2'-модифицированные нуклеотиды,

2'-О-метилнуклеотиды (представленные в настоящем документе строчной буквой 'n' в нуклеотидной последовательности), 2'-дезоксидезокси-2'-фторнуклеотиды (представленные в настоящем документе как Nf, также обозначаемые в настоящем документе как 2'-фторнуклеотид), 2'-дезоксинуклеотиды (представленные в настоящем документе как dN), 2'-метоксиэтил (2'-О-2-метоксилэтил) нуклеотиды, (представленные в настоящем документе как NM или 2'-МОЕ), 2'-амино нуклеотиды, 2'-алкил нуклеотиды, 3' - 3' связи (инвертированные) нуклеотиды (представленные в настоящем документе как invdN, invN, invn, invX), неприродные основания, включая нуклеотиды, закрытые нуклеотиды, мостиковые нуклеотиды, пептидные нуклеиновые кислоты, 2',3'-секонуклеотидные миметики (незакрытые аналоги нуклеоснований, обозначенные в настоящем документе как N_{UNA} или NUNA), закрытые нуклеотиды (представленные в настоящем документе как N_{LNA} или NLNA), 3'-О-метокси (с межнуклеотидной связью по положению 2') нуклеотид (представленный в настоящем документе как 3'-OMen), 2'-F-арабинонуклеотиды (представленные в настоящем документе как NfANA или Nf_{ANA}), морфолинонуклеотиды, винилфосфонатдезоксирибонуклеотид (представленный в настоящем документе как vpdN), винилфосфонатнуклеотиды и нуклеотид без нуклеозидного основания (представленные в настоящем документе как X или Ab). Не обязательно, чтобы все положения данного соединения были модифицированы одинаковым образом. Наоборот, в одном ингибирующем экспрессию олигомерном соединении или даже в одном его олигонуклеотиде может быть сделано более одной модификации. Ингибирующие экспрессию олигомерные соединения могут быть синтезированы и/или модифицированы способами, известными в данной области. Модификация каждого нуклеотида не зависит от модификаций других нуклеотидов.

Модифицированные нуклеоснования включают синтетические и природные нуклеоснования, такие как 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины, N-2-, N-6-, и O-6-замещенные пурины (например, 2-аминопропиладенин), 5-пропинилурацил, 5-пропинилцитозин, 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, бсодержащие 6-метил и другие алкилы производные аденина и гуанина, содержащие 2-пропил и другие алкилы производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин, 2-тиоцитозин, 5-галоурацил, 5-галоцитозин, 5-пропинилурацил, 5-пропинилцитозин, 6-азоурацил, 6-азоцитозин, 6-азотимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-гало-, 8-амино-, 8-тиол-, 8-тиоалкил-, 8-

5 гидроксил- и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-замещенные урацилы и цитозины (например, 5-гало-урацилы и цитозины (например, 5-бромурацил и 5-бромцитозин), 5-трифторметил урацил, 5-трифторметил цитозин), 7-метилгуанин, 7-метиладенин, 8-азагуанин, 8-азааденин, 7-дезазагуанин, 7-дезазааденин, 3-дезазагуанин и 3-дезазааденин.

Для ингибирующих экспрессию олигомерных соединений, описанных в настоящем документе, любые модифицированные нуклеотиды могут быть связаны фосфат-содержащими или не содержащими фосфат ковалентными связями.

10 Модифицированные межнуклеозидные связи или каркасы включают следующие, но не ограничиваются ими: 5'-фосфоротиоатная группа (обозначаемая в настоящем документе как строчная 's' перед нуклеотидом, как в sN, sn, sNf или sdN), хиральные фосфоротиоаты, тиофосфат, фосфордитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкил-фосфотриэфиры, фосфонаты метила и других алкилов, включая 3'-алкиленфосфонаты

15 и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, включая 3'-аминофосфорамидат и аминоалкилфосфорамидаты, тиопофосфорамидаты, тиоалкилфосфонаты, тиоалкилфосфотриэфиры, морфолино-связи, борофосфаты, содержащие обычные 3'-5'-связи, 2'-5'-связанные аналоги борофосфонатов и борофосфонатов с инвертированной полярностью, в которых соседние пары нуклеозидных звеньев

20 связаны 3'-5' к 5'-3' или 2'-5' к 5'-2'. В некоторых вариантах реализации с модифицированной межнуклеотидной связи или каркасе отсутствует атом фосфора. Модифицированные межнуклеотидные связи без атома фосфора включают следующие, но не ограничиваются ими: связи между сахарами на основе короткоцепочечных алкилов или циклоалкилов, смешанные связи между сахарами на

25 основе гетероатома и алкила или циклоалкила, или одну или более связей между сахарами на основе короткоцепочечных гетероатомных фрагментов или циклоалкилов. В некоторых вариантах реализации модифицированные межнуклеозидные каркасы включают следующие, но не ограничиваются ими: силоксановые каркасы, сульфидные каркасы, сульфоксидные каркасы, сульфоновые каркасы, формацетиловые и

30 тиоформацетиловые каркасы, метилен-формацетиловые и тиоформацетиловые каркасы, алкен-содержащие каркасы, сульфаматные каркасы, метилениминовые и метиленигидразиновые каркасы, сульфонатные и сульфонамидные каркасы, амидные каркасы, и другие каркасы, содержащие смесь компонентов N, O, S и CH₂.

В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение представляет собой двунитевый агент РНКи, и включает смысловую нить и антисмысловую нить, которые по меньшей мере частично комплементарны (по меньшей мере на 70% комплементарны) друг другу. Антисмысловая нить содержит

5 участок, имеющий последовательность, которая полностью комплементарна (на 100% комплементарна) или по меньшей мере по существу комплементарна (по меньшей мере на 85% комплементарна) последовательности мРНК-мишени. Длина каждой из смысловой и антисмысловой нитей двунитевого агента РНКи может составлять от 16 до 30 нуклеотидов в длину. Смысловая и антисмысловая нити могут иметь одну длину

10 или разную длину. В некоторых вариантах реализации длина смысловой нити составляет примерно 19 нуклеотидов, а длина антисмысловой нити составляет примерно 21 нуклеотид. В некоторых вариантах реализации длина смысловой нити составляет примерно 21 нуклеотид, а длина антисмысловой нити составляет примерно 23 нуклеотидов. В других вариантах реализации длина каждой из смысловой и антисмысловой нитей

15 составляет независимо 17-21 нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации длина и смысловой, и антисмысловой нитей составляет 21-26 нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации длина и смысловой, и антисмысловой нитей составляет 26 нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации длина каждой из смысловой и антисмысловой нитей составляет независимо от 17 до 26 нуклеотидов. В некоторых

20 вариантах реализации двунитевый агент РНКи содержит дуплекс длиной примерно 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов. Длина участка полной или по существу полной комплементарности между смысловой нитью и антисмысловой нитью составляет обычно 15-25 (например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов) и располагается на 5'-конце антисмысловой нити или вблизи от него.

25 Ингибирующие экспрессию олигомерные соединения, которые конъюгируют с лигандами, раскрытыми в настоящем документе, необязательно и дополнительно включают 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дополнительных нуклеотидов (в виде удлинения) на 3'-конце, 5'-конце или и на 3'-, и на 5'-концах основных последовательностей. Эти

30 дополнительные нуклеотиды, если они присутствуют могут быть или не быть комплементарны соответствующей последовательности в мРНК-мишени.

В некоторых вариантах реализации если двунитевый агент РНКи конъюгирован с раскрытыми в настоящем документе нацеливающими лигандами, дополнительные

нуклеотиды смысловой нити, если они присутствуют, могут быть или не быть идентичными соответствующей последовательности в мРНК-мишени. Дополнительные нуклеотиды антисмысловой нити, если они присутствуют, могут быть комплиментарны или некомплементарны соответствующим дополнительным нуклеотидам смысловой нити, если таковые присутствуют.

Двунитевые агенты РНКи могут быть образованы путем соединения антисмысловой нити со смысловой нитью.

- 10 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд связан с агентом РНКи на 3' или 5' конце либо смысловой, либо антисмысловой нити агента РНКи. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд связан с 5'- концом смысловой нити. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд связан с 3'-концом смысловой нити. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд связан с агентом РНКи лабильной, расщепляемой или обратимой связью. В некоторых вариантах реализации лабильная, расщепляемая или обратимая связь является частью расщепляемого фрагмента, добавляемого между агентом РНКи и нацеливающим лигандом.
- 20 В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение представляет собой однонитевый олигонуклеотид. В некоторых вариантах реализации однонитевый олигонуклеотид ингибирует экспрессию мРНК-мишени по механизму РНК-интерференции. В некоторых вариантах реализации однонитевые олигонуклеотиды снижают экспрессию нуклеиновой кислоты-мишени по механизму, отличному от РНК-интерференции.

В некоторых вариантах реализации уровень экспрессии гена и/или уровень мРНК мишени у субъекта, которому вводят описанный нацеливающий лиганд конъюгированный с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, снижается на по меньшей мере примерно 5%, например, по меньшей мере примерно на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% по сравнению с субъектом до введения или субъектом, не получающим конъюгат с нацеливающим лигандом. Уровень экспрессии гена и/или уровень мРНК у субъекта может снижаться в клетке, группе клеток и/или ткани

субъекта. В некоторых вариантах реализации уровень белка у субъекта, которому ввели нацеливающий лиганд, конъюгированным с ингибирующей экспрессию олигомерным соединением, снижается на по меньшей мере примерно 5%, например, по меньшей мере примерно на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%,
5 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% по сравнению с субъектом до введения конъюгата нацеливающего лиганда или субъектом, не получающим конъюгат с нацеливающим лигандом. Уровень белка у субъекта может снижаться в клетке, группе клеток, ткани, крови и/или другой жидкости субъекта. Снижение экспрессии гена, уровней мРНК или белка можно оценивать любыми способами, известными в
10 данной области. Снижение или уменьшение уровня мРНК и/или уровня белка обобщенно называется ингибированием, уменьшением или снижением экспрессии гена-мишени.

Конкретные ингибирующие экспрессию олигомерные соединения, которые можно
15 применять с раскрытыми нацеливающими лигандами, известны в данной области. В частности, многочисленные документы раскрывают ингибирующие экспрессию олигомерные соединения, которые можно конъюгировать с нацеливающими лигандами, раскрытыми в настоящем документе, для доставки композиции в печень. Неограничивающие примеры включают в заявке на патент США под серийным
20 номером 15/281,309 с названием “Compositions and Methods for Inhibiting Gene Expression of LPA” (“Композиции и способы для ингибирования гена LPA”), которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки, раскрыты различные двунитевые ингибирующие экспрессию олигомерные соединения, мишенью которых является ген человеческого аполипопротеина(а) [*LPA*] (для ингибирования экспрессии
25 белка apo(a), который является частью частицы липопротеина (a), и, соответственно, частицы липопротеина(a) (Lp(a))), которые подходят для применения с раскрытыми в настоящем документе нацеливающими лигандами. Ген apo(a) [*LPA*] экспрессируется у людей и приматов, отличных от человека, в основном в печени. Аналогично, например, в заявке на патент США под серийным номером 15/229,314 с названием “RNAi Therapy
30 for Hepatitis B Virus Infection” (РНКи-терапия для лечения инфекции вирусом гепатита В”), которая также включена в настоящий документ посредством ссылки, раскрыты различные двунитевые ингибирующие экспрессию олигомерные соединения, мишенью которых является вирус гепатита В, которые подходят для применения с раскрытыми в настоящем документе нацеливающими лигандами. Вирус гепатита В представляет

собой строго гепатотрофный, содержащий двунитевую ДНК вирус и относится к гепаднавирусам, принадлежащим к семейству Hepadnaviridae. Далее, в качестве еще одного примера, в заявке на патент США под серийным номером 15/229,314 с названием “Compositions and Methods for Inhibiting Gene Expression of Фактор XII” (“Композиции и способы для ингибирования экспрессии гена Фактора XII”), которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки, раскрыты различные двунитевые ингибирующие экспрессию олигомерные соединения мишенью которых является ген Фактора XII (или Фактора 12, F12), которые подходят для применения с раскрытыми в настоящем документе нацеливающими лигандами. Фактор XII представляет собой сериновую протеазу, экспрессирующуюся в основном в печени и присутствующую в крови. Дополнительно, в качестве еще одного примера, в заявке на патент США под серийным номером 14/740,307 с названием “Compositions and Methods for Inhibiting Gene Expression of Alpha-1 AntiTrypsin “Композиции и способы для ингибирования экспрессии гена альфа-1 антитрипсина”, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки, раскрыты различные двунитевые ингибирующие экспрессию олигомерные соединения, мишенью которых является ген антитрипсина альфа-1 (или ААТ), которые подходят для применения с раскрытыми в настоящем документе нацеливающими лигандами. ААТ представляет собой ингибитор протеаз, принадлежащий к надсемейству серпинов, и нормальный белок ААТ синтезируется в основном гепатоцитами печени и секретируется в кровь. Далее, в публикации WO 2016/01123 с названием “Organic Compositions to Treat APOC3-Related Diseases” (“Органические композиции для лечения связанных с АРОС3 заболеваний”), которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки, раскрыты различные двунитевые ингибирующие экспрессию олигомерные соединения, мишенью которых является человеческий аполипопротеин III (АРОС3), которые подходят для применения с раскрытыми в настоящем документе нацеливающими лигандами. Аполипопротеин С-III представляет является компонентом липопротеинов, который, как считают, ингибирует поглощение богатых триглицеридами частиц печенью. В уровне техники также можно найти дополнительные документы, в которых раскрыты различные терапевтические соединения, включая ингибирующие экспрессию олигомерные соединения, которые могут быть пригодны для применения с раскрытыми в настоящем документе нацеливающими лигандами. Они включают композиции, для которых было бы желательно нацеливание в печень, но не ограничиваются ими.

Фармацевтические композиции и составы

Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, если они связаны с олигомерным соединением, можно применять для лечения субъекта (например, человека или млекопитающего) с болезнью или нарушением, при котором было бы полезно введение этого соединения. В некоторых вариантах реализации раскрытые в настоящем документе нацеливающие лиганды, связанные с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, можно применять для лечения субъекта (например, человека) с болезнью или нарушением, при которых снижение или ингибирование экспрессии мРНК-мишени было бы полезным. Субъекту вводят терапевтически эффективное количество любых одного или более ингибирующих экспрессию олигомерных соединений, таких как агент РНКи, который связан с нацеливающим лигандом, раскрытым в настоящем документе. Субъект может представлять собой человека, пациента или пациента-человека. Субъект может быть взрослым, подростком, ребенком или младенцем. Описанные фармацевтические композиции, включающие нацеливающий лиганд, связанный с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением можно применять для обеспечения способов терапевтического лечения заболеваний. Такие способы включают введение фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, человеку или животному.

Фармацевтические композиции и способы, раскрытые в настоящем документе, могут снижать уровень мРНК-мишени в клетке, группе клеток, группе клеток, ткани или организме субъекта, включая: введение субъекту терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе ингибирующего экспрессию олигомерного соединения, которое связано с нацеливающим лигандом, что обеспечивает ингибирование экспрессии мРНК-мишени у субъекта. В некоторых вариантах реализации субъект предварительно идентифицирован как субъект с патологической повышающей регуляцией гена-мишени в клетке или ткани-мишени.

В некоторых вариантах реализации фармацевтические композиции включают по меньшей мере одно ингибирующее экспрессию олигомерное соединение, связанное с нацеливающим лигандом. Эти фармацевтические композиции особенно полезны в ингибировании экспрессии мРНК-мишени в клетке, группе клеток, ткани или

организме - мишени. Фармацевтические композиции можно применять для лечения субъекта с болезнью или нарушением, при которых было бы полезно снижение уровня мРНК-мишени или ингибирование экспрессии гена-мишени. Фармацевтические композиции можно применять для лечения субъекта с риском развития заболевания или нарушения, при котором было бы полезно снижение уровня мРНК-мишени или ингибирование экспрессии гена-мишени. В одном варианте реализации способ включает введение композиции, включающей нацеливающий лиганд, описанный в настоящем документе, связанный с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, таким как агент РНКи, субъекту, которого лечат. В некоторых вариантах реализации одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ (включая основы, носители, разбавители, и/или полимеры для доставки) добавляют в фармацевтические композиции, включающие нацеливающий лиганд, связанный с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, благодаря чему получают фармацевтические составы (препараты), подходящие для доставки человеку *in vivo*.

15 В некоторых вариантах реализации описанные фармацевтические композиции, включающие нацеливающий лиганд, связанный с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, применяют для лечения или регуляции клинических проявлений, связанных с экспрессией мРНК-мишени. В некоторых вариантах реализации терапевтически или профилактически эффективное количество одной или более фармацевтических композиций вводят субъекту, нуждающемуся в таком лечении, предотвращении или регуляции. В некоторых вариантах реализации введение любого из конъюгированных лигандов, ковалентно связанных с олигомерным соединением, можно применять для снижения числа, тяжести и/или частоты симптомов заболевания у субъекта.

30 Описанные фармацевтические композиции, включающие нацеливающий лиганд, связанный с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, могут применяться для лечения по меньшей мере одного симптома у субъекта с заболеванием, при котором снижение или ингибирование экспрессии мРНК-мишени могло бы принести пользу. В некоторых вариантах реализации субъекту вводят терапевтически эффективное количество одной или более фармацевтических композиций, содержащих ингибирующее экспрессию олигомерное соединение, такое как агент РНКи, связанный с нацеливающим лигандом, описанным в настоящем

документе, что обеспечивает лечение указанного симптома. В других вариантах реализации субъекту вводят профилактически эффективное количество одного или более ингибирующих экспрессию олигомерных соединений, что обеспечивает предотвращение по меньшей мере одного симптома.

5

В некоторых вариантах реализации уровень экспрессии гена и/или уровень мРНК-мишени у субъекта, которому вводят ингибирующее экспрессию олигомерное соединение, связанное с нацеливающим уменьшается на по меньшей мере примерно 5%, например, по меньшей мере примерно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 10 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% по сравнению с субъектом, не получающим фармацевтическую композицию. Уровень экспрессии гена у субъекта может снижаться в клетке, группе клеток и/или ткани субъекта. В некоторых вариантах реализации снижается уровень мРНК. В других вариантах реализации снижается уровень экспрессируемого белка. В некоторых вариантах 15 реализации уровень белка у субъекта, которому вводят ингибирующее экспрессию олигомерное соединение, связанное с нацеливающим лигандом, раскрытым в настоящем документе, снижается на по меньшей мере примерно 5%, например, на по меньшей мере примерно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% по сравнению с субъектом, не 20 получающим фармацевтическую композицию. Снижение экспрессии, уровней мРНК или уровней белка можно оценивать любыми способами, известными в данной области. Уменьшение или снижение уровня мРНК и/или уровня белка в целом называют в настоящем описании ингибированием, снижением или уменьшением экспрессии гена-мишени.

25

Путь введения представляет собой путь, которым ингибирующее экспрессию олигомерное соединение приводят в контакт с организмом. В целом, способы введения лекарственных средств и нуклеиновых кислот для лечения млекопитающего хорошо известны в данной области техники, и их можно использовать для введения 30 композиций, описанных в настоящем документе. Ингибирующее экспрессию олигомерное соединение, связанное с описанными в настоящем документе нацеливающими лигандами, можно вводить любым подходящим путем в препарате, специально предназначенном для конкретного пути. Соответственно, описанные в настоящем документе фармацевтические композиции можно вводить путем инъекции,

например, внутривенно, внутримышечно, внутрикожно, подкожно, внутрь сустава или интраперитонеально (внутрибрюшинно). В некоторых вариантах реализации описаны фармацевтические композиции, и их можно вводить путем ингаляции.

5 Фармацевтические композиции, включающие ингибирующее экспрессию олигомерное соединение, связанное с нацеливающим лигандом, описанным в настоящем документе, можно доставлять в клетку, группу клеток, ткань или субъекту с применением методик доставки олигонуклеотидов, известных в данной области техники. В целом, любой подходящий способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*),
10 общепринятый в данной области техники, можно адаптировать для применения с описанными в настоящем документе композициями. Например, доставку можно осуществлять путем местного введения (например, путем прямой инъекции, имплантации или топического введения), системного введения или подкожного, внутривенного, перорального, интраперитонеального или парентерального способов,
15 включая интракраниальное (например, внутрижелудочковое, внутривентрикулярное и интратекальное), внутримышечное, чрескожное введение, введение через дыхательные пути (в виде аэрозоля), интраназальное, ректальное или местное (включая трансбуккальное и подъязычное) введение. В некоторых вариантах реализации композиции вводят путем подкожной или внутривенной инфузии или инъекции.

20 Соответственно, в некоторых вариантах реализации описанные в настоящем документе фармацевтические композиции могут включать одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. В некоторых вариантах реализации фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут быть
25 выполнены в форме для введения субъекту.

В настоящем тексте фармацевтическая композиция или медикамент включает фармакологически эффективное количество фармакологически эффективное количество по меньшей мере одного из описанных терапевтических соединений и одно
30 или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества (вспомогательные вещества) представляют собой вещества, отличные от активного фармацевтического ингредиента (АФИ, терапевтического продукта, например, F12 агента РНКи), которые специально включают в систему доставки лекарственного средства. Вспомогательные вещества не

- проявляют или не должны проявлять терапевтический эффект в предполагаемой дозировке. Вспомогательные вещества могут служить для а) улучшения технологичности системы доставки лекарственных средств во время получения, б) защиты, поддержания или увеличения стабильности, биодоступности или применимости АФИ у пациента, с) облегчения идентификации продукта, и/или д) улучшения одного или более из общей безопасности, эффективности или доставки АФИ при хранении или применении. Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество является или не является инертным веществом.
- 10 Вспомогательные вещества включают следующие, но не ограничиваются ими: усилители всасывания, антиадгезивы, противовспениватели, антиоксиданты, связующие, буферные вещества, носители, покрытия, красители, вещества, улучшающие доставку, полимеры для доставки, декстран, декстрозу, разбавители, разрыхлители, эмульгаторы, объемообразующие вещества, наполнители, вкусоароматические вещества, скользящие вещества, увлажняющие вещества, смазывающие вещества, масла, полимеры, консерванты, солевой раствор, соли, растворители, сахара, суспендирующие вещества, матрицы с замедленным высвобождением, подсластители, загустители, регуляторы тоничности, основы, водоотталкивающие вещества и смачивающие вещества.
- 20 Фармацевтические композиции, подходящие для применения для инъекций, включают стерильные водные растворы (для водорастворимых веществ) или дисперсии и стерильные порошки для экстемпорального приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Подходящие носители для внутривенного введения включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, шт. Нью-Джерси, США) или фосфатный буферный раствор (ФБР). Они должны быть стабильны в условиях изготовления и хранения и должны быть защищены от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси. Подходящую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Во многих случаях
- 30

предпочтительно чтобы состав включал изотонические агенты, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннитол, сорбит, и хлорид натрия. Прологированного всасывания инъекционных композиций можно достичь путем включения в композицию агента, который замедляет всасывание, например, 5 моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные растворы для инъекций могут быть получены путем включения активного соединения в необходимое количество подходящего растворителя с одним или с комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей 10 стерилизацией путем фильтрации. Обычно дисперсии получают путем введения активного соединения в стерильную основу, которая содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из числа перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов, способу получения включают вакуумную сушку и сублимационную сушку, 15 которые позволяют получить порошок активного ингредиента в комбинации с любым дополнительным желательным ингредиентом из их раствора, предварительно подвергнутого стерильной фильтрации.

Составы, подходящие для внутрисуставного введения, могут быть выполнены в форме 20 стерильного водного препарата лекарственного средства, которое может быть в микрокристаллической форме, например, в форме водной микрокристаллической суспензии. Лизосомные составы или системы, включающие биodeградируемый полимер, также можно применять для подготовки лекарственного средства как для внутрисуставного введения, так и для введения в глаза.

25
Формы, подходящие для топического введения, включая лечение глаз, включают жидкие или полужидкие препараты, такие как линименты, лосьоны, гели, формы для нанесения, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, такие как кремы, мази или пасты; или растворы или суспензии, такие как капли. Формы для топического применения на 30 поверхности кожи могут быть получены путем диспергирования лекарственного средства дерматологически приемлемым носителем таким как лосьон, крем, мазь или мыло. Пригодны носители, способные образовывать пленку или слой на коже, позволяющие локализовать применение и снижающие перемещение. Для топического введения на внутренние поверхности тканей, агент может быть диспергирован в

жидком тканевом адгезиве или другом веществе, о котором известно, что оно повышает адсорбцию на тканевой поверхности. Например, может быть полезным применение растворов гидроксипропилцеллюлозы или фибриногена/тромбина. В качестве альтернативы можно применять покрытия для тканей в покрытиях, такие как пектин-содержащие составы.

Для ингаляционных средств лечения можно применять ингаляцию порошка (самопропеллирующие составы или составы в форме спрея), для дозирования которых могут применяться аэрозольный баллон, небулайзер или атомайзер. Такие составы могут быть представлены в форме тонкого порошка для легочного введения из устройства для порошковой ингаляции или самопропеллирующих формах для введения порошка. В случае самопропеллирующих растворов или форм спрея, В случае самопропеллирующих растворов или форм спрея желаемого эффекта можно достичь либо за счет выбора клапана с желаемыми характеристиками распыления (*m.e.*, способного выдавать спрей с желаемым размером частиц) или за счет введения активного ингредиента в качестве суспендированного порошка в частицы контролируемого размера. Для введения путем ингаляции соединения можно также вводить в форме аэрозольного спрея из контейнера или диспенсера, который содержит подходящий пропеллент, например, газ, такой как диоксид углерода, или небулайзера.

Системное введение также может осуществляться посредством введения через слизистые оболочки или трансдермальными средствами. Для введения через слизистые оболочки или трансдермального введения, в форме применяют пенетранты, подходящие для барьера, который нужно пересечь. Такие пенетранты общеизвестны в соответствующей области и включают, например, предназначенные для введения через слизистые оболочки, детергенты и соли желчных кислот. Введение через слизистые оболочки можно осуществлять с применением назальных спреев или суппозитория. Для трансдермального введения активные соединения обычно включают в состав мази, мазей, гелей или кремов, как широко известно в данной области.

Активные соединения можно объединять с носителями, которые будут защищать это соединение от быстрого выведения из организма, такими как препараты с замедленным высвобождением, включая импланты и микроинкапсулированными

системами доставки. Можно применять биodeградируемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэфиры и полимолочная кислота. Способы получения таких составов будут понятны специалистам в данной области. Липосомные суспензии также можно применять в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Их можно приготовить в соответствии со способами, известными специалистам в данной области, например, как описано в патенте США № 4,522,811.

Композиции для перорального или парентерального применения могут быть выполнены в дозированной лекарственной форме для легкости введения и равномерности дозировки. Дозированная лекарственная форма относится к физически дискретным единицам, которые можно применять в качестве единиц дозировки для субъекта, которого лечат; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное таким образом, чтобы обеспечить желаемый терапевтический эффект в комбинации с необходимым фармацевтическим носителем. Свойства дозированных лекарственных форм согласно настоящему изобретению диктуются и напрямую зависят от уникальных характеристик активного соединения и терапевтического эффекта, который предполагается получить, и неотъемлемых ограничений, связанных с объединением такого активного соединения с другими компонентами для лечения индивидуумов. Кроме того, введение можно осуществлять путем периодических инъекций болюса, или может быть более непрерывным с применением внутривенного, внутримышечного или интраперитонеального введения их внешнего резервуара (например, мешка для внутривенного введения).

В сочетании со способами согласно настоящему раскрытию можно рассматривать фармакогеномику (*m.e.*, исследование отношений между генотипом индивидуума и реакцией индивидуума на чужеродное соединение или лекарственное средство). Различия в метаболизме терапевтических средств могут привести к тяжелым токсическим эффектам или провалу терапии в результате изменения соотношения между дозой и концентрацией в плазме фармакологически активного лекарственного средства. Соответственно, лечащий врач или клинический специалист может рассмотреть применение информации, полученной в соответствующих фармакогеномных исследованиях, чтобы определить, вводить ли лекарственное

средство, а также для подбора дозировки и/или терапевтической схемы лечения лекарственным средством.

5 Фармацевтическая композиция другие дополнительные компоненты, обычно присутствующие в фармацевтических композициях. Такие дополнительные компонента включают следующие, но не ограничиваются ими: противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные агенты (например, антигистаминный препарат, дифенгидрамини т.д.). Также предусмотрено, что клетки, ткани или выделенные органы, которые экспрессируют или содержат
10 определенные в настоящем документе агенты РНКи, можно применять в качестве “фармацевтических композиций”. В настоящем тексте “фармакологически эффективное количество”, “терапевтически эффективное количество” или просто “эффективное количество” относится к такому количеству агента РНКи, которое обеспечивает предполагаемый фармакологический, терапевтический или
15 профилактический результат.

Обычно эффективное количество активного соединения будет лежать в диапазоне от приблизительно 0.1 до приблизительно 100 мг/кг массы тела/день, например, от приблизительно 1.0 до приблизительно 50 мг/кг массы тела/день. В некоторых
20 вариантах реализации эффективное количество активного соединения будет лежать в диапазоне от приблизительно 0.25 до приблизительно 5 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах реализации эффективное количество активного ингредиента будет лежать в диапазоне от приблизительно 0.5 до приблизительно 3 мг/кг массы тела на дозу. Вводимое количество также вероятно будет зависеть от таких переменных, как
25 общее состояние здоровья пациента, относительная биологическая эффективность доставляемого соединения, типа препарата лекарственного средства, наличие и тип вспомогательных веществ в составе и способ введения. Кроме того, следует понимать, что начальную вводимую дозировку можно увеличивать выше верхнего предела для быстрого достижения целевого уровня в крови или уровня в ткани, или начальная
30 дозировка может быть ниже оптимального значения.

Для лечения заболевания или получения лекарственного средства или композиции для лечения заболевания фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, включающие ингибирующее экспрессию олигомерное соединение, такое

как агент РНКи, связанный с нацеливающим лигандом, можно объединять со вспомогательным веществом или со вторым терапевтическим агентом или средством лечения, включая перечисленные, но не ограничиваясь ими: второе или другое ингибирующее экспрессию олигомерное соединение, низкомолекулярное лекарственное средство, антитело, фрагмент антитела и/или вакцину.

Описанные нацеливающие лиганды, связанные с ингибирующими экспрессию олигомерными соединениями, и добавленные к фармацевтически приемлемым вспомогательным веществам или адьювантам, могут быть упакованы в комплекты (наборы), контейнеры, упаковки или дозирующие устройства. Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут быть упакованы в предварительно наполненные шприцы или ампулы.

Ниже варианты реализации, предложенные выше, описаны посредством неограничивающих примеров.

ПРИМЕРЫ

Следующие далее примеры не являются ограничивающими предназначены для иллюстрации некоторых вариантов реализации, раскрытых в настоящем тексте.

Ниже определены некоторые из сокращений, применяемых в описании экспериментальных подробностей синтеза примеров соединений, описанных ниже: ч = час(часы); мин = минута (минуты); моль = моль (моли); ммоль = миллимоль (миллимоли); М = молярный; мкМ= микромолярный; г = грамм (граммы); микро = микрограмм (микрограммы); кт или КТ = комнатная температура; кт л = литр (литры); мл = миллилитр(миллилитры); масс. = масса; Et₂O = диэтиловый эфир; ТГФ = тетрагидрофуран; ДМСО= диметилсульфоксид; EtOAc = этилацетат; Et₃N или ТЭА = триэтиламин; *i*-Pr₂NEt, или DIPEA, или DIEA = диизопропилэтиламин; CH₂Cl₂ или ДХМ = метиленхлорид; CHCl₃ = хлороформ; CDCl₃ = дейтерированный хлороформ хлороформ; CCl₄ = carbon tetрахлорид; MeOH = метанол; EtOH = этанол; ДМФА = диметилформаид; Boc = *трет*-бутоксикарбонил; CBZ = бензилоксикарбонил; TBS = *t*-бутилдиметилсилил; TBSCl = *t*-бутилдиметилсилил хлорид; ТФУК = трифторуксусная кислоты; DMAP = 4-диметиламинопиридин; NaN₃ = азид натрия; Na₂SO₄ = сульфат натрия; NaHCO₃ = бикарбонат натрия; NaOH = гидроксид натрия;

MgSO₄ = сульфат магния; K₂CO₃ = карбонат калия; KOH = гидроксид калия; NH₄OH = гидроксид аммония; NH₄Cl = хлорид аммония; SiO₂ = оксид кремния Pd-C = палладий на угле; HCl = хлороводород или соляная кислота; NMM = N-метилморфолин; H₂ = газообразный водород; KF = фторид калия; EDC-HCl = N-(3-Диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида гидрохлорид; MTBE = метил-*трет*-бутиловый эфир; MeOH = метанол; Ar = аргон; SiO₂ = оксид кремния R_T = время удерживания.

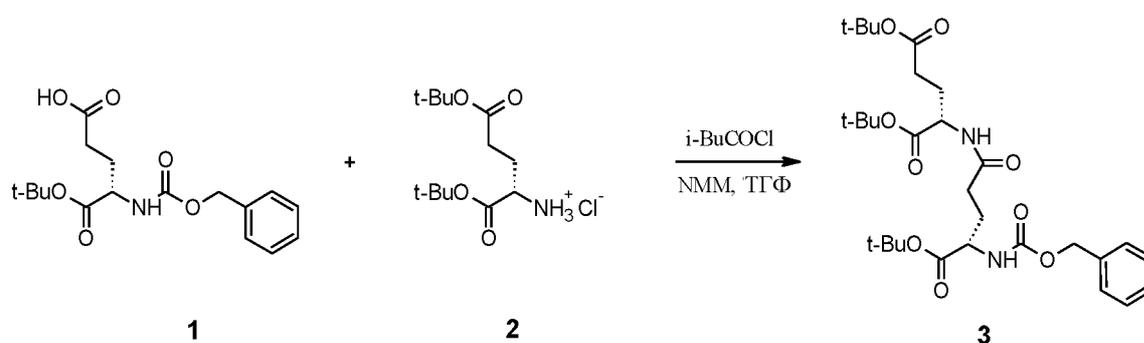
Дополнительно, примеры ингибирующих экспрессию олигомерных соединений, подходящих для применения с нацеливающими лигандами, раскрытыми в настоящем документе, приведены в различных Таблицах в разделе Примеры ниже. Для обозначения модифицированных нуклеотидов для последовательностей, приведенных в таблицах ниже, используются следующие обозначения:

	N	= 2'-ОН (немодифицированный) рибонуклеотид (заглавная буква без f или d)
15	n	= 2'-ОМе-модифицированный нуклеотид
	Nf	= 2'-фтор-модифицированный нуклеотид
	dN	= 2'-дезоксинуклеотиды
	N _{UNA}	= 2',3'-секонуклеотидные миметики (незакрытые аналоги нуклеозидов)
20	N _{LNA}	= закрытый нуклеотид
	Nf _{ANA}	= 2'-F-арабинонуклеотид
	NM	= 2'-метоксиэтил нуклеотид
	X или Ab	= рибоза без нуклеозидного основания
	R	= рибитол
25	(invdN)	= инвертированный дезоксирибонуклеотид (3'-3'-связанный нуклеотид)
	(invAb)	= инвертированный нуклеотид без нуклеозидного основания
	(invX)	= инвертированный нуклеотид без нуклеозидного основания
	(invn)	= инвертированный 2'-ОМе нуклеотид
30	s	= фосфоротиоат-связанный нуклеотид
	vpdN	= винилфосфонатдезоксирибонуклеотид
	(3'OMe)	= 3'-ОМе-нуклеотид
	(5Me-Nf)	= 5'-Ме, 2'-фторнуклеотид
35	cPrp	= циклопропилфосфонат

Раскрытые в настоящем документе соединения могут быть изготовлены с применением химических методик, известных специалистам в данной области.

Пример 1. Синтез нацеливающего лиганда, представляющего собой форфорамидитное соединение структуры 101b.

- 5 1) Получение три-*tert*-бутил-*N*-[*N*-(Бензилоксикарбонил)-*L*- γ -глутамил]-*L*-глутамата (3)



В продукую азотом 250 мл трехгорлую круглодонную колбу, оборудованную термопарой, магнитной мешалкой, входом для азота и воронкой для порошка, добавляли соединение **1** (10.00 г, 29.64 ммоль), а затем ТГФ (100 мл). Полученный раствор перемешивали, а затем добавляли *N*-метилморфолин (7.82 мл, 71.15 ммоль).

Воронку для порошка заменяли резиновой перегородкой и охлаждали смесь при помощи ванны со льдом до 0 °С. К реакционной смеси на протяжении 10 минут по каплям добавляли изобутилхлорформиат (iBuCOCl, 3.85 мл, 29.64 ммоль, 1.0 эквивалентов), поддерживая температуру в сосуде ниже 4.0 °С. После добавления смесь перемешивали еще 40 минут и заменяли перегородку воронкой для порошка. К реакционной смеси порциями на протяжении 15 минут добавляли соединение **2** (8.767 г, 29.64 ммоль, 1.0 эквивалентов), поддерживая температуру в сосуде ниже 4.0 °С. После добавления соединения **2** ванну со льдом и воронку для порошка удаляли и давали реакционной смеси нагреться до температуры окружающей среды на протяжении оставшихся этапов. Прозрачный, бесцветный раствор выдерживали 25 минут после добавления соединения **2**.

Образец реакционной смеси (98 мкл, разбавленных в 5.0 мл ацетонитрила в 5 мл мерной колбе) брали через 40 минут после начала добавления соединения **2** и исследовали процент превращения методом ОФ-ВЭЖХ. Было обнаружено 23% оставшегося соединения **1**, поэтому через 60 минут после начала реакции последовательно добавляли дополнительное количество iBuCOCl (1.16 мл, 30 мол.%) и

2 (2.63 г, 30 мол.%) добавляли. Раствор выдерживали в течение еще 60 минут, до тех пор пока ВЭЖХ не показывала в образце не обнаруживалось более, чем 99% превращение. Общее время реакции составляло 2.5 ч от начала первого добавления соединения 2.

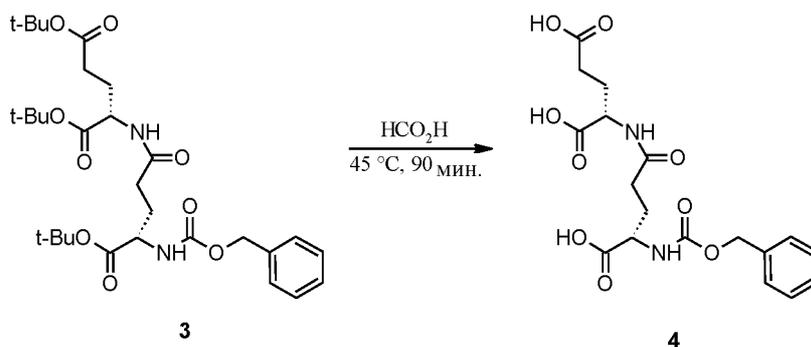
5 Реакционный раствор вливали в перемешиваемый раствор 0.5 М HCl_(вод.), охлажденный в ванне со льдом до 3 °С и перемешивали примерно 5 минут. Гашеную реакцию смесь переносили в 500 мл делительную воронку и добавляли этилацетат (100 мл). Слои разделялись, и органическую фазу промывали солевым раствором (100 мл), сушили при помощи MgSO₄, фильтровали в 500 мл круглодонную колбу и
10 концентрировали *под вакуумом*, в результате чего получали густое бесцветное масло. Это масло растворяли в МТБЕ (100 мл) и концентрировали *под вакуумом*, после чего еще раз получали густое бесцветное масло.

К перемешиваемому маслу добавляли гексаны (100 мл). В растворе появлялась белая муть, которая исчезала после перемешивания. Добавляли затравочные кристаллы и
15 оставляли смесь перемешиваться в течение 40 минут; за это время медленно образовывались кристаллы.

В течение 20 минут суспензия становилась достаточно густой чтобы затруднять перемешивание и добавляли дополнительные (50 мл) добавляли. Через 40 минут суспензию фильтровали при помощи крупнопористой воронки, промывали три раза
20 гексанами (~10 мл в каждом случае) и сушили воздухом в воронке в течение 1 ч, в результате чего получали соединение 2 в виде тонкого белого порошка (15.64 г, 91%).
¹H-ЯМР соединения 3 показан на Фигуре 1. В масштабе 75 г выход составил 917% при чистоте 99%.

2) Получение *N*-[*N*-(бензилоксикарбонил)-*L*-γ-глутамил]-*L*-глутаминовая кислота

25 (4)

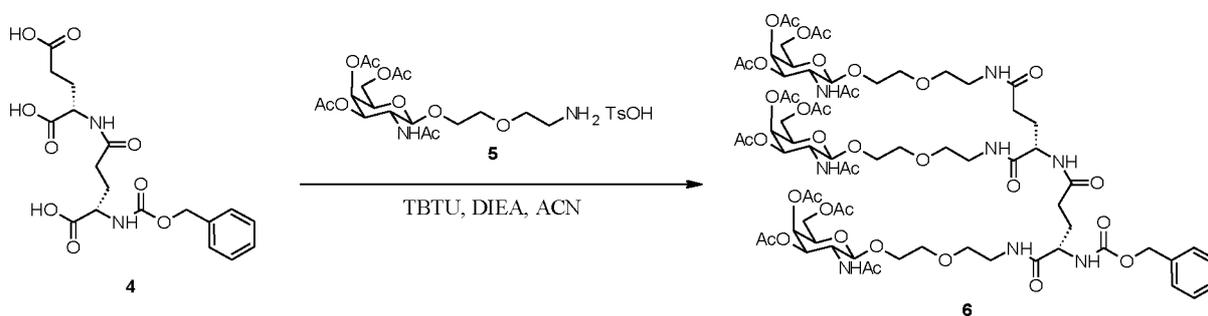


В 3000 мл трехгорлую круглодонную колбу, оборудованную верхнеприводной мешалкой, воронкой для порошка, термопарой и колбонагревателем, добавляли соединение **3** (72.57 г, 125.4 ммоль) и муравьиную кислоту (чистую для анализа, >95%, 1.45 л, 20 об. эквив.). Воронку для порошка заменяли пробкой/N₂ и нагревали
5 полученный раствор до 45°C и перемешивали в течение 1 ч, отслеживая ход реакции методом ОФ-ВЭЖХ. Реакцию признавали завершенной, когда оставалось менее 2.0 % площади моно-*t*-бутиловых эфиров.

Образец реакционной смеси (50 мкл, разбавленный в 950 мкл H₂O) брали через 60 минут после добавления муравьиной кислоты, и исследовали этот образец методом ОФ
10 ВЭЖХ для определения процента оставшихся моно-*t*-бутиловых эфиром. Анализ показал, что оставалось 1.8% моно-*t*-Бу-эфиров; соответственно на 90 минуте нагревание прекращали.

Реакционную смесь разбавляли толуолом и ацетонитрилом (ACN, 1500 мл а каждом случае) и концентрировали смесь *под вакуумом*. Удаляли муравьиную кислоту путем
15 азеотропирования со смесью 1:1 ACN:толуол (~600 мл) дважды с ACN (~500 мл а каждом случае). Этот материал сушили в высоком вакууме в течение ночи, в результате чего получали соединение **4** в виде белого пенистого твердого вещества (54.3 г, количественный выход). ¹H-ЯМР соединения **4** (L/N 1321-063В) показан на Фигуре 2.

20 3) Получение *N*-[*N*-(бензилоксикарбонил)-*L*-γ-глутамил]-*L*-глутаминовой кислоты, три-[NAG-PEG₂]-амида (**6**)



25 В круглодонную колбу объемом 1 л добавляли соль *p*-тозилат NAG-амина (**5**, 59.19 г, 97.6 ммоль, 4.13 эквив.) и *Z*-бис-Glu-триацид (**4**, 10.01 г, 23.6 ммоль, 1.0 эквив.). Смесь растворяли в ацетонитриле (500 мл) и концентрировали *под вакуумом* для

азеотропического удаления воды. Остаток растворяли в свежем ацетонитриле (400 мл) и переносили в продутую азотом трехгорлую круглодонную колбу, имеющую мешалку и оборудованную термопарой. Содержание воды измеряли методом Карла Фишера (257 ppm).

5

К перемешиваемому раствору через воронку для порошка в атмосфере азота добавляли ТВТУ (28.20 г, 87.8 ммоль, 3.7 эквив.). Остаток ТВТУ на воронке смывали в реакционную смесь с использованием дополнительного количества ацетонитрила (100 мл). По каплям при помощи шприца добавляли DIPEA (34.0 мл, 25.2 г, 8.0 эквив.) в течение 20 минут, поддерживая температуру реакции ниже 25 °С. Смесь перемешивали в течение 2 ч от начала добавления DIPEA, осуществляя мониторинг методом ВЭЖХ. На 78 минуте анализ показал полное поглощение исходного материала.

10

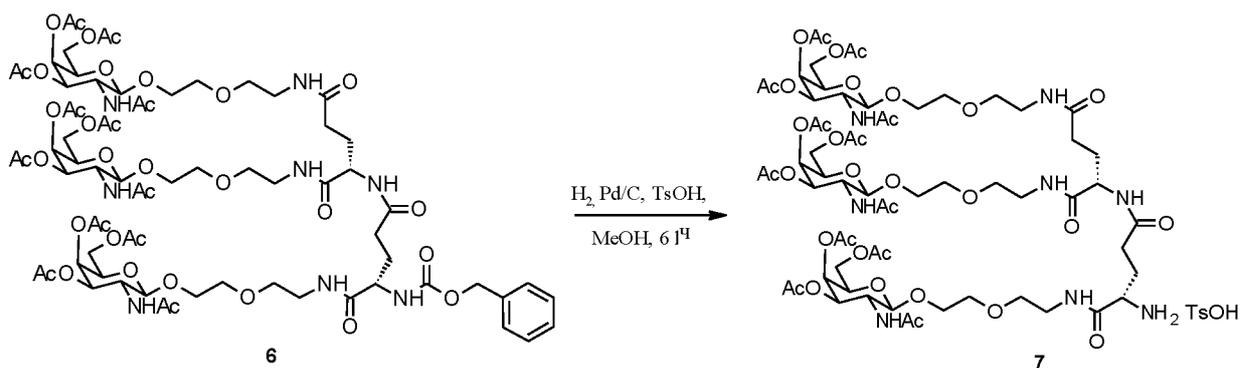
Через 2 ч растворитель удаляли *под вакуумом*. Полученное густое масло растворяли в дихлорметане (1000 мл) и промывали 1.0 н. HCl_(вод.) (3 x 500 мл) и насыщенным NaHCO_{3(вод.)} (3 x 500 мл). Органический слой сушили при помощи Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали *под вакуумом*, в результате чего получали беловатое воскоподобное твердое вещество (33.5 г).

15

Проводили флэш-хроматографию на автоматизированной системе очистки ISCO CombiFlash с использованием хлороформа и метанола в качестве элюентов. Все фракции, в которых на основании УФ-хроматограммы (220нм) подозревали присутствие продукта, иммледовали методом ВЭЖХ, и все фракции, содержащие по меньшей мере 97.0% AUC продукта объединяли и концентрировали, в результате чего получали 18.75 г (97.0% чистота) соединения **6**. Объединяли фракции с примесями, в результате чего получали еще 12.2 г (78.8% чистота) соединения **6**. Общий выход **6** составил 70.9%. ¹H-ЯМР соединения **6** показан на Фигуре 3.

25

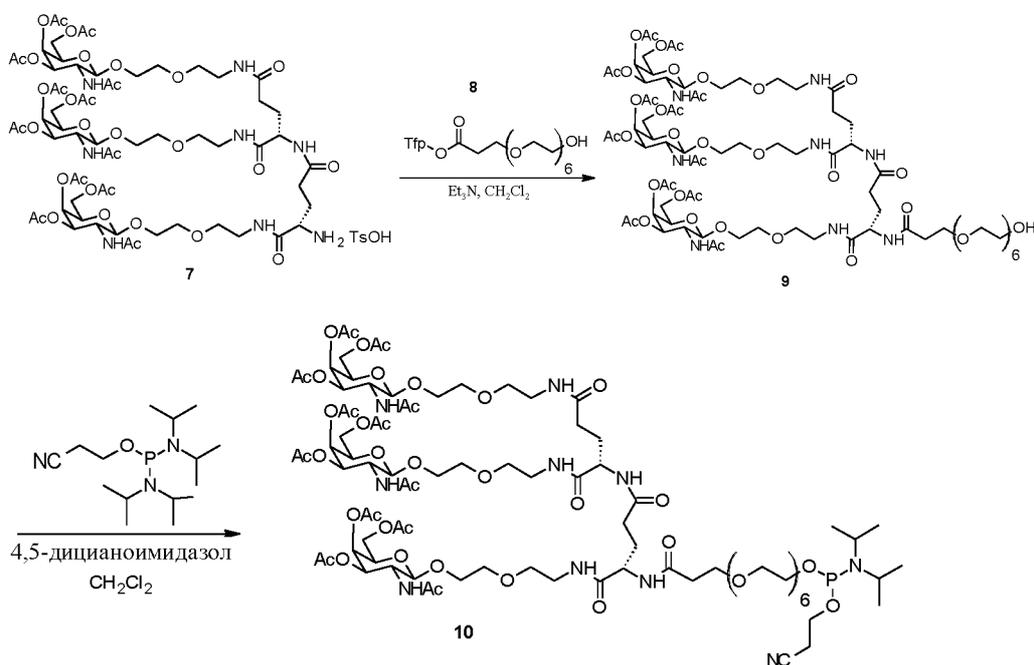
4) Получение три-NAG-бис-Glu-NH₂ тозилат(7).



Соединение **6** (5.737 г, 3.46 ммоль) в MeOH (155 мл) с *p*-TsOH-H₂O (0.657 г, 3.46 ммоль) гидрогенировали в присутствии Pd/C 10% (688 мг) в течение 6 ч. ТСХ (CHCl₃;MeOH= 8.5:1.5) подтверждала, что к этому времени реакция была завершена. Реакционную колбу заполняли Ag, добавляли EtOH (200 мл) и фильтровали раствор через целит. Продукт концентрировали и сушили *под вакуумом*. Получали 4.81 г целевой тозилатной соли **7**. ¹H-ЯМР соединения **7** показан на Фигуре 4.

5) Получение три-NAG-бис-Glu-NH-PEG₆-OH (**9**):

10



*Процедура А (если чистота соли три-NAG амина **7** меньше 96%):* Соль NAG-амин **7** (чистота ~90%, 18.50 г, 10.90 ммоль) и эфир HO-PEG₆-CO₂TFP - **8** (6.57 г, 13.08 ммоль) растворяли в дихлорметане (185 мл) и охлаждали до 0 °С. К этому раствору добавляли триэтиламин (6.10 мл, 43.59 ммоль). Раствору давали нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 18 ч, осуществляя мониторинг методом

ВЭЖХ. Реакцию гасили насыщенным водным NaHCO_3 и соевым раствором (1:1, 140 мл), перемешивали в течение 30 мин при к.т., и разделяли слои. Органический слой промывали насыщенным водным NaHCO_3 (3 x 140 мл) и соевым раствором (1:1) и сушили при помощи Na_2SO_4 . Осушающий агент фильтровали и концентрировали раствор и очищали флэш-хроматографией, что давало соединение **9** (13.56 г, 67%) в форме белого твердого материала. ^1H -ЯМР соединения **9** показан на Фигуре 5.

Проводили флэш-хроматографию на автоматизированной системе очистки ISCO CombiFlash с использованием дихлорметана и метанола в качестве элюентов. Чистые фракции объединяли и концентрировали, в результате чего получали 13.56 г соединения **9** (чистота 99%). Объединяли фракции с примесями, в результате чего получали 4.9 г соединения **9** (чистота ~95%).

Процедура В (если чистота соли три-NAG-амин 7 больше 96%): Продукт **7** (1.94 г, 1.272 ммоль) в ДХМ (40 мл) перемешивали в атмосфере аргона с эфиром HO-PEG₆-CO₂TFP **8** (767 мг, 1.526 ммоль) и DIPEA (443 мкл, 2.544 ммоль) в течение 16 ч. Реакционную смесь концентрировали *под вакуумом*, растворяли в CHCl_3 и добавляли по каплям к перемешиваемому Et_2O (90 мл). Осадок отделяли, споласкивали Et_2O (3x35 мл) и сушили *под вакуумом*. Выход 2.275 г (96%).

б) Получение три-NAG-бис-Glu-NH-PEG₆ фосфорамидит (**10**):

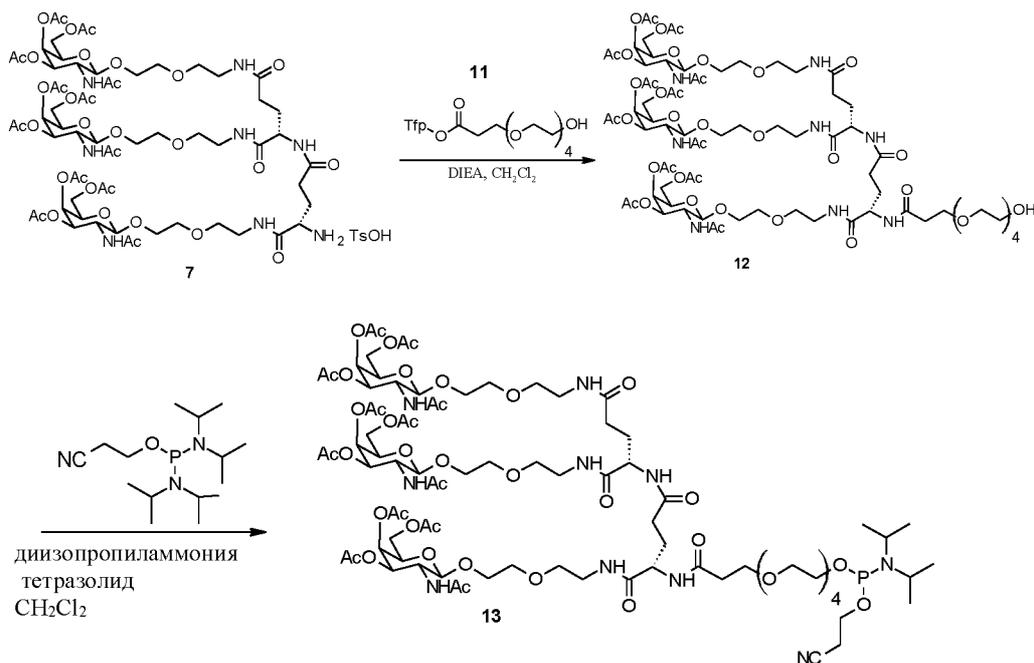
Соединение **9** (6.62 г, 3.56 ммоль) и 4,5-дицианоимидазол (0.11 г, 0.89 ммоль) растворяли в безводном дихлорметане (230 мл) и помещали в атмосферу азота. К этой смеси по каплям добавляли раствор 2-цианоэтил- N,N,N',N' -тетраизопропилфосфородиамидид ("реагент Phos", 1.46 мл, 4.62 ммоль) в безводном дихлорметане (5 мл) добавляли на протяжении 5 минут. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч без мониторинга ВЭЖХ (оставалось <1% исходного материала).

Реакционную смесь промывали насыщенным водным NaHCO_3 (2 x 150 мл), 3% ДМФА в H_2O (об./об., 2 x 150 мл), H_2O (3 x 150 мл), и соевым раствором (1 x 150 мл), органический слой сушили с использованием Na_2SO_4 . Осушающий агент фильтровали и концентрировали раствор *под вакуумом*, в результате чего получали неочищенный продукт. Неочищенный продукт суспендировали в 5% смеси толуол-гексан (50 мл) и перемешивали в течение 5 минут, после чего сливали растворитель. Процесс повторяли с 5% смесью толуол-гексан (1 x 50 мл) и гексаном (2 x 50 мл). Твердые вещества

сушили под вакуумом с получением 6.69 г **10** в форме белого твердого материала (91%) (соединение **10**). ¹H-ЯМР соединения **10** (Структура 101d в настоящем документе) показан на Фигуре 6.

5 Пример 2. Синтез нацеливающего лиганда, представляющего собой фосфорамидитное соединение структуры 103d.

1) Получение три-NAG-бис-Glu-NH-PEG₄-OH (**12**):



10 Продукт **7** (2.44 г, 1.44 ммоль) из Примера 1 выше растворяли в ДХМ (30 мл) и помещали в атмосферу аргона. К раствору добавляли сложный эфир HO-PEG₄-CO₂TFP **11** (717 мг, 1.73 ммоль) и DIPEA (502 мкл, 2.88 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение 16 ч. Реакционную смесь концентрировали *под вакуумом* и снова растворяли в CHCl₃. Затем раствор по каплям добавляли к перемешиваемому

15 Et₂O (90 мл). Осадок отделяли, споласкивали Et₂O и сушили *под вакуумом*, в результате чего получали 2.60 г (102%) продукта **12**, который использовали без дальнейшей очистки.

2) Получение три-NAG-бис-Glu-NH-PEG₄ фосфорамидит (**13**):

Продукт **12** (1.80 г, 1.01 ммоль) дважды выпаривали с пиридином, а затем растворяли в безводном дихлорметане (25 мл) и помещали в атмосферу аргона. К раствору добавляли диизопропиламмония тетразолид (87 мг, 0.51 ммоль) и 2-цианоэтил-N,N,N',N'-тетраизопропилфосфородиамидид (458 мг, 1.52 ммоль). Реакционную смесь

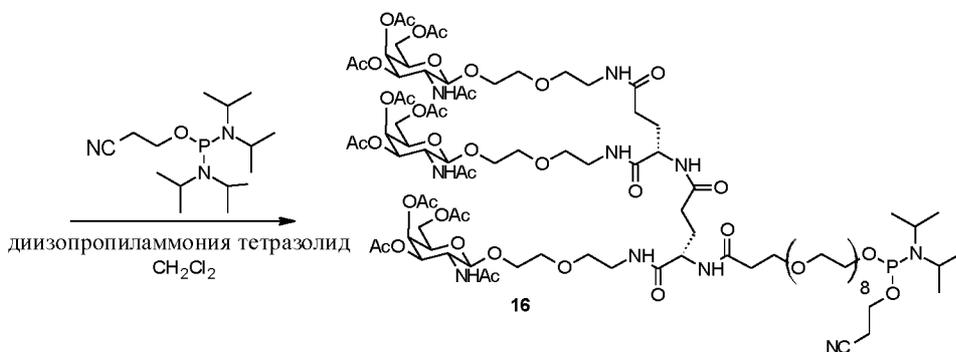
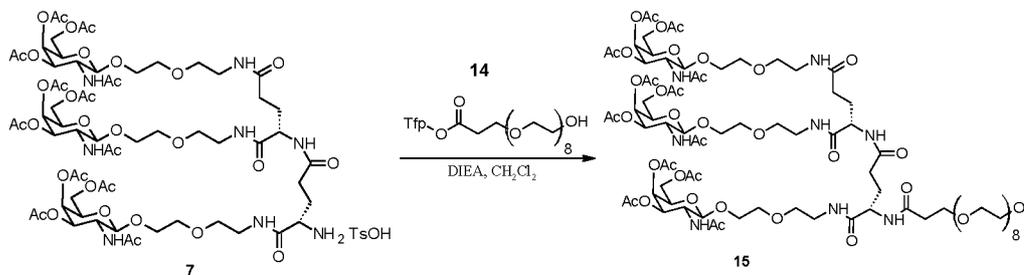
20

перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч, отслеживая ход реакции методом ТСХ (CHCl₃: MeOH: Et₃N 95:5:2). После поглощения исходного материала Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном (250 мл) и промывали насыщенным водным NaHCO₃ (100 мл) и насыщенным водным соевым раствором (100 мл).

5 Органический слой сушили сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией (ДХМ: MeOH: Et₃N 97:3:2), в результате чего получали 1.04 г (53%) соединения **13**. ¹H-ЯМР соединения **13** (Структура 103d в настоящем документе) показан на Фигуре 7.

10 Пример 3. Синтез нацеливающего лиганда, представляющего собой фосфорамидитное соединение структуры 102d.

1) Получение три-NAG-бис-Glu-NH-PEG₈-OH (**15**):



15 Продукт **7** (3.09 г, 1.82 ммоль) из Примера 1 выше растворяли в ДХМ (30 мл) и помещали в атмосферу аргона. К раствору добавляли сложный эфир HO-PEG₈-CO₂TFP **14** (1.29 г, 2.18 ммоль) и DIPEA (634 мкл, 3.64 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение 16 ч. Реакционную смесь концентрировали *под вакуумом* и снова растворяли CHCl₃. Затем раствор по каплям добавляли к перемешиваемому Et₂O (180 мл). Осадок отделяли, споласкивали Et₂O и сушили *под вакуумом*, в результате чего получали 3.54 г (99%) продукта **15**, который использовали без дальнейшей очистки.

2) Получение три-NAG-бис-Glu-NH-PEG₈ фосфорамидита (**16**):

связывания составляли 10 мин (РНК), 15 мин (нацеливающий лиганд), 90 сек (2'ОМе) и 60 сек (2'F). Для введения фосфоротиоатных связей применяли 100 мМ раствор 3--фенил-1,2,4-дитиазолин-5-она (POS, полученный из PolyOrg, Inc., Leominster, MA, USA) в безводном ацетонитриле.

5

В. Отщепление и удаление защиты олигомера, связанного с подложкой. После окончания твердофазного синтеза высушенную твердую подложку обрабатывали раствором 1:1 по объему 40 масс.% метиламин в воде и 28% раствором гидроксида аммония (Aldrich) в течение двух ч при 30°C. Раствор выпаривали и восстанавливали твердый остаток в воде в воде (см. ниже).

10

С. Очистка. Неочищенные олигомеры очищали анионо-обменной ВЭЖХ с применением колонки TKSgel SuperQ-5PW 13и и системы Shimadzu LC-8. Буфер А представлял собой 20 мМ Tris, 5 мМ ЭДТА, pH 9.0, и содержал 20% ацетонитрила, а буфер Б был таким же как буфер А, но с добавлением 1.5 М хлорида натрия. Регистрировали остаточное УФ при 260 нм. Соответствующие фракции объединяли, затем подвергали вытеснительной ВЭЖХ с применением колонки GE Healthcare XK 16/40, заполненная средой Sephadex G-25 с подвижным буфером из 100 мМ бикарбоната аммония, pH 6.7, и 20% ацетонитрила.

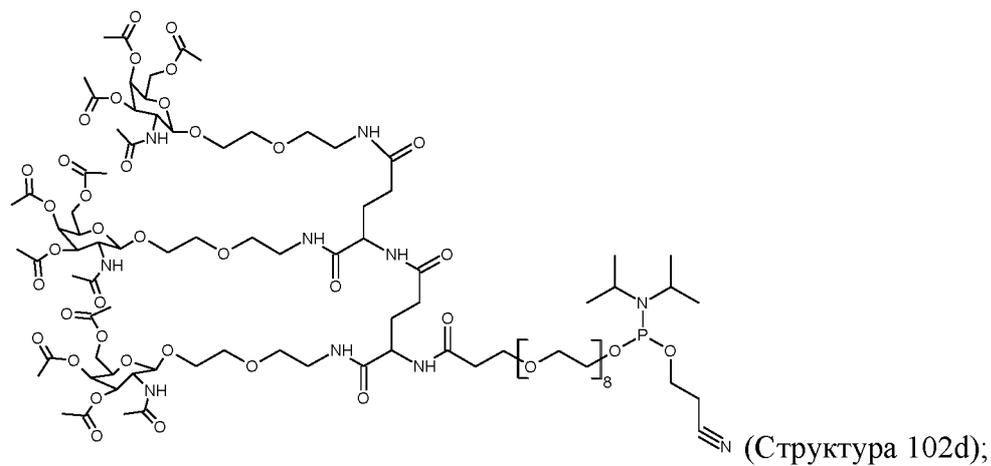
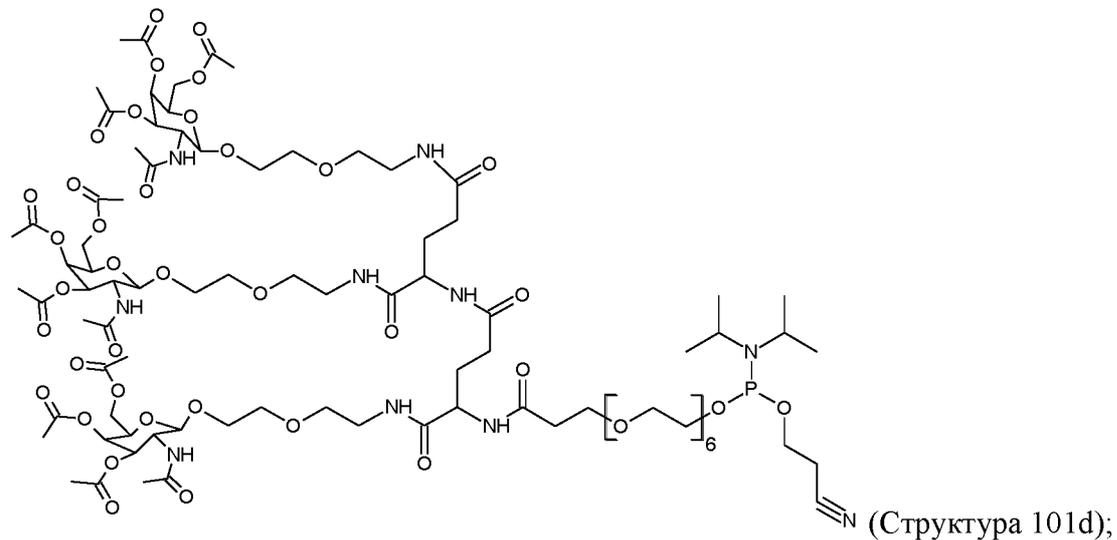
20

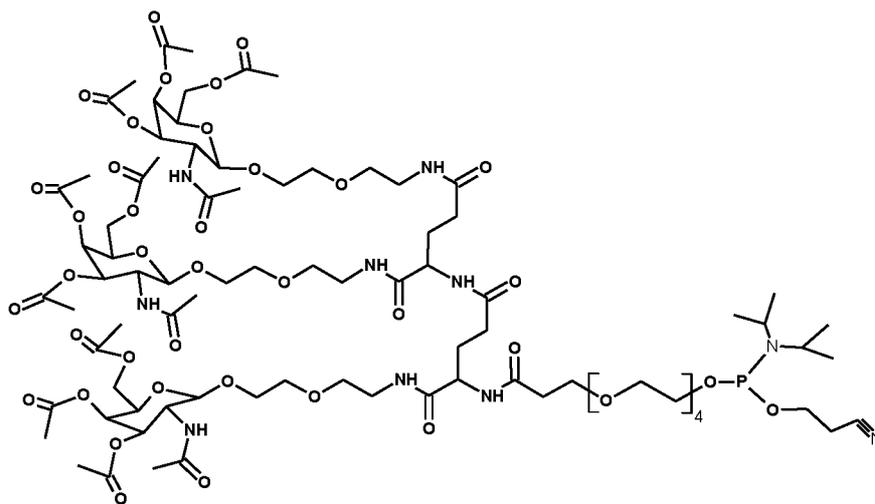
Д. Отжиг. Комплементарные нити смешивали путем объединения эквимольных растворов РНК (смысловой и антисмысловой) в 0.2× ФБР (фосфатно-буферном растворе, 1×, Corning, Cellgro) с образованием агентов РНКи. Этот раствор помещали в термомиксер при 70°C, нагревали до 95°C, выдерживали при 95°C в течение 5 мин и медленно охлаждали до комнатной температуры. Некоторые агента РНК лиофилизировали и хранили при температуре от -15 до -25°C. Концентрацию дуплексов определяли путем измерения поглощения растворов на УФ-вид. спектрометре в 0.2× ФБР. Затем поглощение раствора при 260 нм умножали на коэффициент преобразования и коэффициент разбавления, определяя таким образом концентрацию дуплекса. Если не указано иное, во всех случаях коэффициент преобразования составлял 0.037 мг/(мл·см). Для некоторых экспериментов коэффициент преобразования рассчитывали по экспериментально определенному коэффициенту экстинкции.

30

Пример 5. Свойства фосфорамидит-содержащих соединений, включающих нацеливающие лиганды с ПЭГ-линкерами варьирующей длины.

Синтезировали следующие фосфорамидитные соединения с нацеливающими лигандами в соответствии со способами, описанными выше в примерах 1–4:





(Структура 103d).

5 Каждое из фосфорамидитных соединений Структуры 101d, 102d и 103d вводили в количестве 16 эквивалентов для конъюгации на 5'-конце одностороннего олигонуклеотида AM03704-SS, представляющего собой смысловую цепь, которая может применяться при синтезе двунитевого агента для РНК-интерференции (РНКи), нацеленного на F12. AM03704 имеет последовательность нуклеотидов, приведенную в таблице ниже:

Таблица 1. Последовательность смысловой цепи из примера 5.

	5' → 3'	SEQ ID NO:
Последовательность смысловой цепи: (AM03704-SS)	uaauugscsccaagaAfaGfugaaagacc(inv dA)	1

10

Композиции солубилизировали в дихлорметане (ДХМ) и высушивали над ситами. Для фосфорамидитного соединения структуры 103d (т.е. содержащего ПЭГ-4-линкер) наблюдались связанные с гелеобразованием проблемы при концентрации как 0,05M, так и 0,25M. Как показано на фиг. 9, в указанных условиях только очень незначительное количество нацеливающего лиганда Структуры 103d было способно к конъюгации с 5'-концом олигонуклеотида AM03704-SS.

15

Наблюдалась конъюгация с олигонуклеотидом нацеливающего лиганда как Структуры

101d, так и Структуры 102d. На фиг. 9 приведена ВЭЖХ-хроматограмма для AM03704, конъюгированного со Структурой 101d. Было определено, что в случае нацеливающего лиганда Структуры 101 происходило образование приблизительно 78% конъюгированного с нацеливающим лигандом олигонуклеотида (FLP =

5 полноразмерный продукт). На фиг. 10 приведена ВЭЖХ-хроматограмма для AM03704, конъюгированного со Структурой 102d. Происходило образование приблизительно 40% конъюгированного с нацеливающим лигандом олигонуклеотида, и приблизительно 60% олигонуклеотида оставалось неконъюгированным.

10 Удивительным и неожиданным образом при введении 16 эквивалентов Структура 101d по существу превосходила как Структуру 102d, так и Структуру 103d применительно к конъюгации с олигонуклеотидом на 5'-конце последовательности. Кроме того, как Структура 101d, так и 102d демонстрировали более высокую растворимость по сравнению со Структурой 103d. Как отмечалось выше, Структура 103d плохо

15 растворялась при использовании стандартных концентраций и растворителей, типичных для синтеза олигонуклеотидов. Получение нацеливающих лигандов, связанных с ингибирующими экспрессию олигомерными соединениями, содержащими нацеливающий лиганд Структуры 103 (применение фосфорамидитного соединения Структуры 103d), требовало добавления более агрессивных полярных растворителей.

20 **Пример 6. Сравнение 3' и 5' сайтов прикрепления смысловой цепи для нацеливающих GalNAc-лигандов с применением ингибирующих экспрессию F12 олигомерных соединений у мышей дикого типа.**

Для оценки различий в сайте прикрепления GalNAc-лигандов между 3'- и 5'-концами смысловой цепи получали ингибирующие экспрессию олигомерные соединения

25 (двунитевых агентов для РНКи), направленные на F12 (называемые в настоящем документе агентами для РНКи F12), с последовательностями, представленными ниже в таблице 2:

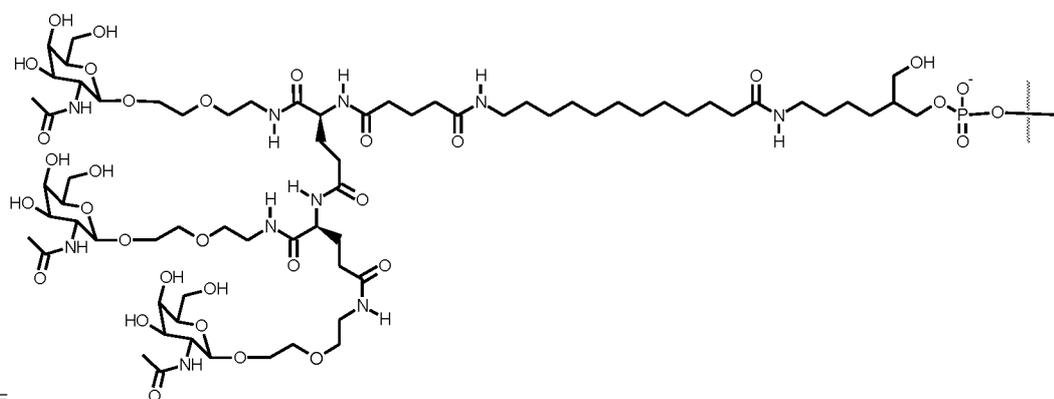
Таблица 2. Ингибирующие экспрессию F12 олигомерные соединения (дуплексы агентов для РНКи) из примера 6.

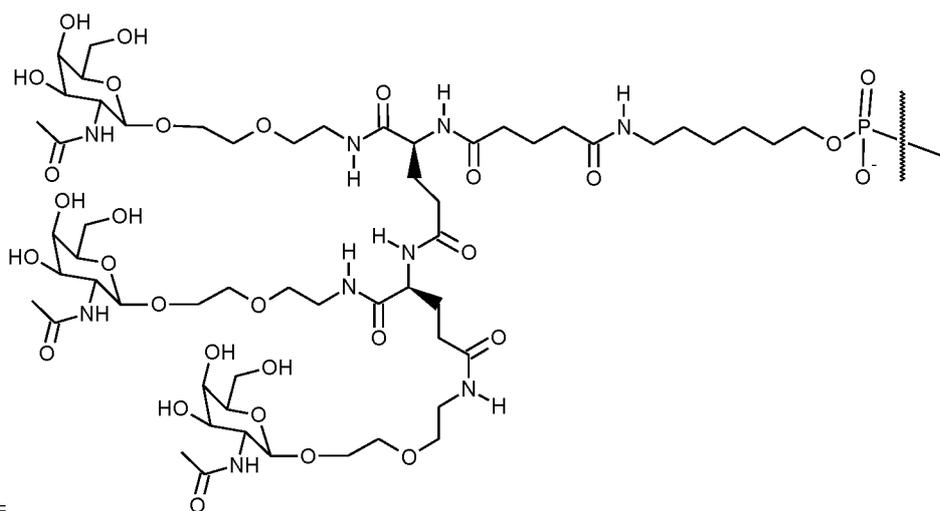
Идентификатор дуплекса: AD02803	5' → 3'	SEQ ID NO:

Последовательность смысловой цепи: (AM03628-SS)	uAuAugscsccaagaAfaGfugaaagacca(NAG15)	2
Последовательность антисмысловой цепи: (AM03157-AS)	usGfsgucuuUfcAfcuuUfcuugggcsuscuAu	3
Идентификатор дуплекса: AD02807	5' → 3'	SEQ ID NO:
Последовательность смысловой цепи: (AM03632-SS)	(NAG18)uauaugscsccaagaAfaGfugaaagacc(inv dA)	4
Последовательность антисмысловой цепи: (AM03157-AS)	usGfsgucuuUfcAfcuuUfcuugggcsuscuAu	5

В таблице 2 выше использованы следующие обозначения:

5 (NAG15)=





(NAG 18)=

(NAG18) имеет химическую структуру, которая в настоящем документе представлена Структурой 2.

5

Каждую цепь агентов для РНКи F12 синтезировали в соответствии с фосфорамидитной технологией, на твердой фазе, применяемой при синтезе олигонуклеотидов, используя либо MerMade96E® (Bioautomation), либо MerMade12® (Bioautomation); комплементарные цепи смешивали путем комбинирования эквимольных растворов РНК (смысловой и антисмысловой) в $0,2 \times \text{ФБР}$ (фосфатно-буферный раствор, $1\times$, Corning, Cellgro) с получением дуплексов, используя способы, в целом описанные в примере 4 в настоящем документе.

Агенты для РНКи F12, связанные с соответствующим GalNAc-лигандом (т.е. (NAG15) или (NAG18)), комбинировали с фармацевтически приемлемым буфером для подкожных (п/к) инъекций, известным в данной области техники.

Агенты для РНКи F12, связанные с соответствующими GalNAc-лигандами, доставляли посредством п/к инъекции. На 1 день инъецировали п/к в складку кожи на спине между лопатками 200 мкл /20 г массы тела мыши раствора, содержащего либо солевой раствор, либо дозу 3 мг/кг (миллиграммов на килограмм – mpk) одного из двух агентов для РНКи F12 (AD02803 или AD02807) в буферном солевом растворе. Использовали по три (3) мыши дикого типа на группу лечения. Как показано выше, AD02803 включает (NAG15), присвязанный к 3'-концу смысловой цепи, тогда как AD 2807 включает (NAG18), присвязанный к 5'-концу смысловой цепи.

25

Образцы сыворотки от получавших лечение мышей брали на 8, 15, 22 и 29 дни для мониторинга нокдауна. Нокдаун измеряли путем количественного определения уровней циркулирующего белка F12 мыши (mF12) в сыворотке с применением собственного анализа на mF12, разработанного на основе alphaLISA® (Perkin Elmer).

5 Экспрессию, соответствующую специфической дате взятия крови, нормировали по соответствующему той же дате среднему значению для получавшей солевой раствор контрольной группы.

На фиг. 12 представлены результаты указанного исследования. При минимальных значениях (22 день) для AD02803 наблюдалось приблизительно 70% снижение уровней циркулирующего F12, тогда как для AD02807 наблюдалось более чем 80% снижение. Указанные данные также указывают на различие продолжительности эффекта нокдауна, так как на 29 день у получавших лечение AD02803 мышей наблюдалось более быстрое возвращение к базовым уровням по сравнению с получавшими лечение
15 AD2807 мышами.

Указанные данные подтверждают, что связывание GalNAc-лиганда на 5'-конце смысловой цепи превосходит связывание на 3'-конце смысловой цепи.

Пример 7. Дополнительное сравнение 3' и 5' сайтов прикрепления смысловой цепи для нацеливающих GalNAc-лигандов с применением ингибирующих экспрессию F12 олигомерных соединений у мышей дикого типа.
20

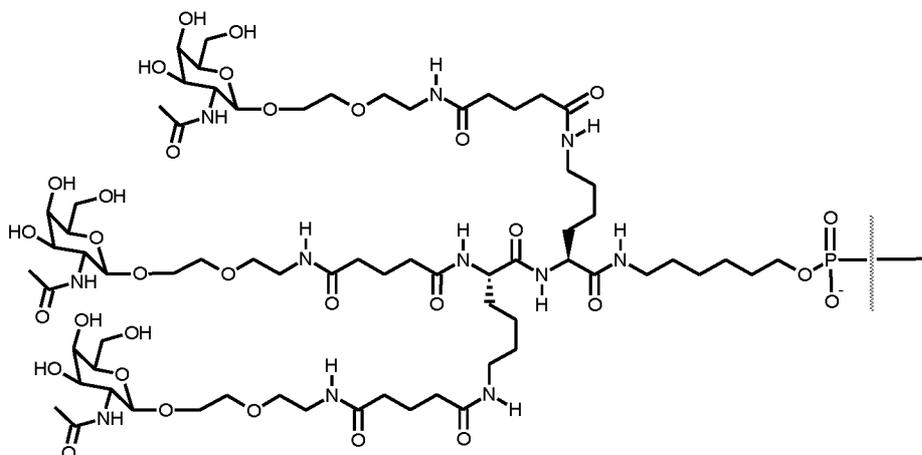
Для дополнительной оценки сайта прикрепления GalNAc-лигандов на 3'- и 5'-концах смысловой цепи двунитевых ингибирующих экспрессию олигомерных соединений (двунитевых агентов для РНКи), получали композиции, направленные на ген F12, с последовательностями, представленными ниже в таблице 3:

Таблица 3. Ингибирующие экспрессию F12 олигомерные соединения (дуплексы агентов для РНКи) из примера 7.

Идентификатор дуплекса: AD02815	5' → 3'	SEQ ID NO:
Последовательность смысловой цепи: (AM03640-SS)	(NAG20)uauaugscsccaagaAfaGfugaaagacc(invda)	6
Последовательность антисмысловой цепи: (AM03157-AS)	usGfsgucuuUfcAfcuuUfcuugggcsuscuAu	7
Идентификатор дуплекса: AD02816	5' → 3'	SEQ ID NO:
Последовательность смысловой цепи: (AM03641-SS)	uAuAugscsccaagaAfaGfugaaagacca(NAG20)	8
Последовательность антисмысловой цепи: (AM03157-AS)	usGfsgucuuUfcAfcuuUfcuugggcsuscuAu	9

В таблице 3 выше использованы следующие обозначения:

5 (NAG20)=



(NAG20) имеет химическую структуру, которая в настоящем документе представлена Структурой 4.

5 Каждую цепь агентов для РНКи F12 синтезировали в соответствии с фосфорамидитной технологией на твердой фазе, применяемой при синтезе олигонуклеотидов, используя либо MerMade96E® (Bioautomation), либо MerMade12® (Bioautomation); комплементарные цепи смешивали путем комбинирования эквимольных растворов РНК (смысловой и антисмысловой) в $0,2 \times \Phi\text{БР}$ (фосфатно-буферный раствор, $1\times$, Corning, Cellgro) с получением дуплексов, используя способы, в целом описанные в
10 примере 4 в настоящем документе.

Агенты для РНКи F12, связанные с соответствующим GalNAc-лигандом (т.е. (NAG20)), комбинировали с фармацевтически приемлемым буфером для подкожных (п/к) инъекций, известным в данной области техники.

15

Агенты для РНКи F12, связанные с соответствующим GalNAc-лигандом, доставляли посредством п/к инъекции. На 1 день инъецировали п/к в складку кожи на спине между лопатками по 200 мкл / 20 г массы тела мыши раствора, содержащего либо солевой раствор, либо дозу 3 мг/кг (mpk) одного из двух агентов для РНКи (AD02815 или
20 AD02816) в буферном солевом растворе. Использовали по три (3) мыши дикого типа на группу лечения. Как показано выше в таблице 3, AD02815 включает (NAG20), присвязанный к 5'-концу смысловой цепи, тогда как AD02816 включает (NAG20), присвязанный к 3'-концу смысловой цепи.

25 Образцы сыворотки от получавших лечение мышей брали на 8, 15, 22 и 29 дни для мониторинга нокдауна. Нокдаун измеряли путем количественного определения уровней циркулирующего белка F12 мыши (mF12) в сыворотке с применением собственного анализа на mF12, разработанного на основе alphaLISA® (Perkin Elmer). Экспрессию, соответствующую специфической дате взятия крови, нормировали по
30 соответствующему той же дате среднему значению для получавшей солевой раствор контрольной группы.

На фиг. 13 представлены результаты указанного эксперимента. При минимальных значениях (22 день) для AD02816 наблюдалось приблизительно 60% снижение уровней циркулирующего белка F12, тогда как для AD02815 наблюдалось 79% снижение. Указанные данные также указывают на различие продолжительности эффекта нокдауна. На 29 день у получавших лечение AD02816 мышей наблюдался 40% нокдаун, тогда как у получавших лечение AD02815 мышей наблюдался 71% нокдаун относительно уровней для солевого раствора. Указанные данные подтверждают связывание GalNAc-лиганда на 5'-конце смысловой цепи.

10 **Пример 8. Ингибирующие экспрессию LP(a) олигомерные соединения (двунитевые агенты РНКи), связанные с нацеливающими лигандами Структуры 101 у трансгенных (Tg) по Lp(a) мышей.**

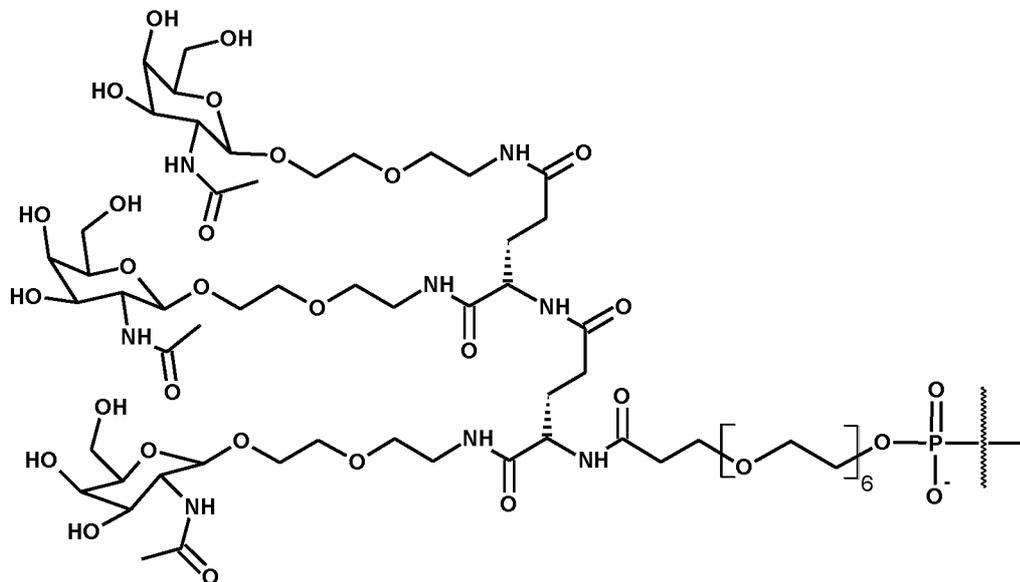
Получали ингибирующие экспрессию LP(a) олигомерные соединения (двунитевые агенты РНКи Lp(a)) с последовательностями, представленными ниже в таблице 5:

15 *Таблица 4. Ингибирующие экспрессию LP(a) олигомерные соединения (дуплексы агентов для РНКи) из примера 8.*

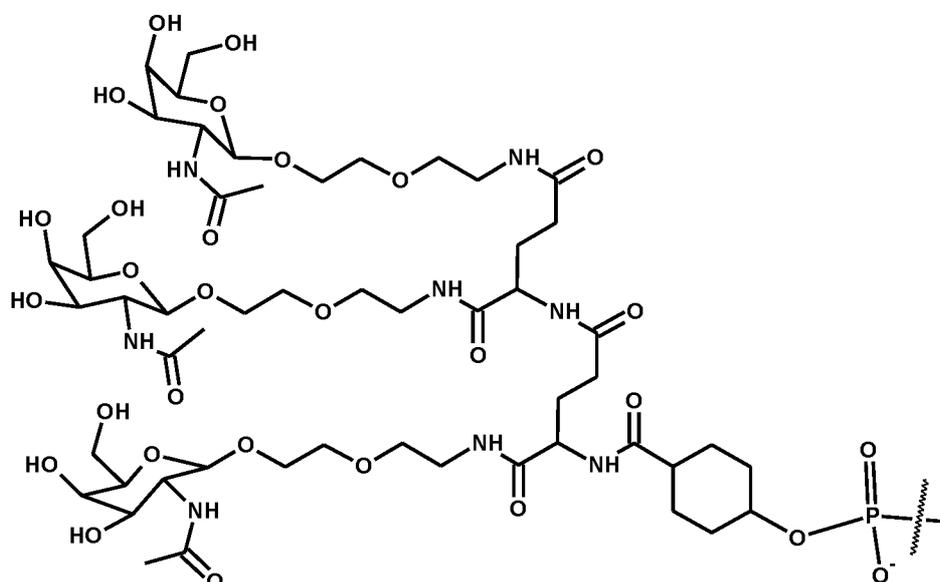
Идентификатор дуплекса: AD03547	5' → 3'	SEQ ID NO:
Последовательность смысловой цепи: (AM04498-SS)	(NAG29)uauauaasuuaucgaGfGfcucauucucsa(invAb)	10
Последовательность антисмысловой цепи: (AM04507-AS)	usGfsasGfaAfuGfaGfccuCfgAfuAfausuAUAUA	11
Идентификатор дуплекса: AD03549	5' → 3'	SEQ ID NO:
Последовательность смысловой цепи: (AM04502-SS)	(NAG25)uauauaasuuaucgaGfGfcucauucucsa(invAb)	12

Последовательность антисмысловой цепи: (AM04507-AS)	usGfsasGfaAfuGfaGfccuCfgAfuAfausuAUAUA	13
--------------------------------------------------------	----------------------------------------	----

В таблице 4 выше использованы следующие обозначения:



(NAG25)=



5 (NAG29)=

(NAG25) имеет химическую структуру, которая в настоящем документе представлена Структурой 101.

10 Каждую цепь агентов для РНКи Lp(a) синтезировали в соответствии с фосфорамидитной технологией на твердой фазе, применяемой при синтезе

олигонуклеотидов, используя либо MerMade96E® (Bioautomation), либо MerMade12® (Bioautomation); комплементарные цепи смешивали путем комбинирования эквимоллярных растворов РНК (смысловой и антисмысловой) в 0,2 × ФБР (фосфатно-буферный раствор, 1×, Corning, Cellgro) с получением дуплексов, используя способы, в
5 целом описанные в примере 4 в настоящем документе.

Для оценки эффективности двунитевых агентов для РНКи с конъюгированными N-ацетил-галактозаминовыми лигандами *in vivo* использовали трансгенных (Tg) по Lp(a) мышей (Frazer KA et al 1995, Nature Genetics 9:424-431). Указанные мыши (здесь и
10 далее в настоящем документе называемые «Lp(a) Tg-мышами») экспрессируют apo(a) человека с YAC, содержащей полный ген *LPA* (кодирующий белок apo(a)) с дополнительными последовательностями как в 5'-, так и в 3'-направлении, а также apoB-100 человека, продуцируя таким образом частицы гуманизированного Lp(a) (Callow MJ et al 1994, PNAS 91:2130-2134).

15
Агенты для РНКи Lp(a), связанные с соответствующими GalNAc-лигандами (т.е. (NAG25) или (NAG29)), комбинировали с фармацевтически приемлемым буфером для подкожных (п/к) инъекций, известным в данной области техники.

20
Агенты для РНКи Lp(a), связанные с соответствующими GalNAc-лигандами (т.е. (NAG25) или (NAG29)) на 5'-конце смысловой цепи, доставляли посредством п/к инъекции. На 1 день инъецировали п/к в складку кожи на спине между лопатками по 200 мкл / 20 г массы тела мыши раствора, содержащего либо солевой раствор, либо дозу 1 мг/кг (mpk) соответствующего агента для РНКи Lp(a) (AD03547 или AD03549) в
25 буферном солевом растворе. Использовали по четыре (4) Lp(a) Tg-мышы на группу лечения.

Образцы сыворотки от получавших лечение мышей брали на -1 (до дозирования), 5, 11, 16, 22, 29 и 36 дни. Нокдаун определяли, рассчитывая уровни циркулирующих частиц
30 Lp(a) в сыворотке. Уровни частиц Lp(a) измеряли на Cobas® Integra 400 (Roche Diagnostics) в соответствии с рекомендациями производителя. Для нормирования уровень Lp(a) для каждого животного в некоторый момент времени делили на уровень экспрессии до дозирования у указанного животного (в данном случае – на уровень для -1 дня) для определения коэффициента экспрессии, «нормированного по -1 дню».

Затем экспрессию в специфический момент времени нормировали по получавшей солевой раствор контрольной группе путем деления «нормированного по -1 дню» коэффициента для индивидуального животного на среднее значение «нормированного по -1 дню» коэффициента для всех мышей в получавшей солевой раствор контрольной
5 группе. Таким образом получали уровень экспрессии в каждый момент времени, нормированный по уровню экспрессии в контрольной группе. Погрешность эксперимента представлена в виде стандартного отклонения.

Результаты показаны на фиг. 14. Для AD03549 (NAG25) наблюдался 71% нокдаун при минимальных значениях (16 день); для AD03547 (NAG29) наблюдался 81% нокдаун
10 при минимальных значениях (11 день). Для обоих триггеров наблюдались аналогичные кривые восстановления после минимальных значений, с менее чем 26% нокдауном на 36 день. Указанные данные подтверждают, что показанные GalNAc-лиганды отличались как сопоставимой начальной активностью нокдауна, так и сопоставимой продолжительностью нокдауна у Lp(a) Tg-мышей при однократном введении дозы 1
15 мг/кг.

Пример 9. Нокдаун Lp(a) у трансгенных (Tg) по Lp(a) мышей после введения ингибирующих экспрессию LP(a) олигомерных соединений (двунитевых агентов для РНКи), связанных с нацеливающим лигандом Структуры 101.

Получали ингибирующие экспрессию LP(a) олигомерные соединения (двунитевые
20 агенты РНКи Lp(a)) с последовательностями, представленными ниже в таблице 5:

Таблица 5. Ингибирующие экспрессию LP(a) олигомерные соединения (дуплексы агентов для РНКи) из примера 9.

Идентификатор дуплекса: AD03272	5' → 3'	SEQ ID NO:
Последовательность смысловой цепи: (AM04138-SS)	(NAG25)uaauasasguuaucgAfGfGfcucauucuc(inv dA)	14
Последовательность антисмысловой цепи: (AM02860-AS)	usGfsaGfaAfuGfaGfccuCfgAfuAfaCfucusuAu	15

В таблице 5 (NAG25) представлен той же структурой, что и показанная в примере 8 выше, и имеет химическую структуру, которая в настоящем документе представлена Структурой 101.

Каждую цепь агентов для РНКи Lp(a) синтезировали в соответствии с фосфорамидитной технологией на твердой фазе, применяемой при синтезе олигонуклеотидов, используя либо MerMade96E® (Bioautomation), либо MerMade12® (Bioautomation); комплементарные цепи смешивали путем комбинирования эквимоллярных растворов РНК (смысловой и антисмысловой) в 0,2 × ФБР (фосфатно-буферный раствор, 1×, Corning, Cellgro) с получением дуплексов, используя способы, в целом описанные в примере 4 в настоящем документе.

Для оценки эффективности двунитевых агентов для РНКи с конъюгированными N-ацетил-галактозаминовыми лигандами *in vivo* использовали Lp(a) Tg-мышей.

Агент для РНКи Lp(a), связанный с нацеливающим лигандом Структуры 101, комбинировали с фармацевтически приемлемым буфером для подкожных (п/к) инъекций, известным в данной области техники.

Агент для РНКи Lp(a), связанный с нацеливающим лигандом на 5'-конце смысловой цепи, доставляли посредством п/к инъекции. На 1 день инъецировали п/к в складку кожи на спине между лопатками по 200 мкл / 20 г массы тела мыши раствора либо солевого раствора, либо дозы 1 мг/кг (mpk) агента для РНКи AD03272 в буферном
5 солевом растворе. Использовали по четыре (4) Lp(a) Tg-мыши на группу лечения.

Образцы сыворотки от получавших лечение мышей брали на -1 (до дозирования), 8, 15, 22, 29, 36 и 43 дни. Нокдаун определяли, рассчитывая уровни циркулирующих частиц Lp(a) в сыворотке. Уровни частиц Lp(a) измеряли на Cobas® Integra 400 (Roche
10 Diagnostics) в соответствии с рекомендациями производителя. Для нормирования уровень Lp(a) для каждого животного в некоторый момент времени делили на уровень экспрессии до дозирования у указанного животного (в данном случае – на уровень для -1 дня) для определения коэффициента экспрессии, «нормированного по -1 дню». Затем экспрессию в специфический момент времени нормировали по получавшей
15 солевой раствор контрольной группе путем деления «нормированного по -1 дню» коэффициента для индивидуального животного на среднее значение «нормированного по -1 дню» коэффициента для всех мышей в получавшей солевой раствор контрольной группе. Таким образом получали уровень экспрессии в каждый момент времени, нормированный по уровню экспрессии в контрольной группе. Погрешность
20 эксперимента представлена в виде стандартного отклонения.

Результаты показаны на фиг. 15. Для AD03272 наблюдался 88% нокдаун при минимальных значениях (15 день) и поддерживался нокдаун 75% на день 29. Указанные данные подтверждают, что нацеливающий лиганд Структуры 1008 может нацеливать нацеленные на LPA агенты РНКи в печень и обеспечивать >85% нокдаун
25 при однократном введении дозы 1 мг/кг у трансгенных мышей.

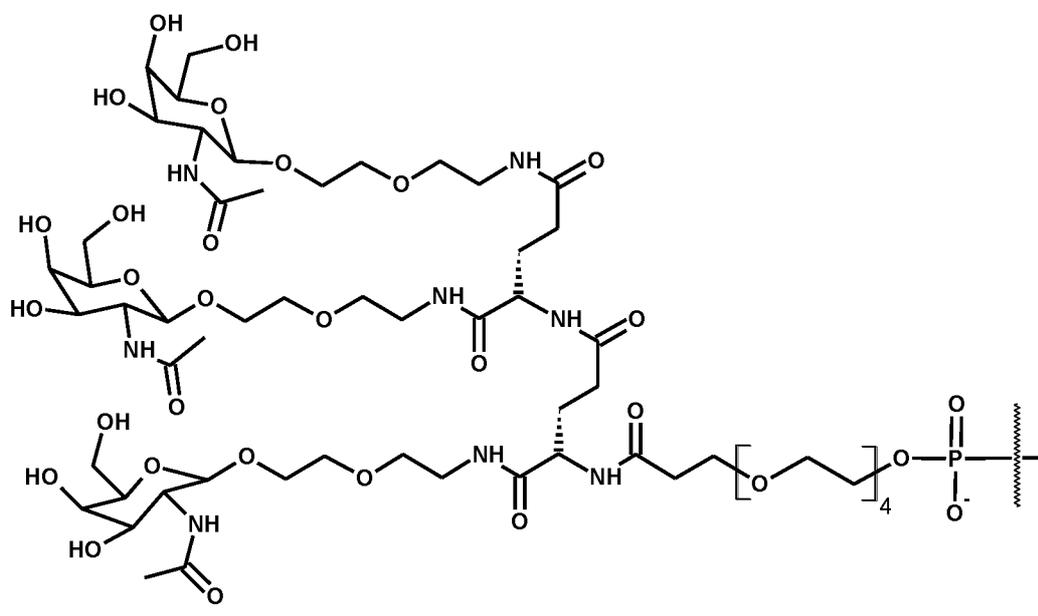
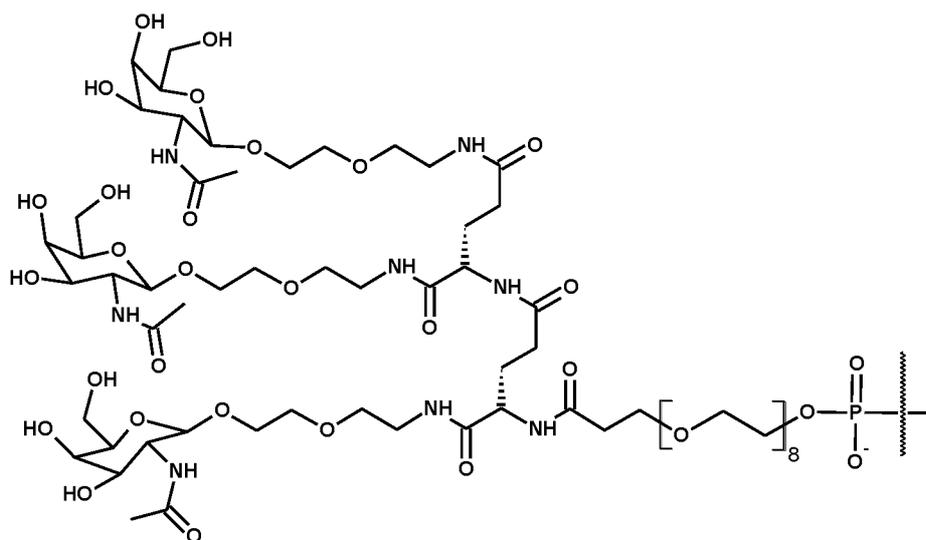
Пример 10. Нокдаун аполипопротеина(a) (apo(a)) у трансгенных (Tg) по apo(a) мышей после введения ингибирующей экспрессию LP(a) олигомерных соединений (двунитевых агентов для РНКи), связанных с нацеливающим лигандом Структуры 101, 102 и 103.

30 Ингибирующие экспрессию LP(a) олигомерные соединения (двунитевые агенты РНКи Lp(a)) получали с последовательностями, представленными ниже в таблице 4:

Таблица 6. Ингибирующие экспрессию LP(a) олигомерные соединения (дуплексы агентов для РНКи) из примера 10.

Идентификатор дуплекса: AD03275	5' → 3'	SEQ ID NO:
Последовательность смысловой цепи: (AM04138-SS)	(NAG25)uauausasguuaucgAfGfGfcucauucuc(inv dA)	16
Последовательность антисмысловой цепи: (AM04133-AS)	usGfsagaauGfaGfccuCfgauaacucsusuau	17
Идентификатор дуплекса: AD03341	5' → 3'	SEQ ID NO:
Последовательность смысловой цепи: (AM04233-SS)	(NAG26)uauausasguuaucgAfGfGfcucauucucuM(inv dA)	18
Последовательность антисмысловой цепи: (AM04133-AS)	usGfsagaauGfaGfccuCfgauaacucsusuau	19
Идентификатор дуплекса: AD03421	5' → 3'	SEQ ID NO:
Последовательность смысловой цепи: (AM04372-SS)	(NAG27)uauausasguuaucgAfGfGfcucauucucuM(inv dA)	20
Последовательность антисмысловой цепи: (AM04133-AS)	usGfsagaauGfaGfccuCfgauaacucsusuau	21

В таблице 6 выше использованы следующие обозначения:



- 5 Кроме того, (NAG25) представлен той же структурой, что и показанная в примере 8 выше, и имеет химическую структуру, которая в настоящем документе представлена Структурой 101. (NAG26) имеет химическую структуру, которая в настоящем документе представлена Структурой 102. (NAG27) имеет химическую структуру, которая в настоящем документе представлена Структурой 103. Как показано выше в
- 10 таблице 7, за исключением выбора разных нацеливающих лигандов указанные композиции идентичны.

Каждую цепь агентов для РНКи Lp(a) синтезировали в соответствии с фосфорамидитной технологией на твердой фазе, применяемой при синтезе

олигонуклеотидов, используя либо MerMade96E® (Bioautomation), либо MerMade12® (Bioautomation); комплементарные цепи смешивали путем комбинирования эквимоллярных растворов РНК (смысловой и антисмысловой) в $0,2 \times \text{ФБР}$ (фосфатно-буферный раствор, $1\times$, Corning, Cellgro) с получением дуплексов, используя способы, в
5 целом описанные в примере 10 в настоящем документе.

Для оценки эффективности двунитевых агентов для РНКи с конъюгированными N-ацетил-галактозаминовыми лигандами *in vivo* использовали трансгенных (Tg) по аро(a) мышей. Аро(a) Tg-мыши (Frazer KA et al 1995, Nature Genetics 9:424-431) (здесь и далее в настоящем документе называемые «аро(a) Tg-мышами») экспрессируют аро(a)
10 человека с YAC, содержащей полный ген *LPA* (кодирующий белок аро(a)), с дополнительными последовательностями как в 5'-, так и в 3'-направлении.

Агенты для РНКи Lp(a), связанные с соответствующими GalNAc-лигандами (т.е. (NAG25), (NAG26) или (NAG27)), комбинировали с фармацевтически приемлемым
15 буфером для подкожных (п/к) инъекций, известным в данной области техники.

Агенты для РНКи Lp(a), связанные с соответствующими GalNAc-лигандами (т.е. (NAG25), (NAG26) или (NAG27)) на 5'-конце смысловой цепи, доставляли
20 посредством п/к инъекции. На 1 день инъекцировали п/к в складку кожи на спине между лопатками по 200 мкл / 20 г массы тела мыши раствора, содержащего либо солевой раствор, либо дозу 1 мг/кг (mpk) соответствующего агента для РНКи (AD03275, AD03341 или AD03421) в буферном солевом растворе. Использовали по три (3) аро(a) Tg-мышы на группу лечения.

25 Образцы сыворотки от получавших лечение мышей брали на -1 (до дозирования), 8, 15, 22, 29, 36 и 43 дни. Нокдаун определяли путем мониторинга уровней циркулирующего белка аро(a) в сыворотке с применением ИФА ELISA на аро(a) (Abscam). Для нормирования уровень аро(a) для каждого животного в некоторый момент времени делили на уровень экспрессии до лечения у указанного животного (в данном случае –
30 на уровень для -1 дня) для определения коэффициента экспрессии, «нормированного по -1 дню». Затем экспрессию в специфический момент времени нормировали по получавшей солевой раствор контрольной группе путем деления «нормированного по -1 дню» коэффициента для индивидуального животного на среднее значение

«нормированного по -1 дню» коэффициента для всех мышей в получавшей солевой раствор контрольной группе. Таким образом получали уровень экспрессии в каждый момент времени, нормированный по уровню экспрессии в контрольной группе. Погрешность эксперимента представлена в виде стандартной погрешности среднего.

5

Результаты показаны на фиг. 16. Для агента для РНКи Lp(a) AD03275, содержащего нацеливающий лиганд Структуры 101 (NAG25), наблюдался 82% нокдаун при минимальных значениях (22 день) и поддерживался 72% нокдаун на 29 день. Для агента для РНКи Lp(a) AD03341, содержащего нацеливающий лиганд Структуры 102 (NAG26), наблюдался 87% нокдаун при минимальных значениях (15 день), однако степень нокдауна на 29 день составляла 45%, что указывает на ускоренное возвращение к уровням аро(a) до дозирования. Для агента для РНКи Lp(a) AD03421, содержащего нацеливающий лиганд Структуры 103 (NAG27), наблюдался 70% нокдаун при минимальных значениях (15 день); степень нокдауна на 29 день составляла 50%. Указанные данные подтверждают, что все структуры: Структура 101 (NAG25), Структура 102 (NAG26) и Структура 103 (NAG27), изначально демонстрируют аналогичную активность в отношении нокдауна. Однако указанные данные также показывают, что AD03275 (Структура 101 (NAG25)) обеспечивает превосходящие продолжительность и поддержание нокдауна (72% нокдаун на 29 день) по сравнению со Структурой 102 (NAG26) и Структурой 103 (NAG27).

10
15
20

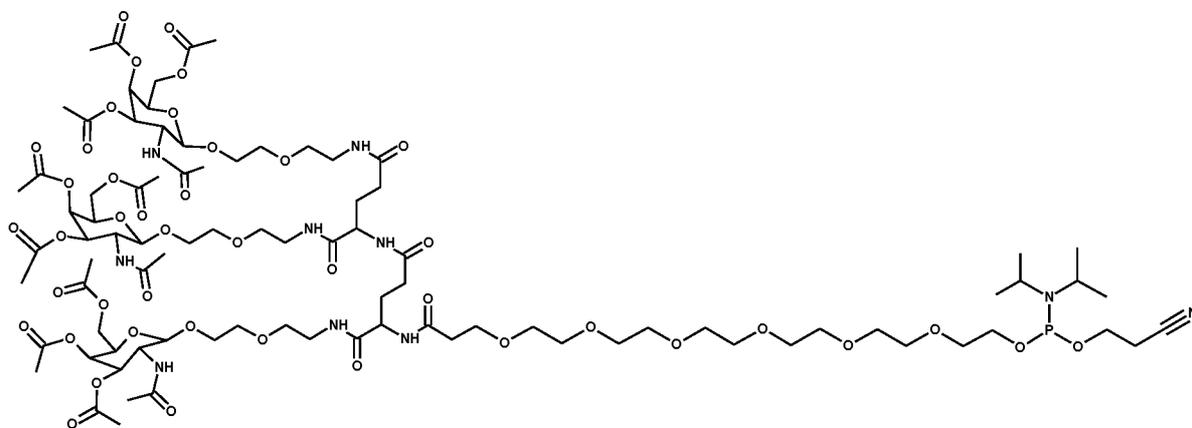
Пример 11. Ингибирующие экспрессию LP(a) олигомерные соединения (двунитевые агенты РНКи), связанные с нацеливающим лигандом Структуры 101, у яванских макаков.

25 Получали пять разных агентов для РНКи LPA, связанных с нацеливающим лигандом, представленным структурой 101, для оценки их эффективности у приматов – яванских макаков (*Macaca fascicularis*): AD03460, AD03536, AD03851, AD03853 и AD04110.

30 Каждую цепь агентов для РНКи Lp(a) синтезировали в соответствии с фосфорамидитной технологией на твердой фазе, применяемой при синтезе олигонуклеотидов, используя либо MerMade96E® (Bioautomation), либо MerMade12® (Bioautomation); комплементарные цепи смешивали путем комбинирования эквимоллярных растворов РНК (смысловой и антисмысловой) в $0,2 \times$ ФБР (фосфатно-

буферный раствор, 1×, Corning, Cellgro) с получением дуплексов, используя способы, в целом описанные в примере 4 в настоящем документе.

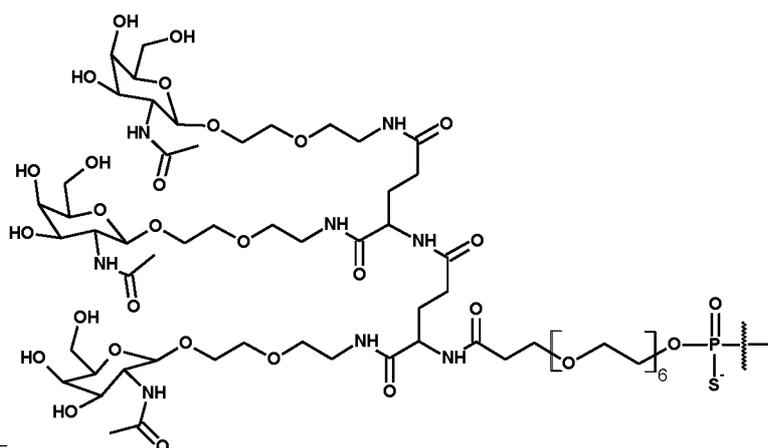
5 Нацеливающие лиганды для всех пяти (5) агентов для РНКи Lp(a) добавляли к 5'-концу смысловой цепи с применением ненуклеозидного фосфорамидитного синтеза, в целом описанного в настоящем документе и известного в данной области техники. Нацеливающий лиганд для каждого из агентов для РНКи Lp(a) соединяли с 5'-концом соответствующего агента для РНКи с применением следующего фосфорамидитного соединения:



10 (Структура 101d).

AD03460 и AD03536 включали нацеливающий лиганд (NAG25), конъюгированный с 5'-концом смысловой цепи соответствующего агента для РНКи. (NAG25) имел ту же
15 структуру, что и показанная в примере 8 выше.

AD03851, AD03853 и AD04110 содержали нацеливающий лиганд (NAG25)s конъюгированный с 5'-концом смысловой цепи соответствующего агента для РНКи.



Образцы крови собирали и анализировали на уровни липопротеина(а) на 8 и 15 дни. уровни Lp(a) нормировали по среднему для трех значений до дозирования.

5 Нормированные уровни Lp(a) приведены в таблице ниже:

	Нормированный Lp(a), 8 день	Нормированный Lp(a), 15 день
Солевой раствор	1,01 ±0,06	1,15 ±0,07
AD03460	0,68 ±0,12	0,40 ±0,13
AD03536	0,54 ±0,07	0,21 ±0,06
AD03851	0,41 ±0,08	0,18 ±0,08
AD03853	0,50 ±0,23	0,27 ±0,17
AD04110	0,59 ±0,13	0,43 ±0,10

10 Указанные данные показывают, что при введении доз 2 мг/кг (мрк) нескольких разных агентов для РНКи Lp(a), конъюгированных с одной структурой нацеливающего лиганда Структуры 101, представленной в настоящем документе, у яванских макаков достигался значимый нокдаун.

15 **Пример 12: Ингибирующие экспрессию F12 олигомерные соединения (двунитевые агенты РНКи), связанные с нацеливающими лигандами Структуры 101, у яванских макаков.**

Получали ингибирующие экспрессию F12 олигомерные соединения (двунитевые агенты РНКи F12) с последовательностями, представленными ниже в таблице 7:

Таблица 7. Ингибирующие экспрессию F12 олигомерные соединения (дуплексы агентов для РНКи) из примера 12.

Идентификатор дуплекса: AD03635	5' → 3'	SEQ ID NO:
Последовательность смысловой цепи: (AM04130-SS)	(NAG25)uauaugscsccaagaAfaGfugaaagacc(inv dA)	22
Последовательность антисмысловой цепи: (AM03157-AS)	usGfsgucuuUfcAfcuuUfcuugggcsuscuAu	23

5

В таблице 7 выше (NAG25) соответствует той же структуре, что и показанная в примере 8 выше, и представлен Структурой 101 в настоящем документе.

10 Каждую цепь агентов для РНКи Lp(a) синтезировали в соответствии с фосфорамидитной технологией на твердой фазе, применяемой при синтезе олигонуклеотидов, используя либо MerMade96E® (Bioautomation), либо MerMade12® (Bioautomation); комплементарные цепи смешивали путем комбинирования эквимольных растворов РНК (смысловой и антисмысловой) в 0,2 × ФБР (фосфатно-буферный раствор, 1×, Corning, Cellgro) с получением дуплексов, используя способы, в
15 целом описанные в примере 4 в настоящем документе.

Получали агент РНКи F12, конъюгированный с нацеливающим лигандом на 5'-конце смысловой цепи, и комбинировали с фармацевтически приемлемым буфером для подкожных (п/к) инъекций, известным в данной области техники.

20

На 1 день приматам – яванским макакам (*Macaca fascicularis*) инъецировали подкожно 3 мг/кг AD03635. Дозы вводили трем (3) обезьянам на группу лечения.

- Образцы сыворотки от получавших лечение яванских макаков брали на -7 и 1 день (до дозирования); и на 8, 15 и 22 дни для мониторинга нокдауна. Нокдаун измеряли путем количественного определения уровней циркулирующего белка F12 яванского макака (сF12) уровни в сыворотке с применением набора для ИФА ELISA на F12 человека (Molecular Innovations). Уровни сF12 для каждого животного в соответствующий момент времени делили на уровень экспрессии у указанного животного до лечения (среднее значение для -7 дня и 1 дня) для определения коэффициента экспрессии, «нормированного по уровню до дозирования». Погрешность эксперимента представлена в виде стандартного отклонения.
- 10 На фиг. 17 показаны результаты. Наблюдался нокдаун при применении у яванских макаков агента для РНКи F12, связанного с (NAG25) (Структура 101 в настоящем документе).

- Пример 13: Ингибирующие экспрессию альфа-1-антитрипсина олигомерные соединения (двунитевые агенты РНКи), связанные с нацеливающими лигандами**
- 15 **Структуры 101 у трансгенных мышей PiZ.**
- Для оценки *in vivo* агентов для РНКи, направленных на ген альфа-1 антитрипсина (ААТ), использовали модель на трансгенных мышах PiZ (мыши PiZ). Мыши PiZ являются носителями мутантного аллеля ААТ человека PiZ и моделью дефицита альфа-1-антитрипсина (ААТD) человека (Carlson et al., Journal of Clinical Investigation
- 20 1989).

Получали ингибирующие экспрессию ААТ олигомерные соединения (двунитевые агенты РНКи) с последовательностями, представленными ниже в таблице 8:

Таблица 8. Ингибирующие экспрессию ААТ олигомерных соединений (дуплексы агентов для РНКи) из примера 13.

Идентификатор дуплекса: AD04454	5' → 3'	SEQ ID NO:
Последовательность смысловой цепи: (AM05662-SS)	(NAG25)scsgauaucaUfCfAfccaaguuccsa(invAb)	24
Последовательность антисмысловой цепи: (AM05663-AS)	usGfsgAfaCfuugguGfaUfgAfuAfusCfsg	25

В таблице 8 (NAG25)s имеет химическую структуру, показанную в примере 11 выше.

5

Получали агент РНКи ААТ в фармацевтически приемлемом солевом буфере и подкожно (п/к) инъецировали мышам PiZ в складку кожи на спине между лопатками 200 мкл раствора/20 г массы тела мыши для оценки нокдауна генной экспрессии ААТ. Каждая мышь получала одну п/к дозу 5 мг/кг (mpk) AD04454. Дозы агента для РНКи ААТ вводили трем мышам (n = 3).

10

Образцы плазмы собирали и анализировали на уровни белка ААТ (Z-ААТ) на -1, 1 (до дозирования), 8 и 15 дни. Уровни ААТ нормировали по уровням ААТ в плазме на 1 день (до дозирования). Уровни белка измеряли путем количественного определения уровней циркулирующего в плазме Z-ААТ человека с применением набора для ИФА ELISA.

15

Средние нормированные уровни ААТ (Z-ААТ) показаны на фиг. 18. Наблюдался нокдаун при применении агента для РНКи ААТ, связанного с нацеливающим лигандом Структуры 101, представленной в настоящем документе, у трансгенных по PiZ мышей.

20

Пример 14: *Нокдаун F12 после введения ингибирующих экспрессию F12 олигомерных соединений (двунитевых агентов для РНКи), связанных с нацеливающими лигандами Структуры 101, у мышей дикого типа.*

Получали ингибирующие экспрессию F12 олигомерные соединения (двунитевые агенты РНКи F12) с последовательностями, представленными ниже в таблице 9:

Таблица 9. Ингибирующие экспрессию F12 олигомерные соединения (дуплексы агентов для РНКи) из примера 14.

Идентификатор дуплекса: AD03632	5' → 3'	SEQ ID NO:
Последовательность смысловой цепи: (AM04613-SS)	(NAG25)gcgaugscsccaagaAfaGfugaaagacc(inv dA)	26
Последовательность антисмысловой цепи: (AM04048-AS)	usGfsgucuuUfcAfcuuUfcuugggcsasucgc	27

10 В таблице 9 (NAG25) имеет химическую структуру, показанную в примере 8 выше, и представлен Структурой 101 согласно описанию в настоящем документе.

Каждую цепь агентов для РНКи F12 синтезировали в соответствии с фосфорамидитной технологией на твердой фазе, применяемой при синтезе олигонуклеотидов, используя либо MerMade96E® (Bioautomation), либо MerMade12® (Bioautomation);
15 комплементарные цепи смешивали путем комбинирования эквимольных растворов РНК (смысловой и антисмысловой) в 0,2 × ФБР (фосфатно-буферный раствор, 1×, Corning, Cellgro) с получением дуплексов, используя способы, в целом описанные в примере 10 в настоящем документе.

20 Агенты для РНКи F12, конъюгированные с соответствующим нацеливающим GalNAc-лигандом (т.е. (NAG25)), комбинировали с фармацевтически приемлемым буфером для подкожных (п/к) инъекций, известным в данной области техники.

Указанную композицию доставляли посредством п/к инъекции. На 1 день инъецировали п/к в складку кожи на спине между лопатками 200 мкл /20 г массы тела мыши раствора, содержащего либо солевой раствор, либо дозу 3 мг/кг (mpk) AD03632 в буферном солевом растворе. Использовали по три (3) мыши дикого типа на группу лечения. Как показано выше, AD03632 включает структуру (NAG25), присоединенную на 5'-конце смысловой цепи.

Образцы сыворотки от получавших лечение мышей брали на -1 (до дозирования), 8, 15 22, 29 и 36 дни для мониторинга нокдауна. Нокдаун измеряли путем количественного определения уровней циркулирующего белка F12 мыши (mF12) в сыворотке с применением собственного анализа на mF12, разработанного на основе alphaLISA® (Perkin Elmer). Уровни mF12 для каждого животного в соответствующий момент времени делили на уровень экспрессии до лечения у указанного животного для определения коэффициента экспрессии, «нормированного по уровню до дозирования». Затем экспрессию в специфический момент времени нормировали по получавшей солевой раствор контрольной группе путем деления «нормированного по дню до дозирования» коэффициента для индивидуального животного на средний «нормированный по дню до дозирования» коэффициент для всех мышей в получавшей солевой раствор контрольной группе. Таким образом получали уровень экспрессии в каждый момент времени, нормированный по уровню экспрессии в контрольной группе. Погрешность эксперимента представлена в виде стандартного отклонения.

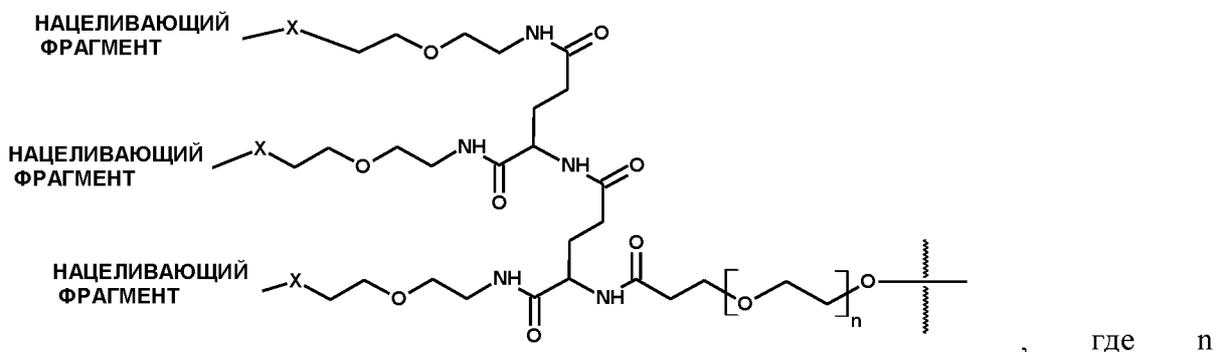
Результаты указанного исследования показаны на фиг. 19. При применении AD03632, который включает нацеливающий лиганд Структуры 101 согласно описанию в настоящем документе, наблюдается значимый нокдаун во все моменты времени.

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ РЕАЛИЗАЦИИ

Следует понимать, что хотя настоящее изобретение было описано вместе с его подробным описанием, описание выше предназначено для иллюстрации, а не для ограничения объема изобретения, которое определяется объемом прилагающейся формулы изобретения. Объем следующей ниже формулы изобретения включает другие аспекты, преимущества и модификации.

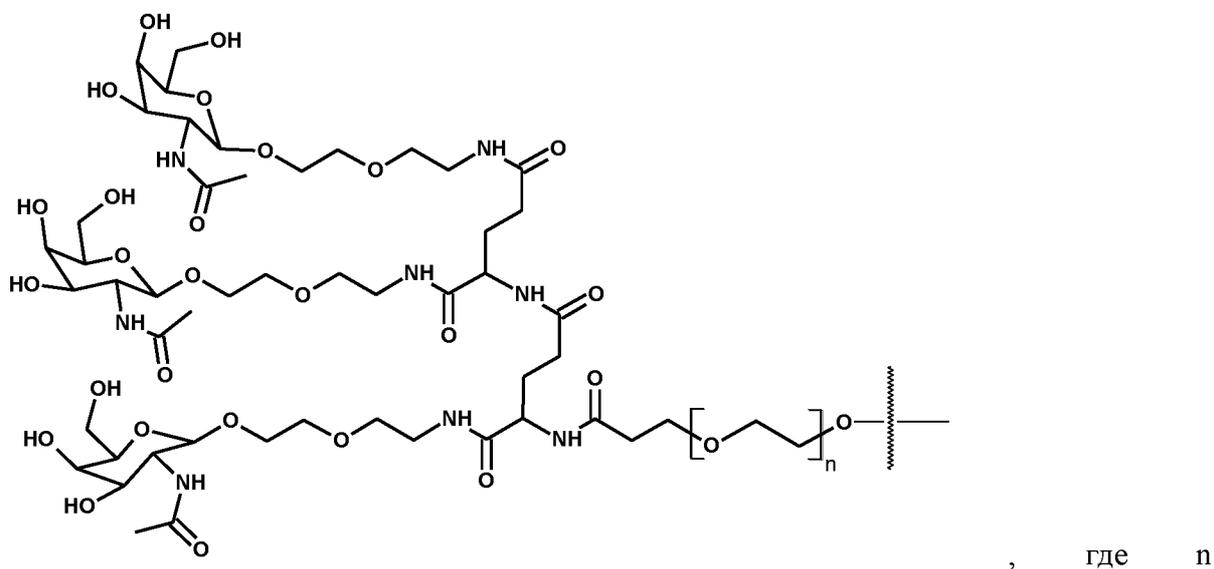
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Нацеливающий лиганд, содержащий структуру Формулы В:



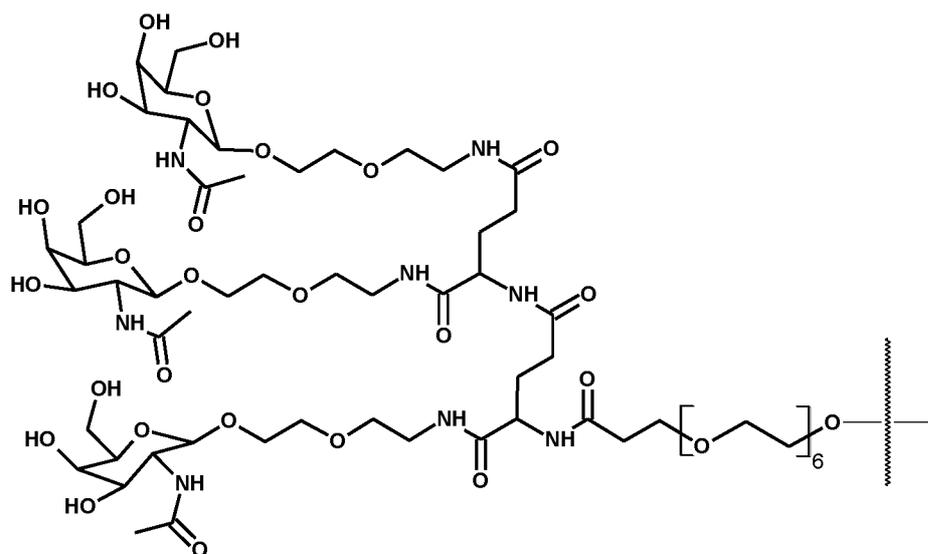
представляет собой целое число от 1 до 20; X представляет собой O, S или NH; и нацеливающий фрагмент выбран из группы, состоящей из: N-ацетилгалактозамина, галактозы, галактозамина, N-формилгалактозамина, N-пропионилгалактозамина, N-н-бутаноилгалактозамина и N-изо-бутаноилгалактозамина.

2. Нацеливающий лиганд по п. 1, содержащий следующую структуру:

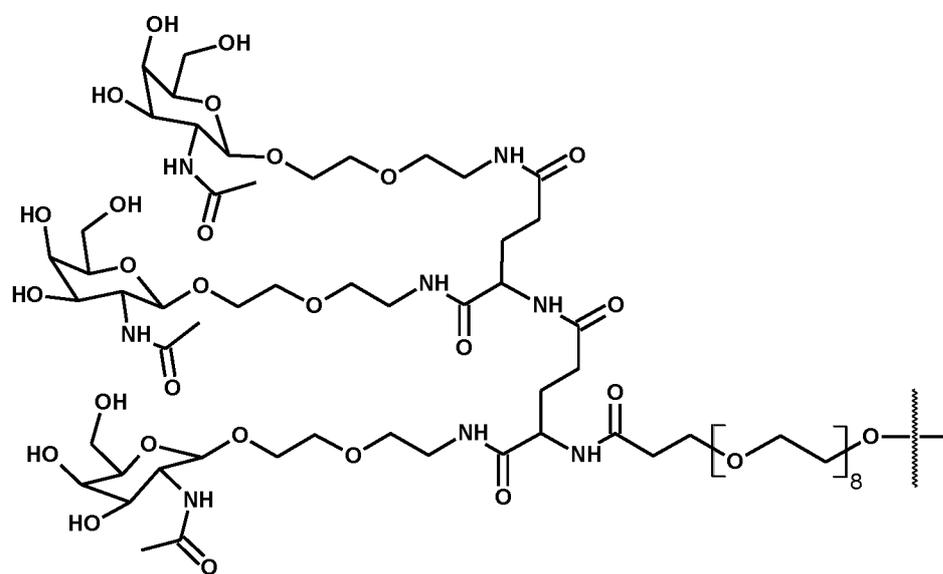


представляет собой целое число от 1 до 20 (Структура 1).

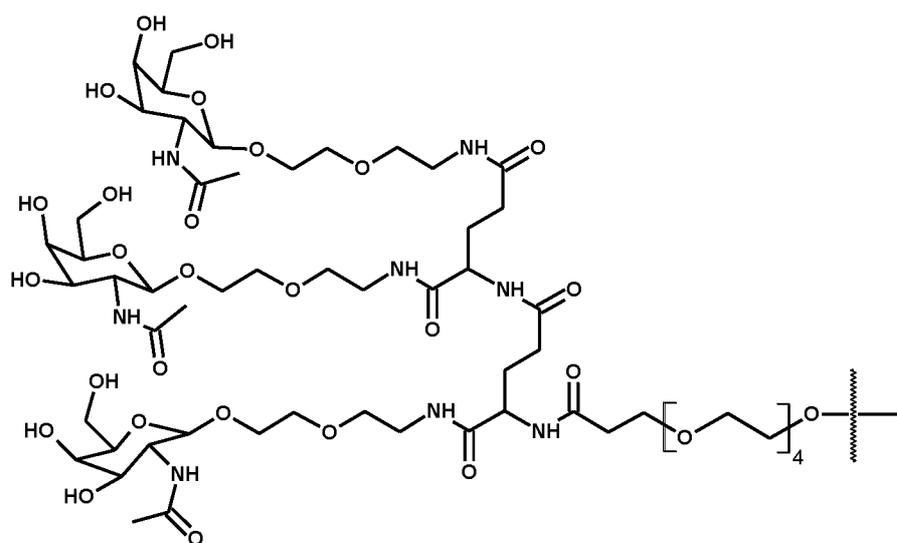
3. Нацеливающий лиганд по п. 1, где нацеливающий лиганд содержит структуру, выбранную из:



(Структура 101);

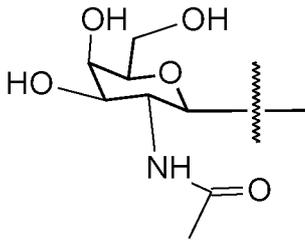


(Структура 102); и



(Структура 103).

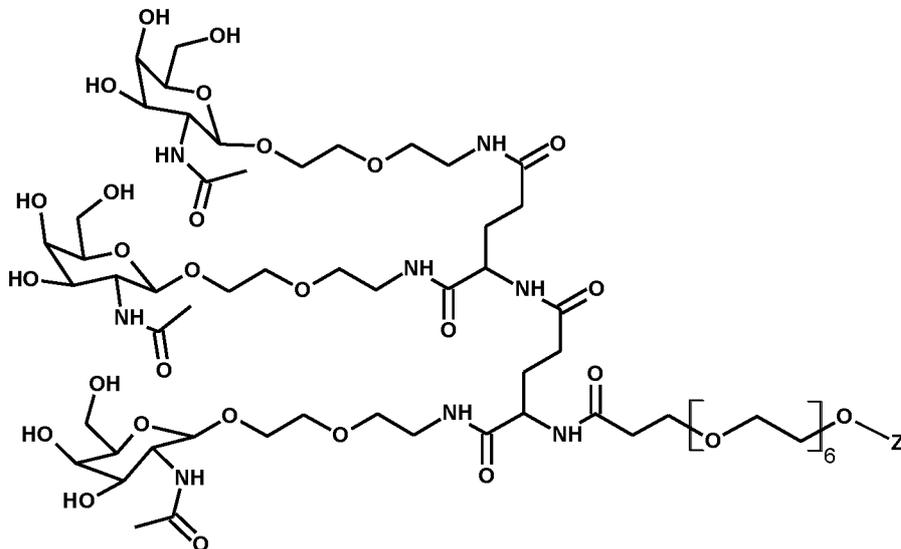
4. Нацеливающий лиганд по п. 1, где нацеливающий фрагмент представляет



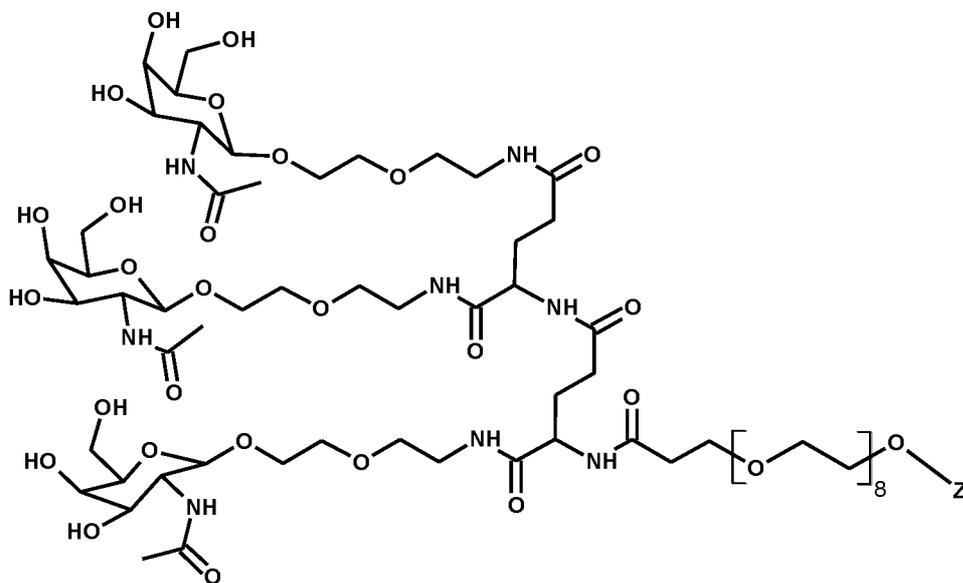
собой

5. Нацеливающий лиганд по п. 1 или п. 4, где n представляет собой 6.
6. Нацеливающий лиганд по п. 1 или п. 4, где n представляет собой 8.
7. Нацеливающий лиганд по любому из пп. 1-6, где нацеливающий лиганд связан с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением.
8. Нацеливающий лиганд по п. 7, где ингибирующее экспрессию олигомерное соединение представляет собой агент РНКи.
9. Нацеливающий лиганд по п. 8, где агент РНКи является двунитевым.
10. Нацеливающий лиганд по п. 9, где агент РНКи содержит один или более модифицированных нуклеотидов.
11. Нацеливающий лиганд по любому из пп. 1-10, дополнительно содержащий агент РНКи, связанный с 3'- или 5'- концом агента РНКи.
12. Нацеливающий лиганд по п. 11, где агент РНКи является двунитевым.
13. Нацеливающий лиганд по п. 12, где двунитевой агент РНКи связан с нацеливающим лигандом на 5'-конце смысловой нити агента РНКи.
14. Нацеливающий лиганд по п. 13, где агент РНКи связан с нацеливающим лигандом через фосфатную группу, фосфоротиоатную группу или фосфонатную группу.

15. Композиция, содержащая нацеливающий лиганд по п. 1, где связывающий лиганд связан с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, где структура нацеливающего лиганда и ингибирующего экспрессию олигомерного соединения представлена структурой, выбранной из группы, состоящей из:

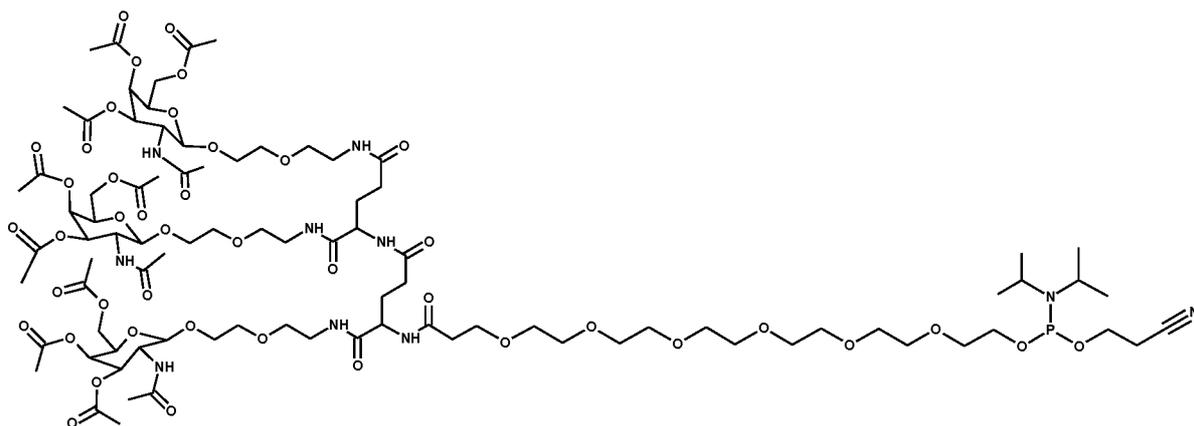


, где Z включает или состоит из ингибирующего экспрессию олигомерного соединения (Структура 101a);

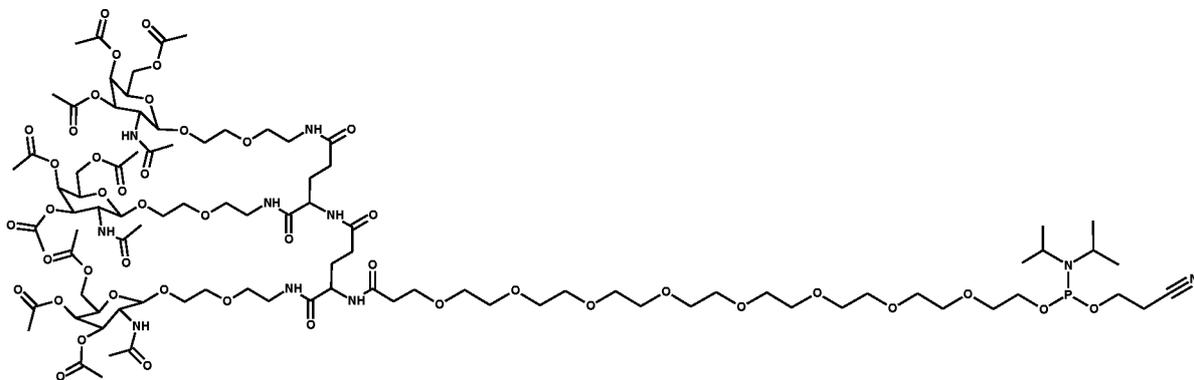


, где Z включает или состоит из ингибирующего экспрессию олигомерного соединения (Структура 102a);

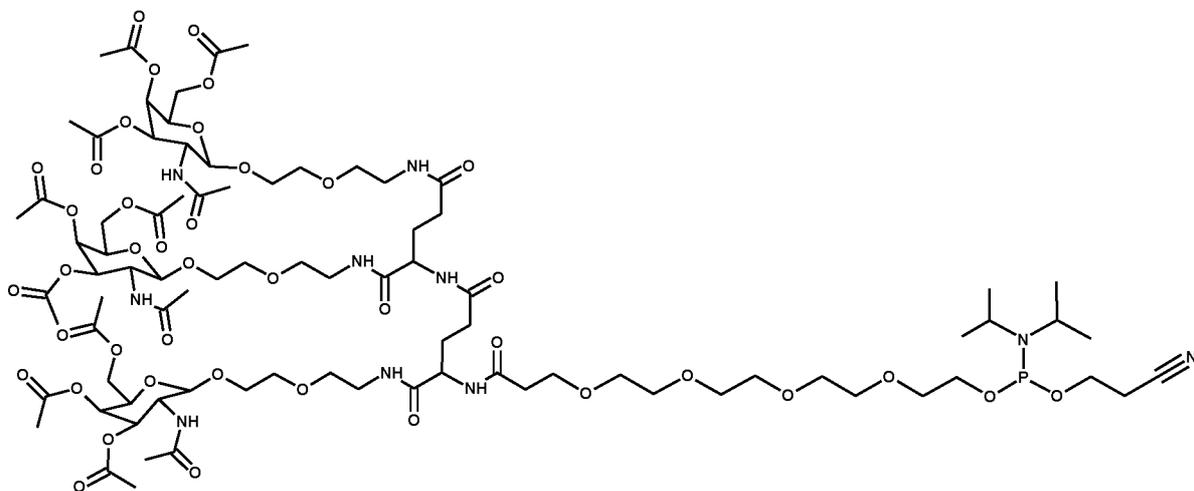
и



(Структура 101d);

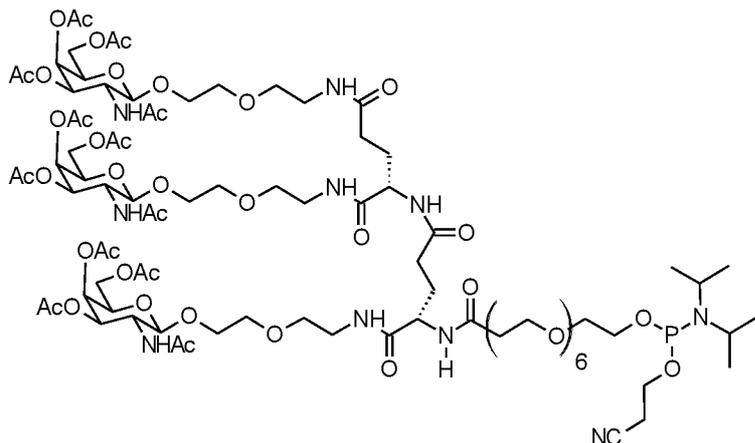


(Структура 102d) и



(Структура 103d).

20. Соединение по п. 19, причем указанное соединение представляет собой:



21. Способ ингибирования экспрессии нуклеиновой кислоты-мишени у субъекта, включающий введение терапевтического количества ингибирующего экспрессию олигомерного соединения, конъюгированного с любым из нацеливающих лигандов по пп. 1 - 14.

22. Способ введения ингибирующего экспрессию олигомерного соединения в клетку млекопитающего, включающий осуществление контакта клетки млекопитающего с нацеливающим лигандом по любому из пп. 1 - 14, связанным с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением.

23. Способ по п. 22, характеризующийся тем, что указанная клетка находится в организме субъекта.

24. Способ по п. 23, характеризующийся тем, что субъект представляет собой человека.

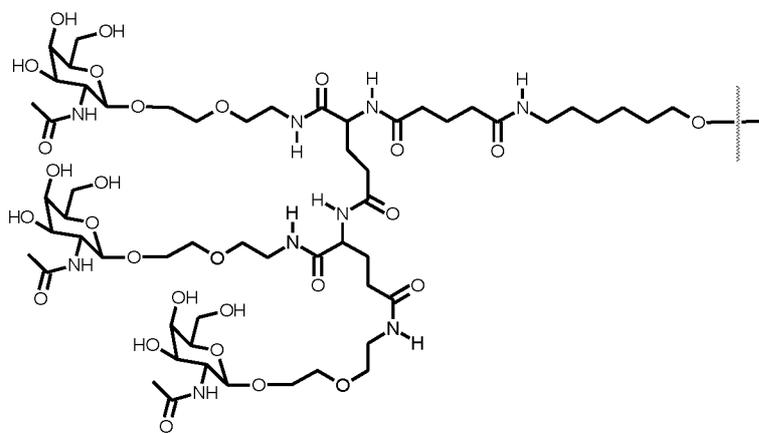
25. Способ по п. 24, характеризующийся тем, что ингибирующее экспрессию олигомерное соединение представляет собой агент РНКи.

26. Способ лечения заболевания или нарушения, при котором было бы полезно введение ингибирующего экспрессию олигомерного соединения, включающий введение терапевтического количества нацеливающего лиганда по любому из пп. 1 - 14, связанного с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, субъекту, нуждающемуся в таком лечении.

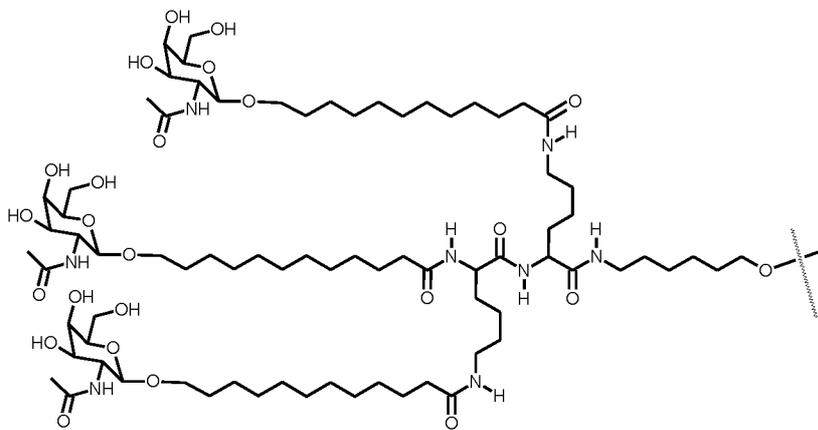
27. Способ по п. 25, характеризующийся тем, что ингибирующее экспрессию олигомерное соединение представляет собой агент РНКи.

28. Способ лечения заболевания или нарушения, при котором было бы полезно введение ингибирующего экспрессию олигомерного соединения, включающий введение терапевтического количества композиции по любому из пп. 15 - 17 субъекту, нуждающемуся в таком лечении.

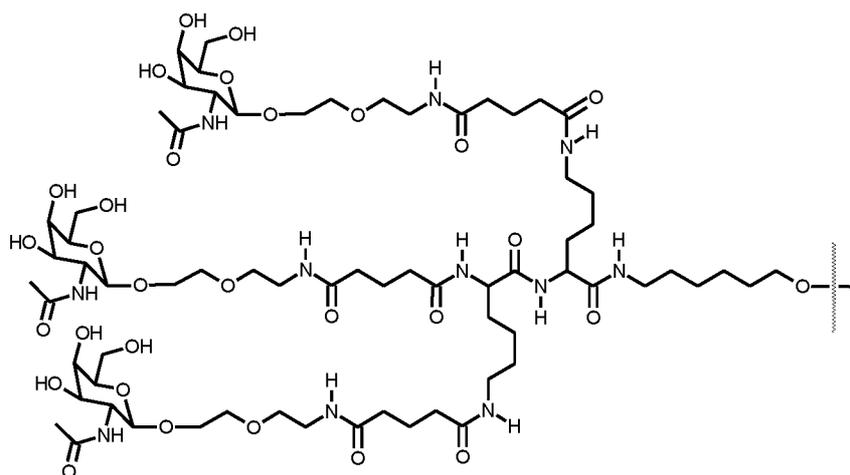
29. Нацеливающий лиганд, содержащий структуру:



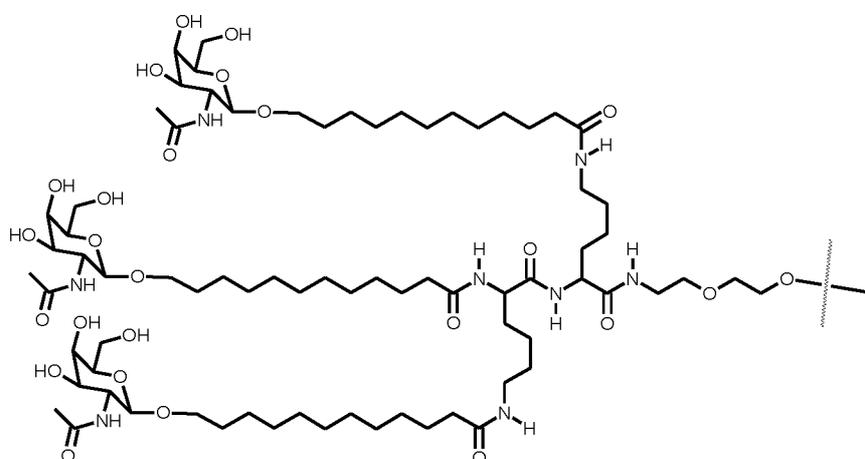
(Структура 2);



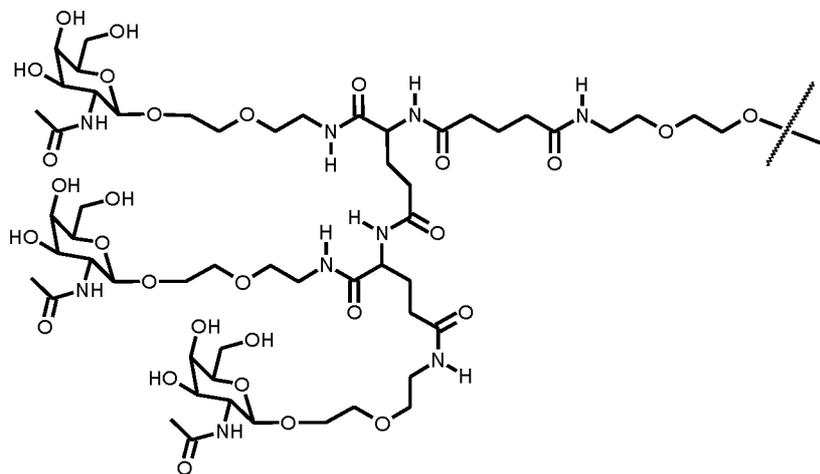
(Структура 3);



(Структура 4);



(Структура 5); или



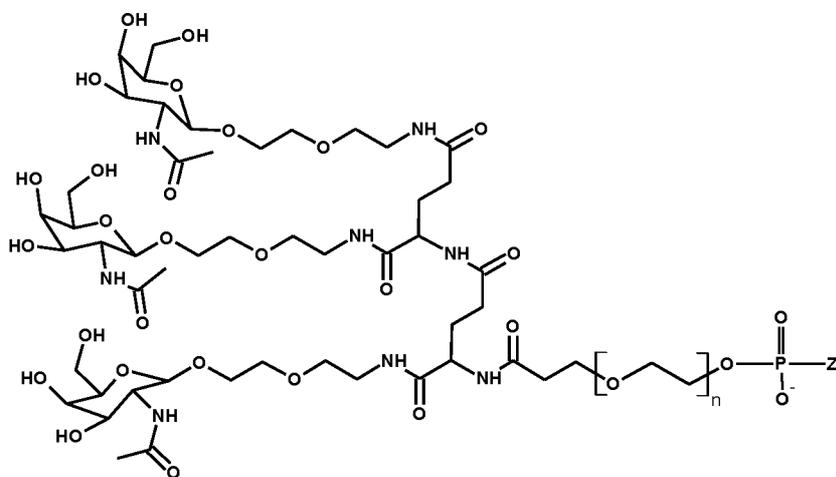
(Структура 6).

30. Нацеливающий лиганд по п. 28, причем указанный нацеливающий лиганд дополнительно связан с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением.

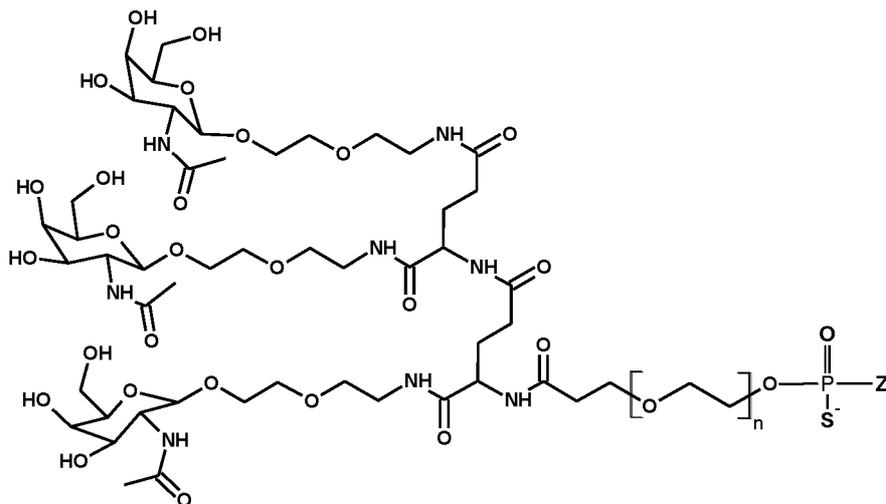
31. Нацеливающий лиганд по любому из пп. 1 - 14 или 29 - 30, связанный с терапевтическим агентом, для применения в качестве лекарственного средства.

32. Нацеливающий лиганд по любому из пп. 1 - 14 или 29 - 30, связанный с терапевтическим агентом, для применения во введении терапевтического агента в клетку млекопитающего, для ингибирования экспрессии нуклеиновой кислоты-мишени у субъекта, или для лечения заболевания или нарушения, при котором было бы полезно введение терапевтического агента.

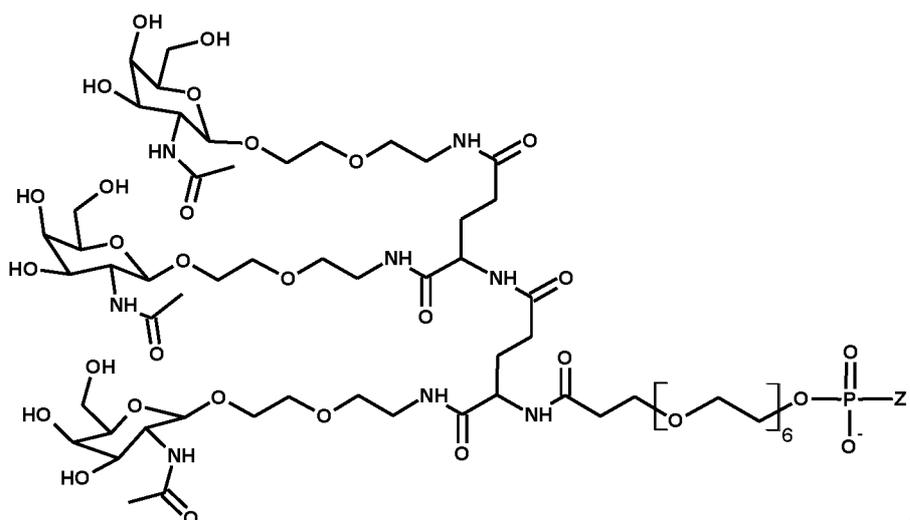
33. Соединение или его фармацевтическая соль, выбранное из группы, состоящей из:



(Структура 1b), где n представляет собой целое число от 1 до 20, и Z содержит ингибирующее экспрессию олигомерное соединение;

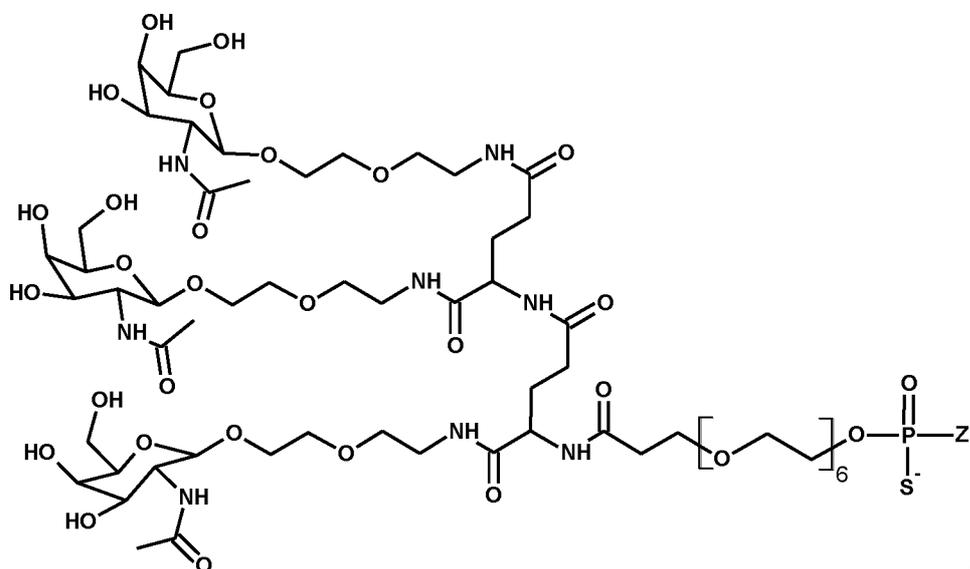


(Структура 1c), где n представляет собой целое число от 1 до 20, и Z содержит ингибирующее экспрессию олигомерное соединение;



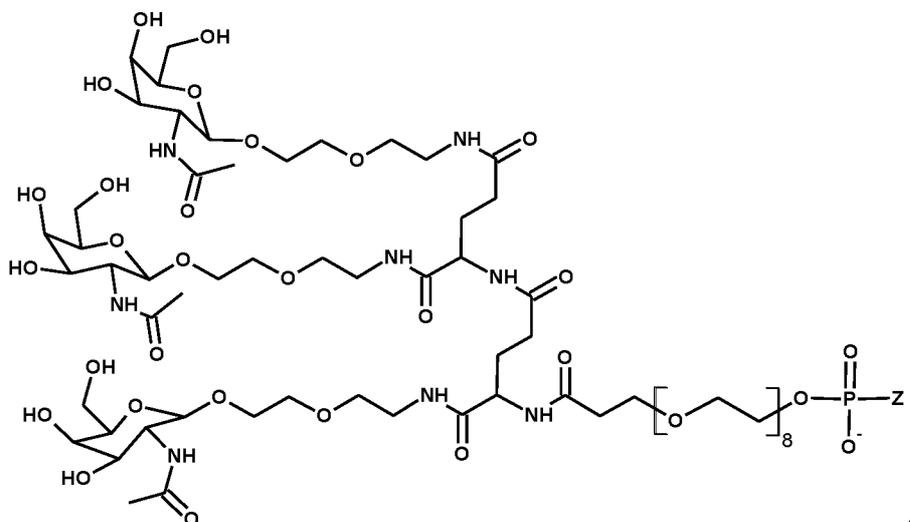
(Структура 101b), где

Z содержит ингибирующее экспрессию олигомерное соединение;



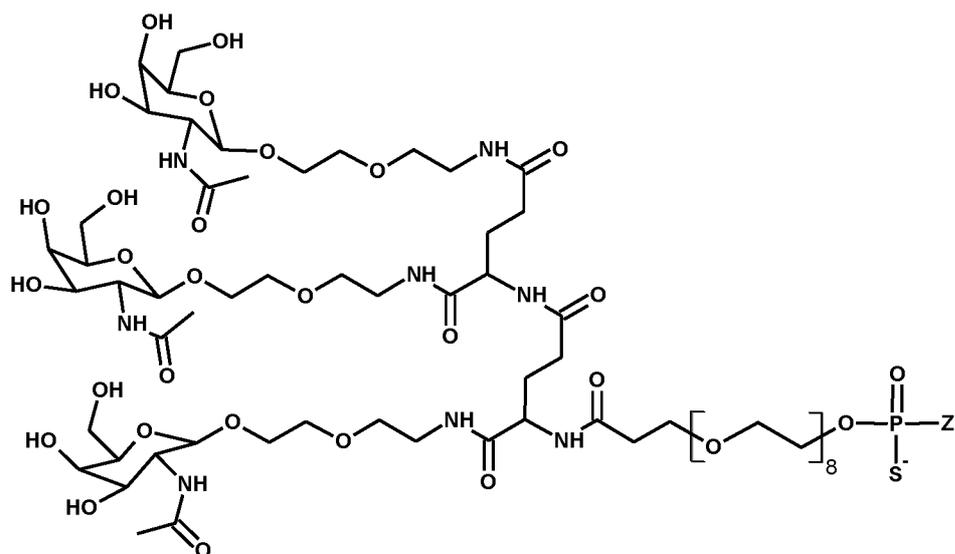
(Структура 101c),

где Z содержит ингибирующее экспрессию олигомерное соединение;



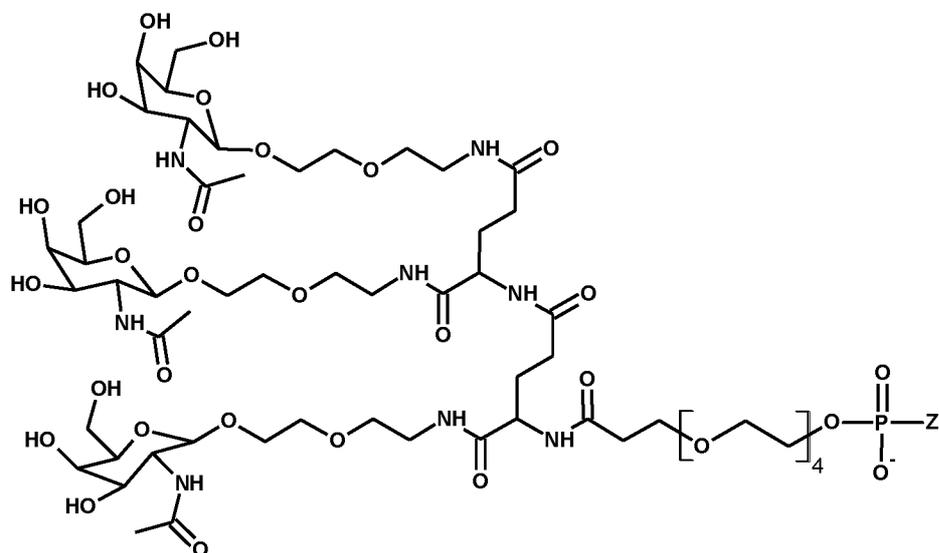
(Структура 102b), где

Z содержит ингибирующее экспрессию олигомерное соединение;



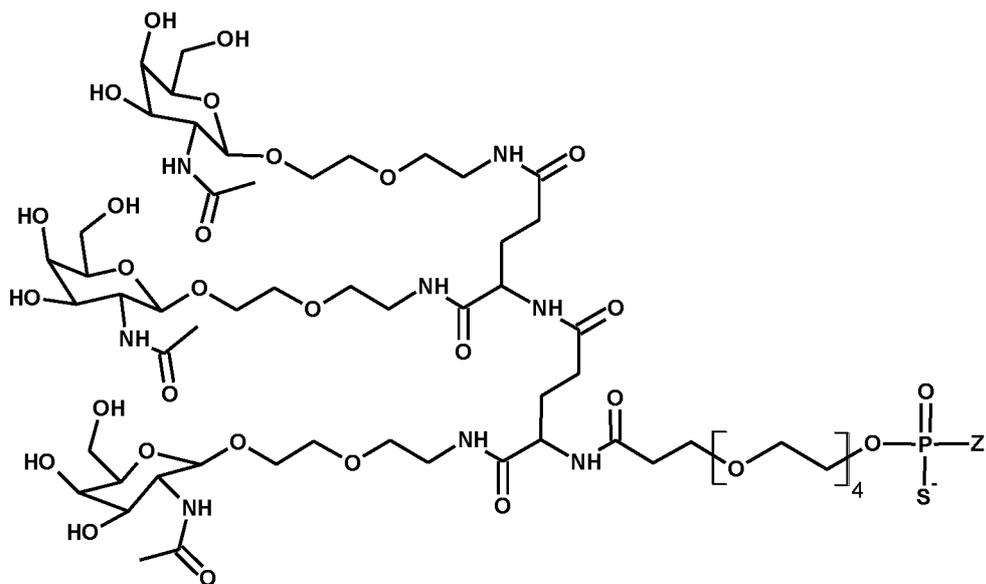
(Структура 102с),

где Z содержит ингибирующее экспрессию олигомерное соединение;



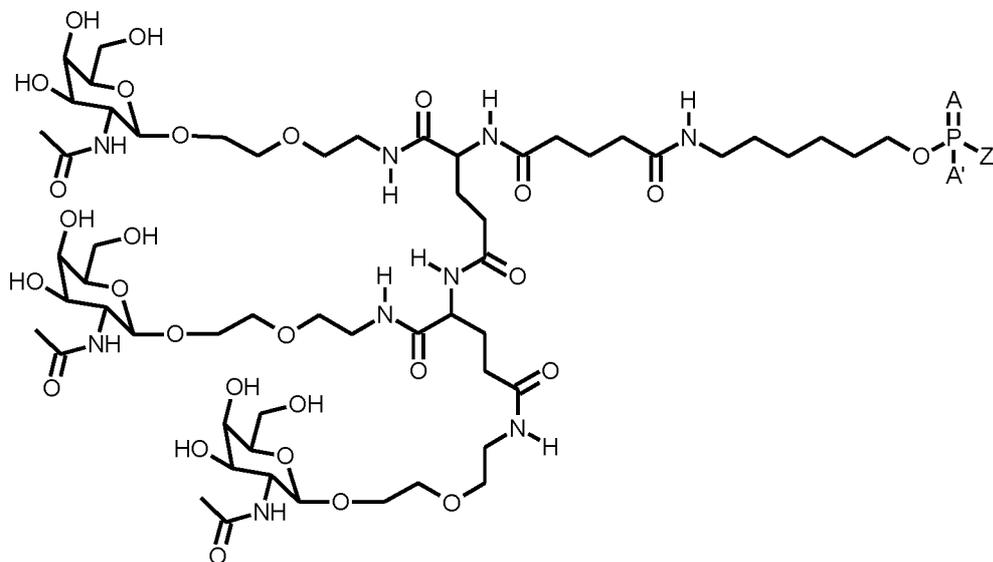
(Структура 103b),

где Z состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; и

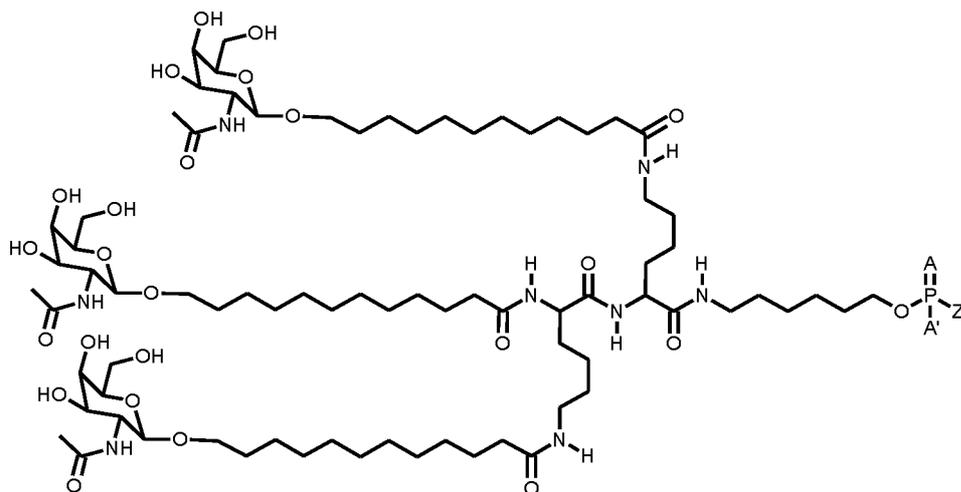


(Структура 103с), где Z состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение.

34. Соединение или его фармацевтическая соль, выбранные из группы, состоящей из:

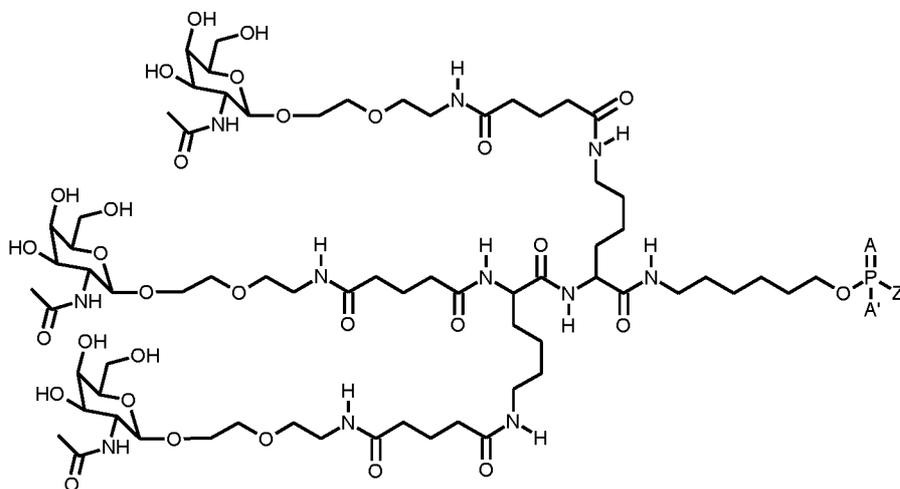


(Структура 2b), где Z содержит ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; A представляет собой O или S; и A' представляет собой O⁻, S⁻ или NH⁻;



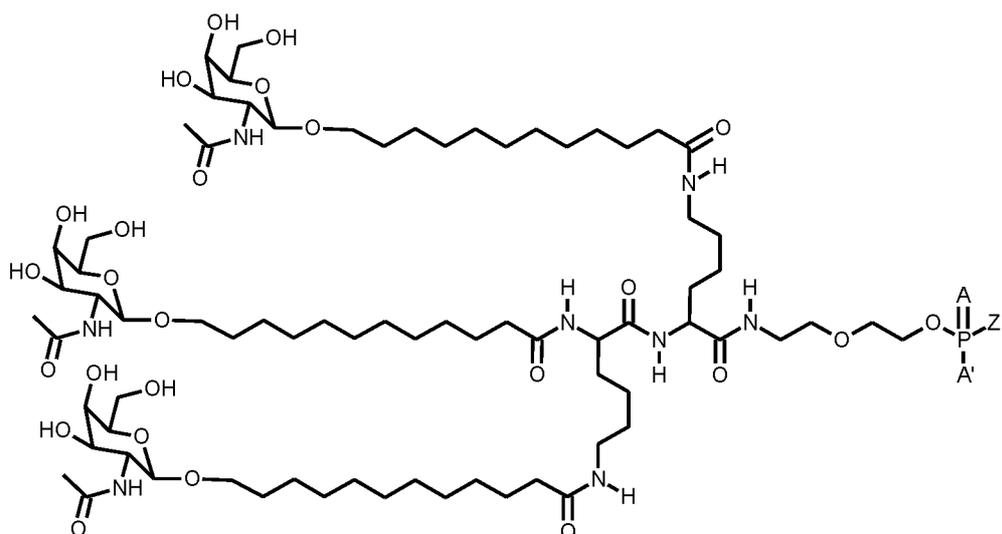
(Структура 3b),

где Z содержит ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; A представляет собой O или S; и A' представляет собой O-, S- или NH⁻;



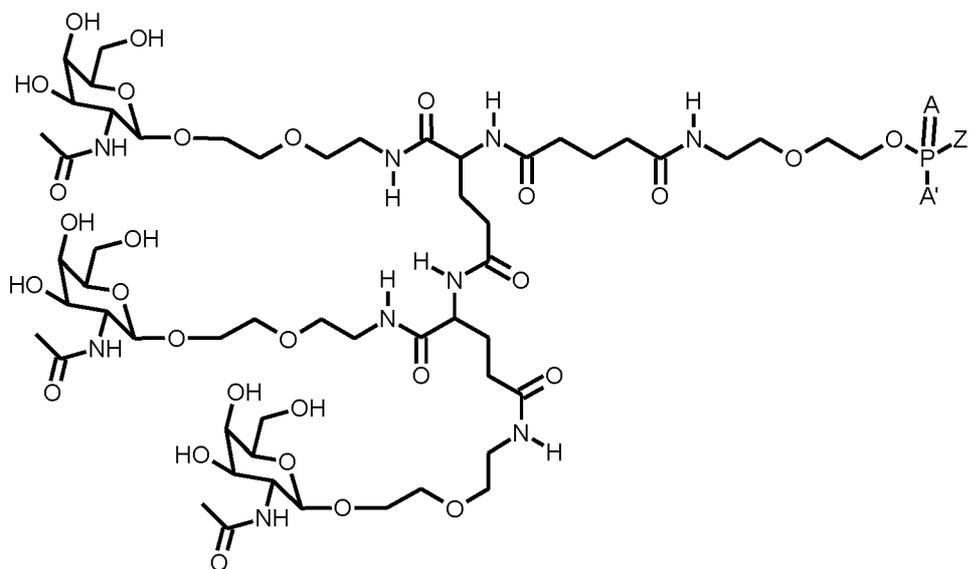
(Структура 4b), где Z

содержит ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; A представляет собой O или S; и A' представляет собой O-, S- или NH⁻;



(Структура 5b),

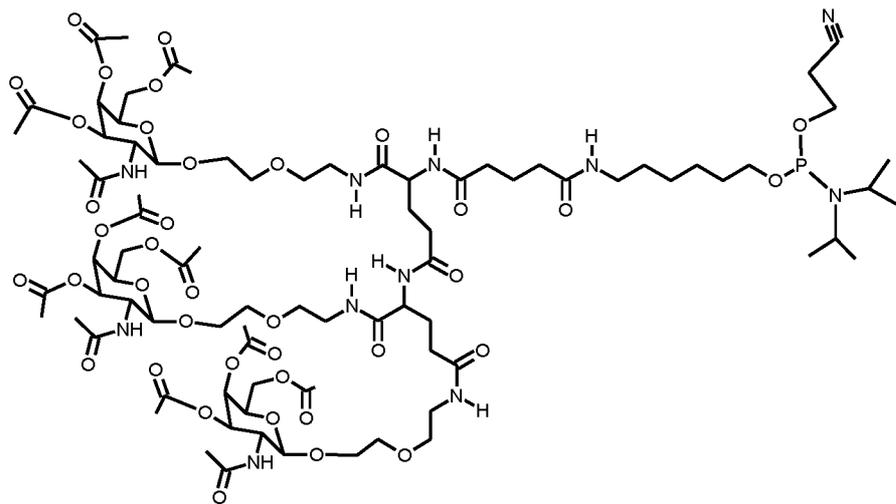
где Z содержит ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; A представляет собой O или S; и A' представляет собой O-, S- или NH₂; и



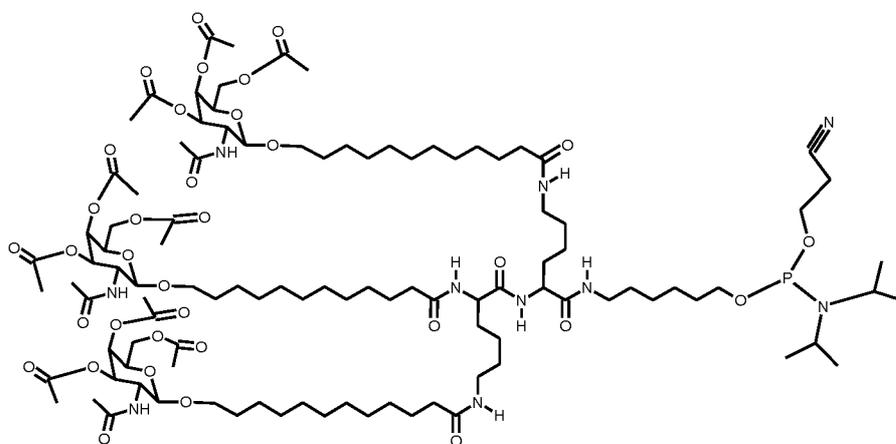
(Структура 6b),

где Z содержит ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; A представляет собой O или S; и A' представляет собой O-, S- и NH₂.

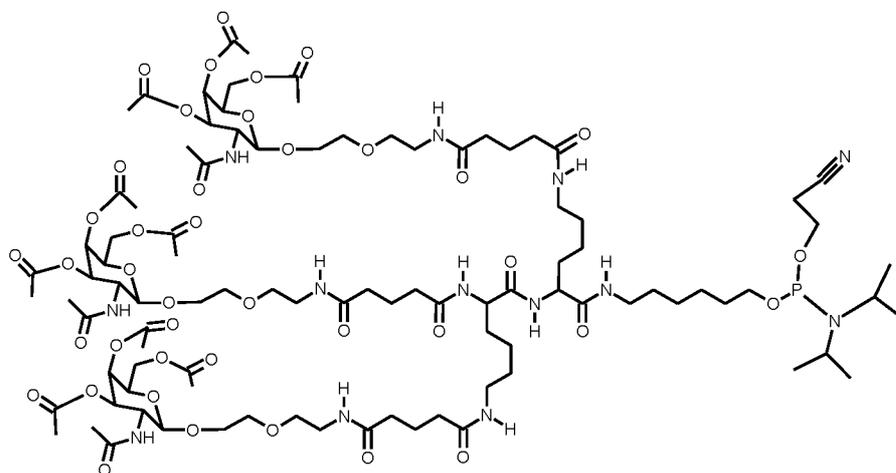
35. Соединение или его фармацевтическая соль, которое выбрано из группы, состоящей из:



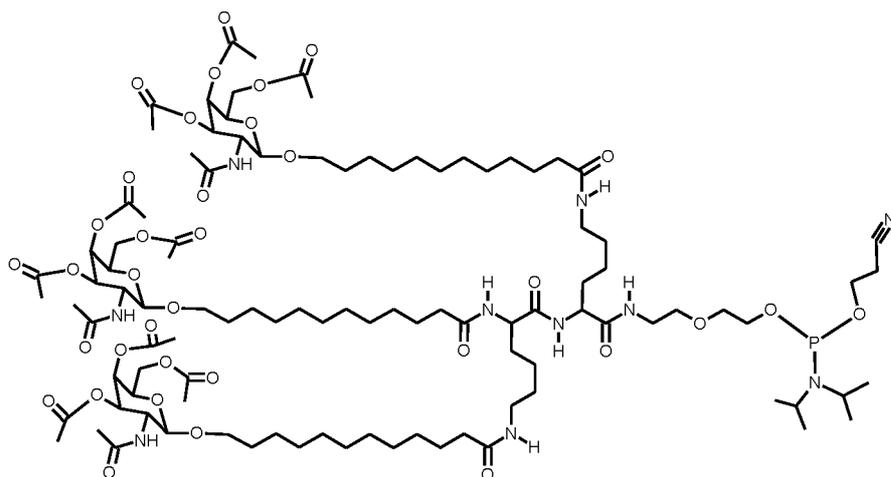
(Структура 2d);



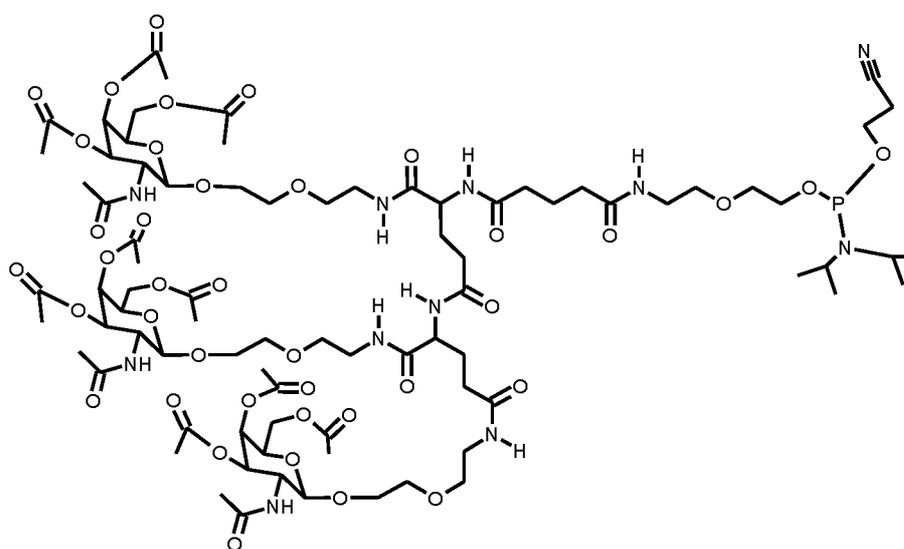
(Структура 3d);



(Структура 4d);

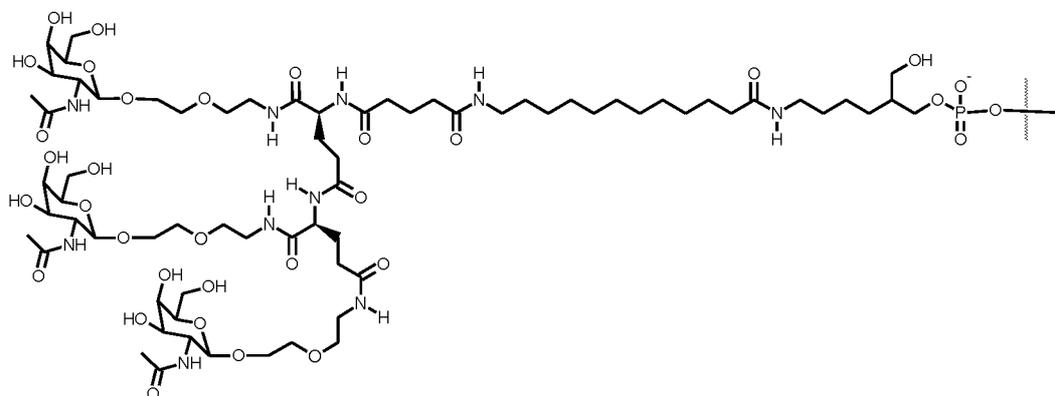


(Структура 5d); и

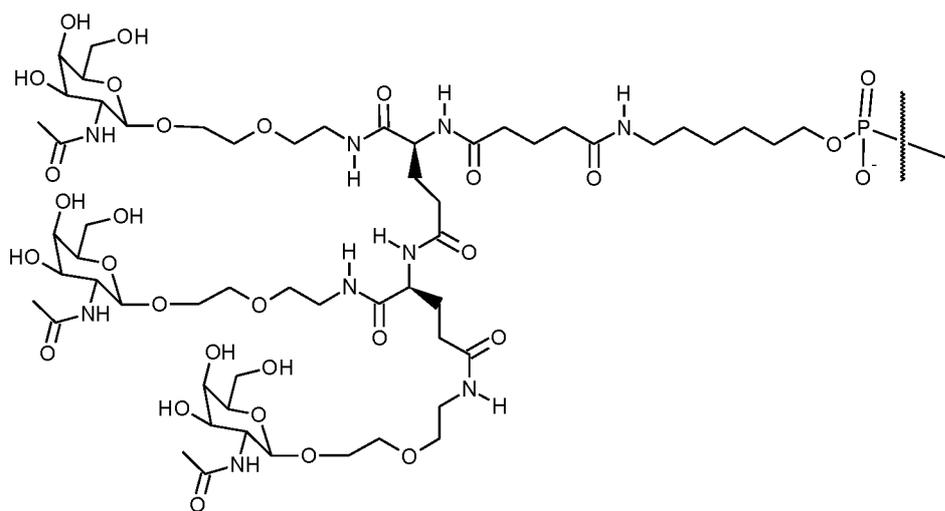


(Структура 6d).

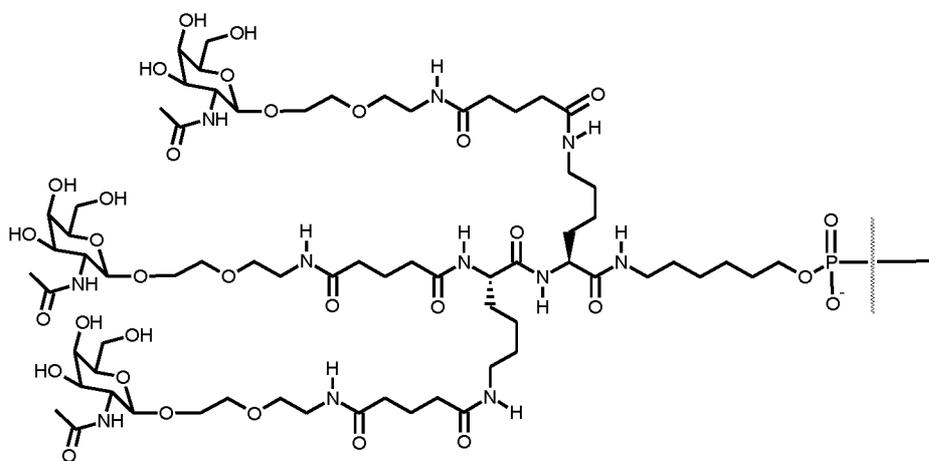
36. Нацеливающий лиганд или его фармацевтически приемлемая соль, содержащее структуру, выбранную из группы, состоящей из:



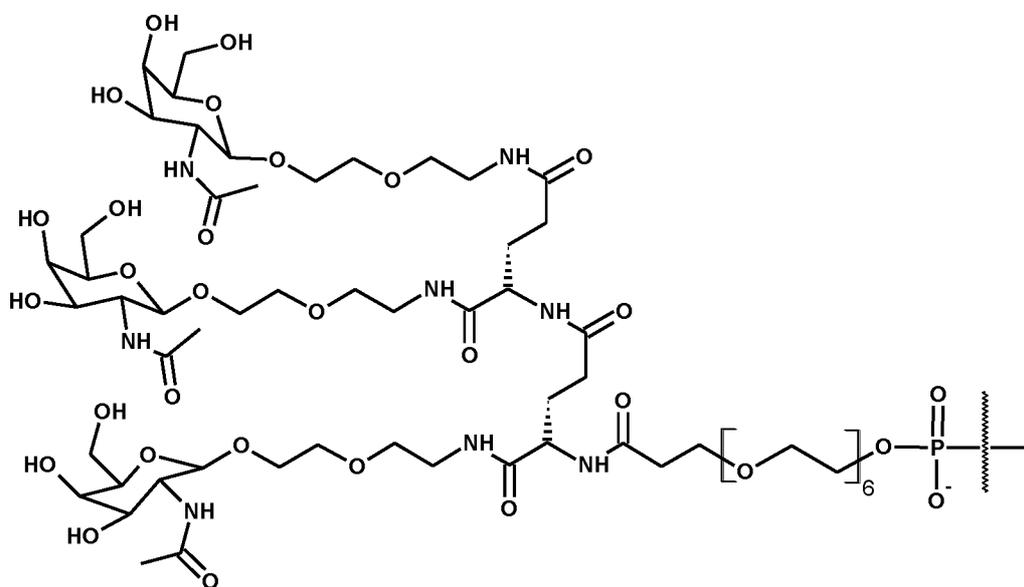
NAG15;



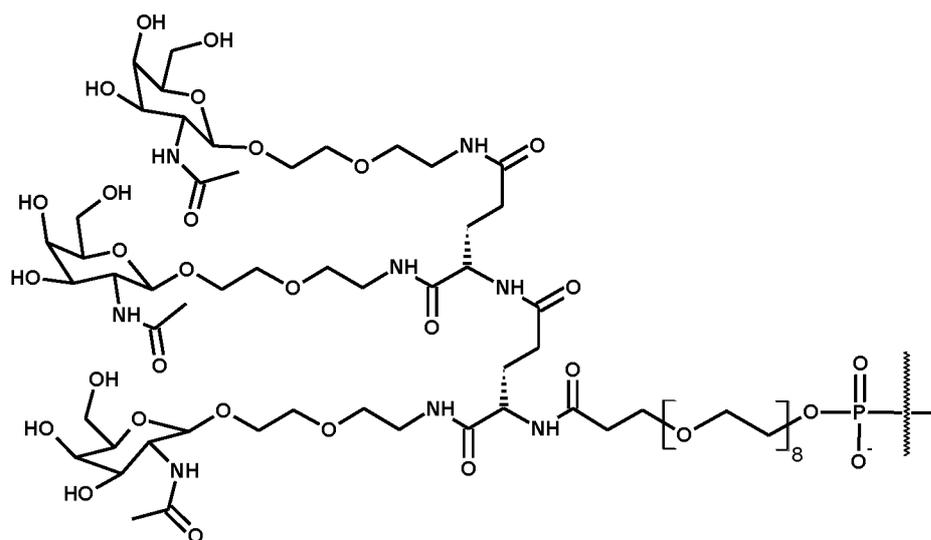
NAG18;



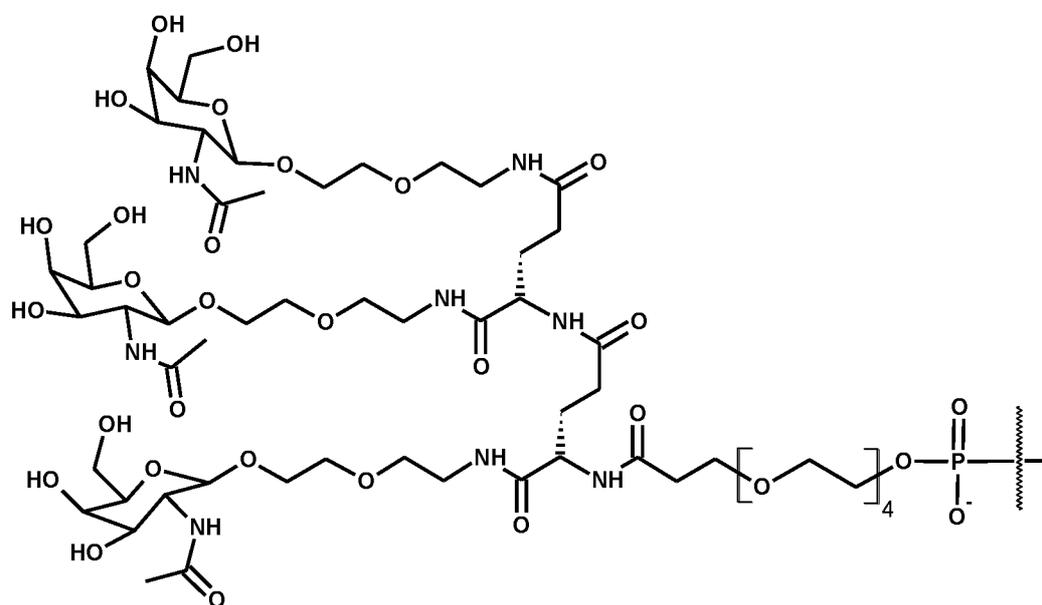
NAG20;



NAG25;

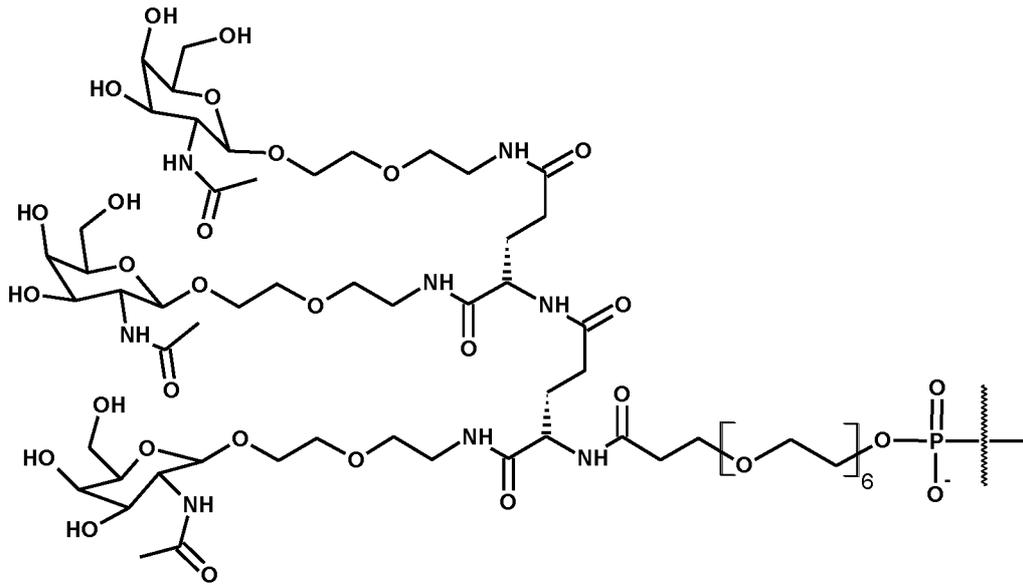


NAG26; и



NAG27.

37. Нацеливающий лиганд или его фармацевтически приемлемая соль, содержащее следующую структуру:



NAG25.

38. Фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии нуклеиновой кислоты-мишени у субъекта, содержащая ингибирующее экспрессию олигомерное соединение, конъюгированное с нацеливающим лигандом по пп. 36 или 37, или его фармацевтически приемлемой солью.

39. Применение ингибирующего экспрессию олигомерного соединения, связанного с нацеливающим лигандом по п. 36 или п. 37, или его фармацевтически приемлемой соли, для получения лекарственного средства для ингибирования экспрессии нуклеиновой кислоты-мишени у субъекта.

40. Применение нацеливающего лиганда по любому из п. 36 или п. 37, или его фармацевтически приемлемой соли, связанного с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, в получении лекарственного средства для введения указанного ингибирующего экспрессию олигомерного соединения в клетку млекопитающего, причем указанное применение включает осуществление контакта указанной клетки млекопитающего с нацеливающим лигандом по п. 36 или п. 37, или его фармацевтически приемлемой солью, связанным с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением.

41. Применение по п. 40, где клетка находится в организме субъекта.

42. Применение по п. 41, где ингибирующее экспрессию олигомерное соединение представляет собой агент РНКи.

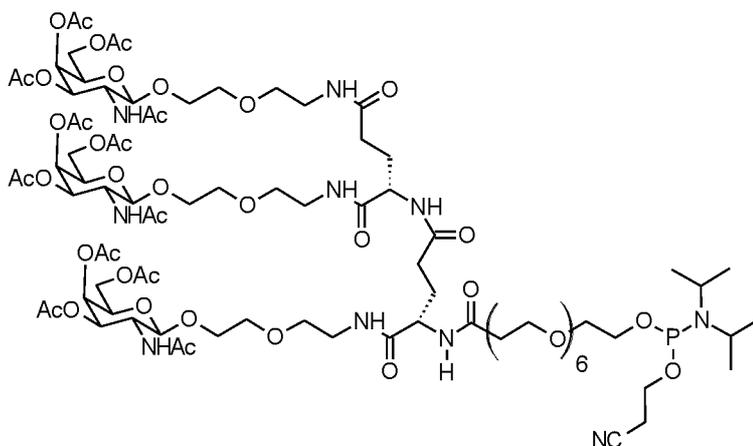
43. Применение нацеливающего лиганда по п. 36 или п. 37, или его фармацевтически приемлемой соли, связанного с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, в получении лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения, при котором было бы полезно введение ингибирующего экспрессию олигомерного соединения, причем применение включает введение терапевтического количества нацеливающего лиганда по любому из п. 36 или п. 37, или его фармацевтической соли, связанного с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, субъекту, нуждающемуся в таком лечении.

44. Применение по п. 43, где ингибирующее экспрессию олигомерное соединение представляет собой агент РНКи.

45. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или нарушения, при котором было бы полезно введение ингибирующего экспрессию олигомерного соединения, содержащая терапевтически эффективное количество нацеливающего лиганда по любому из п. 36 или п. 37, или его фармацевтической соли, связанного с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением.

46. Фармацевтическая композиция по п. 45 где ингибирующее экспрессию олигомерное соединение представляет собой агент РНКи.

47. Способ получения Соединения 10



Соединение 10

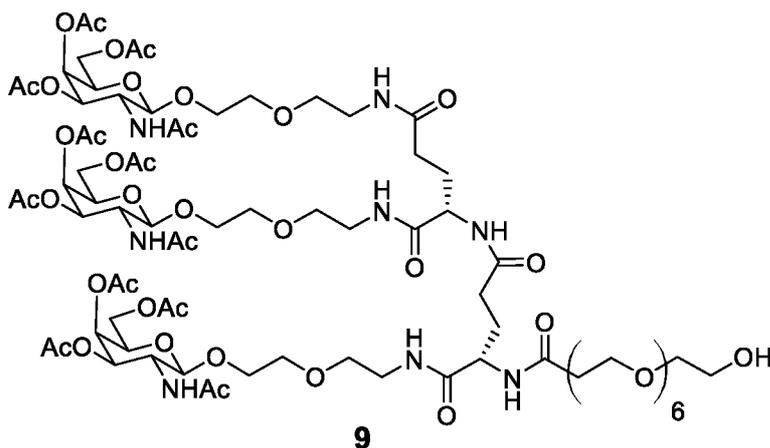
включающий:

осуществление

реакции

Соединения

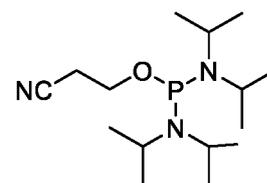
9



9

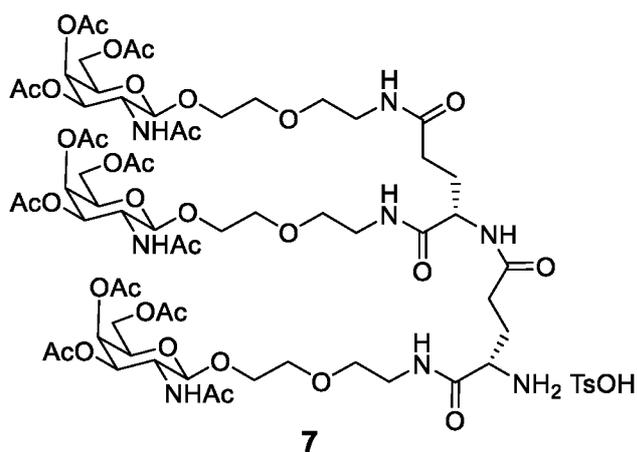
c

2-цианоэтил-*N,N,N',N'*-тетраизопропилфосфородиамидином
присутствии 4,5-а с получением Соединения 10.

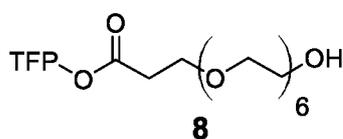


b

48. Способ по п. 47, дополнительно включающий осуществление реакции

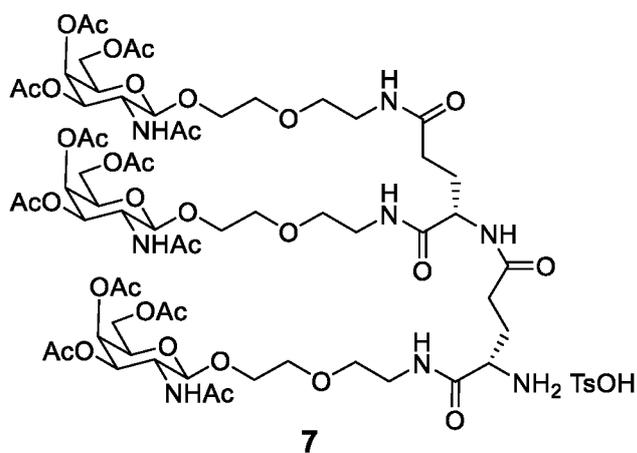


тозилатной соли 7

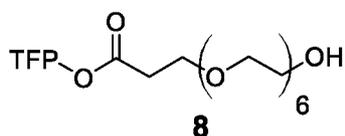


с Соединением 8 в присутствии триэтиламина с получением Соединения 9, где TFP представляет собой тетрафторфенил.

49. Способ по п. 47, дополнительно включающий осуществление реакции



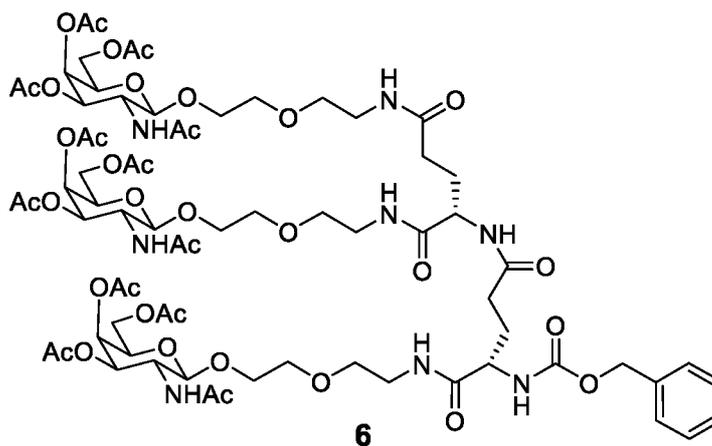
тозилатной соли 7



с Соединением 8

в присутствии N, N-диизопропилэтиленамина с образованием Соединения 9, где TFP представляет собой тетрафторфенил.

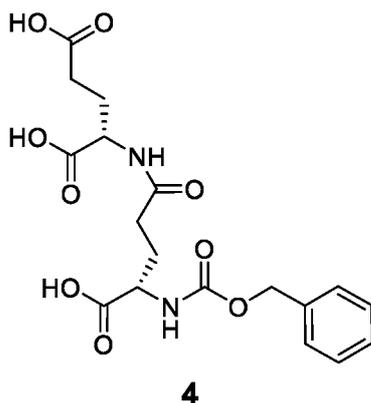
50. Способ по п. 48 или 49, дополнительно включающий гидрогенирование



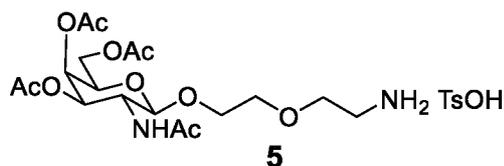
Соединения 6

использованием H_2 в присутствии of Pd/C и *p*-толуолсульфоновой кислоты с образованием тозилатной соли 7.

51. Способ по п. 50, дополнительно включающий осуществление реакции



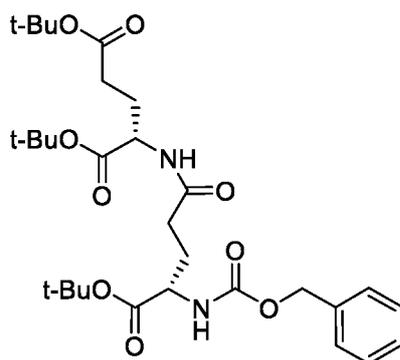
Соединения 4



с Соединением 5

в присутствии 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметиламиния тетрафторбората (TBTU) и N,N-диизопропилэтиленамина (DIPEA) с образованием Соединения 6.

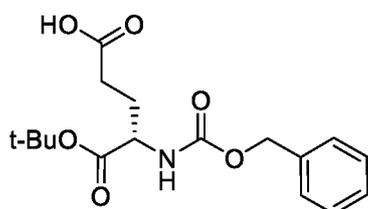
52. Способ по п. 51, дополнительно включающий осуществление реакции



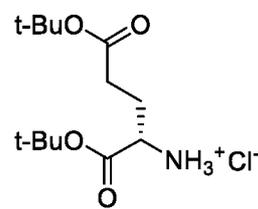
3

Соединения **3** с муравьиной кислотой с образованием Соединения 4.

53. Способ по п. 52, дополнительно включающий осуществление реакции



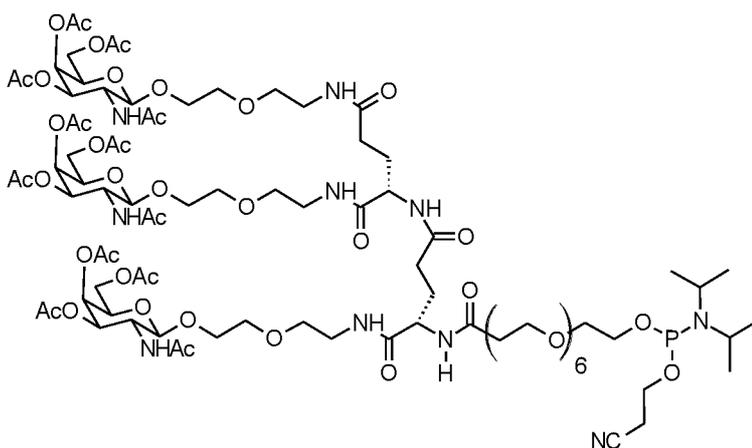
1



2

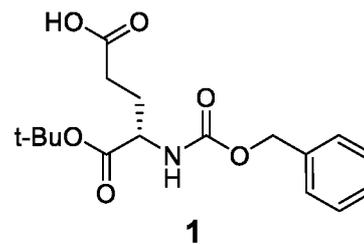
Соединения **1** с Соединением **2** в присутствии изобутилхлорформиата и N-метилморфолина (NMM) с образованием Соединения **3**.

54. Способ получения Соединения 10



Соединение 10

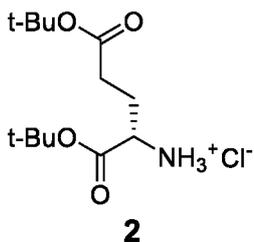
включающий:



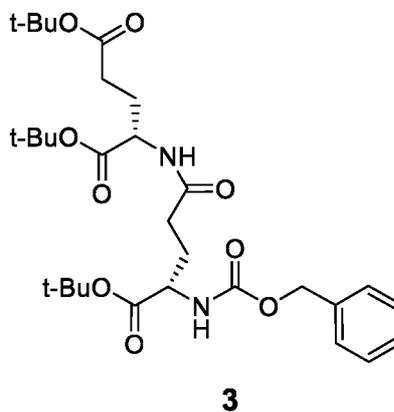
осуществления реакции Соединения 1

с

Соединением 2



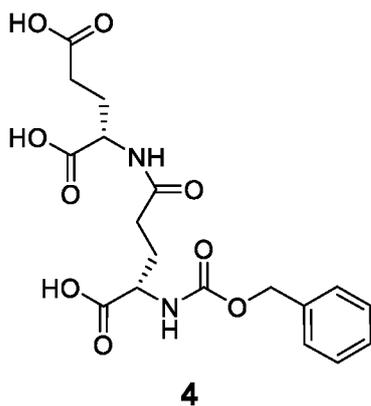
в присутствии изобутилхлорформиата и N- метилморфолина



(NMM) с образованием Соединения 3

;

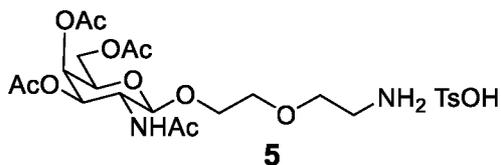
осуществления реакции Соединения 3 с муравьиной кислотой с образованием



Соединения 4

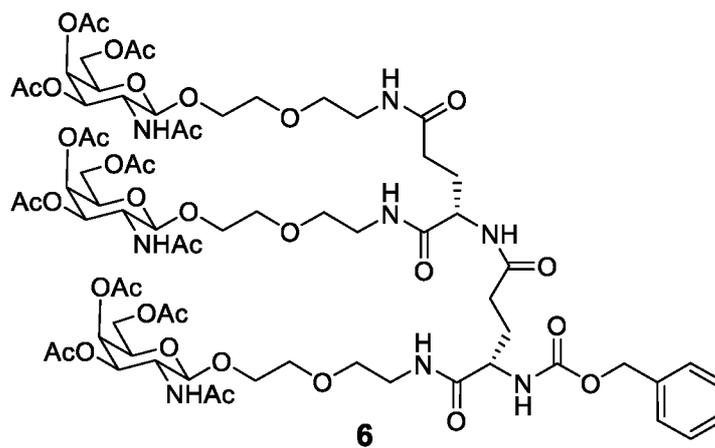
;

осуществления реакции Соединения 4 с Соединением 5



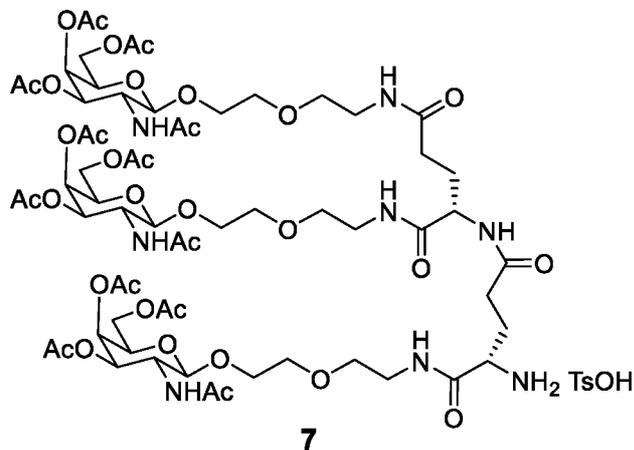
в присутствии 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-

тетраметиламиния тетрафторбората (TBTU) и N,N-диизопропилэтиленамина (DIPEA) с

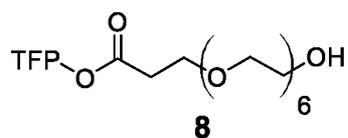


образованием Соединения 6

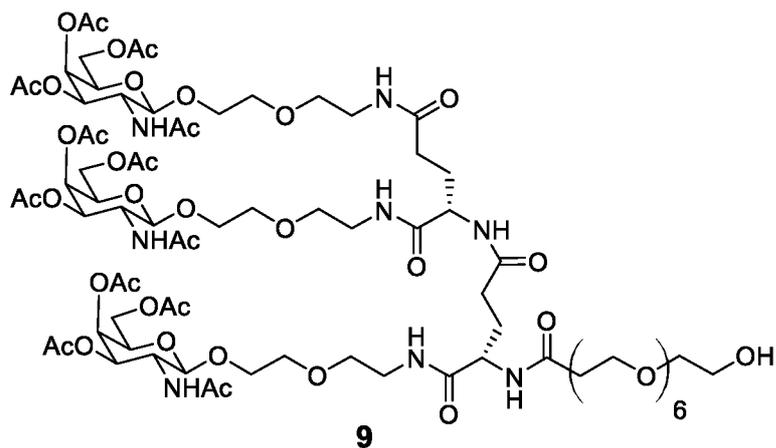
гидрогенирование Соединения 6 с использованием H_2 в присутствии Pd/C и *n*-толуолсульфоновой кислоты с образованием тозилатной соли 7



осуществление реакции тозилатной соли 7 с Соединением 8

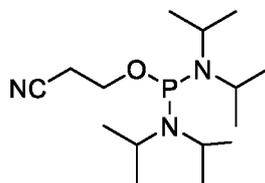


в присутствии триэтиламина с образованием Соединения 9



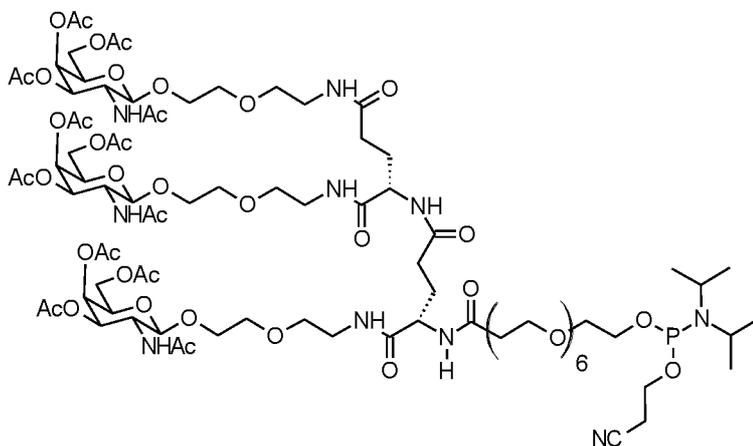
, где TFP представляет собой тетрафторфенил; и

осуществление реакции Соединения 9 с 2-цианозтил-N,N,N',N'-



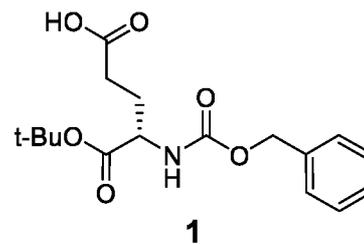
тетраизопропилфосфордиамидитом в присутствии 4,5-дицианоимидазола с образованием Соединения 10.

55. Способ получения Соединения 10



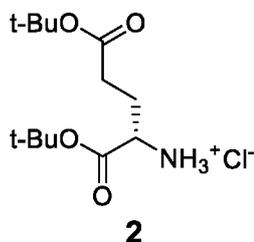
Соединение 10,

включающий:



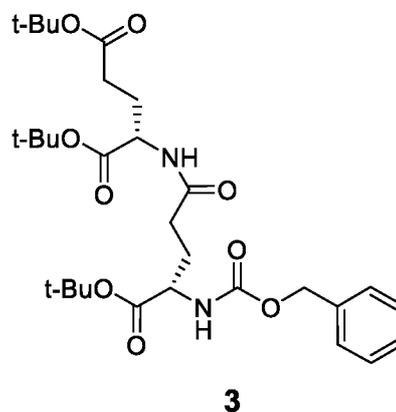
осуществление реакции Соединения 1

c



Соединением 2

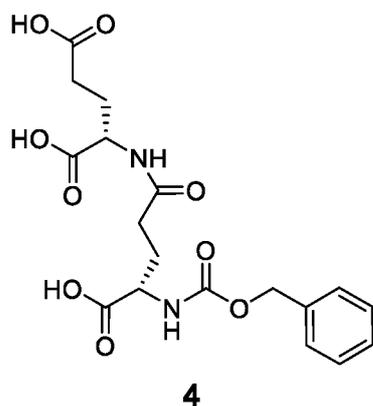
в присутствии изобутилхлорформиата и N-



метилморфолина (NMM) с образованием Соединения 3

;

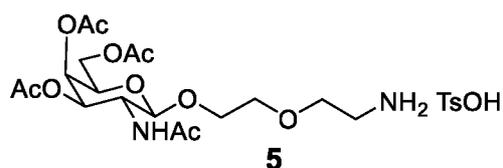
осуществление реакции Соединения 3 с муравьиной кислотой с образованием



Соединения 4

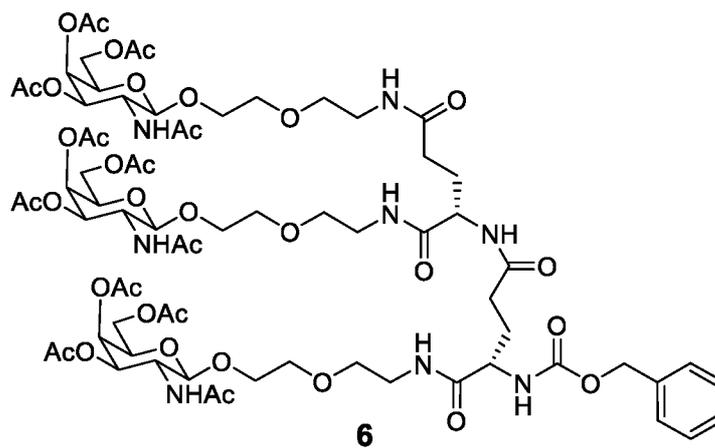
;

осуществление реакции Соединения 4 с соединением 5



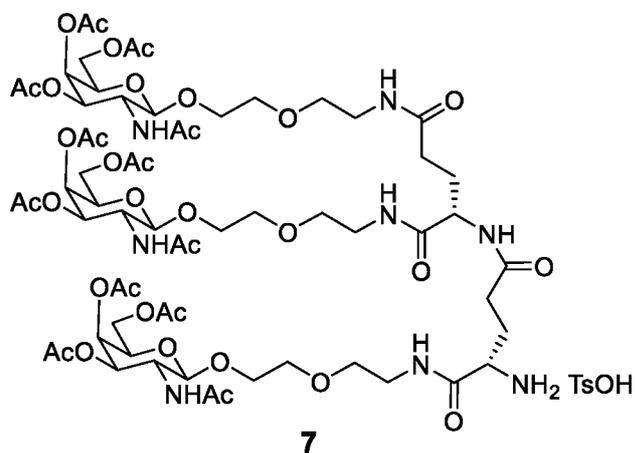
в присутствии 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-

тетраметиламиния тетрафторбората (TBTU) и N,N-диизопропилэтиламина (DIPEA) с

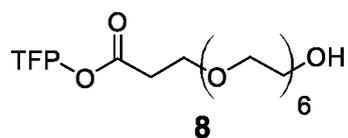


образованием Соединения 6

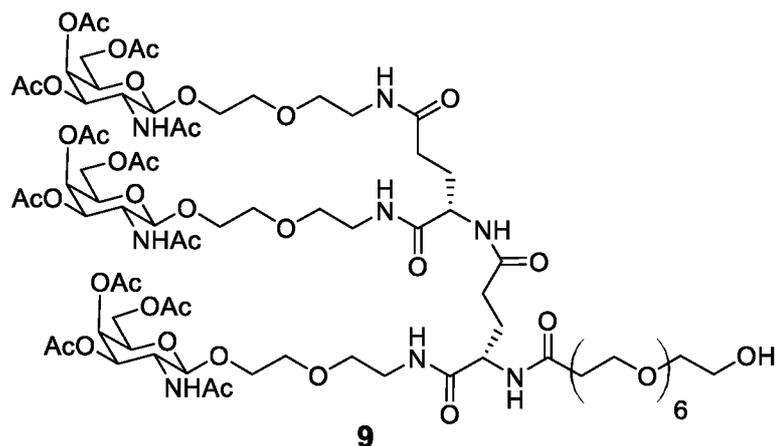
гидрогенирование Соединения 6 с использованием H_2 в присутствии Pd/C и *n*-толуолсульфоновой кислоты с образованием тозилатной соли 7



осуществление реакции тозилатной соли 7 с соединением 8

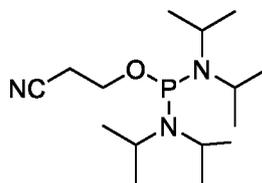


в присутствии N, N-диизопропилэтиламина с образованием



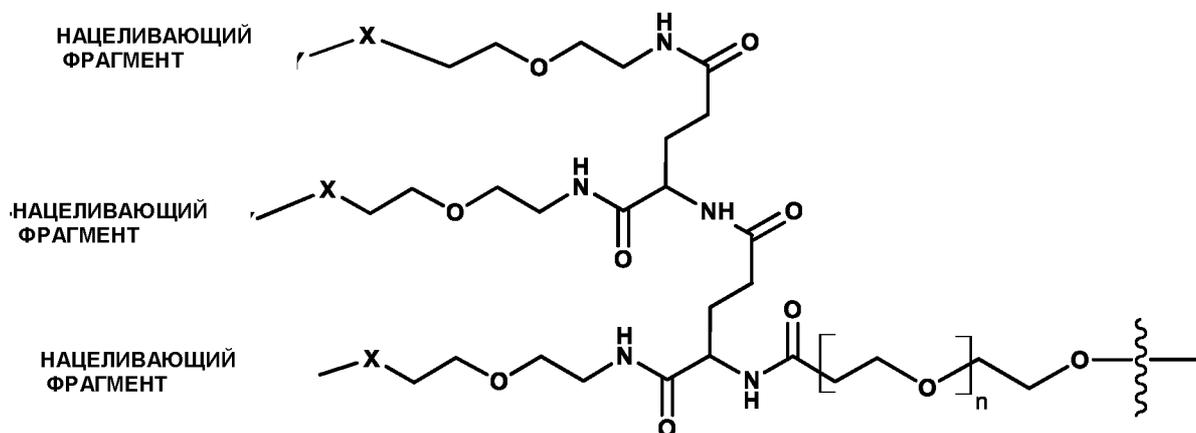
Соединения 9, где TFP представляет собой тетрафторфенил; и

осуществление реакции Соединения 9 с 2-цианоэтил-N,N,N',N'-



тетраизопропилфосфородиамида в присутствии 4,5-дицианоимидазола с образованием Соединения 10.

56. Нацеливающий лиганд или его фармацевтически приемлемая соль, содержащий структуру Формулы В:



Формула В,

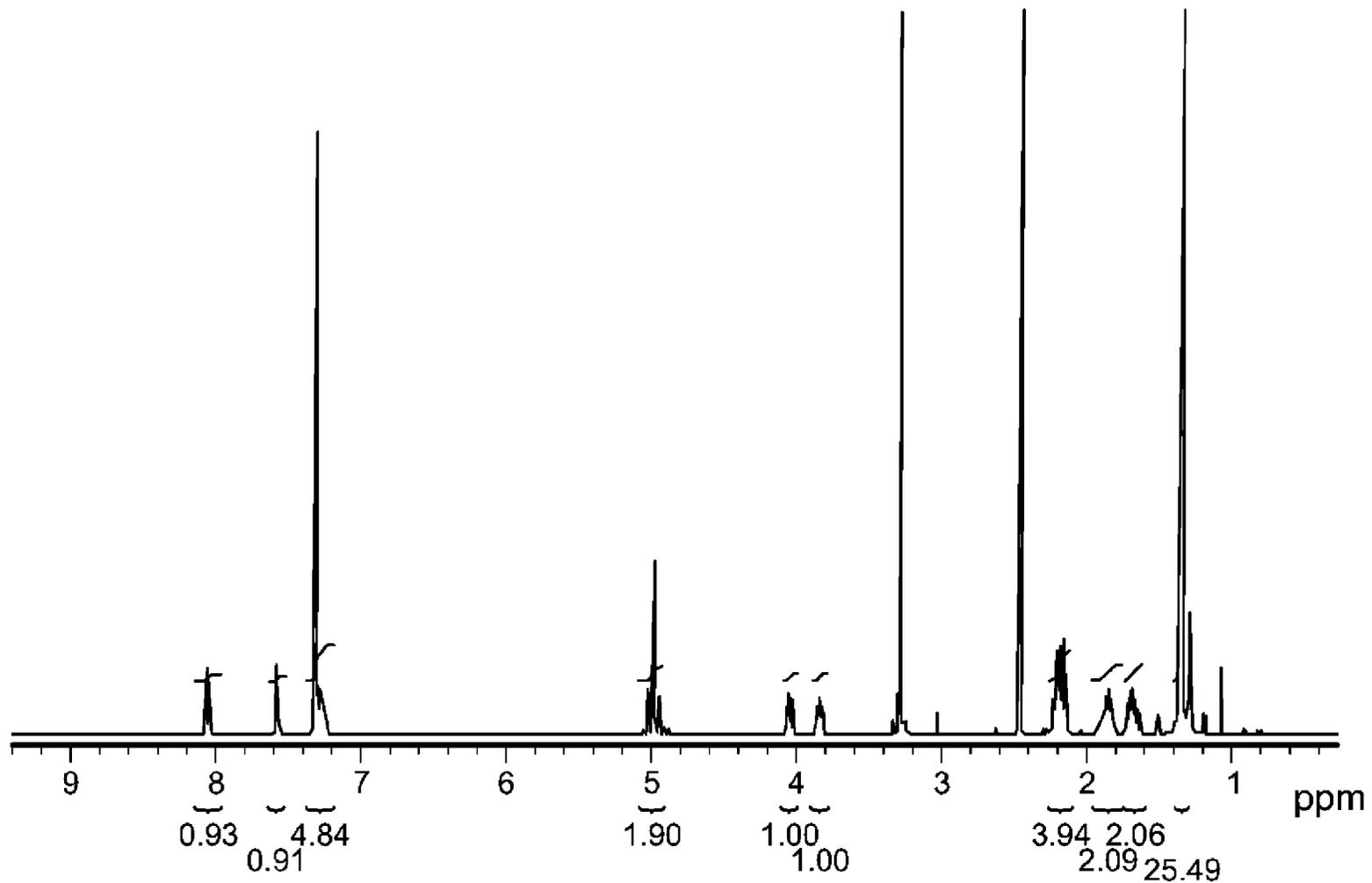
где

n представляет собой целое число от 1 до 20;

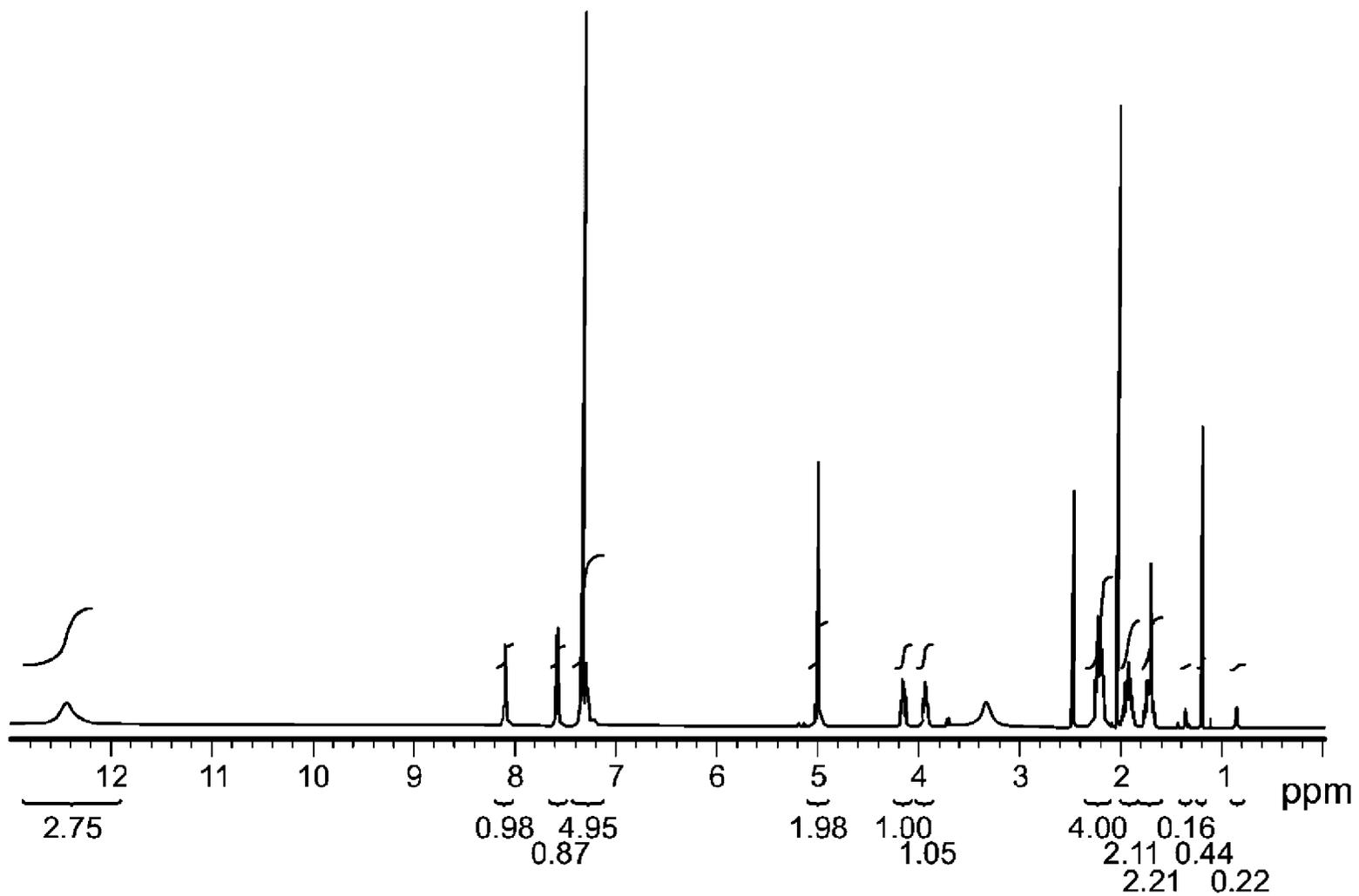
X представляет собой O, S или NH; и

нацеливающий фрагмент выбран из группы, состоящей из: N-ацетилгалактозамина, галактозы, галактозамина, N-формилгалактозамина, N-пропионилгалактозамина, N-н-бутаноилгалактозамина и N-изо-бутаноилгалактозамина;

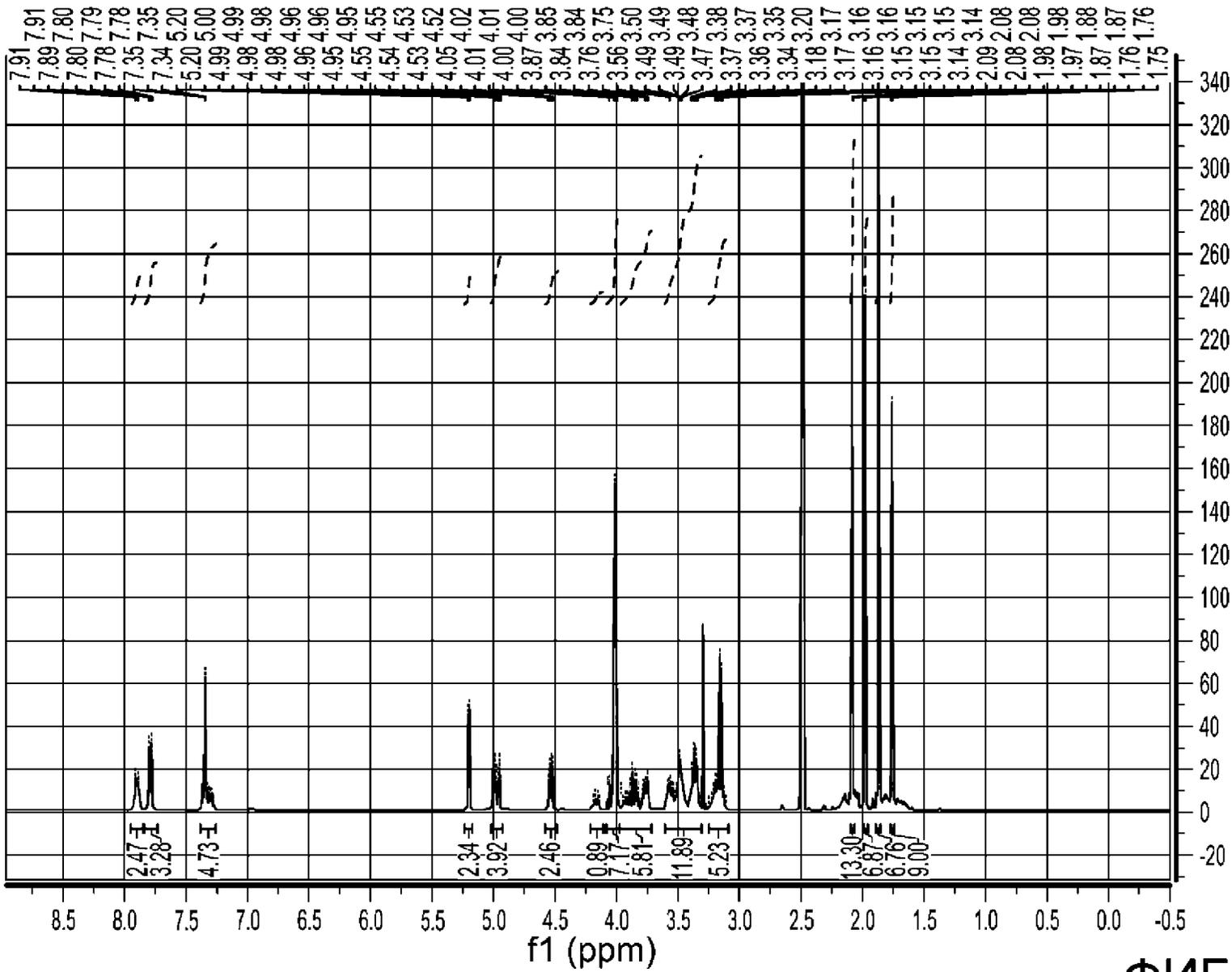
причем нацеливающий лиганд связан с агентом РНКи, содержащим один или более модифицированных нуклеотидов, и при этом агент РНКи является двунитевым и агент РНКи связан с нацеливающим лигандом на 3'-конце смысловой нити агента РНКи.



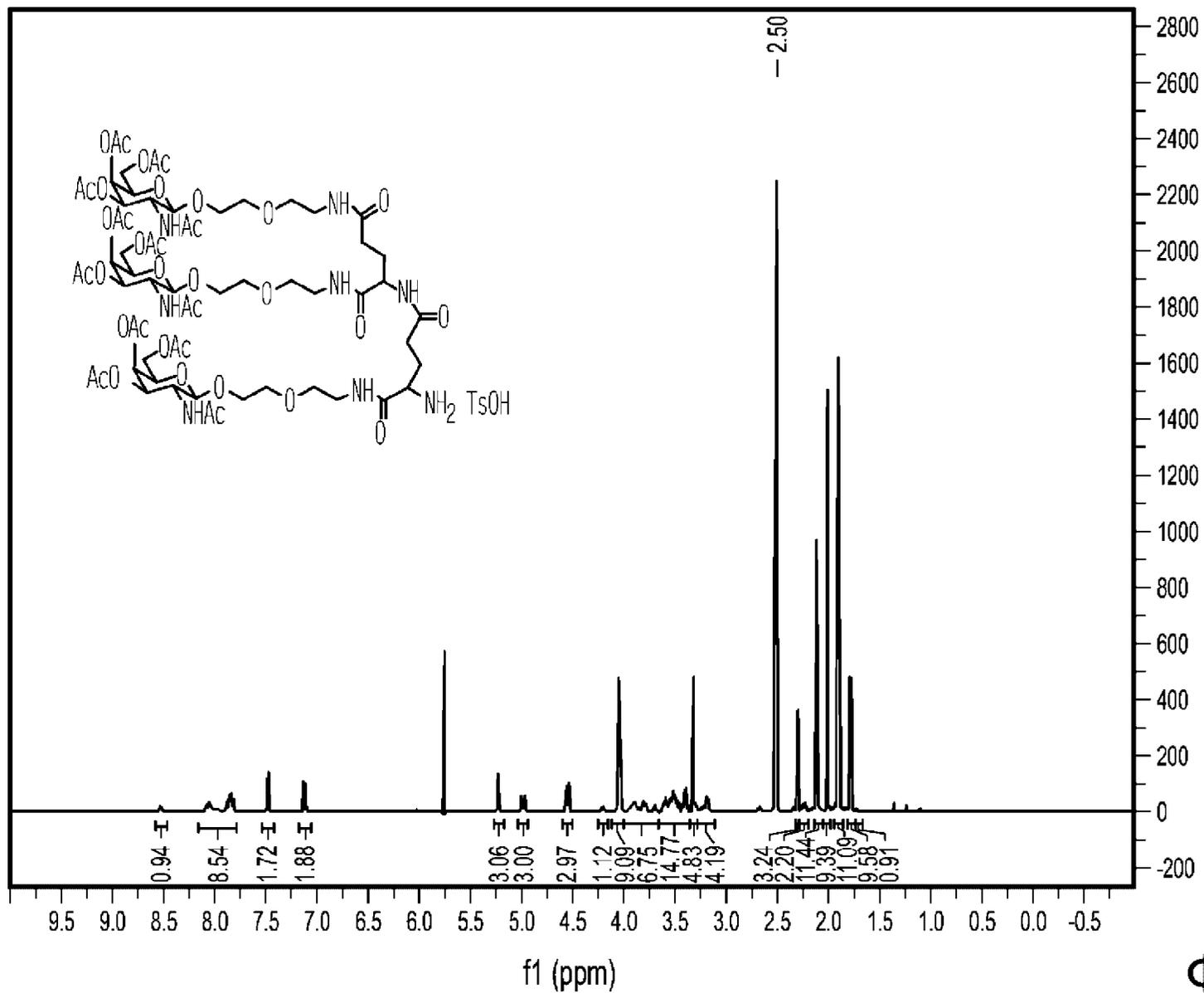
ФИГ. 1



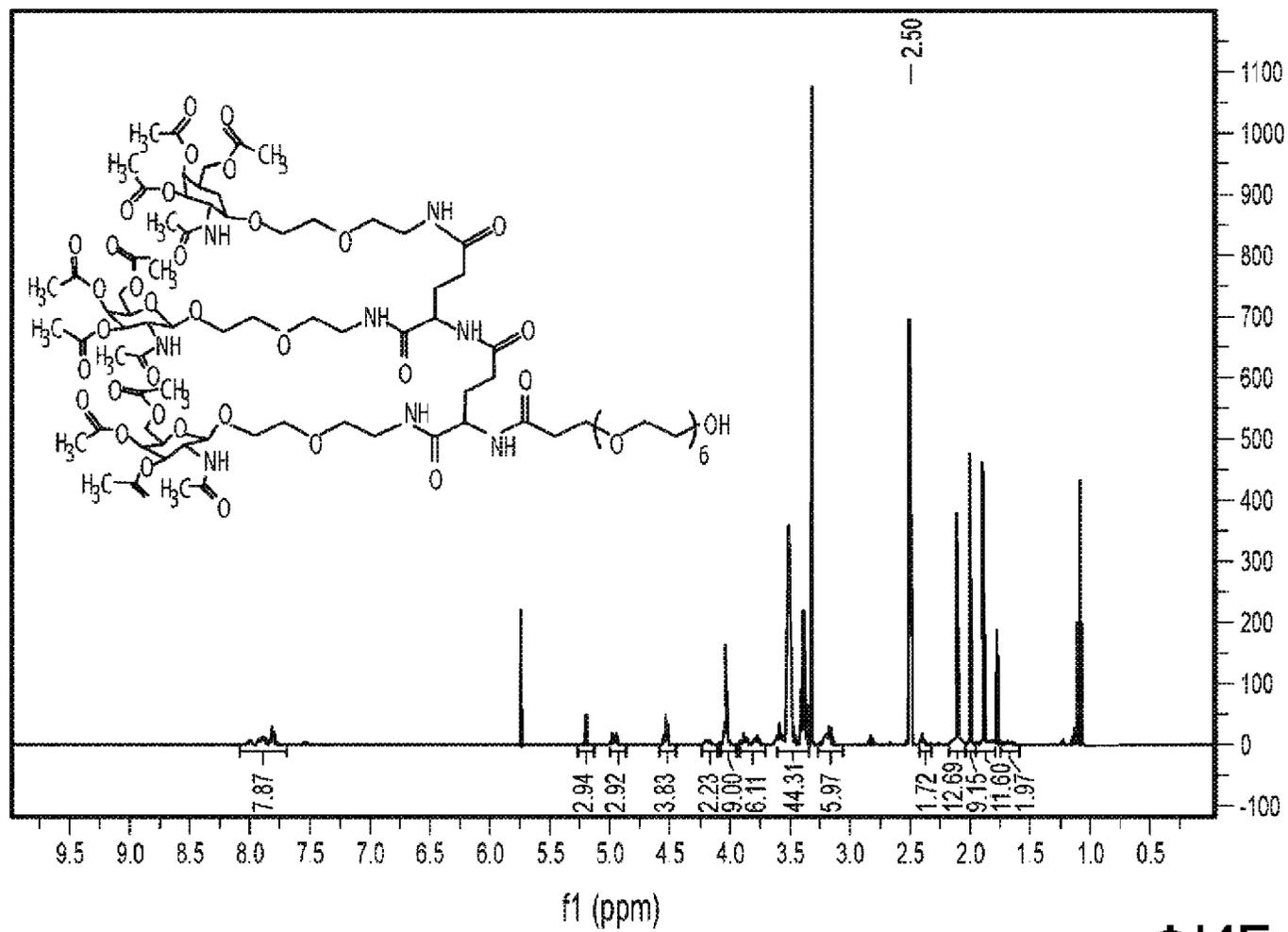
ФИГ. 2



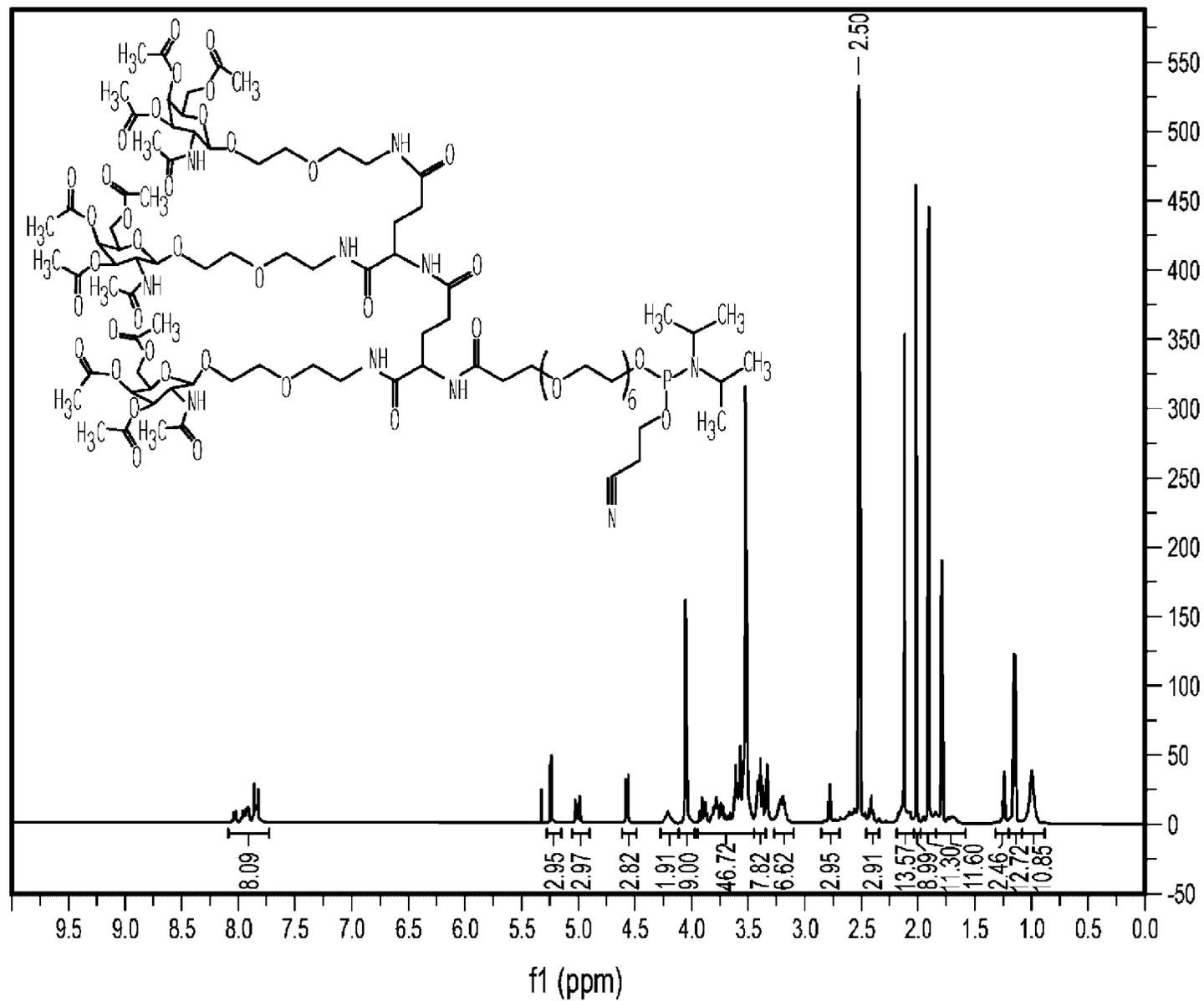
ФИГ. 3



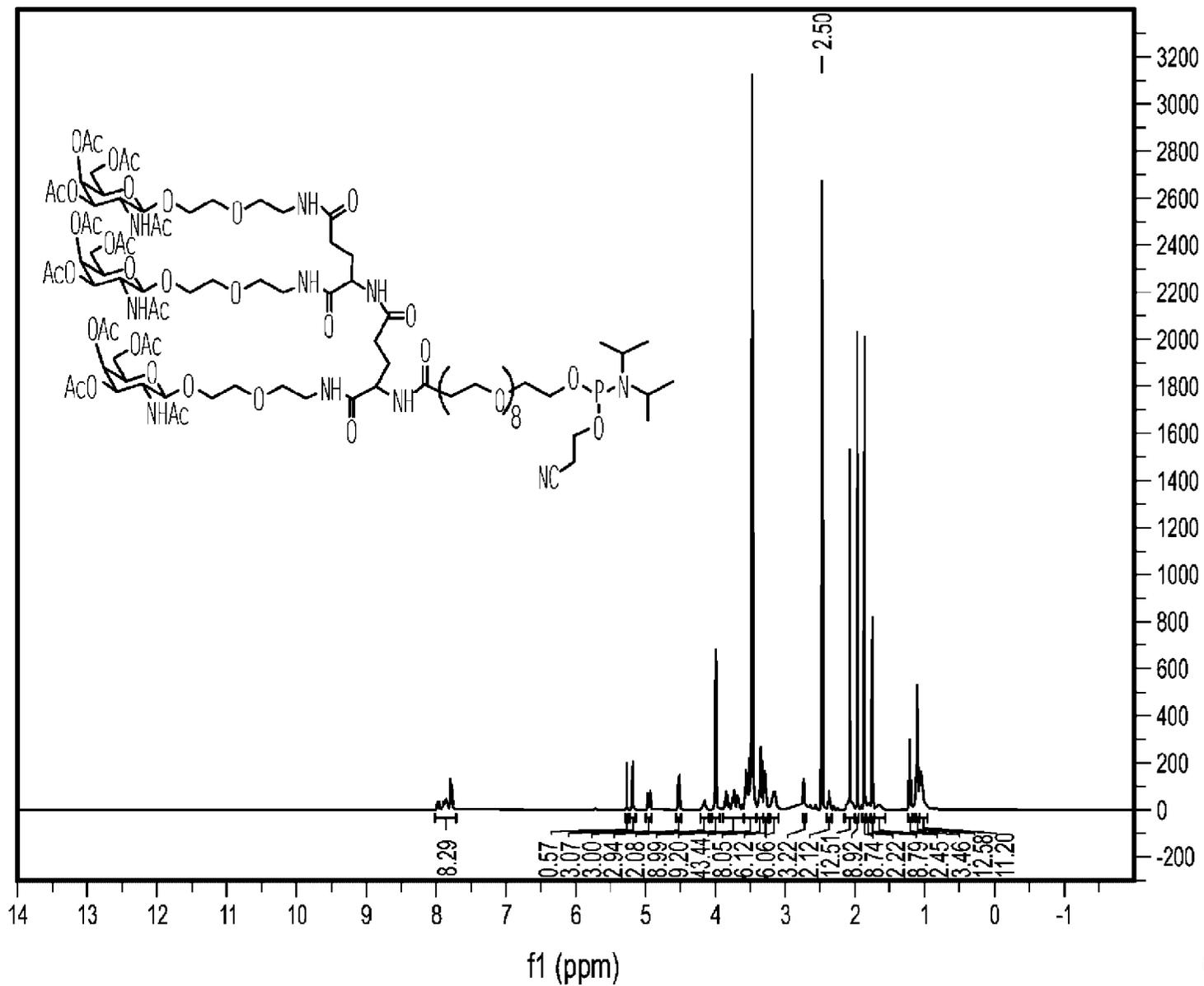
ФИГ. 4



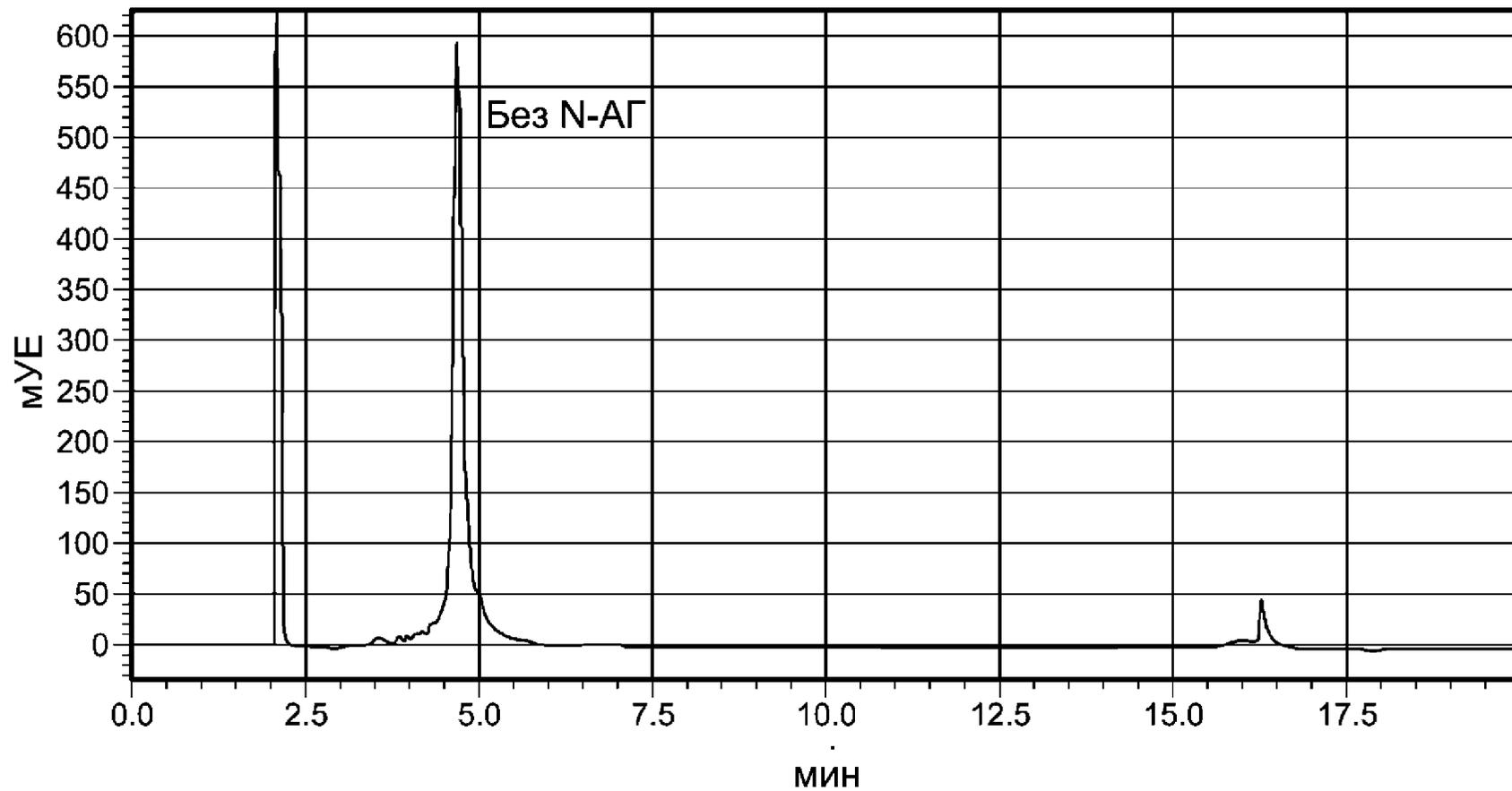
ФИГ. 5



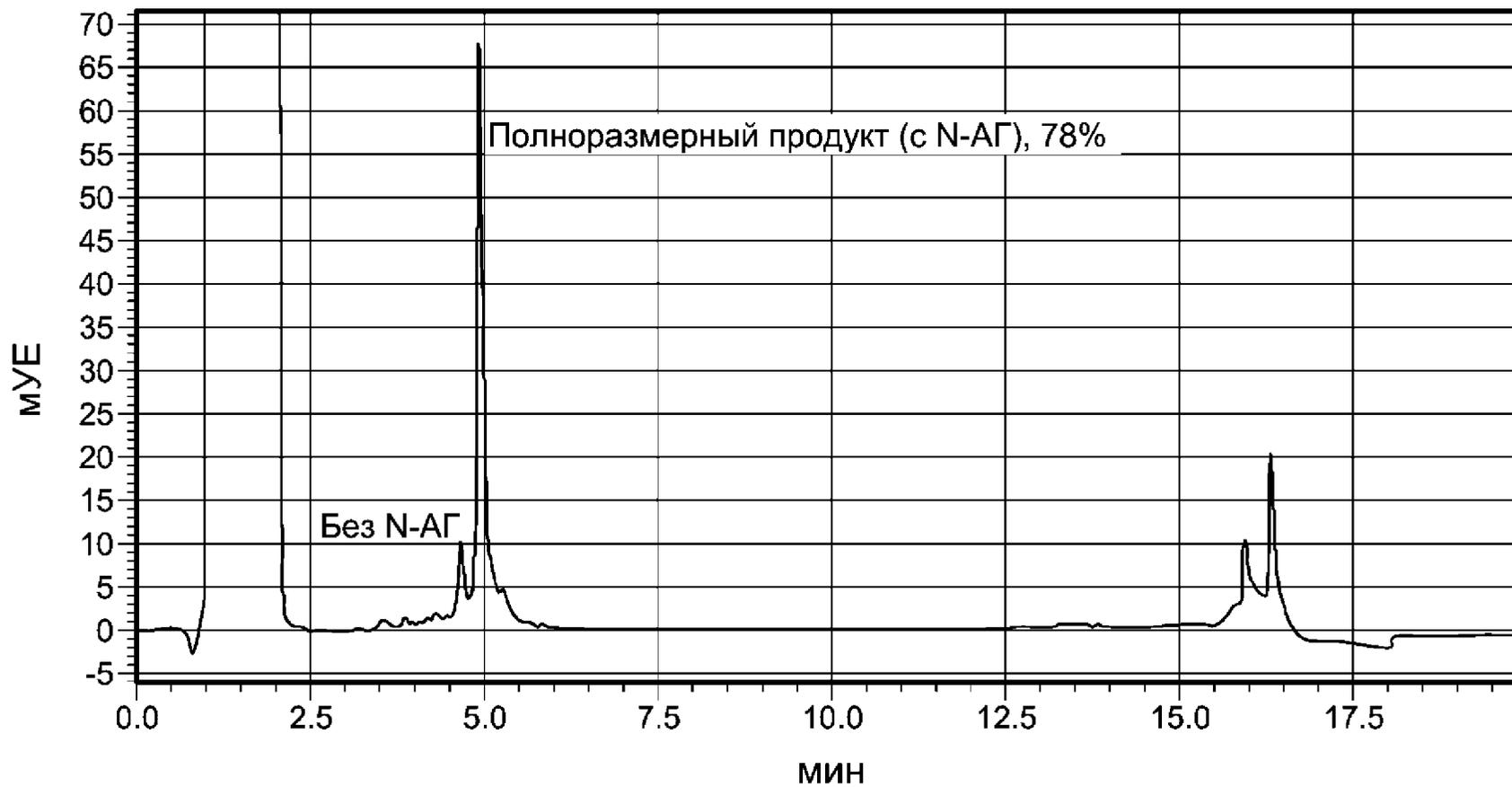
ФИГ. 6



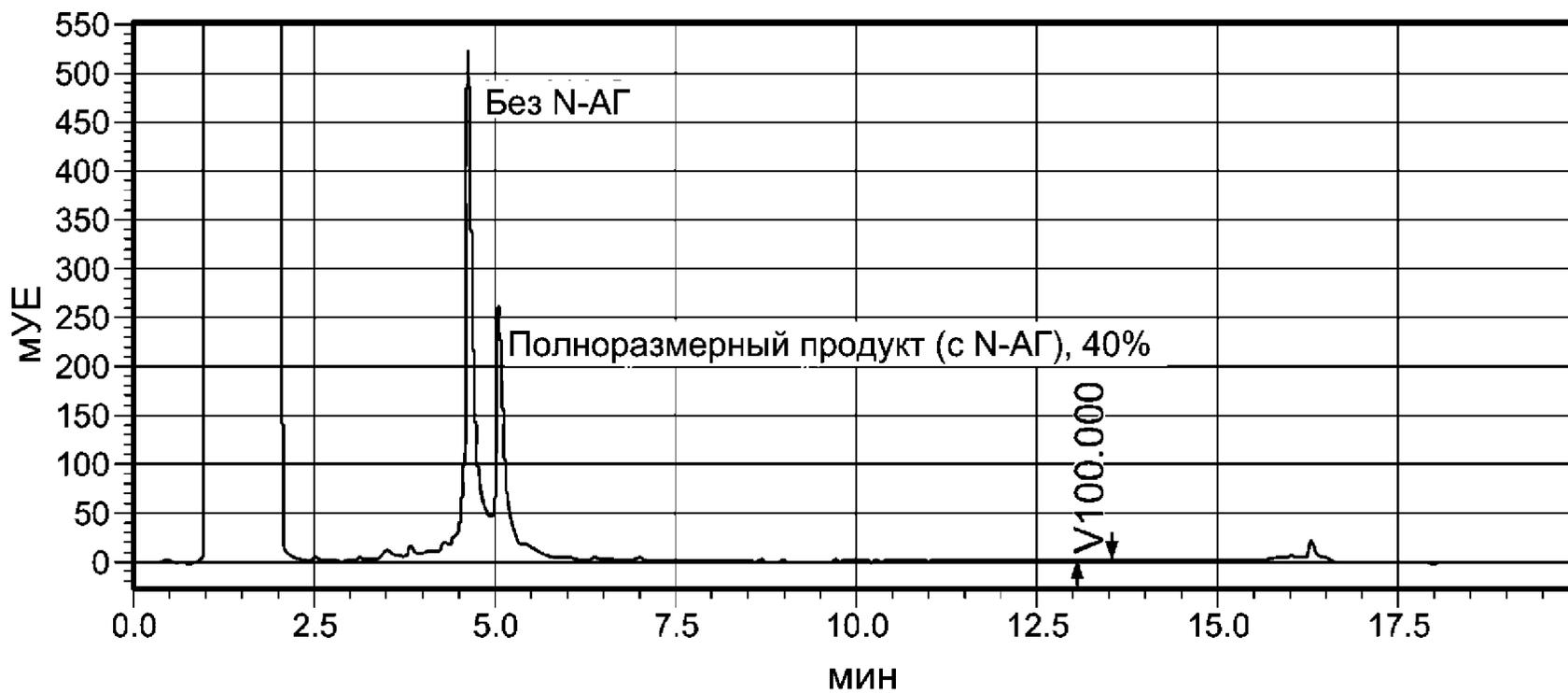
ФИГ. 8



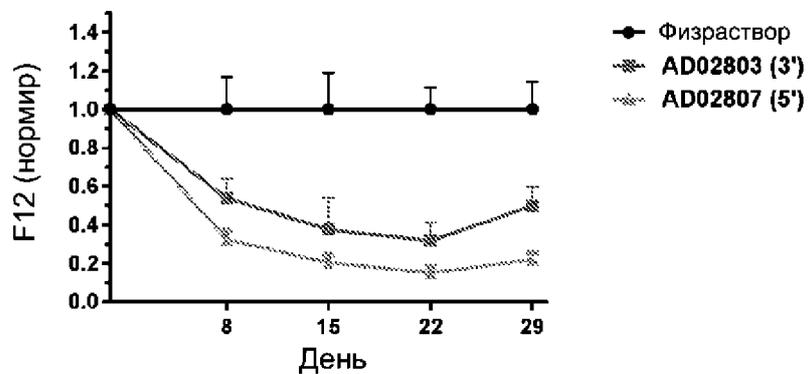
ФИГ. 9



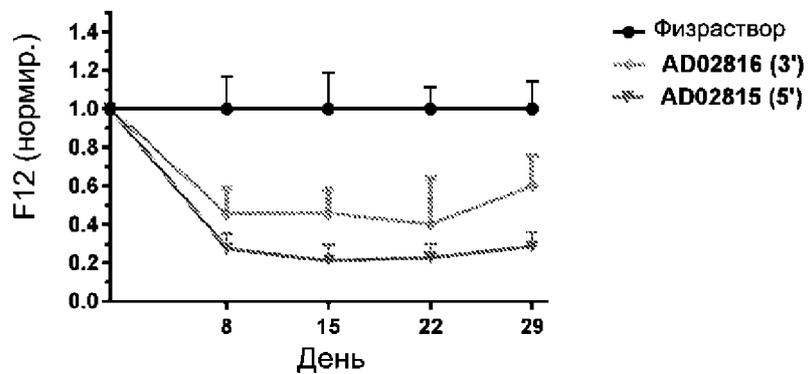
ФИГ. 10



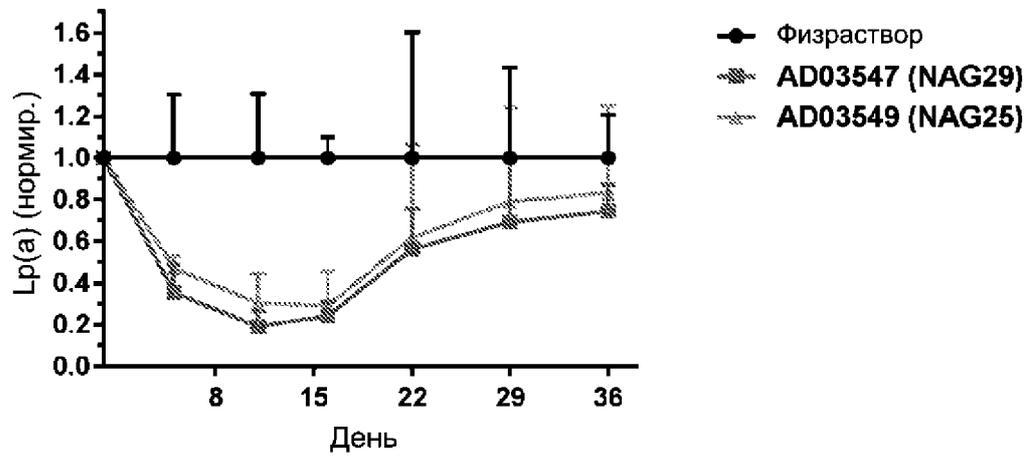
ФИГ. 11



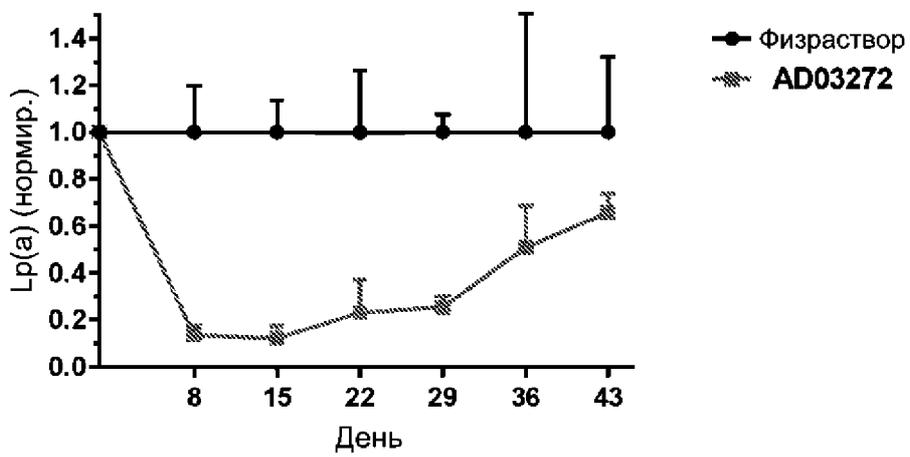
ФИГ. 12



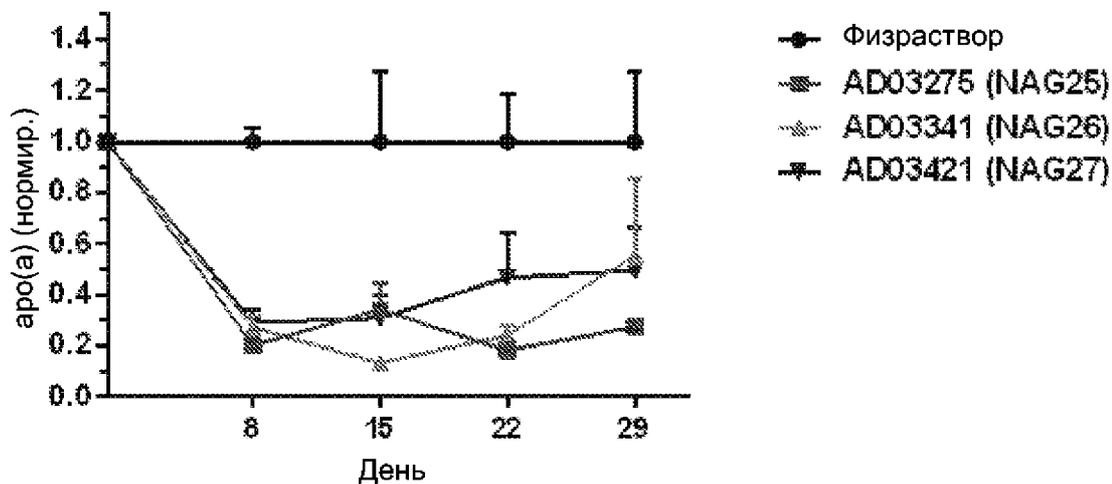
ФИГ. 13



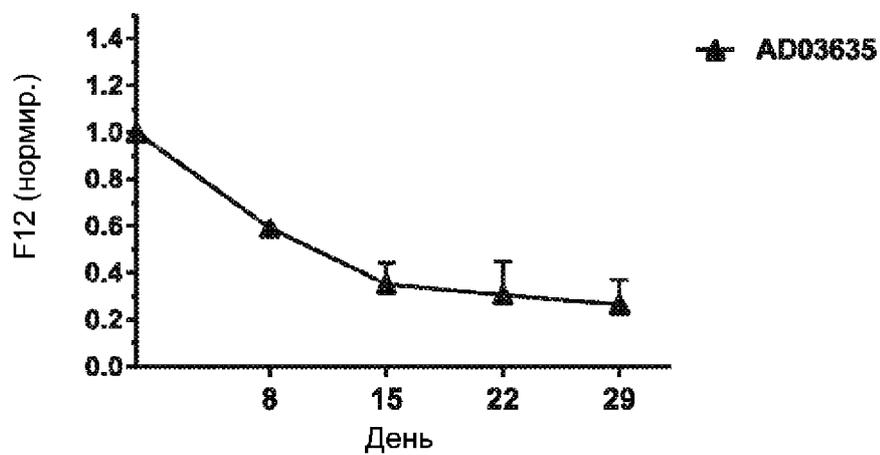
ФИГ. 14



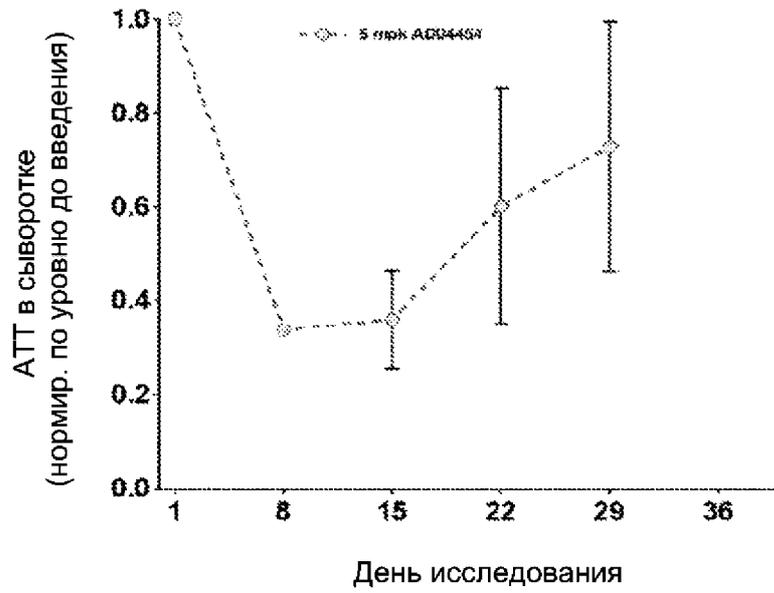
ФИГ. 15



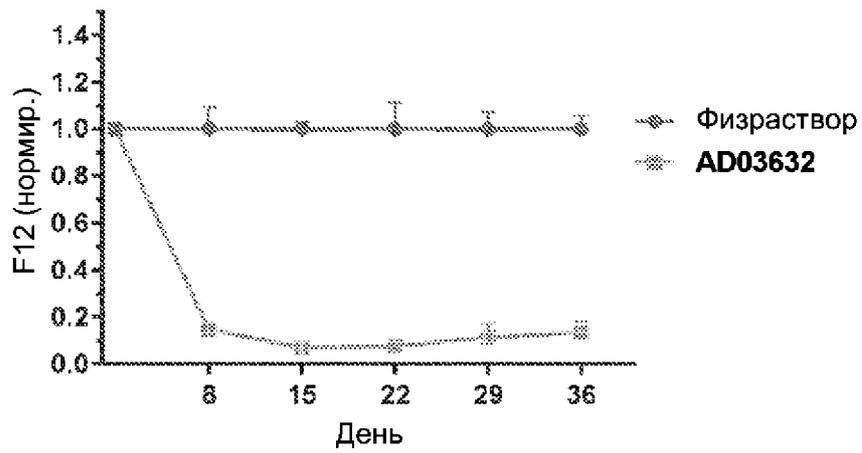
ФИГ. 16



ФИГ. 17



ФИГ. 18



ФИГ. 19