

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202490080 (13) A2

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.07.31

(22) Дата подачи заявки  
2014.05.01

(51) Int. Cl. *A61K 31/7088* (2006.01)  
*A61K 31/7125* (2006.01)  
*A61K 31/713* (2006.01)  
*A61K 47/54* (2006.01)  
*A61K 48/00* (2006.01)  
*C07H 21/00* (2006.01)  
*C07H 21/04* (2006.01)  
*C12N 9/16* (2006.01)  
*C12N 15/113* (2006.01)  
*A61P 25/00* (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ МОДУЛИРОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ НВУ И ТТР

(31) 61/818,442; 61/823,826; 61/843,887;  
61/871,673; 61/880,790; 61/976,991;  
61/986,867

(32) 2013.05.01; 2013.05.15; 2013.07.08;  
2013.08.29; 2013.09.20; 2014.04.08;  
2014.04.30

(33) US

(62) 202091966; 2014.05.01

(71) Заявитель:  
ИОНИС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК.  
(US)

(72) Изобретатель:  
Пракаш Тхажа П., Сет Пунит П.,  
Свейз Эрик Е. (US)

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

(57) В настоящем документе предложены олигомерные соединения с конъюгированными группами. В некоторых вариантах реализации изобретения олигомерные соединения конъюгированы с N-ацетилгалактозамином.

A2

202490080

202490080

A2

## **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ МОДУЛИРОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ HBV И TTR**

### **ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

Настоящее изобретение зарегистрировано вместе с перечнем последовательностей в электронном формате. Перечень последовательностей представлен в виде файла под названием BIOL0248WOSEQ\_ST25.txt, созданного 1 мая 2014 года, размером 16 Кб. Информация о перечне последовательностей в электронном формате в полном объеме включена в настоящий документ посредством ссылки.

### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Принцип, лежащий в основе антисмысловой технологии, заключается в том, что антисмысловое соединение гибридизуется с целевой нуклеиновой кислотой и модулирует количество, активность и/или функцию целевой нуклеиновой кислоты. Например, в некоторых случаях антисмысловые соединения приводят к изменению транскрипции или трансляции мишени. Такое модулирование экспрессии может быть достигнуто, например, разрушением целевой мРНК или ингибированием по механизму замещения. Пример модулирования целевой функции РНК за счет разрушения представляет собой разрушение за счет РНКазы Н целевой РНК при гибридизации с ДНК-подобным антисмысловым соединением. Другой пример модулирования генной экспрессии за счет направленного разрушения представляет собой РНК-интерференция (РНКи). РНКи относится к антисмысловому сайленсингу гена по механизму, в котором применяется РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга (RISC). Дополнительный пример модулирования целевой функции РНК представляет собой механизм замещения, такой как использует в естественных условиях микроРНК. МикроРНК представляют собой небольшие некодирующие РНК, которые регулируют экспрессию РНК, кодирующих белки. Связывание антисмыслового соединения с микроРНК препятствует связыванию микроРНК с ее матричными РНК мишенями, и, следовательно, затрудняет функцию микроРНК. МикроРНК-миметики могут усиливать естественную функцию микроРНК. Некоторые антисмысловые соединения изменяют сплайсинг пре-мРНК. Независимо от конкретного механизма, специфичность в отношении последовательностей делает антисмысловые соединения перспективными в качестве средств для подтверждения наличия цели и функционализации генов, а также в качестве терапевтических средств для селективного модулирования экспрессии генов, участвующих в патогенезе заболеваний.

Антисмысловая технология представляет собой эффективный способ модулирования экспрессии одного или более специфических генных продуктов и, следовательно, может быть признана исключительно подходящей в ряде терапевтических, диагностических и исследовательских применений. Химически модифицированные нуклеозиды могут быть внедрены в антисмысловые соединения для усиления одного или более свойств, таких как устойчивость к нуклеазе, фармакокинетика или аффинность к целевой нуклеиновой кислоте. В 1998 году антисмысловое соединение Vitravene® (фомивирсен; разработанный компанией Isis Pharmaceuticals Inc., Карлсбад, штат Калифорния) стал первым антисмысловым лекарством, получившим разрешение на продажу от Администрации США по пищевым продуктам и лекарственным веществам (FDA), и в настоящее время представляет собой средство для лечения вызванного цитомегалогеновирусом (CMV) ретинита у пациентов со СПИДом.

Новые химические модификации обладают улучшенной активностью и эффективностью антисмысловых соединений, раскрывая потенциал для пероральной доставки, а также для усовершенствования подкожного введения, снижения возможных побочных эффектов, и приводят к улучшению удобства для пациента. Химические модификации, усиливающие активность антисмысловых соединений, позволяют осуществлять введение более низких доз, что снижает возможность токсичности, а также уменьшает общую стоимость лечения. Модификации, увеличивающие устойчивость к разрушению, приводят к более медленному выведению из организма, обеспечивая возможность менее частого введения доз. Различные типы химических модификаций могут быть комбинированы в одном соединении для дальнейшей оптимизации эффективности соединения.

## **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

В некоторых вариантах реализации настоящего описания приведены конъюгированные антисмысловые соединения. В некоторых вариантах реализации настоящего описания приведены конъюгированные антисмысловые соединения, содержащие антисмысловый олигонуклеотид, комплементарный транскрипту нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации настоящего описания приведены способы, включающие контакт клетки с конъюгированным антисмысловым соединением, содержащим антисмысловый олигонуклеотид, комплементарный транскрипту нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации настоящего описания приведены способы, включающие контакт клетки с конъюгированным антисмысловым соединением,

содержащим антисмысловый олигонуклеотид, и уменьшение количества или активности транскрипта нуклеиновой кислоты в клетке.

Ранее был описан асиалогликопротеиновый рецептор (ASGP-R). См., например, Park et al., PNAS, том 102, № 47, сс. 17125-17129 (2005). Такие рецепторы экспрессируются на клетках печени, в частности, гепатоцитах. Кроме того, было показано, что соединения, содержащие кластеры трех N-ацетилгалактозаминных (GalNAc) лигандов, способны связываться с ASGP-R, приводя к захвату указанного соединения в клетку. См., например, Khorev et al., Bioorganic and Medicinal Chemistry, 16, 9, сс. 5216-5231 (май, 2008). Соответственно, конъюгаты, содержащие такие кластеры GalNAc, применяли для облегчения захвата некоторых соединений в клетки печени, в частности, гепатоциты. Например, было показано, что некоторые GalNAc-содержащие конъюгаты увеличивают активность дуплексных миРНК соединений в клетках печени *in vivo*. В таких случаях GalNAc-содержащий конъюгат, как правило, прикрепляется к смысловой спирали дуплекса миРНК. Поскольку смысловая спираль отбрасывается перед окончательной гибридизацией антисмысловой спирали с целевой нуклеиновой кислотой, то маловероятно, что такой конъюгат будет влиять на активность. Как правило, конъюгат присоединяется к 3'-концу смысловой спирали миРНК. См., например, патент США 8106022. Некоторые конъюгирующие группы, описанные в настоящем документе, более активны и/или синтезируются легче, чем конъюгирующие группы, описанные ранее.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения конъюгаты присоединяются к одноцепочечным антисмысловым соединениям, включая, но не ограничиваясь ими, антисмысловые соединения на основе РНКазы Н и антисмысловые соединения, которые изменяют сплайсинг целевой нуклеиновой кислоты пре-мРНК. В таких вариантах реализации изобретения конъюгат должен оставаться присоединенным к антисмысловому соединению достаточно долго для обеспечения преимущества (улучшенного захвата в клетки), но затем он должен либо расщепляться, либо иным образом не препятствовать последующим стадиям, необходимым для активности, таким как гибридизация с целевой нуклеиновой кислотой и взаимодействие с РНКазой Н или ферментами, связанными со сплайсингом или модулированием сплайсинга. Такой баланс свойств более важен при подготовке одноцепочечных антисмысловых соединений, чем соединений миРНК, где конъюгат может быть просто присоединен к смысловой спирали. В настоящем документе описаны одноцепочечные антисмысловые соединения, обладающие улучшенной активностью в клетках печени *in vivo*, по сравнению с таким же антисмысловым соединением, не имеющим конъюгата. Учитывая необходимый баланс

свойств для этих соединений, такая улучшенная активность является неожиданной.

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы по настоящему документу содержат расщепляемый фрагмент. Как было отмечено, не ограничиваясь каким-либо механизмом, логично, что конъюгат должен сохраняться у соединения достаточно долго для обеспечения усиления захвата, но после этого желательно, чтобы некоторая его часть или, в идеале, весь конъюгат расщеплялся, выделяя исходное соединение (например, антисмысловое соединение) в его наиболее активной форме. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент представляет собой расщепляемый нуклеозид. Такие варианты реализации изобретения используют эндогенные нуклеазы в клетке за счет присоединения остальной части конъюгата (кластера) к антисмысловому олигонуклеотиду через нуклеозид при помощи одной или более расщепляемых связей, таких как фосфодиэфирные связи. В некоторых вариантах реализации изобретения кластер связан с расщепляемым нуклеозидом через фосфодиэфирную связь. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый нуклеозид присоединен к антисмысловому олигонуклеотиду (антисмысловому соединению) фосфодиэфирной связью. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгирующая группа может содержать два или три расщепляемых нуклеозида. В таких вариантах реализации изобретения указанные расщепляемые нуклеозиды связаны друг с другом, с антисмысловым соединением и/или с кластером посредством расщепляемых связей (таких как фосфодиэфирная связь). Некоторые конъюгаты по настоящему документу не содержат расщепляемый нуклеозид, а вместо этого содержат расщепляемую связь. Показано, что достаточное расщепление конъюгата из олигонуклеотида обеспечивается по меньшей мере за счет одной связи, которая легко поддается расщеплению в клетке (расщепляемая связь).

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированные антисмысловые соединения представляют собой пролекарства. Такие пролекарства вводят животному, и они в конечном итоге метаболизируются до более активной формы. Например, конъюгированные антисмысловые соединения расщепляются с удалением всего или части конъюгата, приводя к активной (или более активной) форме антисмыслового соединения, не содержащего всего или части конъюгата.

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгаты присоединены на 5'-конце олигонуклеотида. Некоторые такие 5'-конъюгаты расщепляются более эффективно, чем аналоги, имеющие такую же конъюгирующую группу, присоединенную на 3'-конце. В некоторых вариантах реализации изобретения улучшенная активность может

коррелировать с улучшенным расщеплением. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды, содержащие конъюгат на 5'-конце, обладают более высокой эффективностью, чем олигонуклеотиды, содержащие конъюгат на 3'-конце (см., например, Примеры 56, 81, 83 и 84). Кроме того, 5'-присоединение обеспечивает более простой синтез олигонуклеотида. Как правило, олигонуклеотиды синтезируют на твердой подложке в направлении от 3' к 5'. Для получения 3'-конъюгированного олигонуклеотида, как правило присоединяют предварительно конъюгированный 3'-нуклеозид к твердой подложке, а затем обычным путем создают олигонуклеотид. Однако присоединение такого конъюгированного нуклеозида к твердой подложке усложняет синтез. Кроме того, применяя такой подход, конъюгат затем присутствует в ходе всего синтеза олигонуклеотида и может разрушаться во время последующих стадий или может ограничивать типы реакций и реагентов, которые можно применять. Применяя структуры и методики, описанные в настоящем документе для 5'-конъюгированных олигонуклеотидов, можно синтезировать олигонуклеотид при помощи стандартных автоматизированных методик и внедрять конъюгат вместе с последним (5'-крайний) нуклеозидом или после отделения олигонуклеотида от твердой подложки.

С учетом известного уровня техники и настоящего описания, специалисты в данной области техники могут легко получить любые из конъюгатов и конъюгированных олигонуклеотидов, описанных в настоящем документе. Кроме того, синтез некоторых таких конъюгатов и конъюгированных олигонуклеотидов, описанных в настоящем документе, проще и/или требует меньше стадий и, следовательно, менее дорогой, чем синтез ранее описанных конъюгатов, что дает преимущество при производстве. Например, синтез некоторых конъюгирующих групп состоит из меньшего количества синтетических стадий, что приводит к увеличению выхода, по сравнению с ранее описанными группами конъюгата. Конъюгирующие группы, такие как GalNAc3-10 в Примере 46 и GalNAc3-7 в Примере 48, гораздо проще, чем ранее описанные конъюгаты, такие как описаны в публикациях U.S. 8106022 или U.S. 7262177, для которых необходима сборка большего количества химических промежуточных соединений. Соответственно, эти и другие конъюгаты, описанные в настоящем документе, обладают преимуществом по сравнению с ранее описанными соединениями для применения с любым олигонуклеотидом, включая одноцепочечные олигонуклеотиды и любую спираль двухцепочечных олигонуклеотидов (например, мРНК).

Точно так же в настоящем документе описаны конъюгирующие группы, имеющие ровно один или два лиганда GalNAc. Как показано, такие конъюгированные группы

усиливают активность антисмысловых соединений. Такие соединения гораздо проще получить, чем конъюгаты, содержащие три лиганда GalNAc. Конъюгирующие группы, содержащие один или два лиганда GalNAc, могут быть присоединены к любым антисмысловым соединениям, включая одноцепочечные олигонуклеотиды и любую спираль двухцепочечных олигонуклеотидов (например, miРНК).

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгаты, описанные в настоящем документе, существенно не изменяют некоторые показатели переносимости. Например, в настоящем документе показано, что конъюгированные антисмысловые соединения являются не более иммуногенными, чем не конъюгированные исходные соединения. Поскольку активность улучшается, то варианты реализации, в которых переносимость остается такой же (или, в действительности, если даже переносимость ухудшается лишь незначительно, по сравнению с приростом активности), обладают улучшенными характеристиками для терапии.

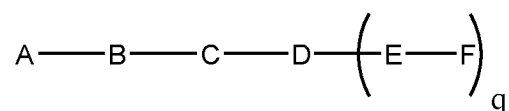
В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгация позволяет изменять антисмысловые соединения так, чтобы они обладали менее выраженными последствиями в отсутствие конъюгации. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения замена одной или более тиофосфатных связей полностью тиофосфатного антисмыслового соединения на фосфодиэфирные связи приводит к улучшению некоторых показателей переносимости. Например, в некоторых случаях такие антисмысловые соединения, имеющие один или более фосфодиэфиров, являются менее иммуногенными, чем такие же соединения, в которых каждая связь представляет собой тиофосфат. Однако в некоторых случаях, как показано в Примере 26, такое же замещение одной или более тиофосфатных связей на фосфодиэфирные связи приводит также к снижению клеточного захвата и/или к снижению активности. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированные антисмысловые соединения, описанные в настоящем документе, допускают такое изменение связей с небольшим снижением или без снижения захвата и активности, по сравнению с конъюгированным полностью тиофосфатным аналогом. В действительности, в некоторых вариантах реализации, например, в Примерах 44, 57, 59 и 86, олигонуклеотиды, содержащие конъюгат и по меньшей мере одну фосфодиэфирную межнуклеозидную связь, фактически демонстрируют повышенную активность *in vivo* даже по сравнению с полностью тиофосфатным аналогом, также содержащим такой же конъюгат. Более того, поскольку конъюгация приводит к значительному увеличению захвата/активности, то небольшое снижение такого существенного прироста может быть приемлемым для достижения улучшенной переносимости. Соответственно, в некоторых вариантах

реализации изобретения конъюгированные антисмысловые соединения содержат по меньшей мере одну фосфодиэфирную связь.

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгация антисмысловых соединений по настоящему документу приводит к улучшенной доставке, захвату и активности в гепатоцитах. Следовательно, в ткань печени доставляется большее количество соединения. Однако в некоторых вариантах реализации изобретения такая улучшенная доставка сама по себе не объясняет общего увеличения активности. В некоторых таких вариантах реализации изобретения большее количество соединения поступает в гепатоциты. В некоторых вариантах реализации изобретения даже такой улучшенный захват гепатоцитов сам по себе не объясняет общего увеличения активности. В таких вариантах реализации изобретения увеличивается продуктивный захват конъюгированного соединения. Например, как показано в Примере 102, некоторые варианты реализации GalNAc-содержащих конъюгатов увеличивают обогащение антисмысловых олигонуклеотидов в гепатоцитах, по сравнению с не паренхимальными клетками. Такое обогащение преимущественно для олигонуклеотидов, которые нацелены на гены, экспрессируемые в гепатоцитах.

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированные антисмысловые соединения по настоящему документу приводят к уменьшению воздействия на почки. Например, как показано в Примере 20, концентрации антисмысловых олигонуклеотидов, содержащих некоторые варианты реализации GalNAc-содержащих конъюгатов, в почках ниже, чем концентрации антисмысловых олигонуклеотидов, не имеющих GalNAc-содержащего конъюгата. Это имеет несколько благоприятных терапевтических эффектов. Для терапевтических показаний, в которых не требуется проявление активности в почках, воздействие на почки подвергает их риску токсичности без соответствующей пользы. Более того, высокая концентрация в почках обычно приводит к выводу соединения с мочой, обеспечивая более быстрое выведение. Соответственно, для внепочечных мишеней накопление в почках является нежелательным.

В некоторых вариантах реализации настоящего описания приведены конъюгированные антисмысловые соединения, представленные формулой:





где

A представляет собой антисмысловый олигонуклеотид;

B представляет собой расщепляемый фрагмент;

C представляет собой линкер конъюгата;

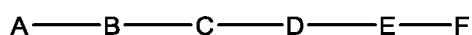
D представляет собой группу ветвления;

каждый E представляет собой связку;

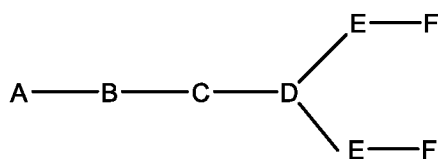
каждый F представляет собой лиганд; и

q представляет собой целое число от 1 до 5.

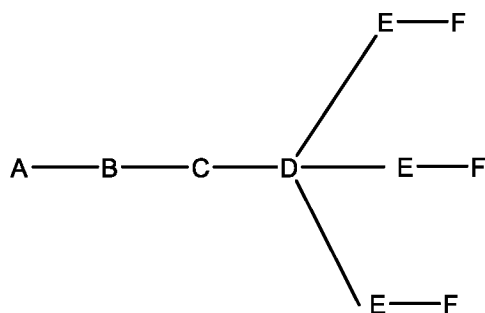
На приведенной выше схеме и в аналогичных схемах в настоящем документе группа ветвления «D» разветвляется такое количество раз, которое необходимо для соответствия количеству групп (E-F), указанному количеством «q». Так, если  $q = 1$ , то формула представляет собой:



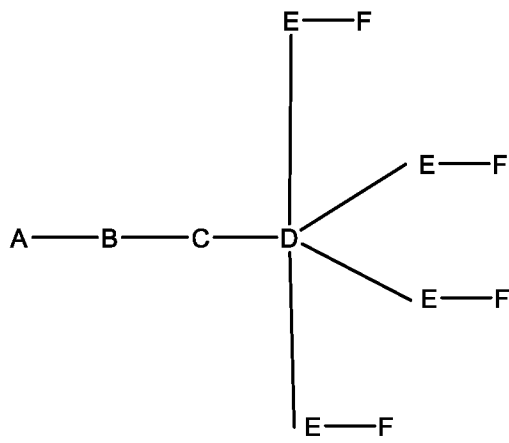
если  $q = 2$ , то формула представляет собой:



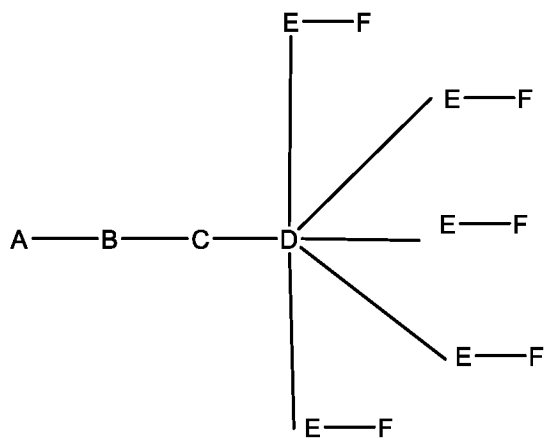
если  $q = 3$ , то формула представляет собой:



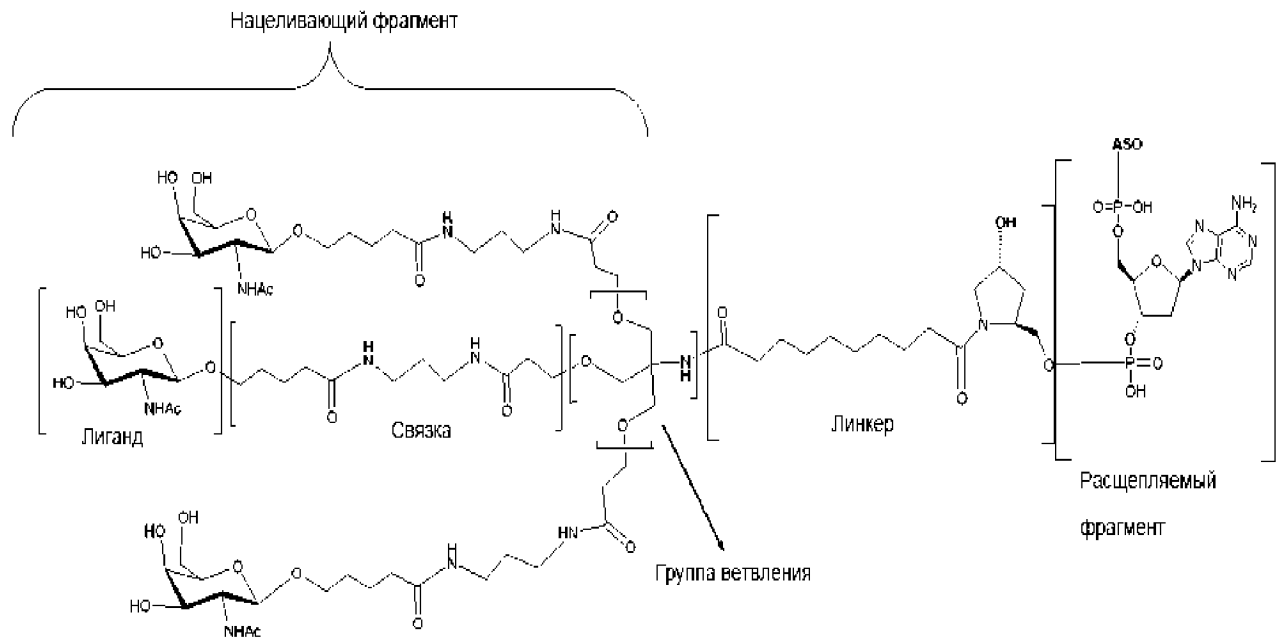
если  $q = 4$ , то формула представляет собой:



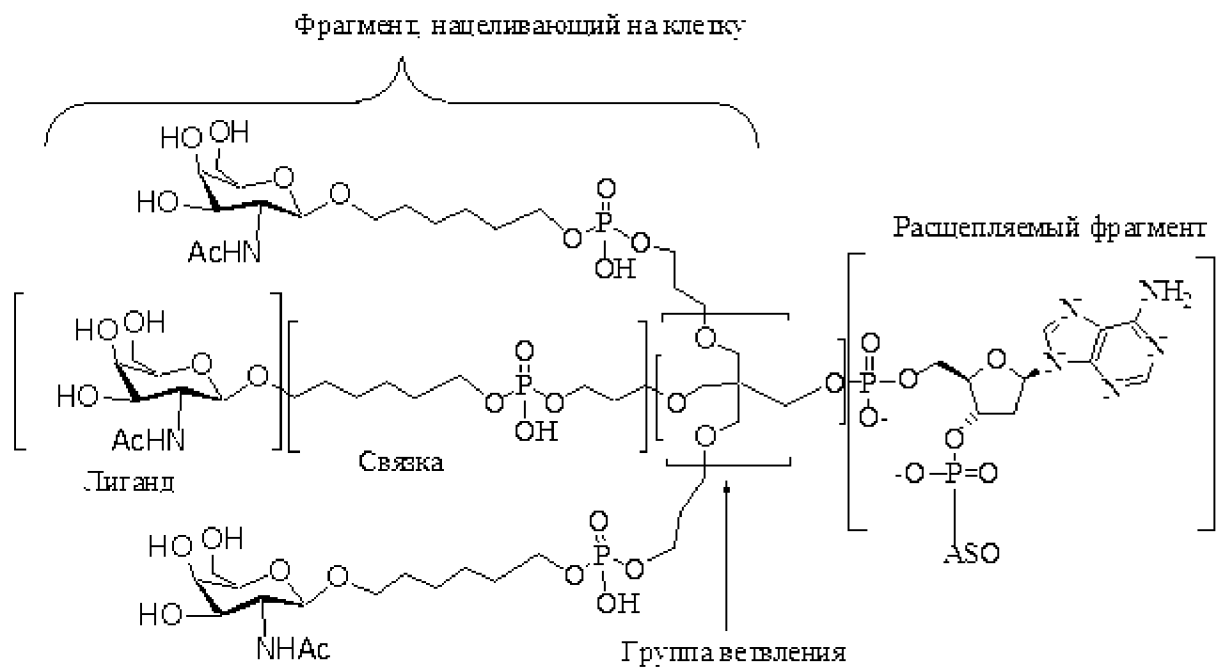
если  $q = 5$ , то формула представляет собой:



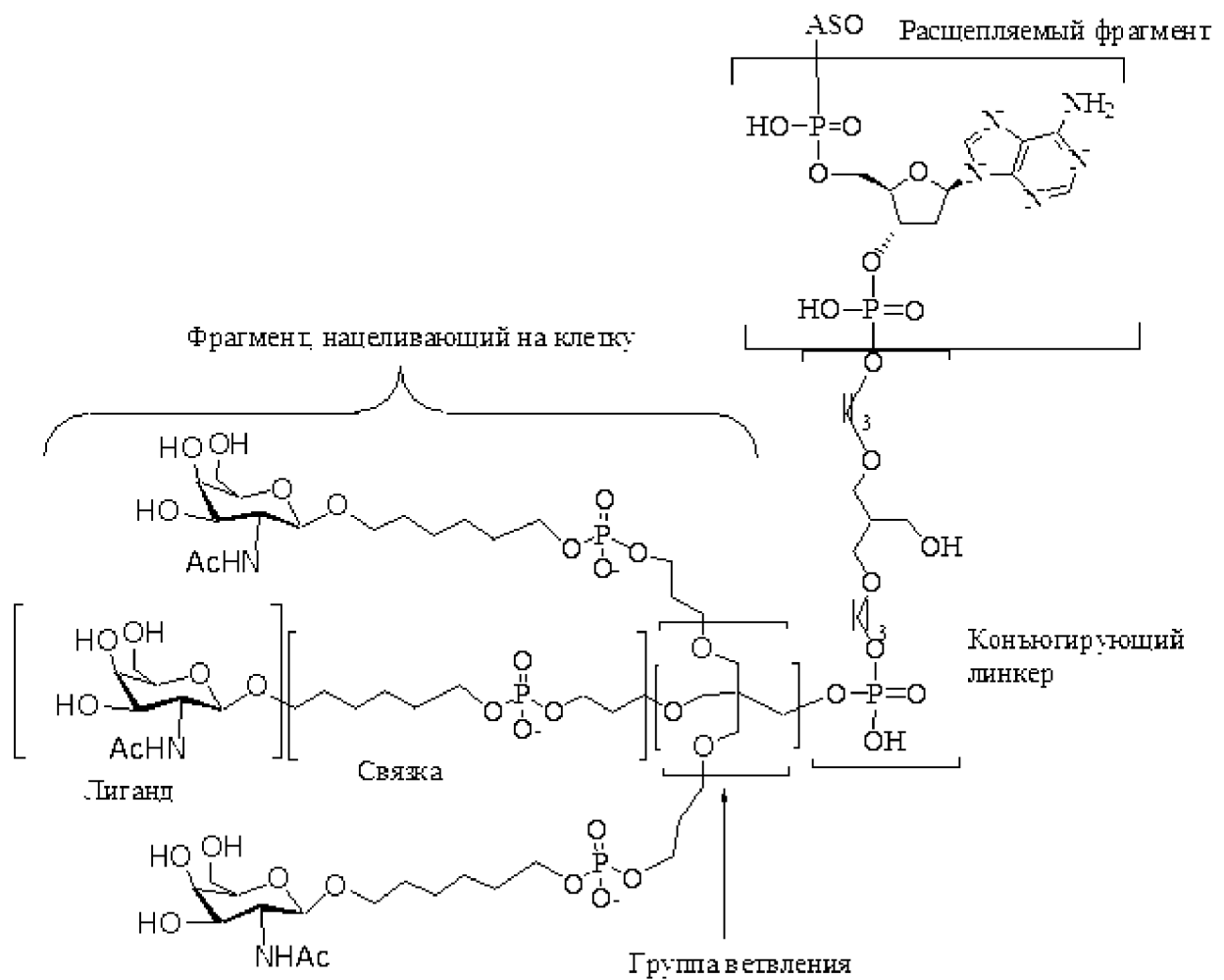
В некоторых вариантах реализации изобретения приведены конъюгированные антисмысловые соединения, имеющие структуру:



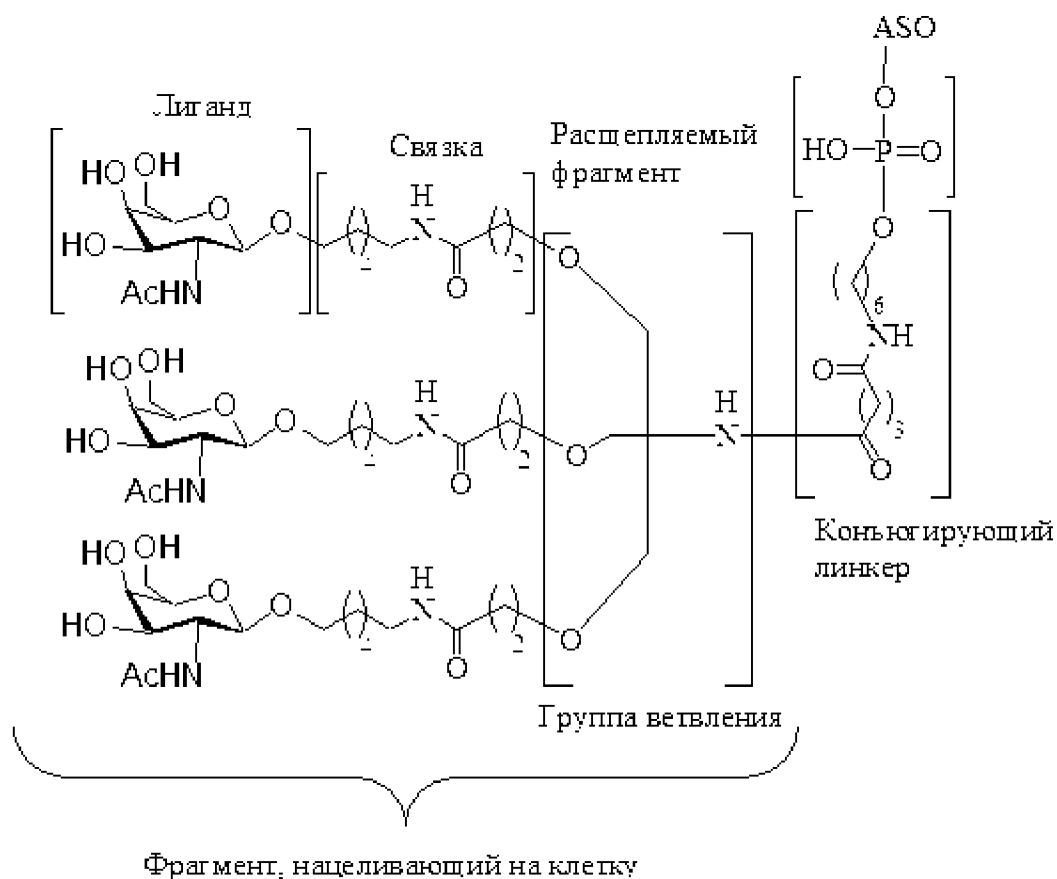
В некоторых вариантах реализации изобретения приведены конъюгированные антисмысловые соединения, имеющие структуру:



В некоторых вариантах реализации изобретения приведены конъюгированные антисмысловые соединения, имеющие структуру:



В некоторых вариантах реализации изобретения приведены конъюгированные антисмысловые соединения, имеющие структуру:



В вариантах реализации, имеющих более одной конкретной переменной (например, более одного «m» или «n»), если не указано иное, каждая такая конкретная переменная выбрана независимо. Следовательно, для структуры, имеющей более одного n, каждый n выбран независимо, так что они могут быть или не быть одинаковыми между собой.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Следует понимать, что и приведенное выше общее описание, и следующее подробное описание являются лишь иллюстративными и пояснительными, и они не ограничивают настоящее описание. В настоящем документе использование единственного числа включает множественное число, если специально не указано иное. При использовании в настоящем документе, термин «или» означает «и/или», если не указано иное. Кроме того, использование термина «включая», а также других форм, таких как «включает» и «включенный», не является ограничивающим. Также, такие термины как «элемент» или «компонент» охватывают как элементы и компоненты, содержащие одну единицу, так и элементы и компоненты, которые содержат более одной субъединицы, если

специально не указано иное.

Названия разделов, используемые в настоящем документе, предназначены лишь для организационных целей, и их не следует толковать как ограничение описанного объекта изобретения. Все документы или части документов, цитируемые в настоящей заявке, включая, но не ограничиваясь ими, патенты, патентные заявки, статьи, книги и монографии, в явной форме включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме для всех целей.

#### **A. Определения**

При отсутствии конкретных определений, номенклатура, используемая в связи с ними, а также в связи с приемами и методиками аналитической химии, синтетической органической химии, а также медицинской и фармацевтической химии, описанная в настоящем документе, является общеизвестной и общепринятой в данной области техники. Для химического синтеза и химического анализа могут быть использованы стандартные методики. Некоторые такие методики и приемы приведены, например, в публикациях “Carbohydrate Modifications in Antisense Research” под редакцией Sangvi и Cook, American Chemical Society, федеральный округ Вашингтон, 1994; “Remington's Pharmaceutical Sciences,” Mack Publishing Co., Истон, штат Пенсильвания, 21<sup>е</sup> издание, 2005; и “Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications” под редакцией Stanley T. Crooke, CRC Press, Бока-Ратон, штат Флорида; а также в книге Sambrook et al., “Molecular Cloning, A laboratory Manual,” 2<sup>е</sup> издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, которые включены в настоящий документ посредством ссылки для всех целей. Если это допустимо, все патенты, заявки, опубликованные заявки и другие публикации, а также другие данные, упоминаемые в тексте настоящего описания, включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Если не указано иное, следующие термины имеют следующие значения:

При использовании в настоящем документе, «нуклеозид» означает соединение, содержащее фрагмент азотистые основания и сахарный фрагмент. Нуклеозиды включают, но не ограничиваются ими, природные нуклеозиды (которые находятся в ДНК и РНК) и модифицированные нуклеозиды. Нуклеозиды могут быть связаны с фосфатным фрагментом.

При использовании в настоящем документе, «химическая модификация» означает химическое отличие в соединении, по сравнению с природным аналогом. Химические модификации олигонуклеотидов включают нуклеозидные модификации (включая

модификации сахарного фрагмента и модификации азотистые основания) и модификации межнуклеозидных связей. В отношении олигонуклеотида химическая модификация включает не только отличия в последовательности азотистых оснований.

При использовании в настоящем документе, «фуранозил» означает структуру, содержащую 5-членное кольцо, содержащее четыре атома углерода и один атом кислорода.

При использовании в настоящем документе, «природный сахарный фрагмент» означает рибофуранозил, встречающийся в природной РНК, или дезоксирибофуранозил, встречающийся в природной ДНК.

При использовании в настоящем документе, «сахарный фрагмент» означает природный сахарный фрагмент или модифицированный сахарный фрагмент нуклеозида.

При использовании в настоящем документе, «модифицированный сахарный фрагмент» означает замещенный сахарный фрагмент или заменитель сахара.

При использовании в настоящем документе, «замещенный сахарный фрагмент» означает фуранозил, который не является природным сахарным фрагментом. Замещенные сахарные фрагменты включают, но не ограничиваются ими, фуранозилы, содержащие заместители в 2'-положении, 3'-положении, 5'-положении и/или 4'-положении. Некоторые замещенные сахарные фрагменты представляют собой бициклические сахарные фрагменты.

При использовании в настоящем документе, «2'-замещенный сахарный фрагмент» означает фуранозил, содержащий заместитель в 2'-положении, отличный от H или OH. Если не указано иное, то 2'-замещенный сахарный фрагмент не является бициклическим сахарным фрагментом (т.е. 2'-заместитель 2'-замещенного сахарного фрагмента не образует мостик с другим атомом радикала фуранозного кольца).

При использовании в настоящем документе, «МОЕ» означает  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ .

При использовании в настоящем документе, «2'-F нуклеозид» относится к нуклеозиду, содержащему сахар, который содержит фтор в 2'-положении. Если не указано иное, то фтор в 2'-F нуклеозиде находится в рибо-положении (заменяя OH природной рибозы).

При использовании в настоящем документе, термин «заменитель сахара» означает структуру, которая не содержит фуранозила и способна заменять природный сахарный фрагмент нуклеозида, так что образующиеся нуклеозидные субъединицы могут связываться вместе и/или связываться с другими нуклеозидами с образованием

олигомерного соединения, которое может гибридизоваться с комплементарным олигомерным соединением. Такие структуры включают кольца, содержащие другое количество атомов, чем фуранозил (например, 4, 6 или 7-членные кольца); замену кислорода фуранозила некислородным атомом (например, углеродом, серой или азотом); или одновременное изменение количество атомов и замену кислорода. Такие структуры также могут содержать замещения, соответствующие замещениям, описанным для замещенных сахарных фрагментов (например, 6-членные карбоциклические бициклические заменители сахара, необязательно содержащие дополнительные заместители). Заменители сахара включают также более сложные сахарные заместители (например, некольцевые системы пептидной нуклеиновой кислоты). Заменители сахара включают, без ограничения, морфолино, циклогексенилы и циклогекситолы.

При использовании в настоящем документе, «бициклический сахарный фрагмент» означает модифицированный сахарный фрагмент, содержащий 4-7-членное кольцо (включая, но не ограничиваясь фуранозилом), содержащее мостик, связывающий два атома 4-7-членного кольца с образованием второго кольца, что приводит к получению бициклической структуры. В некоторых вариантах реализации изобретения 4-7-членное кольцо представляет собой сахарное кольцо. В некоторых вариантах реализации изобретения 4-7-членное кольцо представляет собой фуранозил. В некоторых таких вариантах реализации изобретения мостик соединяет 2'-углерод и 4'-углерод фуранозила.

При использовании в настоящем документе, «нуклеотид» означает нуклеозид, дополнительно содержащий фосфатную связывающую группу. При использовании в настоящем документе, «связанные нуклеозиды» могут быть или не быть связаны фосфатными связями и, следовательно, включают, но не ограничиваются ими, «связанные нуклеотиды». При использовании в настоящем документе, «связанные нуклеозиды» представляют собой нуклеозиды, которые связаны в непрерывную последовательность (т.е. между связанными нуклеозидами нет дополнительных нуклеозидов).

При использовании в настоящем документе, «азотистое основание» означает группу атомов, которая может быть связана с сахарным фрагментом с образованием нуклеозида, который может быть внедрен в олигонуклеотид, и при этом указанная группа атомов может связываться с комплементарным природным азотистым основанием другого олигонуклеотида или нуклеиновой кислоты. Азотистые основания могут быть природными или могут быть модифицированными.

При использовании в настоящем документе, термины «немодифицированное



азотистое основание» или «природное азотистое основание» означают природные гетероциклические азотистые основания РНК или ДНК: пуриновые основания аденин (А) и гуанин (G) и пиримидиновые основания тимин (Т), цитозин (С) (включая 5-метил С) и урацил (U).

При использовании в настоящем документе, «модифицированное азотистое основание» означает любое азотистое основание, которое не является природным азотистым основанием.

При использовании в настоящем документе, «модифицированный нуклеозид» означает нуклеозид, содержащий по меньшей мере одну химическую модификацию, по сравнению с природными нуклеозидами РНК или ДНК. Модифицированные нуклеозиды содержат модифицированный сахарный фрагмент и/или модифицированное азотистое основание.

При использовании в настоящем документе, «бициклический нуклеозид» или «BNA» означает нуклеозид, содержащий бициклический сахарный фрагмент.

При использовании в настоящем документе, «стерически затрудненный этил-нуклеозид» или «сEt» означает нуклеозид, содержащий бициклический сахарный фрагмент, который содержит мостик  $4' - \text{CH}(\text{CH}_3) - \text{O} - 2'$ .

При использовании в настоящем документе, «нуклеозид закрытой нуклеиновой кислоты» или «LNA» означает нуклеозид, содержащий бициклический сахарный фрагмент, который содержит мостик  $4' - \text{CH}_2 - \text{O} - 2'$ .

При использовании в настоящем документе, «2'-замещенный нуклеозид» означает нуклеозид, содержащий заместитель в 2'-положении, отличный от H или OH. Если не указано иное, то 2'-замещенный нуклеозид не является бициклическим нуклеозидом.

При использовании в настоящем документе, «дезоксинуклеозид» означает нуклеозид, содержащий 2'-H фуранозный сахарный фрагмент, находящийся в природных дезоксирибонуклеозидах (ДНК). В некоторых вариантах реализации изобретения 2'-дезоксинуклеозид может содержать модифицированное азотистое основание или может содержать азотистое основание РНК (например, урацил).

При использовании в настоящем документе, «олигонуклеотид» означает соединение, содержащее множество связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит один или более немодифицированных рибонуклеозидов (РНК) и/или немодифицированных дезоксирибонуклеозидов (ДНА), и/или один или более модифицированных нуклеозидов.

При использовании в настоящем документе, «олигонуклеозид» означает олигонуклеотид, в котором ни один из межнуклеозидных связей не содержит атом фосфора. При использовании в настоящем документе, олигонуклеотиды включают олигонуклеозиды.

При использовании в настоящем документе, «модифицированный олигонуклеотид» означает олигонуклеотид, содержащий по меньшей мере один модифицированный нуклеозид и/или по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь.

При использовании в настоящем документе, «связь» или «связывающая группа» означает группу атомов, которая связывает вместе две или более других групп атомов.

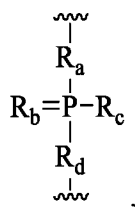
При использовании в настоящем документе, «межнуклеозидная связь» означает ковалентную связь между соседними нуклеозидами в олигонуклеотиде.

При использовании в настоящем документе, «природная межнуклеозидная связь» означает фосфодиэфирную связь 3' с 5'.

При использовании в настоящем документе, «модифицированная межнуклеозидная связь» означает любую межнуклеозидную связь, отличную от природной межнуклеозидной связи.

При использовании в настоящем документе, «концевая межнуклеозидная связь» означает связь между последними двумя нуклеозидами олигонуклеотида или его определенной области.

При использовании в настоящем документе, «фосфорная связывающая группа» означает связывающую группу, содержащую атом фосфора. Фосфорные связывающие группы включают, без ограничения, группы, имеющие формулу:



где:

$\text{R}_a$  и  $\text{R}_d$ , каждый независимо, представляют собой O, S,  $\text{CH}_2$ , NH или  $\text{NJ}_1$ , где  $\text{J}_1$  представляет собой  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$  алкил или замещенный  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$  алкил;

$\text{R}_b$  представляет собой O или S;

R<sub>c</sub> представляет собой OH, SH, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкокси, замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкокси, amino или замещенный amino; и

J<sub>1</sub> представляет собой R<sub>b</sub> представляет собой O или S.

Фосфорные связывающие группы включают, без ограничения, фосфодиэфир, тиофосфат, дитиофосфат, фосфонат, фосфорамидат, фосфортиоамидат, тионоалкилфосфонат, фосфотриэфиры, тионоалкилфосфотриэфиры и боранофосфат.

При использовании в настоящем документе, «межнуклеозидная фосфорная связывающая группа» означает фосфорную связывающую группу, которая напрямую связывает два нуклеозида.

При использовании в настоящем документе, «не межнуклеозидная фосфорная связывающая группа» означает фосфорную связывающую группу, которая не связывает напрямую два нуклеозида. В некоторых вариантах реализации изобретения не межнуклеозидная фосфорная связывающая группа связывает нуклеозид с группой, отличной от нуклеозида. В некоторых вариантах реализации изобретения не межнуклеозидная фосфорная связывающая группа связывает две группы, ни одна из которых не является нуклеозидом.

При использовании в настоящем документе, «нейтральная связывающая группа» означает связывающую группу, которая не имеет заряда. Нейтральные связывающие группы включают, без ограничения, фосфотриэфиры, метилфосфонаты, MMI (-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-), амид-3 (-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(H)-), амид-4 (-CH<sub>2</sub>-N(H)-C(=O)-), формацеталь (-O-CH<sub>2</sub>-O-) и тиоформацеталь (-S-CH<sub>2</sub>-O-). Дополнительные нейтральные связывающие группы включают неионные связи, содержащие силокасан (диалкилсилоксан), карбоновый сложный эфир, карбоксамид, сульфид, сульфоновый сложный эфир и амиды (см., например: Carbohydrate Modifications in Antisense Research; под ред. Y.S. Sanghvi и P.D. Cook, ACS Symposium, серия 580; главы 3 и 4, (сс. 40-65)). Дополнительные нейтральные связывающие группы включают неионные связи, содержащие смешанные составные части N, O, S и CH<sub>2</sub>.

При использовании в настоящем документе, «межнуклеозидная нейтральная связывающая группа» означает нейтральную связывающую группу, которая напрямую связывает два нуклеозида.

При использовании в настоящем документе, «не межнуклеозидная нейтральная

связывающая группа» означает нейтральную связывающую группу, которая не связывает напрямую два нуклеозида. В некоторых вариантах реализации изобретения не межнуклеозидная нейтральная связывающая группа связывает нуклеозид с группой, отличной от нуклеозида. В некоторых вариантах реализации изобретения не межнуклеозидная нейтральная связывающая группа связывает две группы, ни одна из которых не является нуклеозидом.

При использовании в настоящем документе, «олигомерное соединение» означает полимерную структуру, содержащую две или более субструктур. В некоторых вариантах реализации изобретения олигомерное соединение содержит олигонуклеотид. В некоторых вариантах реализации изобретения олигомерное соединение содержит одну или более конъюгированных групп и/или концевых групп. В некоторых вариантах реализации изобретения олигомерное соединение состоит из олигонуклеотида. Олигомерные соединения включают также природные нуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения олигомерное соединение содержит скелет одной или более связанных мономерных субъединиц, при этом каждая связанная мономерная субъединица прямо или косвенно присоединена к гетероциклическому основному фрагменту. В некоторых вариантах реализации изобретения олигомерные соединения могут содержать также мономерные субъединицы, которые не связаны с гетероциклическим основным фрагментом, обеспечивая таким образом сайты с удаленными основаниями. В некоторых вариантах реализации изобретения связи, соединяющие мономерные субъединицы, сахарные фрагменты или заменители и гетероциклические основные фрагменты, могут быть независимо модифицированы. В некоторых вариантах реализации изобретения единица связь-сахар, которая может содержать или не содержать гетероциклическое основание, может быть замещена миметиком, таким как мономеры в пептидных нуклеиновых кислотах.

При использовании в настоящем документе, «концевая группа» означает один или более атомов, присоединенных к любому или к обоим 3'- или 5'-концам олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения концевая группа представляет собой конъюгирующую группу. В некоторых вариантах реализации изобретения концевая группа содержит один или более нуклеозидов концевой группы.

При использовании в настоящем документе, «конъюгат» или «конъюгирующая группа» означает атом или группу атомов, связанную с олигонуклеотидом или олигомерным соединением. Как правило, конъюгирующие группы модифицируют одно или более свойств соединения, к которому они присоединены, включая, но не

ограничиваясь ими, свойства фармакодинамики, фармакокинетики, связывания, поглощения, клеточного распределения, клеточного захвата, заряда и/или выведения.

При использовании в настоящем документе, «линкер конъюгата» или «линкер» в контексте конъюгирующие группы означает часть конъюгирующие группы, содержащую любой атом или группу атомов и ковалентно связывающую (1) олигонуклеотид с другой частью конъюгирующие группы или (2) две или более частей конъюгирующие группы.

Конъюгирующие группы показаны в настоящем документе как радикалы, обеспечивающие связь для образования ковалентного присоединения к олигомерному соединению, такому как бессмысловый олигонуклеотид. В некоторых вариантах реализации изобретения точка присоединения у олигомерного соединения представляет собой 3'-атом кислорода 3'-гидроксильной группы 3'-концевого нуклеозида олигомерного соединения. В некоторых вариантах реализации изобретения точка присоединения у олигомерного соединения представляет собой 5'-атом кислорода 5'-гидроксильной группы 5'-концевого нуклеозида олигомерного соединения. В некоторых вариантах реализации изобретения связь для образования присоединения к олигомерному соединению представляет собой расщепляемую связь. В некоторых таких вариантах реализации изобретения такая расщепляемая связь составляет весь или часть расщепляемого фрагмента.

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы содержат расщепляемый фрагмент (например, расщепляемую связь или расщепляемый нуклеозид) и часть углеводного кластера, такую как часть кластера GalNAc. Такая часть углеводного кластера содержит: нацеливающий фрагмент и, необязательно, линкер конъюгата. В некоторых вариантах реализации изобретения часть углеводного кластера определяют по количеству и сущности лиганда. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения часть углеводного кластера содержит три группы GalNAc и обозначена «GalNAc<sub>3</sub>». В некоторых вариантах реализации изобретения часть углеводного кластера содержит 4 группы GalNAc и обозначена «GalNAc<sub>4</sub>». Конкретные части углеводных кластеров (имеющие конкретную связку, группы ветвления и линкера конъюгата) описаны в настоящем документе и обозначены римской цифрой с последующим нижним индексом «а». Соответственно, «GalNAc<sub>3-1a</sub>» относится к конкретной части углеводного кластера конъюгирующие группы, имеющей 3 группы GalNAc и конкретно определенную связку, группы ветвления и линкера. Такой фрагмент углеводного кластера присоединен к олигомерному соединению через расщепляемый фрагмент, такой как расщепляемая связь или расщепляемый нуклеозид.

При использовании в настоящем документе, «расщепляемый фрагмент» означает связь или группу, которая может быть расщеплена при физиологических условиях. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент расщепляется внутри клетки или во внутриклеточных отделах, таких как лизосома. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент расщепляется эндогенными ферментами, такими как нуклеазы. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент содержит группу атомов, имеющую один, два, три, четыре или более четырех расщепляемых связей.

При использовании в настоящем документе, «расщепляемая связь» означает любую химическую связь, которая может быть расщеплена. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемая связь выбрана из: амида, полиамида, сложного эфира, эфира, одного или обоих сложных эфиров фосфодиэфира, фосфатного сложного эфира, карбамата, дисульфида или пептида.

При использовании в настоящем документе, «углеводный кластер» означает соединение, имеющее один или более углеводных остатков, присоединенных к скелету или связывающей группе. (см., например, публикацию Maier et al., "Synthesis of Antisense Oligonucleotides Conjugated to a Multivalent Carbohydrate Cluster for Cellular Targeting," *Bioconjugate Chemistry*, 2003, (14): 18-29, которая в полном объеме включена в настоящий документ посредством ссылки, или Rensen et al., "Design and Synthesis of Novel *N*-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoproteins to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor," *J. Med. Chem.* 2004, (47): 5798-5808, где приведены примеры углеводных конъюгированных кластеров).

При использовании в настоящем документе, «производное углевода» означает любое соединение, которое может быть синтезировано с применением углевода в качестве исходного материала или промежуточного соединения.

При использовании в настоящем документе, «углевод» означает природный углевод, модифицированный углевод или производное углевода.

При использовании в настоящем документе, «защитная группа» означает любое соединение или защитную группу, известную специалистам в данной области техники. Не ограничивающие примеры защитных групп представлены в публикации "Protective Groups in Organic Chemistry", T. W. Greene, P. G. M. Wuts, ISBN 0-471-62301-6, John Wiley & Sons, Inc, Нью-Йорк, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

При использовании в настоящем документе, «одноцепочечное» означает олигомерное соединение, которое не гибридизовано с его комплементом и которое не имеет достаточной самокомплементарностью для образования устойчивого собственного дуплекса.

При использовании в настоящем документе, «двухцепочечное» означает пару олигомерных соединений, которые гибридизованы друг с другом, или одно самокомплементарное олигомерное соединение, которое образует шпилечную структуру. В некоторых вариантах реализации изобретения двухцепочечное олигомерное соединение содержит первое и второе олигомерное соединение.

При использовании в настоящем документе, «антисмысловое соединение» означает соединение, содержащее или состоящее из олигонуклеотида, по меньшей мере часть которого комплементарна целевой нуклеиновой кислоте, с которой возможна его гибридизация, что приводит к получению по меньшей мере одной антисмысловой активности.

При использовании в настоящем документе, «антисмысловая активность» означает любое обнаруживаемое и/или измеримое изменение, обусловленное гибридизацией антисмыслового соединения с его целевой нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловая активность включает модулирование количества или активности транскрипта целевой нуклеиновой кислоты (например, мРНК). В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловая активность включает модулирование сплайсинга пре-мРНК.

При использовании в настоящем документе, «антисмысловое соединение на основе РНКазы Н» означает антисмысловое соединение, в котором по меньшей мере часть антисмысловой активности антисмыслового соединения обусловлена гибридизацией антисмыслового соединения с целевой нуклеиновой кислотой и последующим расщеплением целевой нуклеиновой кислоты под действием РНКазы Н.

При использовании в настоящем документе, «антисмысловое соединение на основе RISC» означает антисмысловое соединение, в котором по меньшей мере часть антисмысловой активности антисмыслового соединения обусловлена РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC).

При использовании в настоящем документе, «обнаружение» или «измерение» означает, что выполнено испытание или анализ для обнаружения или измерения. Такое обнаружение и/или измерение может приводить к результату с нулевым значением.

Следовательно, даже если испытание для обнаружения или измерения приводит к обнаружению отсутствия активности (нулевой активности), то стадия обнаружения или измерения активности была выполнена.

При использовании в настоящем документе, «обнаруживаемая и/или измеримая активность» означает статистически значимую активность, которая не является нулевой.

При использовании в настоящем документе, «по существу не измененный» означает небольшое или отсутствие изменения конкретного параметра, в частности, по сравнению с другим параметром, который изменился гораздо больше. В некоторых вариантах реализации изобретения параметр является по существу не измененным, если его изменение составило менее 5%. В некоторых вариантах реализации изобретения параметр является по существу не измененным, если его изменение составило менее двух раз, тогда как изменение другого параметра составило по меньшей мере десять раз. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловая активность представляет собой изменение количества целевой нуклеиновой кислоты. В некоторых таких вариантах реализации изобретения количество нецелевой нуклеиновой кислоты является по существу не измененным, если оно изменяется гораздо меньше, чем изменяется количество целевой нуклеиновой кислоты, но это изменение не обязательно должно быть нулевым.

При использовании в настоящем документе, «экспрессия» означает процесс, посредством которого ген в конечном итоге преобразуется в белок. Экспрессия включает, но не ограничивается этим, транскрипцию, пост-транскрипционную модификацию (например, сплайсинг, полиаденилирование, добавление 5'-кэпа) и трансляцию.

При использовании в настоящем документе, «целевая нуклеиновая кислота» означает молекулу нуклеиновой кислоты, с которой предполагается гибридизация антисмыслового соединения с получением желаемой антисмысловой активности. Антисмысловые олигонуклеотиды обладают достаточной комплементарностью их целевым нуклеиновым кислотам для обеспечения гибридизации при физиологических условиях.

При использовании в настоящем документе, «комплементарность азотистых оснований» или «комплементарность» в отношении азотистых оснований означает азотистое основание, которое способно к спариванию оснований с другим азотистым основанием. Например, в ДНК аденин (А) комплементарен тимину (Т). Например, в РНК аденин (А) комплементарен урацилу (У). В некоторых вариантах реализации изобретения комплементарное азотистое основание означает азотистое основание антисмыслового



соединения, которое способно к спариванию оснований с азотистым основанием его целевой нуклеиновой кислоты. Например, если азотистое основание в определенном положении антисмыслового соединения способно к водородному связыванию с азотистым основанием в определенном положении целевой нуклеиновой кислоты, то это положение водородного связывания между олигонуклеотидом и целевой нуклеиновой кислотой считается комплементарным по этой паре азотистых оснований. Азотистые основания, содержащие определенные модификации, могут сохранять способность к спариванию с противоположным азотистым основанием и, следовательно, все еще могут обладать комплементарностью азотистых оснований.

При использовании в настоящем документе, «не комплементарные» в отношении азотистых оснований означает пару азотистых оснований, которые не образуют водородные связи друг с другом.

При использовании в настоящем документе, «комплементарные» в отношении олигомерных соединений (например, связанных нуклеозидов, олигонуклеотидов или нуклеиновых кислот) означает способность таких олигомерных соединений или их областей к гибридизации с другим олигомерным соединением или его областью за счет комплементарности азотистых оснований. Комплементарные олигомерные соединения не обязательно должны обладать комплементарностью азотистых оснований в каждом нуклеозиде. До не которой степени допустимы некоторые несоответствия. В некоторых вариантах реализации изобретения комплементарные олигомерные соединения или области комплементарны по 70% азотистых оснований (комплементарность 70%). В некоторых вариантах реализации изобретения комплементарные олигомерные соединения или области комплементарны на 80%. В некоторых вариантах реализации изобретения комплементарные олигомерные соединения или области комплементарны на 90%. В некоторых вариантах реализации изобретения комплементарные олигомерные соединения или области комплементарны на 95%. В некоторых вариантах реализации изобретения комплементарные олигомерные соединения или области комплементарны на 100%.

При использовании в настоящем документе, «несоответствие» означает азотистое основание первого олигомерного соединения, которое не способно спариваться с азотистым основанием в соответствующем положении второго олигомерного соединения при выравнивании первого и второго олигомерного соединения. Любое или оба первое и второе олигомерные соединения могут быть олигонуклеотидами.

При использовании в настоящем документе, «гибридизация» означает спаривание комплементарных олигомерных соединений (например, антисмыслового соединения и его

целевой нуклеиновой кислоты). Не ограничиваясь конкретным механизмом, наиболее распространенный механизм спаривания включает водородное связывание, которое может представлять собой уотсон-криковское, хугстиновское или обратное хугстиновское водородное связывание между комплементарными азотистыми основаниями.

При использовании в настоящем документе, «специфически гибридизуется» означает способность олигомерного соединения гибридизоваться с одним сайтом нуклеиновой кислоты с большей аффинностью, чем оно гибридизуется с другим сайтом нуклеиновой кислоты.

При использовании в настоящем документе, «полностью комплементарный» в отношении олигонуклеотида или его части означает, что каждое азотистое основание олигонуклеотида или его части способно к спариванию с азотистым основанием комплементарной нуклеиновой кислоты или ее непрерывной частью. Следовательно, полностью комплементарная область не содержит несоответствий или не гибридизованных азотистых оснований в обеих спиралях.

При использовании в настоящем документе, «процент комплементарности» означает процент азотистых оснований олигомерного соединения, которые комплементарны равной по длине части целевой нуклеиновой кислоты. Процент комплементарности рассчитывают делением количества азотистых оснований олигомерного соединения, которые комплементарны азотистым основаниям в соответствующих положениях целевой нуклеиновой кислоты, на общую длину олигомерного соединения.

При использовании в настоящем документе, «процент идентичности» означает количество азотистых оснований в первой нуклеиновой кислоте, которые относятся к тому же типу (независимо от химической модификации), что и азотистые основания в соответствующих положениях второй нуклеиновой кислоты, деленное на общее количество азотистых оснований в первой нуклеиновой кислоте.

При использовании в настоящем документе, «модулирование» означает изменение количества или качества молекулы, функции или активности, по сравнению с количеством или качеством молекулы, функции или активности до модулирования. Например, модулирование включает изменение, как увеличение (стимуляцию или индукцию), так и снижение (ингибирование или уменьшение) генной экспрессии. В качестве дополнительного примера, модулирование экспрессии может включать изменение выбора сайта сплайсинга при процессинге пре-мРНК, что приводит к изменению абсолютного или

относительного количества определенного сплайс-варианта, по сравнению с его количеством в отсутствие модулирования.

При использовании в настоящем документе, «химический мотив» означает характерный участок химических модификаций в олигонуклеотиде или его области. Мотивы могут быть определены по модификациям в определенных нуклеозидах и/или в определенных связывающих группах олигонуклеотида.

При использовании в настоящем документе, «нуклеозидный мотив» означает характерный участок нуклеозидных модификаций в олигонуклеотиде или его области. Связи такого олигонуклеотида могут быть модифицированными или немодифицированными. Если не указано иное, мотивы, описывающие в настоящем документе только нуклеозиды, представляют собой нуклеозидные мотивы. Следовательно, в таких случаях связи не ограничены.

При использовании в настоящем документе, «сахарный мотив» означает характерный участок сахарных модификаций в олигонуклеотиде или его области.

При использовании в настоящем документе, «связывающий мотив» означает характерный участок связывающих модификаций в олигонуклеотиде или его области. Нуклеозиды такого олигонуклеотида могут быть модифицированными или немодифицированными. Если не указано иное, мотивы, описывающие в настоящем документе только связи, представляют собой связывающие мотивы. Следовательно, в таких случаях нуклеозиды не ограничены.

При использовании в настоящем документе, «мотив модификации азотистых оснований» означает характерный участок модификаций азотистых оснований вдоль олигонуклеотида. Если не указано иное, то мотив модификации азотистых оснований не зависит от последовательности азотистых оснований.

При использовании в настоящем документе, «мотив последовательности» означает характерный участок азотистых оснований, расположенных вдоль олигонуклеотида или его части. Если не указано иное, то мотив последовательности не зависит от химических модификаций и, следовательно, может иметь любую комбинацию химических модификация, включая отсутствие химических модификаций.

При использовании в настоящем документе, «тип модификации» в отношении нуклеозида или нуклеотида определенного «типа» означает химическую модификацию нуклеозида и включает модифицированные и немодифицированные нуклеозиды.

Соответственно, если не указано иное, «нуклеозид, имеющий модификацию первого типа» может быть немодифицированным нуклеозидом.

При использовании в настоящем документе, «по-разному модифицированные» означает химические модификации или химические заместители, которые отличны друг от друга, включая их отсутствие или модификации. Так, например, МОЕ нуклеозид и немодифицированный нуклеозид ДНК являются «по-разному модифицированными», даже несмотря на то, что нуклеозид ДНК является немодифицированным. Точно так же, ДНК и РНК являются «по-разному модифицированными», даже несмотря на то, что оба представляют собой природные немодифицированные нуклеозиды. Нуклеозиды, которые являются одинаковыми, но содержат различные азотистые основания, не являются по-разному модифицированными. Например, нуклеозид, содержащий 2'-ОМе модифицированный сахар и немодифицированное адениновое нуклеобазовое основание, и нуклеозид, содержащий 2'-ОМе модифицированный сахар и немодифицированное тиминное азотистое основание, не являются по-разному модифицированными.

При использовании в настоящем документе, «модификации одного типа» относится к модификациям, которые являются одинаковыми друг относительно друга, включая отсутствие модификаций. Так, например, два немодифицированных нуклеозида ДНК имеют «модификацию одного типа», даже несмотря на то, что нуклеозид ДНК является немодифицированным. Такие нуклеозиды, имеющие модификацию одного типа, могут содержать различные азотистые основания.

При использовании в настоящем документе, «отдельные области» означает части олигонуклеотида, в которых химические модификации или мотив химических модификаций любой из соседних частей содержит по меньшей мере одно отличие для обеспечения возможности различать области друг от друга.

При использовании в настоящем документе, «фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель» означает любое вещество, подходящее для применения при введении животному. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель представляет собой стерильный солевой раствор. В некоторых вариантах реализации изобретения такой стерильный солевой раствор представляет собой солевой раствор фармацевтической марки.

При использовании в настоящем документе, термин «метаболическое расстройство» означает заболевание или патологическое состояние, которое характеризуется, прежде всего, дисрегуляцией метаболизма - сложного набора химических реакций, связанных с

расщеплением пищи с выработкой энергии.

При использовании в настоящем документе, термин «сердечно-сосудистое расстройство» означает заболевание или патологическое состояние, которое характеризуется, прежде всего, ухудшенной функцией сердца или кровеносных сосудов.

При использовании в настоящем документе, термин «моно- или полициклическая кольцевая система» включает все кольцевые системы, выбранные из одиночных или полициклических радикальных кольцевых систем, в которых указанные кольца конденсированы или связаны, и включает одиночные или смешанные кольцевые системы, индивидуально выбранные из алифатических, алициклических, арильных, гетероарильных, аралкильных, арилалкильных, гетероциклических, гетероарильных, гетероароматических и гетероарилалкильных. Такие моно- и полициклические структуры могут содержать кольца, каждое из которых имеет одинаковую степень насыщенности, или каждое независимо имеет переменные степени насыщенности, включая полностью насыщенные, частично насыщенные или полностью ненасыщенные. Каждое кольцо может содержать кольцевые атомы, выбранные из С, N, O и S с образованием гетероциклических колец, а также колец, содержащих только кольцевые атомы С, которые могут быть представлены в смешанном мотиве, как, например, в бензимидазоле, в котором одно кольцо имеет только кольцевые атомы углерода, а конденсированное кольцо имеет два атома азота. Моно- или полициклическая кольцевая система может быть дополнительно замещена группами заместителей, как, например, фталимид, который имеет две группы =O, присоединенные к одному из колец. Моно- или полициклические кольцевые системы могут быть присоединены к исходным молекулам при помощи различных способов, таких как непосредственно через кольцевой атом, путем конденсации через несколько кольцевых атомов, через группу заместителя или через бифункциональный связывающий фрагмент.

При использовании в настоящем документе, «пролекарство» означает неактивную или менее активную форму соединения, которая при введении субъекту метаболизируется с образованием активного или более активного соединения (например, лекарства).

При использовании в настоящем документе, «заместитель» и «группа заместителя» означает атом или группу, которая вытесняет атом или группу указанного исходного соединения. Например, заместитель модифицированного нуклеозида представляет собой любой атом или группу, которая отлична от атома или группы, находящейся в природном нуклеозиде (например, модифицированный 2'-заместитель представляет собой любой атом или группу в 2'-положении нуклеозида, отличную от H или OH). Группы заместителей

могут быть защищенными или не защищенными. В некоторых вариантах реализации изобретения соединения настоящего описания имеют заместители в одном или более чем в одном положении исходного соединения. Заместители также могут быть дополнительно замещены другими группами заместителей и могут быть присоединены напрямую или через связывающую группу, такую как алкильная или углеводородная группа, к исходному соединению.

Точно так же, при использовании в настоящем документе, «заместитель» в отношении химической функциональной группы означает атом или группу атомов, которая отлична от атома или группы атомов, обычно содержащихся в указанной функциональной группе. В некоторых вариантах реализации изобретения заместитель вытесняет атом водорода функциональной группы (например, в некоторых вариантах реализации изобретения заместитель замещенной метильной группы представляет собой атом или группу, отличную от водорода, которая вытесняет один или более атомов водорода незамещенной метильной группы). Если не указано иное, группы, которые могут быть использованы в качестве заместителей, включают, без ограничения, галоген, гидроксил, алкил, алкенил, алкинил, ацил ( $-C(O)R_{aa}$ ), карбоксил ( $-C(O)O-R_{aa}$ ), алифатические группы, алициклические группы, алкокси, замещенный окси ( $-O-R_{aa}$ ), арил, аралкил, гетероциклический радикал, гетероарил, гетероарилалкил, amino ( $-N(R_{bb})(R_{cc})$ ), имино ( $=NR_{bb}$ ), амидо ( $-C(O)N(R_{bb})(R_{cc})$  или  $-N(R_{bb})C(O)R_{aa}$ ), азидо ( $-N_3$ ), нитро ( $-NO_2$ ), циано ( $-CN$ ), карбамидо ( $-OC(O)N(R_{bb})(R_{cc})$  или  $-N(R_{bb})C(O)OR_{aa}$ ), уреидо ( $-N(R_{bb})C(O)N(R_{bb})(R_{cc})$ ), тиоуреидо ( $-N(R_{bb})C(S)N(R_{bb})(R_{cc})$ ), гуанидинил ( $-N(R_{bb})C(=NR_{bb})N(R_{bb})(R_{cc})$ ), амидинил ( $-C(=NR_{bb})N(R_{bb})(R_{cc})$  или  $-N(R_{bb})C(=NR_{bb})(R_{aa})$ ), тиол ( $-SR_{bb}$ ), сульфинил ( $-S(O)R_{bb}$ ), сульфонил ( $-S(O)_2R_{bb}$ ) и сульфонамидил ( $-S(O)_2N(R_{bb})(R_{cc})$  или  $-N(R_{bb})S(O)_2R_{bb}$ ). Где каждый  $R_{aa}$ ,  $R_{bb}$  и  $R_{cc}$  независимо представляет собой H, необязательно связанную химическую функциональную группу или дополнительную группу заместителя, при этом предпочтительный перечень включает, без ограничения, алкил, алкенил, алкинил, алифатические, алококси, ацил, арил, аралкил, гетероарил, алициклические, гетероциклические и гетероарилалкил. Выбранные заместители с соединениями, описанными в настоящем документе, находятся в рекурсивной степени.

При использовании в настоящем документе, «алкил», используемый в настоящем документе, означает насыщенный прямой или разветвленный углеводородный радикал, содержащий до двадцати четырех атомов углерода. Примеры алкильных групп включают, без ограничения, метил, этил, пропил, бутил, изопропил, н-гексил, октил, децил, додецил и т.п. Алкильные группы обычно содержат от 1 до около 24 атомов углерода, более часто от

1 до около 12 атомов углерода ( $C_1$ - $C_{12}$  алкил), при этом более предпочтительно от 1 до около 6 атомов углерода.

При использовании в настоящем документе, «алкенил» означает прямой или разветвленный углеводородный радикал, содержащий до двадцати четырех атомов углерода и имеющий по меньшей мере одну двойную углерод-углеродную связь. Примеры алкенильных групп включают, без ограничения, этенил, пропенил, бутенил, 1-метил-2-бутен-1-ил, диены, такие как 1,3-бутадиен и т.п. Алкенильные группы обычно содержат от 2 до около 24 атомов углерода, более часто от 2 до около 12 атомов углерода, при этом более предпочтительно от 2 до около 6 атомов углерода. Алкенильные группы, используемые в настоящем документе, могут необязательно содержать одну или более дополнительных групп заместителей.

При использовании в настоящем документе, «алкинил» означает прямой или разветвленный углеводородный радикал, содержащий до двадцати четырех атомов углерода и имеющий по меньшей мере одну тройную углерод-углеродную связь. Примеры алкинильных групп включают, без ограничения, этинил, 1-пропинил, 1-бутинил и т.п. Алкинильные группы обычно содержат от 2 до около 24 атомов углерода, более часто от 2 до около 12 атомов углерода, при этом более предпочтительно от 2 до около 6 атомов углерода. Алкинильные группы, используемые в настоящем документе, могут необязательно содержать одну или более дополнительных групп заместителей.

При использовании в настоящем документе, «ацил» означает радикал, образованный за счет удаления гидроксильной группы от органической кислоты, и имеет общую формулу  $-C(O)-X$ , где X обычно является алифатическим, алициклическим или ароматическим. Примеры включают алифатические карбонилы, ароматические карбонилы, алифатические сульфонилы, ароматические сульфинилы, алифатические сульфинилы, ароматические фосфаты, алифатические фосфаты и т.п. Ацильные группы, используемые в настоящем документе, могут необязательно содержать дополнительные группы заместителей.

При использовании в настоящем документе, «алициклическая» означает циклическую кольцевую систему, в которой кольцо является алифатическим. Кольцевая система может содержать одно или более колец, при этом по меньшей мере одно кольцо является алифатическим. Предпочтительные алициклические системы включают кольца, имеющие от около 5 до около 9 атомов углерода в кольце. Алициклические группы, используемые в настоящем документе, могут необязательно содержать дополнительные группы заместителей.

При использовании в настоящем документе, «алифатический» означает прямой или разветвленный углеводородный радикал, содержащий до двадцати четырех атомов углерода, в котором насыщенность между любыми двумя атомами углерода представляет собой одинарную, двойную или тройную связь. Алифатическая группа предпочтительно содержит от 1 до около 24 атомов углерода, более часто от 1 до около 12 атомов углерода, при этом более предпочтительно от 1 до около 6 атомов углерода. Прямая или разветвленная цепь алифатической группы может быть прервана одним или более гетероатомами, которые включают азот, кислород, серу и фосфор. Такие алифатические группы, прерванные гетероатомами, включают, без ограничения, полиалкокси, такие как полиалкиленгликоли, полиамины и полиимины. Алифатические группы, используемые в настоящем документе, могут необязательно содержать дополнительные группы заместителей.

При использовании в настоящем документе, «алкокси» означает радикал, образованный между алкильной группой и атомом кислорода, при этом атом кислорода применяется для присоединения алкокси-группы к исходной молекуле. Примеры алкокси-групп включают, без ограничения, метокси, этокси, пропокси, изопропокси, н-бутокси, втор-бутокси, *трет*-бутокси, н-пентокси, неопентокси, н-гексокси и т.п. Алкокси-группы, используемые в настоящем документе, могут необязательно содержать дополнительные группы заместителей.

При использовании в настоящем документе, «аминоалкил» означает аминозамещенный C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> алкильный радикал. Алкильная часть указанного радикала образует ковалентную связь с исходной молекулой. Аминогруппа может быть расположена в любом положении, и аминоалкильная группа может быть замещена дополнительной группой заместителя в алкильной и/или амино-части.

При использовании в настоящем документе, «аралкил» и «арилалкил» означает ароматическую группу, которая ковалентно связана с C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> алкильным радикалом. Часть алкильного радикала образовавшейся аралкильной (или арилалкильной) группы образует ковалентную связь с исходной молекулой. Примеры включают, без ограничения, бензил, фенетил и т.п. Аралкильные группы, используемые в настоящем документе, могут необязательно содержать дополнительные группы заместителей, присоединенные к алкильной, арильной или к обеим группам, которые образуют указанную радикальную группу.



При использовании в настоящем документе, «арил» и «ароматический» означает радикалы моно- или полициклической карбоциклической кольцевой системы, имеющие одно или более ароматических колец. Примеры арильных групп включают, без ограничения, фенил, нафтил, тетрагидронафтил, инданил, инденил и т.п. Предпочтительные арильные кольцевые системы имеют от около 5 до около 20 атомов углерода в одном или более кольцах. Арильные группы, используемые в настоящем документе, могут необязательно содержать дополнительные группы заместителей.

При использовании в настоящем документе, «галоген» и «галоген» означает атом, выбранный из фтора, хлора, брома и йода.

При использовании в настоящем документе, «гетероарил» и «гетероароматический» означает радикал, содержащий моно- или полициклическое ароматическое кольцо, кольцевую систему или конденсированную кольцевую систему, в котором по меньшей мере одно из колец является ароматическим и содержит один или более гетероатомов. Гетероарил включает также конденсированные кольцевые системы, включая системы, в которых одно или более из конденсированных колец не содержат гетероатомов. Гетероарильные группы, как правило, содержат один кольцевой атом, выбранный из серы, азота или кислорода. Примеры гетероарильных групп включают, без ограничения, пиридинил, пирозинил, пиримидинил, пирролил, пиразолил, имидазолил, тиазолил, оксазолил, изооксазолил, тиadiaзолил, оксадиазолил, тиофенил, фуранил, хинолинил, изохинолинил, бензимидазолил, бензоксазолил, хиноксалинил и т.п. Гетероарильные радикалы могут быть присоединены к исходной молекуле напрямую или через связывающий фрагмент, такой как алифатическая группа или гетероатом. Гетероарильные группы, используемые в настоящем документе, могут необязательно содержать дополнительные группы заместителей.

При использовании в настоящем документе, «конъюгированное соединение» означает любые атомы, группы атомов или группу связанных атомов, подходящую для применения в качестве конъюгирующие группы. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированные соединения могут обладать или влиять на одно или более свойств, включая, но не ограничиваясь этим, свойства фармакодинамики, фармакокинетики, связывания, адсорбции, клеточного распределения, клеточного захвата, заряда и/или выведения.

При использовании в настоящем документе, если не указано или немодифицировано иным образом, «двухцепочечные» относится к двум отдельным олигомерным соединениям,

которые гибридизованы друг с другом. Такие двухцепочечные соединения могут иметь один или более не гибридизованных нуклеозидов у одного или обоих концов одной или обеих спиралей (выступы) и/или один или более внутренних не гибридизованных нуклеозидов (несоответствий), при условии, что существует достаточная комплементарность для сохранения гибридизации при физиологически релевантных условиях.

## **В. Некоторые соединения**

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения приведены конъюгированные антисмысловые соединения, содержащие антисмысловые олигонуклеотиды и конъюгат.

### **а. Некоторые антисмысловые олигонуклеотиды**

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения приведены антисмысловые олигонуклеотиды. Такие антисмысловые олигонуклеотиды содержат связанные нуклеозиды, и каждый нуклеозид содержит сахарный фрагмент и азотистое основание. Структура таких антисмысловых олигонуклеотидов может быть рассмотрена с точки зрения химических особенностей (например, модификаций и характерных участков модификаций) и последовательности азотистых оснований (например, последовательность антисмыслового олигонуклеотида, сущность и последовательность целевой нуклеиновой кислоты).

### **і. Некоторые химические особенности**

В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловый олигонуклеотид содержит одну или более модификаций. В некоторых таких вариантах реализации изобретения антисмысловые олигонуклеотиды содержат один или более модифицированных нуклеозидов и/или модифицированных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения модифицированные нуклеозиды содержат модифицированный сахарный фрагмент и/или модифицированное азотистое основание.

### **1. Некоторые сахарные фрагменты**

В некоторых вариантах реализации изобретения соединения настоящего описания содержат один или более модифицированных нуклеозидов, содержащих модифицированный сахарный фрагмент. Такие соединения, содержащие один или более модифицированных по сахару нуклеозидов, могут обладать желаемыми свойствами, такими как улучшенная стабильность к нуклеазе или увеличенная связывающая аффинность к целевой нуклеиновой кислоте, по сравнению с олигонуклеотидом, содержащим только нуклеозиды, которые содержат природные сахарные фрагменты. В некоторых вариантах реализации изобретения модифицированные сахарные фрагменты представляют собой замещенные сахарные фрагменты. В некоторых вариантах реализации изобретения модифицированные сахарные фрагменты представляют собой заменители сахара. Такие заменители сахара могут содержать одно или более замещений, соответствующих замещениям замещенных сахарных фрагментов.

В некоторых вариантах реализации изобретения модифицированные сахарные фрагменты представляют собой замещенные сахарные фрагменты, содержащие один или более немостиковых сахарных заместителей, включая, но не ограничиваясь этим, заместители в 2' и/или 5'-положениях. Примеры заместителей сахара, подходящих для 2'-положения, включают, но не ограничиваются ими: 2'-F, 2'-OCH<sub>3</sub> («OMe» или «О-метил») и 2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> («МОЕ»). В некоторых вариантах реализации изобретения заместитель сахара в 2'-положении выбран из аллила, amino, азидо, тио, О-аллила, О-С<sub>1</sub>-С<sub>10</sub> алкила, О-С<sub>1</sub>-С<sub>10</sub> замещенного алкила; OCF<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>) и O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), где каждый R<sub>m</sub> и R<sub>n</sub> независимо представляет собой H или замещенный или незамещенный С<sub>1</sub>-С<sub>10</sub> алкил. Примеры заместителей сахара в 5'-положении включают, но не ограничиваются ими: 5'-метил (R или S), 5'-винил и 5'-метокси. В некоторых вариантах реализации изобретения замещенные сахара содержат более одного немостикового сахарного заместителя, например, 2'-F-5'-метил-сахарные фрагменты (см., например, Международную заявку РСТ WO 2008/101157, где приведены дополнительные 5', 2'-бис-замещенные сахарные фрагменты и нуклеозиды).

Нуклеозиды, содержащие 2'-замещенные сахарные фрагменты, упоминаются как 2'-замещенные нуклеозиды. В некоторых вариантах реализации изобретения 2'-замещенный нуклеозид содержит 2'-группу заместителя, выбранную из галогена, аллила, amino, азидо, SH, CN, OCN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, O, S или N(R<sub>m</sub>)-алкила; O, S или N(R<sub>m</sub>)-алкенила; O, S или N(R<sub>m</sub>)-алкинила; О-алкиленил-О-алкила, алкинила, алкарила, аралкила, О-алкарила, О-аралкила, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>) или O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), где каждый R<sub>m</sub> и R<sub>n</sub> независимо представляет собой H, аминоксигнальную группу или замещенный или

незамещенный C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкил. Эти 2'-группы заместителей могут быть дополнительно замещены одной или более группами заместителей, независимо выбранными из гидроксила, амина, алкокси, карбокси, бензила, фенила, нитро (NO<sub>2</sub>), тиола, тиоалкокси (S-алкила), галогена, алкила, арила, алкенила и алкинила.

В некоторых вариантах реализации изобретения 2'-замещенный нуклеозид содержит 2'-группу заместителя, выбранную из F, NH<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, O-CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>, O-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> и N-замещенного ацетамида (O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), где каждый R<sub>m</sub> и R<sub>n</sub> независимо представляет собой H, аминокзащитную группу или замещенный или незамещенный C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкил.

В некоторых вариантах реализации изобретения 2'-замещенный нуклеозид содержит сахарный фрагмент, содержащий 2'-группу заместителя, выбранную из F, OCF<sub>3</sub>, O-CH<sub>3</sub>, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> и O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(H)CH<sub>3</sub>.

В некоторых вариантах реализации изобретения 2'-замещенный нуклеозид содержит сахарный фрагмент, содержащий 2'-группу заместителя, выбранную из F, O-CH<sub>3</sub> и OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>.

Некоторые модифицированные сахарные фрагменты содержат мостиковый сахарный заместитель, который образует второе кольцо, что приводит к получению бициклического сахарного фрагмента. В некоторых таких вариантах реализации изобретения бициклический сахарный фрагмент содержит мостик между 4' и 2' атомами фуранозного кольца. Примеры таких 4'-2' сахарных заместителей включают, но не ограничиваются ими: -[C(R<sub>a</sub>)(R<sub>b</sub>)]<sub>n</sub>-, -[C(R<sub>a</sub>)(R<sub>b</sub>)]<sub>n</sub>-O-, -C(R<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)-N(R)-O- или -C(R<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)-O-N(R)-; 4'-CH<sub>2</sub>-2', 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-2', 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-2', 4'-(CH<sub>2</sub>)-O-2' (LNA); 4'-(CH<sub>2</sub>)-S-2'; 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2' (ENA); 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2' (сEt) и 4'-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)-O-2', и его аналоги (см., например, патент США 7399845, выданный 15 июля 2008 года); 4'-C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)-O-2' и его аналоги (см., например, WO2009/006478, опубликованный 8 января 2009 года); 4'-CH<sub>2</sub>-N(OCH<sub>3</sub>)-2' и его аналоги (см., например, WO2008/150729, опубликованный 11 декабря 2008 года); 4'-CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-2' (см., например, US2004/0171570, опубликованный 2 сентября 2004 года); 4'-CH<sub>2</sub>-O-N(R)-2' и 4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2', где каждый R независимо представляет собой H, защитную группу или C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> алкил; 4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2', где R представляет собой H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> алкил или защитную группу (см., например, патент США 7427672, выданный 23 сентября 2008 года); 4'-CH<sub>2</sub>-C(H)(CH<sub>3</sub>)-2' (см., например, Chattopadhyaya, et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134);

и 4'-CH<sub>2</sub>-C(=CH<sub>2</sub>)-2' и его аналоги (см. опубликованную Международную заявку PCT WO 2008/154401, опубликованную 8 декабря 2008 года).

В некоторых вариантах реализации изобретения такие мостики 4'-2' независимо содержат от 1 до 4 связанных групп, независимо выбранных из -[C(R<sub>a</sub>)(R<sub>b</sub>)]<sub>n</sub>-, -C(R<sub>a</sub>)=C(R<sub>b</sub>)-, -C(R<sub>a</sub>)=N-, -C(=NR<sub>a</sub>)-, -C(=O)-, -C(=S)-, -O-, -Si(R<sub>a</sub>)<sub>2</sub>-, -S(=O)<sub>x</sub>- и -N(R<sub>a</sub>)-;

где:

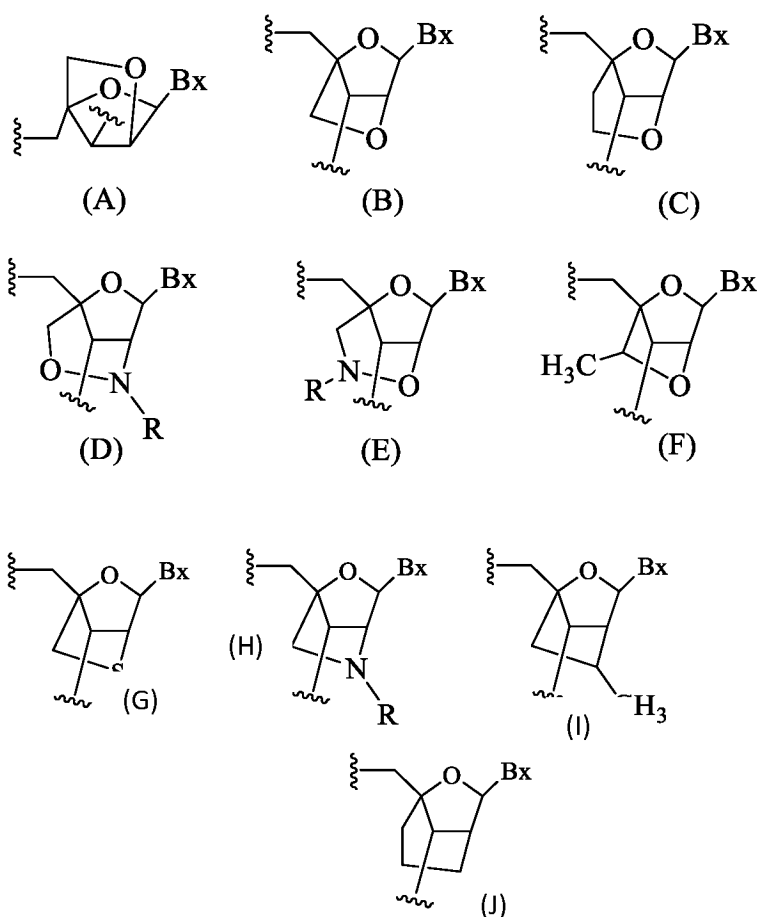
x равен 0, 1 или 2;

n равен 1, 2, 3 или 4;

каждый R<sub>a</sub> и R<sub>b</sub> независимо представляет собой H, защитную группу, гидроксил, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> алкил, замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> алкил, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> алкенил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> алкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> алкинил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> алкинил, C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub> арил, замещенный C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub> арил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал, гетероарил, замещенный гетероарил, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub> алициклический радикал, замещенный C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub> алициклический радикал, галоген, OJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, COOJ<sub>1</sub>, ацил (C(=O)-H), замещенный ацил, CN, сульфонил (S(=O)<sub>2</sub>-J<sub>1</sub>) или сульфоксил (S(=O)-J<sub>1</sub>); и

каждый J<sub>1</sub> и J<sub>2</sub> независимо представляет собой H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> алкил, замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> алкил, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> алкенил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> алкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> алкинил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> алкинил, C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub> арил, замещенный C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub> арил, ацил (C(=O)-H), замещенный ацил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> аминоалкил, замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> аминоалкил или защитную группу.

Нуклеозиды, содержащие бициклические сахарные фрагменты, упоминаются как бициклические нуклеозиды или BNA. Бициклические нуклеозиды включают, но не ограничиваются ими, (A) α-L-метиленокси (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') BNA, (B) β-D-метиленокси (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') BNA (также упоминаемый как закрытая нуклеиновая кислота или LNA), (C) этиленокси (4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2') BNA, (D) аминоокси (4'-CH<sub>2</sub>-O-N(R)-2') BNA, (E) оксиамино (4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2') BNA, (F) метил(метиленокси) (4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2') BNA (также упоминаемый как стерически затрудненный этил или cEt), (G) метилен-тио (4'-CH<sub>2</sub>-S-2') BNA, (H) метилен-амино (4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-2') BNA, (I) метил-карбоциклический (4'-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-2') BNA и (J) пропилен-карбоциклический (4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-2') BNA, как показано ниже.



где Bx представляет собой фрагмент азотистого основания, а R независимо представляет собой H, защитную группу или C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> алкил.

В данной области техники известны дополнительные бициклические сахарные фрагменты, например: Singh et al., *Chem. Commun.*, 1998, 4, 455-456; Koshkin et al., *Tetrahedron*, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, 97, 5633-5638; Kumar et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 2219-2222; Singh et al., *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 10035-10039; Srivastava et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 129(26) 8362-8379 (4 июля 2007 года); Elayadi et al., *Curr. Opinion Invens. Drugs*, 2001, 2, 558-561; Braasch et al., *Chem. Biol.*, 2001, 8, 1-7; Orum et al., *Curr. Opinion Mol. Ther.*, 2001, 3, 239-243; патенты США № 7053207 6268490 6770748 6794499 7034133 6525191 6670461 и 7399845; WO 2004/106356, WO 1994/14226, WO 2005/021570 и WO 2007/134181; публикации патентов США № US2004/0171570, US2007/0287831 и US2008/0039618; патенты США с серийными номерами 12/129154 60/989574 61/026995 61/026998 61/056564 61/086231 61/097787 и 61/099844; и Международные заявки PCT № PCT/US2008/064591, PCT/US2008/066154 и PCT/US2008/068922.

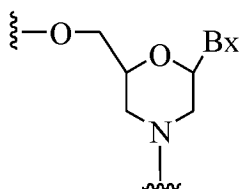
В некоторых вариантах реализации изобретения бициклические сахарные

фрагменты и нуклеозиды, содержащие такие бициклические сахарные фрагменты, дополнительно определяют по изомерной конфигурации. Например, нуклеозид, содержащий мостик 4'-2'-метилен-окси, может быть в  $\alpha$ -L конфигурации или в  $\beta$ -D конфигурации. Ранее  $\alpha$ -L-метиленокси (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') бициклические нуклеозиды были внедрены в антисмысловые олигонуклеотиды, которые обладают антисмысловой активностью (Frieden *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 2003, 21, 6365-6372).

В некоторых вариантах реализации изобретения замещенные сахарные фрагменты содержат один или более немостиковых сахарных заместителей и один или более мостиковых сахарных заместителей (например, 5'-замещенные и 4'-2'-мостиговые сахара). (см., например, Международную заявку PCT WO 2007/134181, опубликованную 11/22/07, в которой LNA замещена, например, 5'-метильной или 5'-виниловой группой).

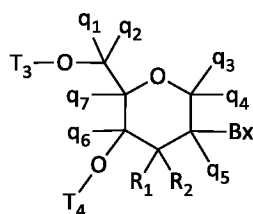
В некоторых вариантах реализации изобретения модифицированные сахарные фрагменты представляют собой заменители сахара. В некоторых таких вариантах реализации изобретения атом кислорода природного сахара является замещенным, например, атомом серы, углерода или азота. В некоторых таких вариантах реализации изобретения такой модифицированный сахарный фрагмент содержит также мостиковые и/или немостиковые заместители, как описано выше. Например, некоторые заменители сахара содержат 4'-атом серы и замещение в 2'-положении (см., например, опубликованную патентную заявку США US2005/0130923, опубликованную 16 июня 2005 года) и/или 5'-положении. В качестве дополнительного примера, были описаны карбоциклические бициклические нуклеозиды, имеющие мостик 4'-2' (см., например, Freier *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22), 4429-4443 и Albaek *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2006, 71, 7731-7740).

В некоторых вариантах реализации изобретения заменители сахара содержат кольца, имеющие не 5 атомов. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения заменитель сахара содержит морфолино. Морфолино-соединения и их применение в олигомерных соединениях было описано в многочисленных патентах и опубликованных статьях (см., например: Braasch *et al.*, *Biochemistry*, 2002, 41, 4503-4510; и патенты США 5698685; 5166315; 5185444; и 5034506). При использовании в настоящем документе, термин «морфолино» означает заменитель сахара, имеющий следующую структуру:



В некоторых вариантах реализации изобретения морфолино могут быть модифицированными, например, добавлением или изменением различных групп заместителей в представленной выше структуре морфолино. Такие заместители сахара упомянуты в настоящем документе как «модифицированные морфолино».

В качестве другого примера, в некоторых вариантах реализации изобретения заместитель сахара содержит шестичленный тетрагидропиран. Такие тетрагидропираны могут быть дополнительно модифицированы или замещены. Нуклеозиды, содержащие такие модифицированные тетрагидропираны, включают, но не ограничиваются ими, гекситоловую нуклеиновую кислоту (HNA), аниоловую нуклеиновую кислоту (ANA), манитоловую нуклеиновую кислоту (MNA) (см. Leumann, *CJ. Bioorg. & Med. Chem.* (2002) **10**:841-854), фтор-HNA (F-HNA) и соединения, имеющие Формулу VI:



VI

где независимо для каждого из указанного по меньшей мере одного тетрагидропиранового нуклеозидного аналога Формулы VI:

Bx представляет собой фрагмент азотистого основания;

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

q<sub>1</sub>, q<sub>2</sub>, q<sub>3</sub>, q<sub>4</sub>, q<sub>5</sub>, q<sub>6</sub> и q<sub>7</sub>, каждый независимо, представляют собой H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил или замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил; и

каждый из R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> независимо выбран из: водорода, галогена, замещенного или незамещенного алкокси, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, OC(=X)J<sub>1</sub>, OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> и CN, где X представляет собой O, S или NJ<sub>1</sub>, и каждый J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub> и J<sub>3</sub> независимо представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил.



В некоторых вариантах реализации изобретения приведены модифицированные ТНР нуклеозиды Формулы VI, в которых каждый  $q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6$  и  $q_7$  представляет собой Н. В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере один из  $q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6$  и  $q_7$  отличен от Н. В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере один из  $q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6$  и  $q_7$  представляет собой метил. В некоторых вариантах реализации изобретения приведены ТНР нуклеозиды Формулы VI, в которых один из  $R_1$  и  $R_2$  представляет собой F. В некоторых вариантах реализации изобретения  $R_1$  представляет собой фтор, а  $R_2$  представляет собой Н,  $R_1$  представляет собой метокси, а  $R_2$  представляет собой Н, и  $R_1$  представляет собой метоксиэтокси, а  $R_2$  представляет собой Н.

В данной области техники известны также многие другие бициклические и трициклические кольцевые системы заместителей сахара, которые могут быть использованы для модификации нуклеозидов для внедрения в антисмысловые соединения (см., например, обзорную статью: Leumann, J. C., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2002**, *10*, 841-854).

Без ограничения, приведены также комбинации модификаций, такие как 2'-F-5'-метил-замещенные нуклеозиды (см. Международную заявку PCT WO 2008/101157, опубликованную 8/21/08, где описаны другие 5', 2'-бис-замещенные нуклеозиды) и замена атома кислорода рибозильного кольца на S и дополнительное замещение в 2'-положении (см. опубликованную заявку на патент США US2005-0130923, опубликованную 16 июня 2005 года) или, альтернативно, 5'-замещение бициклической нуклеиновой кислоты (см. Международную заявку PCT WO 2007/134181, опубликованную 11/22/07, в которой 4'-CH<sub>2</sub>-O-2' бициклический нуклеозид дополнительно замещен в 5'-положении 5'-метильной или 5'-виниловой группой). Был описан также синтез и получение карбоциклических бициклических нуклеозидов вместе с их олигомеризацией и биохимическими исследованиями (см., например, Srivastava *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2007, *129*(26), 8362-8379).

В некоторых вариантах реализации настоящего описания приведены олигонуклеотиды, содержащие модифицированные нуклеозиды. Такие модифицированные нуклеотиды могут содержать модифицированные сахара, модифицированные азотистые основания и/или модифицированные связи. Конкретные модификации выбирают так, чтобы полученные олигонуклеотиды обладали желаемыми характеристиками. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды содержат один или более РНК-подобных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды содержат один или более ДНК-подобных нуклеотидов.

## 2. Некоторые модификации азотистых оснований

В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеозиды настоящего описания содержат одно или более немодифицированных азотистых оснований. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеозиды настоящего описания содержат одно или более модифицированных азотистых оснований.

В некоторых вариантах реализации изобретения модифицированные азотистые основания выбраны из: универсальных оснований, гидрофобных оснований, смещанных оснований, увеличенных в размере оснований и фторированных оснований, описанных в настоящем документе. 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и O-6-замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил; 5-пропинилцитозин; 5-гидроксиметил-цитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галогенурацил и цитозин, 5-пропинил ( $-C\equiv C-CH_3$ ) урацил и цитозин и другие алкильные производные пиримидиновых оснований, 6-азоурацил, цитозин и тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген, 8-амино, 8-тиол, 8-тиоалкил, 8-гидроксил и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген, в частности, 5-бром, 5-трифторметил и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 2-F-аденин, 2-аминоаденин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-дезагуанин и 7-дезааденин, 2-дезагуанин и 3-дезааденин, универсальные основания, гидрофобные основания, смешанные основания, увеличенные в размере основания и фторированные основания, описанные в настоящем документе. Дополнительные модифицированные азотистые основания включают трициклические пиримидины, такие как феноксазина цитидин ([5,4-b][1,4]бензоксазин-2(3H)-он), фенотиазина цитидин (1H-пиримидо[5,4-b][1,4]бензотиазин-2(3H)-он), так называемые G-clamp, такие как замещенный феноксазина цитидин (например, 9-(2-аминоэтокси)-H-пиримидо[5,4-b][1,4]бензоксазин-2(3H)-он), карбазола цитидин (2H-пиримидо[4,5-b]индол-2-он), пиридоиндола цитидин (H-пиридо[3',2':4,5]пирроло[2,3-d]пиримидин-2-он). Модифицированные азотистые основания также могут включать азотистые основания, в которых пуриновое или пиримидиновое основание заменено другими гетероциклами, например, 7-деза-аденин, 7-дезагуанозин, 2-аминопиридин и 2-пиридон. Дополнительные азотистые основания включают азотистые основания, описанные в патенте США № 3687808, описанные в публикации *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, Kroschwitz, J.I., ред., John Wiley & Sons, 1990, 858-859; описанные авторами Englisch *et al.*, *Angewandte Chemie*, Международное издание, 1991, 30,

613; и описанные в публикации Sanghvi, Y.S., глава 15, *Antisense Research and Applications*, Crooke, S.T. и Lebleu, B., ред., CRC Press, 1993, 273-288.

Иллюстративные патенты США, в которых описано получение некоторых из вышеупомянутых модифицированных азотистых оснований, а также других модифицированных азотистых оснований, включают, без ограничения, U.S. 3687808; 4845205; 5130302; 5134066; 5175273; 5367066; 5432272; 5457187; 5459255; 5484908; 5502177; 5525711; 5552540; 5587469; 5594121; 5596091; 5614617; 5645985; 5681941; 5750692; 5763588; 5830653 и 6005096, некоторые из которых находятся на рассмотрении одновременно с настоящей заявкой, и каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

### 3. Некоторые межнуклеозидные связи

В некоторых вариантах реализации настоящего описания приведены олигонуклеотиды, содержащие связанные нуклеозиды. В таких вариантах реализации изобретения нуклеозиды могут быть связаны вместе при помощи любой межнуклеозидной связи. Два основных класса межнуклеозидных связывающих групп определяются по наличию или отсутствию атома фосфора. Иллюстративные фосфорсодержащие межнуклеозидные связи включают, но не ограничиваются ими, фосфодиэфиры (PO), фосфотриэфиры, метилфосфонаты, фосфорамидаты и тиофосфаты (PS). Иллюстративные не содержащие фосфора межнуклеозидные связывающие группы включают, но не ограничиваются ими, метиленметилямино ( $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$ ), тиодиаэфир ( $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{S}-$ ), тионокарбамат ( $-\text{O}-\text{C}(\text{O})(\text{NH})-\text{S}-$ ); силоксан ( $-\text{O}-\text{Si}(\text{H})_2-\text{O}-$ ); и N,N'-диметилгидразин ( $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-$ ). Модифицированные связи, в сравнении с природными фосфодиэфирными связями, могут быть использованы для изменения, обычно увеличения устойчивости олигонуклеотида к нуклеазе. В некоторых вариантах реализации изобретения межнуклеозидные связи, имеющие хиральный атом, могут быть получены в виде рацемической смеси или в виде отдельных энантиомеров. Иллюстративные хиральные связи включают, но не ограничиваются ими, алкилфосфонаты и тиофосфаты. Способы получения фосфорсодержащих и не содержащих фосфора межнуклеозидных связей хорошо известны специалистам в данной области техники.

Олигонуклеотиды, описанные в настоящем документе, содержат один или более асимметричных центров и, следовательно, могут образовывать энантиомеры, диастереомеры и другие стереоизомерные конфигурации, которые в соответствии с абсолютной стереохимией могут быть определены как (R) или (S), или, как для аномеров

сахара, или как (D) или (L), как для аминокислот и т.д. В антисмысловые соединения, представленные в настоящем документе, включены все такие возможные изомеры, а также их рацемические и оптически чистые формы.

Нейтральные связывающие линкеры включают, без ограничения, фосфотриэфиры, метилфосфонаты, MMI (3'-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-5'), амид-3 (3'-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(H)-5'), амид-4 (3'-CH<sub>2</sub>-N(H)-C(=O)-5'), формацеталь (3'-O-CH<sub>2</sub>-O-5') и тиоформацеталь (3'-S-CH<sub>2</sub>-O-5'). Дополнительные нейтральные межнуклеозидные связи включают неионные связи, содержащие силоксан (диалкилсилоксан), карбоновый сложный эфир, карбоксамид, сульфид, сульфоновый сложный эфир и амиды (см., например: *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*; Y.S. Sanghvi и P.D. Cook, ред., ACS Symposium Series 580; главы 3 и 4, 40-65). Дополнительные нейтральные межнуклеозидные связи включают неионные связи, содержащие смешанные составные части N, O, S и CH<sub>2</sub>.

#### **4. Некоторые мотивы**

В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловые олигонуклеотиды содержат один или более модифицированных нуклеозидов (например, нуклеозид, содержащий модифицированный сахар и/или модифицированное азотистое основание) и/или один или более модифицированных межнуклеозидных связей. Характерный участок таких модификаций в олигонуклеотиде упоминается в настоящем документе как мотив. В некоторых вариантах реализации изобретения мотивы сахара, азотистые основания и линкера не зависят друг от друга.

##### **а. Некоторые сахарные мотивы**

В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды содержат один или более типов модифицированных сахарных фрагментов и/или природных сахарных фрагментов, расположенных вдоль олигонуклеотида или его области определенным образом или в виде мотива сахарной модификации. Такие мотивы могут содержать любые сахарные модификации, рассмотренные в настоящем документе и/или другие известные модификации сахара.

В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды содержат или состоят из области, имеющей сахарный мотив гэтамера, который содержит две внешних области или «крыла» и центральную или внутреннюю область, или «гэп». Эти три области сахарного мотива гэтамера (5'-крыло, гэп и 3'-крыло) образуют непрерывную последовательность азотистых оснований, в которой по меньшей мере некоторые из сахарных фрагментов нуклеозидов в каждом крыле отличаются по меньшей мере от

некоторых сахарных фрагментов нуклеозидов в гэпе. В частности, по меньшей мере те сахарные фрагменты нуклеозидов каждого крыла, которые расположены ближе всего к гэпу (3'-ближайший нуклеозид 5'-крыла и 5'-ближайший нуклеозид 3'-крыла), отличаются от сахарного фрагмента соседних нуклеозидов в гэпе, определяя таким образом границу между крыльями и гэпом. В некоторых вариантах реализации изобретения сахарные фрагменты в гэпе являются одинаковыми между собой. В некоторых вариантах реализации изобретения гэп содержит один или более нуклеозидов, имеющих сахарный фрагмент, который отличается от сахарного фрагмента одного или более других нуклеозидов в гэпе. В некоторых вариантах реализации изобретения сахарные мотивы двух крыльев являются одинаковыми между собой (симметричный сахарный гэпмер). В некоторых вариантах реализации изобретения сахарные мотивы 5'-крыла отличаются от сахарного мотива 3'-крыла (асимметричный сахарный гэпмер).

#### **i. Некоторые 5'-крылья**

В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-крыло гэпмера состоит из 1-8 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-крыло гэпмера состоит из 1-7 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-крыло гэпмера состоит из 1-6 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-крыло гэпмера состоит из 1-5 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-крыло гэпмера состоит из 2-5 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-крыло гэпмера состоит из 3-5 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-крыло гэпмера состоит из 4 или 5 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-крыло гэпмера состоит из 1-4 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-крыло гэпмера состоит из 1-3 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-крыло гэпмера состоит из 1 или 2 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-крыло гэпмера состоит из 2-4 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-крыло гэпмера состоит из 2 или 3 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-крыло гэпмера состоит из 3 или 4 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-крыло гэпмера состоит из 1 нуклеозида. В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-крыло гэпмера состоит из 2 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-крыло гэпмера состоит из 3 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-крыло гэпмера состоит из 4 связанных нуклеозидов.



некоторых вариантах реализации изобретения 5'-крыло гпмера содержит по меньшей мере один рибонуклеозид. В некоторых вариантах реализации изобретения каждый нуклеозид 5'-крыла гпмера представляет собой рибонуклеозид. В некоторых вариантах реализации изобретения один, более одного или каждый из нуклеозидов 5'-крыла представляет собой РНК-подобный нуклеозид.

В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-крыло гпмера содержит по меньшей мере один бициклический нуклеозид и по меньшей мере один не бициклический модифицированный нуклеозид. В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-крыло гпмера содержит по меньшей мере один бициклический нуклеозид и по меньшей мере один 2'-замещенный нуклеозид. В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-крыло гпмера содержит по меньшей мере один бициклический нуклеозид и по меньшей мере один 2'-МОЕ нуклеозид. В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-крыло гпмера содержит по меньшей мере один бициклический нуклеозид и по меньшей мере один 2'-ОМе нуклеозид. В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-крыло гпмера содержит по меньшей мере один бициклический нуклеозид и по меньшей мере один 2'-дезоксинуклеозид.

В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-крыло гпмера содержит по меньшей мере один стерически затрудненный этил-нуклеозид и по меньшей мере один не бициклический модифицированный нуклеозид. В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-крыло гпмера содержит по меньшей мере один стерически затрудненный этил-нуклеозид и по меньшей мере один 2'-замещенный нуклеозид. В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-крыло гпмера содержит по меньшей мере один стерически затрудненный этил-нуклеозид и по меньшей мере один 2'-МОЕ нуклеозид. В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-крыло гпмера содержит по меньшей мере один стерически затрудненный этил-нуклеозид и по меньшей мере один 2'-ОМе нуклеозид. В некоторых вариантах реализации изобретения 5'-крыло гпмера содержит по меньшей мере один стерически затрудненный этил-нуклеозид и по меньшей мере один 2'-дезоксинуклеозид.

## ii. Некоторые 3'-крылья

В некоторых вариантах реализации изобретения 3'-крыло гпмера состоит из 1-8 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения 3'-крыло гпмера состоит из 1-7 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения 3'-крыло гпмера состоит из 1-6 связанных нуклеозидов. В некоторых











нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения гэта гэтамера состоит из 7-10 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения гэта гэтамера состоит из 7-9 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения гэта гэтамера состоит из 7 или 8 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения гэта гэтамера состоит из 8-10 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения гэта гэтамера состоит из 8 или 9 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения гэта гэтамера состоит из 6 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения гэта гэтамера состоит из 7 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения гэта гэтамера состоит из 8 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения гэта гэтамера состоит из 9 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения гэта гэтамера состоит из 10 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения гэта гэтамера состоит из 11 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения гэта гэтамера состоит из 12 связанных нуклеозидов.

В некоторых вариантах реализации изобретения каждый нуклеозид гэта гэтамера представляет собой 2'-дезоксинуклеозид. В некоторых вариантах реализации изобретения гэта содержит один или более модифицированных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения каждый нуклеозид гэта гэтамера представляет собой 2'-дезоксинуклеозид или представляет собой модифицированный «ДНК-подобный» нуклеозид. В таких вариантах реализации изобретения «ДНК-подобный» означает, что нуклеозид имеет такие же характеристики, что и ДНК, то есть что дуплекс, содержащий гэтамер и молекулу РНК может активировать РНКазу Н. Например, было показано, что при некоторых условиях 2'-(ага)-F поддерживает активацию РНКазы Н и, следовательно, является ДНК-подобным. В некоторых вариантах реализации изобретения один или более нуклеозидов гэта гэтамера не представляет собой 2'-дезоксинуклеозид и не является ДНК-подобным. В некоторых таких вариантах реализации изобретения гэтамер тем не менее поддерживает активацию РНКазы Н (например, за счет количества или положения не-ДНК нуклеозидов).

В некоторых вариантах реализации изобретения гэпы содержат участок немодифицированного 2'-дезоксинуклеозида, прерванный одним или более модифицированными нуклеозидами, что приводит к образованию трех субрайонов (двух участков одного или более 2'-дезоксинуклеозидов и участка одного или более прерывающих модифицированных нуклеозидов). В некоторых вариантах реализации изобретения ни один участок немодифицированных 2'-дезоксинуклеозидов не длиннее 5,

6 или 7 нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения такие короткие участки образуются за счет применения коротких гэп-областей. В некоторых вариантах реализации изобретения короткие участки образуются за счет прерывания более длинной области гэп.

В некоторых вариантах реализации изобретения гэп содержит один или более модифицированных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения гэп содержит один или более модифицированных нуклеозидов, выбранных из cEt, FHNA, LNA и 2-тиотимицина. В некоторых вариантах реализации изобретения гэп содержит один модифицированный нуклеозид. В некоторых вариантах реализации изобретения гэп содержит 5'-замещенный сахарный фрагмент, выбранный из 5'-Me и 5'-(R)-Me. В некоторых вариантах реализации изобретения гэп содержит два модифицированных нуклеозида. В некоторых вариантах реализации изобретения гэп содержит три модифицированных нуклеозида. В некоторых вариантах реализации изобретения гэп содержит четыре модифицированных нуклеозида. В некоторых вариантах реализации изобретения гэп содержит два или более модифицированных нуклеозидов, и каждый модифицированный нуклеозид является таким же. В некоторых вариантах реализации изобретения гэп содержит два или более модифицированных нуклеозидов, и каждый модифицированный нуклеозид является другим.

В некоторых вариантах реализации изобретения гэп содержит одну или более модифицированных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения гэп содержит одну или более метилфосфонатных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения гэп содержит две или более модифицированных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения гэп содержит одну или более модифицированных связей и один или более модифицированных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения гэп содержит одну модифицированную связь и один модифицированный нуклеозид. В некоторых вариантах реализации изобретения гэп содержит две модифицированных связи и два или более модифицированных нуклеозидов.

#### **b. Некоторые мотивы межнуклеозидных связей**

В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды содержат модифицированные межнуклеозидные связи, расположенные вдоль олигонуклеотида или его области определенным образом или в виде мотива модифицированной межнуклеозидной связи. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды

содержат область, имеющую мотив чередующихся межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды по настоящему описанию содержат область одинаково модифицированных межнуклеозидных связей. В некоторых таких вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит область, которая равномерно связана тиофосфатными межнуклеозидными связями. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид равномерно связан тиофосфатными межнуклеозидными связями. В некоторых вариантах реализации изобретения каждая межнуклеозидная связь олигонуклеотида выбран из фосфодиэфира и тиофосфата. В некоторых вариантах реализации изобретения каждая межнуклеозидная связь олигонуклеотида выбран из фосфодиэфира и тиофосфата, и по меньшей мере одна межнуклеозидная связь представляет собой тиофосфат.

В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит по меньшей мере 6 тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит по меньшей мере 7 тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит по меньшей мере 8 тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит по меньшей мере 9 тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит по меньшей мере 10 тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит по меньшей мере 11 тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит по меньшей мере 12 тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит по меньшей мере 13 тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит по меньшей мере 14 тиофосфатных межнуклеозидных связей.

В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит по меньшей мере один блок по меньшей мере из 6 смежных тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит по меньшей мере один блок по меньшей мере из 7 смежных тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит по меньшей мере один блок по меньшей мере из 8 смежных тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит по меньшей мере один блок по меньшей мере из 9 смежных тиофосфатных межнуклеозидных

связей. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит по меньшей мере один блок по меньшей мере из 10 смежных тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит по меньшей мере один блок по меньшей мере из 12 смежных тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых таких вариантах реализации изобретения по меньшей мере один такой блок расположен на 3'-конце олигонуклеотида. В некоторых таких вариантах реализации изобретения по меньшей мере один такой блок расположен в пределах 3 нуклеозидов 3'-конца олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит менее 15 тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит менее 14 тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит менее 13 тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит менее 12 тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит менее 11 тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит менее 10 тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит менее 9 тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит менее 8 тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит менее 7 тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит менее 6 тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит менее 5 тиофосфатных межнуклеозидных связей.

**с. Некоторые мотивы модификаций азотистых оснований**

В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды содержат химические модификации азотистых оснований, расположенные вдоль олигонуклеотида или его области определенным образом или в виде мотива модификации азотистых оснований. В некоторых таких вариантах реализации изобретения модификации азотистых оснований расположены в разорванном мотиве. В некоторых вариантах реализации изобретения модификации азотистых оснований расположены в чередующемся мотиве. В некоторых вариантах реализации изобретения каждое азотистое основание является модифицированным. В некоторых вариантах реализации изобретения ни одно из азотистых оснований не является химически модифицированным.

В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды содержат блок модифицированных азотистых оснований. В некоторых таких вариантах реализации изобретения блок находится на 3'-конце олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения блок находится в пределах 3 нуклеотидов 3'-конца олигонуклеотида. В некоторых таких вариантах реализации изобретения блок находится на 5'-конце олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения блок находится в пределах 3 нуклеотидов 5'-конца олигонуклеотида.

В некоторых вариантах реализации изобретения модификации азотистых оснований зависят от природного основания в конкретном положении олигонуклеотида. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения каждый пурин или каждый пиримидин в олигонуклеотиде является модифицированным. В некоторых вариантах реализации изобретения модифицированным является каждый аденин. В некоторых вариантах реализации изобретения модифицированным является каждый гуанин. В некоторых вариантах реализации изобретения модифицированным является каждый тимин. В некоторых вариантах реализации изобретения модифицированным является каждый цитозин. В некоторых вариантах реализации изобретения модифицированным является каждый урацил.

В некоторых вариантах реализации изобретения некоторые, все или никакие из цитозинового фрагментов в олигонуклеотиде не представляют собой 5-метилцитозинового фрагменты. В настоящем документе 5-метилцитозин не является «модифицированным азотистым основанием». Соответственно, если не указано иное, то немодифицированные азотистые основания включают как цитозиновые остатки, содержащие 5-метил, так и те, которые не содержат 5-метил. В некоторых вариантах реализации изобретения оговорено состояние метилирования всех или некоторых цитозинового азотистых оснований.

В некоторых вариантах реализации изобретения химические модификации азотистых оснований включают присоединение некоторых конъюгирующих групп к азотистым основаниям. В некоторых вариантах реализации изобретения каждый пурин или каждый пиримидин в олигонуклеотиде может быть необязательно модифицирован так, чтобы он содержал конъюгирующую группу.

#### d. Некоторые общие длины

В некоторых вариантах реализации настоящего описания приведены олигонуклеотиды любого из различных диапазонов длин. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды содержат от X до Y связанных нуклеозидов,



где X представляет собой наименьшее количество нуклеозидов в диапазоне, а Y представляет собой наибольшее количество нуклеозидов в диапазоне. В некоторых таких вариантах реализации изобретения каждый X и Y независимо выбран из 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 и 50; при условии, что  $X \leq Y$ . Например, в некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид может состоять из 8-9, 8-10, 8-11, 8-12, 8-13, 8-14, 8-15, 8-16, 8-17, 8-18, 8-19, 8-20, 8-21, 8-22, 8-23, 8-24, 8-25, 8-26, 8-27, 8-28, 8-29, 8-30, 9-10, 9-11, 9-12, 9-13, 9-14, 9-15, 9-16, 9-17, 9-18, 9-19, 9-20, 9-21, 9-22, 9-23, 9-24, 9-25, 9-26, 9-27, 9-28, 9-29, 9-30, 10-11, 10-12, 10-13, 10-14, 10-15, 10-16, 10-17, 10-18, 10-19, 10-20, 10-21, 10-22, 10-23, 10-24, 10-25, 10-26, 10-27, 10-28, 10-29, 10-30, 11-12, 11-13, 11-14, 11-15, 11-16, 11-17, 11-18, 11-19, 11-20, 11-21, 11-22, 11-23, 11-24, 11-25, 11-26, 11-27, 11-28, 11-29, 11-30, 12-13, 12-14, 12-15, 12-16, 12-17, 12-18, 12-19, 12-20, 12-21, 12-22, 12-23, 12-24, 12-25, 12-26, 12-27, 12-28, 12-29, 12-30, 13-14, 13-15, 13-16, 13-17, 13-18, 13-19, 13-20, 13-21, 13-22, 13-23, 13-24, 13-25, 13-26, 13-27, 13-28, 13-29, 13-30, 14-15, 14-16, 14-17, 14-18, 14-19, 14-20, 14-21, 14-22, 14-23, 14-24, 14-25, 14-26, 14-27, 14-28, 14-29, 14-30, 15-16, 15-17, 15-18, 15-19, 15-20, 15-21, 15-22, 15-23, 15-24, 15-25, 15-26, 15-27, 15-28, 15-29, 15-30, 16-17, 16-18, 16-19, 16-20, 16-21, 16-22, 16-23, 16-24, 16-25, 16-26, 16-27, 16-28, 16-29, 16-30, 17-18, 17-19, 17-20, 17-21, 17-22, 17-23, 17-24, 17-25, 17-26, 17-27, 17-28, 17-29, 17-30, 18-19, 18-20, 18-21, 18-22, 18-23, 18-24, 18-25, 18-26, 18-27, 18-28, 18-29, 18-30, 19-20, 19-21, 19-22, 19-23, 19-24, 19-25, 19-26, 19-29, 19-28, 19-29, 19-30, 20-21, 20-22, 20-23, 20-24, 20-25, 20-26, 20-27, 20-28, 20-29, 20-30, 21-22, 21-23, 21-24, 21-25, 21-26, 21-27, 21-28, 21-29, 21-30, 22-23, 22-24, 22-25, 22-26, 22-27, 22-28, 22-29, 22-30, 23-24, 23-25, 23-26, 23-27, 23-28, 23-29, 23-30, 24-25, 24-26, 24-27, 24-28, 24-29, 24-30, 25-26, 25-27, 25-28, 25-29, 25-30, 26-27, 26-28, 26-29, 26-30, 27-28, 27-29, 27-30, 28-29, 28-30 или 29-30 связанных нуклеозидов. В тех вариантах реализации, в которых количество нуклеозидов в олигонуклеотиде соединения является ограниченным, либо до диапазона, либо до определенного числа, то соединение может, тем не менее, дополнительно содержать другие дополнительные заместители. Например, олигонуклеотид, содержащий 8-30 нуклеозидов, исключает олигонуклеотиды, имеющие 31 нуклеозид, но, если не указано иное, такой олигонуклеотид может дополнительно содержать, например, одну или более конъюгирующих групп, концевых групп или других заместителей.

Более того, если олигонуклеотид описан общим диапазоном длины и областями, имеющими определенную длину, и если сумма указанных длин областей меньше, чем верхняя граница диапазона общей длины, то олигонуклеотид может иметь дополнительные нуклеозиды, помимо тех, которые находятся в указанных областях, при условии, что общее

количество нуклеозидов не превышает верхнюю границу диапазона общей длины.

#### 5. Некоторые химические мотивы антисмысловых олигонуклеотидов

В некоторых вариантах реализации изобретения химические структурные особенности антисмысловых олигонуклеотидов описываются их сахарным мотивом, мотивом межнуклеозидной связи, мотивом модификации азотистые основания и общей длиной. В некоторых вариантах реализации изобретения такие параметры не зависят друг от друга. Так, каждая межнуклеозидная связь олигонуклеотида, имеющий сахарный мотив гэтамера, может быть модифицированным или немодифицированным и может повторять или не повторять характер модификации сахарных модификаций гэтамера. Следовательно, межнуклеозидные связи в областях крыльев сахара-гэтамера могут быть одинаковыми или отличными друг от друга и могут быть одинаковыми или отличными от межнуклеозидных связей области гэта. Точно так же, такие сахар-гэтамерные олигонуклеотиды могут содержать одно или более модифицированных азотистых оснований, независимо от характера сахарных модификаций гэтамера. Специалистам в данной области техники понятно, что такие мотивы могут быть комбинированы с получением множества олигонуклеотидов.

В некоторых вариантах реализации изобретения выбор межнуклеозидной связи и модификации нуклеозида не зависят друг от друга.

#### i. Некоторые последовательности и мишени

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения приведены антисмысловые олигонуклеотиды, имеющие последовательность, комплементарную целевой нуклеиновой кислоте. Такие антисмысловые соединения могут гибридизоваться с целевой нуклеиновой кислотой с получением по меньшей мере одной антисмысловой активности. В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловые соединения специфически гибридизуются с одной или более целевыми нуклеиновыми кислотами. В некоторых вариантах реализации изобретения специфически гибридизующееся антисмысловое соединение имеет последовательность азотистых оснований, содержащую область с достаточной комплементарностью целевой нуклеиновой кислоте для обеспечения возможности гибридизации и получению антисмысловой активности, и недостаточной комплементарностью любой нецелевой нуклеиновой кислоте для предотвращения или снижения неспецифической гибридизации с последовательностями нецелевых нуклеиновых кислот в условиях, в которых необходима специфическая гибридизация

(например, в физиологических условиях для *in vivo* или терапевтических применений и в условиях выполнения анализов - в случае *in vitro* анализов). В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды являются селективными между мишенью и не мишенью, даже если мишень и не мишень содержат целевую последовательность. В таких вариантах реализации изобретения селективность может быть результатом относительной доступности целевой области одной молекулы нуклеиновой кислоты, по сравнению с другой.

В некоторых вариантах реализации настоящего описания приведены антисмысловые соединения, содержащие олигонуклеотиды, которые полностью комплементарны целевой нуклеиновой кислоте по всей длине олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды на 99% комплементарны целевой нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды на 95% комплементарны целевой нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах реализации изобретения такие олигонуклеотиды на 90% комплементарны целевой нуклеиновой кислоте.

В некоторых вариантах реализации изобретения такие олигонуклеотиды на 85% комплементарны целевой нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах реализации изобретения такие олигонуклеотиды на 80% комплементарны целевой нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловое соединение содержит область, которая полностью комплементарна целевой нуклеиновой кислоте, и по меньшей мере на 80% комплементарно целевой нуклеиновой кислоте по всей длине олигонуклеотида. В некоторых таких вариантах реализации изобретения область полной комплементарности имеет от 6 до 14 нуклеозидов в длину.

В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды содержат область гибридизации и концевую область. В некоторых таких вариантах реализации изобретения область гибридизации состоит из 12-30 связанных нуклеозидов и полностью комплементарна целевой нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах реализации изобретения область гибридизации содержит одно несоответствие в сравнении с целевой нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах реализации изобретения область гибридизации содержит два несоответствия в сравнении с целевой нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах реализации изобретения область гибридизации содержит три несоответствия в сравнении с целевой нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах реализации изобретения концевая область состоит из 1-4 концевых нуклеозидов. В

некоторых вариантах реализации изобретения концевые нуклеозиды находятся на 3'-конце. В некоторых вариантах реализации изобретения один или более концевых нуклеозидов не комплементарны целевой нуклеиновой кислоте.

Антисмысловые механизмы включают любой механизм, затрагивающий гибридизацию олигонуклеотида с целевой нуклеиновой кислотой, при этом гибридизация приводит к биологическому эффекту. В некоторых вариантах реализации изобретения такая гибридизация приводит либо к разрушению, либо к применению целевой нуклеиновой кислоты с сопутствующим подавлением или стимулированием клеточного механизма, затрагивающего, например, трансляцию, транскрипцию или сплайсинг целевой нуклеиновой кислоты.

Один из типов антисмыслового механизма, затрагивающий разрушение целевой РНК представляет собой антисмысл, опосредованный РНКазой H. РНКазы H представляют собой клеточную эндонуклеазу, которая расщепляет спираль РНК дуплекса РНК:ДНК. В данной области техники известно, что одноцепочечные антисмысловые соединения, которые являются «ДНК-подобными», вызывают активность РНКазы H в клетках млекопитающих. Следовательно, активация РНКазы H приводит к расщеплению РНК-мишени, посредством этого в значительной степени усиливая эффективность подавления генной экспрессии, опосредованного ДНК-подобным олигонуклеотидом.

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгирующая группа содержит расщепляемый фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгирующая группа содержит одну или более расщепляемых связей. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгирующая группа содержит линкер. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит фрагмент, связывающий белки. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгирующая группа содержит фрагмент, нацеливающий на клетку (упоминаемый также как группа, нацеливающая на клетку). В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент, нацеливающий на клетку, содержит группу ветвления. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент, нацеливающий на клетку, содержит одну или более связей. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент, нацеливающий на клетку, содержит углевод или углеводный кластер.

## **ii. Некоторые расщепляемые фрагменты**

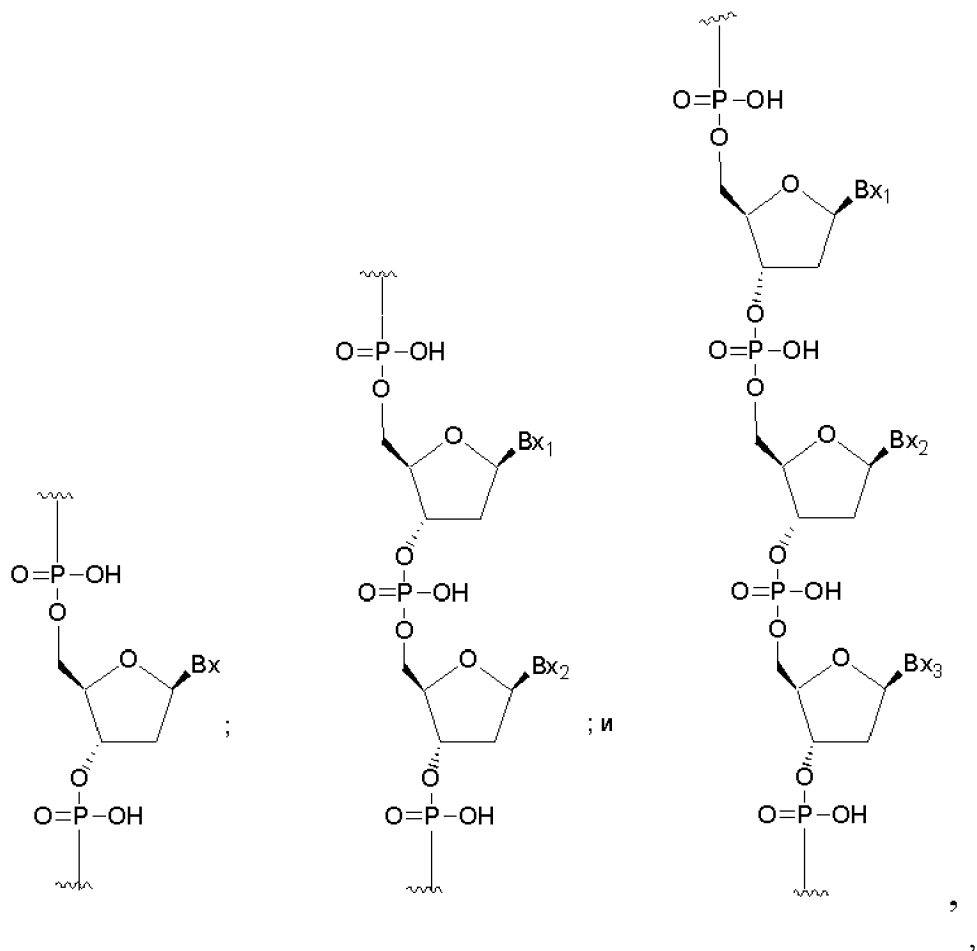
В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент представляет собой расщепляемую связь. В некоторых вариантах реализации изобретения

расщепляемый фрагмент содержит расщепляемую связь. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгирующая группа содержит расщепляемый фрагмент. В некоторых таких вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент присоединяется к антисмысловому олигонуклеотиду. В некоторых таких вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент присоединяется непосредственно к фрагменту, нацеливаемому на клетку. В некоторых таких вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент присоединяется к линкеру конъюгата. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент содержит фосфат или фосфодиэфир. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент представляет собой расщепляемый нуклеозид или нуклеозидный аналог. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеозид или нуклеозидный аналог содержит необязательно защищенное гетероциклическое основание, выбранное из пурина, замещенного пурина, пиримидина или замещенного пиримидина. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент представляет собой нуклеозид, содержащий необязательно защищенное гетероциклическое основание, выбранное из урацила, тимина, цитозина, 4-N-бензоилцитозина, 5-метилцитозина, 4-N-бензоил-5-метилцитозина, аденина, 6-N-бензоиладенина, гуанина и 2-N-изобутирилгуанина. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент представляет собой 2'-дезоксинуклеозид, который присоединен к 3'-положению антисмыслового олигонуклеотида фосфодиэфирной связью и присоединен к линкеру фосфодиэфирной или тиофосфатной связью. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент представляет собой 2'-дезоксаденозин, который присоединен к 3'-положению антисмыслового олигонуклеотида фосфодиэфирной связью и присоединен к линкеру фосфодиэфирной или тиофосфатной связью. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент представляет собой 2'-дезоксаденозин, который присоединен к 3'-положению антисмыслового олигонуклеотида фосфодиэфирной связью и присоединен к линкеру фосфодиэфирной связью.

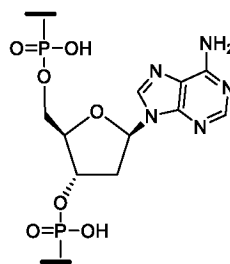
В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент присоединен к 3'-положению антисмыслового олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент присоединен к 5'-положению антисмыслового олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент присоединен к 2'-положению антисмыслового олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент присоединен к антисмысловому олигонуклеотиду фосфодиэфирной связью. В некоторых вариантах

реализации изобретения расщепляемый фрагмент присоединен к указанному линкеру либо фосфодиэфирной, либо тиофосфатной связью. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент присоединен к указанному линкеру фосфодиэфирной связью. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгирующая группа не содержит расщепляемый фрагмент.

В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент расщепляется после введения указанного комплекса в организм животного только после его поглощения целевой клеткой. Внутри клетки расщепляемый фрагмент расщепляется, высвобождая таким образом активный антисмысловый олигонуклеотид. Не ограничиваясь теорией, предполагается, что расщепляемый фрагмент расщепляется под действием одной или более нуклеаз внутри клетки. В некоторых вариантах реализации изобретения одна или более нуклеаз расщепляют фосфодиэфирную связь между расщепляемым фрагментом и линкером. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент имеет структуру, выбранную из следующих:



где каждый из  $V_x$ ,  $V_{x_1}$ ,  $V_{x_2}$  и  $V_{x_3}$  независимо представляет собой гетероциклический основной фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент имеет структуру, выбранную из следующих:



### iii. Некоторые линкеры

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы содержат линкер. В некоторых таких вариантах реализации изобретения линкер ковалентно связан с расщепляемым фрагментом. В некоторых таких вариантах реализации изобретения линкер ковалентно связан с антисмысловым олигонуклеотидом. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер ковалентно связан с фрагментом, нацеливающим на клетку. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер дополнительно содержит ковалентное присоединение к твердой подложке. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер дополнительно содержит ковалентное присоединение к белковому связывающему фрагменту. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер дополнительно содержит ковалентное присоединение к твердой подложке и дополнительно содержит ковалентное присоединение к белковому связывающему фрагменту. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит несколько положений для присоединения связанных лигандов. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит несколько положений для присоединения связанных лигандов и не присоединен к группе ветвления. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер дополнительно содержит одну или более расщепляемых связей. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгирующая группа не содержит линкер.

В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит по меньшей мере одну линейную группу, содержащую группы, выбранные из алкильных, амидных, дисульфидных, полиэтиленгликолевых, тиоэфирных (-S-) и гидроксиламино (-O-N(H)-) групп. В некоторых вариантах реализации изобретения линейная группа содержит группы, выбранные из алкильных, амидных и простых эфирных групп. В некоторых вариантах реализации изобретения линейная группа содержит группы, выбранные из

алкильных и простых эфирных групп. В некоторых вариантах реализации изобретения линейная группа содержит по меньшей мере одну фосфорную связывающую группу. В некоторых вариантах реализации изобретения линейная группа содержит по меньшей мере одну фосфодиэфирную группу. В некоторых вариантах реализации изобретения линейная группа содержит по меньшей мере одну нейтральную связывающую группу. В некоторых вариантах реализации изобретения линейная группа ковалентно присоединена к фрагменту, нацеливаемому на клетку, и к расщепляемому фрагменту. В некоторых вариантах реализации изобретения линейная группа ковалентно присоединена к фрагменту, нацеливаемому на клетку, и к антисмысловому олигонуклеотиду. В некоторых вариантах реализации изобретения линейная группа ковалентно присоединена к фрагменту, нацеливаемому на клетку, к расщепляемому фрагменту и к твердой подложке. В некоторых вариантах реализации изобретения линейная группа ковалентно присоединена к фрагменту, нацеливаемому на клетку, к расщепляемому фрагменту, к твердой подложке и к белковому связывающему фрагменту. В некоторых вариантах реализации изобретения линейная группа содержит одну или более расщепляемых связей.

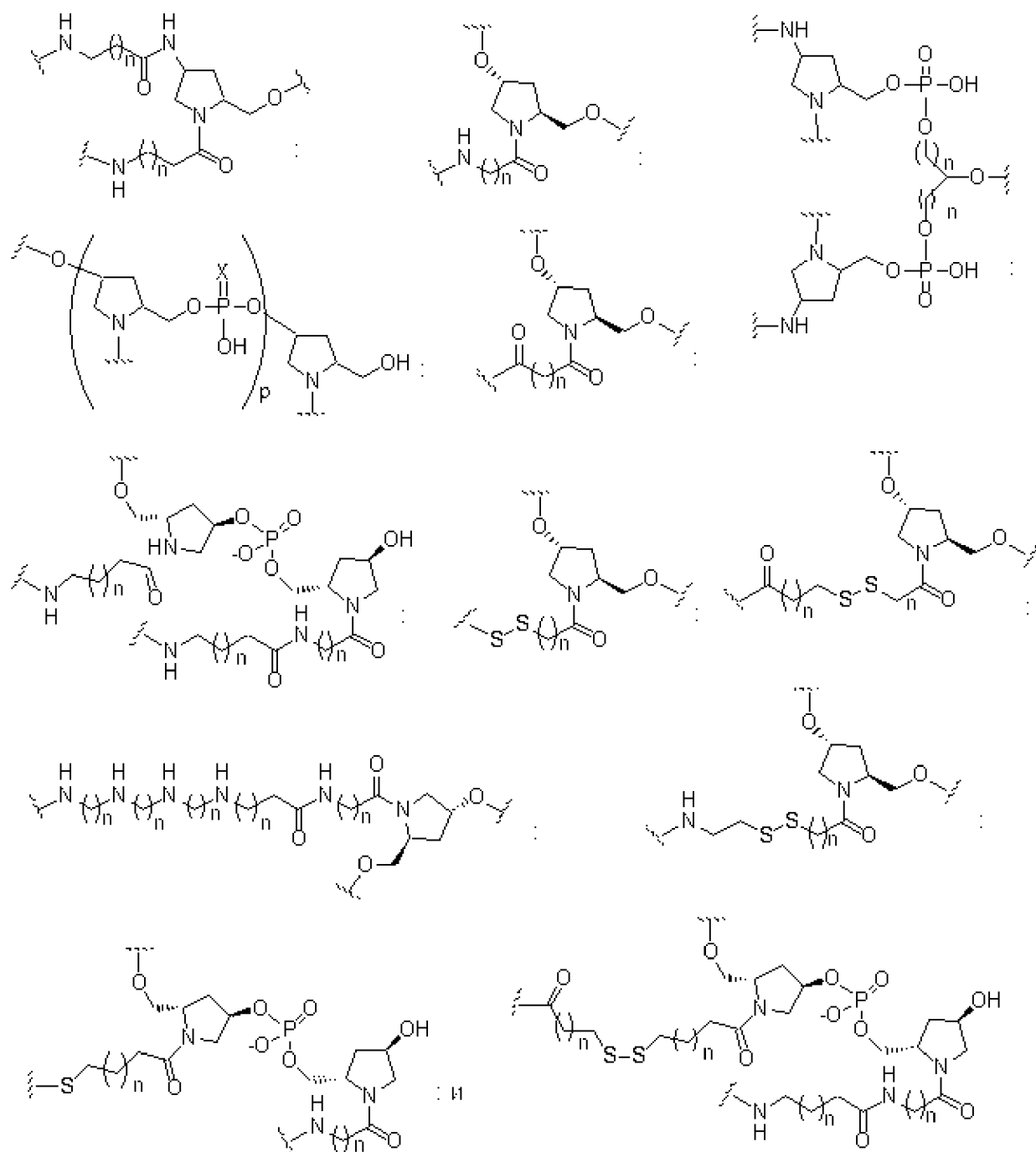
В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит линейную группу, ковалентно присоединенную к группе скелета. В некоторых вариантах реализации изобретения скелет содержит разветвленную алифатическую группу, которая содержит группы, выбранные из алкильных, амидных, дисульфидных, полиэтиленгликолевых, простых эфирных, тиоэфирных и гидроксиламиногрупп. В некоторых вариантах реализации изобретения скелет содержит разветвленную алифатическую группу, которая содержит группы, выбранные из алкильных, амидных и простых эфирных групп. В некоторых вариантах реализации изобретения скелет содержит по меньшей мере одну моно- или полициклическую кольцевую систему. В некоторых вариантах реализации изобретения скелет содержит по меньшей мере две моно- или полициклические кольцевые системы. В некоторых вариантах реализации изобретения линейная группа ковалентно присоединена к группе скелета, а группа скелета ковалентно присоединена к расщепляемому фрагменту и линкеру. В некоторых вариантах реализации изобретения линейная группа ковалентно присоединена к группе скелета, а группа скелета ковалентно присоединена к расщепляемому фрагменту, линкеру и твердой подложке. В некоторых вариантах реализации изобретения линейная группа ковалентно присоединена к группе скелета, а группа скелета ковалентно присоединена к расщепляемому фрагменту, линкеру и белковому связывающему фрагменту. В некоторых вариантах реализации изобретения линейная группа ковалентно присоединена к группе скелета, а группа скелета ковалентно



присоединена к расщепляемому фрагменту, линкеру, белковому связывающему фрагменту и твердой подложке. В некоторых вариантах реализации изобретения группа скелета содержит одну или более расщепляемых связей.

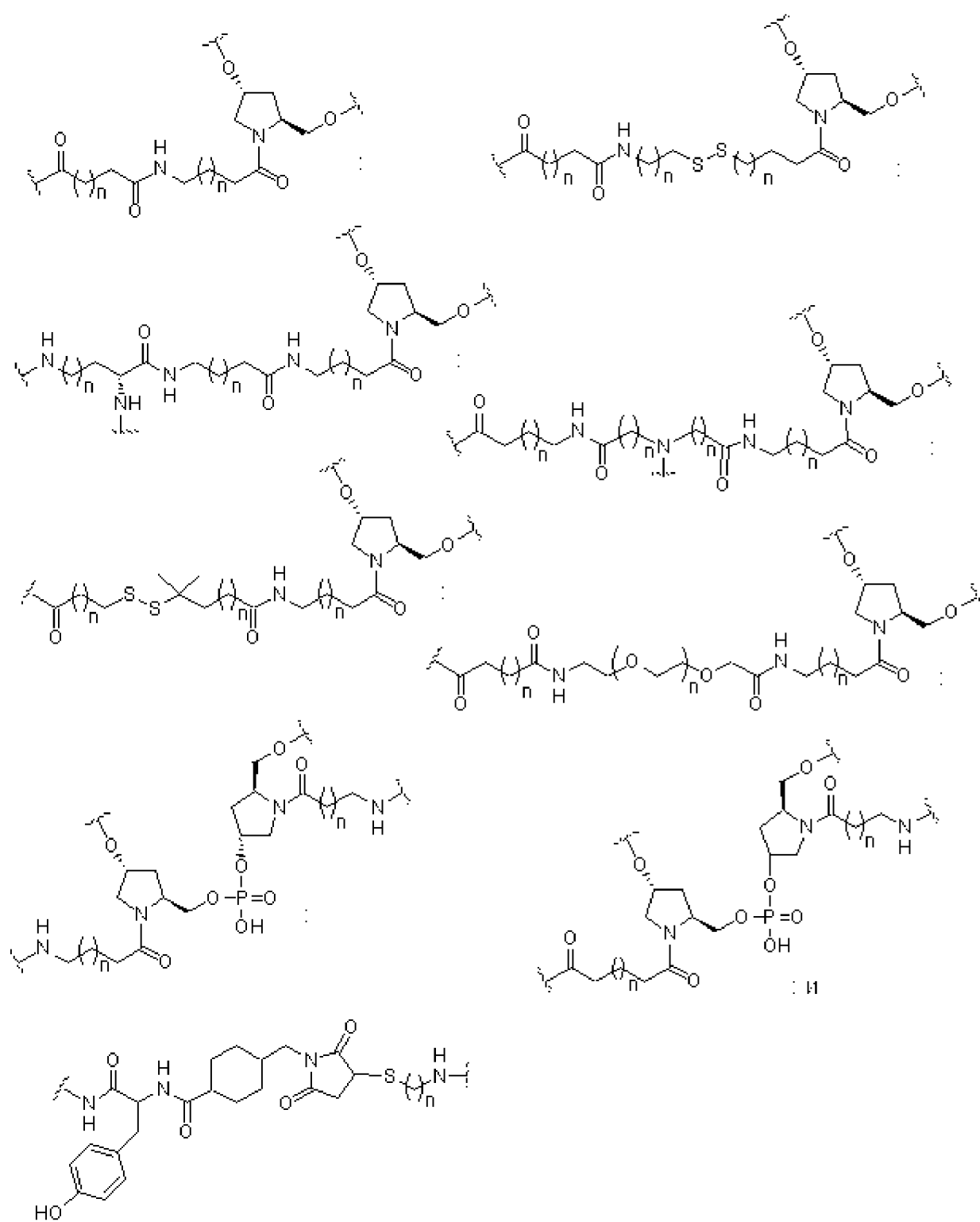
В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит фрагмент, связывающий белки. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент, связывающий белки, представляет собой липид, такой как, например, включая, но не ограничиваясь ими, холестерин, холевая кислота, адамантан-уксусная кислота, 1-пирен-масляная кислота, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилксигексильная группа, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадециловая группа, пальмитиновая кислота, миристиновая кислота, ОЗ-(олеоил)литохолевая кислота, ОЗ-(олеоил)холеновая кислота, диметокситритил или феноксазин, витамин (например, фолат, витамин А, витамин Е, биотин, пиридоксаль), пептид, углевод (например, моносахарид, дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид, полисахарид), эндосомолитический компонент, стероид (например, уваол, гецигенин, диосгенин), терпен (например, тритерпен, например, сарсасапогенин, фриделин, литохолевая кислота, дериватизованная эпифриделанолом) или катионный липид. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент, связывающий белки, представляет собой насыщенную или ненасыщенную жирную кислоту с длиной цепи от С16 до С22, холестерин, холевую кислоту, витамин Е, адамантан или 1-пентафторпропил.

В некоторых вариантах реализации изобретения линкер имеет структуру, выбранную из:



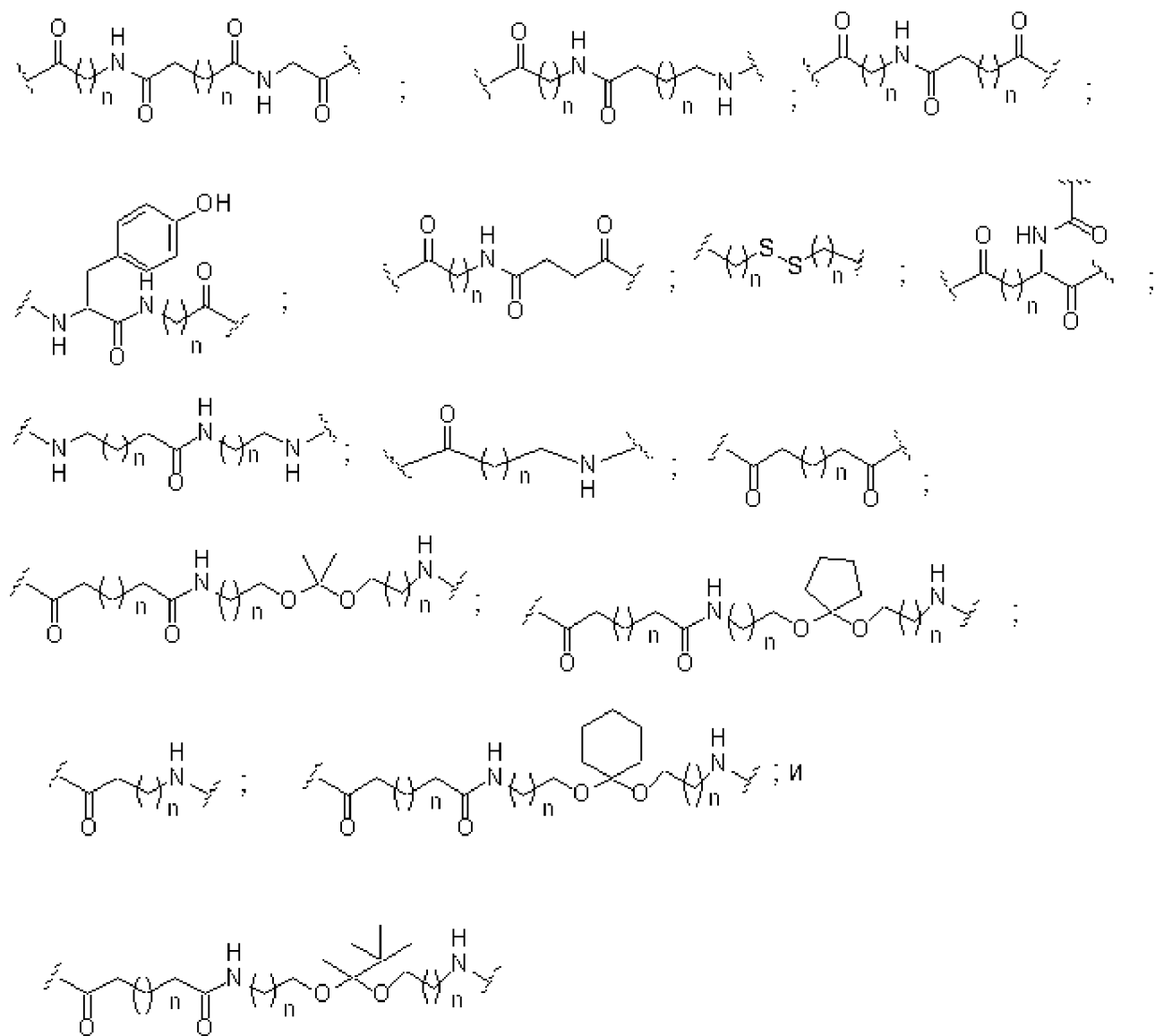
где каждый  $n$  независимо равен от 1 до 20; и  $p$  равен от 1 до 6.

В некоторых вариантах реализации изобретения линкер имеет структуру, выбранную из:



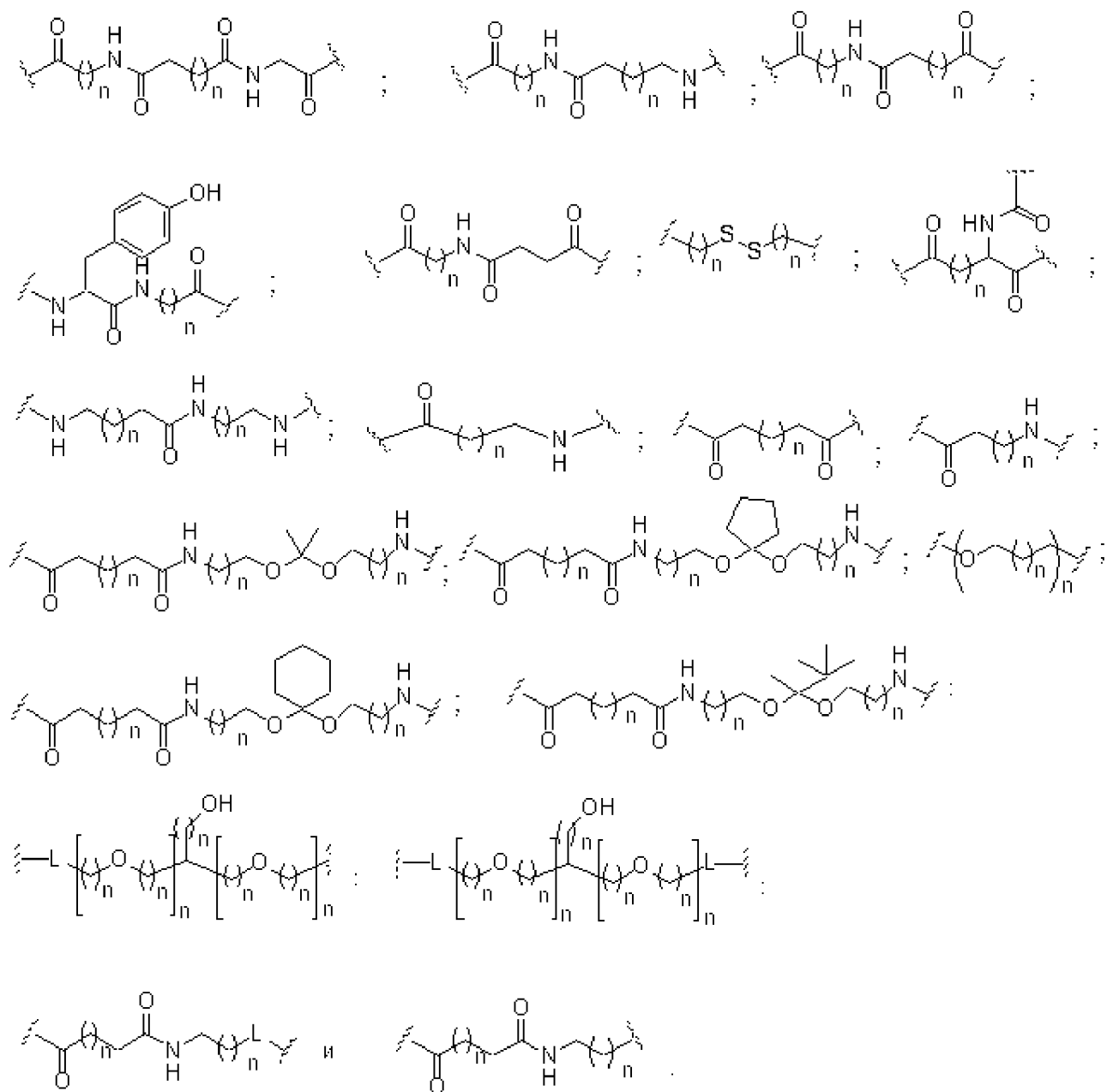
где каждый  $n$  независимо равен от 1 до 20.

В некоторых вариантах реализации изобретения линкер имеет структуру, выбранную из:



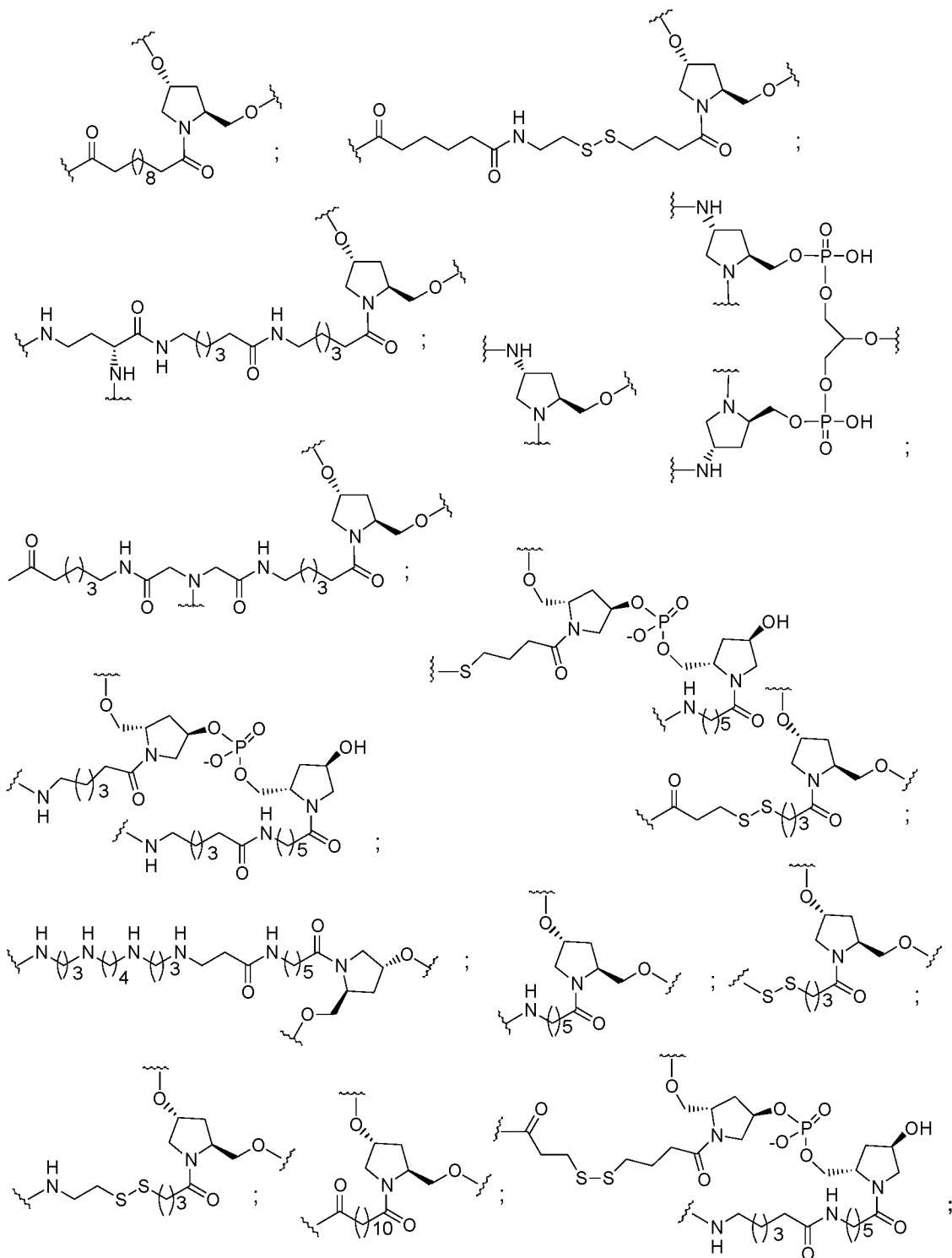
где  $n$  равен от 1 до 20.

В некоторых вариантах реализации изобретения линкер имеет структуру, выбранную из:

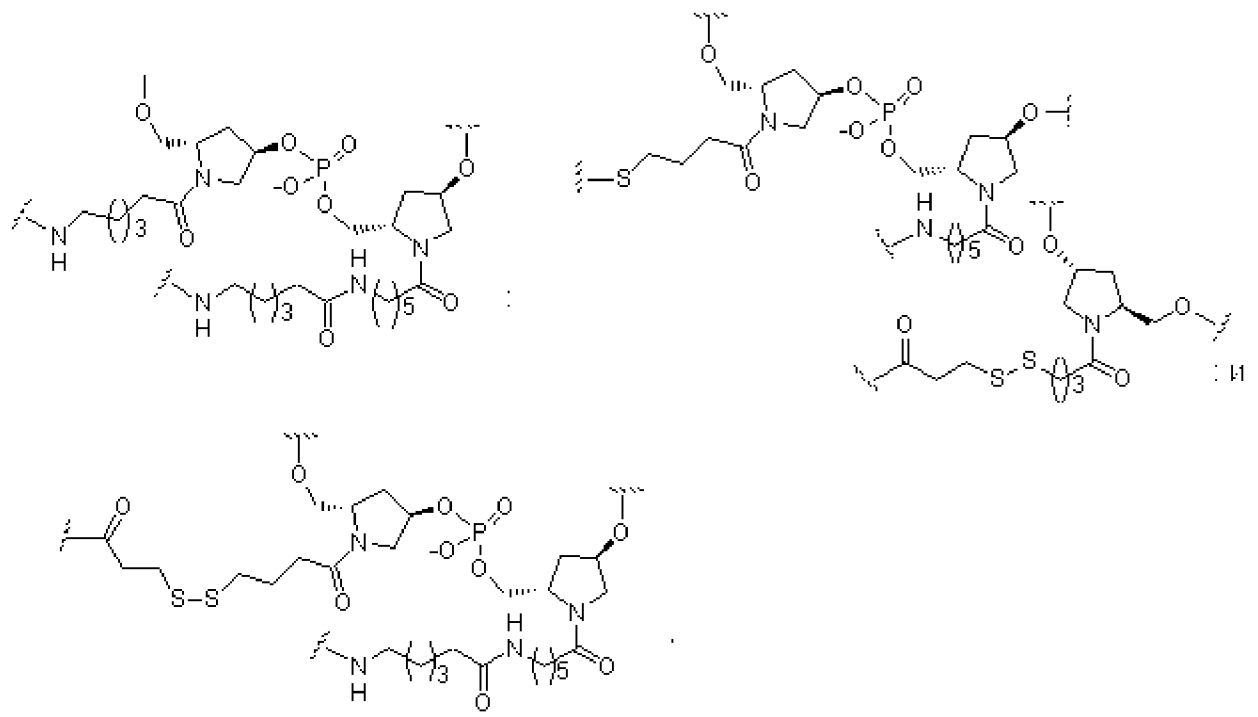


где каждый L независимо представляет собой фосфорную связывающую группу или нейтральную связывающую группу; и  
каждый n независимо равен от 1 до 20.

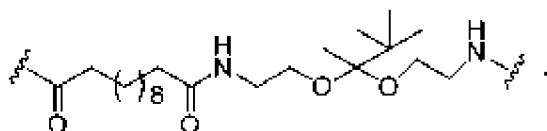
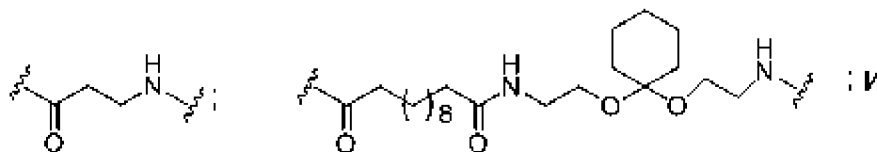
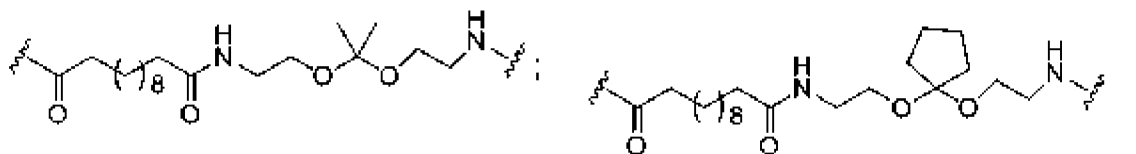
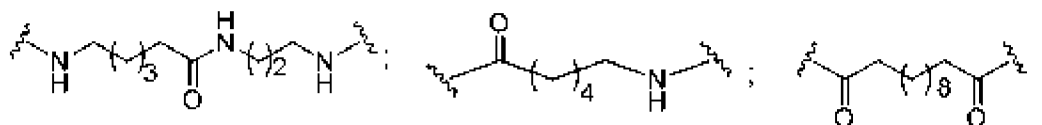
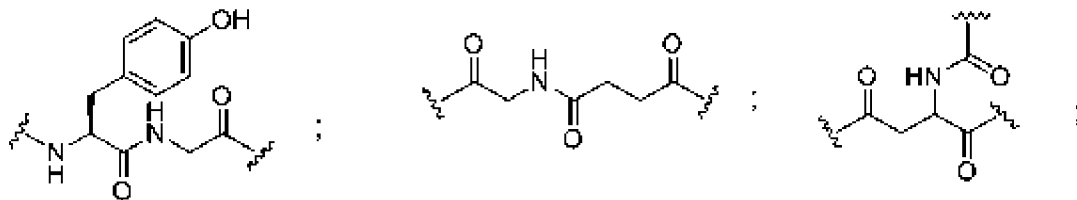
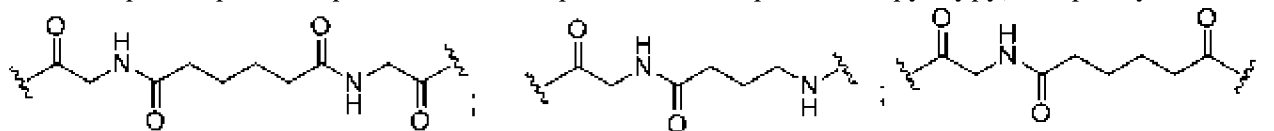
В некоторых вариантах реализации изобретения линкер имеет структуру, выбранную



из:

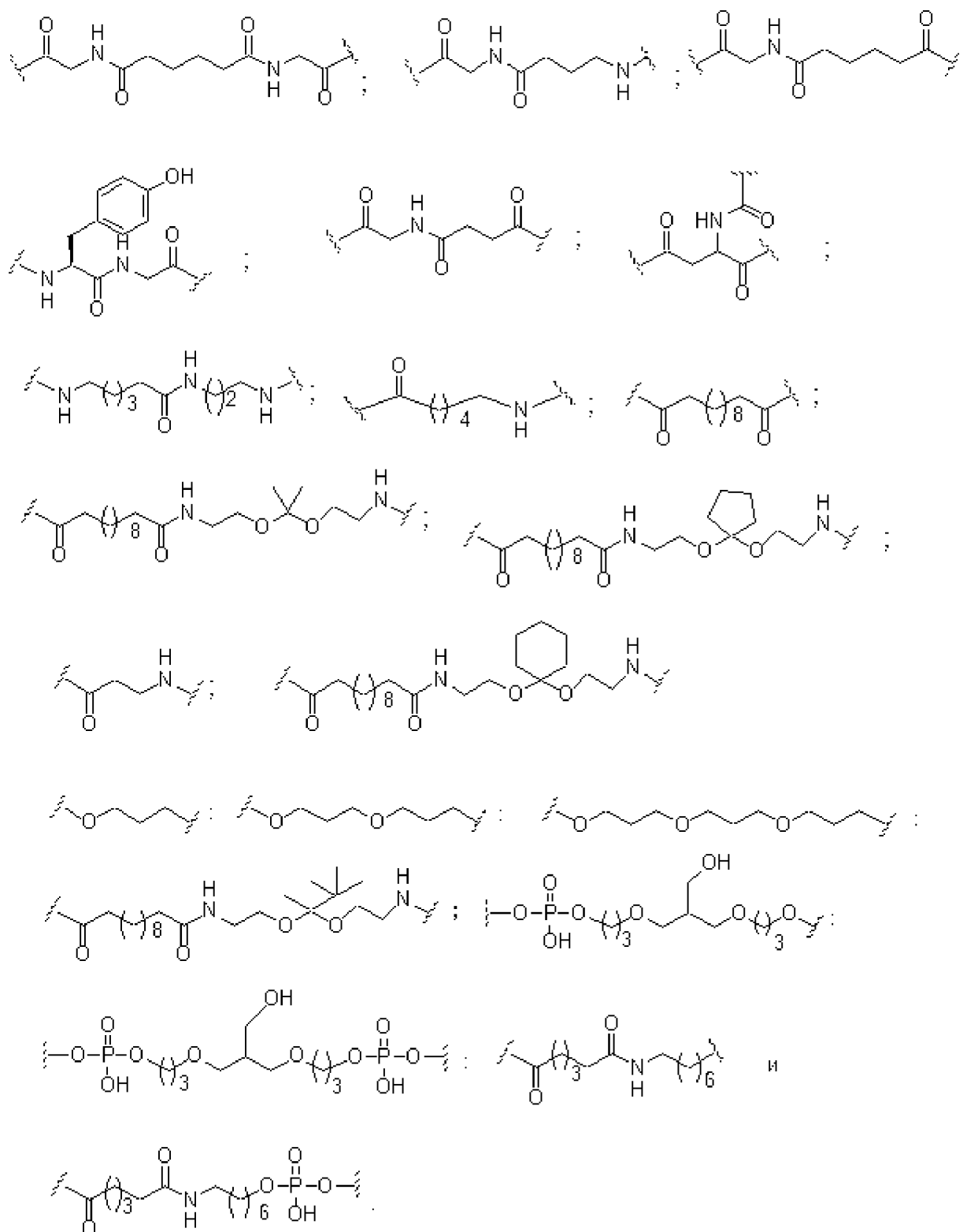


В некоторых вариантах реализации изобретения линкер имеет структуру, выбранную из:



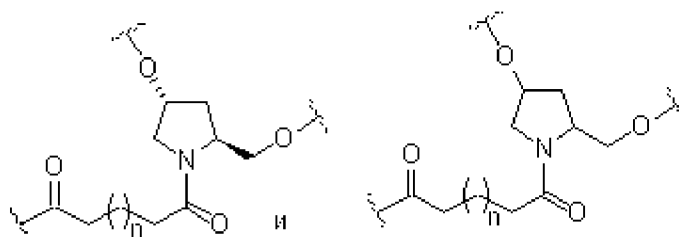


В некоторых вариантах реализации изобретения линкер имеет структуру, выбранную из:



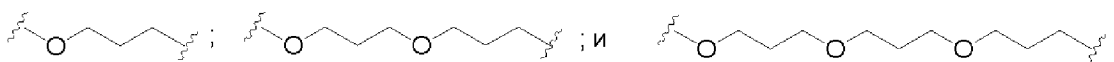
В некоторых вариантах реализации изобретения линкер имеет структуру, выбранную

из:

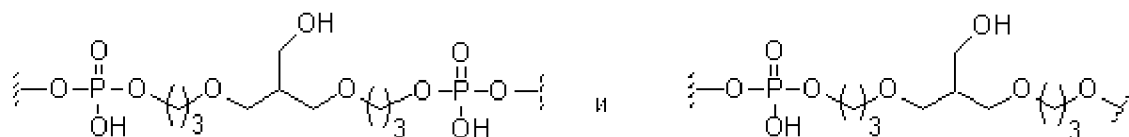


где n равен от 1 до 20.

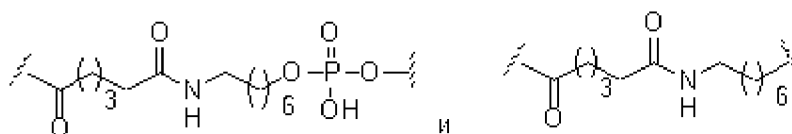
В некоторых вариантах реализации изобретения линкер имеет структуру, выбранную из:



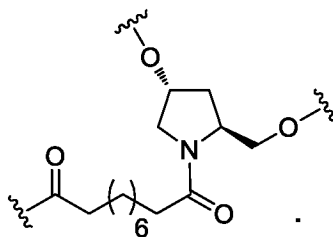
В некоторых вариантах реализации изобретения линкер имеет структуру, выбранную из:



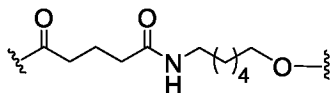
В некоторых вариантах реализации изобретения линкер имеет структуру, выбранную из:



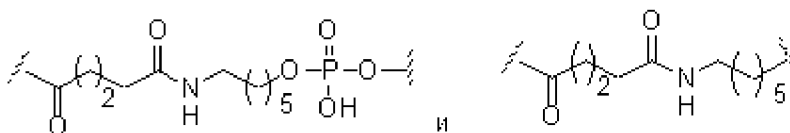
В некоторых вариантах реализации изобретения линкер конъюгата имеет структуру:



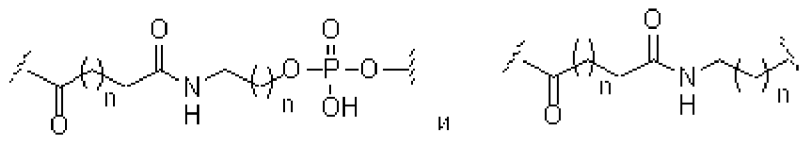
В некоторых вариантах реализации изобретения линкер конъюгата имеет структуру:



В некоторых вариантах реализации изобретения линкер имеет структуру, выбранную из:



В некоторых вариантах реализации изобретения линкер имеет структуру, выбранную из:



где каждый  $n$  независимо равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7.

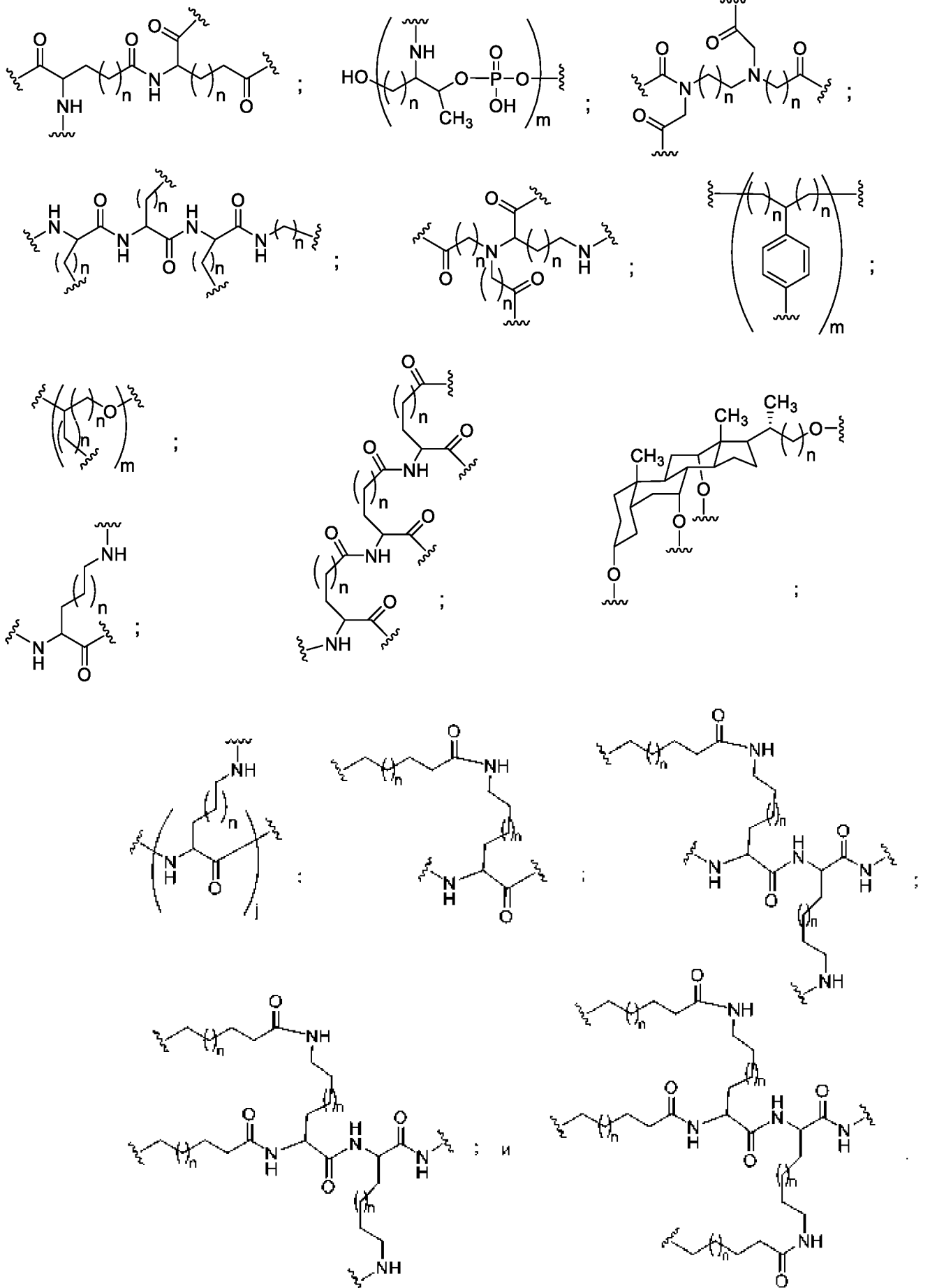
#### **iv. Некоторые фрагменты, нацеливающие на клетку**

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы содержат фрагменты, нацеливающие на клетку. Некоторые такие фрагменты, нацеливающие на клетку, увеличивают клеточный захват антисмысловых соединений. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты, нацеливающие на клетку, содержат группу ветвления, одну или более связей и один или более лигандов. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты, нацеливающие на клетку, содержат группу ветвления, одну или более связей, один или более лигандов и одну или более расщепляемых связей.

### 1. Некоторые группы ветвления

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы содержат нацеливающий фрагмент, содержащий группу ветвления и по меньшей мере два связанных лиганда. В некоторых вариантах реализации изобретения группа ветвления присоединяет линкер конъюгата. В некоторых вариантах реализации изобретения группа ветвления присоединяет расщепляемый фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения группа ветвления присоединяет антисмысловый олигонуклеотид. В некоторых вариантах реализации изобретения группа ветвления ковалентно присоединена к линкеру и каждому из связанных лигандов. В некоторых вариантах реализации изобретения группа ветвления содержит разветвленную алифатическую группу, которая содержит группы, выбранные из алкильных, амидных, дисульфидных, полиэтиленгликолевых, простых эфирных, тиоэфирных и гидроксиламино-групп. В некоторых вариантах реализации изобретения группа ветвления содержит группы, выбранные из алкильных, амидных и простых эфирных групп. В некоторых вариантах реализации изобретения группа ветвления содержит группы, выбранные из алкильных и простых эфирных групп. В некоторых вариантах реализации изобретения группа ветвления содержит моно- или полициклическую кольцевую систему. В некоторых вариантах реализации изобретения группа ветвления содержит одну или более расщепляемых связей. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгирующая группа не содержит группу ветвления.

В некоторых вариантах реализации изобретения группа ветвления имеет структуру, выбранную из:

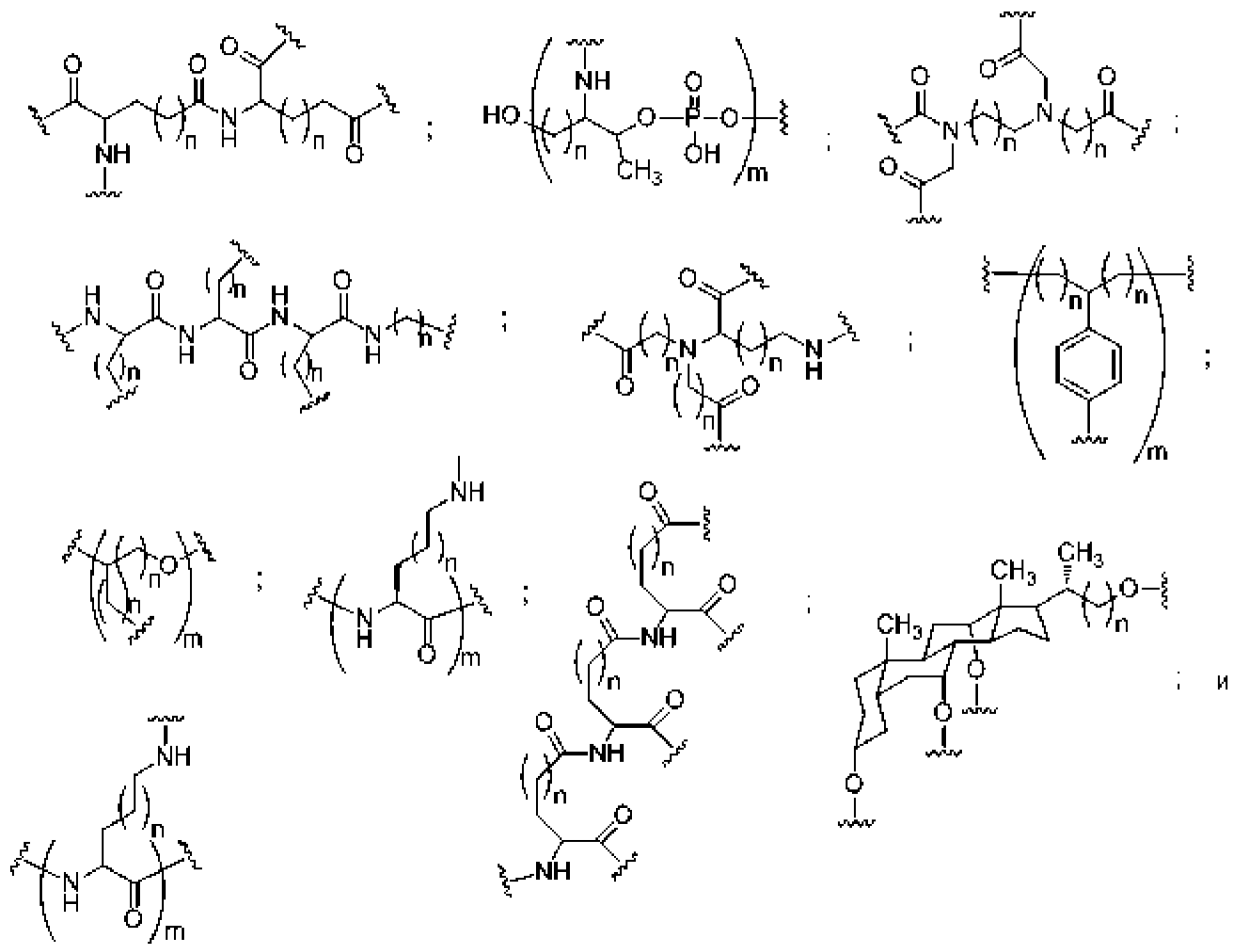


где каждый  $n$  независимо равен от 1 до 20;

$j$  равен от 1 до 3; и

$m$  равен от 2 до 6.

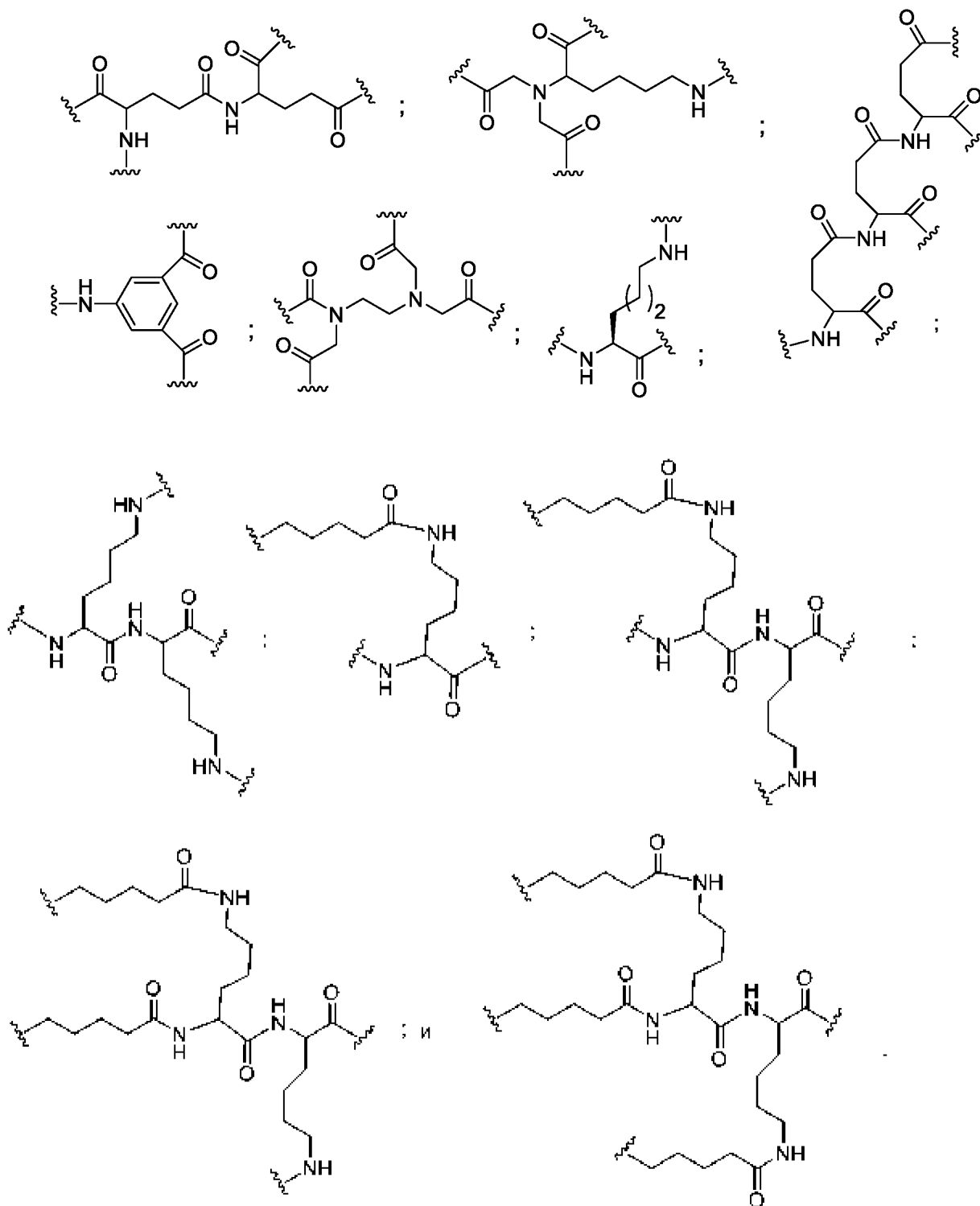
В некоторых вариантах реализации изобретения группа ветвления имеет структуру, выбранную из:



где каждый  $n$  независимо равен от 1 до 20; и

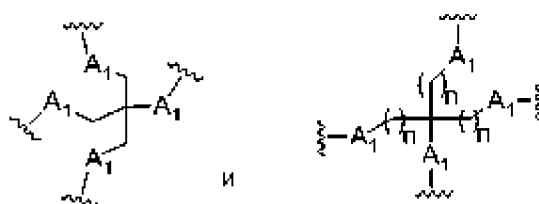
$m$  равен от 2 до 6.

В некоторых вариантах реализации изобретения группа ветвления имеет структуру, выбранную из:



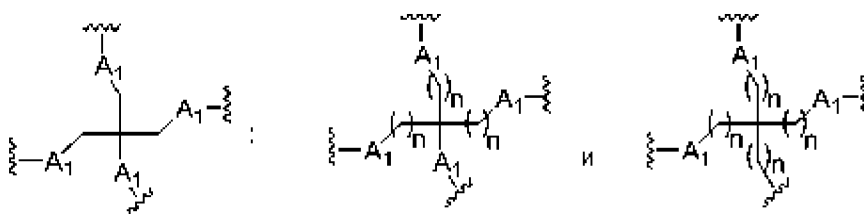
В некоторых вариантах реализации изобретения группа ветвления имеет структуру, выбранную из:





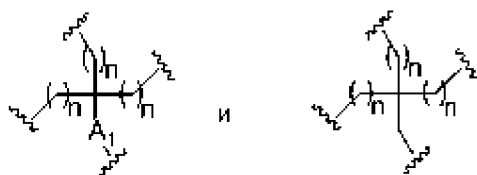
где каждый  $A_1$  независимо представляет собой O, S, C=O или NH; и  
каждый  $n$  независимо равен от 1 до 20.

В некоторых вариантах реализации изобретения группа ветвления имеет структуру, выбранную из:



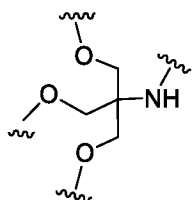
где каждый  $A_1$  независимо представляет собой O, S, C=O или NH; и  
каждый  $n$  независимо равен от 1 до 20.

В некоторых вариантах реализации изобретения группа ветвления имеет структуру, выбранную из:

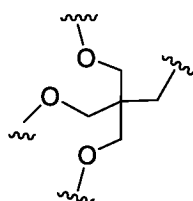


где  $A_1$  представляет собой O, S, C=O или NH; и  
каждый  $n$  независимо равен от 1 до 20.

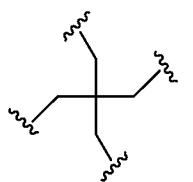
В некоторых вариантах реализации изобретения группа ветвления имеет структуру, выбранную из:



В некоторых вариантах реализации изобретения группа ветвления имеет структуру, выбранную из:



В некоторых вариантах реализации изобретения группа ветвления имеет структуру, выбранную из:



## 2. Некоторые связи

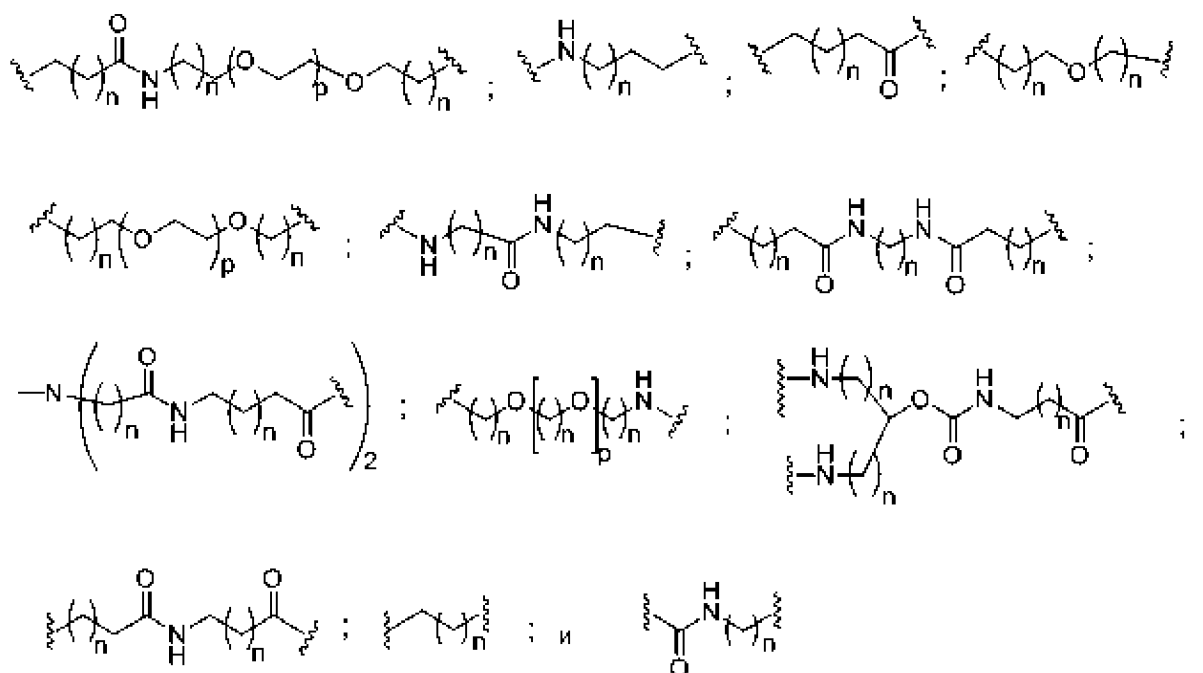
В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы содержат одну или более связей, ковалентно присоединенных к группе ветвления. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы содержат одну или более связей, ковалентно присоединенных к связывающей группе. В некоторых вариантах реализации изобретения каждая связка представляет собой линейную алифатическую группу, содержащую одну или более групп, выбранных из алкильных, простых эфирных, тиоэфирных, дисульфидных, амидных и полиэтиленгликолевых групп в любой комбинации. В некоторых вариантах реализации изобретения каждая связка представляет собой линейную алифатическую группу, содержащую одну или более групп, выбранных из алкильных, замещенных алкильных, простых эфирных, тиоэфирных, дисульфидных, амидных, фосфодиэфирных и полиэтиленгликолевых групп в любой комбинации. В некоторых вариантах реализации изобретения каждая связка представляет собой линейную алифатическую группу, содержащую одну или более групп, выбранных из алкильных, простых эфирных и амидных групп в любой комбинации. В некоторых

вариантах реализации изобретения каждая связка представляет собой линейную алифатическую группу, содержащую одну или более групп, выбранных из алкильных, замещенных алкильных, фосфодиэфирных, простых эфирных и амидных групп в любой комбинации. В некоторых вариантах реализации изобретения каждая связка представляет собой линейную алифатическую группу, содержащую одну или более групп, выбранных из алкила и фосфодиэфира в любой комбинации. В некоторых вариантах реализации изобретения каждая связка содержит по меньшей мере одну фосфорную связывающую группу или нейтральную связывающую группу.

В некоторых вариантах реализации изобретения связка содержит одну или более расщепляемых связей. В некоторых вариантах реализации изобретения связка присоединена к группе ветвления через амидную или простую эфирную группу. В некоторых вариантах реализации изобретения связка присоединена к группе ветвления через фосфодиэфирную группу. В некоторых вариантах реализации изобретения связка присоединена к группе ветвления через фосфорную связывающую группу или через нейтральную связывающую группу. В некоторых вариантах реализации изобретения связка присоединена к группе ветвления через простую эфирную группу. В некоторых вариантах реализации изобретения связка присоединена к лиганду либо через амидную, либо через простую эфирную группу. В некоторых вариантах реализации изобретения связка присоединена к лиганду через простую эфирную группу. В некоторых вариантах реализации изобретения связка присоединена к лиганду либо через амидную, либо через простую эфирную группу. В некоторых вариантах реализации изобретения связка присоединена к лиганду через простую эфирную группу.

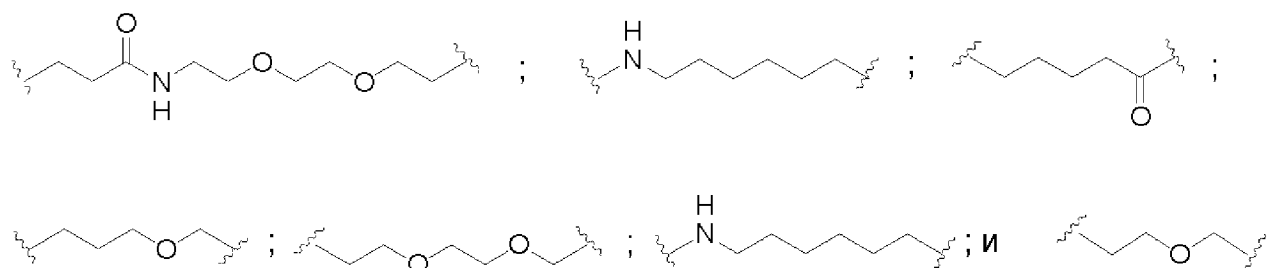
В некоторых вариантах реализации изобретения каждая связка имеет длину от около 8 до около 20 атомов в цепи между лигандом и группой ветвления. В некоторых вариантах реализации изобретения каждая связка имеет длину от около 10 до около 18 атомов в цепи между лигандом и группой ветвления. В некоторых вариантах реализации изобретения каждая связка имеет длину около 13 атомов в цепи.

В некоторых вариантах реализации изобретения связка имеет структуру, выбранную из:

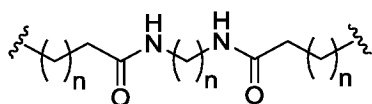


где каждый  $n$  независимо равен от 1 до 20; и  
каждый  $p$  равен от 1 до около 6.

В некоторых вариантах реализации изобретения связка имеет структуру,  
выбранную из:

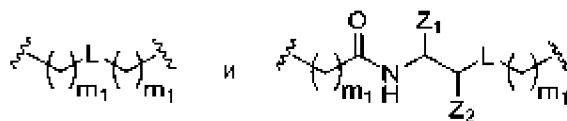


В некоторых вариантах реализации изобретения связка имеет структуру,  
выбранную из:



где каждый  $n$  независимо равен от 1 до 20.

В некоторых вариантах реализации изобретения связка имеет структуру, выбранную из:



где L представляет собой либо фосфорную связывающую группу, либо нейтральную связывающую группу;

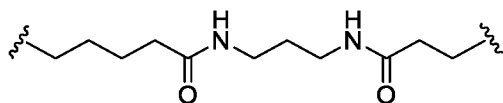
Z<sub>1</sub> представляет собой C(=O)O-R<sub>2</sub>;

Z<sub>2</sub> представляет собой H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил или замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил;

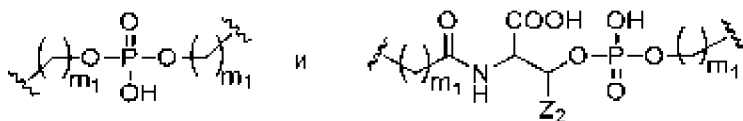
R<sub>2</sub> представляет собой H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил или замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил; и

каждый m<sub>1</sub> независимо равен от 0 до 20, при этом по меньшей мере один m<sub>1</sub> больше 0 для каждой связки.

В некоторых вариантах реализации изобретения связка имеет структуру, выбранную из:



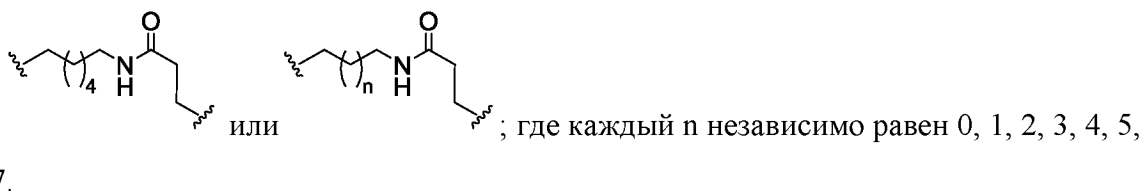
В некоторых вариантах реализации изобретения связка имеет структуру, выбранную из:



где Z<sub>2</sub> представляет собой H или CH<sub>3</sub>; и

каждый m<sub>1</sub> независимо равен от 0 до 20, при этом по меньшей мере один m<sub>1</sub> больше 0 для каждой связки.

В некоторых вариантах реализации изобретения связка имеет структуру, выбранную из:



В некоторых вариантах реализации изобретения связка содержит фосфорную связывающую группу. В некоторых вариантах реализации изобретения связка не содержит ни одной амидной связи. В некоторых вариантах реализации изобретения связка содержит фосфорную связывающую группу и не содержит ни одной амидной связи.

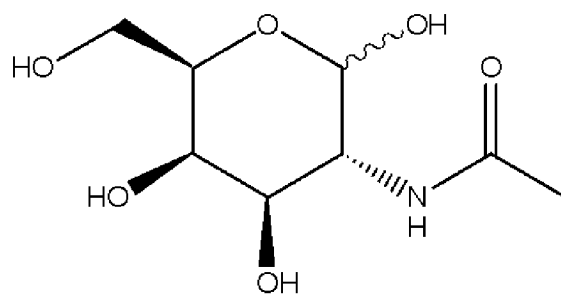
### 3. Некоторые лиганды

В некоторых вариантах реализации настоящего описания приведены лиганды, при этом каждый лиганд ковалентно присоединен к связке. В некоторых вариантах реализации изобретения каждый лиганд выбран так, чтобы он обладал аффинностью по меньшей мере к одному типу рецептора на клетке-мишени. В некоторых вариантах реализации изобретения лиганды выбраны так, чтобы они обладали аффинностью по меньшей мере к одному типу рецептора на поверхности клетки печени млекопитающего. В некоторых вариантах реализации изобретения лиганды выбраны так, чтобы они обладали аффинностью к печеночному асиалогликопротеиновому рецептору (ASGP-R). В некоторых вариантах реализации изобретения каждый лиганд представляет собой углевод. В некоторых вариантах реализации изобретения каждый лиганд независимо выбран из галактозы, N-ацетилгалактозамина, маннозы, глюкозы, глюкозамина и фукозы. В некоторых вариантах реализации изобретения каждый лиганд представляет собой N-ацетилгалактозамин (GalNAc). В некоторых вариантах реализации изобретения нацеливающий фрагмент содержит 2-6 лигандов. В некоторых вариантах реализации изобретения нацеливающий фрагмент содержит 3 лиганда. В некоторых вариантах реализации изобретения нацеливающий фрагмент содержит 3 N-ацетилгалактозаминовых лиганда.

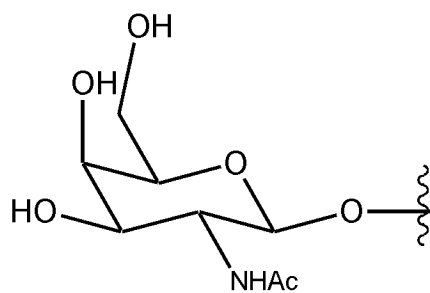
В некоторых вариантах реализации изобретения лиганд представляет собой углевод, углеводное производное, модифицированный углевод, поливалентный углеводный кластер, полисахарид, модифицированный полисахарид или полисахаридное производное. В некоторых вариантах реализации изобретения лиганд представляет собой аминоксахар или тиосахар. Например, аминоксахара могут быть выбраны из любого количества соединений, известных в данной области техники, например, глюкозамина, сиаловой кислоты,  $\alpha$ -D-галактозамина, N-ацетилгалактозамина, 2-ацетамидо-2-дезоксид-

галактопиранозы (GalNAc), 2-амино-3-*O*-[(*R*)-1-карбоксиэтил]-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозы (β-мурамовой кислоты), 2-дезоксид-2-метиламино-L-глюкопиранозы, 4,6-дидезокси-4-формамидо-2,3-ди-*O*-метил-D-маннопиранозы, 2-дезоксид-2-сульфоамино-D-глюкопиранозы и *N*-сульфо-D-глюкозамина, и *N*-гликолоил-α-нейраминовой кислоты. Например, тиосахара могут быть выбраны из группы, состоящей из 5-тио-β-D-глюкопиранозы, метил 2,3,4-три-*O*-ацетил-1-тио-6-*O*-тритил-α-D-глюкопиранозиды, 4-тио-β-D-галактопиранозы и этил 3,4,6,7-тетра-*O*-ацетил-2-дезоксид-1,5-дитио-α-D-глюкогептопиранозиды.

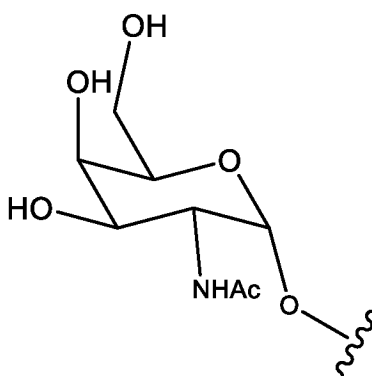
В некоторых вариантах реализации изобретения «GalNAc» или «Gal-NAc» относится к 2-(ацетиламино)-2-дезоксид-D-галактопиранозе, обычно упоминаемой в литературе как *N*-ацетилгалактозамин. В некоторых вариантах реализации изобретения «*N*-ацетилгалактозамин» относится к 2-(ацетиламино)-2-дезоксид-D-галактопиранозе. В некоторых вариантах реализации изобретения «GalNAc» или «Gal-NAc» относится к 2-(ацетиламино)-2-дезоксид-D-галактопиранозе. В некоторых вариантах реализации изобретения «GalNAc» или «Gal-NAc» относится к 2-(ацетиламино)-2-дезоксид-D-галактопиранозе, которая включает и β-форму: 2-(ацетиламино)-2-дезоксид-β-D-галактопиранозу, и α-форму: 2-(ацетиламино)-2-дезоксид-D-галактопиранозу. В некоторых вариантах реализации изобретения обе формы, β-форма: 2-(ацетиламино)-2-дезоксид-β-D-галактопираноза, и α-форма: 2-(ацетиламино)-2-дезоксид-D-галактопираноза, могут быть применены взаимозаменяемо. Соответственно, в структурах, в которых изображена одна форма, подразумевается, что эти структуры включают также и другую форму. Например, если показана структура для α-формы: 2-(ацетиламино)-2-дезоксид-D-галактопиранозы, то подразумевается, что эта структура включает также и другую форму. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения β-форма 2-(ацетиламино)-2-дезоксид-D-галактопиранозы является предпочтительным вариантом реализации.



2-(Ацетиламино)-2-дезоксид-D-галактопираноза

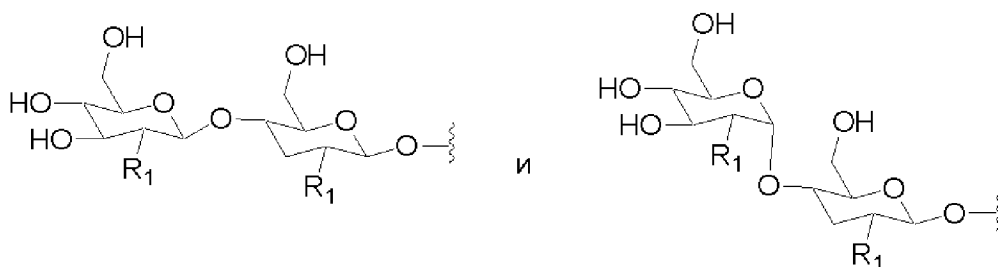


2-(Ацетиламино)-2-дезоксi-β-D-галактопираноза



2-(Ацетиламино)-2-дезоксi-α-D-галактопираноза

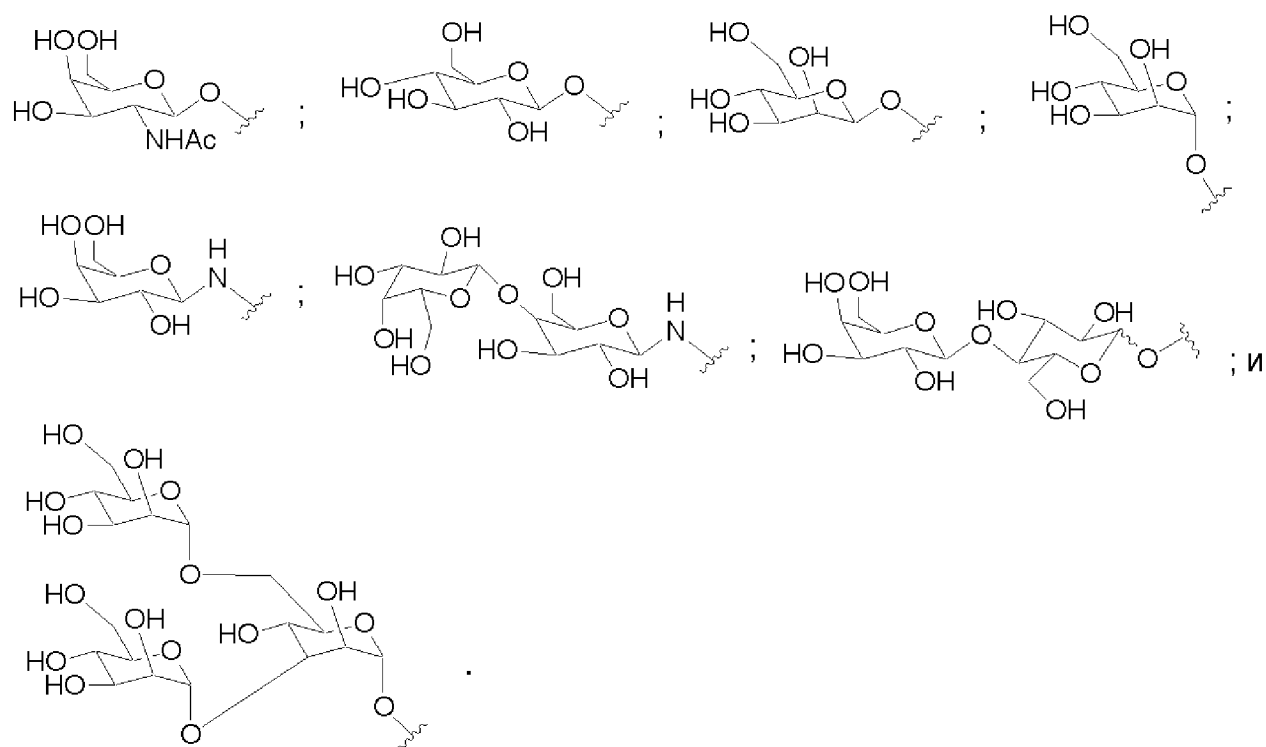
В некоторых вариантах один или более лигандов имеют структуру, выбранную из:



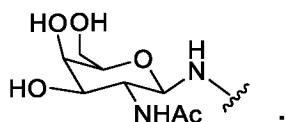
где каждый  $R_1$  выбран из  $\text{OH}$  и  $\text{NHCOOH}$ .



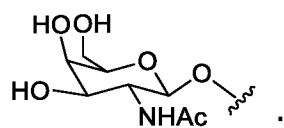
В некоторых вариантах один или более лигандов имеют структуру, выбранную из:



В некоторых вариантах один или более лигандов имеют структуру, выбранную из:

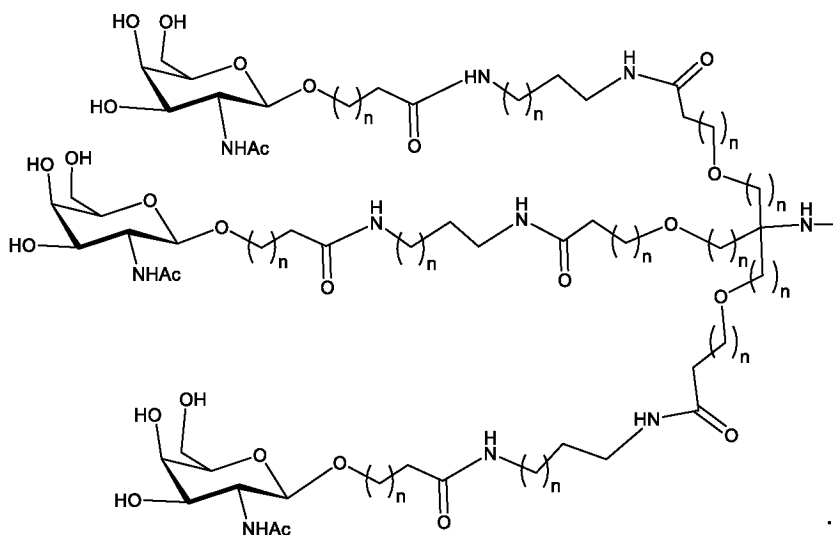


В некоторых вариантах один или более лигандов имеют структуру, выбранную из:



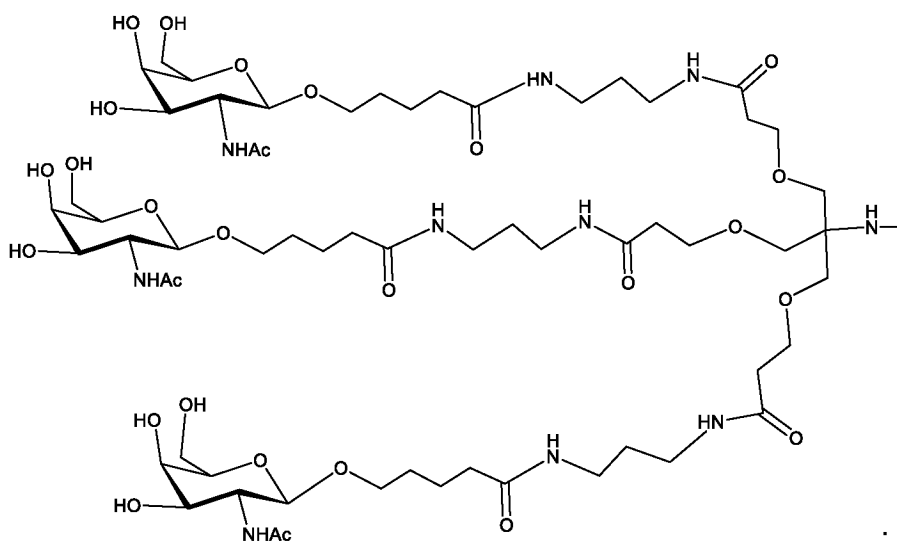
**i. Некоторые конъюгаты**

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы содержат структурные особенности, представленные выше. В некоторых таких вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы имеют следующую структуру:

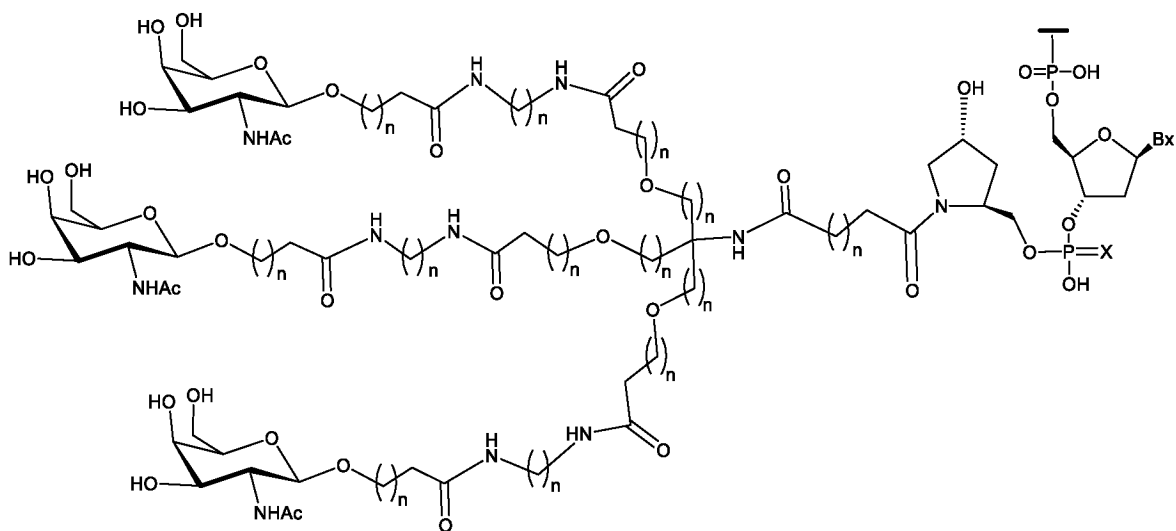


где каждый  $n$  независимо равен от 1 до 20.

В некоторых таких вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы имеют следующую структуру:



В некоторых таких вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы имеют следующую структуру:



где каждый  $n$  независимо равен от 1 до 20;

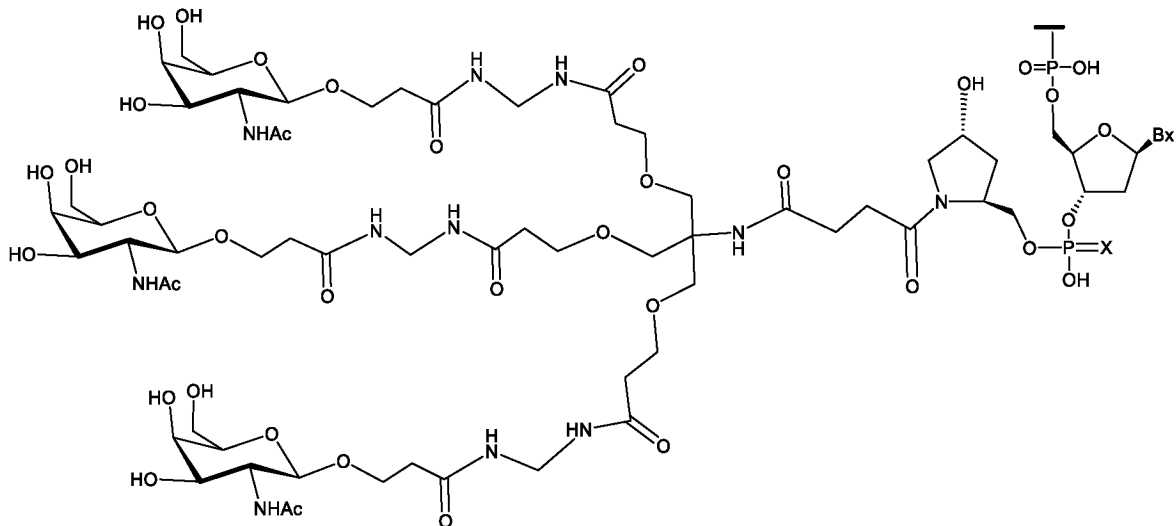
Z представляет собой H или связанную твердую подложку;

Q представляет собой антисмысловое соединение;

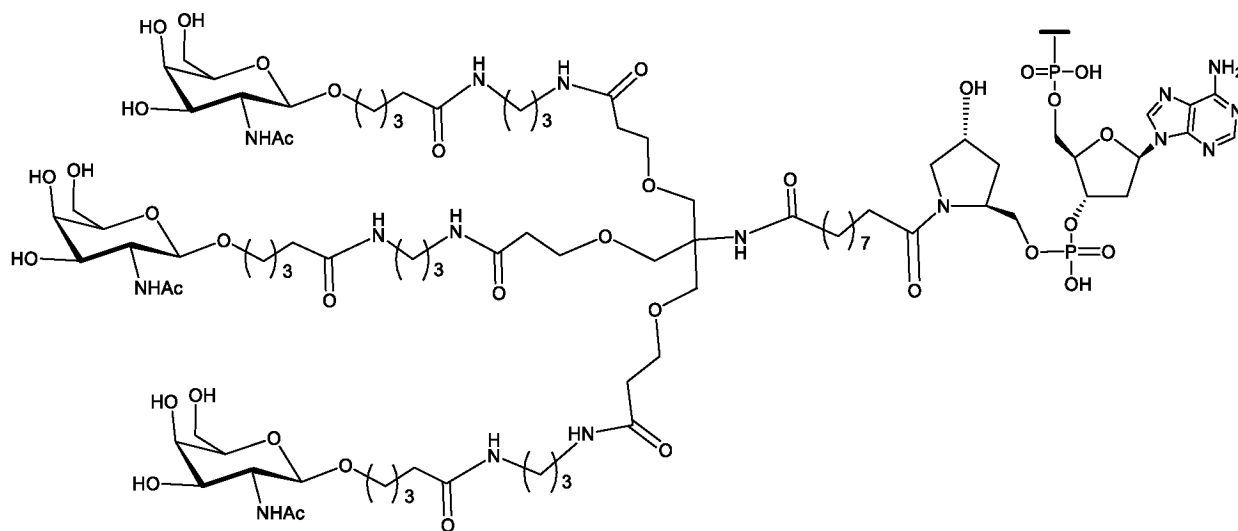
X представляет собой O или S; и

Bx представляет собой гетероциклический основной фрагмент.

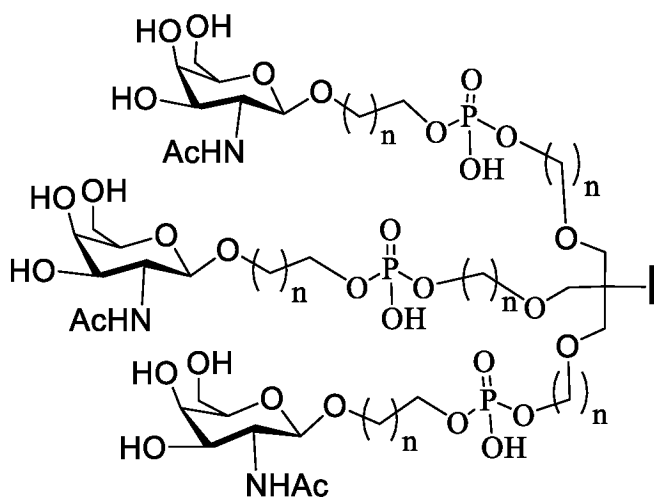
В некоторых таких вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы имеют следующую структуру:



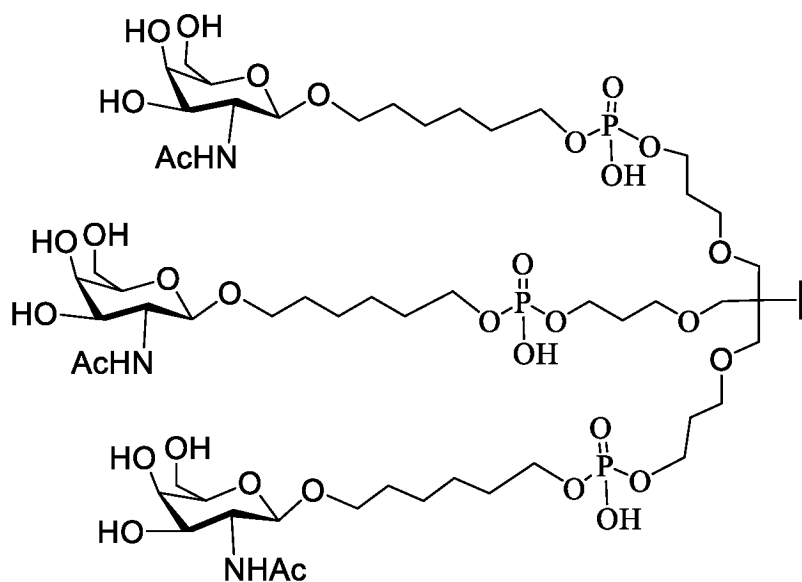
В некоторых таких вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы имеют следующую структуру:



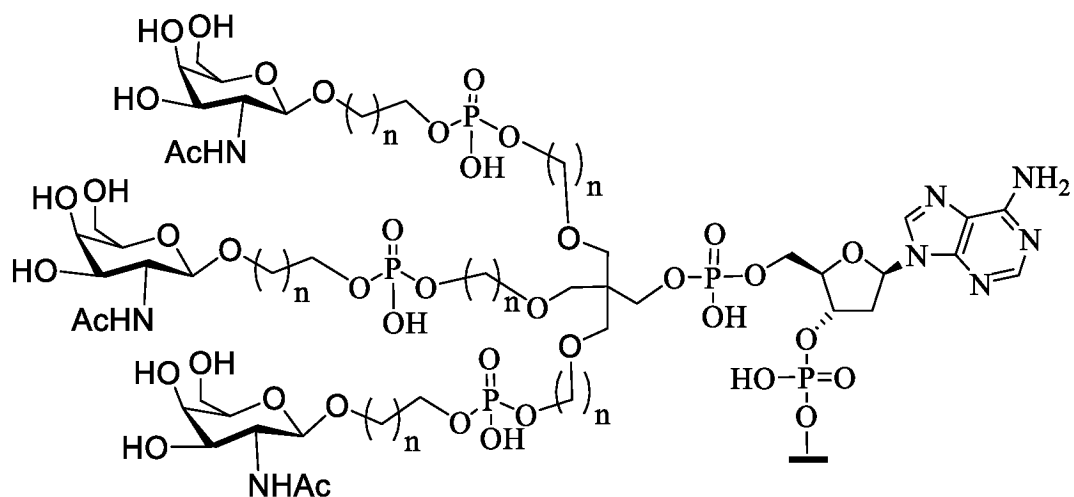
В некоторых таких вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы имеют следующую структуру:



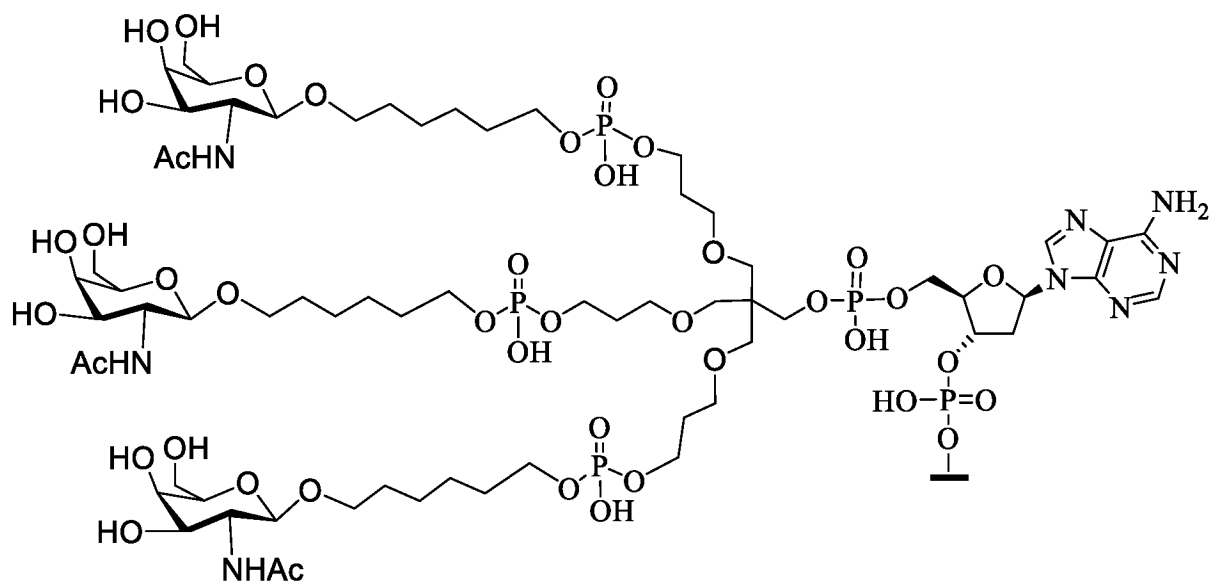
В некоторых таких вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы имеют следующую структуру:



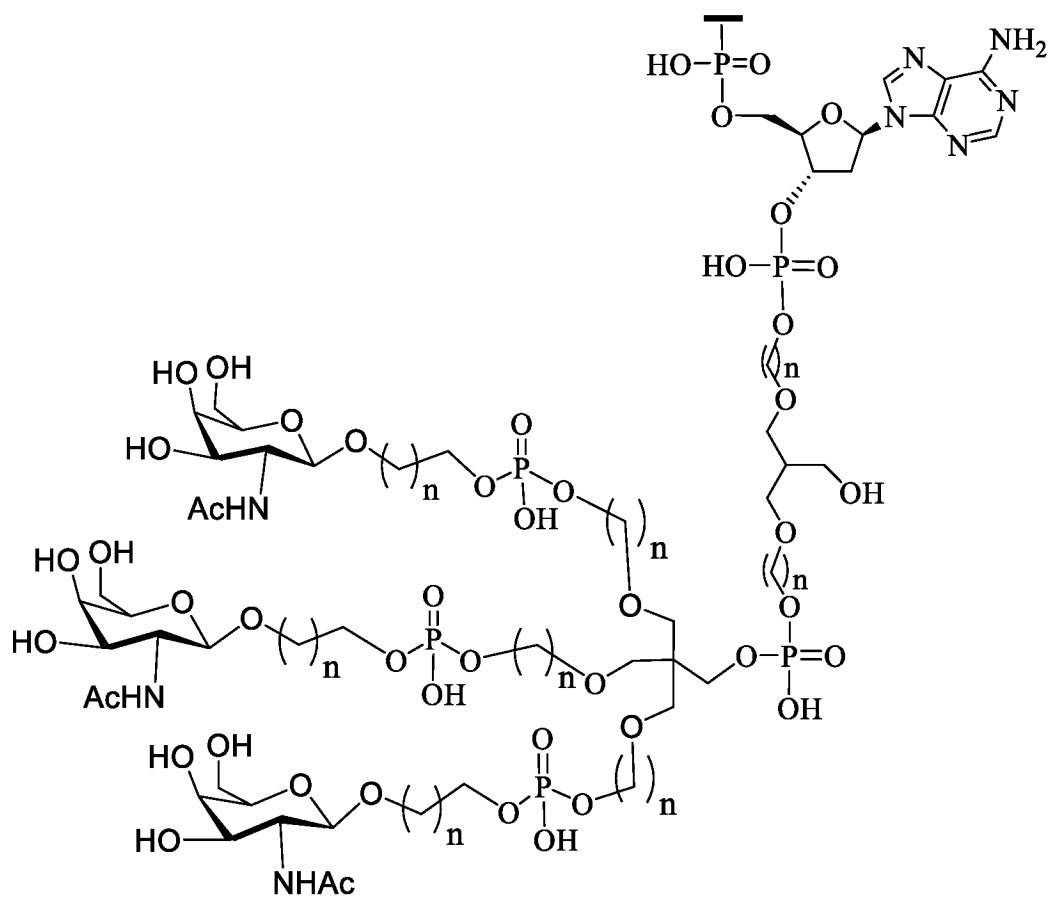
В некоторых таких вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы имеют следующую структуру:



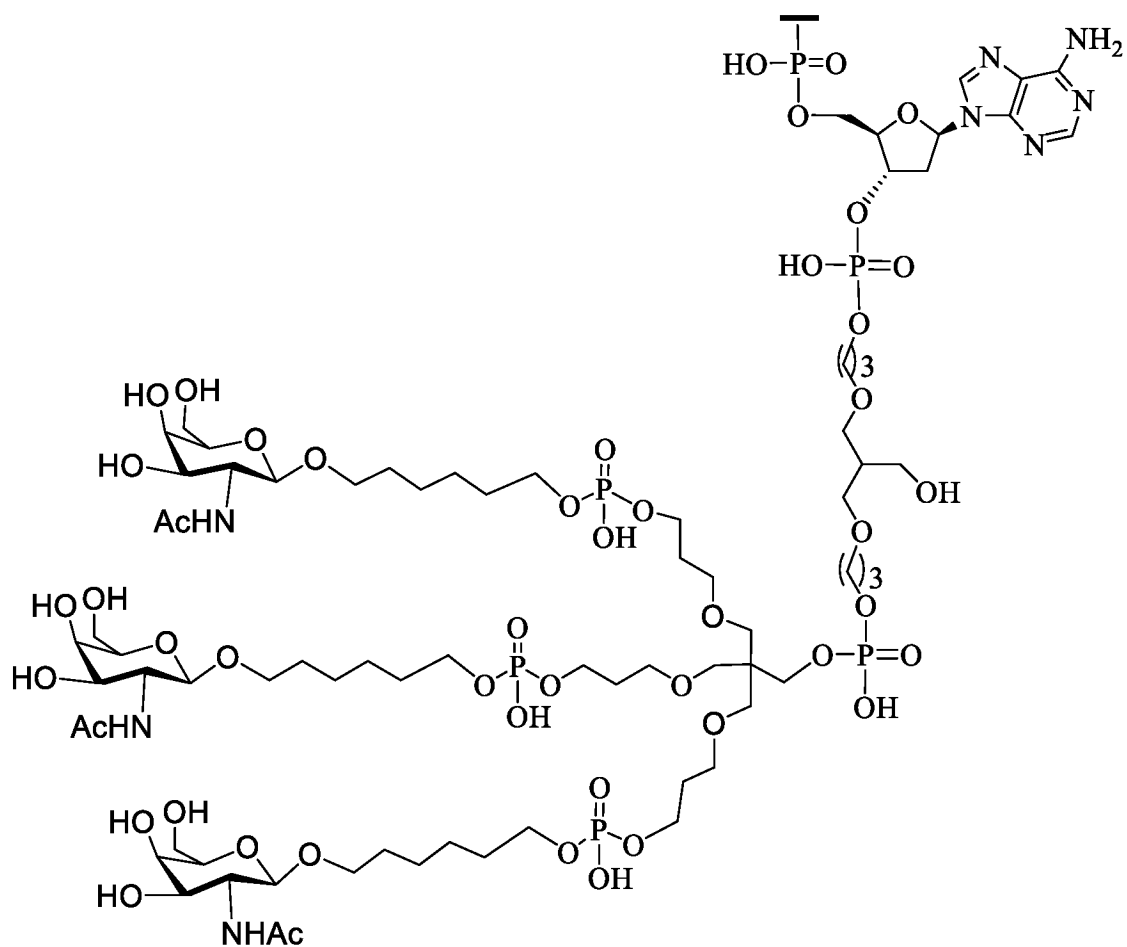
В некоторых таких вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы имеют следующую структуру



В некоторых таких вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы имеют следующую структуру:

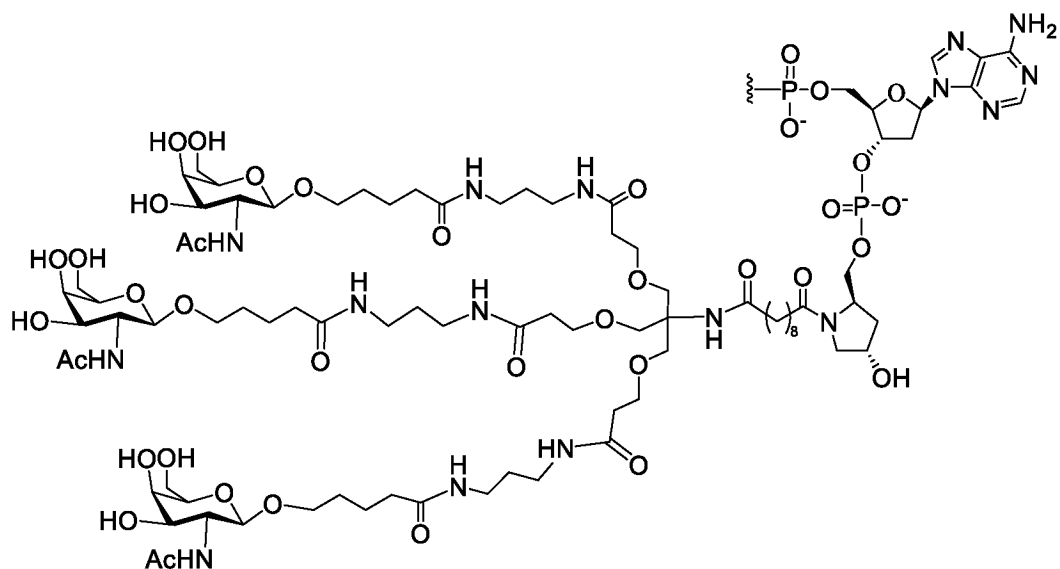


В некоторых таких вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы имеют следующую структуру:

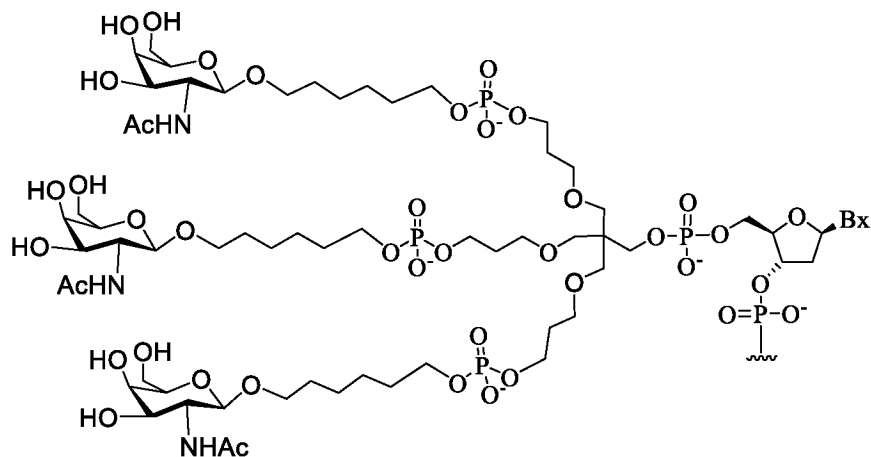


В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгаты не содержат пирролидин.

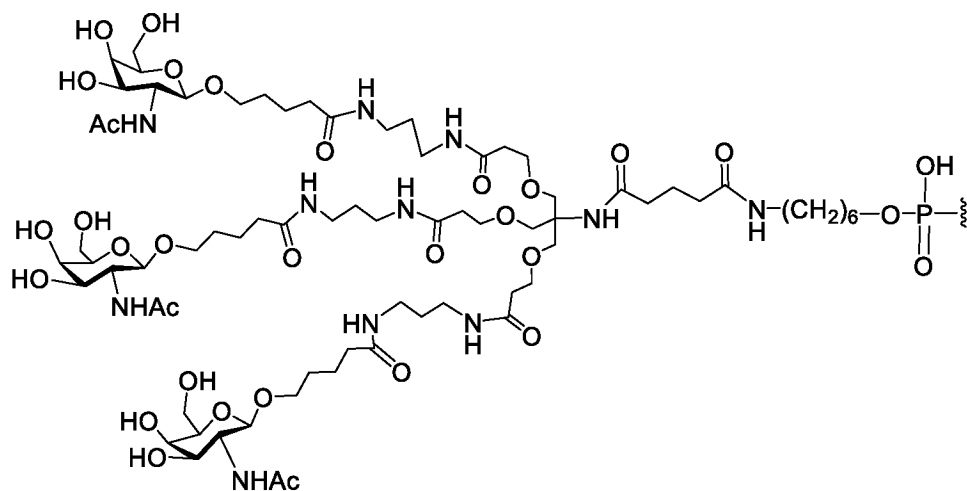
В некоторых таких вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы имеют следующую структуру:



В некоторых таких вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы имеют следующую структуру:

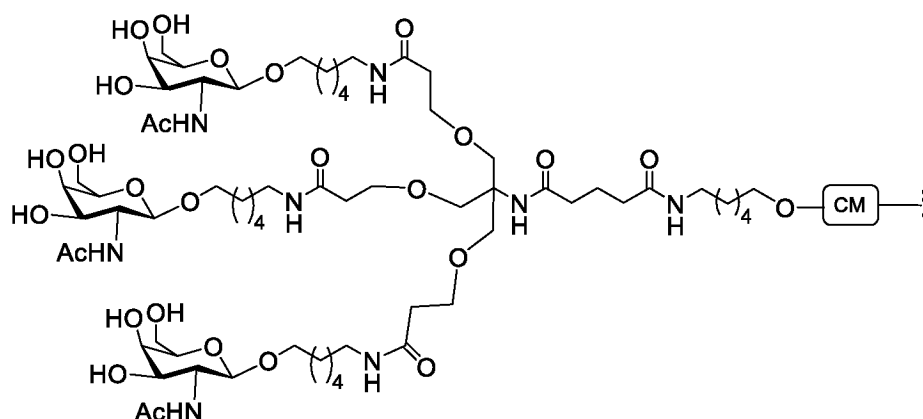


В некоторых таких вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы имеют следующую структуру:

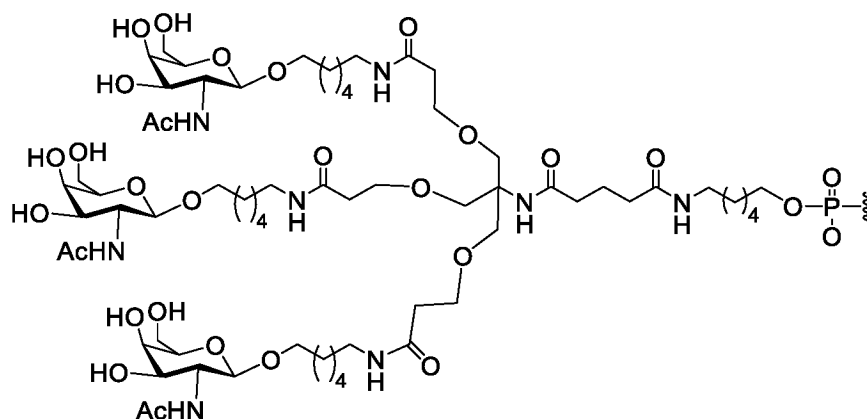




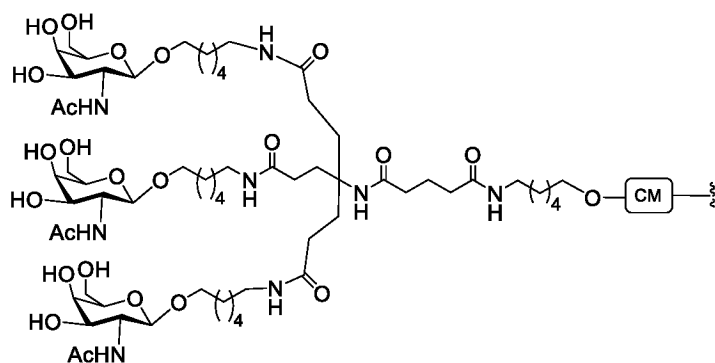
В некоторых таких вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы имеют следующую структуру:



В некоторых таких вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы имеют следующую структуру:

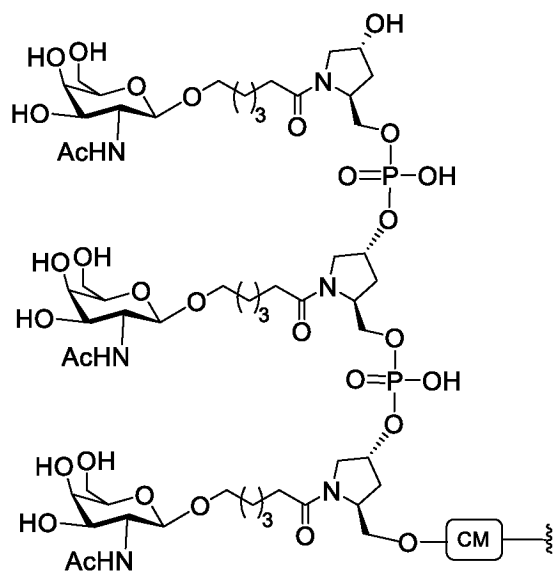


В некоторых таких вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы имеют следующую структуру:

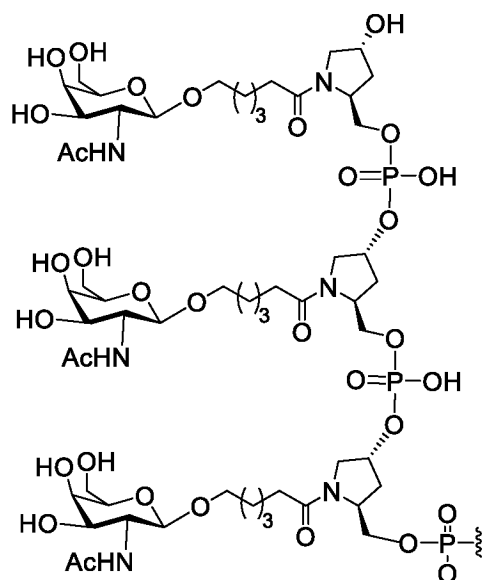


В некоторых таких вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы имеют следующую структуру:

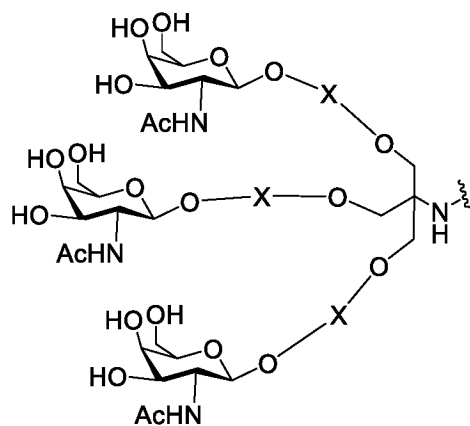




В некоторых таких вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы имеют следующую структуру:

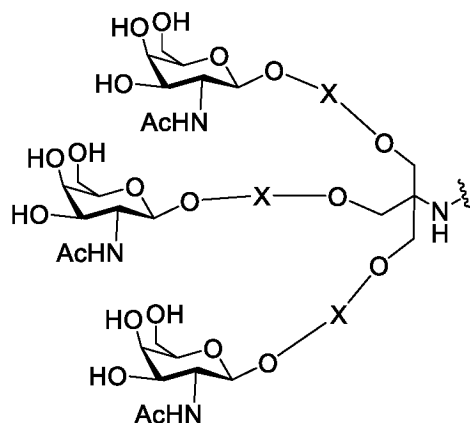


В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент конъюгирующие группы, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:



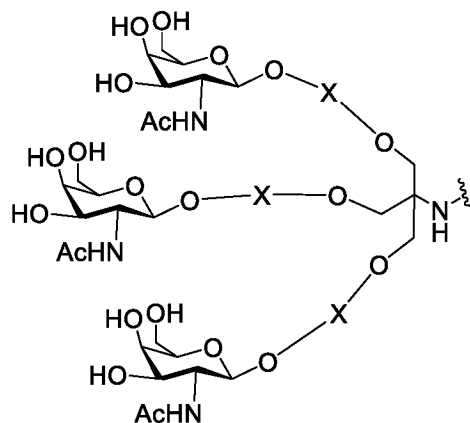
где X представляет собой замещенную или незамещенную связку из шести-одиннадцати последовательно связанных атомов.

В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент конъюгирующие группы, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:



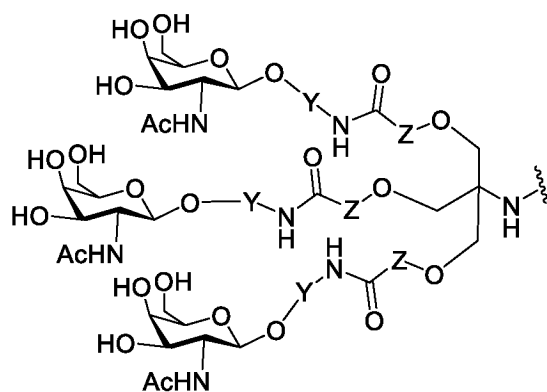
где X представляет собой замещенную или незамещенную связку из десяти последовательно связанных атомов.

В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент конъюгирующие группы, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:



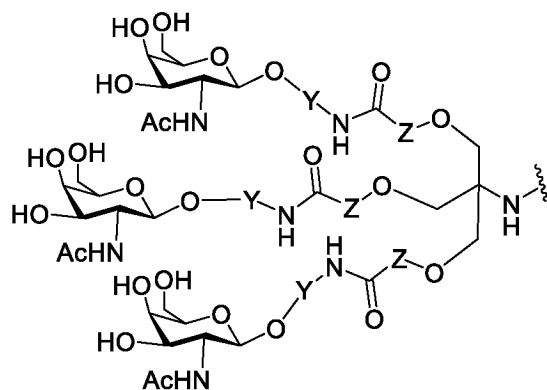
где X представляет собой замещенную или незамещенную связку из четырех-одиннадцати последовательно связанных атомов, и при этом указанная связка содержит только одну амидную связь.

В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент конъюгирующие группы, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:



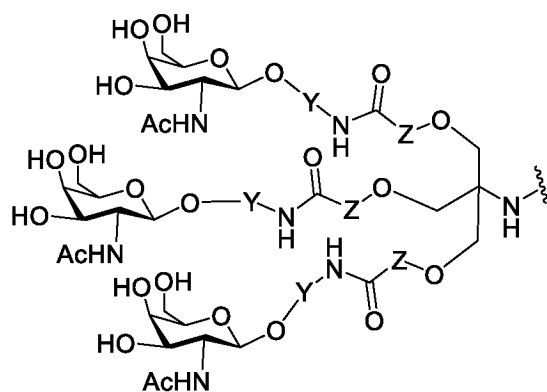
где Y и Z независимо выбраны из C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> замещенной или незамещенной алкильной, алкенильной или алкинильной группы или группы, содержащей эфир, кетон, амид, сложный эфир, карбамат, амин, пиперидин, фосфат, фосфодиэфир, тиофосфат, триазол, пирролидин, дисульфид или тиоэфир.

В некоторых таких вариантах реализации изобретения фрагмент конъюгирующие группы, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:



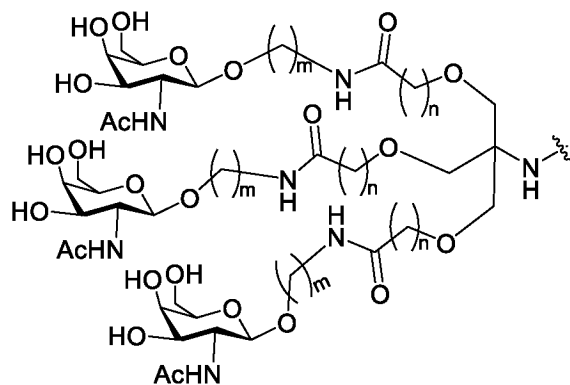
где Y и Z независимо выбраны из C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> замещенной или незамещенной алкильной группы или группы, содержащей ровно один эфир или ровно два эфира, амид, амин, пиперидин, фосфат, фосфодиэфир или тиофосфат.

В некоторых таких вариантах реализации изобретения фрагмент конъюгирующие группы, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:



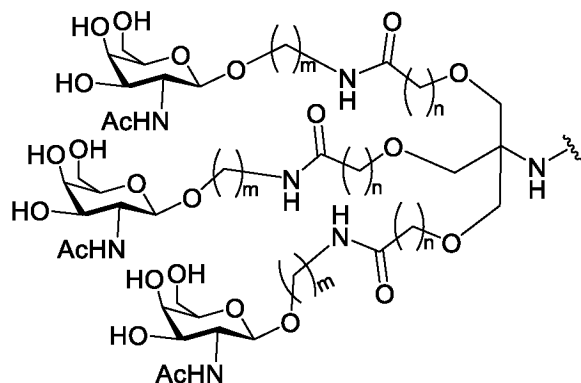
где Y и Z независимо выбраны из C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> замещенной или незамещенной алкильной группы.

В некоторых таких вариантах реализации изобретения фрагмент конъюгирующие группы, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:



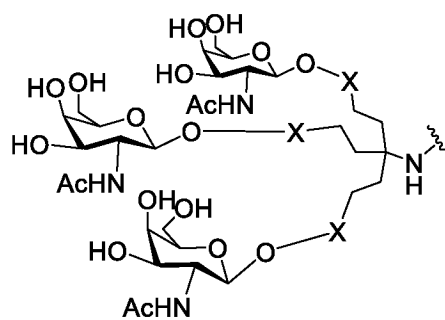
где m и n независимо выбраны из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12.

В некоторых таких вариантах реализации изобретения фрагмент конъюгирующие группы, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:



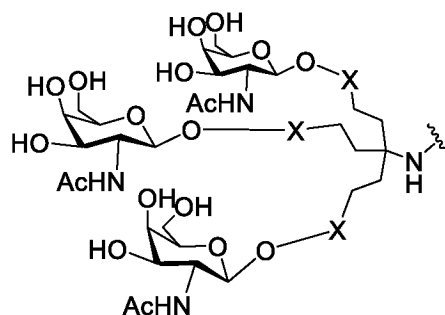
где m равен 4, 5, 6, 7 или 8, и n равен 1, 2, 3 или 4.

В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент конъюгирующие группы, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:



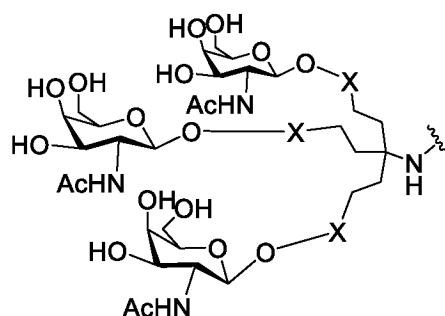
где X представляет собой замещенную или незамещенную связку из четырех-тринадцати последовательно связанных атомов, и при этом X не содержит эфирную группу.

В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент конъюгирующие группы, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:



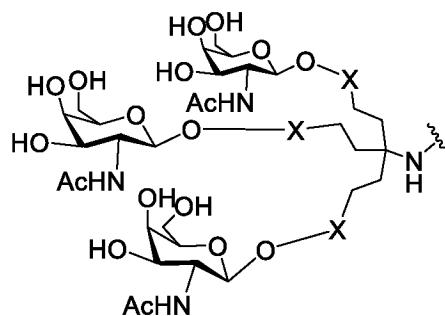
где X представляет собой замещенную или незамещенную связку из восьми последовательно связанных атомов, и при этом X не содержит эфирную группу.

В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент конъюгирующие группы, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:



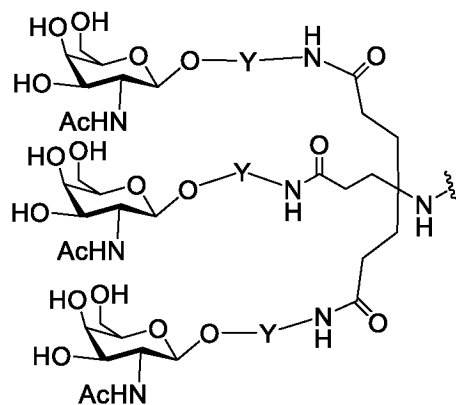
где X представляет собой замещенную или незамещенную связку из четырех-тринадцати последовательно связанных атомов, и при этом указанная связка содержит только одну амидную связь, а X не содержит эфирную группу.

В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент конъюгирующие группы, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:



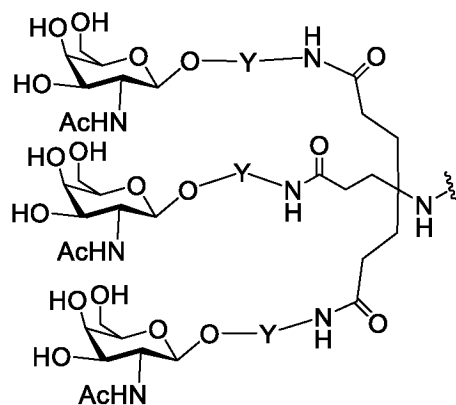
где X представляет собой замещенную или незамещенную связку из четырех-тринадцати последовательно связанных атомов, и при этом указанная связка состоит из амидной связи и замещенной или незамещенной C<sub>2</sub>-C<sub>11</sub> алкильной группы.

В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент конъюгирующие группы, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:



где Y выбран из C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> замещенной или незамещенной алкильной, алкенильной или алкинильной группы или группы, содержащей эфир, кетон, амид, сложный эфир, карбамат, амин, пиперидин, фосфат, фосфодиэфир, тиофосфат, триазол, пирролидин, дисульфид или тиоэфир.

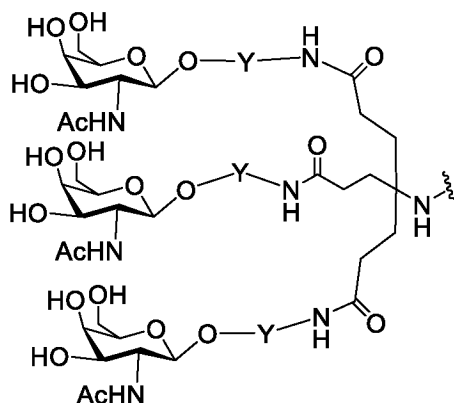
В некоторых таких вариантах реализации изобретения фрагмент конъюгирующие группы, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:





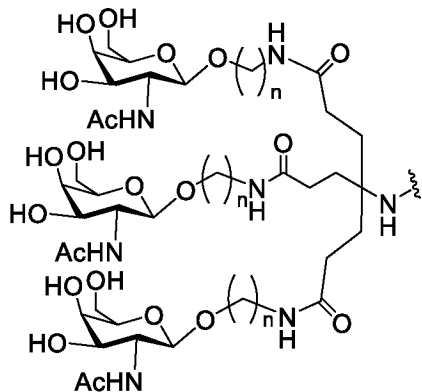
где Y выбран из C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> замещенной или незамещенной алкильной группы или группы, содержащей эфир, амин, пиперидин, фосфат, фосфодиэфир или тиофосфат.

В некоторых таких вариантах реализации изобретения фрагмент конъюгирующие группы, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:



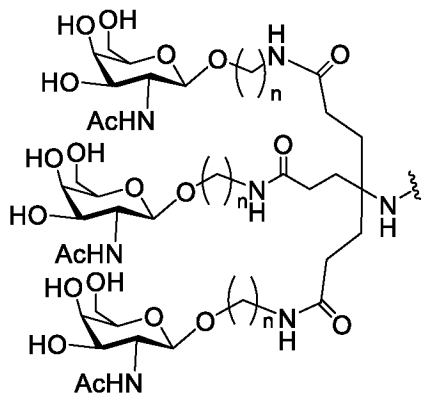
где Y выбран из C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> замещенной или незамещенной алкильной группы.

В некоторых таких вариантах реализации изобретения фрагмент конъюгирующие группы, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:



где n равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12.

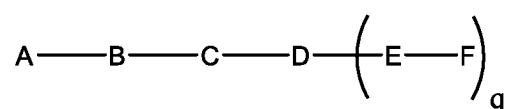
В некоторых таких вариантах реализации изобретения фрагмент конъюгирующие группы, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:



где n равен 4, 5, 6, 7 или 8.

**b. Некоторые конъюгированные антисмысловые соединения**

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгаты связаны с нуклеозидом антисмыслового олигонуклеотида в 2', 3' или 5' положении нуклеозида. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированное антисмысловое соединение имеет следующую структуру:



где

A представляет собой антисмысловый олигонуклеотид;

B представляет собой расщепляемый фрагмент

C представляет собой линкер конъюгата

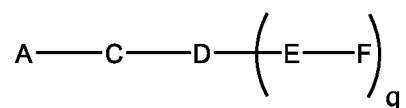
D представляет собой группу ветвления

каждый E представляет собой связку;

каждый F представляет собой лиганд; и

q представляет собой целое число от 1 до 5.

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированное антисмысловое соединение имеет следующую структуру:



где

A представляет собой антисмысловый олигонуклеотид;

С представляет собой линкер конъюгата

D представляет собой группу ветвления

каждый E представляет собой связку;

каждый F представляет собой лиганд; и

q представляет собой целое число от 1 до 5.

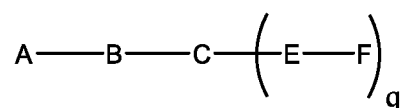
В некоторых таких вариантах реализации изобретения линкер конъюгата содержит по меньшей мере одну расщепляемую связь.

В некоторых таких вариантах реализации изобретения группа ветвления содержит по меньшей мере одну расщепляемую связь.

В некоторых вариантах реализации изобретения каждая связка содержит по меньшей мере одну расщепляемую связь.

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгаты связаны с нуклеозидом антисмыслового олигонуклеотида в 2', 3' или 5' положении нуклеозида.

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированное антисмысловое соединение имеет следующую структуру:



где

A представляет собой антисмысловый олигонуклеотид;

B представляет собой расщепляемый фрагмент

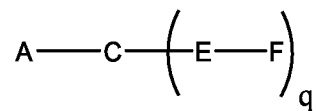
C представляет собой линкер конъюгата

каждый E представляет собой связку;

каждый F представляет собой лиганд; и

q представляет собой целое число от 1 до 5.

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгаты связаны с нуклеозидом антисмыслового олигонуклеотида в 2', 3' или 5' положении нуклеозида. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированное антисмысловое соединение имеет следующую структуру:



где

A представляет собой антисмысловый олигонуклеотид;

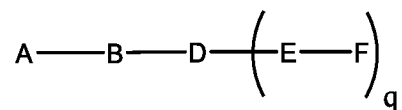
C представляет собой линкер конъюгата

каждый E представляет собой связку;

каждый F представляет собой лиганд; и

q представляет собой целое число от 1 до 5.

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированное антисмысловое соединение имеет следующую структуру:



где

A представляет собой антисмысловый олигонуклеотид;

B представляет собой расщепляемый фрагмент

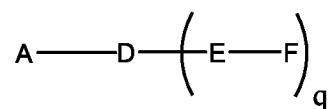
D представляет собой группу ветвления

каждый E представляет собой связку;

каждый F представляет собой лиганд; и

q представляет собой целое число от 1 до 5.

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированное антисмысловое соединение имеет следующую структуру:



где

A представляет собой антисмысловый олигонуклеотид;

D представляет собой группу ветвления

каждый E представляет собой связку;

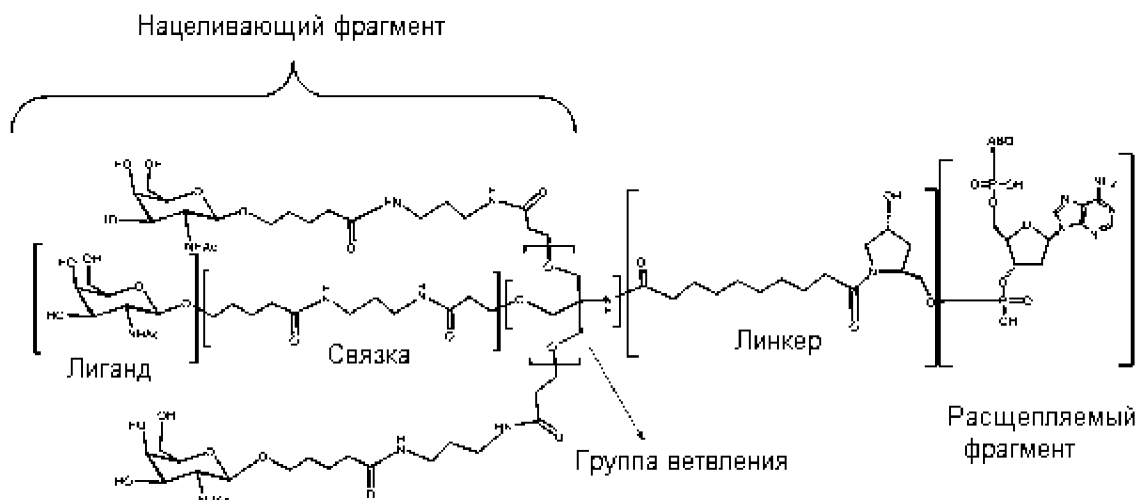
каждый F представляет собой лиганд; и

q представляет собой целое число от 1 до 5.

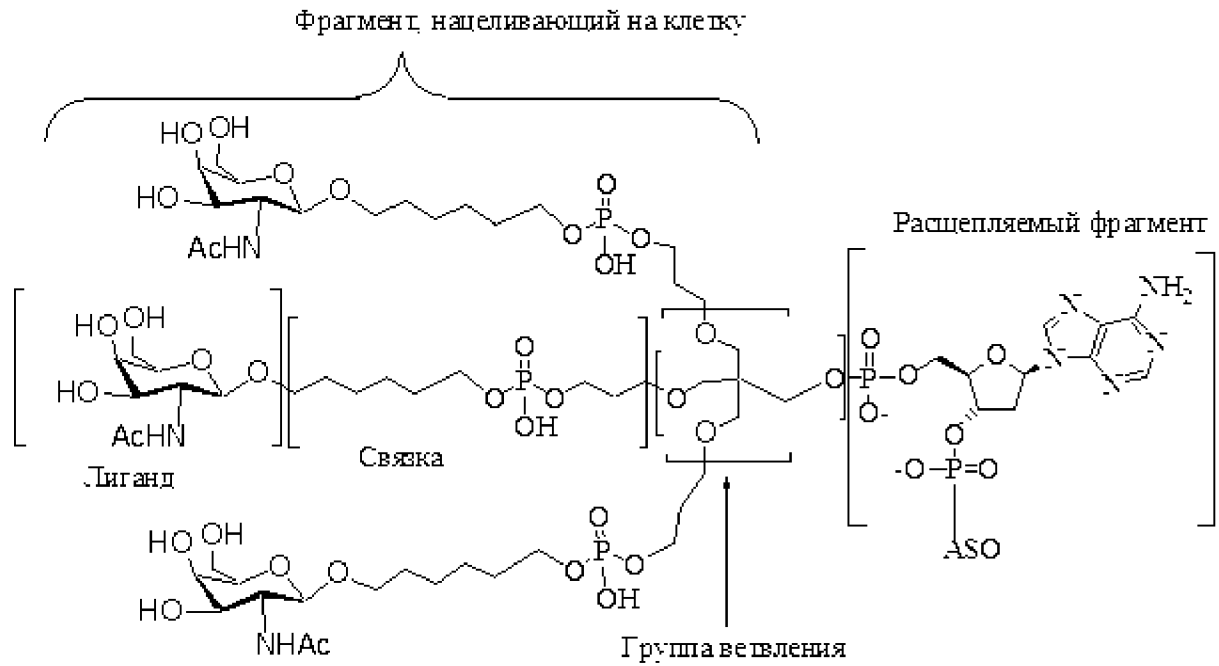
В некоторых таких вариантах реализации изобретения линкер конъюгата содержит по меньшей мере одну расщепляемую связь.

В некоторых вариантах реализации изобретения каждая связка содержит по меньшей мере одну расщепляемую связь.

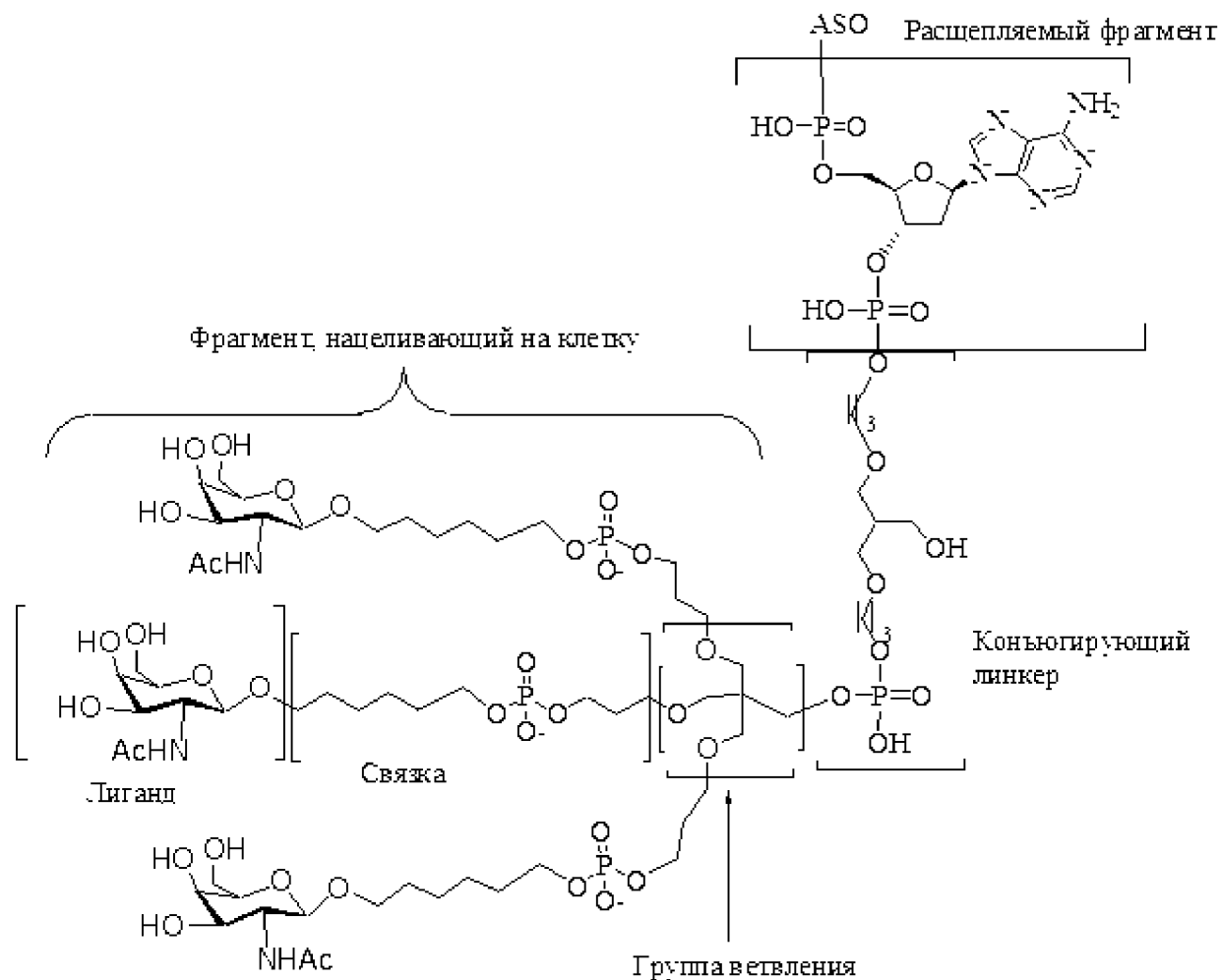
В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированное антисмысловое соединение имеет структуру, выбранную из следующих:



В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированное антисмысловое соединение имеет структуру, выбранную из следующих:



В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированное антисмысловое соединение имеет структуру, выбранную из следующих:



Иллюстративные патенты Соединенных штатов Америки, публикации патентных заявок Соединенных штатов Америки и публикации международных патентных заявок, в которых описано получение некоторых из указанных выше конъюгатов, конъюгированных антисмысловых соединений, связей, линкеров, групп ветвления, лигандов, расщепляемых фрагментов, а также других модификаций, включают, без ограничения, US 5994517, US 6300319, US 6660720, US 6906182, US 7262177, US 7491805, US 8106022, US 7723509, US 2006/0148740, US 2011/0123520, WO 2013/033230 и WO 2012/037254, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Иллюстративные публикации, в которых описано получение некоторых из указанных выше конъюгатов, конъюгированных антисмысловых соединений, связей, линкеров, групп ветвления, лигандов, расщепляемых фрагментов, а также других модификаций, включают, без ограничения, BIESSEN et al., "The Cholesterol Derivative of a Triantennary Galactoside with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor: a

Potent Cholesterol Lowering Agent" *J. Med. Chem.* (1995) 38:1846-1852, BIESSEN et al., "Synthesis of Cluster Galactosides with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" *J. Med. Chem.* (1995) 38:1538-1546, LEE et al., "New and more efficient multivalent glyco-ligands for asialoglycoprotein receptor of mammalian hepatocytes" *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2011) 19:2494-2500, RENSEN et al., "Determination of the Upper Size Limit for Uptake and Processing of Ligands by the Asialoglycoprotein Receptor on Hepatocytes in Vitro and in Vivo" *J. Biol. Chem.* (2001) 276(40):37577-37584, RENSEN et al., "Design and Synthesis of Novel N-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoproteins to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" *J. Med. Chem.* (2004) 47:5798-5808, SLIEDREGT et al., "Design and Synthesis of Novel Amphiphilic Dendritic Galactosides for Selective Targeting of Liposomes to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" *J. Med. Chem.* (1999) 42:609-618 и Valentijn *et al.*, "Solid-phase synthesis of lysine-based cluster galactosides with high affinity for the Asialoglycoprotein Receptor" *Tetrahedron*, 1997, 53(2), 759-770, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированные антисмысловые соединения содержат олигонуклеотид на основе РНКазы Н (такой как гэпмер) или сплайс-модулирующий олигонуклеотид (такой как полностью модифицированный олигонуклеотид) и любую конъюгирующую группу, содержащую по меньшей мере одну, две или три группы GalNAc. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированное антисмысловое соединение содержит любую конъюгирующую группу, приведенную в следующих ссылках: Lee, *Carbohydr Res*, 1978, 67, 509-514; Connolly et al., *J Biol Chem*, 1982, 257, 939-945; Pavia et al., *Int J Pep Protein Res*, 1983, 22, 539-548; Lee et al., *Biochem*, 1984, 23, 4255-4261; Lee et al., *Glycoconjugate J*, 1987, 4, 317-328; Toyokuni et al., *Tetrahedron Lett*, 1990, 31, 2673-2676; Biessen et al., *J Med Chem*, 1995, 38, 1538-1546; Valentijn et al., *Tetrahedron*, 1997, 53, 759-770; Kim et al., *Tetrahedron Lett*, 1997, 38, 3487-3490; Lee et al., *Bioconjug Chem*, 1997, 8, 762-765; Kato et al., *Glycobiol*, 2001, 11, 821-829; Rensen et al., *J Biol Chem*, 2001, 276, 37577-37584; Lee et al., *Methods Enzymol*, 2003, 362, 38-43; Westerlind et al., *Glycoconj J*, 2004, 21, 227-241; Lee et al., *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16(19), 5132-5135; Maierhofer et al., *Bioorg Med Chem*, 2007, 15, 7661-7676; Khorev et al., *Bioorg Med Chem*, 2008, 16, 5216-5231; Lee et al., *Bioorg Med Chem*, 2011, 19, 2494-2500; Kornilova et al., *Analyt Biochem*, 2012, 425, 43-46; Pujol et al., *Angew Chemie Int Ed Engl*, 2012, 51, 7445-7448; Biessen et al., *J Med Chem*, 1995, 38, 1846-1852; Sliedregt et al., *J Med Chem*, 1999, 42, 609-618; Rensen et al., *J Med Chem*, 2004, 47, 5798-5808; Rensen et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26, 169-175; van Rossenberg et al., *Gene Ther*, 2004, 11, 457-464; Sato



et al., *J Am Chem Soc*, 2004, 126, 14013-14022; Lee et al., *J Org Chem*, 2012, 77, 7564-7571; Biessen et al., *FASEB J*, 2000, 14, 1784-1792; Rajur et al., *Bioconjug Chem*, 1997, 8, 935-940; Duff et al., *Methods Enzymol*, 2000, 313, 297-321; Maier et al., *Bioconjug Chem*, 2003, 14, 18-29; Jayaprakash et al., *Org Lett*, 2010, 12, 5410-5413; Manoharan, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2002, 12, 103-128; Merwin et al., *Bioconjug Chem*, 1994, 5, 612-620; Tomiya et al., *Bioorg Med Chem*, 2013, 21, 5275-5281; Международные заявки WO1998/013381; WO2011/038356; WO1997/046098; WO2008/098788; WO2004/101619; WO2012/037254; WO2011/120053; WO2011/100131; WO2011/163121; WO2012/177947; WO2013/033230; WO2013/075035; WO2012/083185; WO2012/083046; WO2009/082607; WO2009/134487; WO2010/144740; WO2010/148013; WO1997/020563; WO2010/088537; WO2002/043771; WO2010/129709; WO2012/068187; WO2009/126933; WO2004/024757; WO2010/054406; WO2012/089352; WO2012/089602; WO2013/166121; WO2013/165816; патенты США 4751219; 8552163; 6908903; 7262177; 5994517; 6300319; 8106022; 7491805; 7491805; 7582744; 8137695; 6383812; 6525031; 6660720; 7723509; 8541548; 8344125; 8313772; 8349308; 8450467; 8501930; 8158601; 7262177; 6906182; 6620916; 8435491; 8404862; 7851615; опубликованные заявки на патент США US2011/0097264; US2011/0097265; US2013/0004427; US2005/0164235; US2006/0148740; US2008/0281044; US2010/0240730; US2003/0119724; US2006/0183886; US2008/0206869; US2011/0269814; US2009/0286973; US2011/0207799; US2012/0136042; US2012/0165393; US2008/0281041; US2009/0203135; US2012/0035115; US2012/0095075; US2012/0101148; US2012/0128760; US2012/0157509; US2012/0230938; US2013/0109817; US2013/0121954; US2013/0178512; US2013/0236968; US2011/0123520; US2003/0077829; US2008/0108801; и US2009/0203132; каждая из которых включена посредством ссылки в полном объеме.

### **С. Некоторые применения и особенности**

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированные антисмысловые соединения демонстрируют эффективное снижение целевой РНК *in vivo*. В некоторых вариантах реализации изобретения неконъюгированные антисмысловые соединения накапливаются в почках. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированные антисмысловые соединения накапливаются в печени. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированные антисмысловые соединения являются хорошо переносимыми. Такие свойства делают конъюгированные антисмысловые соединения особенно пригодными для ингибирования многих целевых РНК, включая, но не ограничиваясь ими, те, которые участвуют в метаболических, сердечно-сосудистых и других заболеваниях, расстройства или патологических

состояниях. Таким образом, в настоящем документе приведены способы лечения таких заболеваний, расстройств или патологических состояний приведением тканей печени в контакт с конъюгированными антисмысловыми соединениями, нацеленными на РНК, связанные с такими заболеваниями, расстройствами или патологическими состояниями. Следовательно, приведены также способы улучшения любых из множества метаболических, сердечно-сосудистых и других заболеваний, расстройств или патологических состояний при помощи конъюгированных антисмысловых соединений настоящего изобретения.

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированные антисмысловые соединения являются более эффективными, чем неконъюгированные аналоги при определенной концентрации в ткани. Не ограничиваясь какой-либо теорией или механизмом, в некоторых вариантах реализации изобретения конъюгат может обеспечивать возможность более эффективного вхождения конъюгированного антисмыслового соединения в клетку или возможность более продуктивного вхождения в клетку. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированные антисмысловые соединения могут демонстрировать более значительное снижение мишени, по сравнению с неконъюгированным аналогом, при этом и конъюгированное антисмысловое соединение, и его неконъюгированный аналог находятся в ткани в одинаковых концентрациях. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированные антисмысловые соединения могут демонстрировать более значительное снижение мишени, по сравнению с их неконъюгированными аналогами, при этом и конъюгированное антисмысловое соединение, и его неконъюгированный аналог находятся в печени в одинаковых концентрациях.

Ранее был рассмотрен продуктивный и непродуктивный захват олигонуклеотидов (см., например, Geary, R. S., E. Wancewicz, et al. (2009). "Effect of Dose and Plasma Concentration on Liver Uptake and Pharmacologic Activity of a 2'-Methoxyethyl Modified Chimeric Antisense Oligonucleotide Targeting PTEN." *Biochem. Pharmacol.* 78(3): 284-91; и Koller, E., T. M. Vincent, et al. (2011). "Mechanisms of single-stranded phosphorothioate modified antisense oligonucleotide accumulation in hepatocytes." *Nucleic Acids Res.* 39(11): 4795-807). Конъюгирующие группы, описанные в настоящем документе, могут улучшать продуктивный захват.

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы, описанные в настоящем документе, могут дополнительно усиливать эффективность за

счет увеличения аффинности конъюгированного антисмыслового соединения к конкретному типу клетки или ткани. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы, описанные в настоящем документе, могут дополнительно усиливать эффективность за счет увеличения распознавания конъюгированного антисмыслового соединения одним или более рецепторами клеточной поверхности. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы, описанные в настоящем документе, могут дополнительно усиливать эффективность за счет облегчения эндоцитоза конъюгированного антисмыслового соединения.

В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент может дополнительно усиливать эффективность за счет обеспечения возможности расщепления конъюгата из антисмыслового олигонуклеотида после попадания конъюгированного антисмыслового соединения в клетку. Соответственно, в некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированные антисмысловые соединения могут быть введены в более низких дозах, чем необходимы для неконыгированных антисмысловых олигонуклеотидов.

Ранее в антисмысловые олигонуклеотиды уже были внедрены тиофосфатные связи. Такие тиофосфатные связи являются устойчивыми к нуклеазам и за счет этого улучшают стабильность олигонуклеотида. Кроме того, тиофосфатные связи связывают также некоторые белки, что приводит к накоплению антисмыслового олигонуклеотида в печени. Олигонуклеотиды с меньшим количеством тиофосфатных связей меньше накапливаются в печени и больше - в почках (см., например, Geary, R., "Pharmacokinetic Properties of 2'-O-(2-Methoxyethyl)-Modified Oligonucleotide Analogs in Rats," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, том 296, № 3, 890-897; и *Pharmacological Properties of 2'-O-Methoxyethyl Modified Oligonucleotides in Antisense a Drug Technology*, глава 10, Crooke, S.T., ред., 2008). В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды с меньшим количеством тиофосфатных межнуклеозидных связей и с большим количеством фосфодиэфирных межнуклеозидных связей меньше накапливаются в печени и больше - в почках. При лечении заболеваний печени это нежелательно по нескольким причинам: (1) меньше лекарства попадает в центр желаемого действия (печень); (2) лекарство выводится с мочой; (3) почки подвергаются воздействию относительно высокой концентрации лекарства, что может приводить к токсичности в почках. Следовательно, для заболеваний печени тиофосфатные связи обеспечивают важное преимущество.

Однако в некоторых вариантах реализации изобретения введение олигонуклеотидов, равномерно связанных тиофосфатными межнуклеозидными связями, вызывает одну или более провоспалительных реакций. (См., например: *J Lab Clin Med.* 1996 Sep;128(3):329-38. “Amplification of antibody production by phosphorothioate oligodeoxynucleotides”. Branda et al.; и см. также, например: *Toxicologic Properties in Antisense a Drug Technology*, глава 12, страницы 342-351, Crooke, S.T., ред., 2008). В некоторых вариантах реализации изобретения введение олигонуклеотидов, в которых большая часть межнуклеозидных связей содержит тиофосфатные межнуклеозидные связи, вызывает одну или более провоспалительных реакций.

В некоторых вариантах реализации изобретения степень провоспалительного эффекта может зависеть от нескольких переменных (например, модификация скелета, нецелевое действие, модификации азотистых оснований и/или модификации нуклеозида), см., например: *Toxicologic Properties in Antisense a Drug Technology*, глава 12, страницы 342-351, Crooke, S.T., ред., 2008). В некоторых вариантах реализации изобретения степень провоспалительного эффекта может быть ослаблена за счет подбора одной или более переменных. Например, степень провоспалительного эффекта данного олигонуклеотида может быть ослаблена за счет замены любого количества тиофосфатных межнуклеозидных связей на фосфодиэфирные межнуклеозидные связи с уменьшением посредством этого общего количества тиофосфатных межнуклеозидных связей.

В некоторых вариантах реализации изобретения может быть желательно снизить количество тиофосфатных связей, если это может быть выполнено без потери стабильности и без сдвига распределения из печени в почки. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения количество тиофосфатных связей может быть уменьшено за счет замены тиофосфатных связей на фосфодиэфирные связи. В таком варианте реализации изобретения антисмысловое соединение, имеющее меньшее количество тиофосфатных связей и большее количество фосфодиэфирных связей, может вызывать меньшее количество провоспалительных реакций или не вызывать провоспалительных реакций. Хотя антисмысловое соединение, имеющее меньшее количество тиофосфатных связей и большее количество фосфодиэфирных связей, может вызывать меньшее количество провоспалительных реакций, антисмысловое соединение, имеющее меньшее количество тиофосфатных связей и большее количество фосфодиэфирных связей, может не накапливаться в печени и может быть менее эффективным в такой же или аналогичной дозе, по сравнению с антисмысловым соединением, имеющим большее количество тиофосфатных связей. Поэтому в некоторых вариантах реализации изобретения

желательно разработать антисмысловое соединение, которое имеет множество фосфодиэфирных связей и множество тиофосфатных связей, но которое при этом обладает также стабильностью и хорошим распределением в печени.

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированные антисмысловые соединения больше накапливаются в печени и меньше - в почках, чем неконъюгированные аналоги, даже если некоторые тиофосфатные связи заменены менее провоспалительными фосфодиэфирными межнуклеозидными связями. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированные антисмысловые соединения больше накапливаются в печени и не так сильно выводятся с мочой, как их неконъюгированные аналоги, даже если некоторые тиофосфатные связи заменены менее провоспалительными фосфодиэфирными межнуклеозидными связями. В некоторых вариантах реализации изобретения применение конъюгата обеспечивает возможность разрабатывать более эффективные и лучше переносимые антисмысловые лекарства. Действительно, в некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированные антисмысловые соединения имеют более широкий терапевтический индекс, чем неконъюгированные аналоги. Это позволяет вводить конъюгированное антисмысловое соединение в более высокой абсолютной дозе благодаря меньшему риску провоспалительной реакции и меньшему риску токсичности для почек. Такая более высокая доза дает возможность вводить дозу реже, поскольку ожидается такой же коэффициент очищения (метаболизм). Кроме того, поскольку соединение является более эффективным, как описано выше, то можно допускать снижение концентрации перед введением следующей дозы, без потери терапевтической активности, что обеспечивает еще более продолжительные периоды между введениями доз.

В некоторых вариантах реализации изобретения сохраняется необходимость во внедрении некоторого количества тиофосфатных связей. Например, концевые связи легко подвергаются действию экзонуклеаз, и поэтому в некоторых вариантах реализации изобретения эти связи представляют собой тиофосфатные или другие модифицированные связи. Межнуклеозидные связи, соединяющие два дезоксинуклеозида, легко подвергаются действию эндонуклеаз, и поэтому в некоторых вариантах реализации изобретения эти связи представляют собой тиофосфатные или другие модифицированные связи. Межнуклеозидные связи между модифицированным нуклеозидом и дезоксинуклеозидом, где дезоксинуклеозид расположен на 5'-стороне связывающего дезоксинуклеозида, легко подвергаются действию эндонуклеаз, и поэтому в некоторых вариантах реализации изобретения эти связи представляют собой тиофосфатные или другие модифицированные

связи. Межнуклеозидные связи между двумя модифицированными нуклеозидами определенных типов и между дезокси-нуклеозидом и модифицированным нуклеозидом определенного типа, где модифицированный нуклеозид расположен на 5'-стороне линкера, являются достаточно устойчивыми к нуклеазному расщеплению, поэтому связь может быть фосфодиэфиром.

В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловый олигонуклеотид конъюгированного антисмыслового соединения содержит менее 16 тиофосфатных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловый олигонуклеотид конъюгированного антисмыслового соединения содержит менее 15 тиофосфатных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловый олигонуклеотид конъюгированного антисмыслового соединения содержит менее 14 тиофосфатных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловый олигонуклеотид конъюгированного антисмыслового соединения содержит менее 13 тиофосфатных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловый олигонуклеотид конъюгированного антисмыслового соединения содержит менее 12 тиофосфатных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловый олигонуклеотид конъюгированного антисмыслового соединения содержит менее 11 тиофосфатных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловый олигонуклеотид конъюгированного антисмыслового соединения содержит менее 10 тиофосфатных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловый олигонуклеотид конъюгированного антисмыслового соединения содержит менее 9 тиофосфатных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловый олигонуклеотид конъюгированного антисмыслового соединения содержит менее 8 тиофосфатных связей.

В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловые соединения, содержащие одну или более конъюгирующих групп, описанных в настоящем документе, обладают повышенной активностью и/или эффективностью, и/или переносимостью, по сравнению с исходным антисмысловым соединением, не имеющим такой одной или нескольких конъюгирующих групп. Соответственно, в некоторых вариантах реализации изобретения присоединение таких конъюгирующих групп к олигонуклеотиду является желательным. Такие конъюгирующие группы могут быть присоединены у 5'- и/или 3'-конца олигонуклеотида. В некоторых случаях синтетически желательно присоединение на 5'-конце. Как правило, олигонуклеотиды синтезируют присоединением 3'-концевого нуклеозида к твердой подложке с последующим связыванием нуклеозидов от 3' к 5' при помощи методик, общеизвестных в данной области техники. Соответственно, если

конъюгирующая группа необходима на 3'-конце, то можно (1) присоединить конъюгирующую группу к 3'-концевому нуклеозиду и присоединить этот конъюгированный нуклеозид к твердой подложке для последующего получения олигонуклеотида или (2) присоединить конъюгирующую группу к 3'-концевому нуклеозиду готового олигонуклеотида после синтеза. Ни один из этих подходов не является особенно эффективным, и поэтому оба они затратны. В частности, присоединение конъюгированного нуклеозида к твердой подложке, хотя и приведено в настоящем документе в разделе «Примеры», не является эффективным способом. В некоторых вариантах реализации изобретения присоединение конъюгирующие группы к 5'-концевому нуклеозиду синтетически проще, чем присоединение к 3'-концу. Можно присоединить неконъюгированный 3'-концевой нуклеозид к твердой подложке и получить олигонуклеотид по стандартным и хорошо описанным реакциям. Затем нужно лишь присоединить 5'-нуклеозид, имеющий конъюгирующую группу, на последней стадии связывания. В некоторых вариантах реализации изобретения это более эффективно, чем присоединение конъюгированного нуклеозида непосредственно к твердой подложке, как это обычно делают для получения 3'-конъюгированного олигонуклеотида. В представленных в настоящем документе Примерах показано присоединение к 5'-концу. Кроме того, некоторые конъюгирующие группы имеют синтетические преимущества. Например, некоторые конъюгирующие группы, содержащие фосфорные связывающие группы, получают синтетически проще и более эффективно, чем другие конъюгирующие группы, включая конъюгирующие группы, описанные ранее (например, WO/2012/037254).

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированные антисмысловые соединения вводят субъекту. В таких вариантах реализации изобретения антисмысловые соединения, содержащие одну или более конъюгирующих групп, описанных в настоящем документе, обладают повышенной активностью и/или эффективностью, и/или переносимостью, по сравнению с исходным антисмысловым соединением, не имеющим такой одной или нескольких конъюгирующих групп. Не ограничиваясь механизмом, предполагается, что конъюгирующая группа способствует распределению, доставке и/или поглощению в целевой клетке или ткани. В некоторых вариантах реализации, после попадания в целевую клетку или ткань желательно, чтобы вся или часть конъюгирующие группы расщеплялась с высвобождением активного олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения не обязательно, чтобы из олигонуклеотида расщеплялась вся конъюгирующая группа. Например, в Примере 20a

конъюгированный олигонуклеотид вводили мышам и обнаруживали множество различных химических частиц, каждая из которых содержала различные части конъюгирующие группы, оставшиеся на олигонуклеотиде (Таблица 10а). Это конъюгированное антисмысловое соединение показало хорошую эффективность (Таблица 10). Так, в некоторых вариантах реализации изобретения такой метаболитный профиль многократного частичного расщепления конъюгирующие группы не влияет на активность/эффективность. Тем не менее, в некоторых вариантах реализации изобретения желательно, чтобы пролекарство (конъюгированный олигонуклеотид) давало одно активное соединение. В некоторых случаях, при обнаружении многочисленных форм активного соединения, может быть необходимо определить относительные количества и действие для каждой из них. В некоторых вариантах реализации, при необходимости регуляционного тестирования (например, FDA США или другого органа), желательно иметь одну (или преимущественно одну) активную частицу. В некоторых таких вариантах реализации изобретения желательно, чтобы такая одна активная частица представляла собой антисмысловый олигонуклеотид, не содержащий никаких частей конъюгирующие группы. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгирующие группы на 5'-конце более вероятно приводят к полному метаболизму конъюгирующие группы. Не ограничиваясь механизмом, может быть, что эндогенные ферменты, отвечающие за метаболизм на 5'-конце (например, 5'-нуклеазы), более активны/эффективны, чем 3'-аналоги. В некоторых вариантах реализации изобретения определенные конъюгирующие группы более подвержены метаболизму до одной активной частицы. В некоторых вариантах реализации изобретения некоторые конъюгирующие группы более подвержены метаболизму до олигонуклеотида.

#### D. Антисенс

В некоторых вариантах реализации изобретения олигомерные соединения настоящего изобретения представляют собой антисмысловые соединения. В таких вариантах реализации изобретения олигомерное соединение комплементарно целевой нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах реализации изобретения целевая нуклеиновая кислота представляет собой РНК. В некоторых вариантах реализации изобретения целевая нуклеиновая кислота представляет собой некодирующую РНК. В некоторых вариантах реализации изобретения целевая нуклеиновая кислота кодирует белок. В некоторых вариантах реализации изобретения целевая нуклеиновая кислота выбрана из мРНК, пре-мРНК, микроРНК, некодирующей РНК, включая малую некодирующую РНК, и промотор-нацеливаемой РНК. В некоторых вариантах реализации



изобретения олигомерные соединения по меньшей мере частично комплементарны более чем одной целевой нуклеиновой кислоте. Например, олигомерные соединения настоящего изобретения могут представлять собой миметики микроРНК, которые обычно связываются с несколькими мишенями.

В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловые соединения содержат часть, имеющую последовательность азотистых оснований, которая по меньшей мере на 70% комплементарна последовательности азотистых оснований целевой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловые соединения содержат часть, имеющую последовательность азотистых оснований, которая по меньшей мере на 80% комплементарна последовательности азотистых оснований целевой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловые соединения содержат часть, имеющую последовательность азотистых оснований, которая по меньшей мере на 90% комплементарна последовательности азотистых оснований целевой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловые соединения содержат часть, имеющую последовательность азотистых оснований, которая по меньшей мере на 95% комплементарна последовательности азотистых оснований целевой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловые соединения содержат часть, имеющую последовательность азотистых оснований, которая по меньшей мере на 98% комплементарна последовательности азотистых оснований целевой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловые соединения содержат часть, имеющую последовательность азотистых оснований, которая на 100% комплементарна последовательности азотистых оснований целевой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловые соединения по меньшей мере на 70%, 80%, 90%, 95%, 98% или 100% комплементарны последовательности азотистых оснований целевой нуклеиновой кислоты по всей длине антисмыслового соединения.

Антисмысловые механизмы включают любой механизм, затрагивающий гибридизацию олигомерного соединения с целевой нуклеиновой кислотой, при этом гибридизация приводит к биологическому эффекту. В некоторых вариантах реализации изобретения такая гибридизация приводит либо к разрушению, либо к применению целевой нуклеиновой кислоты с сопутствующим подавлением или стимулированием клеточного механизма, затрагивающего, например, трансляцию, транскрипцию или

полиаденилированием целевой нуклеиновой кислоты или нуклеиновой кислоты, с которой целевая кислота может взаимодействовать иным образом.

Один из типов антисмыслового механизма, затрагивающий разрушение целевой РНК представляет собой антисмысл, опосредованный РНКазой H. РНКазы H представляет собой клеточную эндонуклеазу, которая расщепляет спираль РНК дуплекса РНК:ДНК. В данной области техники известно, что одноцепочечные антисмысловые соединения, которые являются «ДНК-подобными», вызывают активность РНКазы H в клетках млекопитающих. Следовательно, активация РНКазы H приводит к расщеплению РНК-мишени, посредством этого в значительной степени усиливая эффективность подавления генной экспрессии, опосредованного ДНК-подобным олигонуклеотидом.

Антисмысловые механизмы включают также, без ограничения, РНКи механизмы, в которых применяется путь RISC. Такие РНКи механизмы включают, без ограничения, миРНК, оцРНК и микроРНК механизмы. Такие механизмы включают создание миметика микроРНК и/или анти-микро РНК.

Антисмысловые механизмы включают также, без ограничения, механизмы, которые гибридизуют или имитируют некодирующую РНК, отличную от микроРНК или мРНК. Такие некодирующие РНК включают, но не ограничиваются ими, промотор-нацеленную РНК и малую и длинную РНК, которая влияет на транскрипцию или трансляцию одной или более нуклеиновых кислот.

В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды, содержащие описанные в настоящем документе конъюгаты, представляют собой РНКи соединения. В некоторых вариантах реализации изобретения олигомерные олигонуклеотиды, содержащие описанные в настоящем документе конъюгаты, представляют собой оцРНК соединения. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды, содержащие описанные в настоящем документе конъюгаты, спарены со вторым олигомерным соединением с образованием миРНК. В некоторых таких вариантах реализации изобретения второе олигомерное соединение также содержит конъюгат. В некоторых вариантах реализации изобретения второе олигомерное соединение представляет собой любую модифицированную или немодифицированную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды, содержащие описанные в настоящем документе конъюгаты, представляют собой антисмысловую цепь в миРНК соединении. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотиды, содержащие описанные в настоящем документе конъюгаты, представляют собой

смысловую цепь в миРНК соединении. В тех вариантах реализации, в которых конъюгированное олигомерное соединение представляет собой двухцепочечную миРНК, конъюгат может находиться на смысловой цепи, антисмысловой цепи или и на смысловой цепи, и на антисмысловой цепи.

#### **D. Целевые нуклеиновые кислоты, области и сегменты**

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированные антисмысловые соединения нацелены на любую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах реализации изобретения целевая нуклеиновая кислота кодирует белок-мишень, который является клинически значимым. В таких вариантах реализации изобретения модулирование целевой нуклеиновой кислоты приводит к благоприятному клиническому эффекту. Некоторые целевые нуклеиновые кислоты включают, но не ограничиваются ими, целевые нуклеиновые кислоты, представленные в Таблице 1.

**Таблица 1. Некоторые целевые нуклеиновые кислоты**

<b>Мишень</b>	<b>Виды</b>	<b>Номер доступа GENBANK®</b>	<b>SEQ ID NO</b>
HBV	Человек	U95551.1	1
Транстиретин (TTR)	Человек	NM_000371.3	2

Процесс таргетинга обычно включает определение по меньшей мере одной целевой области, сегмента или сайта в целевой нуклеиновой кислоте для антисмыслового взаимодействия с возникновением в результате такого желаемого эффекта.

В некоторых вариантах реализации изобретения целевая область представляет собой структурно определенную область нуклеиновой кислоты. Например, в некоторых таких вариантах реализации изобретения целевая область может охватывать 3' UTR, 5' UTR, экзон, интрон, кодирующую область, область инициации трансляции, область терминации трансляции или другую определенную область или целевой сегмент нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах реализации изобретения целевой сегмент представляет собой часть целевой области по меньшей мере из около 8 азотистых оснований, на которую нацелено конъюгированное антисмысловое соединение. Целевые сегменты могут содержать последовательности ДНК или РНК, которые содержат по меньшей мере 8

смежных азотистых оснований от 5'-конца одного из целевых сегментов (остальные азотистые основания тянутся друг за другом из той же ДНК или РНК, начинаясь сразу перед 5'-концом целевого сегмента и продолжаясь до момента, когда ДНК или РНК будет содержать от около 8 до около 30 азотистых оснований). Целевые сегменты представлены также последовательностями ДНК или РНК, которые содержат по меньшей мере 8 смежных азотистых оснований от 3'-конца одного из целевых сегментов (остальные азотистые основания тянутся друг за другом из той же ДНК или РНК, начинаясь сразу после 3'-конца целевого сегмента и продолжаясь до момента, когда ДНК или РНК будет содержать от около 8 до около 30 азотистых оснований). Целевые сегменты также могут быть представлены последовательностями ДНК или РНК, которые содержат по меньшей мере 8 смежных азотистых оснований из внутренней части последовательности целевого сегмента, и могут тянуться в любом или в обоих направлениях до момента, когда конъюгированное антисмысловое соединение будет содержать от около 8 до около 30 азотистых оснований.

В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловые соединения, нацеленные на нуклеиновые кислоты, перечисленные в Таблице 1, могут быть модифицированы так, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловые соединения могут иметь модифицированный сахарный фрагмент, немодифицированный сахарный фрагмент или смесь модифицированных и немодифицированных сахарных фрагментов, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловые соединения могут иметь модифицированную межнуклеозидную связь, немодифицированную межнуклеозидную связь или смесь модифицированных и немодифицированных межнуклеозидных связей, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловые соединения могут иметь модифицированное азотистое основание, немодифицированное азотистое основание или смесь модифицированных и немодифицированных азотистых оснований, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловые соединения могут иметь мотив, описанный в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловые соединения, нацеленные на нуклеиновые кислоты, перечисленные в Таблице 1, могут быть конъюгированы так, как описано в настоящем документе.

## 1. Гепатит В (HBV)

Гепатит В представляет собой вирусное заболевание, передающееся парентерально через зараженный материал, такой как кровь и продукты крови, загрязненные иглы, половым путем и вертикально от инфицированной или несущей вирус матери к ее потомству. По оценкам Всемирной организации здравоохранения, во всем мире инфицировано более 2 миллиардов людей, при этом ежегодно происходит около 4 миллионов острых случаев, 1 миллионов смертей в год и 350-400 миллионов хронических носителей (Всемирная организация здравоохранения: Geographic Prevalence of Hepatitis B Prevalence, 2004. <http://www.who.int/vaccines-surveillance/graphics/htmls/hepbprev.htm>).

Вирус HBV представляет собой двухцепочечный гепатотропный вирус, который инфицирует только людей и человекоподобных приматов. Вирусная репликация происходит преимущественно в печени и, в меньшей степени, в почках, поджелудочной железе, костном мозге и селезенке (Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64: 2000; 51-68.). Вирусные и иммунные маркеры могут быть обнаружены в крови и являются характеристическими профилями антигенов-антител, развивающимися с течением времени. Первый обнаруживаемый вирусный маркер представляет собой HBsAg, за ним следует антиген е гепатита В (HBeAg) и ДНК HBV. В инкубационном периоде титры могут быть высокими, но уровни ДНК и HBeAg HBV начинают резко снижаться в начале заболевания и могут не быть обнаруживаемыми на пике клинической болезни (Hepatitis B virus infection—natural history and clinical consequences. *N Engl J Med.* 350: 2004; 1118-1129). HBeAg представляет собой вирусный маркер, обнаруживаемый в крови, который коррелирует с активной вирусной репликацией и, следовательно, высокой вирусной нагрузкой и инфективностью (Hepatitis B e antigen—the dangerous end game of hepatitis B. *N Engl J Med.* 347: 2002; 208-210). Наличие анти-HBsAb и анти-HBcAb (IgG) указывает на выздоровление и иммунитет у ранее инфицированного индивидуума.

В настоящее время терапии для хронической инфекции HBV, рекомендованные Американской ассоциацией по изучению заболеваний печени (AASLD) и Европейской ассоциацией по изучению печени (EASL), включают интерферон-альфа (IFN $\alpha$ ), пегилированный интерферон-альфа-2а (Peg-IFN2a), энтекавир и тенофовир. Терапии нуклеозидами и азотистыми основаниями, энтекавир и тенофовир, являются успешными для снижения вирусной нагрузки, но скорости сероконверсии HBeAg и снижения HBsAg даже ниже, чем скорости, достижимые при помощи IFN $\alpha$  терапии. Применяют также другие аналогичные терапии, включая ламивудин (3ТС), телбивудин (LdT) и адефовир, но терапевтическая эффективность терапий с нуклеозидами/азотистыми основаниями в целом ограничена появлением резистентности.

Следовательно, в данной области техники существует необходимость в открытии и разработке новых противовирусных терапий. Кроме того, существует необходимость в новых анти-HBV терапиях, способных увеличивать скорости сероконверсии HBeAg и HBsAg. В недавних клинических исследованиях была обнаружена корреляция между сероконверсией и снижением HBeAg (Fried et al (2008) Hepatology 47:428), и снижением HBsAg (Moucari et al (2009) Hepatology 49:1151). Снижение уровней антигенов может обеспечивать возможность иммунологического контроля инфекции HBV, поскольку предполагается, что высокие уровни антигенов вызывают иммунологическую толерантность. Существующие нуклеозидные терапии для HBV могут значительно снижать уровни HBV в сыворотке, но мало влияют на уровни HBeAg и HBsAg.

Антисмысловые соединения, нацеленные на HBV, были описаны ранее в WO2011/047312, WO2012/145674 и WO2012/145697, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Запланированы клинические исследования для оценки влияния антисмысловых соединения, нацеленных на HBV, на пациентов. Однако все еще существует необходимость в обеспечении пациентов дополнительными и более эффективными возможностями лечения.

*Некоторые конъюгированные антисмысловые соединения, нацеленные на нуклеиновую кислоту HBV*

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированные антисмысловые соединения нацелены на нуклеиновую кислоту HBV, имеющую последовательность с номером доступа GENBANK® U95551.1, которая включена в настоящий документ как SEQ ID NO: 1. В некоторых таких вариантах реализации изобретения конъюгированное антисмысловое соединение, нацеленное на SEQ ID NO: 1, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% комплементарно SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированное антисмысловое соединение, нацеленное на SEQ ID NO: 1, содержит по меньшей мере 8 смежных азотистых оснований последовательности SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированное антисмысловое соединение, нацеленное на SEQ ID NO: 1, содержит последовательность азотистых оснований SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированное антисмысловое соединение, нацеленное на SEQ ID NO: 1, содержит по меньшей мере 8 смежных азотистых оснований последовательности SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах



В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированное антисмысловое соединение, нацеленное на SEQ ID NO: 1, содержит по меньшей мере 8 смежных азотистых оснований последовательности SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированное антисмысловое соединение, нацеленное на SEQ ID NO: 1, содержит последовательность азотистых оснований SEQ ID NO: 11.

**Таблица 2. Антисмысловые соединения, нацеленные на HBV SEQ ID NO: 1**

ISIS №	Сайт-мишень инициация	Последовательность (5'-3')	Мотив	SEQ ID NO
505358	1583	GCAGAGGTGAAGCGAAGTG C	eeeeedddddddddeeeee	3
509934	1780	ССААТТТАТGCCTACAGCCT	eeeeedddddddddeeeee	4
510100	411	GGCATAGCAGCAGGATG	eedddddddddeeeee	5
552023	1266	AGGAGTTCCGCAGTATGGAT	eeeeedddddddddeeeee	6
552024	1577	GTGAAGCGAAGTGCACACG G	eeeeedddddddddeeeee	7
552032	1585	GTGCAGAGGTGAAGCGAAG T	eeeeedddddddddeeeee	8
552859	1583	AGGTGAAGCGAAGTGC	ekkkdddddddkeke	9
552925	1264	TCCGCAGTATGGATCG	ekdddddddkeke	10
577119	1780	ААТТТАТGCCTACAGCCT	kdkkddddddddeeeee	11

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит или состоит из ISIS 505358 и конъюгирующие группы. ISIS 505358 представляет собой



модифицированный олигонуклеотид, имеющий формулу: Ges mCes Aes Ges Aes Gds Gds Tds Gds Ads Ads Gds mCds Gds Ads Aes Ges Tes Ges mCe, где

A = аденин,

mC = 5'-метилцитозин

G = гуанин,

T = тимин,

e = 2'-О-метоксиэтил-модифицированный нуклеозид,

d = 2'-дезоксинуклеозид и

s = тиофосфатная межнуклеозидная связь.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит или состоит из ISIS 509934 и конъюгирующие группы. ISIS 509934 представляет собой модифицированный олигонуклеотид, имеющий формулу: mCes mCes Aes Aes Tes Tds Tds Ads Tds Gds mCds mCds Tds Ads mCds Aes Ges mCes mCes Te, где

A = аденин,

mC = 5'-метилцитозин

G = гуанин,

T = тимин,

e = 2'-О-метоксиэтил-модифицированный нуклеозид,

d = 2'-дезоксинуклеозид и

s = тиофосфатная межнуклеозидная связь.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит или состоит из ISIS 510100 и конъюгирующие группы. ISIS 510100 представляет собой модифицированный олигонуклеотид, имеющий формулу: Ges Ges mCes Ads Tds Ads Gds mCds Ads Gds mCds Ads Gds Ges Aes Tes Ge, где

A = аденин,

mC = 5'-метилцитозин

G = гуанин,

T = тимин,

e = 2'-О-метоксиэтил-модифицированный нуклеозид,

d = 2'-дезоксинуклеозид и

s = тиофосфатная межнуклеозидная связь.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит или состоит из ISIS 552023 и конъюгирующие группы. ISIS 552023 представляет собой модифицированный олигонуклеотид, имеющий формулу: Aes Ges Ges Aes Ges Tes Tds mCds mCds Gds mCds Ads Gds Tds Ads Tds Ges Ges Aes Te, где

A = аденин,

mC = 5'-метилцитозин

G = гуанин,

T = тимин,

e = 2'-О-метоксиэтил-модифицированный нуклеозид,

d = 2'-дезоксинуклеозид и

s = тиофосфатная межнуклеозидная связь.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит или состоит из ISIS 552024 и конъюгирующие группы. ISIS 552024 представляет собой модифицированный олигонуклеотид, имеющий формулу: Ges Tes Ges Aes Aes Ges mCds Gds Ads Ads Gds Tds Gds mCds Ads mCds Aes mCes Ges Ge, где

A = аденин,

mC = 5'-метилцитозин

G = гуанин,

T = тимин,

e = 2'-О-метоксиэтил-модифицированный нуклеозид,

d = 2'-дезоксинуклеозид и

s = тиофосфатная межнуклеозидная связь.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит или состоит из ISIS 552032 и конъюгирующие группы. ISIS 552032 представляет собой модифицированный олигонуклеотид, имеющий формулу: Ges Tes Ges mCes Aes Ges Ads Gds Gds Tds Gds Ads Ads Gds mCds Gds Aes Aes Ges Te, где

A = аденин,

mC = 5'-метилцитозин

G = гуанин,

T = тимин,

e = 2'-О-метоксиэтил-модифицированный нуклеозид,

d = 2'-дезоксинуклеозид и

s = тиофосфатная межнуклеозидная связь.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит или состоит из ISIS 552859 и конъюгирующие группы. ISIS 552859 представляет собой модифицированный олигонуклеотид, имеющий формулу: Aes Gks Gks Tds Gds Ads Ads Gds mCds Gds Ads Ads Gds Tks Gks mCe, где

A = аденин,

mC = 5'-метилцитозин

G = гуанин,

T = тимин,

e = 2'-О-метоксиэтил-модифицированный нуклеозид,

k = сEt-модифицированный нуклеозид,

d = 2'-дезоксинуклеозид и

s = тиофосфатная межнуклеозидная связь.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит или состоит из ISIS 552925 и конъюгирующие группы. ISIS 552925 представляет собой модифицированный олигонуклеотид, имеющий формулу: Tes mCks mCds Gds mCds Ads Gds Tds Ads Tds Gds Gds Aks Tes mCks Ge, где

A = аденин,

mC = 5'-метилцитозин

G = гуанин,

T = тимин,

e = 2'-О-метоксиэтил-модифицированный нуклеозид,

k = сEt-модифицированный нуклеозид,

d = 2'-дезоксинуклеозид и

s = тиофосфатная межнуклеозидная связь.

s = тиофосфатная межнуклеозидная связь.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит или состоит из ISIS 577119 и конъюгирующие группы. ISIS 577119 представляет собой модифицированный олигонуклеотид, имеющий формулу: Aks Ads Tks Tds Tks Ads Tds Gds mCds mCds Tds Ads mCds Aes Ges mCes mCes Te, где

A = аденин,

mC = 5'-метилцитозин

G = гуанин,

T = тимин,

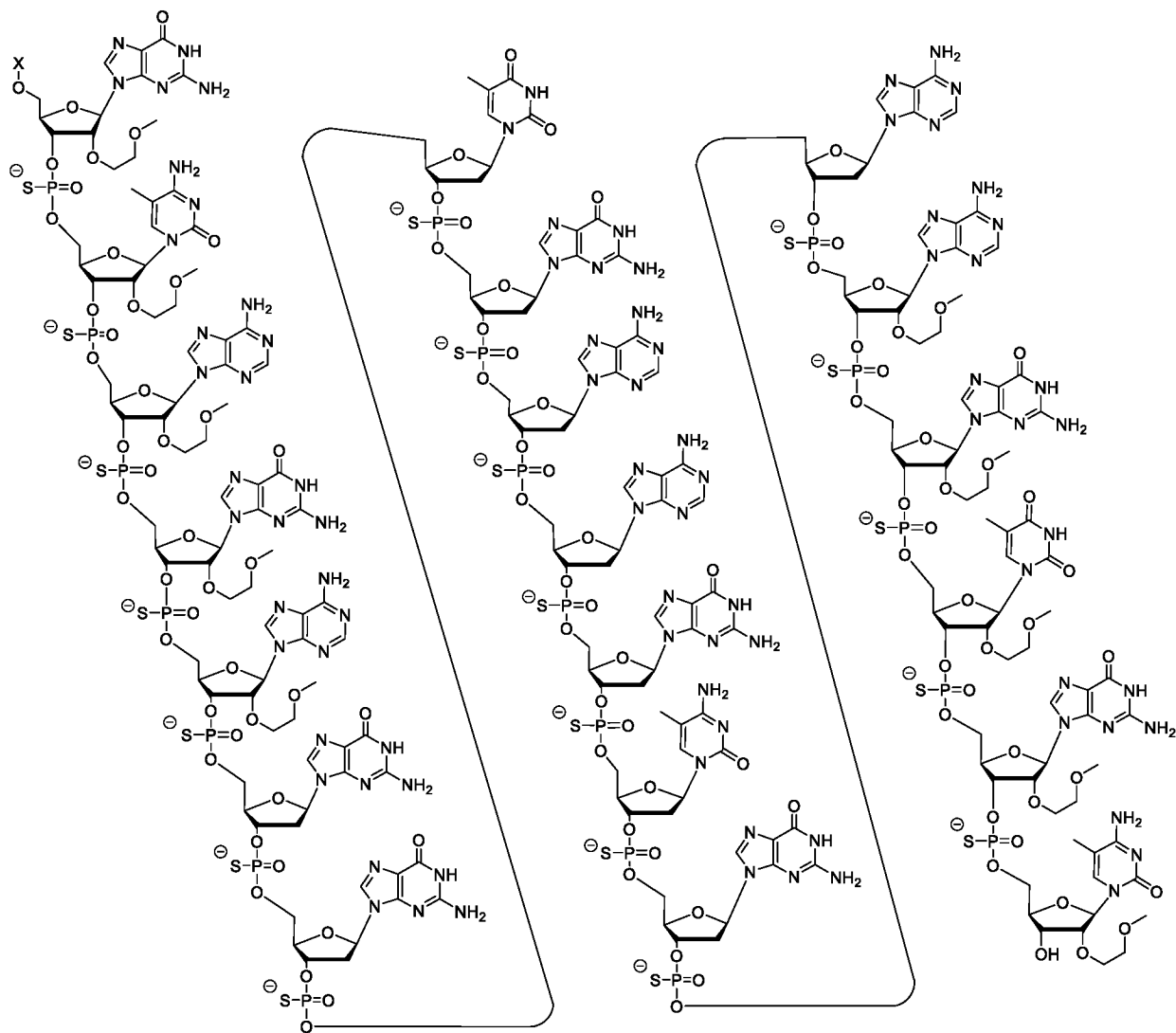
e = 2'-О-метоксиэтил-модифицированный нуклеозид,

k = сEt-модифицированный нуклеозид,

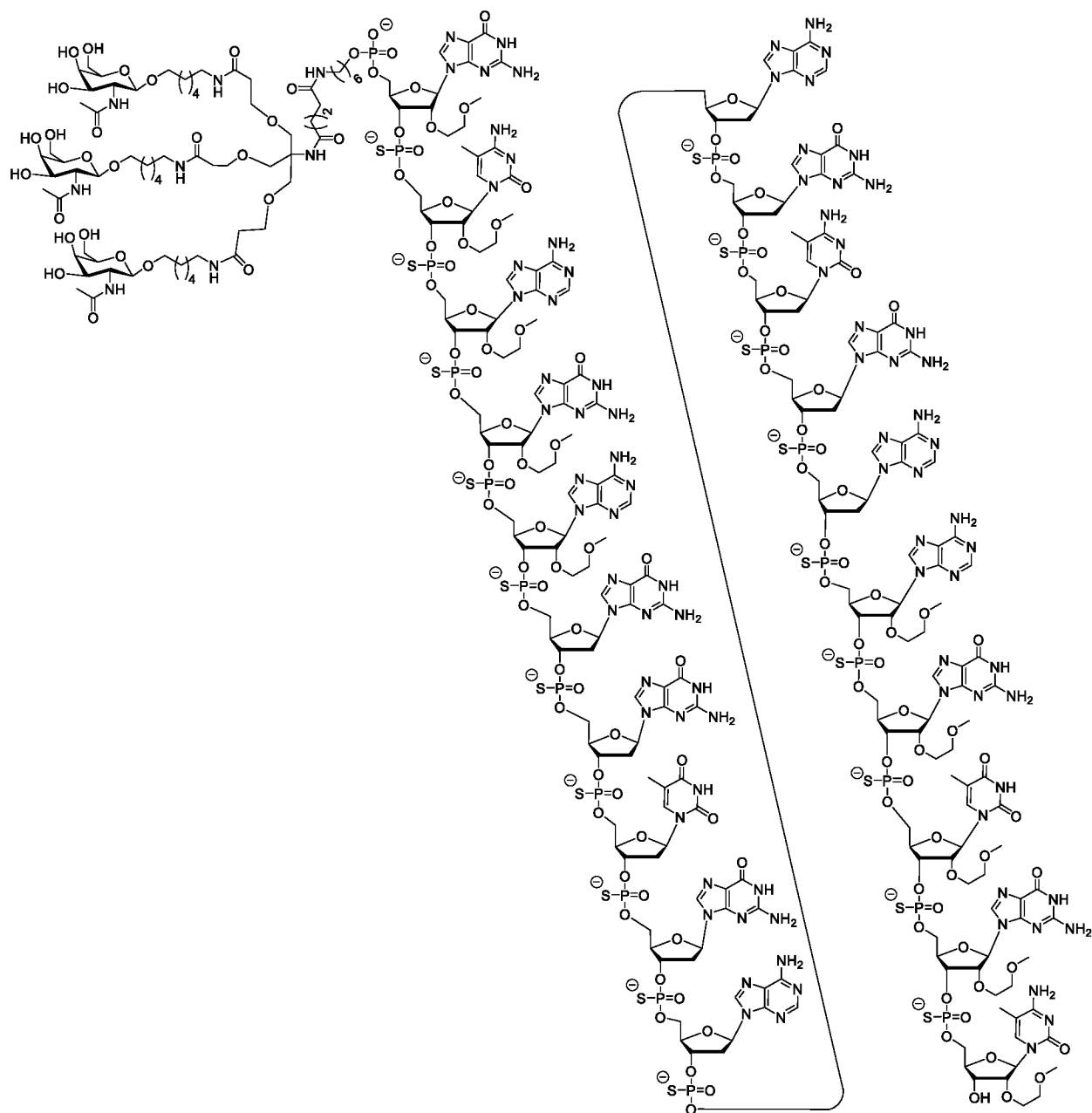
d = 2'-дезоксинуклеозид и

s = тиофосфатная межнуклеозидная связь.

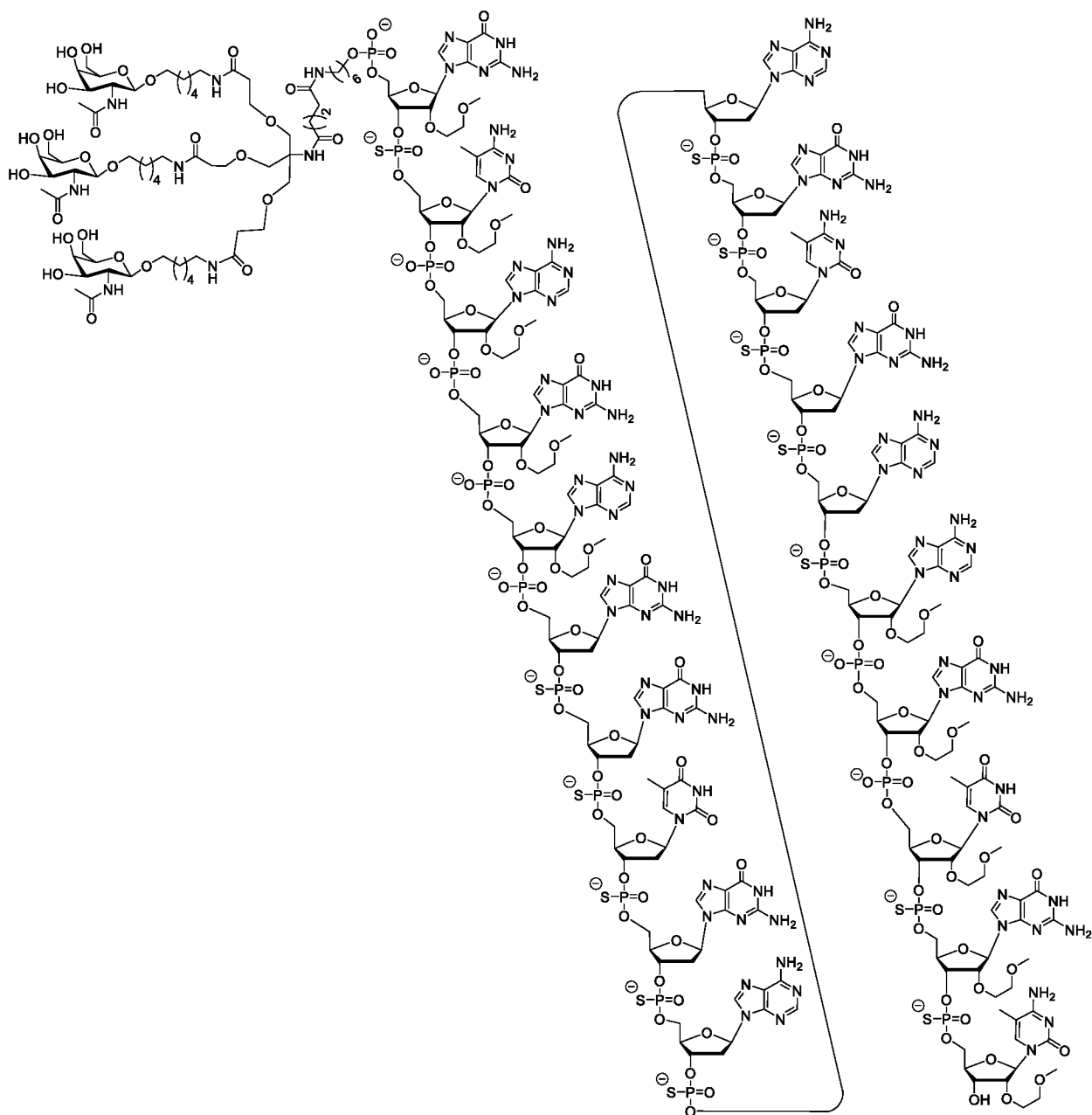
В некоторых вариантах реализации изобретения соединение, имеющее следующую химическую структуру, содержит или состоит из ISIS 505358 с 5'-X, где X представляет собой конъюгирующую группу, описанную в настоящем документе:



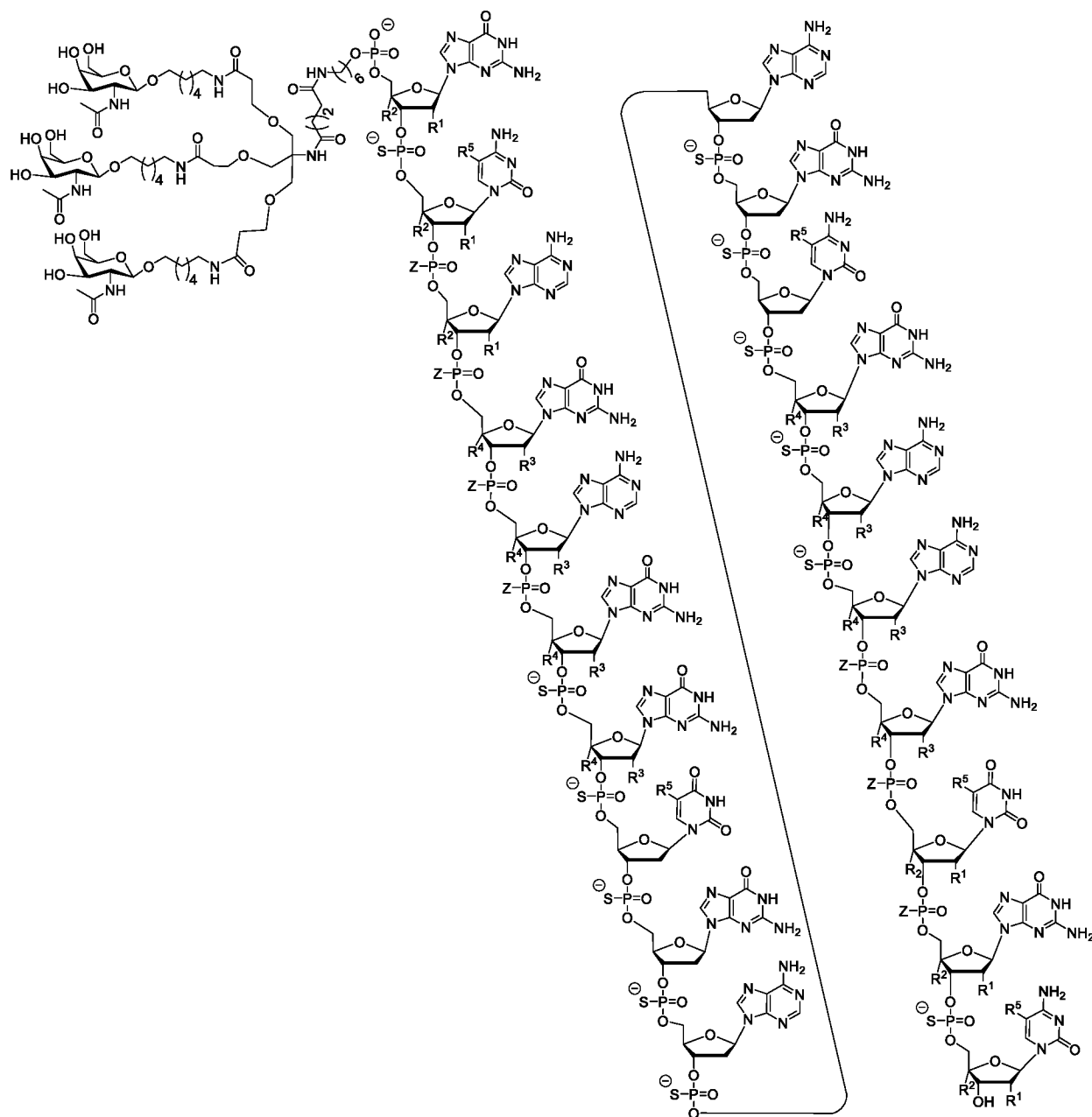
В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит или состоит из ISIS 712408, имеющего следующую химическую структуру:



В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит или состоит из ISIS 695324, имеющего следующую химическую структуру:



В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит или состоит из SEQ ID NO: 3, 5'-GalNAc и химических модификаций и представлено следующей химической структурой:



где любой  $R^1$  представляет собой  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$  (MOE), а  $R^2$  представляет собой H; или  $R^1$  и  $R^2$  вместе образуют мостик, при этом  $R^1$  представляет собой  $-\text{O}-$ , а  $R^2$  представляет собой  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$  или  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ , и  $R^1$  и  $R^2$  напрямую связаны так, что образующийся мостик выбран из:  $-\text{O}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)-$  и  $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ;

и для каждой пары из  $R^3$  и  $R^4$  у одного кольца, независимо для каждого кольца: любой  $R^3$  выбран из H и  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ , а  $R^4$  представляет собой H; или  $R^3$  и  $R^4$  вместе образуют мостик, при этом  $R^3$  представляет собой  $-\text{O}-$ , а  $R^4$  представляет собой  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$  или  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ , и  $R^3$  и  $R^4$  напрямую связаны так, что образующийся мостик выбран из:  $-\text{O}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)-$  и  $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ;

и  $R^5$  выбран из H и  $-\text{CH}_3$ ;



а Z выбран из S<sup>-</sup> и O<sup>-</sup>.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит антисмысловый олигонуклеотид, описанный в публикации WO 2012/145697, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки, и конъюгирующую группу, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит антисмысловый олигонуклеотид, имеющий последовательность азотистых оснований любой из SEQ ID NO 5-310, 321-802, 804-1272, 1288-1350, 1364-1372, 1375, 1376 и 1379, описанных в WO 2012/145697, и конъюгирующую группу, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит антисмысловый олигонуклеотид, описанный в публикации WO 2011/047312, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки, и конъюгирующую группу, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит антисмысловый олигонуклеотид, имеющий последовательность азотистых оснований любой из SEQ ID NO 14-22, описанных в WO 2011/047312, и конъюгирующую группу, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит антисмысловый олигонуклеотид, описанный в публикации WO 2012/145674, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки, и конъюгирующую группу, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит антисмысловый олигонуклеотид, имеющий последовательность азотистых оснований любой из SEQ ID NO 18-35, описанных в WO 2012/145674. В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит двухцепочечный олигонуклеотид, описанный в публикации WO 2013/159109, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки, и конъюгирующую группу, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит двухцепочечный олигонуклеотид, в котором одна спираль имеет последовательность азотистых оснований любой из SEQ ID NO 30-125, описанных в WO 2013/159109. Последовательности азотистых оснований всех вышеупомянутых ссылочных SEQ ID NO включены в настоящий документ посредством ссылки.

#### *Терапевтические показания для HBV*

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения приведены способы применения конъюгированного антисмыслового соединения, нацеленного на

нуклеиновую кислоту HBV, для модулирования экспрессии HBV у субъекта. В некоторых вариантах реализации изобретения экспрессия HBV снижена.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения приведены способы применения конъюгированного антисмыслового соединения, нацеленного на нуклеиновую кислоту HBV, в фармацевтической композиции для лечения субъекта. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект страдает патологическим состоянием, связанным с HBV. В некоторых вариантах реализации изобретения патологическое состояние, связанное с HBV, включает, но не ограничивается ими, хроническую HBV инфекцию, воспаление, фиброз, цирроз, рак печени, сывороточный гепатит, разлитие желчи, рак печени, воспаление печени, фиброз печени, цирроз печени, печеночную недостаточность, диффузное гепатоцеллюлярное воспалительное заболевание, гемофагоцитарный синдром, сывороточный гепатит и HBV виремию. В некоторых вариантах реализации изобретения патологическое состояние, связанное с hBV, может характеризоваться симптомами, которые могут включать любой или все из следующих признаков: гриппоподобное заболевание, слабость, боль, головная боль, лихорадка, потеря аппетита, диарея, разлитие желчи, тошнота и рвота, боль в области печени, стул глинистого или серого цвета, общий зуд и моча темного цвета, в сочетании с положительным тестом на наличие вируса гепатита В, вирусного антигена гепатита В или положительным тестом на наличие антитела, специфичного к вирусному антигену гепатита В. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект имеет риск патологического состояния, связанного с HBV. Сюда входят субъекты, имеющие один или более факторов риска для развития патологического состояния, связанного с HBV, включая половой контакт с индивидуумом, инфицированным вирусом гепатита В, проживание в одном доме с индивидуумом с пожизненной инфекцией вируса гепатита В, воздействие крови человека, инфицированного вирусом гепатита В, инъекция запрещенных веществ субъектом с гемофилией и посещение мест распространения гепатита В. В некоторых вариантах реализации изобретения у субъекта идентифицирована необходимость лечения патологического состояния, связанного с HBV.

В некоторых вариантах реализации изобретения предложен способ снижения уровней ДНК HBV и/или антигенов HBV у животного, инфицированного HBV, включающий введение указанному животному конъюгированного антисмыслового соединения, нацеленного на нуклеиновую кислоту HBV. В некоторых вариантах реализации изобретения антиген представляет собой HBsAG или HBeAG. В некоторых вариантах

реализации изобретения количество антигена HBV может быть существенно снижено, что приводит к сероконверсии.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения приведены способы применения конъюгированного антисмыслового соединения, нацеленного на нуклеиновую кислоту HBV, для производства лекарственного средства.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложено конъюгированное антисмысловое соединение, нацеленное на нуклеиновую кислоту HBV, или его фармацевтически приемлемая соль для применения в терапии.

В некоторых вариантах реализации изобретения предложено конъюгированное антисмысловое соединение, нацеленное на нуклеиновую кислоту HBV, для применения при лечении патологического состояния, связанного с HBV. Патологическое состояние, связанное с HBV, включает, но не ограничивается ими, хроническую HBV инфекцию, воспаление, фиброз, цирроз, рак печени, сывороточный гепатит, разлитие желчи, рак печени, воспаление печени, фиброз печени, цирроз печени, печеночную недостаточность, диффузное гепатоцеллюлярное воспалительное заболевание, гемофагоцитарный синдром, сывороточный гепатит и HBV виремию.

В некоторых вариантах реализации изобретения предложено конъюгированное антисмысловое соединение, нацеленное на нуклеиновую кислоту HBV, для применения для снижения уровней ДНК HBV и/или антигена HBV у животного инфицированного HBV, включающего введение указанному животному конъюгированного антисмыслового соединения, нацеленного на нуклеиновую кислоту HBV. В некоторых вариантах реализации изобретения антиген представляет собой HBsAG или HBeAG. В некоторых вариантах реализации изобретения количество антигена HBV может быть существенно снижено, что приводит к сероконверсии.

Следует понимать, что любое из описанных в настоящем документе соединений можно применять в вышеупомянутых способах и применениях. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированное антисмысловое соединение, нацеленное на нуклеиновую кислоту HBV, в вышеупомянутых способах и применениях может включать, но не ограничиваясь ими, конъюгированное антисмысловое соединение, нацеленное на SEQ ID NO: 1, которое содержит по меньшей мере 8 смежных азотистых оснований последовательности SEQ ID NO: 3-11; конъюгированное антисмысловое соединение, нацеленное на SEQ ID NO: 1, которое содержит последовательность азотистых

оснований любой из SEQ ID NO: 3-11; соединение, содержащее или состоящее из ISIS 505358, ISIS 509934, ISIS 510100, ISIS 552023, ISIS 552024, ISIS 552032, ISIS 552859, ISIS 552925, или ISIS 577119 и конъюгирующие группы; соединение, содержащее антисмысловый олигонуклеотид, описанный в публикации WO 2012/145697, полное описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки, и конъюгирующую группу; соединение, содержащее антисмысловый олигонуклеотид, имеющий последовательность азотистых оснований любой из SEQ ID NO 5-310, 321-802, 804-1272, 1288-1350, 1364-1372, 1375, 1376 и 1379, описанных в WO 2012/145697, и конъюгирующую группу, описанную в настоящем документе; соединение, содержащее антисмысловый олигонуклеотид, имеющий последовательность азотистых оснований любой из SEQ ID NO 14-22, описанных в WO 2011/047312, и конъюгирующую группу, описанную в настоящем документе; соединение, содержащее антисмысловый олигонуклеотид, имеющий последовательность азотистых оснований любой из SEQ ID NO 18-35, описанных в WO 2012/145674; или соединение, содержащее двухцепочечный олигонуклеотид, в котором одна спираль имеет последовательность азотистых оснований любой из SEQ ID NO 30-125, описанных в WO 2013/159109.

## 2. Транстиретин (TTR)

TTR (также известный как преальбумин, гипертироксинемия, диспреальбуминемическая, тироксин; старческий системный амилоидоз, амилоидная полиневропатия, амилоидоз I, PALB; дистранстиретинемическая, HST2651; ТВРА; диспреальбуминемическая эутиреоидная гипертироксинемия) представляет собой белок сыворотки/плазмы и спинномозговой жидкости, отвечающий за транспорт тироксина и ретинола (Sakaki et al, Mol Biol Med. 1989, 6:161-8). Структурно TTR представляет собой гомотетрамер; точечные мутации и неправильное скручивание белка приводит к отложению амилоидных фибрилл и сопровождается такими расстройствами как старческий системный амилоидоз (SSA), семейная амилоидная полиневропатия (FAP) и семейная амилоидная кардиопатия (FAC).

TTR синтезируется, в основном, печенью и хориоидным сплетением головного мозга, а также, в меньшей степени, сетчаткой глаза у людей (Palha, *Clin Chem Lab Med*, 2002, 40, 1292-1300). Транстиретин, который синтезирован в печени, секретируется в кровь, тогда как транстиретин из хориоидного сплетения предназначен для спинномозговой жидкости (CSF). Синтез транстиретина в хориоидном сплетении составляет около 20% от общего локального синтеза белка и целых 25% от общего белка CSF (Dickson et al., *J Biol Chem*, 1986, 261, 3475-3478).

Благодаря возможности выполнения генетических и иммуногистохимических диагностических тестов, были обнаружены пациенты с TTR амилоидозом во многих народах мира. Недавние исследования показали, что TTR амилоидоз представляет собой не редкое эндемическое заболевание, как считалось ранее, и может поражать не менее 25% взрослого населения (Tanskanen et al, *Ann Med.* 2008;40(3):232-9).

На биохимическом уровне TTR был определено как основной белковый компонент в амилоидных отложениях пациентов с FAP (Costa et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1978, **75**:4499–4503), а позже было обнаружено, что замена метионина на валин в положении 30 этого белка представляет собой наиболее распространенный молекулярный дефект, вызывающий это заболевание (Saraiva et al, *J. Clin. Invest.* 1984, **74**: 104–119). При FAP происходит повсеместное системное внеклеточное отложение скоплений TTR, и амилоидные фибриллы возникают по всей соединительной ткани, особенно в периферической нервной системе (Sousa and Saraiva, *Prog. Neurobiol.* 2003, **71**: 385–400). После отложения TTR происходит аксонная дегенерация, берущая начало в немиелинизированных и миелинизированных волокнах малого диаметра, что в конечном итоге приводит к потере нейронов в ганглионарных центрах.

Антисмысловые соединения, нацеленные на TTR, были описаны ранее в US2005/0244869, WO2010/017509 и WO2011/139917, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Антисмысловое олигоазотистое основание, нацеленное на TTR, ISIS-TTR<sub>Rx</sub>, в настоящее время проходит 2/3 фазу клинических испытаний для исследования его эффективности при лечении субъектов, страдающих семейной амилоидной полиневропатией. Однако все еще существует необходимость в обеспечении пациентов дополнительными и более эффективными возможностями лечения.

*Некоторые конъюгированные антисмысловые соединения, нацеленные на нуклеиновую кислоту TTR*

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированные антисмысловые соединения нацелены на нуклеиновую кислоту TTR, имеющую последовательность с номером доступа GENBANK® NM\_000371.3, которая включена в настоящий документ как SEQ ID NO: 2. В некоторых таких вариантах реализации изобретения конъюгированное антисмысловое соединение, нацеленное на SEQ ID NO: 2, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% комплементарно SEQ ID NO: 2.



азотистых оснований последовательности SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированное антисмысловое соединение, нацеленное на SEQ ID NO: 2, содержит последовательность азотистых оснований SEQ ID NO: 17.

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированное антисмысловое соединение, нацеленное на SEQ ID NO: 2, содержит по меньшей мере 8 смежных азотистых оснований последовательности SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированное антисмысловое соединение, нацеленное на SEQ ID NO: 2, содержит последовательность азотистых оснований SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированное антисмысловое соединение, нацеленное на SEQ ID NO: 2, содержит по меньшей мере 8 смежных азотистых оснований последовательности SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированное антисмысловое соединение, нацеленное на SEQ ID NO: 2, содержит последовательность азотистых оснований SEQ ID NO: 19.

**Таблица 3. Антисмысловые соединения, нацеленные на TTR SEQ ID NO: 2**

<b>ISIS №</b>	<b>Сайт-мишень инициации</b>	<b>Последовательность (5'-3')</b>	<b>Мотив</b>	<b>SEQ ID NO</b>
420915	508	TCTTGGTTACATGAAATC CC	eeeeedddddddddeee ee	12
304299	507	CTTGGTTACATGAAATCC CA	eeeeedddddddddeee ee	13
420921	515	GGAATACTCTTGGTTACA TG	eeeeedddddddddeee ee	14
420922	516	TGGAATACTCTTGGTTAC AT	eeeeedddddddddeee ee	15
420950	580	TTTTATTGTCTCTGCCTGG A	eeeeedddddddddeee ee	16
420955	585	GAATGTTTTATTGTCTCTG C	eeeeedddddddddeee ee	17
420957	587	AGGAATGTTTTATTGTCT CT	eeeeedddddddddeee ee	18
420959	589	ACAGGAATGTTTTATTGT CT	eeeeedddddddddeee ee	19

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит или состоит из ISIS 420915 и конъюгирующие группы. ISIS 420915 представляет собой модифицированный олигонуклеотид, имеющий формулу: Tes mCes Tes Tes Ges Gds Tds Tds Ads mCds Ads Tds Gds Ads Ads Aes Tes mCes mCes mCe, где

A = аденин,

mC = 5'-метилцитозин

G = гуанин,

T = тимин,

e = 2'-О-метоксиэтил-модифицированный нуклеозид,

d = 2'-дезоксинуклеозид и

s = тиофосфатная межнуклеозидная связь.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит или состоит из ISIS 304299 и конъюгирующие группы. ISIS 304299 представляет собой модифицированный олигонуклеотид, имеющий формулу: mCes Tes Tes Ges Ges Tds Tds Ads mCds Ads Tds Gds Ads Ads Ads Tes mCes mCes mCes Ae, где

A = аденин,

mC = 5'-метилцитозин

G = гуанин,

T = тимин,

e = 2'-О-метоксиэтил-модифицированный нуклеозид,

d = 2'-дезоксинуклеозид и

s = тиофосфатная межнуклеозидная связь.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит или состоит из ISIS 420921 и конъюгирующие группы. ISIS 420921 представляет собой модифицированный олигонуклеотид, имеющий формулу: Ges Ges Aes Aes Tes Ads mCds Tds mCds Tds Tds Gds Gds Tds Tds Aes mCes Aes Tes Ge, где

A = аденин,

mC = 5'-метилцитозин

G = гуанин,



T = тимин,

e = 2'-О-метоксиэтил-модифицированный нуклеозид,

d = 2'-дезоксинуклеозид и

s = тиофосфатная межнуклеозидная связь.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит или состоит из ISIS 420922 и конъюгирующие группы. ISIS 420922 представляет собой модифицированный олигонуклеотид, имеющий формулу: Tes Ges Ges Aes Aes Tds Ads mCds Tds mCds Tds Tds Gds Gds Tds Tes Aes mCes Aes Te, где

A = аденин,

mC = 5'-метилцитозин

G = гуанин,

T = тимин,

e = 2'-О-метоксиэтил-модифицированный нуклеозид,

d = 2'-дезоксинуклеозид и

s = тиофосфатная межнуклеозидная связь.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит или состоит из ISIS 420950 и конъюгирующие группы. ISIS 420950 представляет собой модифицированный олигонуклеотид, имеющий формулу: Tes Tes Tes Tes Aes Tds Tds Gds Tds mCds Tds mCds Tds Gds mCds mCes Tes Ges Ges Ae, где

A = аденин,

mC = 5'-метилцитозин

G = гуанин,

T = тимин,

e = 2'-О-метоксиэтил-модифицированный нуклеозид,

d = 2'-дезоксинуклеозид и

s = тиофосфатная межнуклеозидная связь.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит или состоит из ISIS 420955 и конъюгирующие группы. ISIS 420955 представляет собой

модифицированный олигонуклеотид, имеющий формулу: Ges Aes Aes Tes Ges Tds Tds Tds Tds Ads Tds Tds Gds Tds mCds Tes mCes Tes Ges mCe, где

A = аденин,

mC = 5'-метилцитозин

G = гуанин,

T = тимин,

e = 2'-О-метоксиэтил-модифицированный нуклеозид,

d = 2'-дезоксинуклеозид и

s = тиофосфатная межнуклеозидная связь.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит или состоит из ISIS 420957 и конъюгирующие группы. ISIS 420957 представляет собой модифицированный олигонуклеотид, имеющий формулу: Aes Ges Ges Aes Aes Tds Gds Tds Tds Tds Ads Tds Tds Gds Tes mCes Tes mCes Te, где

A = аденин,

mC = 5'-метилцитозин

G = гуанин,

T = тимин,

e = 2'-О-метоксиэтил-модифицированный нуклеозид,

d = 2'-дезоксинуклеозид и

s = тиофосфатная межнуклеозидная связь.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит или состоит из ISIS 420959 и конъюгирующие группы. ISIS 420959 представляет собой модифицированный олигонуклеотид, имеющий формулу: Aes mCes Aes Ges Ges Ads Ads Tds Gds Tds Tds Tds Tds Ads Tds Tes Ges Tes mCes Te, где

A = аденин,

mC = 5'-метилцитозин

G = гуанин,

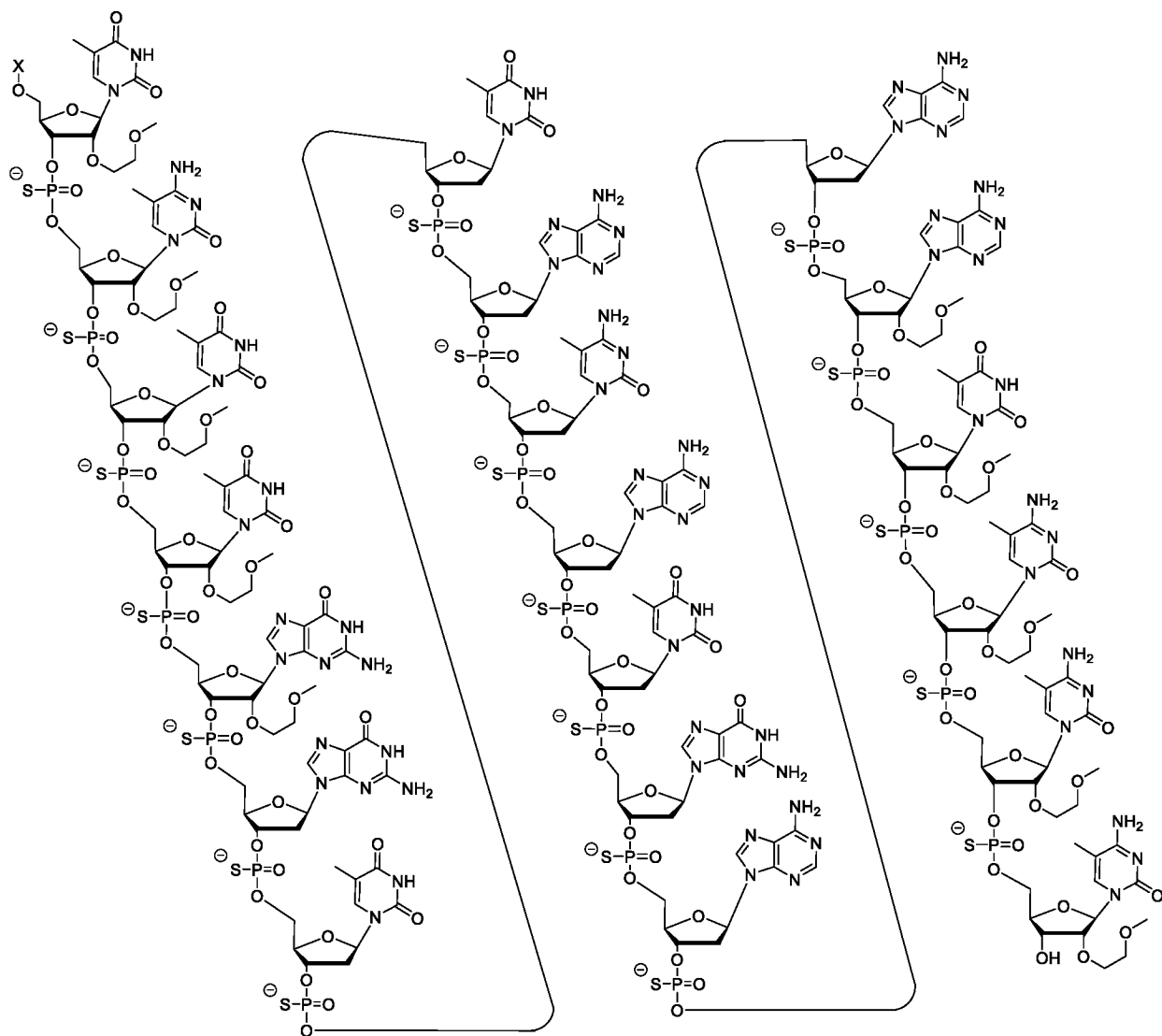
T = тимин,

e = 2'-О-метоксиэтил-модифицированный нуклеозид,

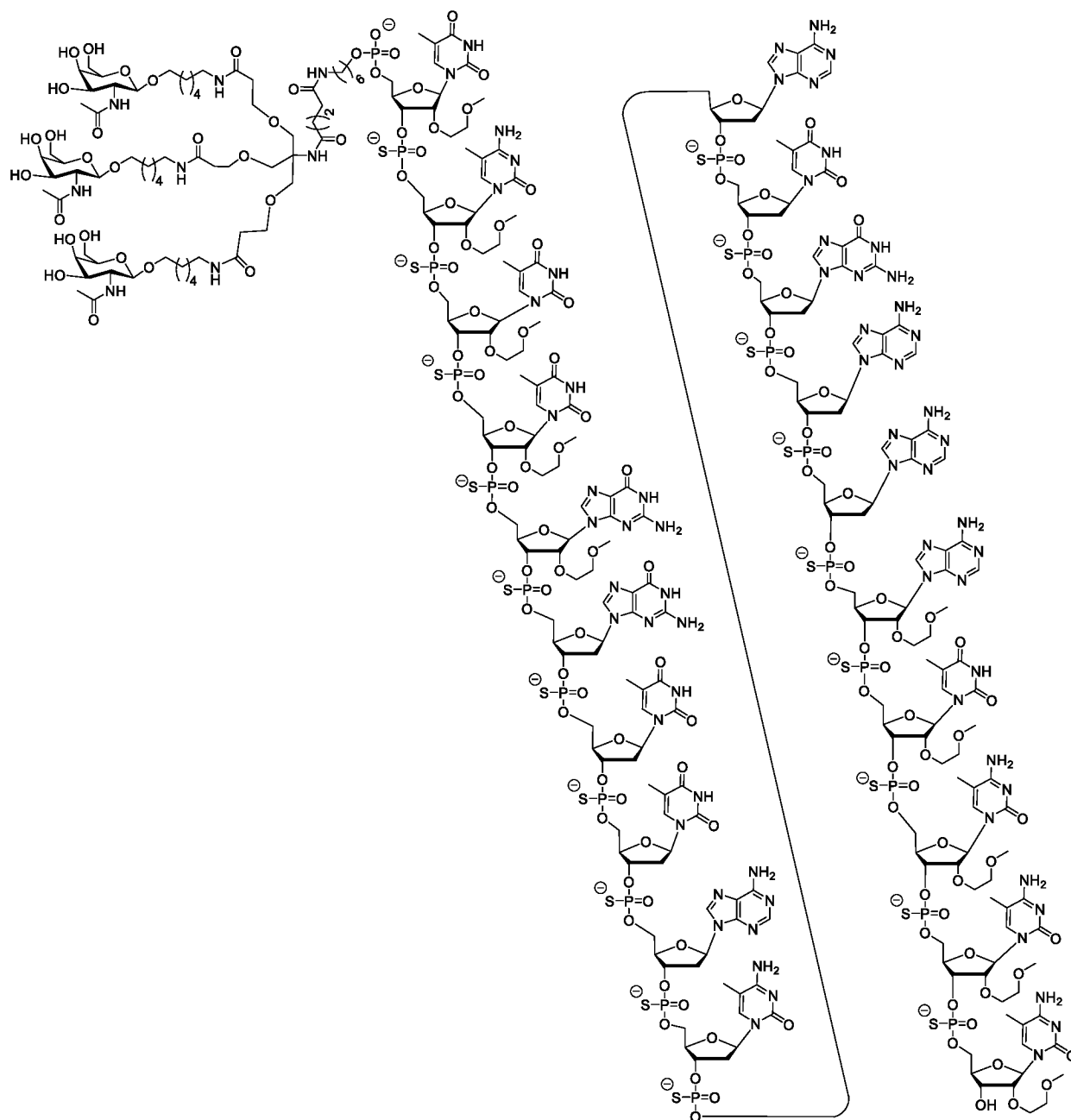
d = 2'-дезоксинуклеозид и

s = тиофосфатная межнуклеозидная связь.

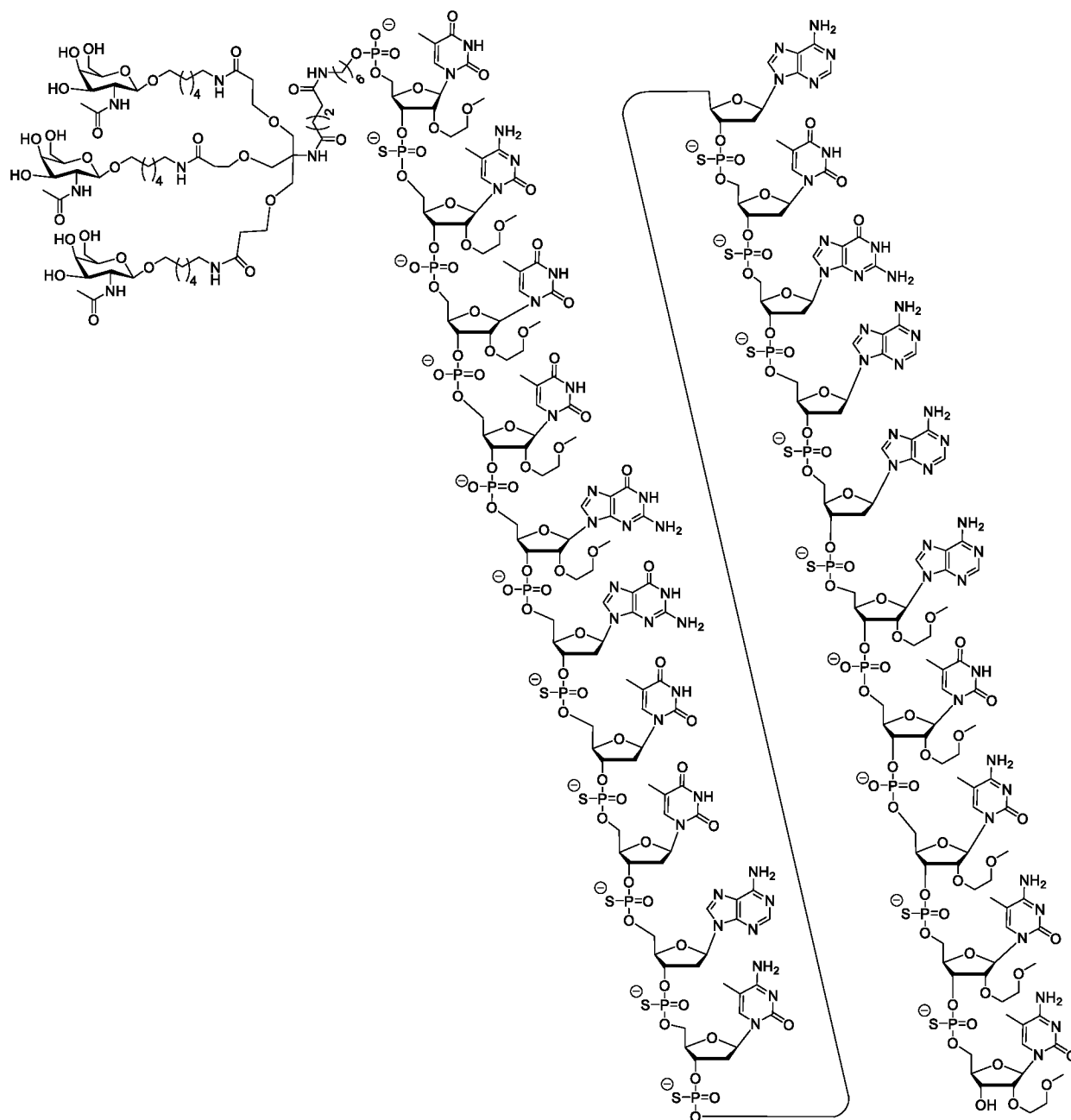
В некоторых вариантах реализации изобретения соединение, имеющее следующую химическую структуру, содержит или состоит из ISIS 420915 с 5'-X, где X представляет собой конъюгирующую группу, описанную в настоящем документе:



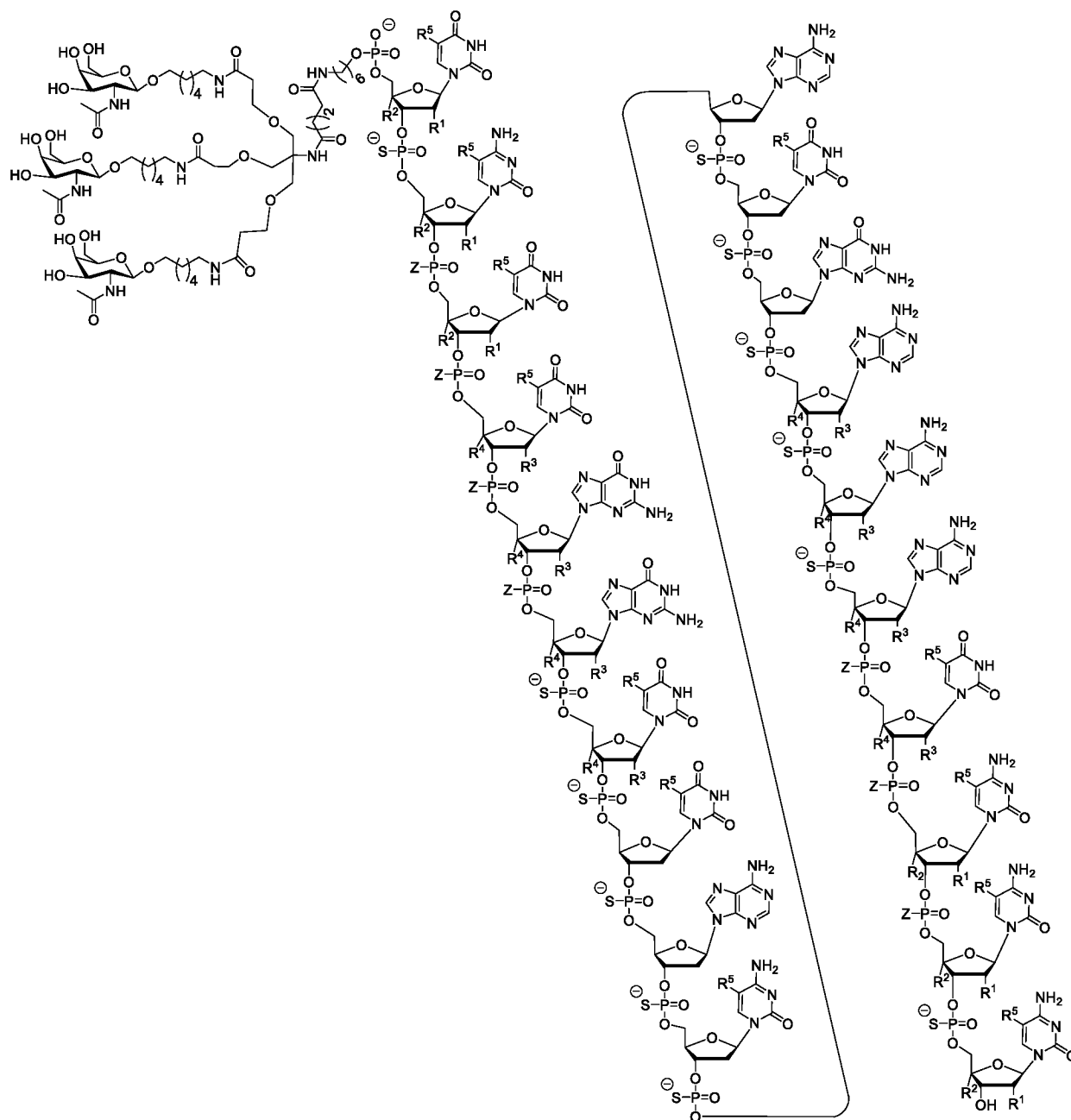
В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит или состоит из ISIS 682877, имеющего следующую химическую структуру:



В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит или состоит из ISIS 682884, имеющего следующую химическую структуру:



В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит или состоит из SEQ ID NO: 12, 5'-GalNAc и химических модификаций, и представлено следующей химической структурой:



где любой  $R^1$  представляет собой  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$  (MOE), а  $R^2$  представляет собой H; или  $R^1$  и  $R^2$  вместе образуют мостик, при этом  $R^1$  представляет собой  $-\text{O}-$ , а  $R^2$  представляет собой  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$  или  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ , и  $R^1$  и  $R^2$  напрямую связаны так, что образующийся мостик выбран из:  $-\text{O}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)-$  и  $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ;

и для каждой пары из  $R^3$  и  $R^4$  у одного кольца, независимо для каждого кольца: любой  $R^3$  выбран из H и  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ , а  $R^4$  представляет собой H; или  $R^3$  и  $R^4$  вместе образуют мостик, при этом  $R^3$  представляет собой  $-\text{O}-$ , а  $R^4$  представляет собой  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$  или  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ , и  $R^3$  и  $R^4$  напрямую связаны так, что образующийся мостик выбран из:  $-\text{O}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)-$  и  $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ;

и  $R^5$  выбран из H и  $-\text{CH}_3$ ;

а Z выбран из S<sup>-</sup> и O<sup>-</sup>.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит антисмысловый олигонуклеотид, описанный в публикации WO 2011/139917 или US 8101743, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки, и конъюгирующую группу. В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит антисмысловый олигонуклеотид, имеющий последовательность азотистых оснований любой из SEQ ID NO 8-160, 170-177, описанных в WO 2011/139917, и конъюгирующую группу, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит антисмысловый олигонуклеотид, имеющий последовательность азотистых оснований любой из SEQ ID NO 12-89, описанных в US 8 101 743, и конъюгирующую группу, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит антисмысловый олигонуклеотид, имеющий последовательность азотистых оснований, комплементарную предпочтительному целевому сегменту любой из SEQ ID NO 90-133, описанных в US 8101743, и конъюгирующую группу, описанную в настоящем документе. Последовательности азотистых оснований всех вышеупомянутых справочных SEQ ID NO включены в настоящий документ посредством ссылки.

#### *Терапевтические показания для TTR*

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения приведены способы применения конъюгированного антисмыслового соединения, нацеленного на нуклеиновую кислоту TTR, для модулирования экспрессии TTR у субъекта. В некоторых вариантах реализации изобретения экспрессия TTR снижена.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения приведены способы применения конъюгированного антисмыслового соединения, нацеленного на нуклеиновую кислоту TTR, в фармацевтической композиции для лечения субъекта. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект страдает заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, связанным с транстиретином, или его симптомом. В некоторых вариантах реализации изобретения заболевание, расстройство или патологическое состояние, связанное с транстиретином, представляет собой транстиретиновый амилоидоз. «Амилоидоз, связанный с транстиретином» или «транстиретиновый амилоидоз», или «транстиретиновое амилоидное заболевание», при использовании в настоящем документе, представляет собой любую патологию или заболевание, связанное с дисфункцией или дисрегуляцией транстиретина, которая

приводит к образованию содержащих транстиретин амилоидных фибрилл.

Транстиретиновый амилоидоз включает, но не ограничивается ими, наследственный TTR амилоидоз, лептоменингеальный амилоидоз, семейную амилоидную полиневропатию (FAP), семейную амилоидную кардиомиопатию, семейный окулолептоменингеальный амилоидоз, старческий амилоидоз сердца или старческий системный амилоидоз.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения приведены способы применения конъюгированного антисмыслового соединения, нацеленного на нуклеиновую кислоту TTR, для производства лекарственного средства.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложено конъюгированное антисмысловое соединение, нацеленное на нуклеиновую кислоту TTR, или его фармацевтически приемлемая соль для применения в терапии.

В некоторых вариантах реализации изобретения предложено конъюгированное антисмысловое соединение, нацеленное на нуклеиновую кислоту TTR, для применения при лечении заболевания, расстройства, патологического состояния или его симптома, связанного с транстиретином. В некоторых вариантах реализации изобретения заболевание, расстройство или патологическое состояние, связанное с транстиретином, представляет собой транстиретиновый амилоидоз.

Следует понимать, что любое из описанных в настоящем документе соединений можно применять в вышеупомянутых способах и применениях. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения конъюгированное антисмысловое соединение, нацеленное на нуклеиновую кислоту TTR, в вышеупомянутых способах и применениях может включать, но не ограничиваясь ими, конъюгированное антисмысловое соединение, нацеленное на SEQ ID NO: 2, которое содержит по меньшей мере 8 смежных азотистых оснований любой из SEQ ID NO: 12-19; конъюгированное антисмысловое соединение, нацеленное на SEQ ID NO: 2, которое содержит последовательность азотистых оснований любой из SEQ ID NO: 12-19; соединение, содержащее или состоящее из ISIS 420915, ISIS 304299, ISIS 420921, ISIS 420922, ISIS 420950, ISIS 420955, ISIS 420957 или ISIS 420959 и конъюгирующие группы; соединение, содержащее антисмысловый олигонуклеотид, описанный в WO 2011/139917 или US 8101743, полное содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки, и конъюгирующую группу; соединение, содержащее антисмысловый олигонуклеотид, имеющий последовательность азотистых оснований любой из SEQ ID NO 8-160, 170-177, описанных в WO 2011/139917, и конъюгирующую группу, описанную в настоящем документе; антисмысловый



олигонуклеотид, имеющий последовательность азотистых оснований любой из SEQ ID NO 12-89, описанных в US 8101743, и конъюгирующую группу, описанную в настоящем документе; или соединение, содержащее антисмысловый олигонуклеотид, имеющий последовательность азотистых оснований, комплементарную предпочтительному целевому сегменту любой из SEQ ID NO 90-133, описанных в US 8101743, и конъюгирующую группу, описанную в настоящем документе. Последовательности азотистых оснований всех вышеупомянутых справочных SEQ ID NO включены в настоящий документ посредством ссылки.

#### **Е. Некоторые фармацевтические композиции**

В некоторых вариантах реализации настоящего описания приведены фармацевтические композиции, содержащие одно или более антисмысловых соединений. В некоторых вариантах реализации изобретения такая фармацевтическая композиция содержит подходящий фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит стерильный солевой раствор и одно или более антисмысловых соединений. В некоторых вариантах реализации изобретения такая фармацевтическая композиция состоит из стерильного солевого раствора и одного или более антисмысловых соединений. В некоторых вариантах реализации изобретения стерильный солевой раствор представляет собой солевой раствор фармацевтической марки. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит одно или более антисмысловых соединений и стерильную воду. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция состоит из одного или более антисмысловых соединений и стерильной воды. В некоторых вариантах реализации изобретения стерильный солевой раствор представляет собой воду фармацевтической марки. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит одно или более антисмысловых соединений и фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция состоит из одного или более антисмысловых соединений и фосфатно-солевого буферного раствора (PBS). В некоторых вариантах реализации изобретения стерильный солевой раствор представляет собой PBS фармацевтической марки.

В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловые соединения могут быть смешаны с фармацевтически приемлемыми активными и/или инертными веществами

для получения фармацевтических композиций или составов. Композиции и способы составления фармацевтических композиций зависят от множества критериев, включая, но не ограничиваясь этим, способ введения, тяжесть заболевания или дозу, подлежащую введению.

Фармацевтические композиции, содержащие антисмысловые соединения, охватывают любые фармацевтически приемлемые соли, сложные эфиры или соли таких сложных эфиров. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции, содержащие антисмысловые соединения, содержат один или более олигонуклеотидов, которые при введении млекопитающему, включая человека, могут обеспечивать (прямо или косвенно) его биологически активный метаболит или остаток. Соответственно, настоящее описание относится также к фармацевтически приемлемым солям антисмысловых соединений, пролекарствам, фармацевтически приемлемым солям таких пролекарств и к другим биоэквивалентам. Подходящие фармацевтически приемлемые соли включают, но не ограничиваются ими, соли натрия и калия.

Пролекарство может включать внедрение дополнительных нуклеозидов у одного или обоих концов олигонуклеотида, которые расщепляются в организме под действием эндогенных нуклеаз с образованием активного антисмыслового олигонуклеотида.

В многочисленных способах в терапиях с нуклеиновыми кислотами были применены липидные фрагменты. В некоторых таких способах нуклеиновую кислоту вводят в предварительно сформированные липосомы или липоплексы, полученные из смесей катионных липидов и нейтральных липидов. В некоторых способах получают ДНК комплексы с моно- или поликатионными липидами без участия нейтрального липида. В некоторых вариантах реализации изобретения липидный фрагмент выбран для улучшения распределения фармацевтического агента в определенной клетке или ткани. В некоторых вариантах реализации изобретения липидный фрагмент выбран для улучшения распределения фармацевтического агента в жировой ткани. В некоторых вариантах реализации изобретения липидный фрагмент выбран для улучшения распределения фармацевтического агента в мышечной ткани.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции, представленные в настоящем документе, содержат один или более модифицированных олигонуклеотидов и одно или более вспомогательных веществ. В некоторых таких вариантах реализации изобретения вспомогательные вещества выбраны из воды, солевых

растворов, спирта, полиэтиленгликолей, желатина, лактозы, амилазы, стеарата магния, талька, кремниевой кислоты, вязкого парафина, гидроксиметилцеллюлозы и поливинилпирролидона.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция, представленная в настоящем документе, содержит систему доставки. Примеры систем доставки включают, но не ограничиваются ими, липосомы и эмульсии. Некоторые системы доставки подходят для получения некоторых фармацевтических композиций, включая композиции, содержащие гидрофобные соединения. В некоторых вариантах реализации изобретения применяют некоторые органические растворители, такие как диметилсульфоксид.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция, представленная в настоящем документе, содержит одну или более тканеспецифичных молекул доставки, предназначенных для доставки одного или более фармацевтических агентов настоящего описания в определенную ткань или типы клеток. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции включают липосомы, покрытые тканеспецифичным антителом.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция, представленная в настоящем документе, содержит систему совместного растворителя. Некоторые такие системы совместных растворителей содержат, например, бензиловый спирт, неполярное поверхностно-активное вещество, смешиваемый с водой органический полимер и водную фазу. В некоторых вариантах реализации изобретения такие системы совместных растворителей применяют для гидрофобных соединений. Не ограничивающий пример такой системы совместных растворителей представляет собой система совместных растворителей VPD, которая представляет собой раствор абсолютного этанола, содержащего 3% масс./об. бензинового спирта, 8% масс./об. неполярного поверхностно-активного вещества Polysorbate 80™ и 65% масс./об. полиэтиленгликоля 300. Пропорции таких систем совместных растворителей могут существенно варьироваться без значительного изменения их характеристик растворимости и токсичности. Кроме того, может варьироваться сущность компонентов совместных растворителей: например, вместо Polysorbate 80™ могут быть применены другие поверхностно-активные вещества; может варьироваться размер фракции полиэтиленгликоля; вместо полиэтиленгликоля могут быть применены другие биосовместимые полимеры, например, поливинилпирролидон; и вместо декстрозы могут быть применены другие сахара или полисахариды.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическую композицию, представленную в настоящем документе, получают для перорального введения. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции получают для буккального введения.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическую композицию получают для введения инъекцией (например, внутривенной, подкожной, внутримышечной и т.д.). В некоторых таких вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит носитель и составлена в водном растворе, таком как вода или физиологически совместимые буферы, такие как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический солевой буфер. В некоторых вариантах реализации изобретения включены другие ингредиенты (например, ингредиенты, улучшающие растворимость или служащие консервантами). В некоторых вариантах реализации изобретения суспензии для инъекций получают при помощи подходящих жидких носителей, суспендирующих агентов и т.п. Некоторые фармацевтические композиции для инъекций представлены в форме разовой дозы, например, в ампулах, или в многодозовых контейнерах. Некоторые фармацевтические композиции для инъекций представляют собой суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных жидких носителях, и они могут содержать вспомогательные агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Некоторые растворители, подходящие для применения в фармацевтических композициях для инъекций, включают, но не ограничиваются ими, липофильные растворители и жирные масла, такие как кунжутное масло, синтетические сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеат или триглицериды, и липосомы. Водные суспензии для инъекций могут содержать вещества, которые увеличивают вязкость суспензии, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, сорбит или декстран. Такие суспензии могут также необязательно содержать подходящие стабилизаторы или агенты, которые увеличивают растворимость фармацевтических агентов с обеспечением возможности получения высококонцентрированных растворов.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическую композицию получают для трансмукозального введения. В некоторых таких вариантах реализации изобретения в составе применяют пенетранты, соответствующие барьеру, через который необходимо проникнуть. Такие пенетранты общеизвестны в данной области техники.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция, представленная в настоящем документе, содержит олигонуклеотид в терапевтически

эффективном количестве. В некоторых вариантах реализации изобретения терапевтически эффективное количество является достаточным для предотвращения, облегчения или облегчения симптомов заболевания или для увеличения продолжительности жизни субъекта, подлежащего лечению. Определение терапевтически эффективного количества находится в пределах возможностей специалистов в данной области техники.

В некоторых вариантах реализации изобретения один или более модифицированных олигонуклеотидов, представленных в настоящем документе, составляют в виде пролекарства. В некоторых вариантах реализации изобретения при введении *in vivo* пролекарство химически превращается в биологически, фармацевтически или терапевтически более активную форму олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения пролекарства пригодны благодаря тому, что их проще вводить, чем соответствующую активную форму. Например, в некоторых случаях пролекарство может быть более биодоступным (например, при пероральном введении), чем соответствующая активная форма. В некоторых случаях пролекарство может обладать улучшенной растворимостью, по сравнению с соответствующей активной формой. В некоторых вариантах реализации изобретения пролекарства менее растворимы в воде, чем соответствующая активная форма. В некоторых случаях такие пролекарства обладают превосходной передачей через клеточные мембраны, при этом растворимость в воде ухудшает их подвижность. В некоторых вариантах реализации изобретения пролекарство представляет собой сложный эфир. В некоторых таких вариантах реализации изобретения сложный эфир при введении метаболически гидролизуеться до карбоновой кислоты. В некоторых случаях соединение, содержащее карбоновую кислоту, представляет собой соответствующую активную форму. В некоторых вариантах реализации изобретения пролекарство содержит короткий пептид (полиаминокислоту), связанный с кислотной группой. В некоторых таких вариантах реализации изобретения пептид расщепляется при введении с образованием соответствующей активной формы.

В некоторых вариантах реализации настоящего описания приведены композиции и способы снижения количества или активности целевой нуклеиновой кислоты в клетке. В некоторых вариантах реализации изобретения клетка находится в организме животного. В некоторых вариантах реализации изобретения животное представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах реализации изобретения животное представляет собой грызуна. В некоторых вариантах реализации изобретения животное представляет собой примата. В некоторых вариантах реализации изобретения животное представляет собой примата, не являющегося человеком. В некоторых вариантах реализации

изобретения животное представляет собой человека.

В некоторых вариантах реализации настоящего описания приведены способы введения животному фармацевтической композиции, содержащей олигонуклеотид настоящего описания. Подходящие способы введения включают, но не ограничиваются ими, пероральный, ректальный, трансмукозальный, интестинальный, энтеральный, местный, суппозитории, через ингаляции, интратекальный, интрацеребровентрикулярный, внутрибрюшинный, интраназальный, интраокулярный, внутриопухолевый и парентеральный (например, внутривенный, внутримышечный, интрамедуллярный и подкожный). В некоторых вариантах реализации изобретения вводят фармацевтические интратекальные средства для достижения местного, а не системного воздействия. Например, фармацевтические композиции могут быть введены инъекцией непосредственно в область желаемого эффекта (например, в печень).

#### Неограничивающее описание и включение посредством ссылки

Несмотря на то, что некоторые соединения, композиции и способы, описанные в настоящем документе, были подробно описаны в соответствии с некоторыми вариантами реализации изобретения, следующие примеры служат лишь для иллюстрации соединений, описанных в настоящем документе, и их не следует считать их ограничением. Каждая из ссылок, номера доступа GenBank и подобные ссылки, упоминаемые в настоящей заявке, включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Некоторые соединения, композиции и способы в настоящем документе описаны как «содержащие точно» или «содержащие только» определенное количество конкретных элементов или характеристик. Такие описания использованы для обозначения того, что, хотя соединение, композиция или способ может включать другие дополнительные элементы, количество конкретного элемента или характеристики представляет собой определенное число. Например, «конъюгат, содержащий ровно один GalNAc» представляет собой конъюгат, который содержит один и ровно один GalNAc, хотя он может содержать другие элементы, помимо указанного одного GalNAc.

Несмотря на то, что перечень последовательностей, сопровождающий этот файл, указывает каждую последовательность либо как «РНК», либо как «ДНА», по необходимости, в действительности эти последовательности могут быть модифицированы любой комбинацией химических модификаций. Специалистам в данной области техники понятно, что такое обозначение как «РНК» или «ДНК» для описания модифицированных

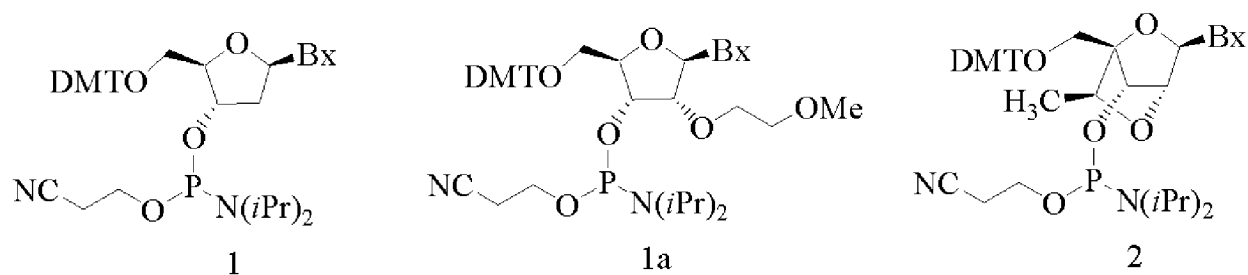
олигонуклеотидов, является в некоторых случаях произвольным. Например, олигонуклеотид, содержащий нуклеозид, содержащий 2'-ОН сахарный фрагмент и тиминовое основание, может быть описан как ДНК, имеющая модифицированный сахар (2'-ОН вместо природного 2'-Н в ДНК) или как РНК, имеющая модифицированное основание (тимин (метилованный урацил) вместо природного урацила в РНК).

Соответственно, последовательности нуклеиновых кислот, представленные в настоящем документе, включая, но не ограничиваясь ими, последовательности в перечне последовательностей, предназначены для охвата нуклеиновых кислот, содержащих любую комбинацию природных или модифицированных РНК и/или ДНК, включая, но не ограничиваясь ими, такие нуклеиновые кислоты, которые содержат модифицированные азотистые основания. В качестве дополнительного примера и без ограничения, олигонуклеотид, содержащий последовательность азотистых оснований «ATCGATCG», хватывает любые олигонуклеотиды, имеющие такую последовательность азотистых оснований, модифицированных или немодифицированных, включая, но не ограничиваясь ими, такие соединения, которые содержат РНК основания, такие как те, которые имеют последовательность «AUCGAUCG», и те, которые имеют некоторые ДНК основания и некоторые РНК основания, такие как «AUCGATCG», а также олигонуклеотиды, имеющие другие модифицированные основания, такие как «AT<sup>me</sup>CGAUCG», где <sup>me</sup>C означает цитозинное основание, содержащее метиловую группу в 5-положении.

### **ПРИМЕРЫ**

Следующие примеры иллюстрируют некоторые варианты реализации настоящего описания и не являются ограничивающими. Более того, если приведены конкретные варианты реализации, авторы изобретения подразумевают общее применение указанных конкретных вариантов реализации. Например, описание олигонуклеотида, содержащего конкретный мотив, дает обоснованное основание для дополнительных олигонуклеотидов, содержащих такой же или похожий мотив. И, например, если конкретная высокоаффинная модификация возникает в определенном положении, то в этом же положении считаются подходящими другие высокоаффинные модификации, если не указано иное.

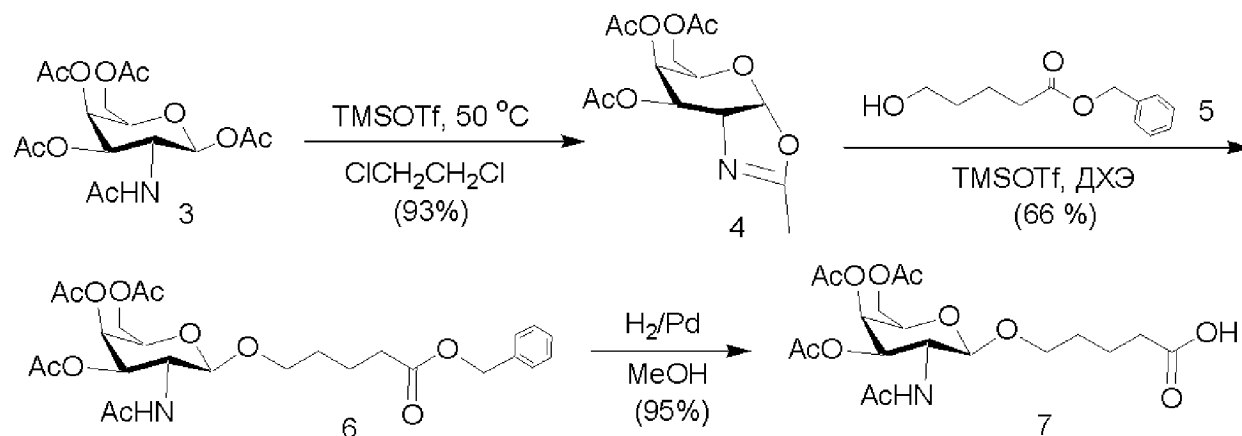
### Пример 1. Общий способ получения фосфорамидитов, Соединений 1, 1a и 2



Bx представляет собой гетероциклическое основание

Соединения 1, 1a и 2 получили по методикам, общеизвестным в данной области техники, описанным в данном описании (см. Seth et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, 21(4), 1122-1125, *J. Org. Chem.*, 2010, 75(5), 1569-1581, *Nucleic Acids Symposium Series*, 2008, 52(1), 553-554); и см. также опубликованные Международные заявки PCT (WO 2011/115818, WO 2010/077578, WO2010/036698, WO2009/143369, WO 2009/006478 и WO 2007/090071) и патент США 7569686).

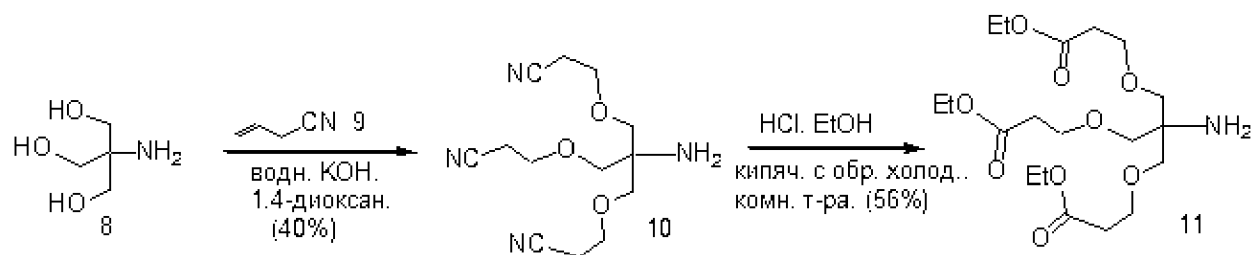
### Пример 2. Получение Соединения 7



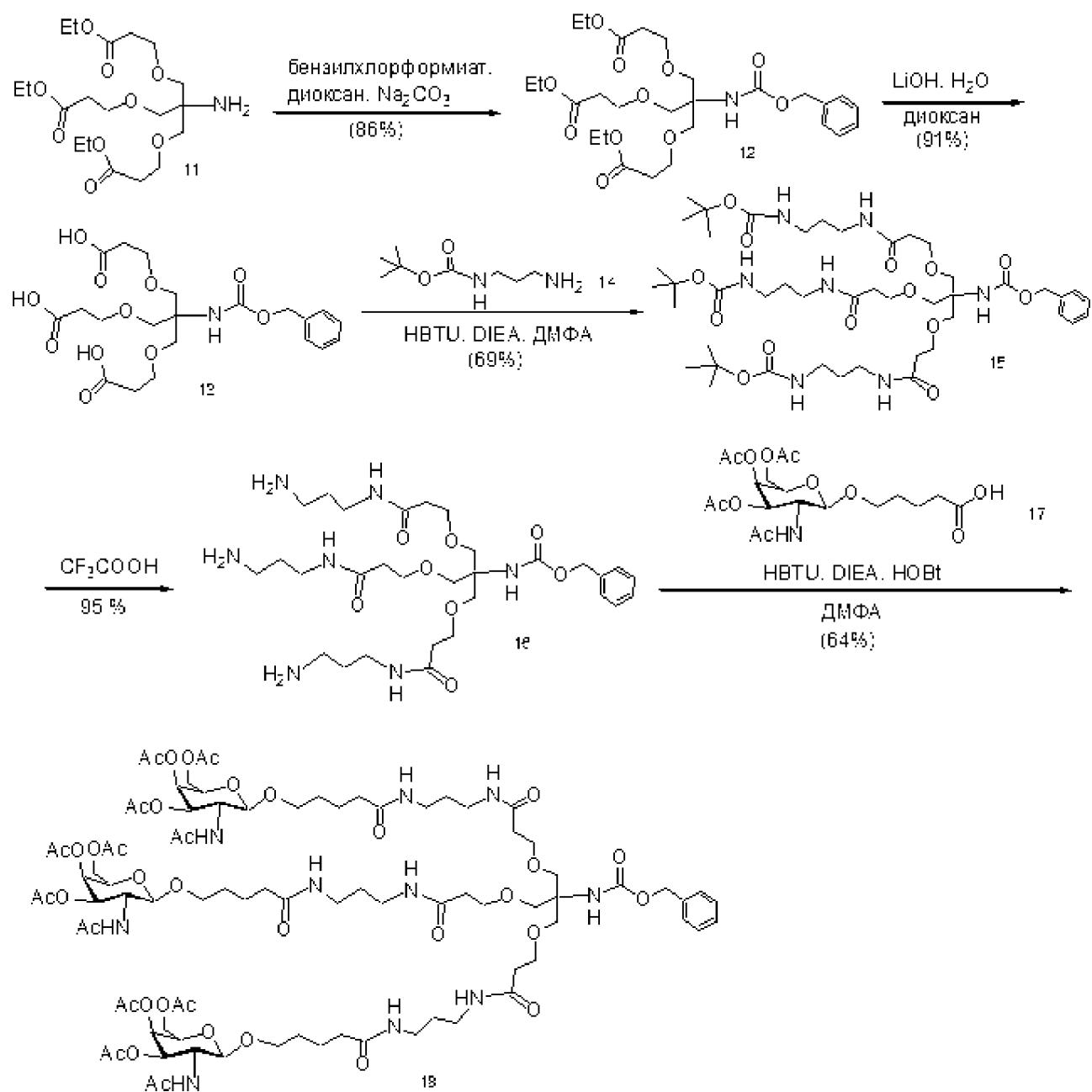
Соединение 3 (2-ацетидамо-1,3,4,6-тетра-*O*-ацетил-2-дезоксид-β-*D*-галактопираноза или галактозамина пентаацетат) имеется в продаже. Соединение 5 получили по опубликованным методикам (Weber et al., *J. Med. Chem.*, 1991, 34, 2692).



### Пример 3. Получение Соединения 11

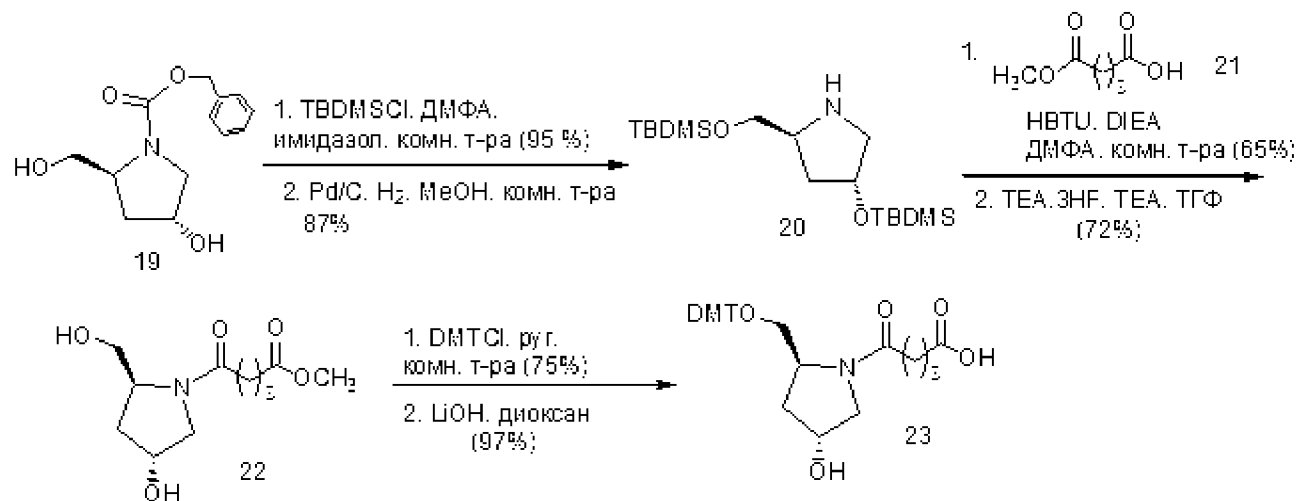


### Пример 4. Получение Соединения 18



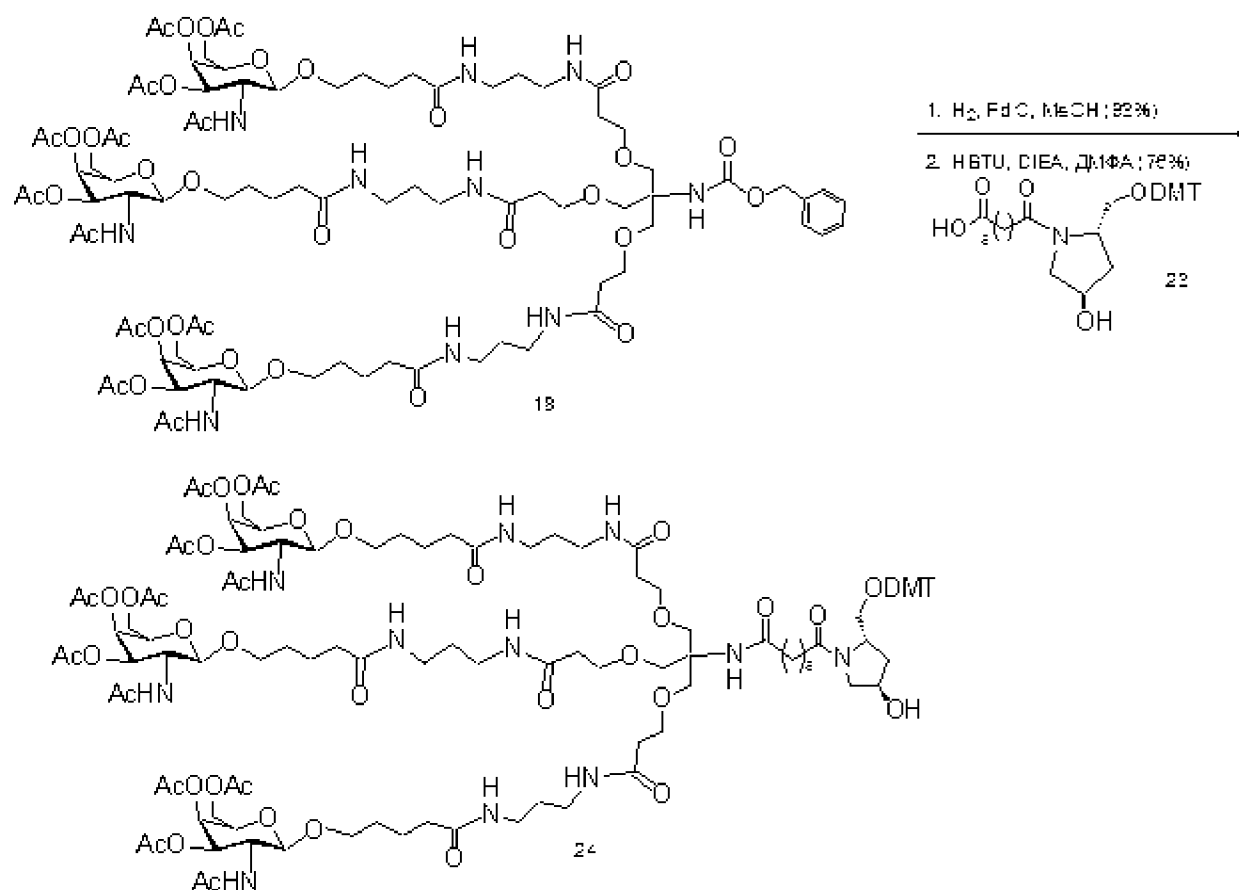
Соединение 11 получили по способам, описанным в Примере 3. Соединение 14 имеется в продаже. Соединение 17 получили по такому же способу, как описан в публикации Rensen *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2004, 47, 5798-5808.

### Пример 5. Получение Соединения 23



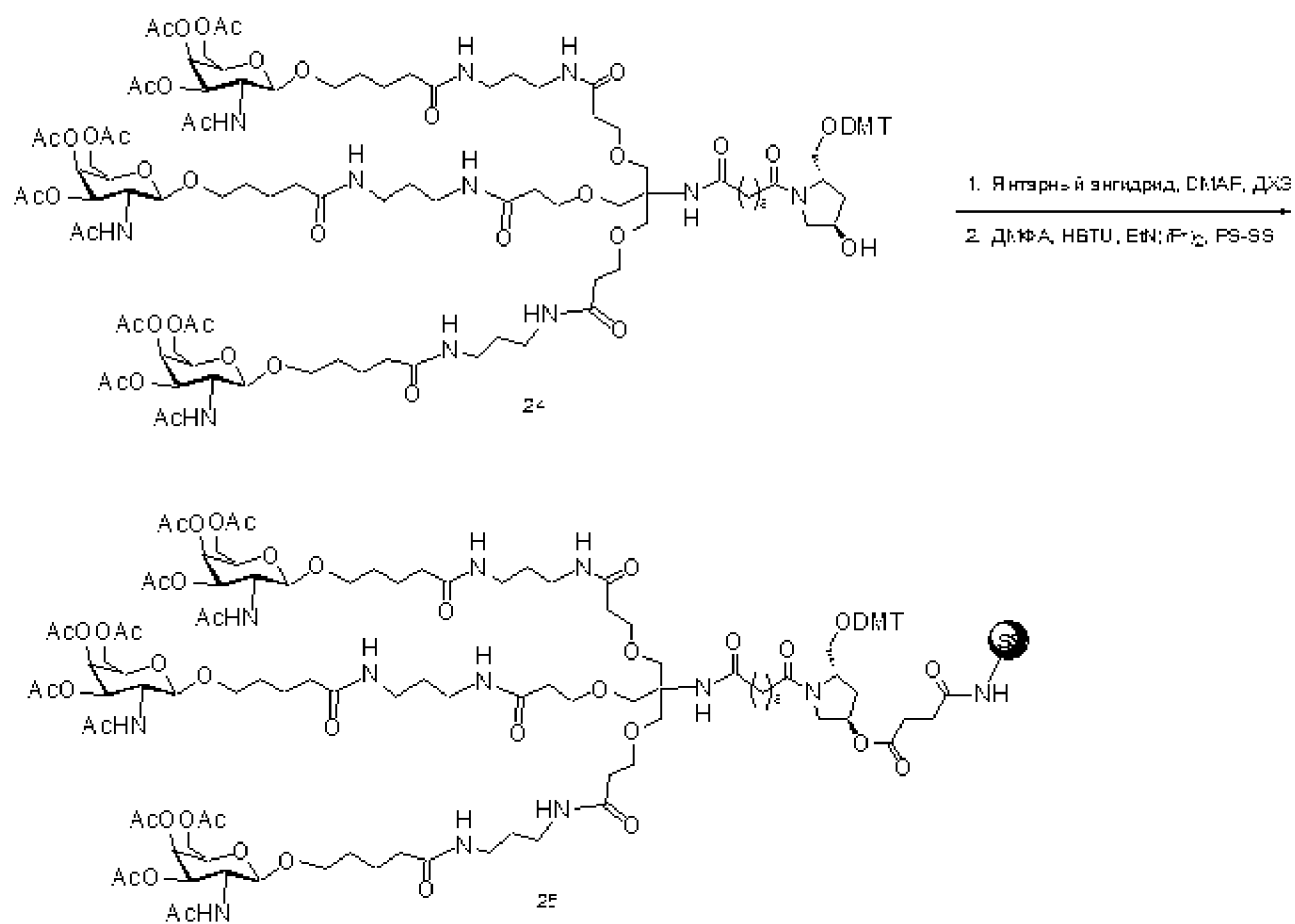
Соединения 19 и 21 имеются в продаже.

### Пример 6. Получение Соединения 24



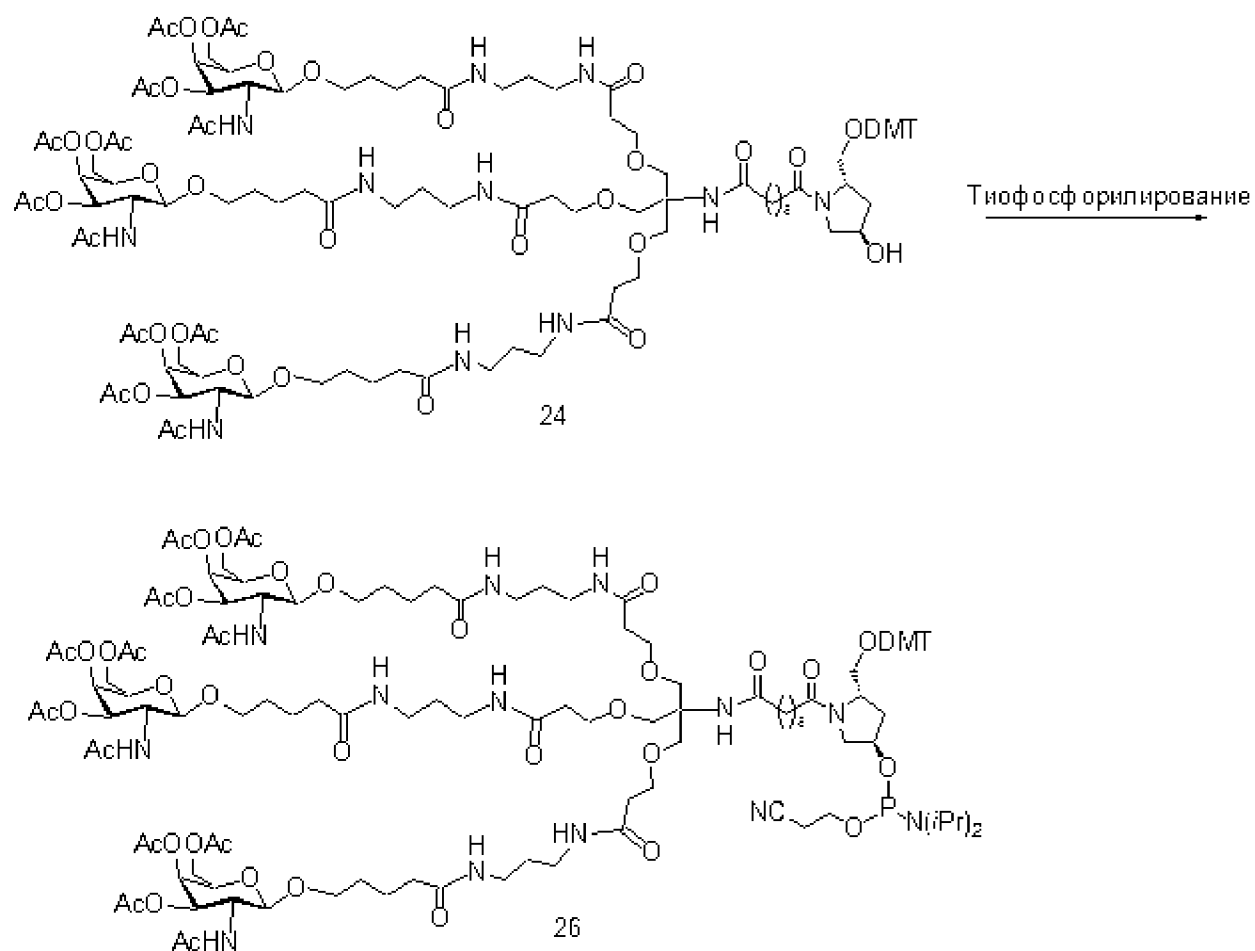
Соединения 18 и 23 получили так, как описано в способах в Примерах 4 и 5.

### Пример 7. Получение Соединения 25



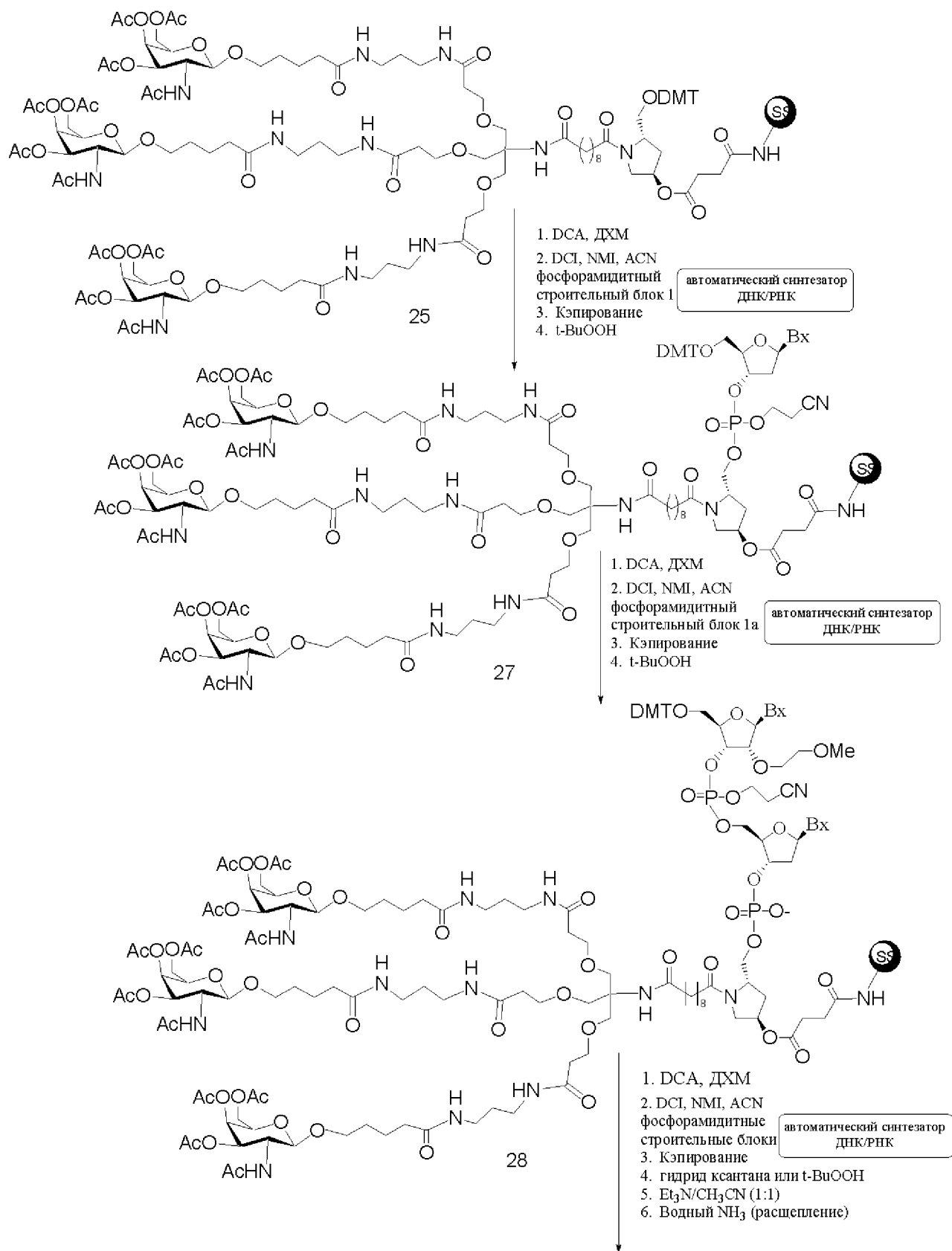
Соединение 24 получили по способам, представленным в Примере 6.

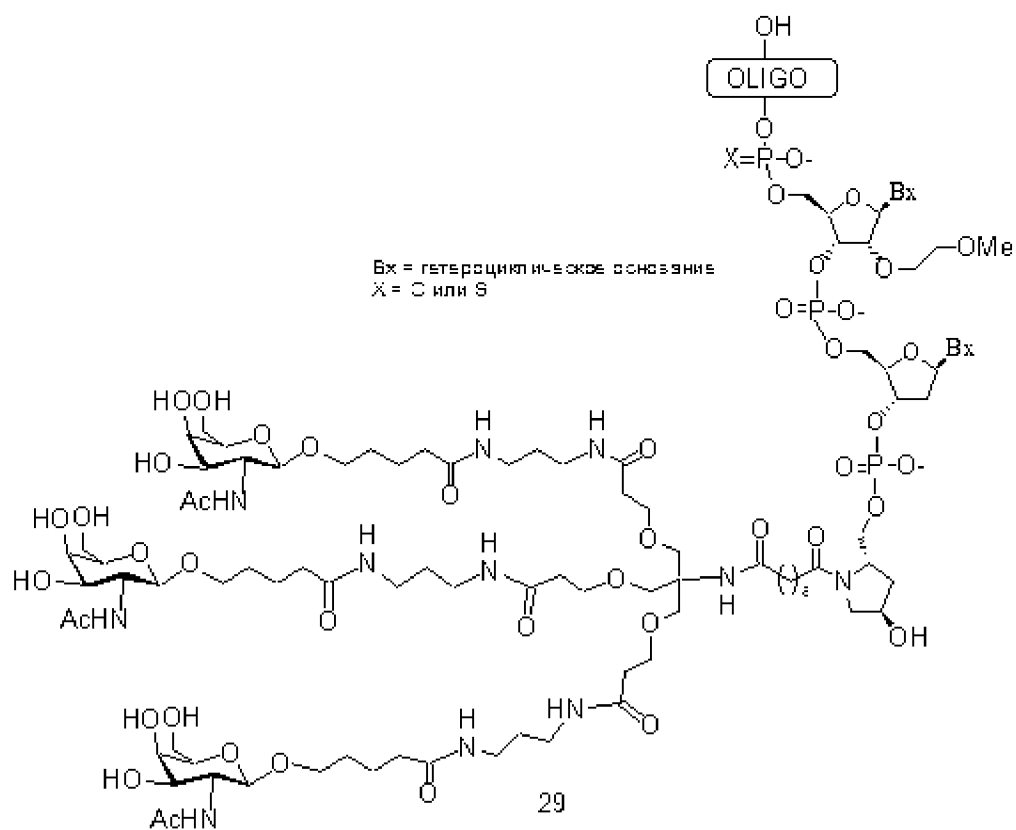
### Пример 8. Получение Соединения 26



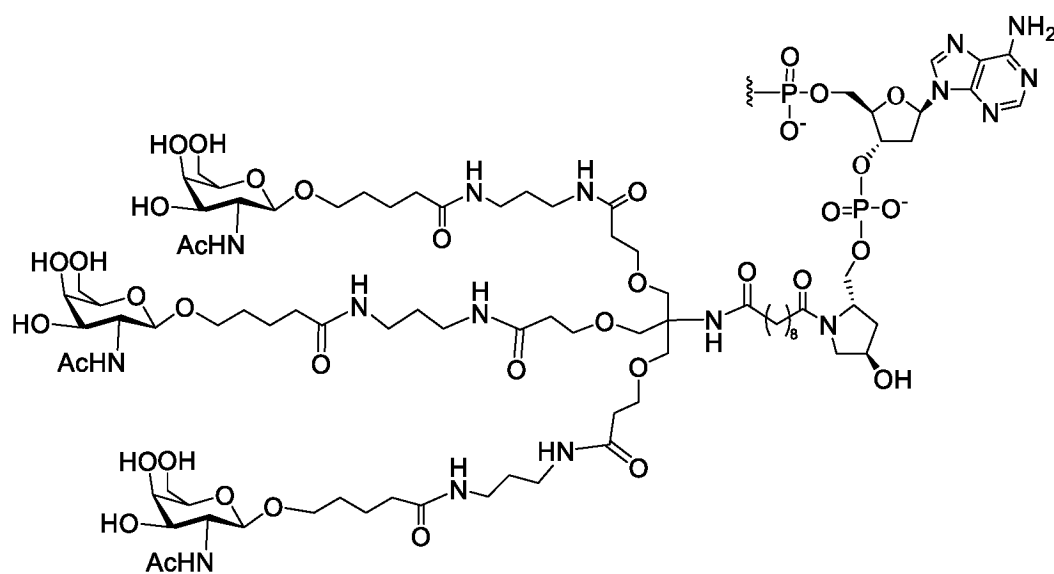
Соединение 24 получили по способам, представленным в Примере 6.

**Пример 9. Общее получение конъюгированных ASO, содержащих GalNAc3-1 на 3'-конце, Соединения 29**

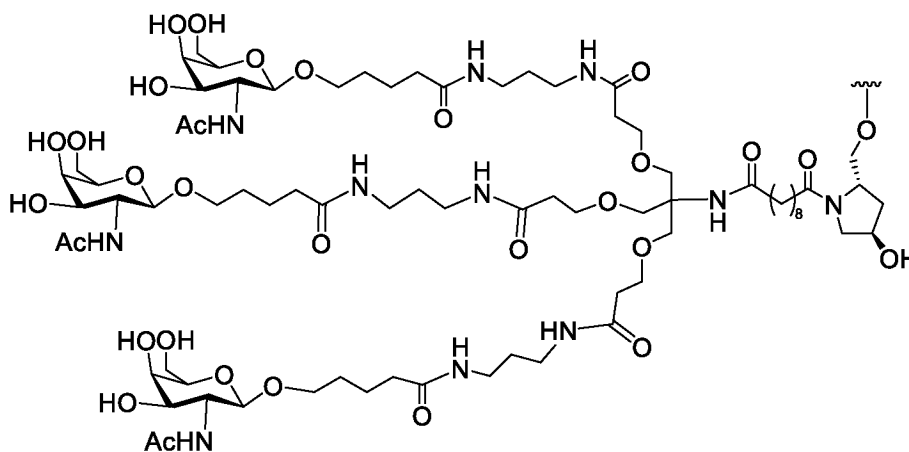




Где защищенный **GalNAc<sub>3</sub>-1** имеет структуру:



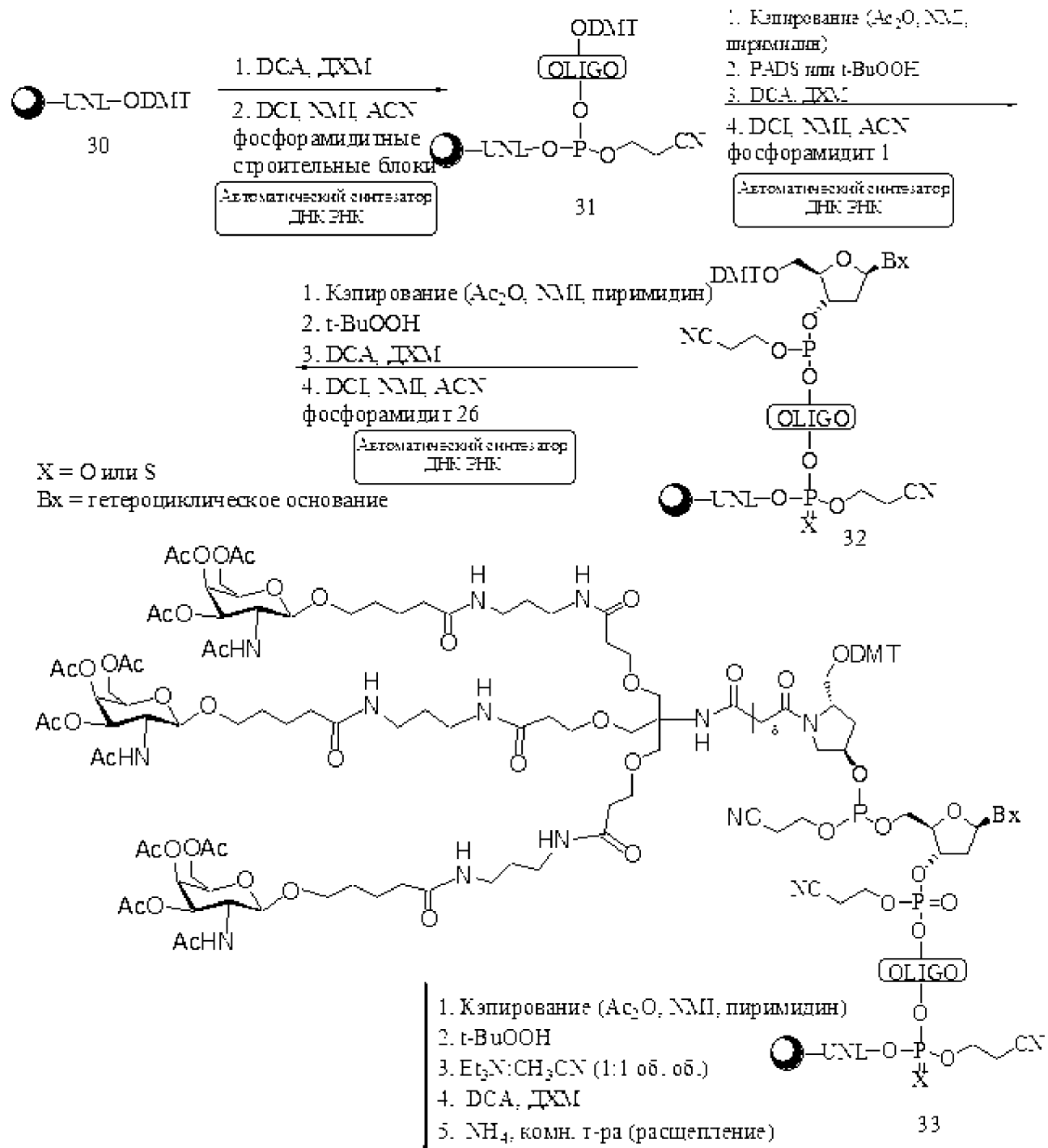
Кластерная часть GalNAc<sub>3</sub> конъюгирующей группы GalNAc<sub>3</sub>-1 (GalNAc<sub>3</sub>-1<sub>a</sub>) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных конъюгирующих групп. При этом GalNAc<sub>3</sub>-1<sub>a</sub> имеет формулу:

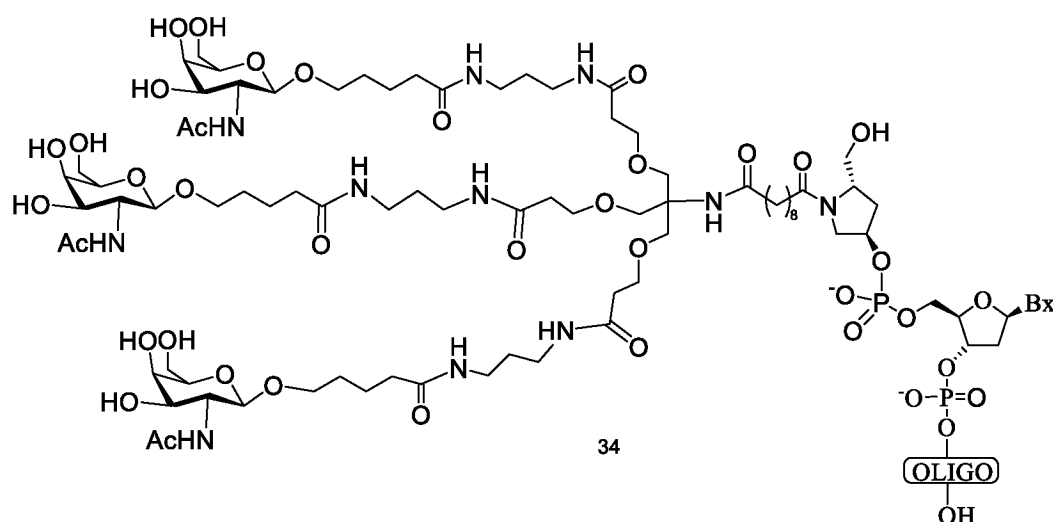


Твердую подложку, связывающую защищенный **GalNAc<sub>3</sub>-1**, Соединение 25, получили по способам, представленным в Примере 7. Олигомерное Соединение 29, содержащее **GalNAc<sub>3</sub>-1** на 3'-конце, получили по стандартным методика в автоматическом синтезаторе ДНК/РНК (см. Dupouy *et al.*, *Angew. Chem. Int. ped.*, 2006, 45, 3623-3627). Фосфорамидитные строительные блоки, Соединения 1 и 1a, получили по способам, представленным в Примере 1. Изображенные фосфорамидиты являются иллюстративными и не предназначены для ограничения, поскольку могут быть применены другие фосфорамидитные строительные блоки для получения олигомерных соединений, имеющих желаемую последовательность и состав. Порядок и количество фосфорамидитов, добавляемых к твердой подложке, может быть подобрано для получения разорванных олигомерных соединений, описанных в настоящем документе. Такие разорванные олигомерные соединения могут иметь желаемый состав и последовательность оснований, продиктованную любой данной мишенью.



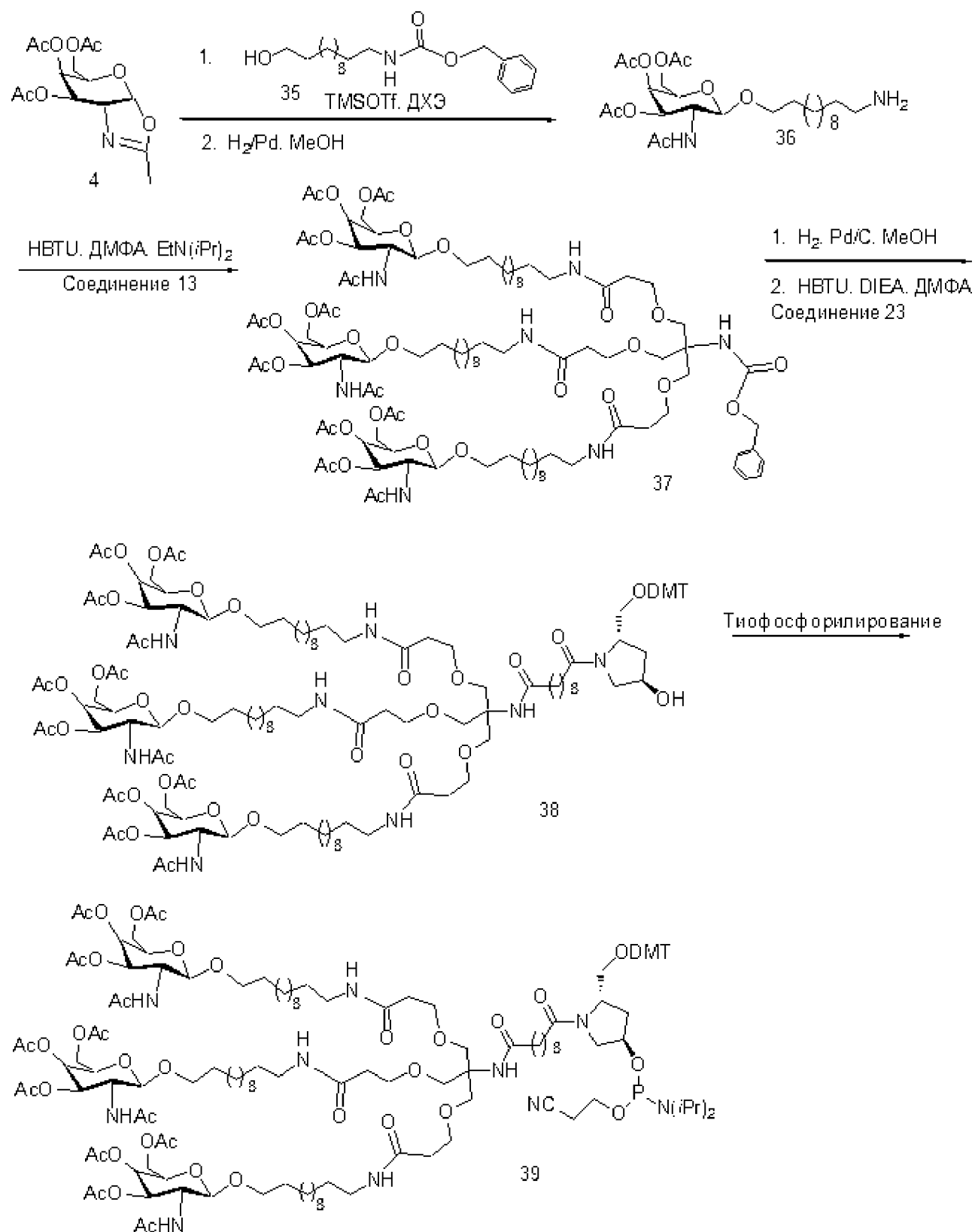
**Пример 10. Общее получение конъюгированных ASO, содержащих GalNAc<sub>3</sub>-1 на 5'-конце, Соединения 34**





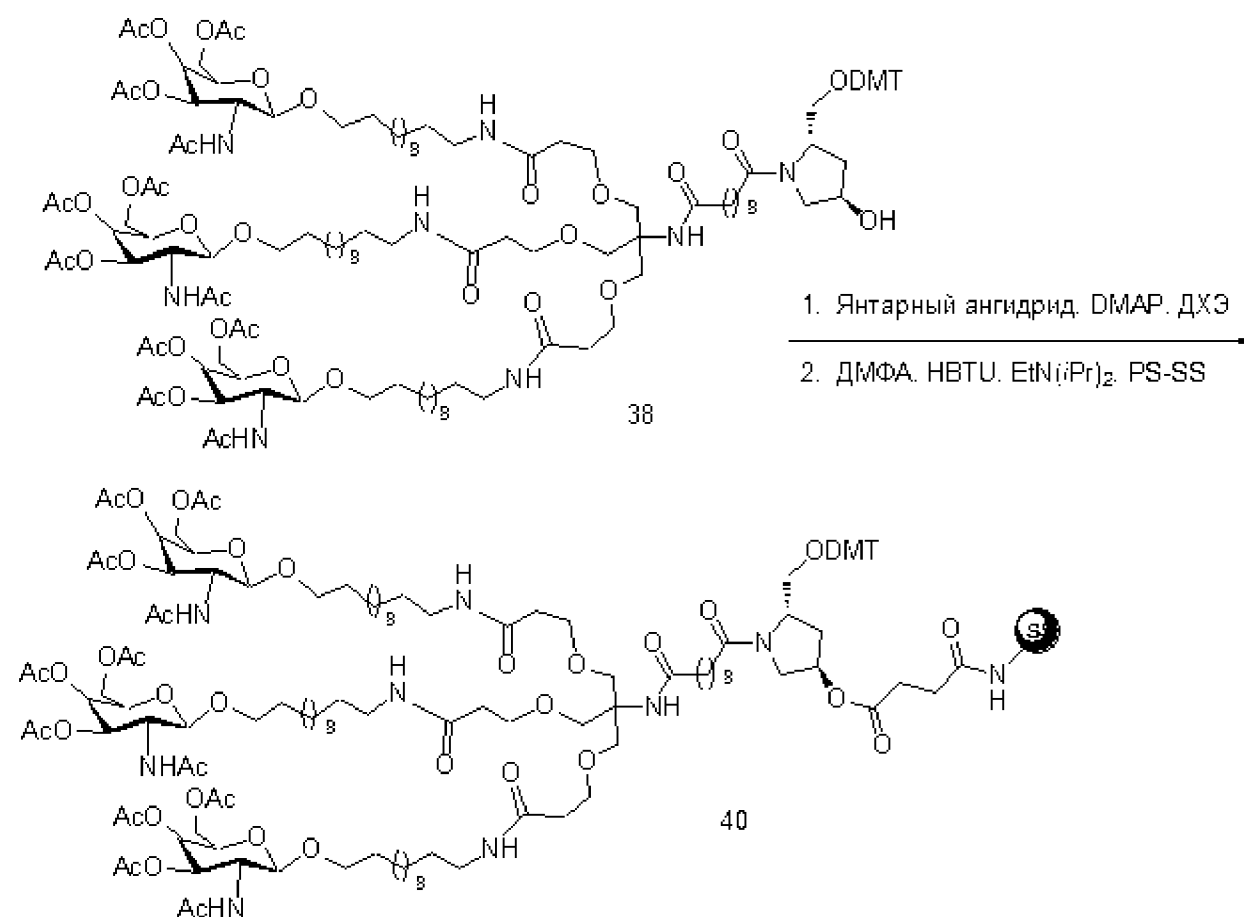
Unylinker™ 30 имеется в продаже. Олигомерное соединение 34, содержащее кластер **GalNAc3-1** на 5'-конце, получили по стандартным способам в автоматическом синтезаторе ДНК/РНК (см. Dupouy *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45, 3623-3627). Фосфорамидитные строительные блоки, Соединения 1 и 1a, получили по способам, представленным в Примере 1. Изображенные фосфорамидиты являются иллюстративными и не предназначены для ограничения, поскольку могут быть применены другие фосфорамидитные строительные блоки для получения олигомерного соединения, имеющего желаемую последовательность и состав. Порядок и количество фосфорамидитов, добавляемых к твердой подложке, может быть подобрано для получения разорванных олигомерных соединений, описанных в настоящем документе. Такие разорванные олигомерные соединения могут иметь желаемый состав и последовательность оснований, продиктованную любой данной мишенью.

### Пример 11. Получение Соединения 39



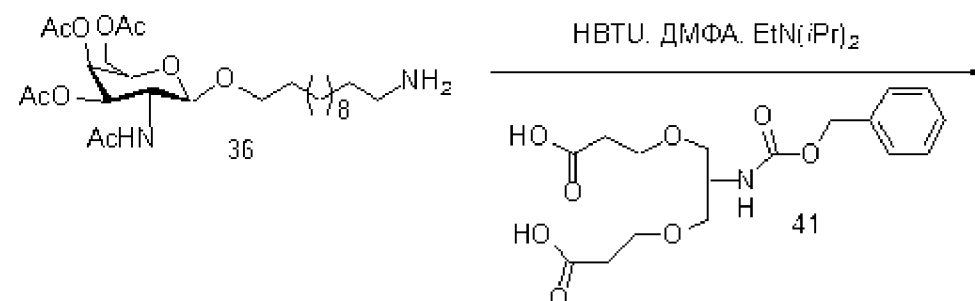
Соединения 4, 13 и 23 получили по способам, описанным в Примерах 2, 4 и 5. Соединение 35 получили по таким же способам, как описаны в публикации Rouchaud *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.*, 2011, 12, 2346-2353.

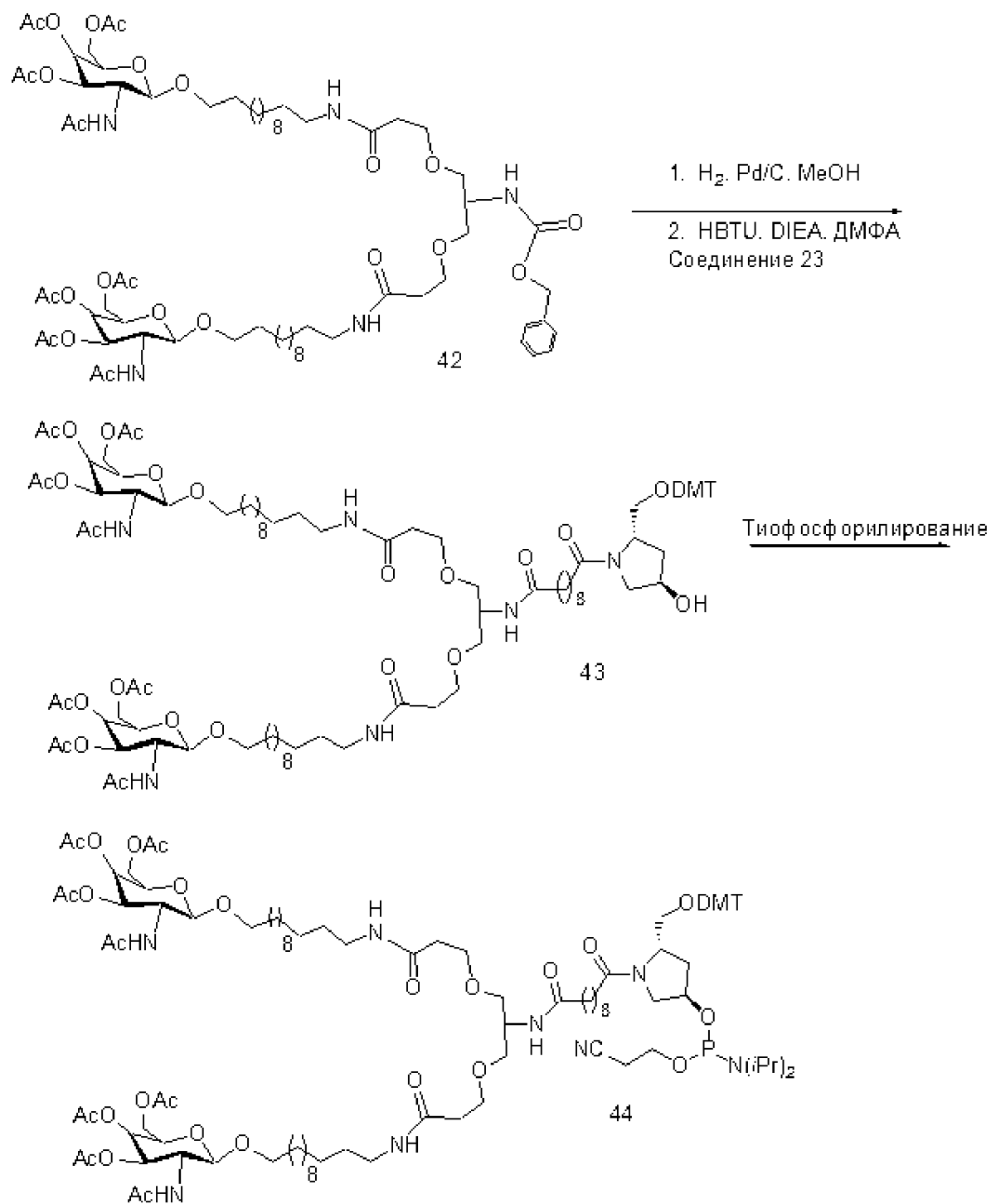
### Пример 12. Получение Соединения 40



Соединение 38 получили по способам, представленным в Примере 11.

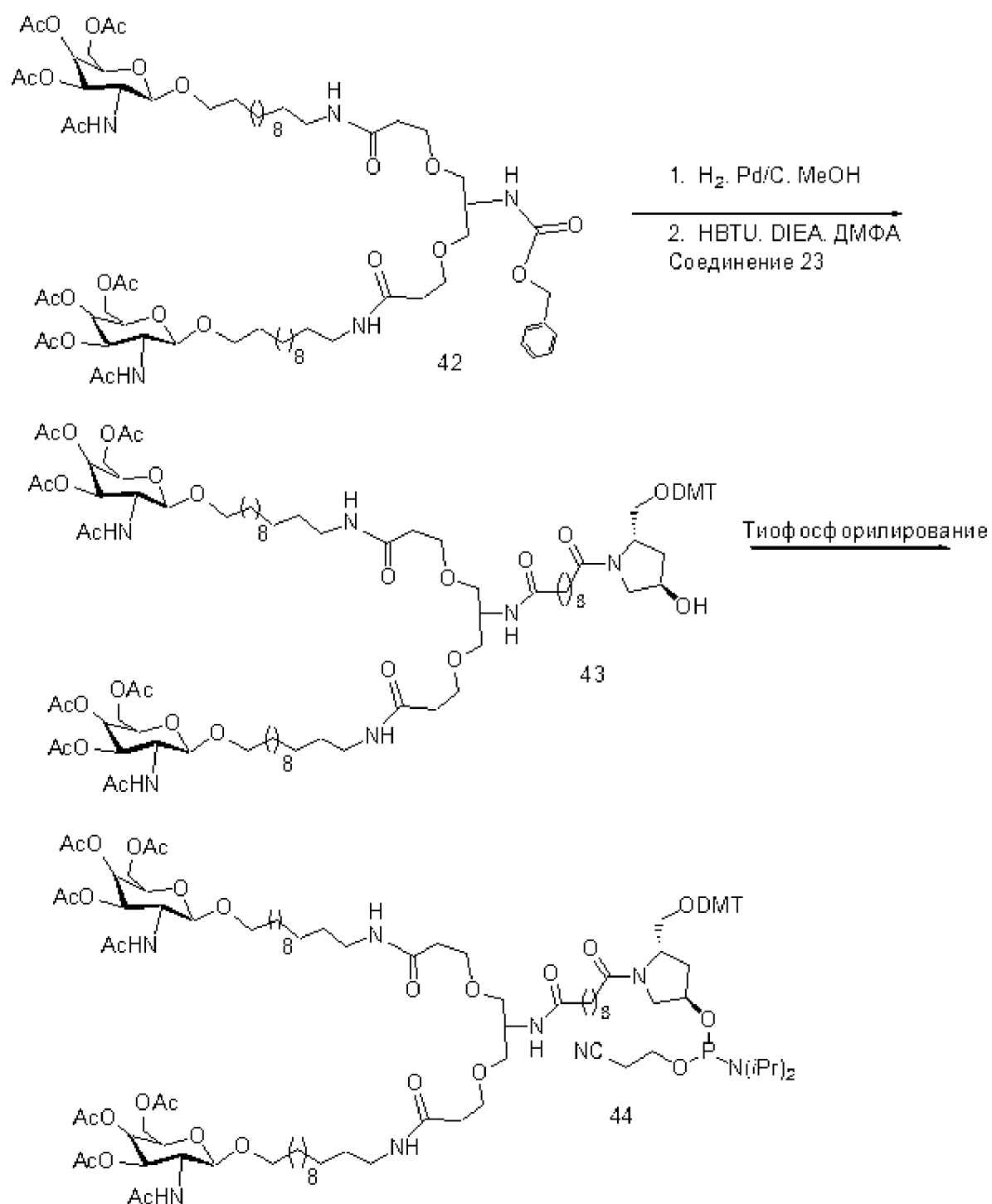
### Пример 13. Получение Соединения 44



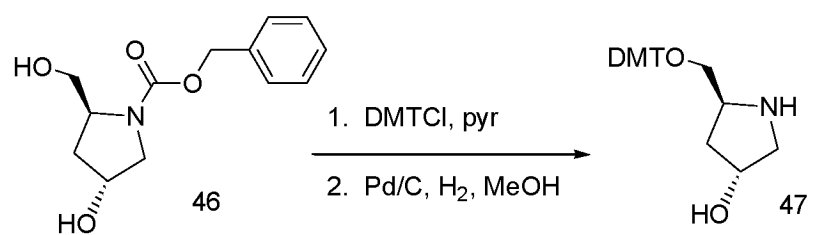


Соединения 23 и 36 получили по способам, представленным в Примерах 5 и 11. Соединение 41 получили по таким же способам, как описаны в публикации WO 2009082607.

### Пример 14. Получение Соединения 45

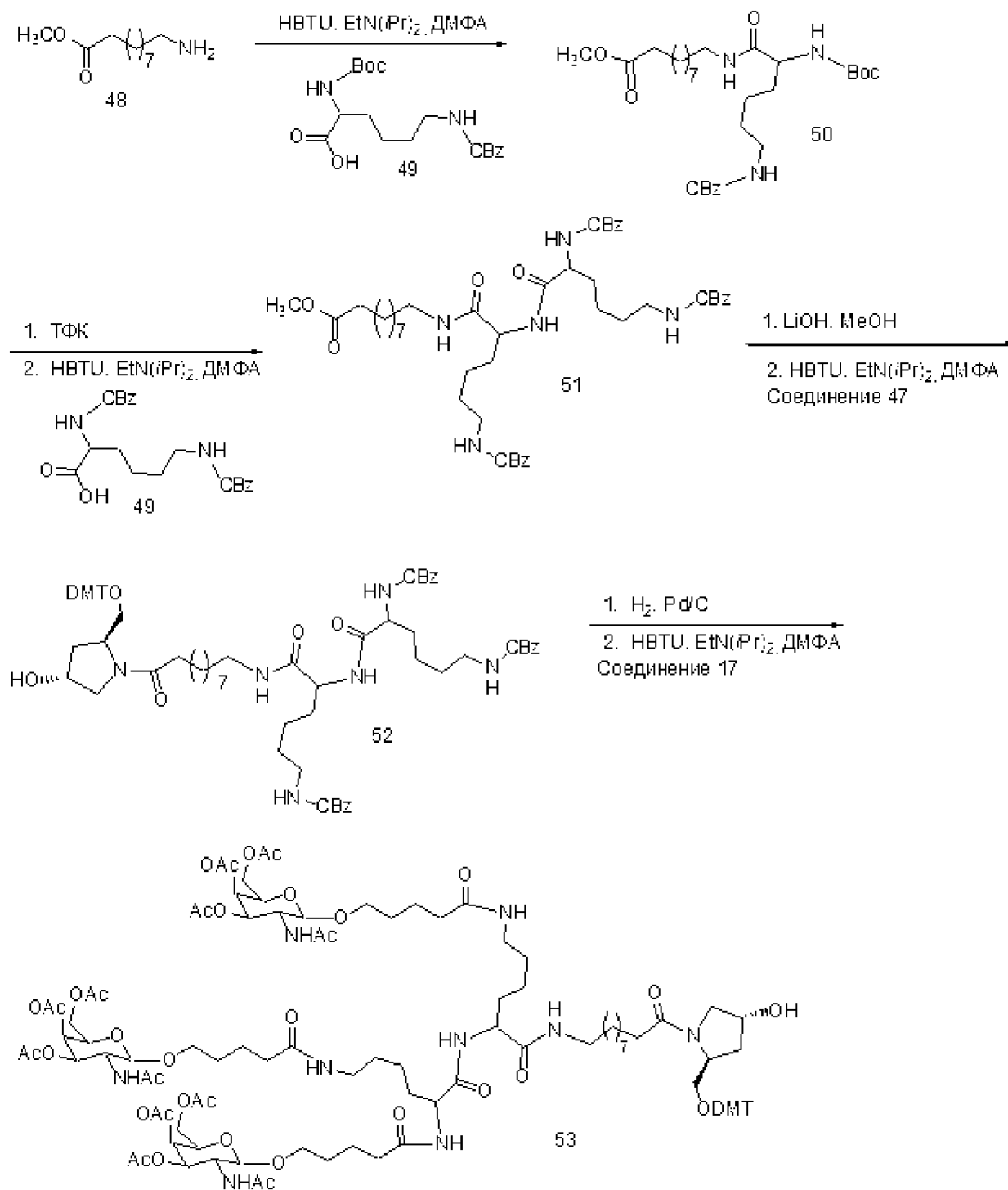


Соединение 43 получили по способам, представленным в Примере 13.

**Пример 15. Получение Соединения 47**

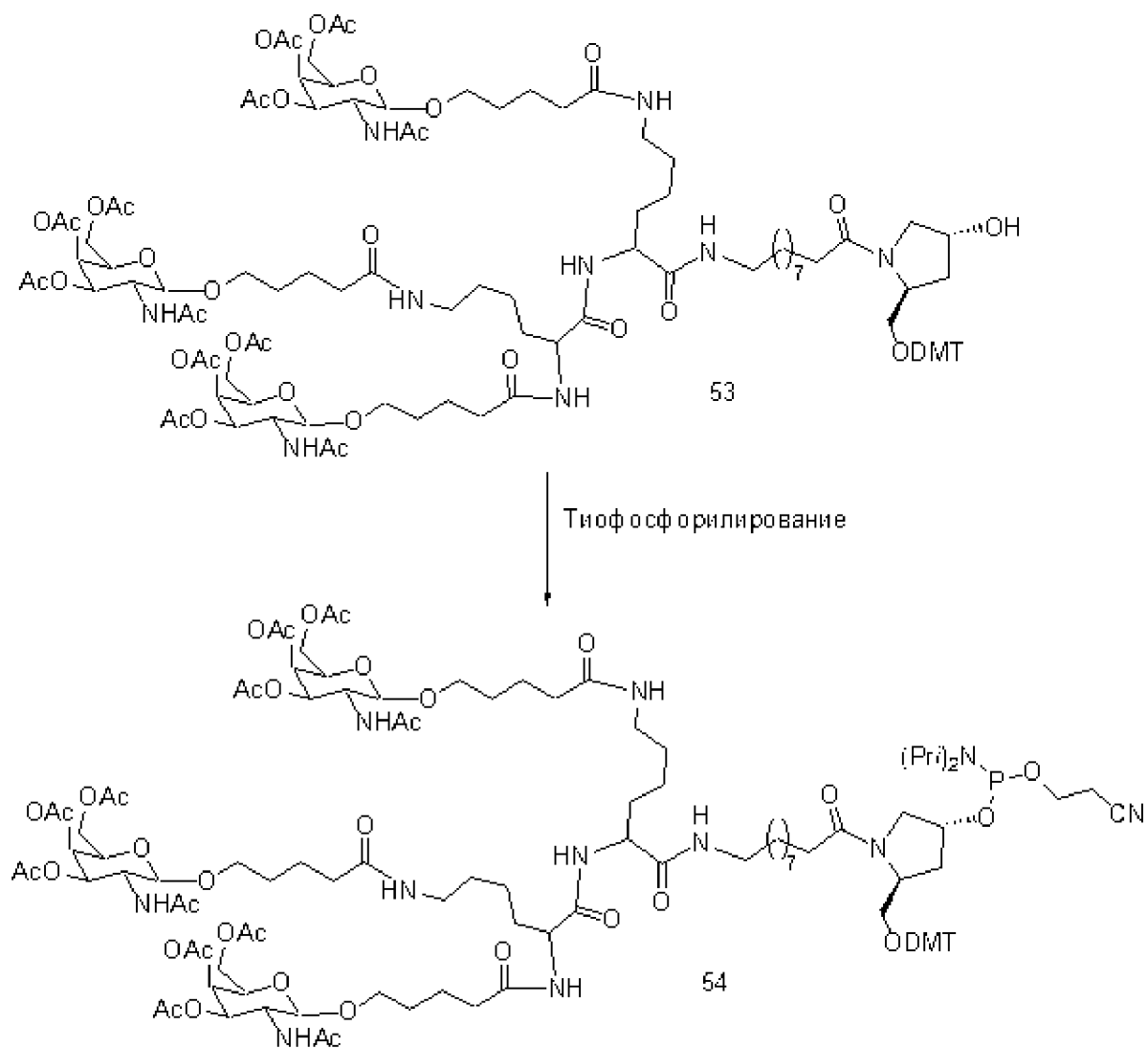
Соединение 46 имеется в продаже.

### Пример 16. Получение Соединения 53



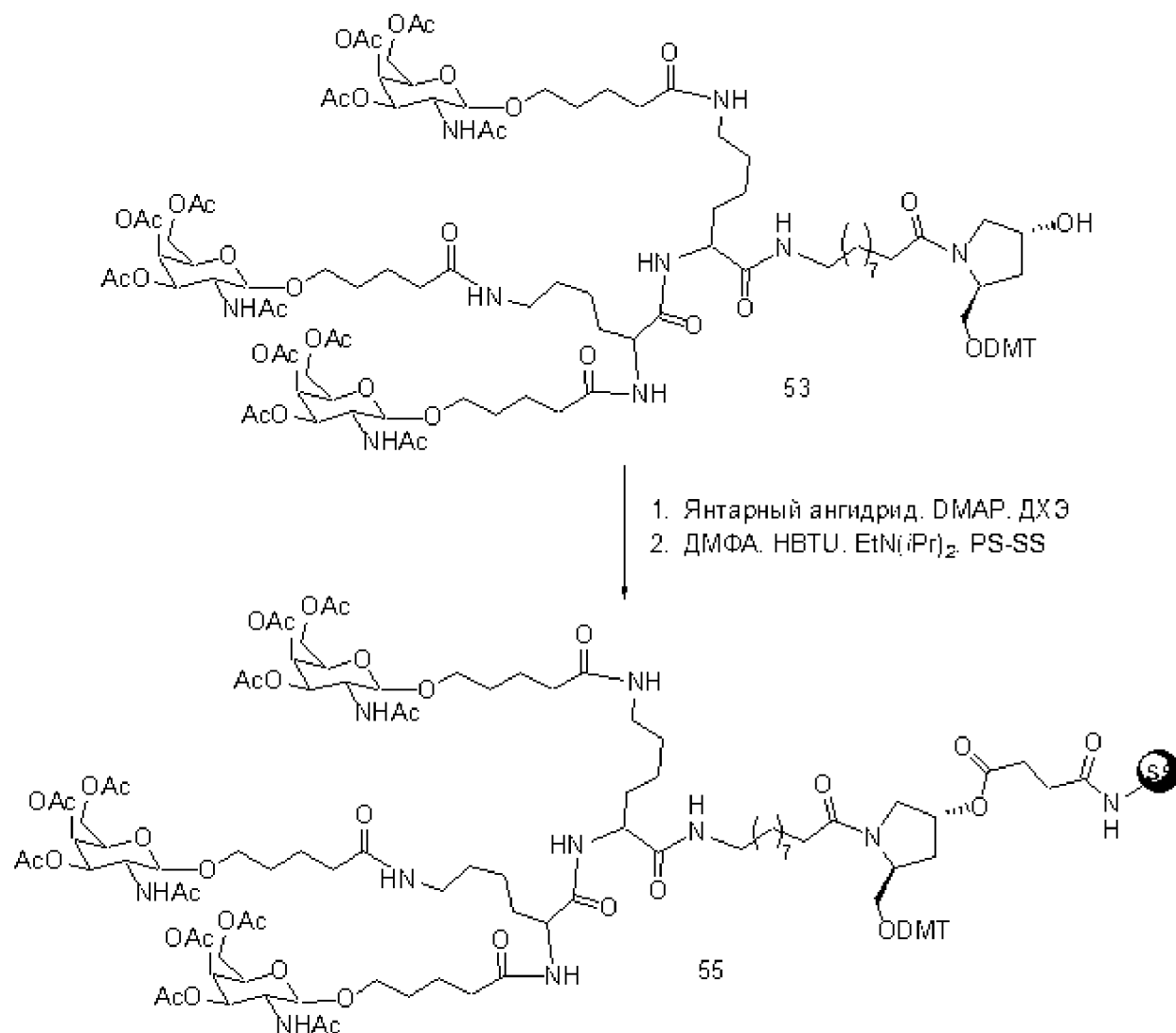
Соединения 48 и 49 имеются в продаже. Соединения 17 и 47 получили так, как описано в способах в Примерах 4 и 15.



**Пример 17. Получение Соединения 54**

Соединение 53 получили по способам, представленным в Примере 16.

### Пример 18. Получение Соединения 55



Соединение 53 получили по способам, представленным в Примере 16.

### Пример 19. Общий способ получения конъюгированных ASO, содержащих GalNAc<sub>3</sub>-1 в 3'-положении, при помощи твердофазных методик (получение ISIS 647535, 647536 и 651900)

Если не указано иное, все реагенты и растворы, применяемые для синтеза олигомерных соединений, приобретены у коммерческих поставщиков. Стандартные фосфорамидитные строительные блоки и твердую подложку применили для внедрения нуклеозидных остатков, которые включают, например, остатки T, A, G и <sup>m</sup>C. 0,1 М раствор фосфорамидита в безводном ацетонитриле применили для β-D-2'-дезоксирибонуклеозида и 2'-МОЕ.

Синтез антисмысловых олигонуклеотидов (ASO) выполнили на синтезаторе ABI 394 (в масштабе 1-2 мкмоль) или на синтезаторе АКТА Oligopilot производства GE Healthcare Bioscience (в масштабе 40-200 мкмоль) по способу фосфорамидитного связывания на твердой подложке VIMAD, наполненной **GalNAc3-1** (110 мкмоль/г, Guzaev *et al.*, 2003), упакованной в колонку. Для стадии связывания фосфорамидиты вводили в 4-кратном избытке по сравнению с загрузкой на твердой подложке, а конденсацию фосфорамидита выполняли в течение 10 минут. Все остальные стадии выполняли по протоколам, предоставленным производителем. Для удаления диметокситритильной (DMT) группы с 5'-гидроксильной группы нуклеотида применили 6% раствор дихлоруксусной кислоты в толуоле. На стадии связывания в качестве активатора применили 4,5-дицианоимидазол (0,7 М) в безводном CH<sub>3</sub>CN. Тиофосфатные связи внедряли сульфированием при помощи 0,1 М раствора гидрида ксантана в 1:1 смеси пиридина/CH<sub>3</sub>CN в течение 3 минут времени контакта. В качестве окислительного агента для обеспечения фосфодиэфирных межнуклеозидных связей применили 20% раствор *трет*-бутилгидропероксида в CH<sub>3</sub>CN, содержащий 6% воды, в течение 12 минут времени контакта.

После сборки желаемой последовательности цианозтил-фосфатные защитные группы снимали при помощи 1:1 (об./об.) смеси триэтиламина и ацетонитрила в течение 45 минут времени контакта. Связанные с твердой подложкой ASO суспендировали в водном растворе аммиака (28-30 масс. %) и нагревали при 55 °С в течение 6 часов.

Затем отфильтровывали не связанные ASO и выпаривали аммиак кипячением. Остаток очищали жидкостной хроматографией высокого давления на сильной анионообменной колонке (GE Healthcare Bioscience, Source 30Q, 30 мкм, 2,54 x 8 см, А = 100 мМ ацетата аммония в 30% водном CH<sub>3</sub>CN, В = 1,5 М NaBr в А, 0-40% В за 60 мин., скорость потока 14 мл.мин<sup>-1</sup>, λ = 260 нм). Остаток обессоливали при помощи ВЭЖХ на обращенно-фазовой колонке с получением желаемых ASO с выделенным выходом 15-30% относительно первоначальной загрузки на твердую подложку. ASO характеризовали при помощи ион-парной ВЭЖХ, совмещенной с МС-анализом на системе Agilent 1100 MSD.

Антисмысловые олигонуклеотиды, не содержащие конъюгат, синтезировали по стандартным способам синтеза олигонуклеотидов, общеизвестным в данной области техники.

Применяя эти способы, получили три отдельных антисмысловых соединения, нацеленных на АроС III. Как показано ниже в Таблице 4, каждое из трех антисмысловых соединений, нацеленных на АроС III, имеет одну и ту же последовательность азотистых

оснований. ISIS 304801 представляет собой 5-10-5 МОЕ гэдмер, содержащий только тиофосфатные связи; ISIS 647535 является таким же, как ISIS 304801, за исключением того, что он содержит **GalNAc3-1**, конъюгированный у его 3'-конца; и ISIS 647536 является таким же, как ISIS 647535, за исключением того, что некоторые межнуклеозидные связи этого соединения представляют собой фосфодиэфирные связи. Как дополнительно показано в Таблице 4, были синтезированы два отдельных бессмысленных соединения, нацеленных на SRB-1. ISIS 440762 представляет собой 2-10-2 сEt гэдмер, содержащий только тиофосфатные межнуклеозидные связи; ISIS 651900 является таким же, как ISIS 440762, за исключением того, что он содержит **GalNAc3-1** у его 3'-конца.

**Таблица 4**  
**Модифицированные ASO, нацеленные на ApoC III и SRB-1**

ASO	Последовательность (от 5' к 3')	Мишень	Расчетная масса	Наблюдаемая масса
ISIS 4801	$A_{es}G_{es}^mC_{es}T_{es}T_{es}^mC_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}A_{ds}G_{ds}^mC_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_e$	ApoC III	7165,4	7164,4
ISIS 7535	$A_{es}G_{es}^mC_{es}T_{es}T_{es}^mC_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}A_{ds}G_{ds}^mC_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{eo}A_{do}'-$ <b>GalNAc3-1a</b>	ApoC III	9239,5	9237,8
ISIS 7536	$A_{es}G_{eo}^mC_{eo}T_{eo}T_{eo}^mC_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}A_{ds}G_{ds}^mC_{ds}T_{eo}T_{eo}T_{es}A_{es}T_{eo}A_{do}'-$ <b>GalNAc3-1a</b>	ApoC III	9142,9	9140,8
ISIS 0762	$T_{ks}^mC_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}^mC_{ds}T_{ds}T_{ks}^mC_k$	SRB-1	4647,0	4646,4
ISIS 1900	$T_{ks}^mC_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}^mC_{ds}T_{ds}T_{ks}^mC_{ko}A_{do}'-$ <b>GalNAc3-1a</b>	SRB-1	6721,1	6719,4

Нижние индексы: «e» означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид; «d» означает β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; «k» означает 6'-(S)-CH<sub>3</sub> бициклический нуклеозид (например, сEt); «s» означает тиофосфатные межнуклеозидные связи (PS); «o» означает фосфодиэфирные межнуклеозидные связи (PO); и «o'» означает -O-P(=O)(OH)-. Верхний индекс «m» означает 5-метилцитозины. «GalNAc3-1» означает конъюгирующую группу, имеющую структуру, изображенную ранее в Примере 9. Следует отметить, что **GalNAc3-1** содержит расщепляемый аденозин, который связывает ASO с остальной частью конъюгата, который обозначен как «GalNAc3-1a». Номенклатура, используемая в представленной выше таблице, показывает полную последовательность азотистых оснований, включая аденозин, который является частью конъюгата. Следовательно, в представленной выше таблице последовательности также могут быть перечислены с окончанием «GalNAc3-1»,

без «A<sub>10</sub>». Такое условное применение нижнего индекса «a» для обозначения части конъюгирующие группы, не содержащей расщепляемого нуклеозида или расщепляемого фрагмента, применяется во всех представленных Примерах. Эта часть конъюгирующие группы, не содержащая расщепляемого фрагмента, упоминается в настоящем документе как «кластер» или «кластер конъюгата» или «кластер GalNAc<sub>3</sub>». В некоторых случаях конъюгирующая группа для удобства описана путем отдельного представления ее кластера и ее расщепляемого фрагмента.

### **Пример 20. Дозозависимое антисмысловое ингибирование человеческого ApoC III у huApoC III трансгенных мышей**

ISIS 304801 и ISIS 647535, каждый из которых нацелен на человеческий ApoC III и описан выше, отдельно испытывали и оценивали в дозозависимом исследовании на их способность ингибировать человеческий ApoC III у трансгенных мышей с человеческим ApoC III.

#### *Лечение*

Трансгенных мышей с человеческим ApoCIII выдерживали при 12-часовом цикле освещения/темноты и обеспечивали свободный доступ к пище Teklad lab. До начала эксперимента животных акклиматизировали по меньшей мере в течение 7 дней в исследовательской лаборатории. Приготовили ASO в PBS и стерилизовали фильтрованием через фильтр 0,2 микрона. ASO растворили в 0,9% PBS для инъекций.

Трансгенным мышам с человеческим ApoC III один раз в неделю в течение двух недель внутрибрюшинно вводили инъекции ISIS 304801 или 647535 при 0,08, 0,25, 0,75, 2,25 или 6,75 мкмоль/кг или PBS в качестве контрольного образца. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Через сорок восемь часов после введения последней дозы каждую мышь обескровили и умертвили, и собрали ткани.

#### *Анализ мРНК ApoC III*

Уровни мРНК ApoC III в печени мышей определили при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Уровни мРНК ApoC III определяли относительно общей РНК (при помощи Ribogreen), затем нормализовали к контрольному образцу, обработанному PBS. Результаты, показанные ниже, представлены

как средний процент уровней мРНК ApoC III для каждой экспериментальной группы, нормализованных к контрольному образцу, обработанному PBS, и обозначены как «% PBS». Ниже в Таблице 5 представлена также полумаксимальная эффективная доза (ED<sub>50</sub>) для каждого ASO.

Показано, что оба антисмысловых соединения снижают РНК ApoC III, по сравнению с контрольным образцом, обработанным PBS. Кроме того, антисмысловое соединение, конъюгированное с **GalNAc3-1** (ISIS 647535), было значительно более эффективным, чем антисмысловое соединение, не содержащее конъюгат **GalNAc3-1** (ISIS 304801).

**Таблица 5**  
**Влияние ASO лечения на уровни мРНК ApoC III у трансгенных мышей с человеческим ApoC III**

ASO	Доза (мкмоль/кг)	% PBS	ED <sub>50</sub> (мкмоль/кг)	3'-конъюгат	Межнуклеозидная связь/длина	SEQ ID NO.
PBS	0	100	--	-	--	
ISIS 304801	0,08	95	0,77	Нет	PS/20	20
	0,75	42				
	2,25	32				
	6,75	19				
ISIS 647535	0,08	50	0,074	<b>GalNAc3-1</b>	PS/20	21
	0,75	15				
	2,25	17				
	6,75	8				

*Анализ белка ApoC III (турбидиметрический анализ)*

Анализ белка ApoC III в плазме выполнили по способам, описанным в работе *Graham et al, Circulation Research*, до печати, опубликованной онлайн 29 марта 2013 года.

Около 100 мкл плазмы, выделенной из мышей, анализировали без разбавления, применяя клинический анализатор Olympus и имеющийся в продаже турбидиметрический аналитический набор ApoC III (Kamiya, кат. № KAI-006, Kamiya Biomedical, Сизтл, штат Вашингтон). Протокол анализа выполняли по описанию поставщика.

Как показано ниже в Таблице 6, оба антисмысловых соединения снижают белок ApoC III, по сравнению с PBS контрольным образцом. Кроме того, антисмысловое соединение, конъюгированное с **GalNAc3-1** (ISIS 647535), было значительно более эффективным, чем антисмысловое соединение, не содержащее конъюгат **GalNAc3-1** (ISIS 304801).

Таблица 6

**Влияние ASO лечения на уровни белка ApoC III в плазме у трансгенных мышей с человеческим ApoC III**

ASO	Доза (мкмоль/кг)	% PBS	ED <sub>50</sub> (мкмоль/кг)	3'- конъюгат	Межнуклеозидная связь/длина	SEQ ID NO.
PBS	0	100	--	--	--	
ISIS 304801	0,08	86	0,73	Нет	PS/20	20
	0,75	51				
	2,25	23				
	6,75	13				
ISIS 647535	0,08	72	0,19	<b>GalNAc3-1</b>	PS/20	21
	0,75	14				
	2,25	12				
	6,75	11				

Триглицериды и холестерин плазмы выделили по способу Bligh и Dyer (Bligh, E.G. and Dyer, W.J. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917, 1959) (Bligh, E and Dyer, W, *Can J Biochem Physiol*, 37, 911-917, 1959) (Bligh, E and Dyer, W, *Can J Biochem Physiol*, 37, 911-917, 1959) и измерили при помощи клинического анализатора Beckmann Coulter и имеющихся в продаже реагентов.

Уровни триглицеридов измерили относительно мышей, инъецированных PBS, и выразили как «% PBS». Результаты представлены в Таблице 7. Показано, что оба антисмысловых соединения снижают уровни триглицеридов. Кроме того, антисмысловое соединение, конъюгированное с **GalNAc3-1** (ISIS 647535), было значительно более эффективным, чем антисмысловое соединение, не содержащее конъюгат **GalNAc3-1** (ISIS 304801).

Таблица 7

## Влияние ASO лечения на уровни триглицеридов у трансгенных мышей

ASO	Доза (мкмоль/кг)	% PBS	ED <sub>50</sub> (мкмоль/кг)	3'- конъюгат	Межнуклеозидная связь/длина	SEQ ID NO.
PBS	0	100	--	--	--	
ISIS 304801	0,08	87	0,63	Нет	PS/20	20
	0,75	46				
	2,25	21				
	6,75	12				
ISIS 647535	0,08	65	0,13	GalNAc3- 1	PS/20	21
	0,75	9				
	2,25	8				
	6,75	9				

Образцы плазмы анализировали при помощи ВЭЖХ для определения количества общего холестерина и различных фракций холестерина (HDL и LDL). Результаты представлены в Таблицах 8 и 9. Показано, что оба антисмысловых соединения снижают общие уровни холестерина; оба снижают LDL; и оба повышают HDL. Кроме того, антисмысловое соединение, конъюгированное с **GalNAc3-1** (ISIS 647535), было значительно более эффективным, чем антисмысловое соединение, не содержащее конъюгат **GalNAc3-1** (ISIS 304801). Увеличение уровней HDL и снижение уровней LDL представляет собой благоприятный сердечно-сосудистый эффект антисмыслового ингибирования ApoC III.

Таблица 8

## Влияние ASO лечения на уровни общего холестерина у трансгенных мышей

ASO	Доза (мкмоль/кг)	Общий холестерин (мг/дл)	3'- конъюгат	Межнуклеозидная связь/длина	SEQ ID NO.
PBS	0	257	--	--	



ISIS 304801	0,08	226	Нет	PS/20	20
	0,75	164			
	2,25	110			
	6,75	82			
ISIS 647535	0,08	230	GalNAc3- 1	PS/20	21
	0,75	82			
	2,25	86			
	6,75	99			

Таблица 9

Влияние ASO лечения на уровни HDL и LDL холестерина у трансгенных мышей

ASO	Доза (мкмоль/кг)	HDL (мг/дл)	LDL (мг/дл)	3'- конъюгат	Межнуклеозидная связь/длина	SEQ ID NO.
PBS	0	17	28	--	--	
ISIS 304801	0,08	17	23	Нет	PS/20	32
	0,75	27	12			
	2,25	50	4			
	6,75	45	2			
ISIS 647535	0,08	21	21	GalNAc3- 1	PS/20	111
	0,75	44	2			
	2,25	50	2			
	6,75	58	2			

#### Фармакокинетический анализ (ФК)

Оценили также ФК ASO. Образцы печени и почек измельчили и экстрагировали по стандартным протоколам. Образцы анализировали на MSD1 при помощи ИП-ВЭЖХ-МС. Определили содержание (мкг/г) в ткани ISIS 304801 и 647535 полной длины, и результаты представлены в Таблице 10. Показано, что концентрации в печени антисмысловых соединений полной длины были схожими для двух антисмысловых соединений. Следовательно, даже несмотря на то, что GalNAc3-1-конъюгированное антисмысловое

соединение является более активным в печени (как показано по данным РНК и белка, представленным выше), его содержание в печени не намного выше. Действительно, рассчитанное значение  $EC_{50}$  (представленное в Таблице 10) подтверждает, что наблюдаемое увеличение эффективности конъюгированного соединения не может быть приписано исключительно повышенному накоплению. Такой результат позволяет предположить, что конъюгат улучшает эффективность по другому механизму, чем простое накопление в печени, возможно за счет увеличения продуктивного захвата антисмыслового соединения в клетки.

Эти результаты показывают также, что концентрация **GalNAc3-1**-конъюгированного антисмыслового соединения почках ниже, чем концентрация антисмыслового соединения, не содержащего конъюгата GalNAc. Это имеет несколько благоприятных терапевтических эффектов. Для терапевтических показаний, в которых не требуется проявление активности в почках, воздействие на почки подвергает их риску токсичности без соответствующей пользы. Более того, высокая концентрация в почках обычно приводит к выводу соединения с мочой, обеспечивая более быстрое выведение. Соответственно, для внепочечных мишеней накопление в почках является нежелательным. Эти данные позволяют предположить, что конъюгирование с **GalNAc3-1** снижает накопление в почках.

**Таблица 10**  
**ФК анализ ASO лечения у трансгенных мышей**

ASO	Доза (мкмоль/кг)	Печень (мкг/г)	Почки (мкг/г)	$EC_{50}$ в печени (мкг/г)	3'- конъюгат	Межнуклеозидная связь/длина	SEQ ID NO.
ISIS 304801	0,1	5,2	2,1	53	Нет	PS/20	20
	0,8	62,8	119,6				
	2,3	142,3	191,5				
	6,8	202,3	337,7				
ISIS 647535	0,1	3,8	0,7	3,8	<b>GalNAc3- 1</b>	PS/20	21
	0,8	72,7	34,3				
	2,3	106,8	111,4				
	6,8	237,2	179,3				

Идентифицировали также метаболиты ISIS 647535 и подтвердили их массы при помощи масс-спектрометрического анализа высокого разрешения. Сайты расщепления и структуры наблюдаемых метаболитов представлены ниже. Относительный % от общей длины ASO рассчитали по стандартным приемам, а результаты представлены в Таблице 10а. Основной метаболит ISIS 647535 представляет собой ASO полной длины без всего конъюгата (то есть ISIS 304801), который образуется в результате расщепления по сайту расщепления А, представленному ниже. Кроме того, наблюдали также дополнительные метаболиты, образующиеся из других сайтов расщепления. Эти результаты позволяют предположить, что может быть пригодным также внедрение других расщепляемых связей, таких как сложные эфиры, пептиды, дисульфиды, фосфорамидаты или ацил-гидразоны, между сахаром **GalNAc-1** и ASO, которые могут расщепляться под действием ферментов внутри клетки или которые могут расщепляться в восстановительной среде цитозоля, или которые лабильны в кислотном рН внутри эндосом и лизосом.

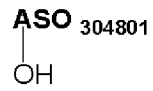
**Таблица 10а**  
**Наблюдаемые метаболиты полной длины ISIS 647535**

Метаболит	ASO	Сайт расщепления	Относительный %
1	ISIS 304801	А	36,1
2	ISIS 304801 + dA	В	10,5
3	ISIS 647535 минус [3 GalNAc]	С	16,1
4	ISIS 647535 минус [3 GalNAc + 1 связка 5-гидрокси-пентановой кислоты]	Д	17,6
5	ISIS 647535 минус [2 GalNAc + 2 связки 5-гидрокси-пентановой кислоты]	Д	9,9
6	ISIS 647535 минус [3 GalNAc + 3 связки 5-гидрокси-пентановой кислоты]	Д	9,8

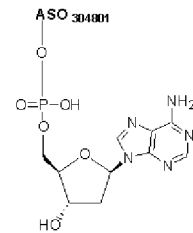
## Сайты расщепления

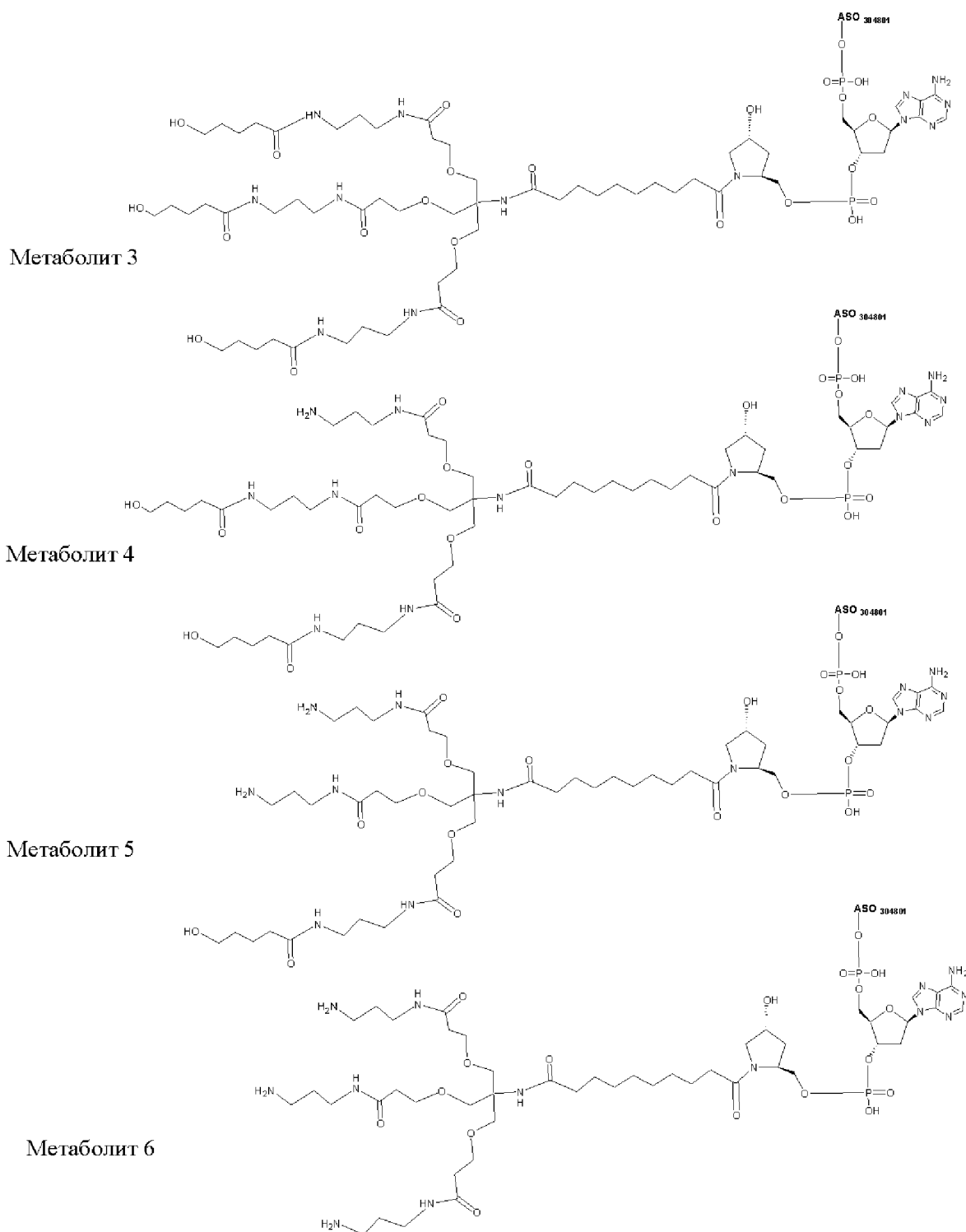


Метаболит 1



Метаболит 2





**Пример 21. Антисмысловое ингибирование человеческого АроС III у трансгенных мышей с АроС III в исследовании одного введения**

ISIS 304801, 647535 и 647536, каждый из которых нацелен на человеческий АроС III и описан в Таблице 4, дополнительно оценивали в исследовании однократного введения на их способность ингибировать человеческий АроС III у трансгенных мышей с человеческим АроС III.

### Лечение

Трансгенных мышей с человеческим ApoCIII выдерживали при 12-часовом цикле освещения/темноты и обеспечивали свободный доступ к пище Teklad lab. До начала эксперимента животных акклиматизировали по меньшей мере в течение 7 дней в исследовательской лаборатории. Приготовили ASO в PBS и стерилизовали фильтрованием через фильтр 0,2 микрона. ASO растворили в 0,9% PBS для инъекций.

Трансгенным мышам с человеческим ApoC III внутривенно ввели однократную инъекцию дозы, представленной ниже, соединения ISIS 304801, 647535 или 647536 (описанных выше), или PBS в качестве контрольного образца. Экспериментальная группа состояла из 3 животных, а контрольная группа состояла из 4 животных. Перед лечением, а также после последней дозы у каждой мыши брали кровь и анализировали образцы плазмы. Мышей умертвили через 72 часа после последнего введения.

Образцы собрали и анализировали для определения уровней мРНК ApoC III и белка в печени; триглицеридов в плазме; и холестерина, включая фракции HDL и LDL, которые анализировали так, как описано выше (Пример 20). Данные этих анализов представлены ниже в Таблицах 11-15. Уровни трансаминазы в печени, аланин-аминотрансферазы (ALT) и аспартат-аминотрансферазы (AST) в сыворотке измеряли относительно мышей, инъецированных солевым раствором, применяя стандартные протоколы. Уровни ALT и AST показали, что антисмысловые соединения хорошо переносятся при всех введенных дозах.

Эти результаты демонстрируют усиление эффективности антисмысловых соединений, содержащих конъюгат **GalNAc<sub>3</sub>-1** на 3'-конце (ISIS 647535 и 647536), по сравнению с антисмысловым соединением, не содержащим конъюгат **GalNAc<sub>3</sub>-1** (ISIS 304801). Кроме того, ISIS 647536, который содержит конъюгат **GalNAc<sub>3</sub>-1** и несколько фосфодиэфирных связей, был таким же эффективным, как ISIS 647535, который содержит тот же конъюгат, и все межнуклеозидные связи в этом ASO являются тиофосфатными.

**Таблица 11**

**Влияние ASO лечения на уровни мРНК ApoC III у трансгенных мышей с человеческим ApoC III**

ASO	Доза (мг/кг)	% PBS	ED <sub>50</sub> (мг/кг)	3'- конъюгат	Межнуклеози дная связь/длина	SEQ ID NO.

PBS	0	99	--	-	--	
ISIS 304801	1	104	13,2	Нет	PS/20	20
	3	92				
	10	71				
	30	40				
ISIS 647535	0,3	98	1,9	GalNAc3- 1	PS/20	21
	1	70				
	3	33				
	10	20				
ISIS 647536	0,3	103	1,7	GalNAc3- 1	PS/PO/20	21
	1	60				
	3	31				
	10	21				

Таблица 12

**Влияние ASO лечения на уровни белка ApoC III в плазме у трансгенных мышей с человеческим ApoC III**

ASO	Доза (мг/кг)	% PBS	ED <sub>50</sub> (мг/кг)	3'- конъюгат	Межнуклеозидная связь/длина	SEQ ID NO.
PBS	0	99	--	--	--	
ISIS 304801	1	104	23,2	Нет	PS/20	20
	3	92				
	10	71				
	30	40				
ISIS 647535	0,3	98	2,1	GalNAc3- 1	PS/20	21
	1	70				
	3	33				
	10	20				
ISIS 647536	0,3	103	1,8	GalNAc3- 1	PS/PO/20	21
	1	60				
	3	31				

	10	21				
--	----	----	--	--	--	--

Таблица 13

## Влияние ASO лечения на уровни триглицеридов у трансгенных мышей

ASO	Доза (мг/кг)	% PBS	ED <sub>50</sub> (мг/кг)	3'-конъюгат	Межнуклеозидная связь/длина	SEQ ID NO.
PBS	0	98	--	--	--	
ISIS 304801	1	80	29,1	Нет	PS/20	20
	3	92				
	10	70				
	30	47				
ISIS 647535	0,3	100	2,2	GalNAc3-1	PS/20	21
	1	70				
	3	34				
	10	23				
ISIS 647536	0,3	95	1,9	GalNAc3-1	PS/PO/20	21
	1	66				
	3	31				
	10	23				

Таблица 14

## Влияние ASO лечения на уровни общего холестерина у трансгенных мышей

ASO	Доза (мг/кг)	% PBS	3'-конъюгат	Межнуклеозидная связь/длина	SEQ ID NO.
PBS	0	96	--	--	
ISIS 304801	1	104	Нет	PS/20	20
	3	96			
	10	86			
	30	72			
	0,3	93	GalNAc3-1	PS/20	21



ISIS 647535	1	85			
	3	61			
	10	53			
ISIS 647536	0,3	115	<b>GalNAc3-1</b>	PS/PO/20	21
	1	79			
	3	51			
	10	54			

Таблица 15

**Влияние ASO лечения на уровни HDL и LDL холестерина у трансгенных мышей**

ASO	Доза (мг/кг)	HDL % PBS	LDL % PBS	3'- конъюгат	Межнуклеозидная связь/длина	SEQ ID NO.
PBS	0	131	90	--	--	
ISIS 304801	1	130	72	Нет	PS/20	20
	3	186	79			
	10	226	63			
	30	240	46			
ISIS 647535	0,3	98	86	<b>GalNAc3- 1</b>	PS/20	21
	1	214	67			
	3	212	39			
	10	218	35			
ISIS 647536	0,3	143	89	<b>GalNAc3- 1</b>	PS/PO/20	21
	1	187	56			
	3	213	33			
	10	221	34			

Эти результаты подтверждают, что конъюгат **GalNAc3-1** улучшает эффективность антисмыслового соединения. Эти результаты показывают также равную эффективность **GalNAc3-1**-конъюгированных антисмысловых соединений, в которых антисмысловые олигонуклеотиды имеют смешанные связи (ISIS 647536, который имеет шесть

фосфодизфирных связей), и полностью тиофосфатной версии того же антисмыслового соединения (ISIS 647535).

Тиофосфатные связи обеспечивают несколько свойств антисмысловых соединений. Например, они устойчивы к нуклеазному расщеплению и связываются с белками, что приводит к накоплению соединения в печени, а не в почках/моче. Эти свойства являются желательными, особенно при лечении показаний в печени. Однако тиофосфатные связи связаны также с воспалительной реакцией. Соответственно, уменьшение количества тиофосфатных связей в соединении предположительно снижает риск воспаления, но снижает также концентрацию соединения в печени, повышает концентрацию в почках и моче, снижает стабильность в присутствии нуклеаз и уменьшает общую эффективность. Представленные результаты демонстрируют, что **GalNAc3-1**-конъюгированное антисмысловое соединение, в котором некоторые тиофосфатные связи заменены фосфодизфирными связями, настолько же эффективно против мишени в печени, как и аналог, содержащий только тиофосфатные связи. Такие соединения предположительно являются менее провоспалительными (см. Пример 24, в котором описан эксперимент, демонстрирующий, что уменьшение тиофосфатов (PS) приводит к снижению воспалительного действия).

#### **Пример 22. Влияние модифицированного GalNAc3-1-конъюгированного ASO, нацеленного на SRB-1, *in vivo***

ISIS 440762 и 651900, каждый из которых нацелен на SRB-1 и описан в Таблице 4, оценили в дозозависимом исследовании на их способность ингибировать SRB-1 у Balb/c мышей.

##### *Лечение*

Шестинедельным самцам мышей Balb/c (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) ввели однократную подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, соединения ISIS 440762, 651900 или PBS в качестве контрольного образца. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей умертвили через 48 часов после последнего введения для определения уровней мРНК SRB-1 в печени при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Уровни мРНК SRB-1 определяли относительно общей РНК (при помощи Ribogreen), затем нормализовали к

контрольному образцу, обработанному PBS. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней мРНК SRB-1 для каждой экспериментальной группы, нормализованных к контрольному образцу, обработанному PBS, и обозначены как «% PBS».

Как показано в Таблице 16, оба антисмысловых соединения снижают уровни мРНК SRB-1. Кроме того, антисмысловое соединение, содержащее конъюгат **GalNAc3-1** (ISIS 651900), было значительно более эффективным, чем антисмысловое соединение, не содержащее конъюгат **GalNAc3-1** (ISIS 440762). Эти результаты демонстрируют, что преимущество эффективности конъюгатов **GalNAc3-1** наблюдается при применении антисмысловых олигонуклеотидов, комплементарных различным мишеням и имеющих различные химически модифицированные нуклеозиды, в этом случае модифицированные нуклеозиды содержат стерически затрудненные этил-сахарные фрагменты (бициклический сахарный фрагмент).

Таблица 16

## Влияние ASO лечения на уровни мРНК SRB-1 у мышей Balb/c

ASO	Доза (мг/кг)	Печень % PBS	ED <sub>50</sub> (мг/кг)	3'-конъюгат	Межнуклеозидная связь/длина	SEQ ID NO.
PBS	0	100		-	--	
ISIS 440762	0,7	85	2,2	Нет	PS/14	22
	2	55				
	7	12				
	20	3				
ISIS 651900	0,07	98	0,3	<b>GalNAc3-1</b>	PS/14	23
	0,2	63				
	0,7	20				
	2	6				
	7	5				

### Пример 23. Протокол анализа человеческих мононуклеарных клеток периферической крови (hPBMC)

Анализ hPBMC выполнили при помощи пробирочного способа BD Vautainer CPT.

Получили образец цельной крови, полученной от доноров-добровольцев, давших информированное согласие в Медицинской клинике США (Faraday & El Camino Real, Карлсбад), и собрали его в 4-15 пробирки BD Vacutainer CPT по 8 мл (VWR, кат. № BD362753). Приблизительный исходный общий объем цельной крови в пробирках CPT для каждого донора записали в формуляре анализа РВМС.

Перед центрифугированием образец крови незамедлительно повторно перемешали, осторожно переворачивая пробирки 8-10 раз. Пробирки CPT центрифугировали при комнатной температуре (18-25 °C) в горизонтальном (с избыточной поворачиваемостью) роторе в течение 30 минут с фактором разделения (RCF) 1500-1800 с затормаживанием (2700 об./мин. Beckman Allegra 6R). Клетки сняли с лейкоцитарной поверхности раздела (между слоями фиколла и полимерного геля); перенесли в стерильную 50 мл коническую пробирку и сгруппировали по 5 CPT пробирок/50 мл коническая пробирка/донор. Затем клетки дважды промыли PBS (без Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>; GIBCO). Пробирки пополнили до 50 мл и перемешали, переворачивая несколько раз. Затем образец центрифугировали при 330 x g в течение 15 при комнатной температуре (1215 об./мин в Beckman Allegra 6R) и аспирировали максимальное количество надосадочной жидкости, не нарушая осадок. Клеточный осадок сняли, осторожно поворачивая пробирку, и повторно суспендировали клетки в RPMI+10% FBS+пенициллин/стрептомицин (~1 мл / 10 мл исходного объема цельной крови). Пипеткой взяли 600 мкл образца и поместили во флакон с пробой (Beckman Coulter), содержащий 600 мкл реагента VersaLyse (Beckman Coulter, кат. № A09777), и осторожно перемешивали на вортексе в течение 10-15 секунд. Образец оставили инкубироваться в течение 10 минут при комнатной температуре, и снова перемешали перед подсчетом. Суспензию клеток считывали на анализаторе жизнеспособности клеток Vicell XR (Beckman Coulter), используя клетки типа РВМС (сохранили фактор разбавления 1:11 с другими параметрами). Записали количество живых клеток/мл и жизнеспособность. Клеточную суспензию разбавили до  $1 \times 10^7$  живых РВМС/мл в RPMI+ 10% FBS+пенициллин/стрептомицин.

Клетки поместили на планшет при  $5 \times 10^5$  в 50 мкл/лунку 96-луночного тканевого культурального планшета (Falcon Microtest). 50 мкл/лунку 2х концентрации олигомеров/контроля, разбавленных в RPMI+10% FBS+пенициллин/стрептомицин, добавили в соответствии с экспериментальной матрицей (в целом 100 мкл/лунку). Планшеты поместили на шейкер и оставили перемешиваться приблизительно на 1 минуту. После инкубации в течение 24 часов при 37 °C; 5% CO<sub>2</sub>, планшеты центрифугировали при 400 x g в течение 10 минут, затем удалили надосадочную жидкость для анализа цитокинов MSD (то есть человеческих IL-6, IL-10, IL-8 и MCP-1).

#### **Пример 24. Оценка провоспалительных эффектов в анализе hPBMC для GalNAc3-1-конъюгированных ASO**

Антисмысловые олигонуклеотиды (ASO), перечисленные в Таблице 17, оценили на провоспалительное действие в анализе hPBMC, используя протокол, описанный в Примере 23. ISIS 353512 представляет собой внутренний стандарт, который, как известно, обладает высоким ответом на высвобождение IL-6 в этом анализе. hPBMC выделили из свежих образцов, полученных от доноров-добровольцев, и обработали ASO в концентрациях 0, 0,0128, 0,064, 0,32, 1,6, 8, 40 и 200 мкМ. Через 24 часа обработки измерили уровни цитокинов.

Уровни IL-6 применили в качестве первичного показателя.  $EC_{50}$  и  $E_{max}$  рассчитали по стандартным способам. Результаты выразили как среднее отношение  $E_{max}/EC_{50}$  для двух доноров и обозначили как « $E_{max}/EC_{50}$ ». Более низкое соотношение означает относительное снижение провоспалительного ответа, а более высокое соотношение означает относительное увеличение провоспалительного ответа.

В отношении исследуемых соединений, наименее провоспалительным соединением было ASO, соединенное при помощи PS/PO (ISIS 616468). GalNAc3-1-конъюгированное ASO, ISIS 647535, было немного менее провоспалительным, чем его неконоъюгированный аналог, ISIS 304801. Эти результаты показывают, что внедрение нескольких PO связей снижает провоспалительную реакцию, а добавление конъюгата GalNAc3-1 не делает соединение более провоспалительным, и может снижать провоспалительную реакцию. Соответственно, можно ожидать, что антисмысловое соединение, содержащее смешанные PS/PO связи и конъюгат GalNAc3-1, может вызывать более слабые провоспалительные реакции, по сравнению с антисмысловым соединением, связанным только посредством PS, с конъюгатом GalNAc3-1 или без него. Эти результаты показывают, что GalNAc3-1-конъюгированные антисмысловые соединения, в частности, соединения, имеющие меньшее содержание PS, являются менее провоспалительными.

В целом, эти результаты позволяют предположить, что GalNAc3-1-конъюгированное соединение, в частности, соединение со сниженным содержанием PS, может быть введено в более высокой дозе, чем аналогичное полностью PS антисмысловое соединение без конъюгата GalNAc3-1. Поскольку не ожидается, что период полувыведения для этих соединений будет существенно различаться, то такое введение в более высокой дозе обусловит менее частое введение доз. В действительности, такое введение может быть еще

более редким, поскольку **GalNAc3-1**-конъюгированные соединения являются более эффективными (см. Примеры 20-22), а повторное введение дозы необходимо только при снижении концентрации соединения ниже желаемого уровня, при этом такой желаемый уровень обусловлен эффективностью.

Таблица 17

## Модифицированные ASO

ASO	Последовательность (от 5' к 3')	Мишень	SEQ ID NO.
ISIS 104838	G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> A <sub>es</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>e</sub>	TNF $\square$	24
ISIS 353512	T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> G <sub>e</sub>	CRP	25
ISIS 304801	A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> A <sub>es</sub> T <sub>e</sub>	ApoC III	20
ISIS 647535	A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> A <sub>es</sub> T <sub>eo</sub> <b>Ado'-GalNAc3-1a</b>	ApoC III	21
ISIS 616468	A <sub>es</sub> G <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> T <sub>es</sub> A <sub>es</sub> T <sub>e</sub>	ApoC III	20

Нижние индексы: «e» означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид; «d» означает  $\beta$ -D-2'-дезоксирибонуклеозид; «k» означает 6'-(S)-CH<sub>3</sub> бициклический нуклеозид (например, cEt); «s» означает тиофосфатные межнуклеозидные связи (PS); «o» означает фосфодиэфирные межнуклеозидные связи (PO); и «o'» означает -O-P(=O)(OH)-. Верхний индекс «m» означает 5-метилцитозины. «Ado'-GalNAc3-1a» означает конъюгат, имеющий структуру **GalNAc3-1**, представленную в Примере 9, присоединенный к 3'-концу указанного антисмыслового олигонуклеотида.

Таблица 18

## Провоспалительное действие ASO, нацеленных на ApoC III, в анализе hPBMC

ASO	EC <sub>50</sub> (мкМ)	E <sub>max</sub> (мкМ)	E <sub>max</sub> /EC <sub>50</sub>	3'- конъюгат	Межнуклеозидная связь/длина	SEQ ID No.
ISIS 353512	0,01	265,9	26,590	Нет	PS/20	25

(с высоким ответом)						
ISIS 304801	0,07	106,55	1,522	Нет	PS/20	20
ISIS 647535	0,12	138	1,150	<b>GalNAc3-1</b>	PS/20	21
ISIS 616468	0,32	71,52	224	Нет	PS/PO/20	20

**Пример 25. Влияние модифицированного GalNAc3-1-конъюгированного ASO, нацеленного на человеческий ApoC III, *in vitro***

ISIS 304801 и 647535, описанные выше, испытали *in vitro*. Первичные гепатоцитарные клетки трансгенных мышей при плотности 25000 клеток на лунку обработали концентрациями 0,03, 0,08, 0,24, 0,74, 2,22, 6,67 и 20 мкМ модифицированных олигонуклеотидов. После обработки в течение около 16 часов, из клеток выделили РНК и измерили уровни мРНК при помощи количественной ПЦР в реальном времени, а уровни мРНК hApoC III скорректировали в соответствии с общим содержанием РНК, измеренным при помощи RIBOGREEN.

IC<sub>50</sub> рассчитали по стандартным способам, а результаты представлены в Таблице 19. Показано, что наблюдали сравнимую эффективность в клетках, обработанных ISIS 647535, по сравнению с контрольным образцом, ISIS 304801.

**Таблица 19**

**Модифицированные ASO, нацеленные на человеческие ApoC III, в первичных гепатоцитах**

ASO	IC <sub>50</sub> (мкМ)	3'-конъюгат	Межнуклеозидная связь/длина	SEQ ID NO.
ISIS 304801	0,44	Нет	PS/20	20
ISIS 647535	0,31	<b>GalNAc3-1</b>	PS/20	21

В этом эксперименте *in vitro* не наблюдали такого большого преимущества эффективности конъюгирования с **GalNAc3-1**, как наблюдали *in vivo*. Последующие эксперименты свободного захвата в первичных гепатоцитах *in vitro* не показали повышенной эффективности олигонуклеотидов, содержащих различные конъюгаты GalNAc, по сравнению с олигонуклеотидами, не содержащими конъюгаты GalNAc (см. Примеры 60, 82 и 92).

#### **Пример 26. Влияние связей PO/PS на кативность ASO в отношении ApoC III**

Трансгенным мышам с человеческим ApoC III внутрибрюшинной инъекцией вводили 25 мг/кг ISIS 304801 или ISIS 616468 (оба описаны выше) или PBS в качестве контрольного образца, один раз в неделю в течение двух недель. Экспериментальная группа состояла из 3 животных, а контрольная группа состояла из 4 животных. Перед лечением, а также после последней дозы у каждой мыши брали кровь и анализировали образцы плазмы. Мышей умертвили через 72 часа после последнего введения.

Образцы собрали и анализировали для определения уровней белка ApoC III в печени, как описано выше (Пример 20). Данные этих анализов представлены ниже в Таблице 20.

Эти результаты демонстрируют снижение эффективности антисмысловых соединений с PO/PS (ISIS 616468) в крыльях, по сравнению с соединениями, содержащими только PS (ISIS 304801).

**Таблица 20**

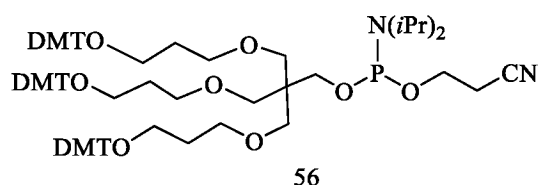
#### **Влияние ASO лечения на уровни белка ApoC III у трансгенных мышей с человеческим ApoC III**

ASO	Доза (мг/кг)	% PBS	3'- конъюгат	Межнуклеози дная связь/длина	SEQ ID NO.
PBS	0	99	-	--	
ISIS 304801	25 мг/кг/нед. в течение 2 нед.	24	Нет	Полностью PS	20



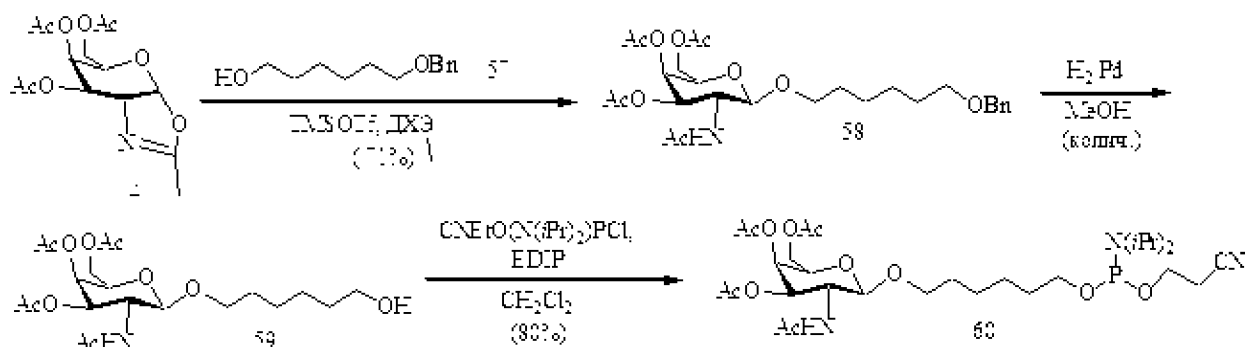
ISIS 616468	25 мг/кг/нед. в течение 2 нед.	40	Нет	14 PS/6 PO	20
----------------	--------------------------------------	----	-----	------------	----

### Пример 27. Соединение 56



Соединение 56 имеется в продаже у компании Glen Research или может быть получено по опубликованным методикам, описанным авторами Shchepinov *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22), 4447-4454.

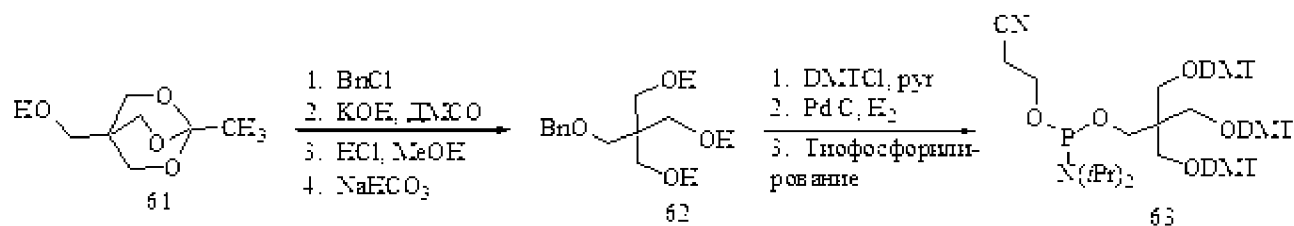
### Пример 28. Получение Соединения 60



Соединение 4 получили по способам, описанным в Примере 2. Соединение 57 имеется в продаже. Соединение 60 подтвердили структурным анализом.

Соединение 57 является иллюстративным, и его не следует считать ограничивающим, поскольку могут быть применены другие монозащищенные замещенные или незамещенные алкилдиолы, включая, но не ограничиваясь ими, те, которые представлены в данном описании, для получения фосфорамидитов, имеющих желаемый состав.

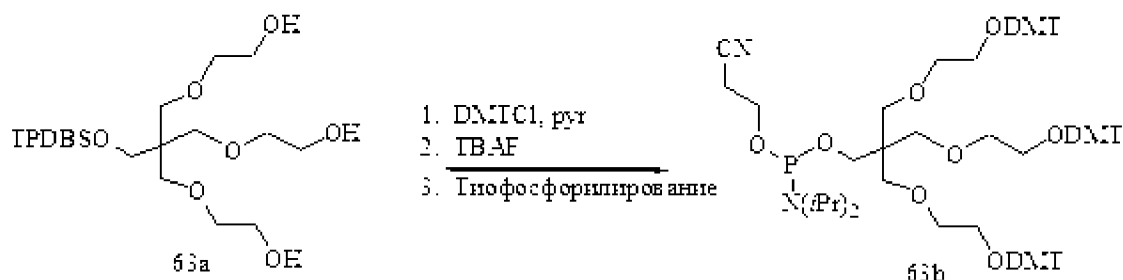
### Пример 29. Получение Соединения 63



Соединения 61 и 62 получили по таким же способам, как описаны авторами Tober *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.*, 2013, 3, 566-577; и Jiang *et al.*, *Tetrahedron*, 2007, 63(19), 3982-3988.

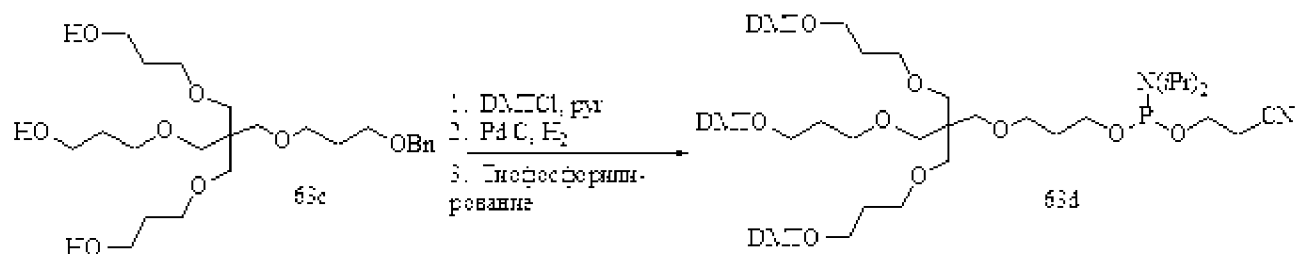
Альтернативно, Соединение 63 получили по таким же способам, как описаны в научной и патентной литературе авторами Kim *et al.*, *Synlett*, 2003, 12, 1838-1840; и Kim *et al.*, в опубликованной Международной заявке PCT WO 2004063208.

### Пример 30. Получение Соединения 63b

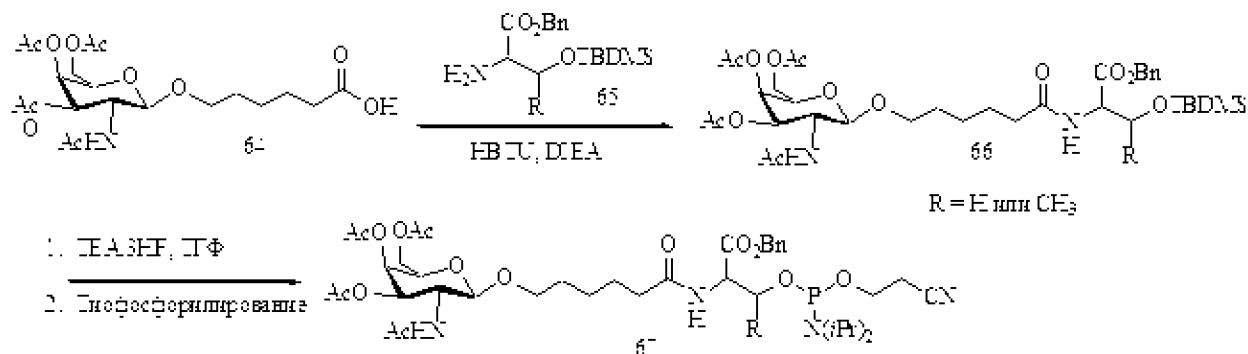


Соединение 63a получили по таким же способам, как описаны авторами Hanessian *et al.*, *Canadian Journal of Chemistry*, 1996, 74(9), 1731-1737.

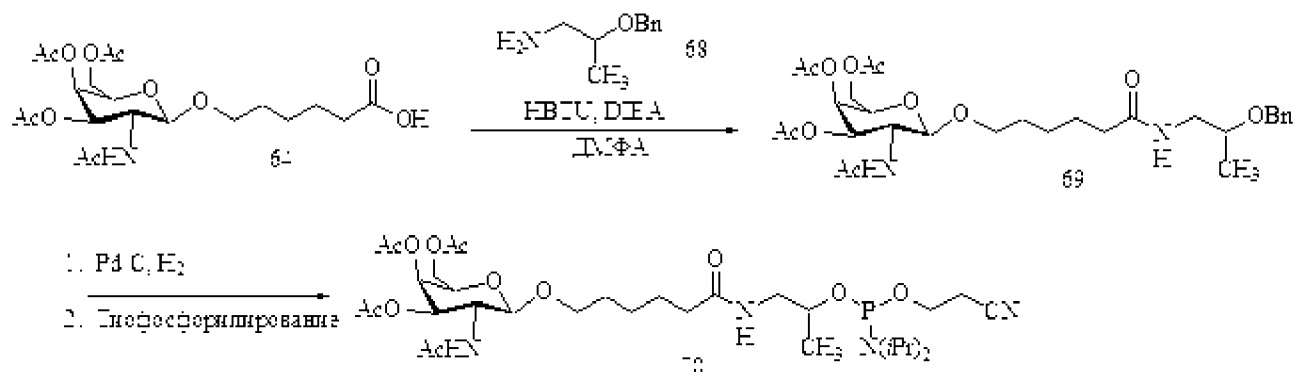
### Пример 31. Получение Соединения 63d



Соединение 63c получили по таким же способам, как описаны авторами Chen *et al.*, *Chinese Chemical Letters*, 1998, 9(5), 451-453.

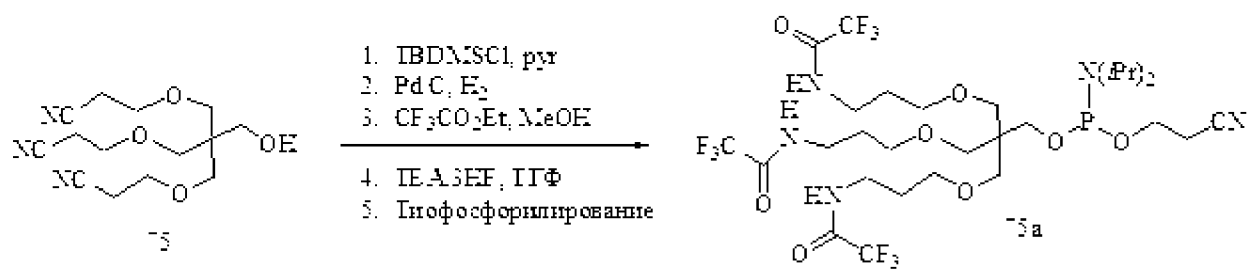
**Пример 32. Получение Соединения 67**

Соединение 64 получили по способам, представленным в Примере 2. Соединение 65 получили по таким же способам, как описаны авторами *Or et al.*, в опубликованной Международной заявке PCT WO 2009003009. Защитные группы, применяемые для Соединения 65, являются иллюстративными, и их не следует считать ограничением, поскольку могут быть применены другие защитные группы, включая, но не ограничиваясь ими, те, которые представлены в данном описании.

**Пример 33. Получение Соединения 70**

Соединение 64 получили по способам, описанным в Примере 2. Соединение 68 имеется в продаже. Защитная группа, примененная для Соединения 68, является иллюстративной, и ее не следует считать ограничением, поскольку могут быть применены другие защитные группы, включая, но не ограничиваясь ими, те, которые представлены в данном описании.

**Пример 34. Получение Соединения 75a**

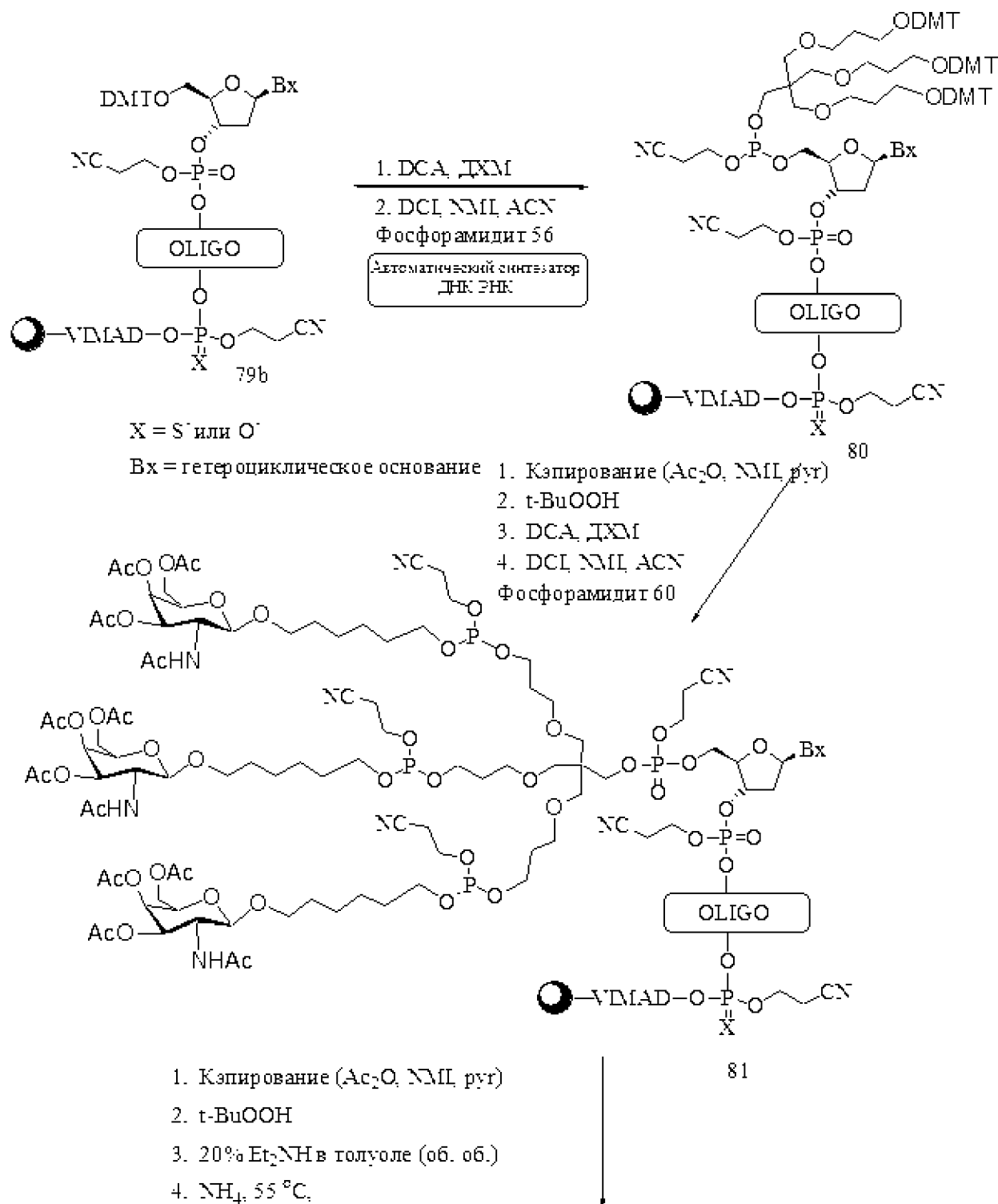


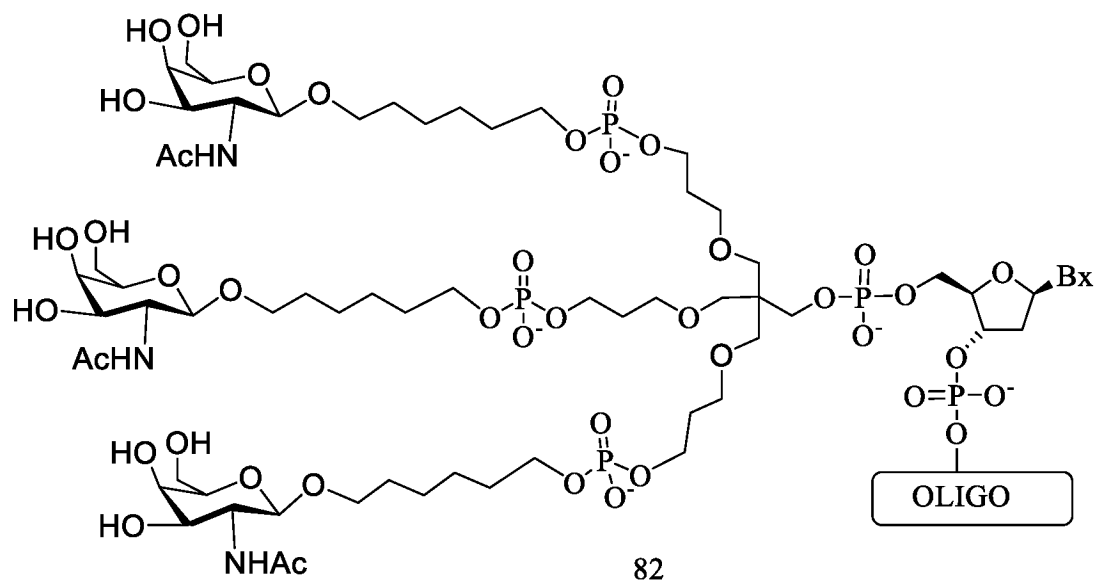
Соединение 75 получили по опубликованным методикам, описанным авторами Shchepinov *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22), 4447-4454.



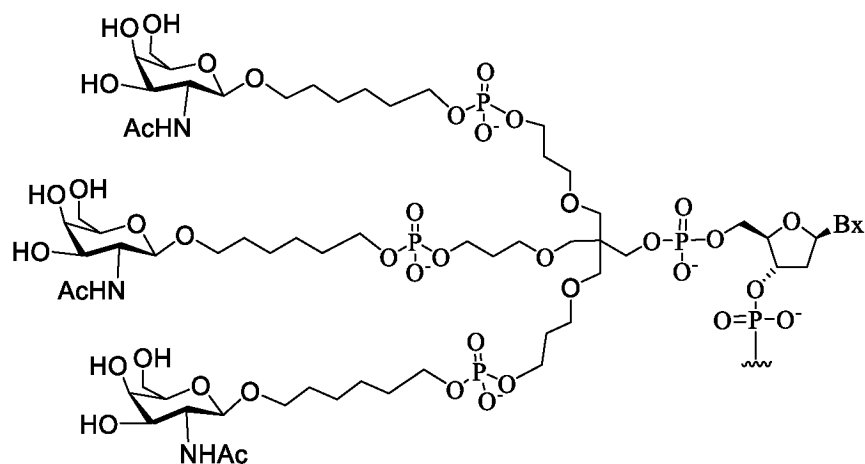
Соединение 77 получили по способам, представленным в Примере 35.

**Пример 37. Общий способ получения конъюгированного олигомерного соединения 82, содержащего фосфодиэфир-связанный конъюгат GalNAc<sub>3</sub>-2 на 5'-конце, на твердой подложке (Способ I)**

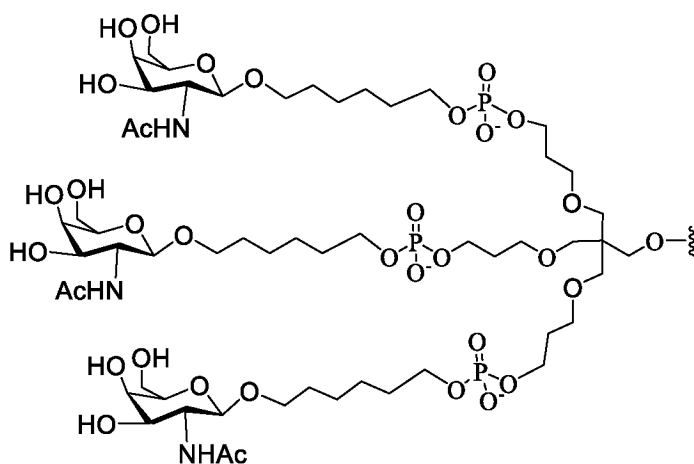




где GalNAc<sub>3</sub>-2 имеет структуру:



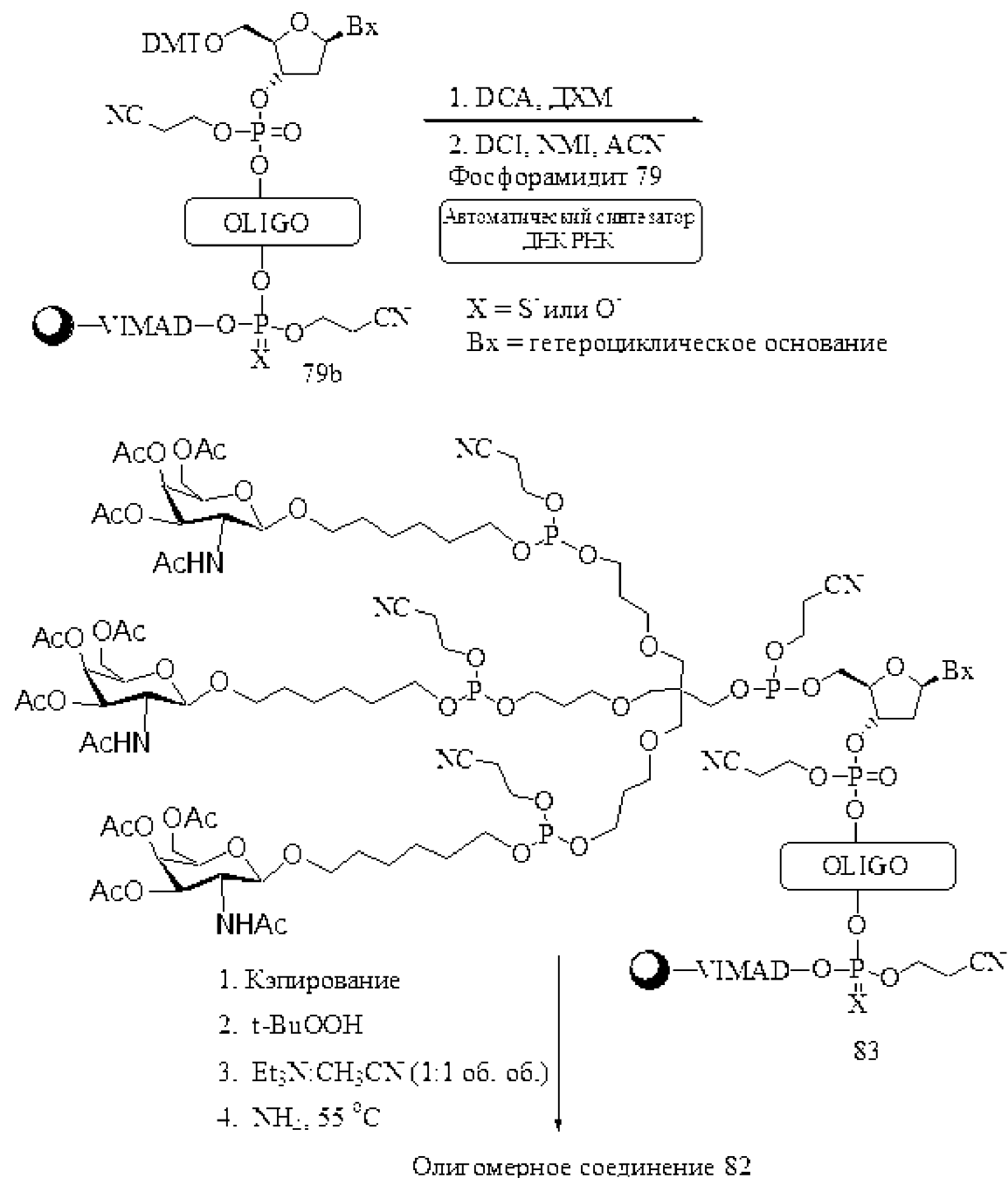
Кластерная часть GalNAc<sub>3</sub> конъюгирующей группы GalNAc<sub>3</sub>-2 (GalNAc<sub>3</sub>-2<sub>a</sub>) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных конъюгирующих групп. При этом GalNAc<sub>3</sub>-2<sub>a</sub> имеет формулу:



VIMAD-связанное олигомерное соединение 79b получили по стандартным способам в автоматическом синтезаторе ДНК/РНК (см. Dupouy *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45, 3623-3627). Фосфорамидитные Соединения 56 и 60 получили так, как описано в способах в Примерах 27 и 28, соответственно. Изображенные фосфорамидиты являются иллюстративными, и их не следует считать ограничением, поскольку могут быть применены другие фосфорамидитные строительные блоки, включая, но не ограничиваясь ими, те, которые представлены в данном описании, для получения олигомерного соединения, содержащего фосфодиэфир-связанную конъюгирующую группу на 5'-конце. Порядок и количество фосфорамидитов, добавляемых к твердой подложке, может быть подобрано для получения олигомерных соединений, описанных в настоящем документе, которые имеют любую желаемую последовательность и состав.



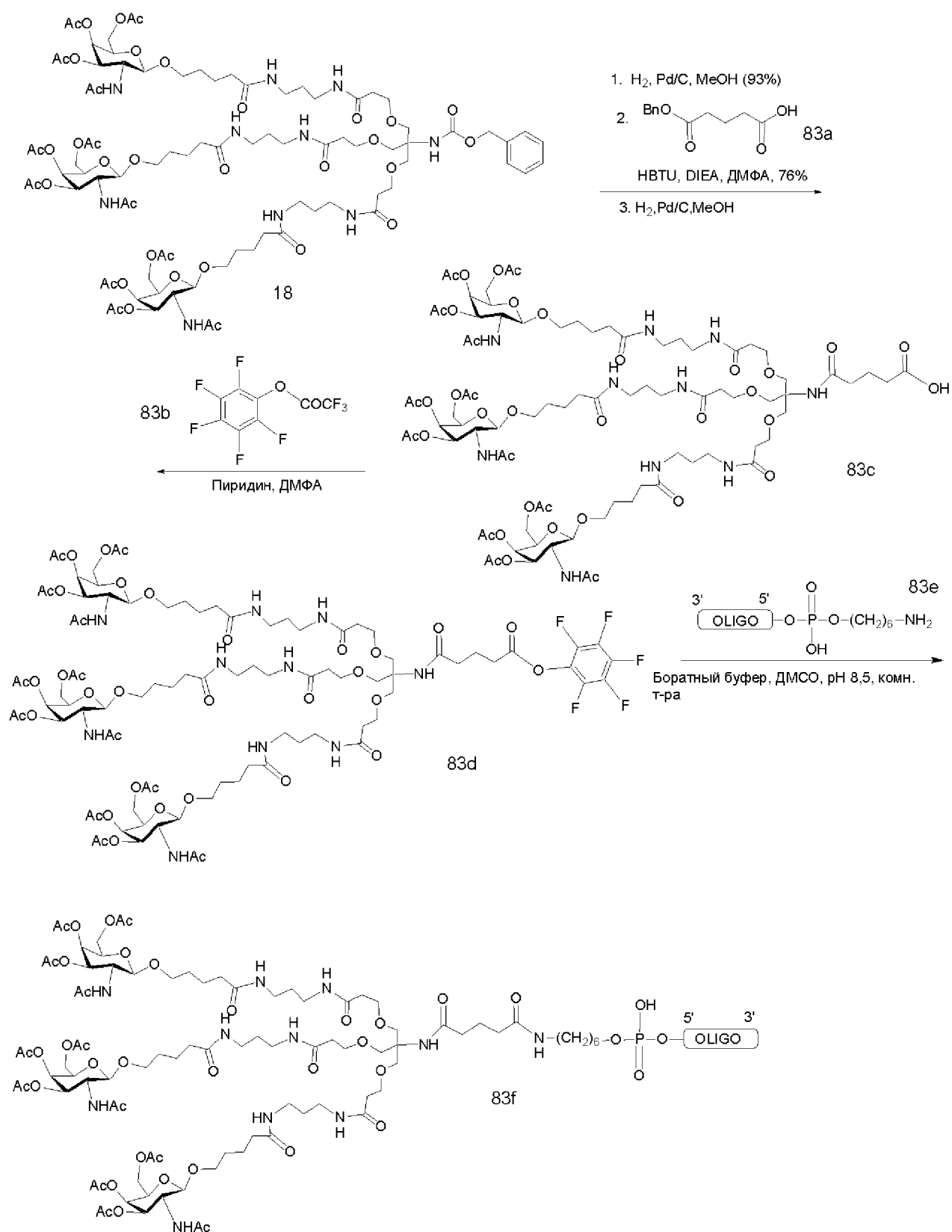
**Пример 38. Альтернативный способ получения олигомерного соединения 82, содержащего фосфодиэфир-связанный конъюгат GalNAc<sub>3</sub>-2 на 5'-конце (Способ II)**

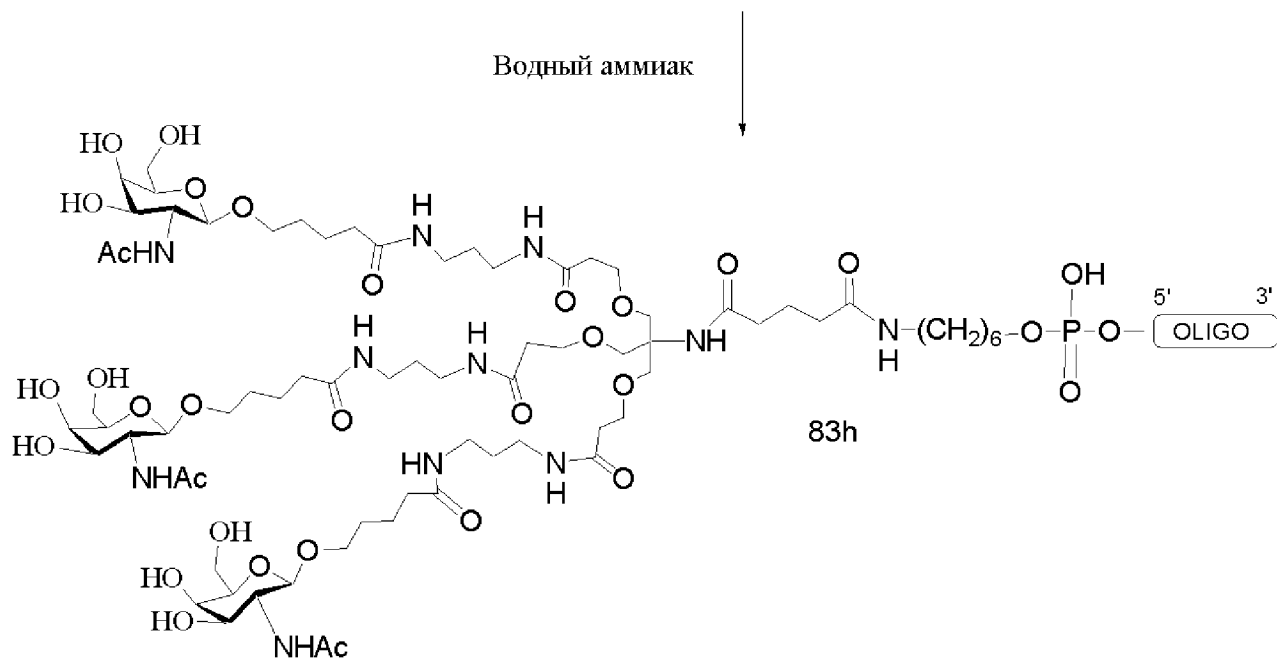


VIMAD-связанное олигомерное соединение 79b получили по стандартным способам в автоматическом синтезаторе ДНК/РНК (см. Dupouy *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45, 3623-3627). GalNAc<sub>3</sub>-2-кластерный фосфорамидит, Соединение 79, получили по способам, представленным в Примере 35. Альтернативный способ обеспечивает возможность одностадийной установки фосфодиэфир-связанного GalNAc<sub>3</sub>-2 конъюгата на олигомерное соединение на последней стадии синтеза. Изображенные фосфорамидиты являются иллюстративными, и их не следует считать ограничением, поскольку могут быть

применены другие фосфорамидитные строительные блоки, включая, но не ограничиваясь ими, те, которые представлены в данном описании, для получения олигомерных соединений, содержащих фосфодиэфирный конъюгат на 5'-конце. Порядок и количество фосфорамидитов, добавляемых к твердой подложке, может быть подобрано для получения олигомерных соединений, описанных в настоящем документе, которые имеют любую желаемую последовательность и состав.

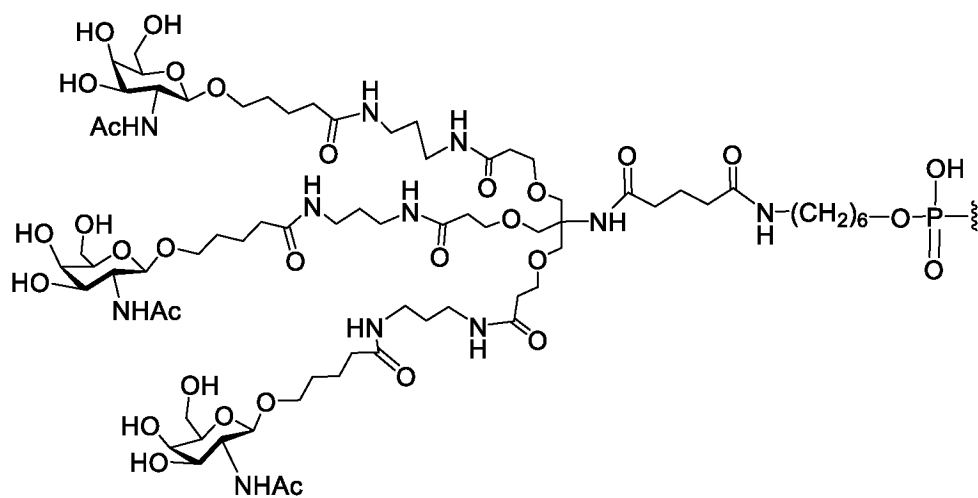
**Пример 39. Общий способ получения олигомерного соединения 83h, содержащего конъюгат GalNAc3-3 на 5'-конце (GalNAc3-1, модифицированный для 5'-концевого присоединения), на твердой подложке**



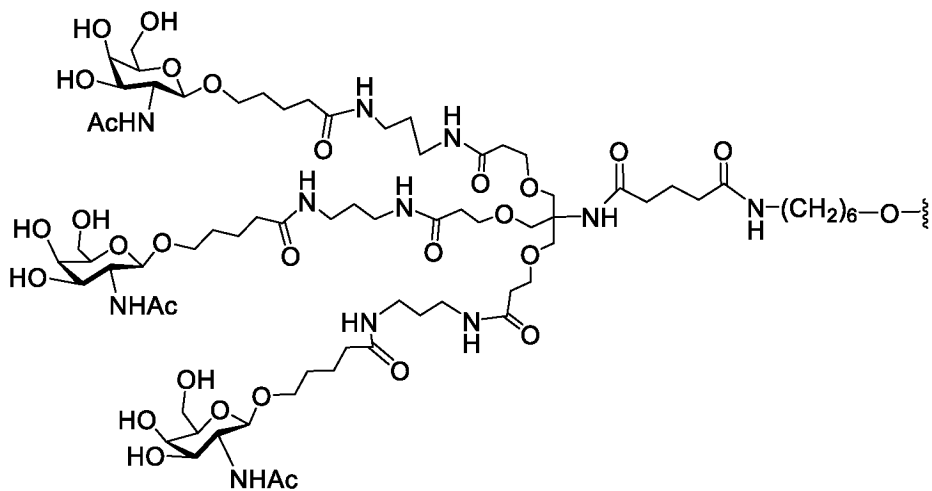


Соединение 18 получили по способам, описанным в Примере 4. Соединения 83а и 83б имеются в продаже. Олигомерное Соединение 83е, содержащее связанный через фосфодиэфир гексиламин, получили по стандартным способам синтеза олигонуклеотидов. В результате обработки защищенного олигомерного соединения водным раствором аммиака получили 5'-GalNAc<sub>3</sub>-3 конъюгированное олигомерное соединение (83h).

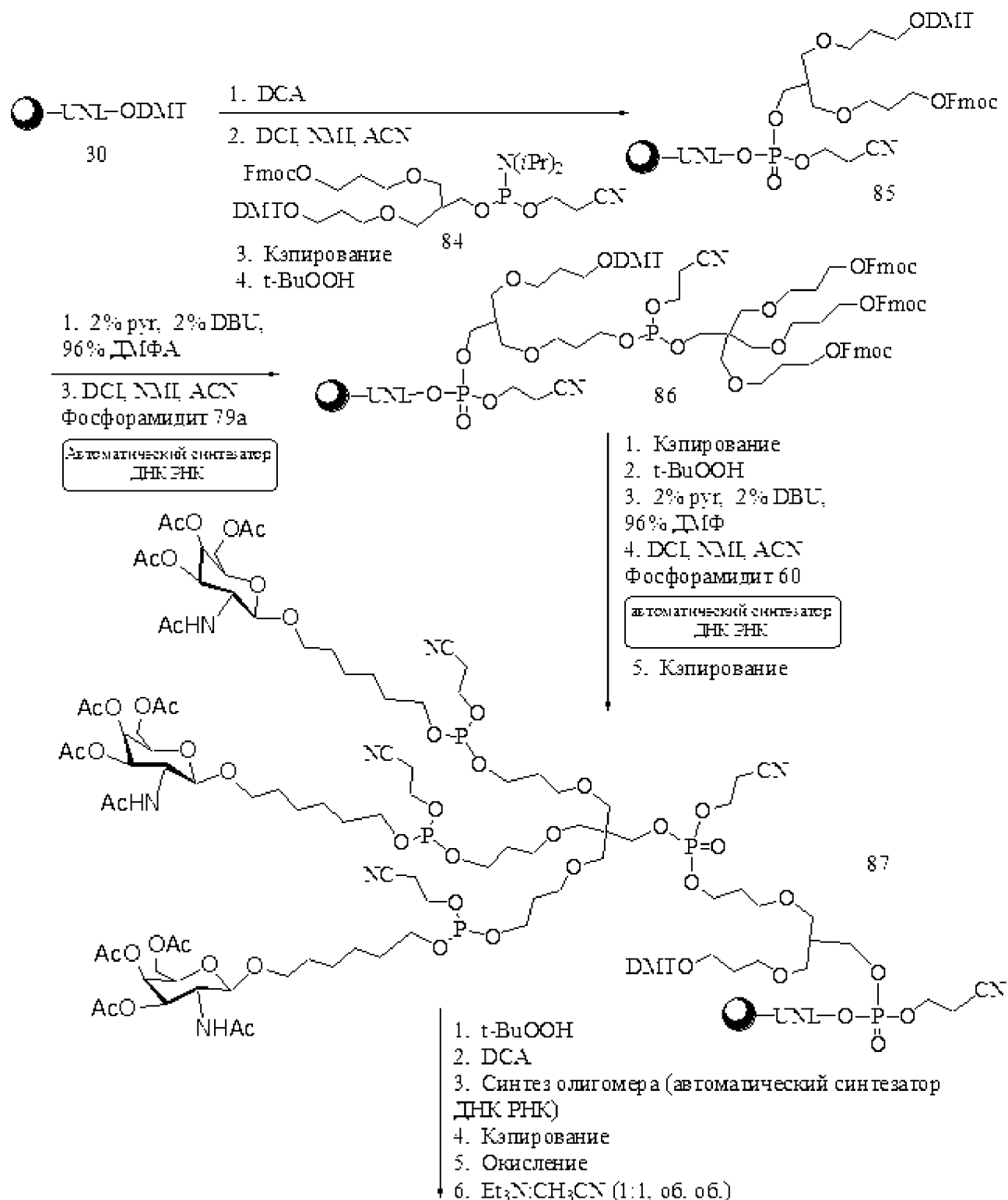
где GalNAc<sub>3</sub>-3 имеет структуру:

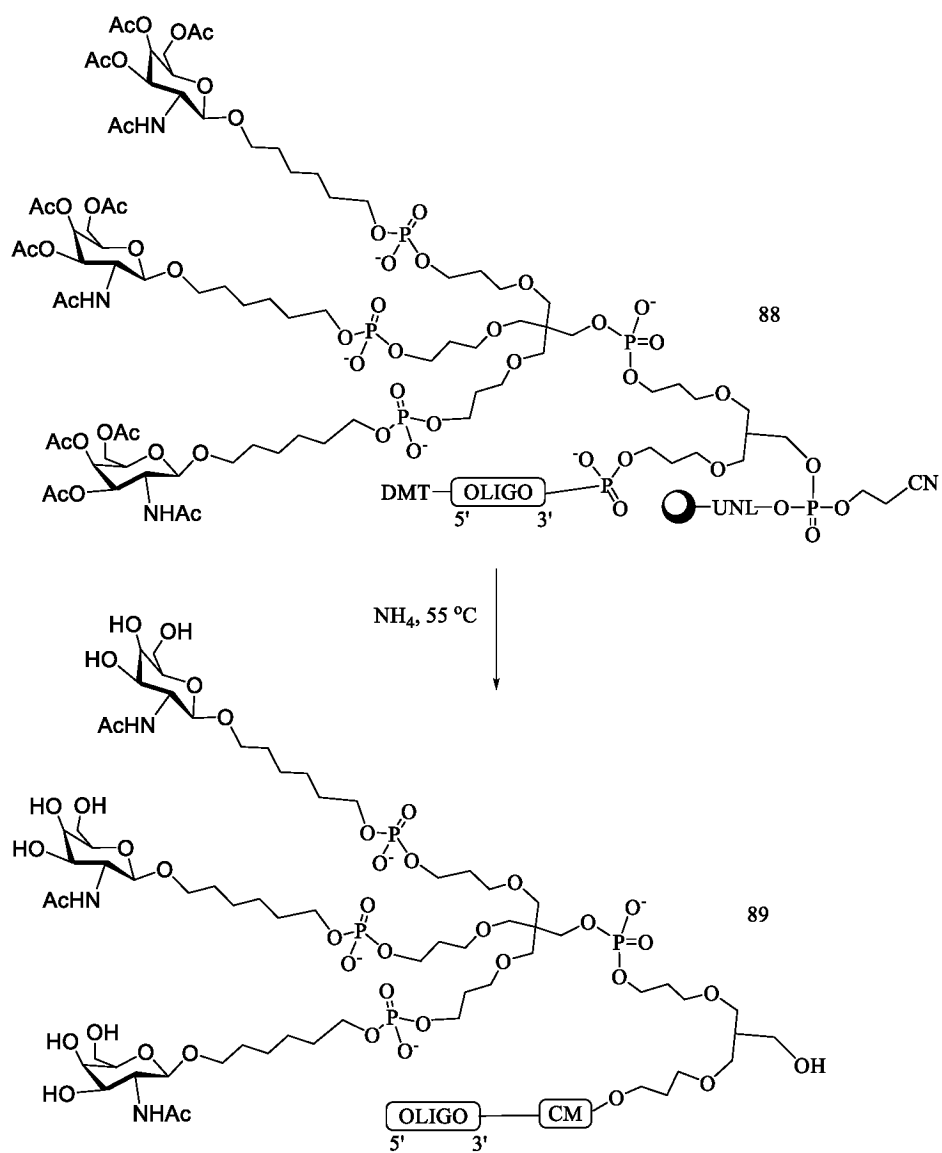


Кластерная часть GalNAc<sub>3</sub> конъюгирующей группы GalNAc<sub>3</sub>-3 (GalNAc<sub>3</sub>-3<sub>a</sub>) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных конъюгирующих групп. При этом GalNAc<sub>3</sub>-3<sub>a</sub> имеет формулу:

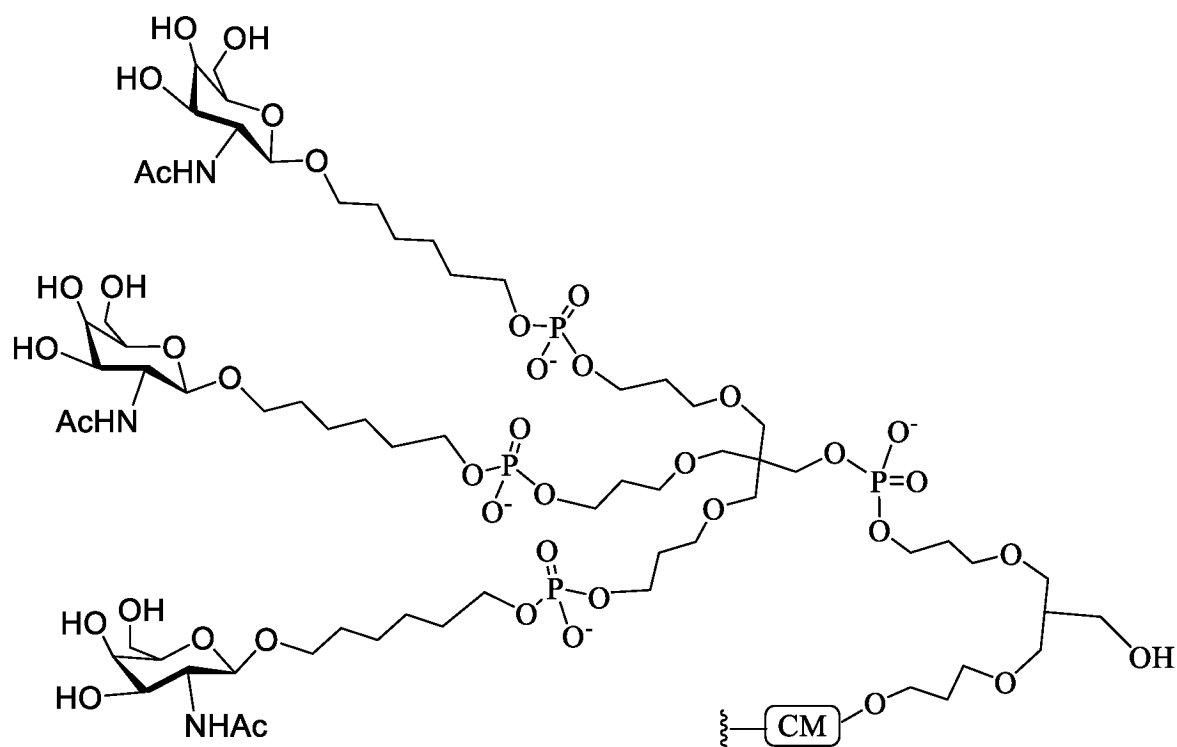


**Пример 40. Общий способ получения олигомерного соединения 89, содержащего фосфодиэфир-связанный конъюгат GalNAc3-4 на 3'-конце, на твердой подложке**

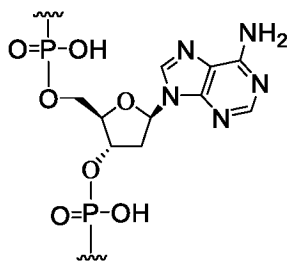




где GalNAc<sub>3</sub>-4 имеет структуру:

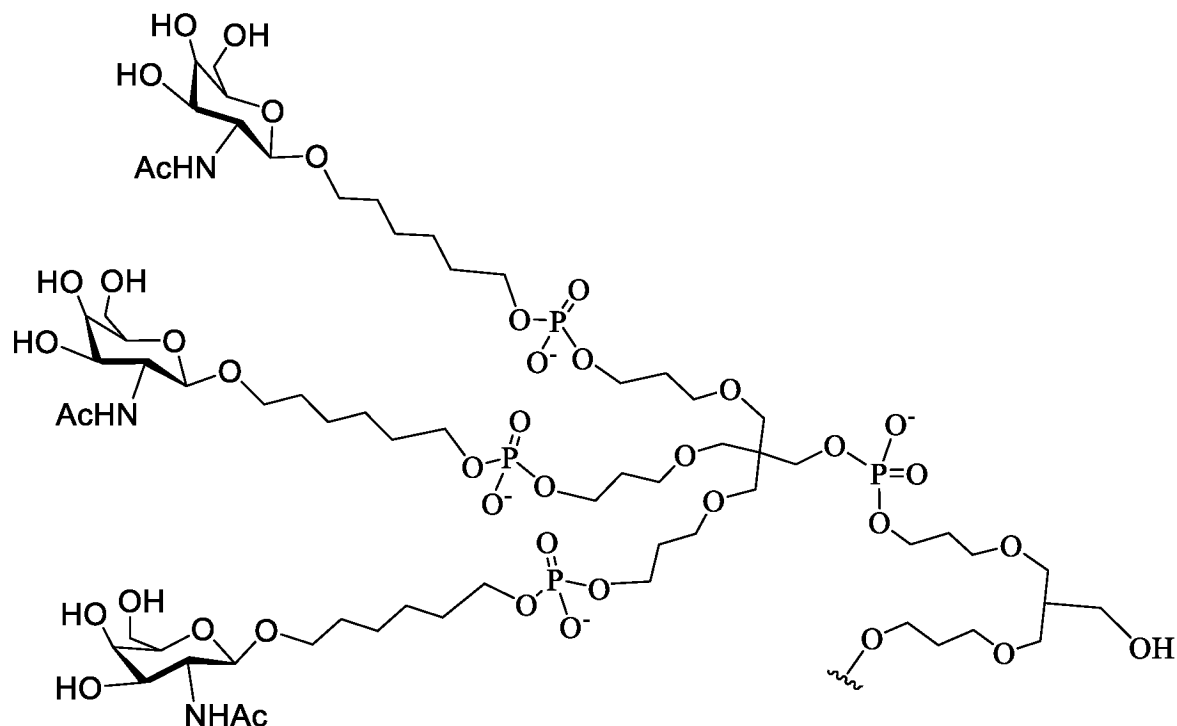


Где CM представляет собой расщепляемый фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент представляет собой:



Кластерная часть GalNAc<sub>3</sub> конъюгирующей группы GalNAc<sub>3</sub>-4 (GalNAc<sub>3</sub>-4<sub>a</sub>) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных конъюгирующих групп. При этом GalNAc<sub>3</sub>-4<sub>a</sub> имеет формулу:





Защищенное Соединение 30 на функционализированной твердой подложке Unylinker имеется в продаже. Соединение 84 получили по таким же способам, как описаны в литературе (см. Shchepinov *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22), 4447-4454; Shchepinov *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 1999, 27, 3035-3041; и Hornet *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 1997, 25, 4842-4849).

Фосфорамидитные строительные блоки, Соединения 60 и 79а, получили по способам, представленным в Примерах 28 и 36. Изображенные фосфорамидиты являются иллюстративными и не предназначены для ограничения, поскольку могут быть применены другие фосфорамидитные строительные блоки для получения олигомерного соединения, имеющего фосфодиэфир-связанный конъюгат на 3'-конце, которое имеет желаемую последовательность и состав. Порядок и количество фосфорамидитов, добавляемых к твердой подложке, может быть подобрано для получения олигомерных соединений,

описанных в настоящем документе, которые имеют любую желаемую последовательность и состав.

**Пример 41. Общий способ получения ASO, содержащих фосфодиэфир-связанный конъюгат GalNAc<sub>3</sub>-2 (см. Пример 37, Vx представляет собой аденин) в 5'-положении, по твердофазному способу (получение ISIS 661134)**

Если не указано иное, все реагенты и растворы, примененные для синтеза олигомерных соединений, приобретены у коммерческих поставщиков. Стандартные фосфорамидитные строительные блоки и твердую подложку применили для внедрения нуклеозидных остатков, которые включают, например, остатки T, A, G и <sup>m</sup>C. Фосфорамидитные соединения 56 и 60 применили для синтеза фосфодиэфир-связанного конъюгата GalNAc<sub>3</sub>-2 на 5'-конце. 0,1 М раствор фосфорамидита в безводном ацетонитриле применили для β-D-2'-дезоксирибонуклеозида и 2'-МОЕ.

Синтез антисмысловых олигонуклеотидов (ASO) выполнили на синтезаторе ABI 394 (в масштабе 1-2 мкмоль) или на синтезаторе ÄKTA Oligopilot производства GE Healthcare Bioscience (в масштабе 40-200 мкмоль) по способу фосфорамидитного связывания на твердой подложке VIMAD (110 мкмоль/г, Guzaev *et al.*, 2003), упакованной в колонку. Для стадии связывания фосфорамидиты вводили в 4-кратном избытке по сравнению с первоначальной загрузкой на твердой подложке, а связывание фосфорамидита выполняли в течение 10 минут. Все остальные стадии выполняли по протоколам, предоставленным производителем. Для удаления диметокситритильных (DMT) групп с 5'-гидроксильных групп нуклеотида применили 6% раствор дихлоруксусной кислоты в толуоле. На стадии связывания в качестве активатора применили 4,5-дицианоимидазол (0,7 М) в безводном CH<sub>3</sub>CN. Тиофосфатные связи внедряли сульфированием при помощи 0,1 М раствора гидрида ксантана в 1:1 смеси пиридина/CH<sub>3</sub>CN в течение 3 минут времени контакта. В качестве окислительного агента для обеспечения фосфодиэфирных межнуклеозидных связей применили 20% раствор *трет*-бутилгидропероксида в CH<sub>3</sub>CN, содержащий 6% воды, в течение 12 минут времени контакта.

После сборки желаемой последовательности цианоэтил-фосфатные защитные группы снимали при помощи 20% диэтиламина в толуоле (об./об.) в течение 45 минут времени контакта. Связанные с твердой подложкой ASO суспендировали в водном растворе аммиака (28-30 масс. %) и нагревали при 55 °C в течение 6 часов.

Затем отфильтровывали не связанные ASO и выпаривали аммиак кипячением. Остаток очищали жидкостной хроматографией высокого давления на сильной анионообменной колонке (GE Healthcare Bioscience, Source 30Q, 30 мкм, 2,54 x 8 см, A = 100 mM ацетата аммония в 30% водном CH<sub>3</sub>CN, B = 1,5 M NaBr в A, 0-40% B за 60 мин., скорость потока 14 мл.мин<sup>-1</sup>, λ = 260 нм). Остаток обессоливали при помощи ВЭЖХ на обращенно-фазовой колонке с получением желаемых ASO с выделенным выходом 15-30% относительно первоначальной загрузки на твердую подложку. ASO характеризовали при помощи ион-парной ВЭЖХ, совмещенной с МС-анализом на системе Agilent 1100 MSD.

Таблица 21

**ASO, содержащие фосфодиэфир-связанный конъюгат GalNAc<sub>3</sub>-2 в 5'-положении, нацеленные на SRB-1**

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Расчетная масса	Наблюдаемая масса	SEQ ID NO.
661134	<b>GalNAc<sub>3</sub>-2<sub>a</sub>-</b> o'A <sub>ds</sub> T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>ks</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>k</sub>	6482,2	6481,6	26

Нижние индексы: «e» означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид; «d» означает β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; «k» означает 6'-(S)-CH<sub>3</sub> бициклический нуклеозид (например, cEt); «s» означает тиофосфатные межнуклеозидные связи (PS); «o» означает фосфодиэфирные межнуклеозидные связи (PO); и «o'» означает -O-P(=O)(OH)-. Верхний индекс «m» означает 5-метилцитозины. Структура GalNAc<sub>3</sub>-2<sub>a</sub> представлена в Примере 37.

**Пример 42. Общий способ получения ASO, содержащих конъюгат GalNAc<sub>3</sub>-3 в 5'-положении, по твердофазным методикам (получение ISIS 661166)**

Синтез ISIS 661166 выполнили по таким же способам, как представлены в Примерах 39 и 41.

ISIS 661166 представляет собой 5-10-5 МОЕ гэпмер, в котором 5'-положение содержит конъюгат GalNAc<sub>3</sub>-3. Это ASO характеризовали при помощи ион-парной ВЭЖХ, совмещенной с МС-анализом на системе Agilent 1100 MSD.

Таблица 21а

**ASO, содержащее конъюгат GalNAc<sub>3</sub>-3 в 5'-положении через гексиламино-фосфодиэфирную связь, нацеленное на Malat-1**

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Конъюгат	Расчетная масса	Наблюдаемая масса	SEQ ID NO.
661166	5'-GalNAc <sub>3</sub> -3 <sub>a-o</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> G <sub>es</sub> G <sub>es</sub> T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> mC <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> mC <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>es</sub> A <sub>es</sub> A <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>e</sub>	<b>5'-GalNAc<sub>3</sub>-3</b>	8992,16	8990,51	27

Нижние индексы: «e» означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид; «d» означает β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; «s» означает тиофосфатные межнуклеозидные связи (PS); «o» означает фосфодиэфирные межнуклеозидные связи (PO); и «o'» означает -O-P(=O)(OH)-. Верхний индекс «m» означает 5-метилцитозины. Структура «5'-GalNAc<sub>3</sub>-3<sub>a</sub>» представлена в Примере 39.

**Пример 43 Дозозависимое исследование фосфодиэфир-связанного GalNAc<sub>3</sub>-2 (см. Примеры 37 и 41, Vx представляет собой аденин) на 5'-конце, нацеленного на SRB-1, *in vivo***

ISIS 661134 (см. Пример 41), содержащий фосфодиэфир-связанный конъюгат GalNAc<sub>3</sub>-2 на 5'-конце, испытывали в дозозависимом исследовании на антисмысловое ингибирование SRB-1 у мышей. Неконъюгированные ISIS 440762 и 651900 (конъюгат GalNAc<sub>3</sub>-1 у 3'-коца, см. Пример 9) включены в исследование для сравнения и описаны ранее в Таблице 4.

*Лечение*

Шестинедельным самцам мышей Balb/c (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) ввели однократную подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, соединения ISIS 440762, 651900, 661134 или PBS в качестве контрольного образца. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей умертвили через 72 часов после последнего введения для определения уровней мРНК SRB-1 в печени при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Уровни мРНК SRB-1 определяли относительно общей РНК (при помощи Ribogreen), затем нормализовали к контрольному образцу, обработанному PBS. Результаты, показанные ниже, представлены

как средний процент уровней мРНК SRB-1 для каждой экспериментальной группы, нормализованных к контрольному образцу, обработанному PBS, и обозначены как «% PBS». ED<sub>50</sub> измеряли по таким же способам, как описаны ранее, и они представлены ниже.

Как показано в Таблице 22, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК SRB-1 дозозависимым образом. Действительно, антисмысловые олигонуклеотиды, содержащие фосфодиэфир-связанный конъюгат GalNAc<sub>3</sub>-2 на 5'-конце (ISIS 661134) или конъюгат GalNAc<sub>3</sub>-1, связанный на 3'-конце (ISIS 651900), демонстрируют значительное улучшение эффективности, по сравнению с неконъюгированным антисмысловым олигонуклеотидом (ISIS 440762). Кроме того, ISIS 661134, который содержит фосфодиэфир-связанный конъюгат GalNAc<sub>3</sub>-2 на 5'-конце, был настолько же эффективным, как ISIS 651900, который содержит конъюгат GalNAc<sub>3</sub>-1 на 3'-конце.

Таблица 22

ASO, содержащие GalNAc<sub>3</sub>-1 или GalNAc<sub>3</sub>-2, нацеленные на SRB-1

ISIS №	Доза (мг/кг)	Уровни мРНК SRB-1 (% PBS)	ED <sub>50</sub> (мг/кг)	Конъюгат	SEQ ID NO.
PBS	0	100	--	--	
440762	0,2	116	2,58	Без конъюгата	22
	0,7	91			
	2	69			
	7	22			
	20	5			
651900	0,07	95	0,26	3' GalNAc <sub>3</sub> -1	23
	0,2	77			
	0,7	28			
	2	11			
	7	8			
661134	0,07	107	0,25	5' GalNAc <sub>3</sub> -2	26
	0,2	86			
	0,7	28			
	2	10			
	7	6			

Структуры 3' GalNAc<sub>3</sub>-1 и 5' GalNAc<sub>3</sub>-2 описаны ранее в Примерах 9 и 37.

*Фармакокинетический анализ (ФК)*

ФК для ASO из группы высокой дозы (7 мг/кг) исследовали и оценили таким же образом, как описано в Примере 20. Образцы печени измельчили и экстрагировали по стандартным протоколам. Идентифицировали метаболиты полной длины 661134 (5' GalNAc<sub>3</sub>-2) и ISIS 651900 (3' GalNAc<sub>3</sub>-1) и подтвердили их массы при помощи масс-спектрометрического анализа высокого разрешения. Результаты показали, что основной метаболит, обнаруженный для ASO, содержащего фосфодиэфир-связанный конъюгат GalNAc<sub>3</sub>-2 на 5'-конце (ISIS 661134), представлял собой ISIS 440762 (данные не показаны). Не наблюдали никаких дополнительных метаболитов в обнаруживаемом количестве. В отличие от него, для ASO, содержащего конъюгат GalNAc<sub>3</sub>-1 на 3'-конце (ISIS 651900), наблюдали дополнительные метаболиты, аналогичные тем, которые описаны ранее в Таблице 10а. Эти результаты позволяют предположить, что наличие фосфодиэфир-связанного конъюгата GalNAc<sub>3</sub>-1 или GalNAc<sub>3</sub>-2 может улучшать ФК профиль ASO без ухудшения их эффективности.

**Пример 44. Влияние PO/PS связей на антисмысловое ингибирование ASO, содержащих конъюгат GalNAc<sub>3</sub>-1 (см. Пример 9) на 3'-конце, нацеленных на SRB-1**

ISIS 655861 и 655862, содержащие конъюгат GalNAc<sub>3</sub>-1 на 3'-конце, каждый из которых нацелен на SRB-1, испытали в исследовании однократного введения на их способность ингибировать SRB-1 у мышей. Исходное неконъюгированное соединение, ISIS 353382, включили в исследование для сравнения.

Эти ASO представляют собой 5-10-5 МОЕ гэпмеры, в которых гэп-область содержит десять 2'-дезоксирибонуклеозидов, и каждая область крыльев содержит пять 2'-МОЕ модифицированных нуклеозидов. Эти ASO получили по таким же способам, как показаны ранее в Примере 19, и они описаны ниже в Таблице 23.

**Таблица 23**

**Модифицированные ASO, содержащие конъюгат GalNAc<sub>3</sub>-1 на 3'-конце, нацеленные на SRB-1**

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Химизм	SE Q ID NO

353382 (исходно е)	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_e$ $s T_{es} T_e$	Только PS, без конъюгат а	28
655861	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_e$ $s T_{es} T_{eo} A_{do}'-GalNAc3-1a$	Только PS с конъюгат ом <b>GalNAc3- 1</b>	29
655862	$G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $m C_{ds} T_{ds} T_{eo}^m C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_{eo} A_{do}'-GalNAc3-1a$	Смешанн ые PS/PO с конъюгат ом <b>GalNAc3- 1</b>	29

Нижние индексы: «e» означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид; «d» означает β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; «s» означает тиофосфатные межнуклеозидные связи (PS); «o» означает фосфодиэфирные межнуклеозидные связи (PO); и «o'» означает -O-P(=O)(OH)-. Верхний индекс «m» означает 5-метилцитозины. Структура «GalNAc3-1» представлена в Примере 9.

### Лечение

Шестинедельным самцам мышей Balb/c (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) ввели однократную подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, соединения ISIS 353382, 655861, 655862 или PBS в качестве контрольного образца. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Перед лечением, а также после последней дозы у каждой мыши брали кровь и анализировали образцы плазмы. Мышей умертвили через 72 часов после последнего введения для определения уровней мРНК SRB-1 в печени при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Уровни мРНК SRB-1 определяли относительно общей РНК (при помощи Ribogreen), затем нормализовали к контрольному образцу, обработанному PBS. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней мРНК SRB-1 для каждой экспериментальной группы, нормализованных к контрольному образцу, обработанному PBS, и обозначены как «% PBS». ED<sub>50</sub> измеряли по таким же способам, как описаны ранее, и они представлены ниже.

Как показано в Таблице 24, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК SRB-1 дозозависимым образом, по сравнению с контрольным образцом, обработанным PBS. Действительно, антисмысловые олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc<sub>3</sub>-1 на 3'-конце (ISIS 655861 и 655862), демонстрируют значительное усиление эффективности, по сравнению с неконъюгированным антисмысловым олигонуклеотидом (ISIS 353382). Кроме того, ISIS 655862 со смешанными PS/PO связями демонстрирует усиление эффективности, по сравнению с соединением, содержащим только PS (ISIS 655861).

Таблица 24

**Влияние PO/PS связей на антисмысловое ингибирование ASO, содержащих конъюгат GalNAc<sub>3</sub>-1 на 3'-конце, нацеленных на SRB-1**

ISIS №	Доза (мг/кг)	Уровни мРНК SRB-1 (% PBS)	ED <sub>50</sub> (мг/кг)	Химизм	SEQ ID NO.
PBS	0	100	--	--	
353382 (исходное)	3	76,65	10,4	Только PS, без конъюгата	28
	10	52,40			
	30	24,95			
655861	0,5	81,22	2,2	Только PS с конъюгатом GalNAc <sub>3</sub> -1	29
	1,5	63,51			
	5	24,61			
	15	14,80			
655862	0,5	69,57	1,3	Смешанные PS/PO с конъюгатом GalNAc <sub>3</sub> -1	29
	1,5	45,78			
	5	19,70			
	15	12,90			

Уровни трансаминазы в печени, аланин-аминотрансферазы (ALT) и аспартат-аминотрансферазы (AST) в сыворотке измеряли относительно мышей, инъецированных солевым раствором, применяя стандартные протоколы. Оценили также массу органов. Результаты показывают, что не наблюдали какого-либо увеличения уровней трансаминазы (Таблица 25) или массы органов (данные не показаны) у мышей, обработанных ASO, по сравнению с PBS контролем. Кроме того, ASO со смешанными PS/PO связями (ISIS 655862)



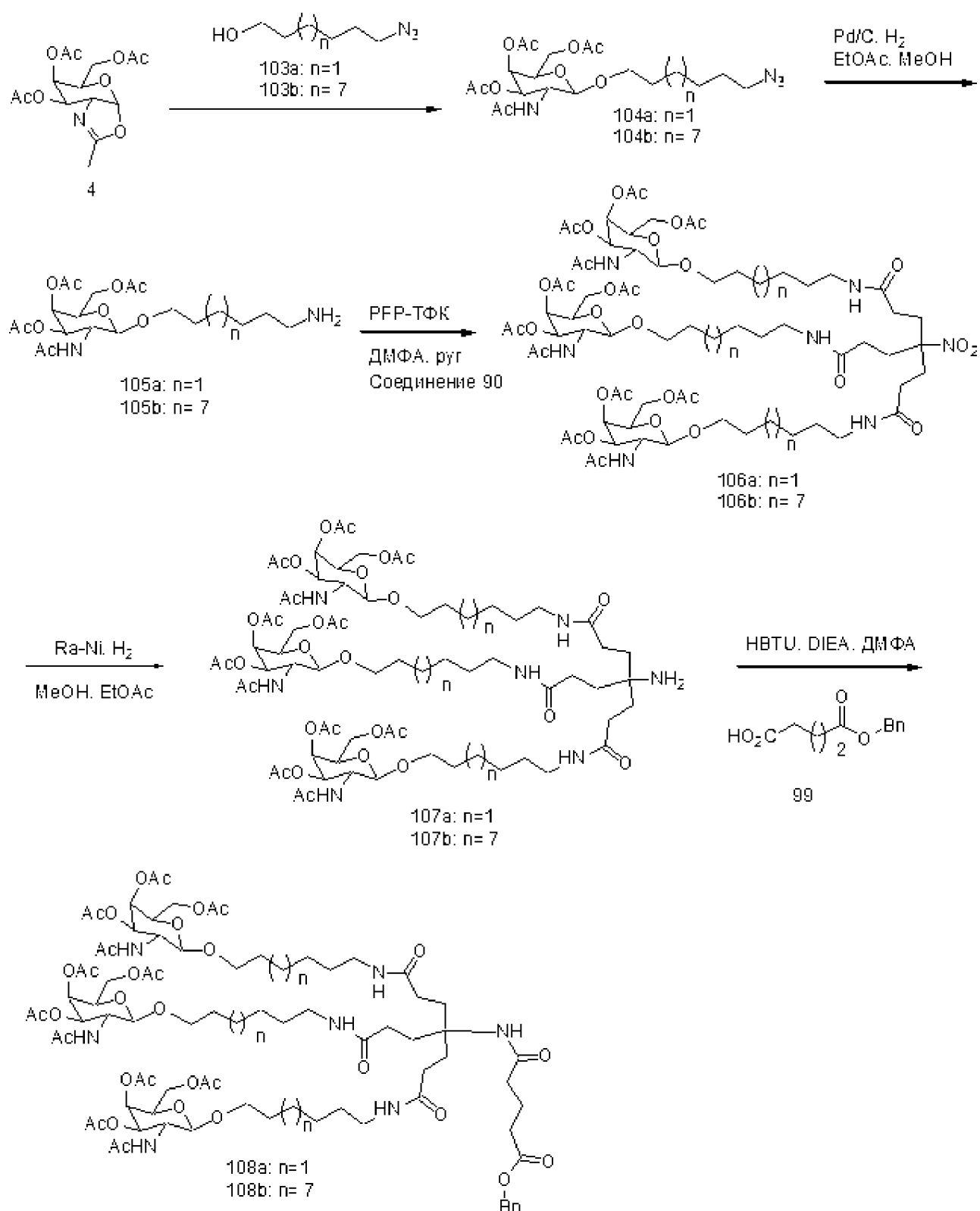
демонстрирует схожие уровни трансаминазы, по сравнению с соединением, содержащим только PS (ISIS 655861).

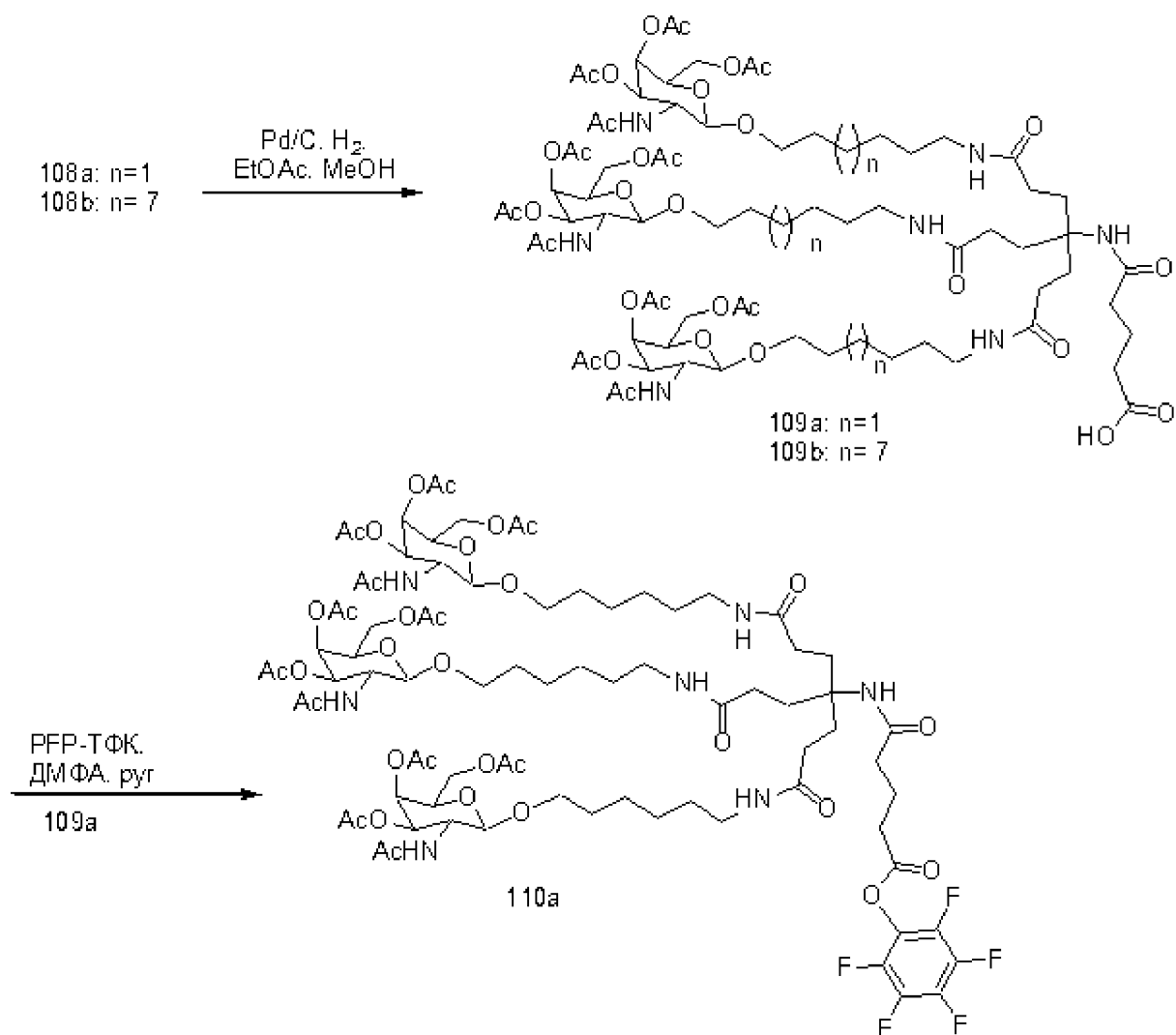
Таблица 25

**Влияние PO/PS связей на уровни трансаминазы ASO,  
содержащих конъюгат GalNAc<sub>3</sub>-1 на 3'-конце, нацеленных на SRB-1**

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Химизм	SEQ ID NO.
PBS	0	28,5	65	--	
353382 (исходное)	3	50,25	89	Только PS, без конъюгата	28
	10	27,5	79,3		
	30	27,3	97		
655861	0,5	28	55,7	Только PS с <b>GalNAc<sub>3</sub>-1</b>	29
	1,5	30	78		
	5	29	63,5		
	15	28,8	67,8		
655862	0,5	50	75,5	Смешанные PS/PO с <b>GalNAc<sub>3</sub>-1</b>	29
	1,5	21,7	58,5		
	5	29,3	69		
	15	22	61		

## Пример 45. Получение PFP эфира, Соединения 110a





Соединение 4 (9,5 г, 28,8 ммоль) обработали по отдельности соединением 103a или 103b (38 ммоль) и TMSOTf (0,5 экв.), и молекулярными ситами в дихлорметане (200 мл), и перемешивали в течение 16 часов при комнатной температуре. Затем органический слой отфильтровали через целит, затем промыли бикарбонатом натрия, водой и насыщенным соевым раствором. Затем отделили органический слой и высушили над сульфатом натрия, отфильтровали и упарили под пониженным давлением. Полученное маслянистое вещество очистили силикагелевой хроматографией (2%-->10% метанол/дихлорметан) с получением соединений 104a и 104b с выходом >80%. Данные ЖХМС и протонного ЯМР согласовались с указанной структурой.

Соединения 104a и 104b обработали в тех же условиях, что и соединения 100a-d (Пример 47), с получением соединений 105a и 105b с выходом >90%. Данные ЖХМС и протонного ЯМР согласовались с указанной структурой.

Соединения 105a и 105b по отдельности обработали соединением 90 при тех же условиях, что и соединения 901a-d, с получением соединений 106a (80%) и 106b (20%). Данные ЖХМС и протонного ЯМР согласовались с указанной структурой.

Соединения 106a и 106b обработали в тех же условиях, что и соединения 96a-d (Пример 47), с получением соединения 107a (60%) и 107b (20%). Данные ЖХМС и протонного ЯМР согласовались с указанной структурой.

Соединения 107a и 107b обработали в тех же условиях, что и соединения 97a-d (Пример 47), с получением соединений 108a и 108b с выходом 40-60%. Данные ЖХМС и протонного ЯМР согласовались с указанной структурой.

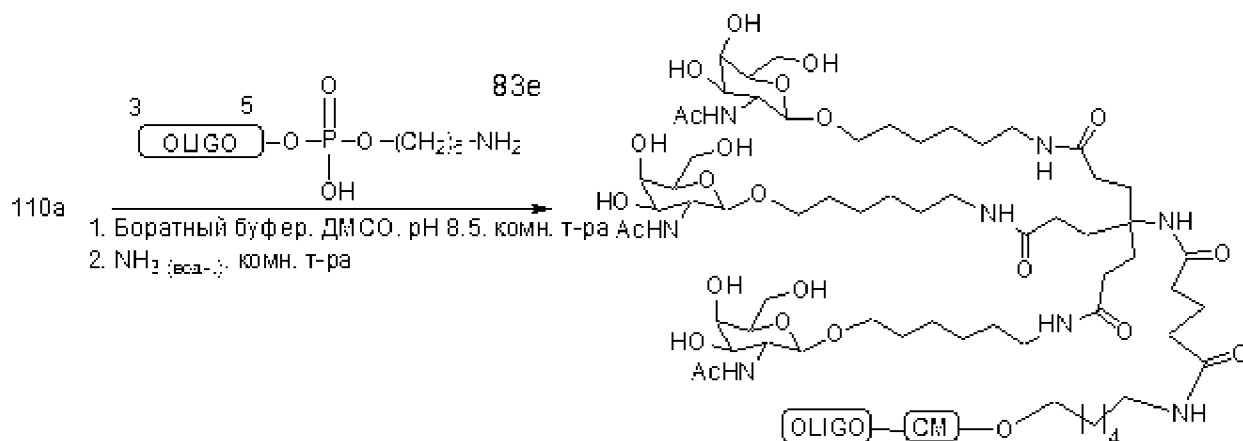
Соединения 108a (60%) и 108b (40%) обработали в тех же условиях, что и соединения 100a-d (Пример 47), с получением соединений 109a и 109b с выходом >80%. Данные ЖХМС и протонного ЯМР согласовались с указанной структурой.

Соединение 109a обработали в тех же условиях, что и соединения 101a-d (Пример 47), с получением соединения 110a с выходом 30-60%. Данные ЖХМС и протонного ЯМР согласовались с указанной структурой. Альтернативно, Соединение 110b может быть получено таким же образом, исходя из Соединения 109b.

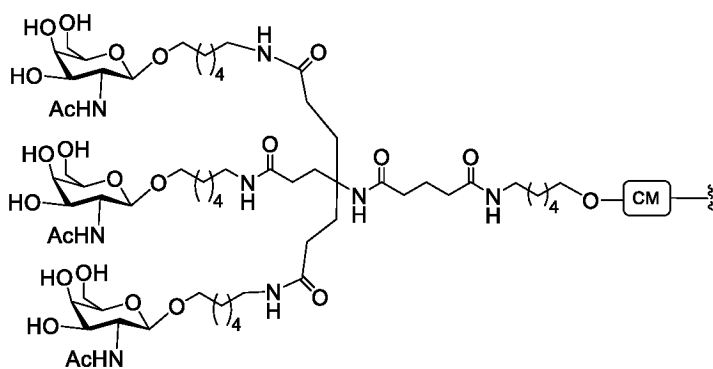
**Пример 46. Общий способ конъюгирования с PFP эфирами (олигонуклеотид 111); получение ISIS 666881 (GalNAc<sub>3</sub>-10)**

Синтезировали и очистили 5'-гексиламино-модифицированный олигонуклеотид по стандартным способам твердофазного получения олигонуклеотидов. 5'-Гексиламино-модифицированный олигонуклеотид растворили в 0,1 М растворе тетрабората натрия, pH 8,5 (200 мкл) и добавили 3 эквивалента выбранного PFP-эстерифицированного кластера GalNAc<sub>3</sub>, растворенного в ДМСО (50 мкл). Если при добавлении раствора ASO эфир PFP выпадал в осадок, то добавляли ДМСО до перехода всего эфира PFP в раствор. Реакция была завершена через около 16 часов перемешивания при комнатной температуре. Полученный раствор разбавили водой до 12 мл, а затем центрифугировали при 3000 об./мин. в центробежном фильтре с отсечением по массе 3000 Да. Этот прием повторили два раза для удаления низкомолекулярных примесей. Затем раствор лиофилизировали досуха и повторно растворили в концентрированном водном растворе аммиака, и перемешивали при комнатной температуре в течение 2,5 часов, затем концентрировали *in vacuo* для удаления большей части аммиака. Конъюгированный олигонуклеотид очистили

и обессолили при помощи ОФ-ВЭЖХ, и лиофилизировали с получением GalNAc<sub>3</sub> конъюгированного олигонуклеотида.



Олигонуклеотид 111 конъюгирован с GalNAc<sub>3</sub>-10. Кластерная часть GalNAc<sub>3</sub> конъюгирующей группы GalNAc<sub>3</sub>-10 (GalNAc<sub>3</sub>-10<sub>a</sub>) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных конъюгирующих групп. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент представляет собой -P(=O)(OH)-A<sub>d</sub>-P(=O)(OH)-, как показано ниже в олигонуклеотиде (ISIS 666881), синтезированном с GalNAc<sub>3</sub>-10. Структура GalNAc<sub>3</sub>-10 (GalNAc<sub>3</sub>-10<sub>a</sub>-CM-) представлена ниже:



По указанному общему способу получили ISIS 666881. Синтезировали и очистили 5'-гексиламино-модифицированный олигонуклеотид, ISIS 660254, по стандартным способам твердофазного получения олигонуклеотидов. ISIS 660254 (40 мг, 5,2 мкмоль) растворили в 0,1 М растворе тетрабората натрия, рН 8,5 (200 мкл) и добавили 3 эквивалента PFP эфира (Соединения 110а), растворенного в ДМСО (50 мкл). Эфир PFP выпал в осадок при добавлении раствора ASO, поэтому потребовалось добавление дополнительного количества ДМСО (600 мкл) для полного растворения PFP эфира. Реакция была завершена

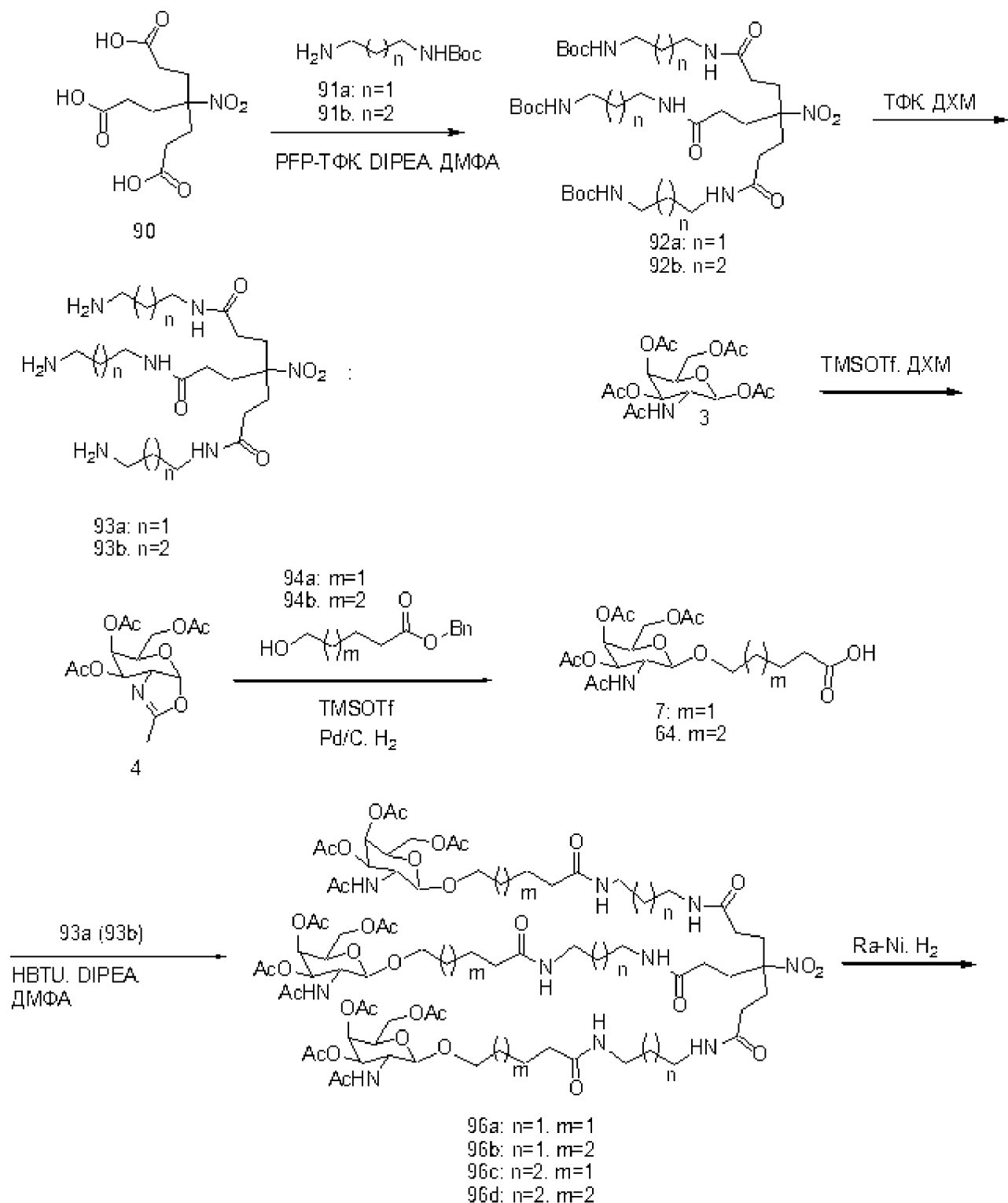
через 16 часов перемешивания при комнатной температуре. Раствор разбавили водой до общего объема 12 мл, а затем центрифугировали при 3000 об./мин. в центробежном фильтре с отсечением по массе 3000 Да. Этот прием повторили два раза для удаления низкомолекулярных примесей. Раствор лиофилизировали досуха и повторно растворили в концентрированном водном растворе аммиака, перемешивая при комнатной температуре в течение 2,5 часов, затем концентрировали *in vacuo* для удаления большей части аммиака. Конъюгированный олигонуклеотид очистили и обессолили при помощи ОФ-ВЭЖХ, и лиофилизировали с получением ISIS 666881 с выходом 90% по массе (42 мг, 4,7 мкмоль).

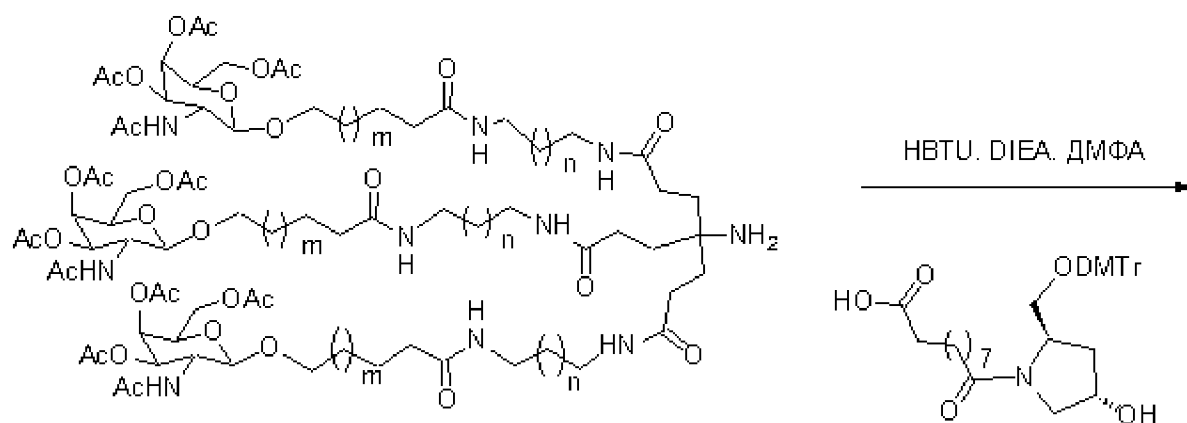
### GalNAc3-10-конъюгированный олигонуклеотид

ASO	Последовательность (от 5' к 3')	5'-группа	SSEQ ID No.
ISIS 660254	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6\text{-o-AdoG}_{\text{es}}^{\text{mC}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}^{\text{mC}_{\text{es}}\text{A}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}}$ $\text{mC}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}^{\text{mC}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{es}}^{\text{mC}_{\text{es}}\text{mC}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{e}}}$	Гексиламин	30
ISIS 666881	<b>GalNAc3-10a-o'-AdoG</b> $\text{es}^{\text{mC}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}^{\text{mC}_{\text{es}}\text{A}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}}$ $\text{mC}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}^{\text{mC}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{es}}^{\text{mC}_{\text{es}}\text{mC}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{e}}}$	<b>GalNAc3-10</b>	30

Заглавные буквы указывают азотистое основание для каждого нуклеотида, а <sup>m</sup>C означает 5-метилцитозин. Нижние индексы: «e» означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеотид; «d» означает β-D-2'-дезоксирибонуклеотид; «s» означает тиофосфатную межнуклеотидную связь (PS); «o» означает фосфодиэфирную межнуклеотидную связь (PO); и «o'» означает -O-P(=O)(OH)-. Конъюгирующие группы выделены жирным шрифтом.

**Пример 47. Получение олигонуклеотида 102, содержащего GalNAc3-8**





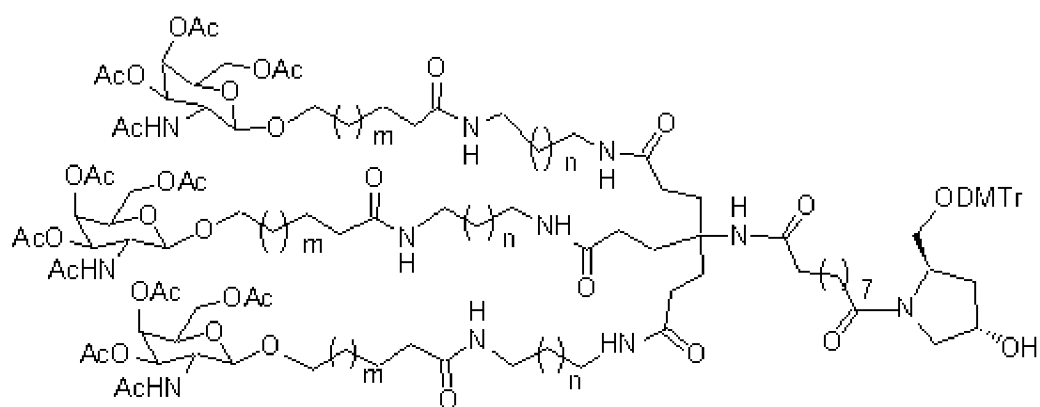
97a: n=1, m=1

97b: n=1, m=2

97c: n=2, m=1

97d: n=2, m=2

23



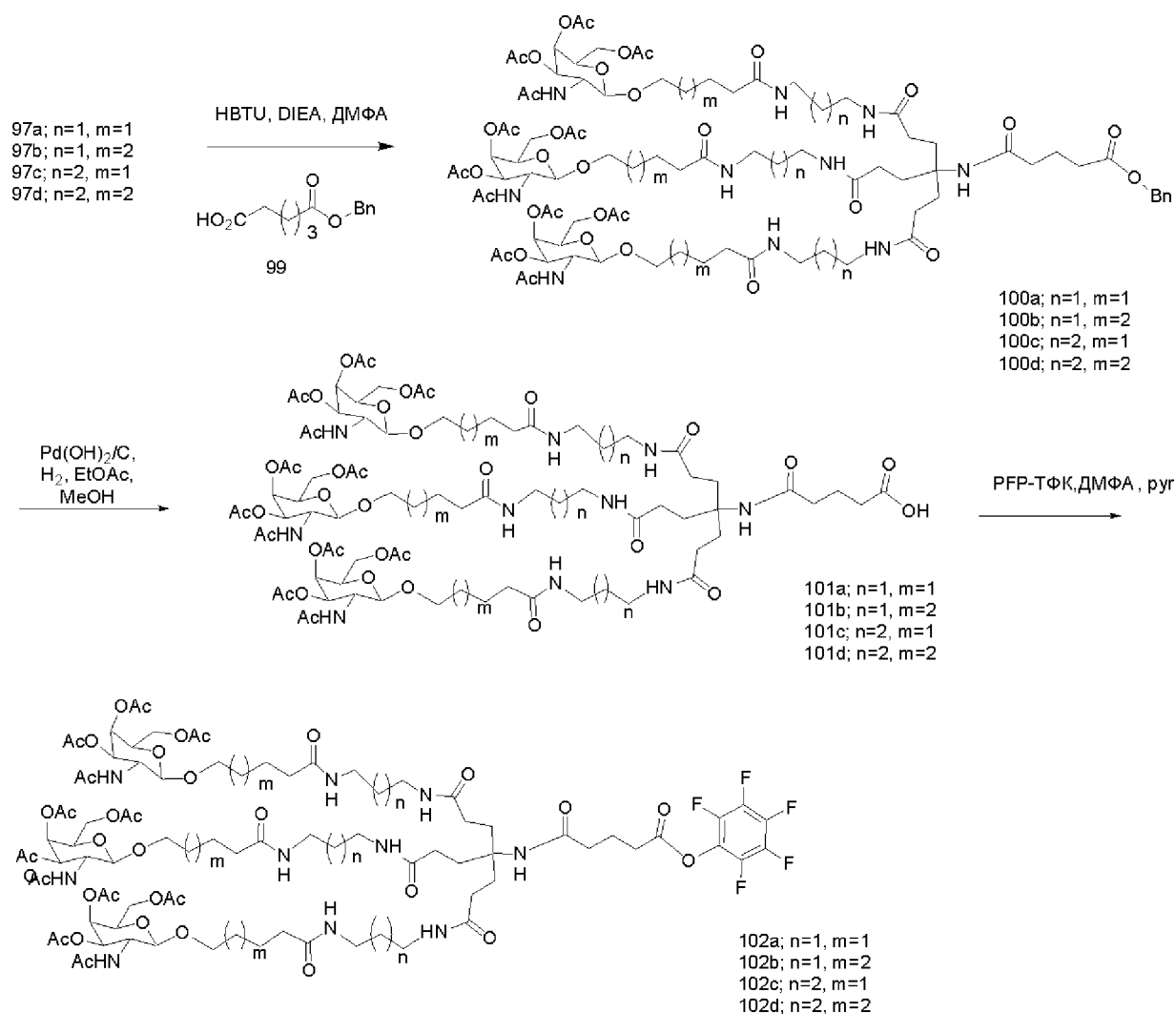
98a: n=1, m=1

98b: n=1, m=2

98c: n=2, m=1

98d: n=2, m=2





Трехкислотное соединение 90 (4 г, 14,43 ммоль) растворили в ДМФА (120 мл) и *N,N*-диизопропилэтиламине (12,35 мл, 72 ммоль). По каплям добавили пентафторфенила трифторацетат (8,9 мл, 52 ммоль) в атмосфере аргона и оставили реакционную смесь перемешиваться при комнатной температуре в течение 30 минут. Добавили Вос-диамин 91a или 91b (68,87 ммоль) вместе с *N,N*-диизопропилэтиламином (12,35 мл, 72 ммоль) и оставили реакционную смесь перемешиваться при комнатной температуре в течение 16 часов. Затем упарили ДМФА на >75% под пониженным давлением, а затем растворили смесь в дихлорметане. Органический слой промыли бикарбонатом натрия, водой и насыщенным солевым раствором. Затем отделили органический слой и высушили над сульфатом натрия, отфильтровали и упарили под пониженным давлением до маслянистого остатка. Полученное маслянистое вещество очистили силикагелевой хроматографией (2%->10% метанол/дихлорметан) с получением соединений 92a и 92b с приблизительным выходом 80%. Данные ЖХМС и протонного ЯМР согласовались с указанной структурой.

Соединение 92a или 92b (6,7 ммоль) обрабатывали 20 мл дихлорметана и 20 мл трифторуксусной кислоты при комнатной температуре в течение 16 часов. Полученный раствор выпарили, а затем растворили в метаноле и обрабатывали смолой DOWEX-OH в течение 30 минут. Полученный раствор отфильтровали и упарили до маслянистого вещества под пониженным давлением с получением 85-90% выхода соединений 93a и 93b.

Соединения 7 или 64 (9,6 ммоль) обрабатывали НВТУ (3,7 г, 9,6 ммоль) и *N,N*-диизопропилэтиламином (5 мл) в ДМФА (20 мл) в течение 15 минут. К смеси добавили либо соединение 93a, либо 93b (3 ммоль) и оставили перемешиваться при комнатной температуре на 16 часов. Затем упарили ДМФА на >75% под пониженным давлением, а затем растворили смесь в дихлорметане. Органический слой промыли бикарбонатом натрия, водой и насыщенным солевым раствором. Затем отделили органический слой и высушили над сульфатом натрия, отфильтровали и упарили под пониженным давлением до маслянистого остатка. Полученное маслянистое вещество очистили силикагелевой хроматографией (5%-->20% метанол/дихлорметан) с получением соединений 96a-d с выходом 20-40%. Данные ЖХМС и протонного ЯМР согласовались с указанной структурой.

Соединения 96a-d (0,75 ммоль) по отдельности гидрировали на никеле Ренея в течение 3 часов в этаноле (75 мл). Затем катализатор удалили фильтрованием через целит, а этанол удалили под пониженным давлением с получением соединений 97a-d с выходом 80-90%. Данные ЖХМС и протонного ЯМР согласовались с указанной структурой.

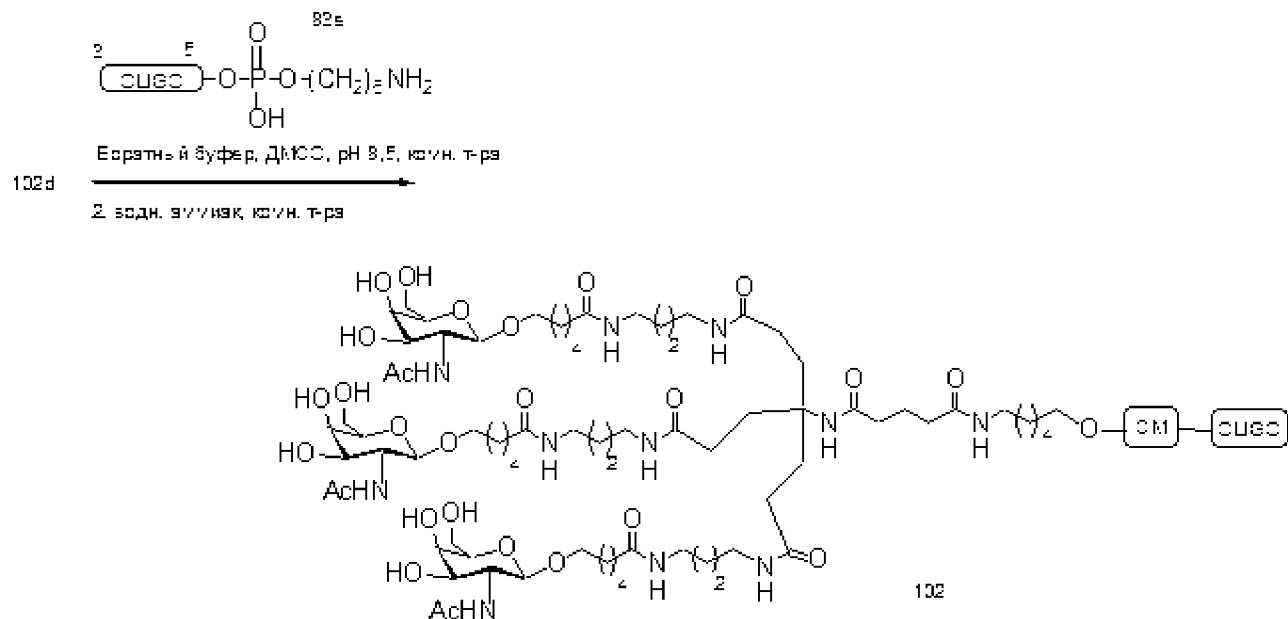
Соединение 23 (0,32 г, 0,53 ммоль) обрабатывали НВТУ (0,2 г, 0,53 ммоль) и *N,N*-диизопропилэтиламином (0,19 мл, 1,14 ммоль) в ДМФА (30 мл) в течение 15 минут. К смеси по отдельности добавили соединения 97a-d (0,38 ммоль) и оставили перемешиваться при комнатной температуре на 16 часов. Затем упарили ДМФА на >75% под пониженным давлением, а затем растворили смесь в дихлорметане. Органический слой промыли бикарбонатом натрия, водой и насыщенным солевым раствором. Затем отделили органический слой и высушили над сульфатом натрия, отфильтровали и упарили под пониженным давлением до маслянистого остатка. Полученное маслянистое вещество очистили силикагелевой хроматографией (2%-->20% метанол/дихлорметан) с получением соединений 98a-d с выходом 30-40%. Данные ЖХМС и протонного ЯМР согласовались с указанной структурой.

Соединение 99 (0,17 г, 0,76 ммоль) обрабатывали НВТУ (0,29 г, 0,76 ммоль) и *N,N*-диизопропилэтиламином (0,35 мл, 2,0 ммоль) в ДМФА (50 мл) в течение 15 минут. К смеси

по отдельности добавили соединения 97a-d (0,51 ммоль) и оставили перемешиваться при комнатной температуре на 16 часов. Затем упарили ДМФА на >75% под пониженным давлением, а затем растворили смесь в дихлорметане. Органический слой промыли бикарбонатом натрия, водой и насыщенным соевым раствором. Затем отделили органический слой и высушили над сульфатом натрия, отфильтровали и упарили под пониженным давлением до маслянистого остатка. Полученное маслянистое вещество очистили силикагелевой хроматографией (5%-->20% метанол/дихлорметан) с получением соединений 100a-d с выходом 40-60%. Данные ЖХМС и протонного ЯМР согласовались с указанной структурой.

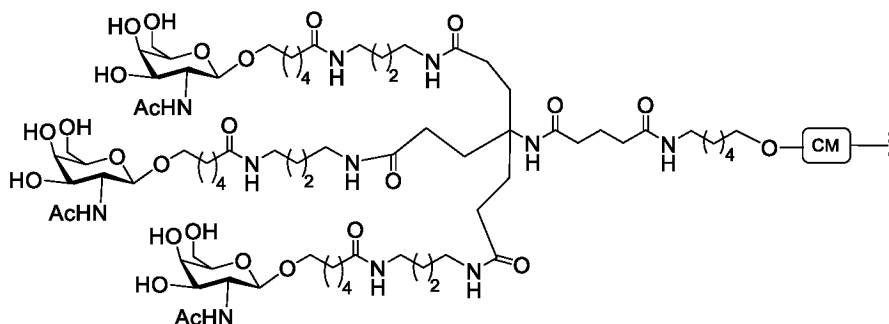
Соединения 100a-d (0,16 ммоль) по отдельности гидрировали на 10% Pd(OH)<sub>2</sub>/C в течение 3 часов в метаноле/этилацетате (1:1, 50 мл). Затем катализатор удалили фильтрованием через целит, а органические растворители удалили под пониженным давлением с получением соединений 101a-d с выходом 80-90%. Данные ЖХМС и протонного ЯМР согласовались с указанной структурой.

Соединения 101a-d (0,15 ммоль) по отдельности растворили в ДМФА (15 мл) и пиридине (0,016 мл, 0,2 ммоль). По каплям добавили пентафторфенила трифторацетат (0,034 мл, 0,2 ммоль) в атмосфере аргона и оставили реакционную смесь перемешиваться при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем упарили ДМФА на >75% под пониженным давлением, а затем растворили смесь в дихлорметане. Органический слой промыли бикарбонатом натрия, водой и насыщенным соевым раствором. Затем отделили органический слой и высушили над сульфатом натрия, отфильтровали и упарили под пониженным давлением до маслянистого остатка. Полученное маслянистое вещество очистили силикагелевой хроматографией (2%-->5% метанол/дихлорметан) с получением соединений 102a-d с приблизительным выходом 80%. Данные ЖХМС и протонного ЯМР согласовались с указанной структурой.

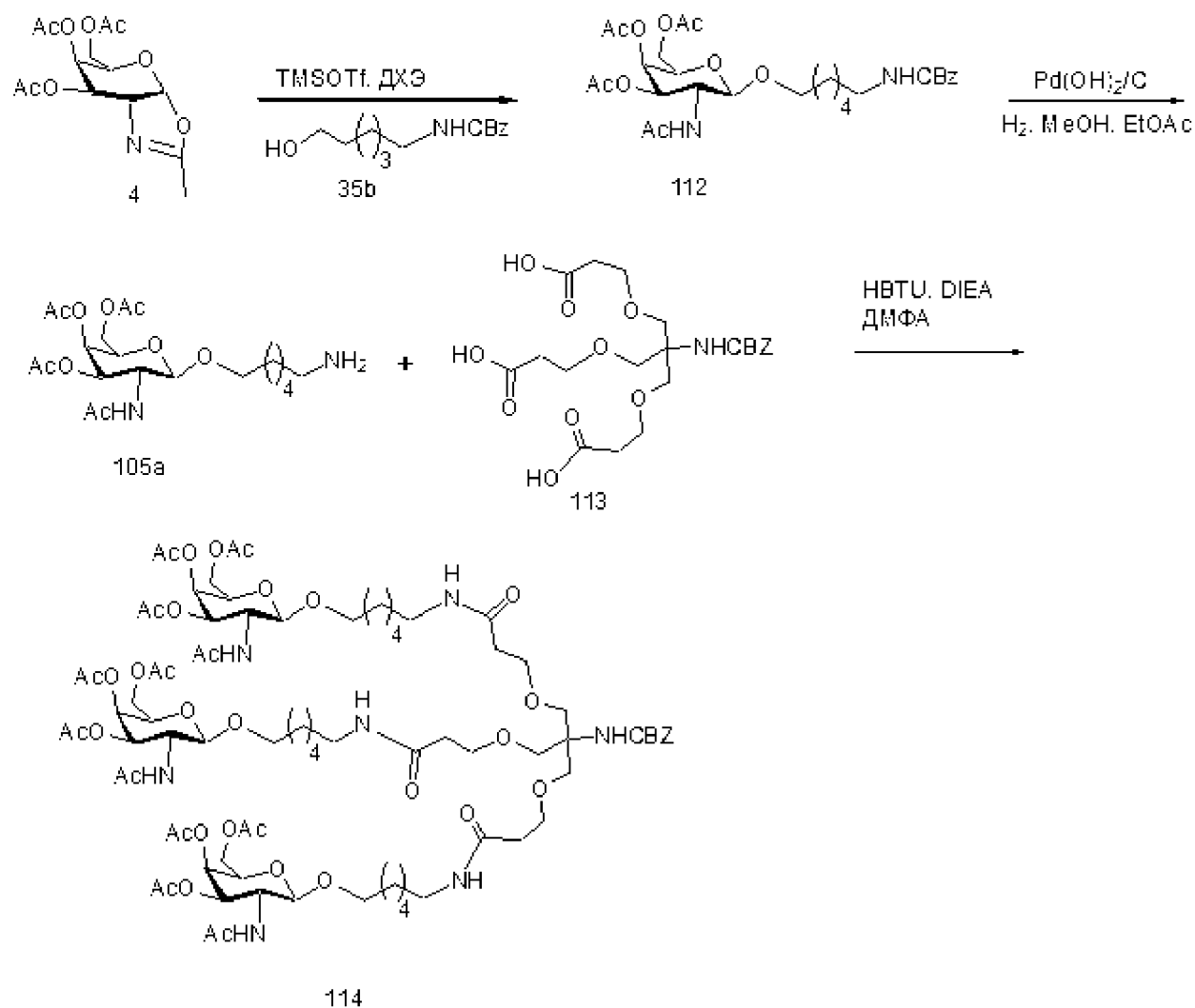


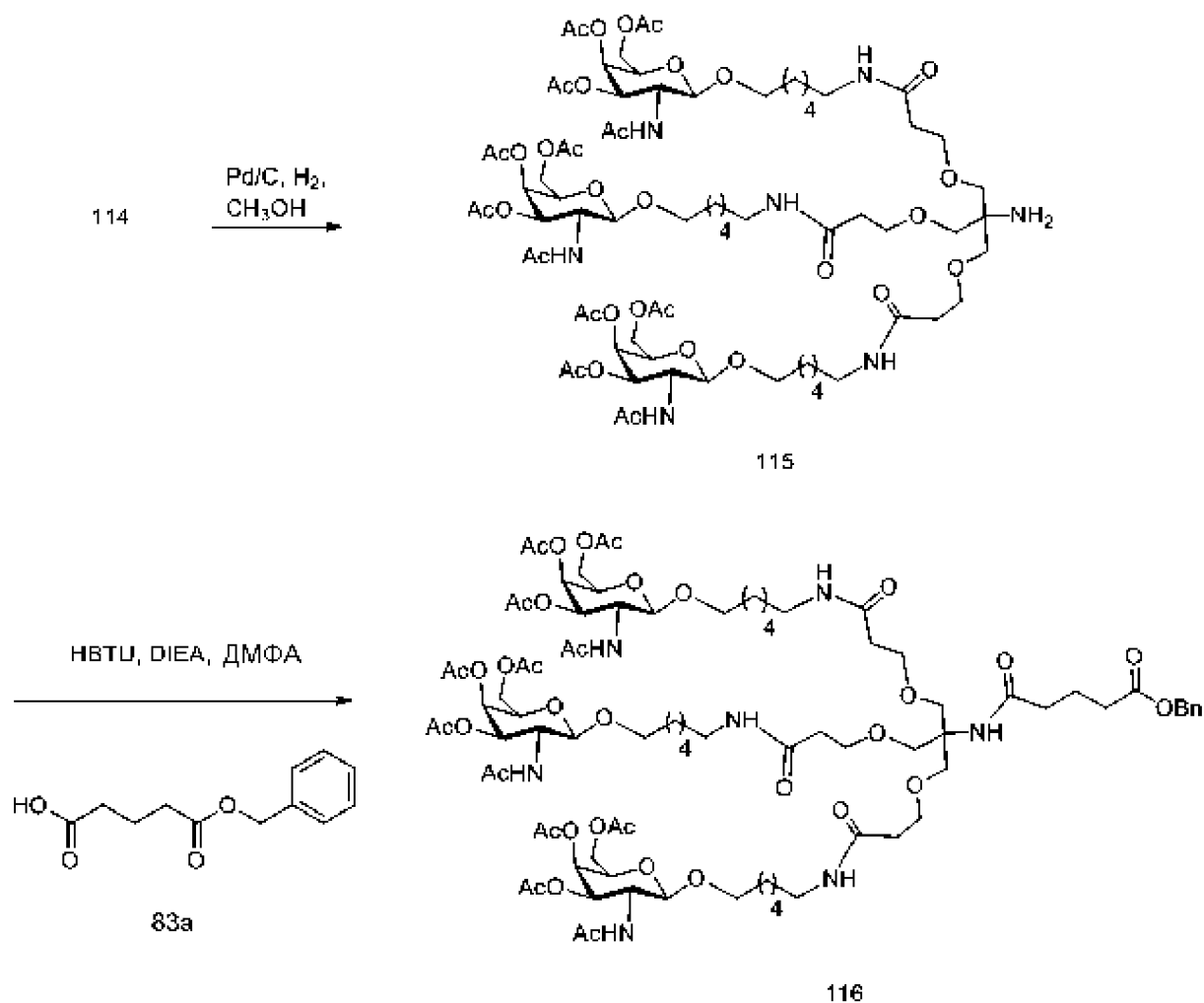
Олигомерное Соединение 102, содержащее конъюгирующую группу GalNAc<sub>3</sub>-8, получили по общим способам, представленным в Примере 46. Кластерная часть GalNAc<sub>3</sub> конъюгирующей группы GalNAc<sub>3</sub>-8 (GalNAc<sub>3</sub>-8<sub>a</sub>) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом для получения различных конъюгирующих групп. В предпочтительном варианте реализации изобретения расщепляемый фрагмент представляет собой -P(=O)(OH)-A<sub>d</sub>-P(=O)(OH)-.

Структура GalNAc<sub>3</sub>-8 (GalNAc<sub>3</sub>-8<sub>a</sub>-CM-) представлена ниже:



**Пример 48. Получение олигонуклеотида 119, содержащего GalNAc<sub>3</sub>-7**





Соединение 112 синтезировали по способу, описанному в литературе (*J. Med. Chem.* 2004, 47, 5798-5808).

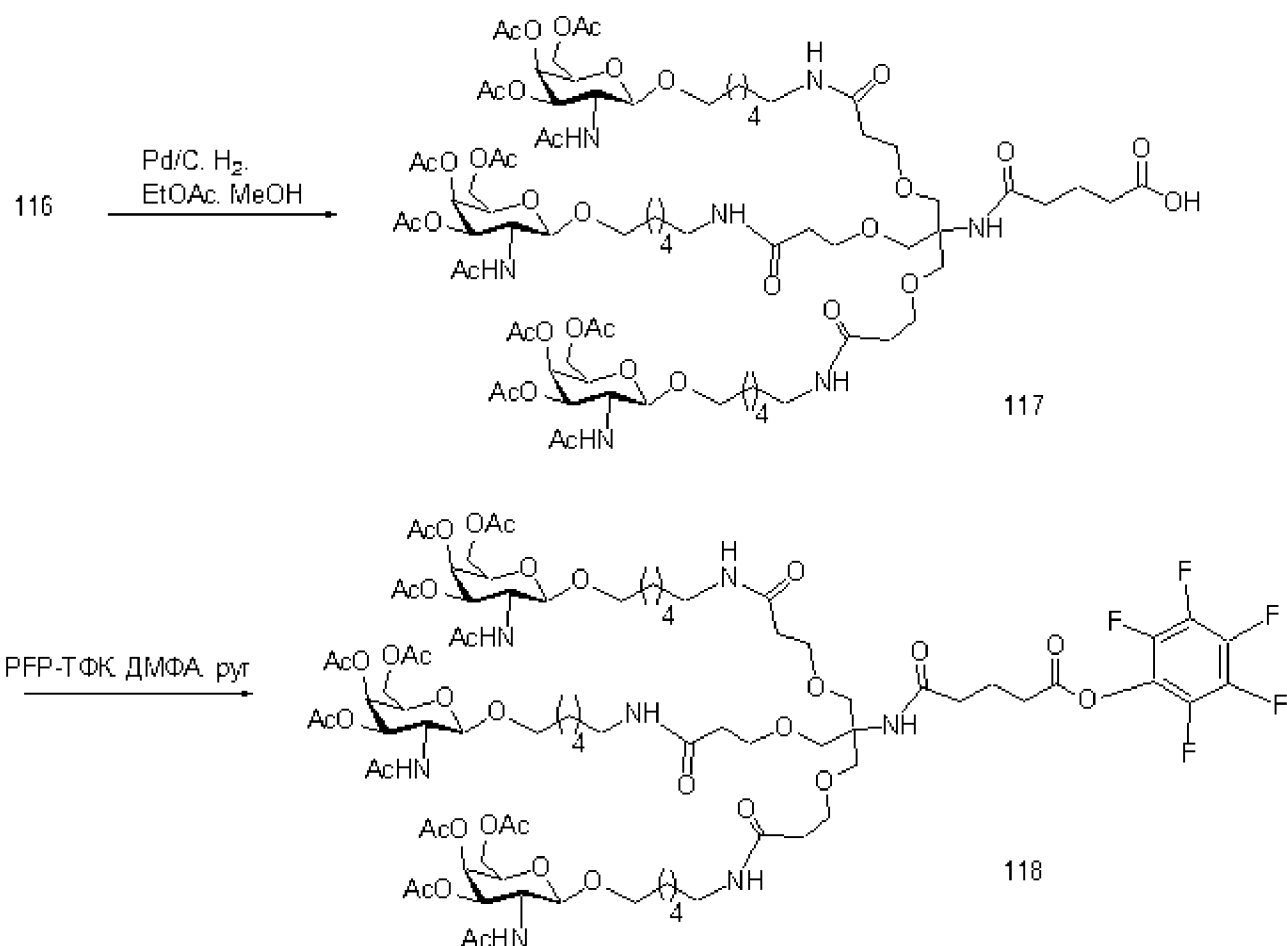
Соединение 112 (5 г, 8,6 ммоль) растворили в 1:1 смеси метанола/этилацетата (22 мл/22 мл). Добавили гидроксид палладия на углеводе (0,5 г). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере водорода в течение 12 часов. Реакционную смесь отфильтровали через слой целита и промыли этот слой 1:1 смесью метанола/этилацетата. Фильтрат и промывочные растворы объединили и концентрировали досуха с получением Соединения 105а (количественно). Структуру подтвердили по ЖХМС.

Соединение 113 (1,25 г, 2,7 ммоль), НВТУ (3,2 г, 8,4 ммоль) и DIEA (2,8 мл, 16,2 ммоль) растворили в безводном ДМФА (17 мл) и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 5 минут. К этой смеси добавили раствор Соединения 105а (3,77 г, 8,4 ммоль) в безводном ДМФА (20 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 6 часов. Растворитель удалили под пониженным давлением с получением маслянистого вещества. Остаток растворили в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 мл) и

промыли насыщенным водным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (100 мл) и насыщенным соевым раствором (100 мл). Органическую фазу отделили, высушили ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), отфильтровали и выпарили. Остаток очистили силикагелевой колоночной хроматографией и элюировали от 10 до 20%  $\text{MeOH}$  в дихлорметане с получением Соединения 114 (1,45 г, 30%). Структуру подтвердили анализом ЖХМС и  $^1\text{H}$  ЯМР.

Соединение 114 (1,43 г, 0,8 ммоль) растворили в 1:1 смеси метанола/этилацетата (4 мл/4 мл). Добавили палладий на углеводе (влажный, 0,14 г). Реакционную смесь продували водородом и перемешивали при комнатной температуре в атмосфере водорода в течение 12 часов. Реакционную смесь отфильтровали через слой целита. Слой целита промыли метанолом/этилацетатом (1:1). Фильтрат и промывочные растворы объединили и выпарили под пониженным давлением с получением Соединения 115 (количественно). Структуру подтвердили анализом ЖХМС и  $^1\text{H}$  ЯМР.

Соединение 83a (0,17 г, 0,75 ммоль), НВТУ (0,31 г, 0,83 ммоль) и DIEA (0,26 мл, 1,5 ммоль) растворили в безводном ДМФА (5 мл) и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 5 минут. К этой смеси добавили раствор Соединения 115 (1,22 г, 0,75 ммоль) в безводном ДМФА и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 6 часов. Растворитель удалили под пониженным давлением, а остаток растворили в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Органический слой промыли насыщенным водным раствором  $\text{NaHCO}_3$  и насыщенным соевым раствором, и высушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , и отфильтровали. Органический слой концентрировали досуха, а полученный остаток очистили силикагелевой колоночной хроматографией и элюировали от 3 до 15%  $\text{MeOH}$  в дихлорметане с получением Соединения 116 (0,84 г, 61%). Структуру подтвердили анализом ЖХМС и  $^1\text{H}$  ЯМР.



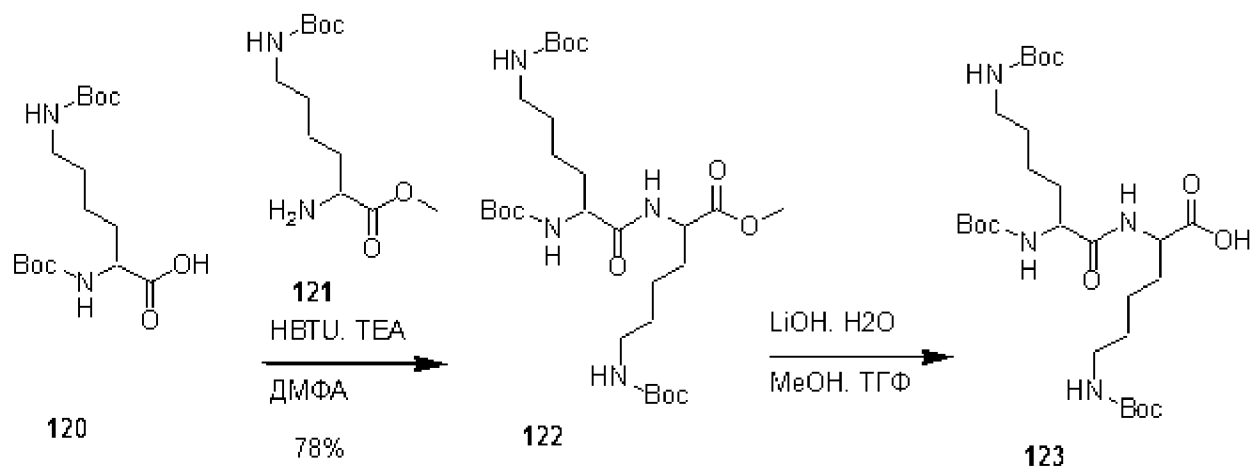
Соединение 116 (0,74 г, 0,4 ммоль) растворили в 1:1 смеси метанола/этилацетата (5 мл/5 мл). Добавили палладий на углероде (влажный, 0,074 г). Реакционную смесь продували водородом и перемешивали при комнатной температуре в атмосфере водорода в течение 12 часов. Реакционную смесь отфильтровали через слой целита. Слой целита промыли метанолом/этилацетатом (1:1). Фильтрат и промывочные растворы объединили и выпарили под пониженным давлением с получением соединения 117 (0,73 г, 98%). Структуру подтвердили анализом ЖХМС и  $^1\text{H}$  ЯМР.

Соединение 117 (0,63 г, 0,36 ммоль) растворили в безводном ДМФА (3 мл). К этому раствору добавили *N,N*-диизопропилэтиламин (70 мкл, 0,4 ммоль) и пентафторфенила трифторацетат (72 мкл, 0,42 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 часов и вылили в насыщенный водный раствор  $\text{NaHCO}_3$ . Смесь экстрагировали дихлорметаном, промыли насыщенным солевым раствором и высушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Дихлорметановый раствор концентрировали досуха и очистили силикагелевой колоночной хроматографией, и элюировали от 5 до 10%  $\text{MeOH}$  в дихлорметане с получением соединения 118 (0,51 г, 79%). Структуру подтвердили по ЖХМС и  $^1\text{H}$ , а также  $^1\text{H}$  и  $^{19}\text{F}$  ЯМР.





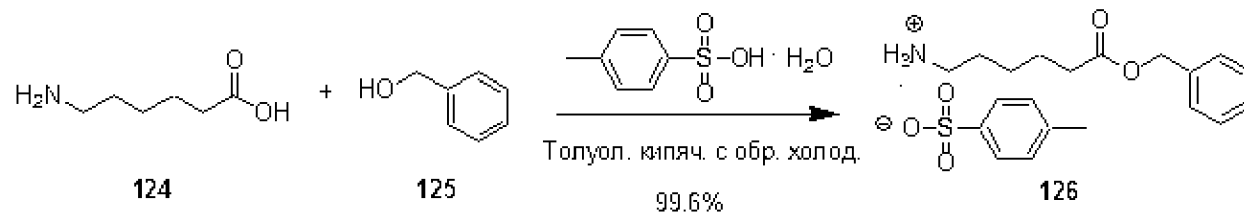
**Пример 49. Получение олигонуклеотида 132, содержащего GalNAc3-5**



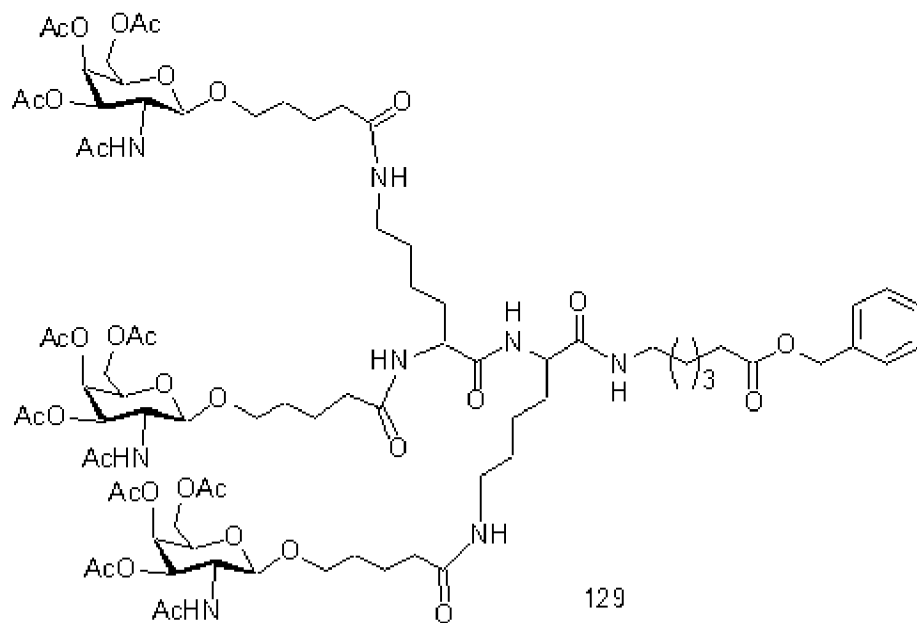
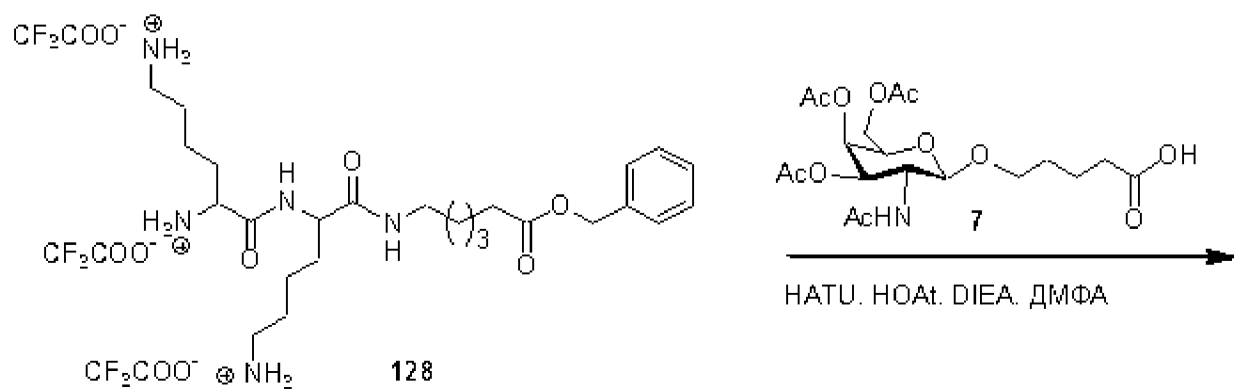
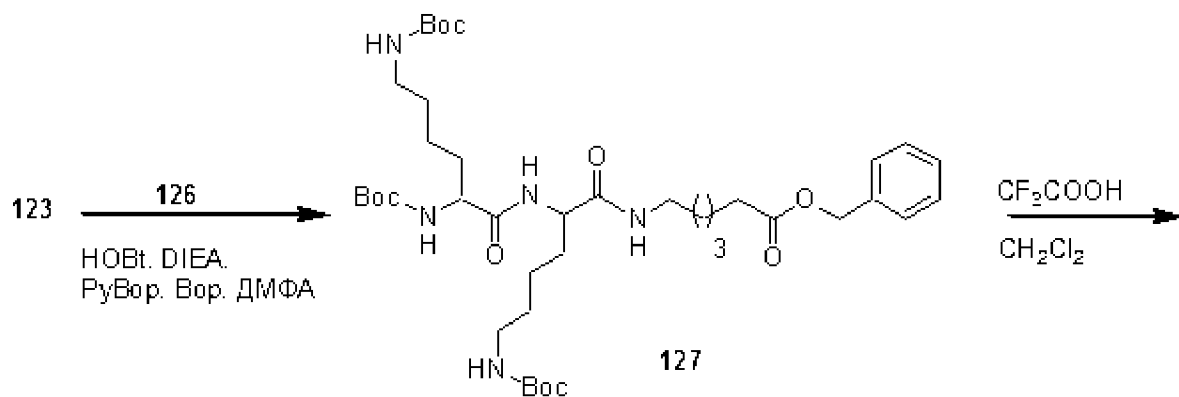
Соединение 120 (14,01 г, 40 ммоль) и HBTU (14,06 г, 37 ммоль) растворили в безводном ДМФА (80 мл). Добавили триэтиламин (11,2 мл, 80,35 ммоль) и перемешивали в течение 5 минут. Реакционную смесь охладили на ледяной бане и добавили раствор соединения 121 (10 г, ммоль) в безводном ДМФА (20 мл). Добавили дополнительное количество триэтиламина (4,5 мл, 32,28 ммоль) и перемешивали реакционную смесь в течение 18 часов в атмосфере аргона. Реакцию контролировали по ТСХ (этилацетат:гексан; 1:1;  $R_f = 0,47$ ). Растворитель удалили под пониженным давлением. Остаток растворили в EtOAc (300 мл) и промыли 1 М раствором NaHSO<sub>4</sub> (3 x 150 мл), насыщенным водным раствором NaHCO<sub>3</sub> (3 x 150 мл) и насыщенным соевым раствором (2 x 100 мл). Органический слой высушили при помощи Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Высушивающий агент удалили фильтрованием, а органический слой концентрировали на ротационном испарителе. Неочищенную смесь очистили силикагелевой колоночной хроматографией и элюировали при помощи 35-50% EtOAc в гексане с получением соединения 122 (15,50 г, 78,13%). Структуру подтвердили анализом ЖХМС и <sup>1</sup>H ЯМР. Масса  $m/z$  589,3 [M + H]<sup>+</sup>.

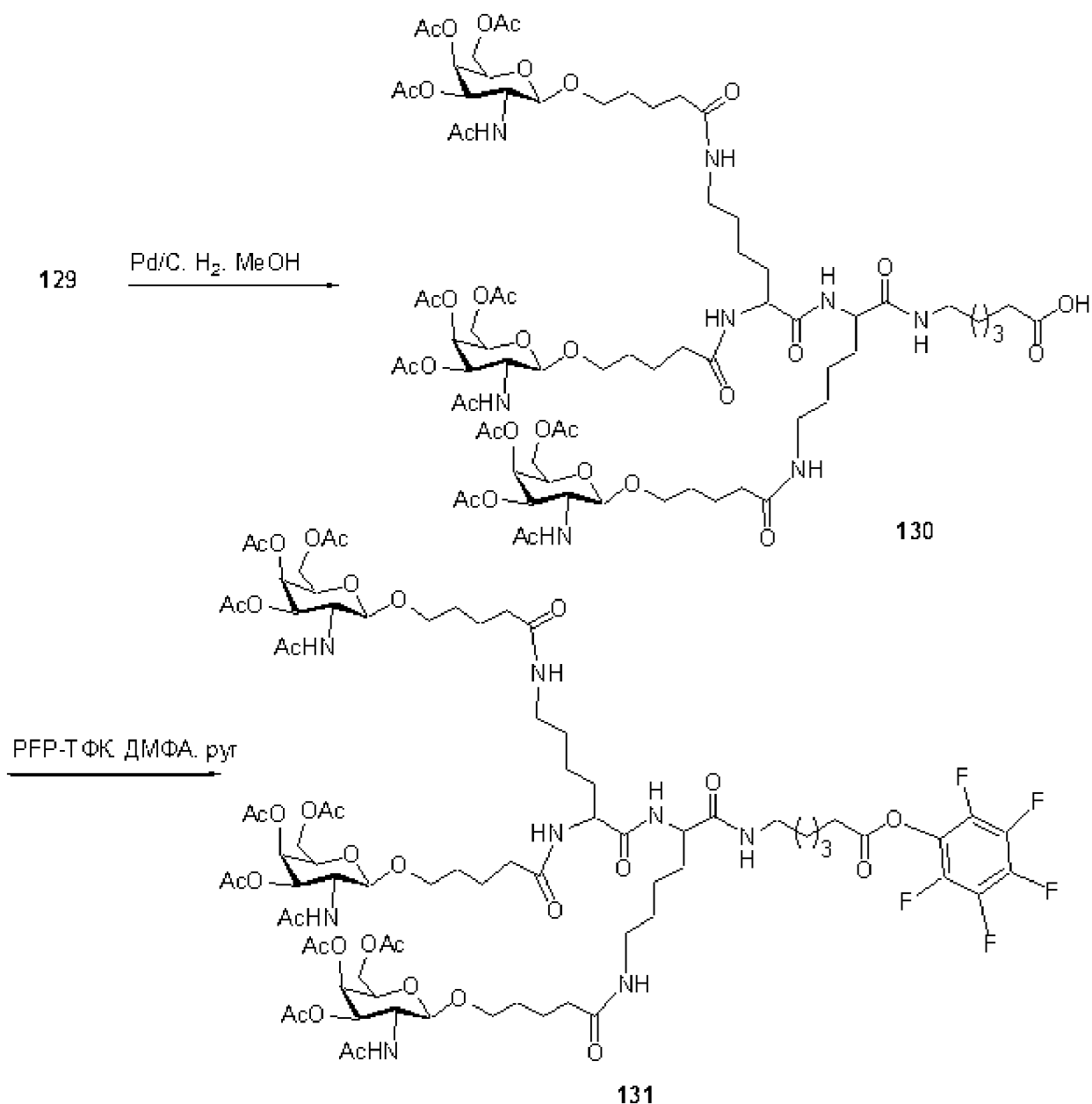
К охлажденному раствору соединения 122 (7,75 г, 13,16 ммоль), растворенного в метаноле (15 мл) добавили раствор LiOH (92,15 ммоль) в воде (20 мл) и ТГФ (10 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 45 минут и контролировали по ТСХ (EtOAc: гексан; 1:1). Реакционную смесь концентрировали до половины объема под пониженным давлением. Оставшийся раствор охладили на ледяной бане и нейтрализовали добавлением концентрированной HCl. Реакционную смесь разбавили, экстрагировали EtOAc (120 мл) и промыли насыщенным соевым раствором (100 мл). При стоянии в течение ночи образовалась и осветлилась эмульсия. Органический

слой отделили, высушили ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), отфильтровали и выпарили с получением Соединения 123 (8,42 г). Избыточную массу вероятно обуславливает остаточная соль. ЖХМС согласовался со структурой. Продукт применили без какой-либо дополнительной очистки. Мол. масса, расчетная: 574,36% мол. масса, найденная: 575,3  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .



Соединение 126 синтезировали по способу, описанному в литературе (*J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 958-963).





Соединение 123 (7,419 г, 12,91 ммоль), НОВт (3,49 г, 25,82 ммоль) и соединение 126 (6,33 г, 16,14 ммоль) растворили в ДМФА (40 мл), а полученную реакционную смесь охладили на ледяной бане. К этой смеси добавили *N,N*-диизопропилэтиламин (4,42 мл, 25,82 ммоль), РуВор (8,7 г, 16,7 ммоль), затем связывающий агент Вор (1,17 г, 2,66 ммоль) в атмосфере аргона. Ледяную баню убрали, а раствор оставили нагреваться до комнатной температуры. Реакция завершилась через 1 час, что определили по ТСХ (ДХМ:MeOH:AA; 89:10:1). Реакционную смесь концентрировали под пониженным давлением. Остаток растворили в EtOAc (200 мл) и промыли 1 М раствором NaHSO<sub>4</sub> (3x100 мл), насыщенным водным раствором NaHCO<sub>3</sub> (3x100 мл) и насыщенным соевым раствором (2x100 мл). Органическую фазу отделили, высушили (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), отфильтровали и концентрировали. Остаток очистили силикагелевой колоночной хроматографией с градиентом от 50%

гексанов в EtOAc до 100% EtOAc с получением Соединения 127 (9,4 г) в виде белого пеннистого вещества. ЖХМС и  $^1\text{H}$  ЯМР согласовались со структурой. Масса  $m/z$  778,4  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

Трифторуксусную кислоту (12 мл) добавили к раствору соединения 127 (1,57 г, 2,02 ммоль) в дихлорметане (12 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Реакционную смесь выпарили совместно с толуолом (30 мл) под пониженным давлением досуха. Полученный остаток два раза совместно выпарили с ацетонитрилом (30 мл) и толуолом (40 мл) с получением Соединения 128 (1,67 г) в виде трифторацетатной соли, и применили его на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХМС и  $^1\text{H}$  ЯМР согласовались со структурой. Масса  $m/z$  478,2  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

Соединение 7 (0,43 г, 0,963 ммоль), НАТУ (0,35 г, 0,91 ммоль) и HOAt (0,035 г, 0,26 ммоль) смешали вместе и высушивали в течение 4 часов над  $\text{P}_2\text{O}_5$  под пониженным давлением в круглодонной колбе, а затем растворили в безводном ДМФА (1 мл) и перемешивали в течение 5 минут. К этой смеси добавили раствор соединения 128 (0,20 г, 0,26 ммоль) в безводном ДМФА (0,2 мл) и добавили *N,N*-диизопропилэтиламин (0,2 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере аргона. Реакция завершилась через 30 минут, что определили по ЖХМС и ТСХ (7% MeOH/ДХМ). Реакционную смесь концентрировали под пониженным давлением. Остаток растворили в ДХМ (30 мл) и промыли 1 М раствором  $\text{NaHSO}_4$  (3x20 мл), насыщенным водным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (3 x 20 мл) и насыщенным соевым раствором (3x20 мл). Органическую фазу отделили, высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , отфильтровали и концентрировали. Остаток очистили силикагелевой колоночной хроматографией, применив 5-15% MeOH в дихлорметане, с получением Соединения 129 (96,6 мг). ЖХМС и  $^1\text{H}$  ЯМР согласовались со структурой. Масса  $m/z$  883,4  $[\text{M} + 2\text{H}]^+$ .

Соединение 129 (0,09 г, 0,051 ммоль) растворили в метаноле (5 мл) в 20 мл скнтилляционной пробирке. К нему добавили небольшое количество 10% Pd/C (0,015 мг) и продували реакционный сосуд газообразным  $\text{H}_2$ . Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере  $\text{H}_2$  в течение 18 часов. Реакционную смесь отфильтровали через слой Целита, а слой Целита промыли метанолом. Фильтрат и промывочные растворы слили вместе и концентрировали под пониженным давлением с получением Соединения 130 (0,08 г). ЖХМС и  $^1\text{H}$  ЯМР согласовались со структурой. Продукт применили без дополнительной очистки. Масса  $m/z$  838,3  $[\text{M} + 2\text{H}]^+$ .

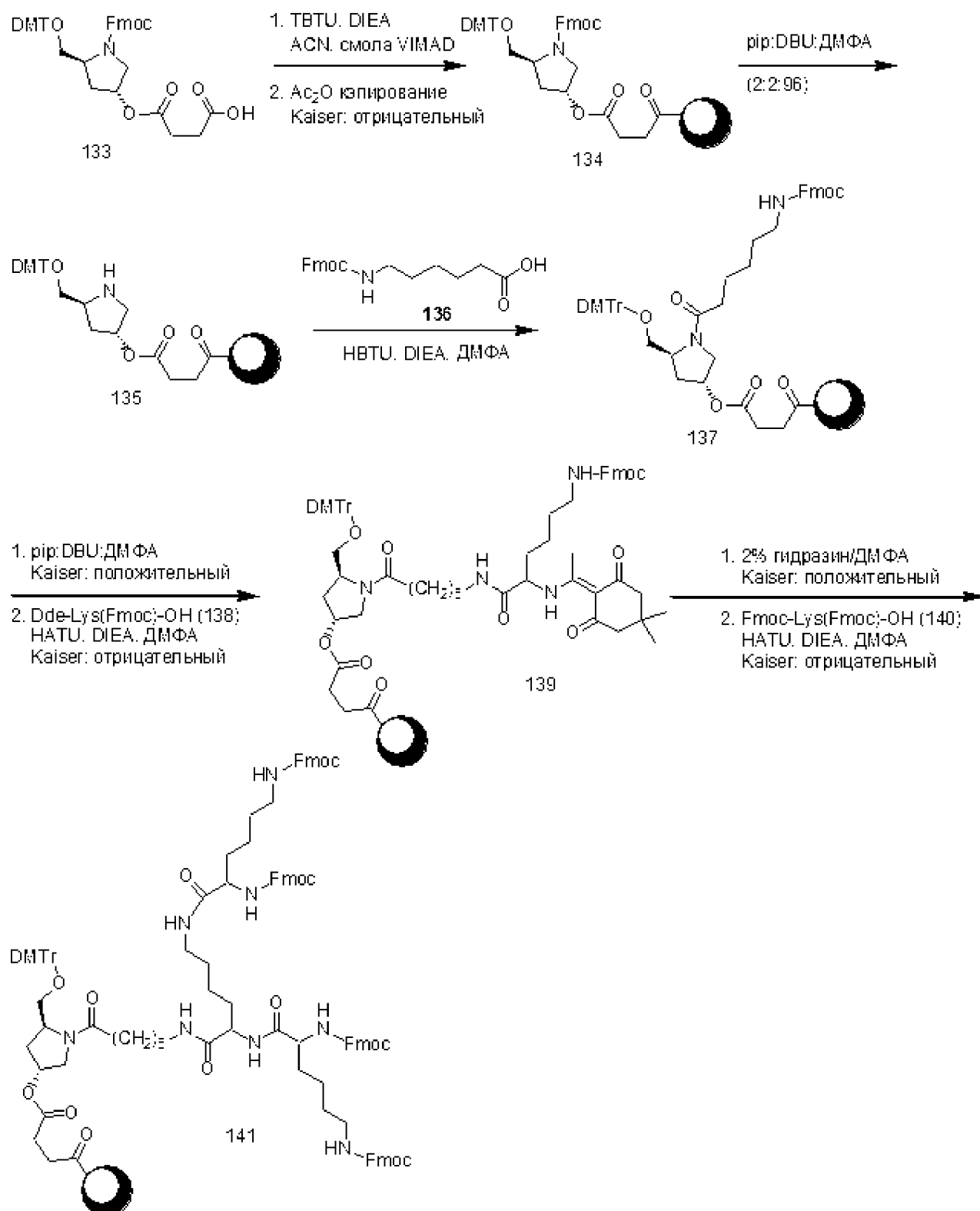
В 10 мл мерную круглодонную колбу добавили соединение 130 (75,8 мг, 0,046 ммоль), 0,37 М раствор пиридина в ДМФА (200 мкл) и установили мешалку. К этому

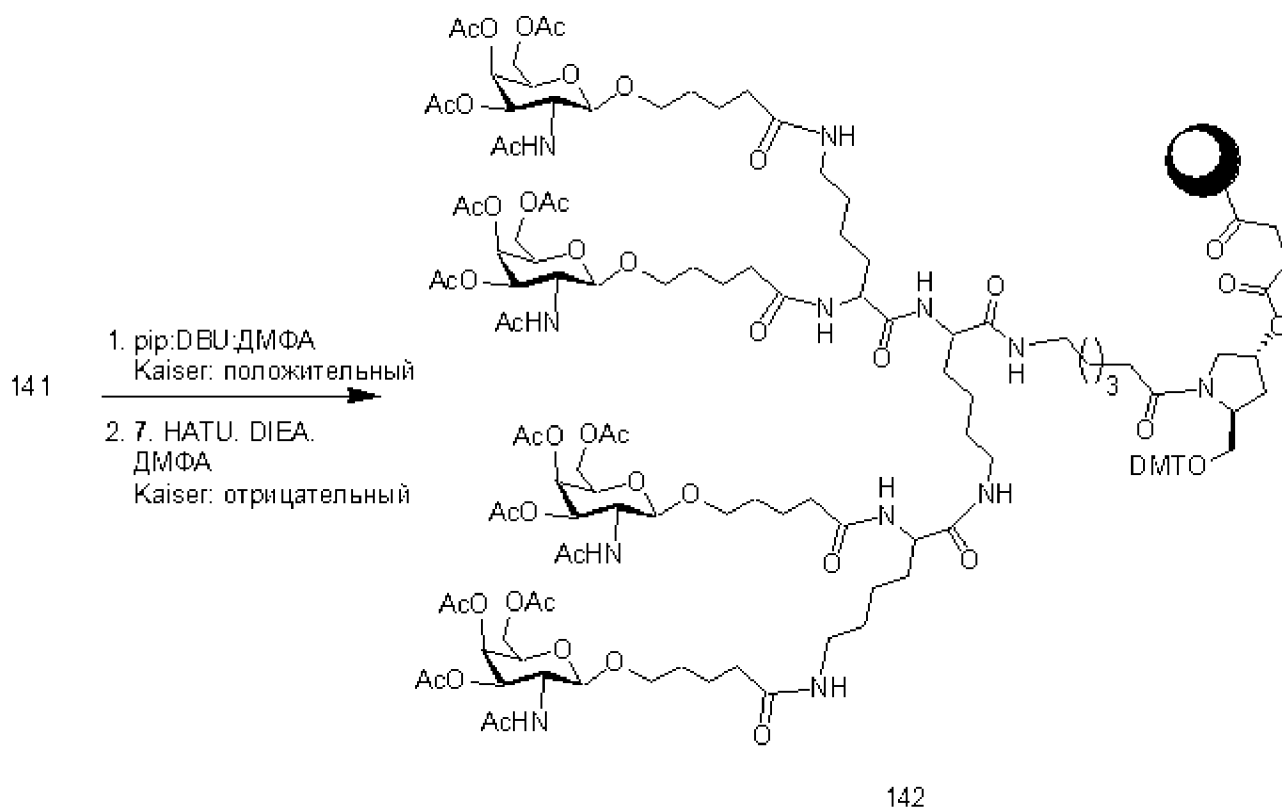






**Пример 50. Получение олигонуклеотида 144, содержащего GalNAc<sub>4</sub>-11**

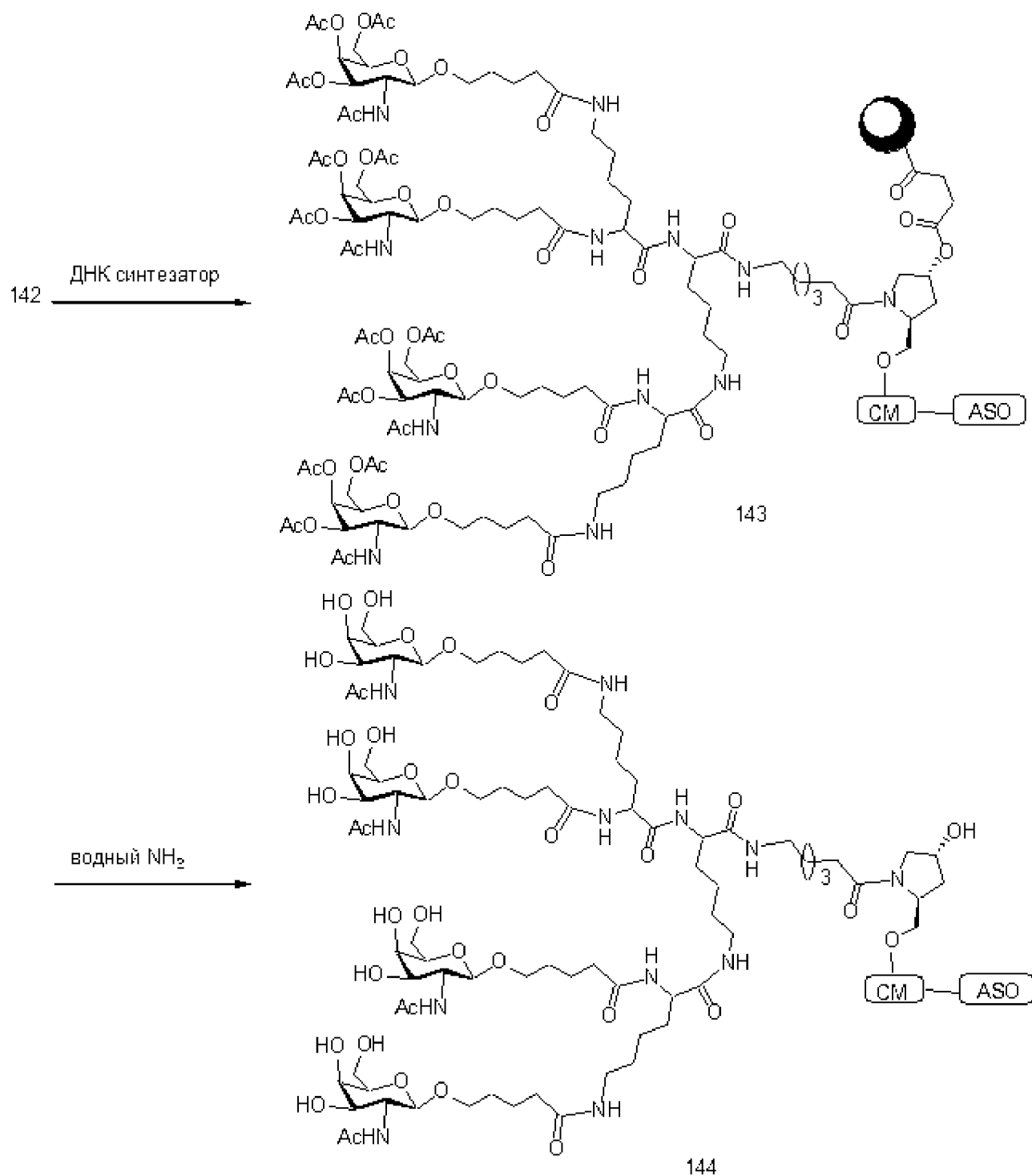




Синтез Соединения 134. В колбу Меррифилда добавили аминотетилловую смолу VIMAD (2,5 г, 450 мкмоль/г), которую промыли ацетонитрилом, диметилформамидом, дихлорметаном и ацетонитрилом. Смолу оставили набухать в ацетонитриле (4 мл). Соединение 133 предварительно активировали в 100 мл круглодонной колбе путем добавления 20 (1,0 ммоль, 0,747 г), TBTU (1,0 ммоль, 0,321 г), ацетонитрила (5 мл) и DIEA (3,0 ммоль, 0,5 мл). Этот раствор оставили перемешиваться на 5 минут, а затем добавили в колбу Меррифилда при встряхивании. Суспензию оставили встряхиваться на 3 часа. Реакционную смесь слили, а смолу промыли ацетонитрилом, DMF и ДХМ. Заполнение новой смолы количественно определили по измерению абсорбции DMT катиона при 500 нм (коэффициент экстинкции = 76000) в ДХМ, которое составило 238 мкмоль/г. Смолу кэпировали трехкратным суспендированием в растворе уксусного ангидрида в течение десяти минут.

Соединение 141, связанное с твердой подложкой, синтезировали многократным повторением способов твердофазного синтеза пептидов при помощи Fmoc. Взяли небольшое количество твердой подложки и суспендировали в водном растворе аммиака (28-30 масс. %) в течение 6 часов. Расщепленное соединение анализировали по ЖХ-МС и наблюдали, что масса согласуется со структурой. Масса  $m/z$  1063,8  $[\text{M} + 2\text{H}]^+$ .

Соединение 142, связанное с твердой подложкой, синтезировали по способам твердофазного синтеза пептидов.



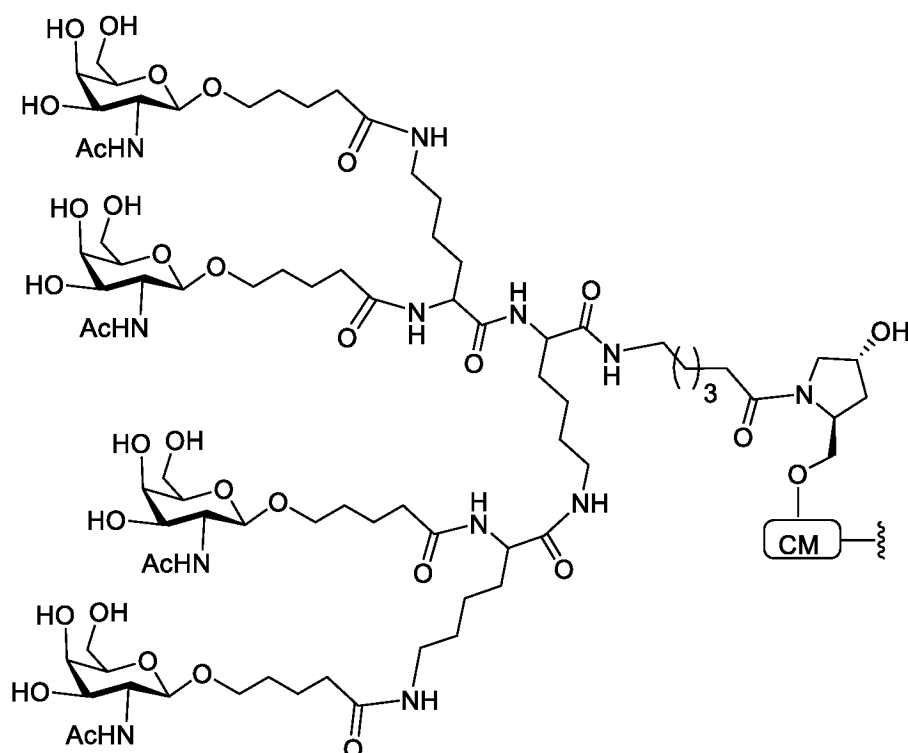
Соединение 143, связанное с твердой подложкой, синтезировали при помощи стандартного твердофазного синтеза на ДНК синтезаторе.

Соединение 143, связанное с твердой подложкой, суспендировали в водном аммиаке (28-30 масс. %) и нагревали при 55 °С в течение 16 часов. Раствор охладили, а твердую подложку отфильтровали. Фильтрат концентрировали, а остаток растворили в воде и очистили при помощи ВЭЖХ на сильной анионообменной колонке. Фракции, содержащие соединение 144 полной длины, слили вместе и обессолили. Полученное GalNAc<sub>4</sub>-11-

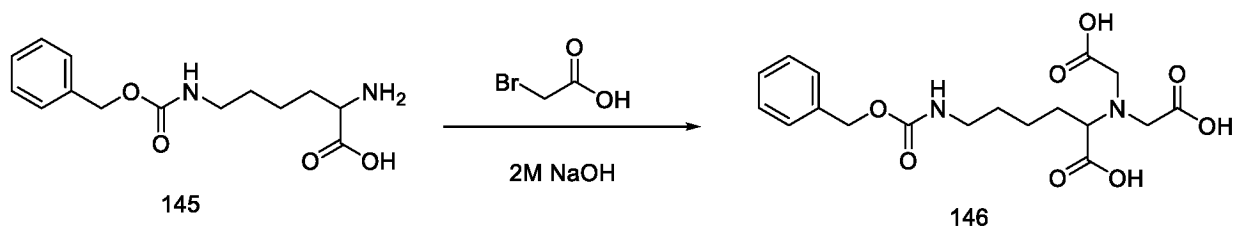
конъюгированное олигомерное соединение анализировали при помощи ЖХ-МС и наблюдали, что масса согласуется со структурой.

Кластерная часть GalNAc<sub>4</sub> конъюгирующей группы GalNAc<sub>4</sub>-11 (GalNAc<sub>4</sub>-11<sub>a</sub>) может быть комбинирана с любым расщепляемым фрагментом с получением различных конъюгирующих групп. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент представляет собой -P(=O)(OH)-A<sub>d</sub>-P(=O)(OH)-.

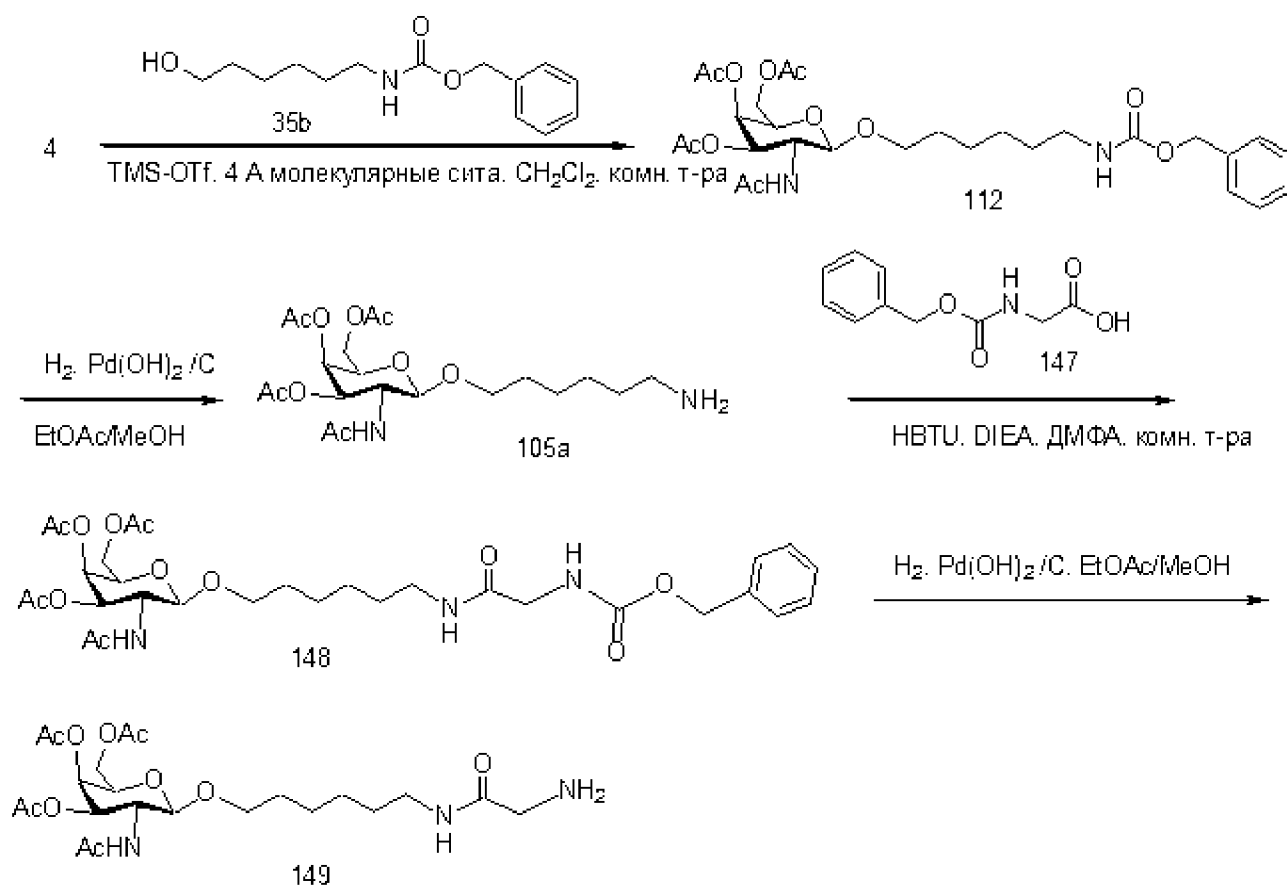
Структура GalNAc<sub>4</sub>-11 (GalNAc<sub>4</sub>-11<sub>a</sub>-CM) представлена ниже:



### Пример 51. Получение олигонуклеотида 155, содержащего GalNAc<sub>3</sub>-6



Соединение 146 синтезировали так, как описано в литературе (*Analytical Biochemistry* 1995, 229, 54-60).



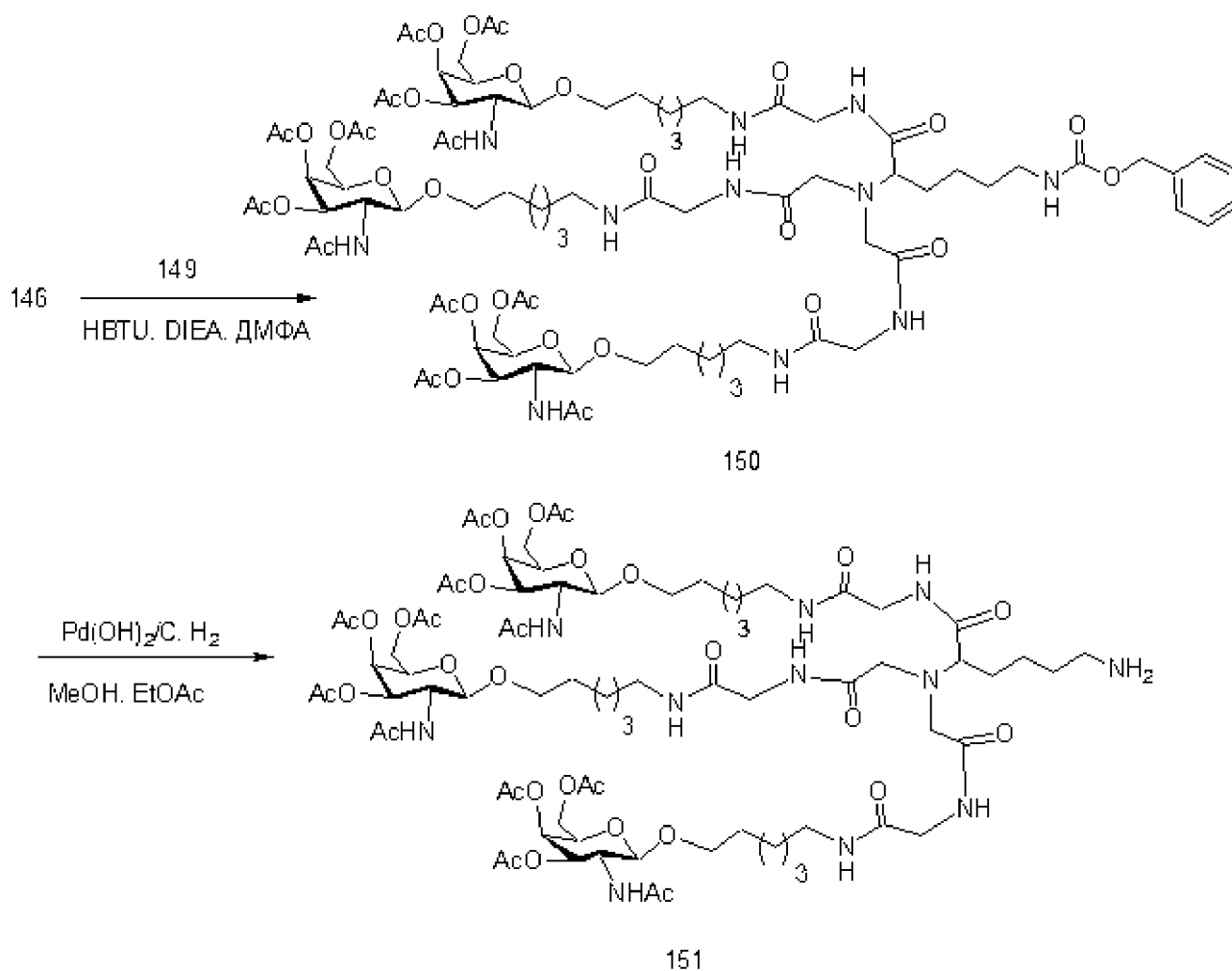
Соединение 4 (15 г, 45,55 ммоль) и соединение 35b (14,3 грамм, 57 ммоль) растворили в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 мл). Добавили активированные молекулярные сита (4 Å, 2 г, порошкообразные) и оставили реакционную смесь перемешиваться в течение 30 минут в атмосфере азота. Добавили TMS-OTf (4,1 мл, 22,77 ммоль) и оставили реакционную смесь перемешиваться при комнатной температуре в течение ночи. После завершения реакции смесь погасили, вылив в насыщенный водный раствор NaHCO<sub>3</sub> (500 мл) с дробленным льдом (~ 150 г). Органический слой отделили, промыли насыщенным солевым раствором, высушили над MgSO<sub>4</sub>, отфильтровали и концентрировали до оранжевого маслянистого вещества под пониженным давлением. Неочищенный материал очистили силикагелевой колоночной хроматографией и элюировали 2-10% MeOH в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> с получением Соединения 112 (16,53 г, 63%). Данные ЖХМС и <sup>1</sup>H ЯМР согласовались с предполагаемым соединением.

Соединение 112 (4,27 г, 7,35 ммоль) растворили в 1:1 MeOH/EtOAc (40 мл). Реакционную смесь очистили пропусканием потока аргона через раствор в течение 15 минут. Добавили катализатор Перлмана (гидроксид палладия на углероде, 400 мг) и пропускали через раствор газообразный водород в течение 30 минут. После завершения (ТСХ, 10% MeOH в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, и ЖХМС), катализатор удалили фильтрованием через слой целита. Фильтрат концентрировали на ротационном испарителе и быстро высушили под

высоким вакуумом с получением Соединения 105а (3,28 г). Данные ЖХМС и <sup>1</sup>H ЯМР согласовались с желаемым продуктом.

Соединение 147 (2,31 г, 11 ммоль) растворили в безводном ДМФА (100 мл). Добавили *N,N*-диизопропилэтиламин (DIEA, 3,9 мл, 22 ммоль), затем НВТУ (4 г, 10,5 ммоль). Реакционную смесь оставили перемешиваться в течение ~15 минут в атмосфере азота. К этой смеси добавили раствор соединения 105а (3,3 г, 7,4 ммоль) в сухом ДМФА и перемешивали в течение 2 часов в атмосфере азота. Реакционную смесь разбавили EtOAc и промыли насыщенным водным раствором NaHCO<sub>3</sub> и насыщенным солевым раствором. Органическую фазу отделили, высушили (MgSO<sub>4</sub>), отфильтровали и концентрировали до оранжевого сиропообразного вещества. Неочищенный материал очистили колоночной хроматографией с 2-5% MeOH в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> с получением Соединения 148 (3,44 г, 73%). Данные ЖХМС и <sup>1</sup>H ЯМР согласовались с предполагаемым продуктом.

Соединение 148 (3,3 г, 5,2 ммоль) растворили в 1:1 MeOH/EtOAc (75 мл). Реакционную смесь очистили пропусканием потока аргона через раствор в течение 15 минут. Добавили катализатор Перлмана (гидроксид палладия на углероде (350 мг). Через раствор продували газообразный водород в течение 30 минут. После завершения (ТСХ, 10% MeOH в ДХМ, и ЖХМС), катализатор удалили фильтрованием через слой целита. Фильтрат концентрировали на ротационном испарителе и быстро высушили под высоким вакуумом с получением Соединения 149 (2,6 г). Данные ЖХМС согласовались с желаемым продуктом. Остаток растворили в сухом ДМФА (10 мл) и сразу применили на следующей стадии.

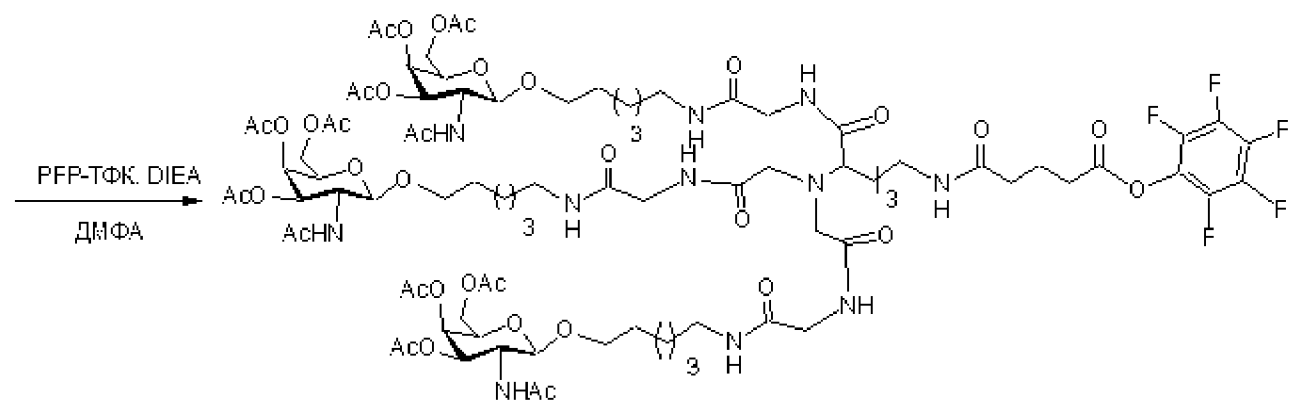
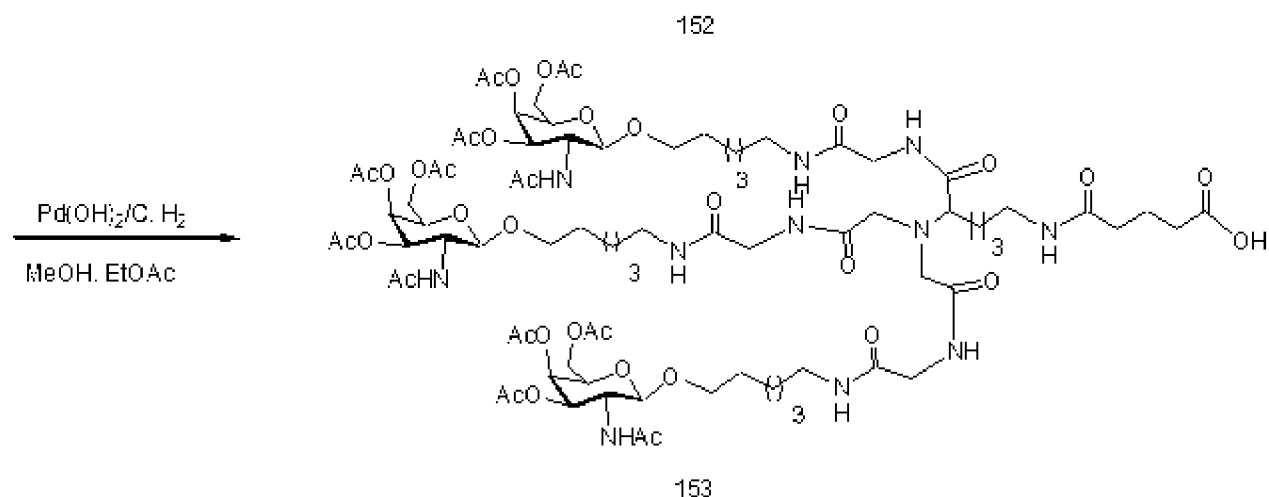
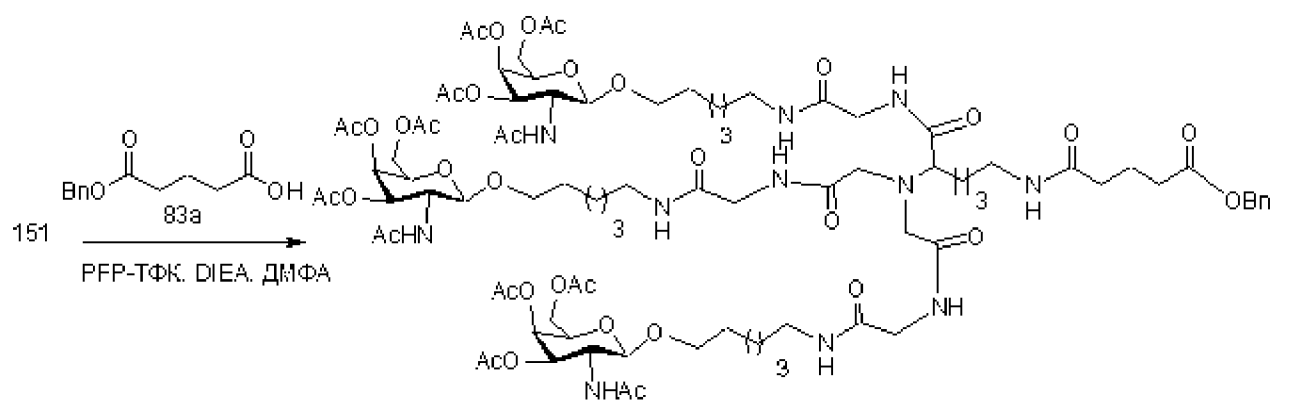


Соединение 146 (0,68 г, 1,73 ммоль) растворили в сухом ДМФА (20 мл). К нему добавили DIEA (450 мкл, 2,6 ммоль, 1,5 экв.) и HBTU (1,96 г, 0,52 ммоль). Реакционную смесь оставили перемешиваться в течение 15 минут при комнатной температуре в атмосфере азота. Добавили раствор соединения 149 (2,6 г) в безводном ДМФА (10 мл). pH реакционной смеси довели до pH = 9-10 добавлением DIEA (при необходимости). Реакционную смесь оставили перемешиваться при комнатной температуре в атмосфере азота в течение 2 часов. После завершения реакции смесь разбавили EtOAc (100 мл) и промыли насыщенным водным раствором  $\text{NaHCO}_3$ , затем насыщенным соевым раствором. Органическую фазу отделили, высушили над  $\text{MgSO}_4$ , отфильтровали и концентрировали. Остаток очистили силикагелевой колоночной хроматографией и элюировали 2-10% MeOH в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  с получением Соединения 150 (0,62 г, 20%). Данные ЖХМС и  $^1\text{H}$  ЯМР согласовались с желаемым продуктом.

Соединение 150 (0,62 г) растворили в 1:1 MeOH/EtOAc (5 л). Реакционную смесь очистили пропусканием потока аргона через раствор в течение 15 минут. Добавили катализатор Перлмана (гидроксид палладия на углероде (60 мг). Через раствор продували

газообразный водород в течение 30 минут. После завершения (ТСХ, 10% MeOH в ДХМ, и ЖХМС), катализатор удалили фильтрованием (тефлоновый фильтр с переходной канюлей шприца, 0,45 мкм). Фильтрат концентрировали на ротационном испарителе и быстро высушили под высоким вакуумом с получением Соединения 151 (0,57 г). Данные ЖХМС согласовались с желаемым продуктом. Продукт растворили в 4 мл сухого ДМФА и сразу применили на следующей стадии.





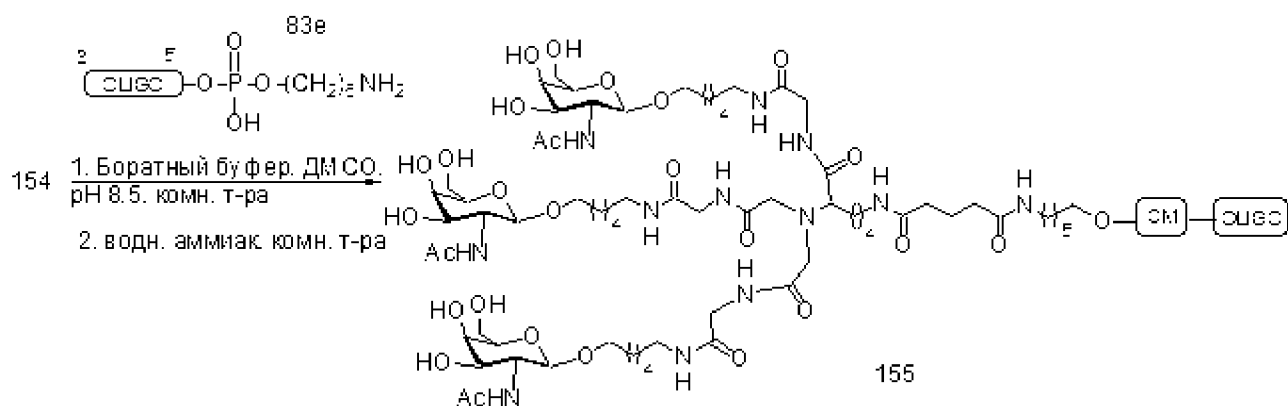
154

Соединение 83a (0,11 г, 0,33 ммоль) растворили в безводном ДМФА (5 мл) и добавили *N,N*-диизопропилэтиламин (75 мкл, 1 ммоль) и PFP-TFK (90 мкл, 0,76 ммоль). При соприкосновении реакционная смесь стала пурпурной и постепенно изменила цвет на оранжевый в течение следующих 30 минут. Ход реакции контролировали по ТСХ и ЖХМС. После завершения (образования эфира PFP) добавили раствор соединения 151 (0,57 г, 0,33 ммоль) в ДМФА. рН реакционной смеси довели до рН = 9-10 добавлением *N,N*-диизопропилэтиламина (при необходимости). Реакционную смесь перемешивали в атмосфере азота в течение ~30 минут. После завершения реакции большую часть

растворителя удалили под пониженным давлением. Остаток разбавили  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и промыли насыщенным водным раствором  $\text{NaHCO}_3$ , затем насыщенным соевым раствором. Органическую фазу отделили, высушили над  $\text{MgSO}_4$ , отфильтровали и концентрировали до оранжевого сиропообразного вещества. Остаток очистили силикагелевой колоночной хроматографией (2-10%  $\text{MeOH}$  в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) с получением Соединения 152 (0,35 г, 55%). Данные ЖХМС и  $^1\text{H}$  ЯМР согласовались с желаемым продуктом.

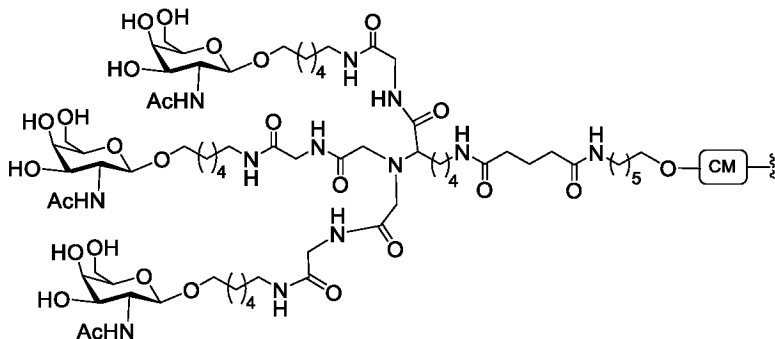
Соединение 152 (0,35 г, 0,182 ммоль) растворили в 1:1  $\text{MeOH}/\text{EtOAc}$  (10 мл). Реакционную смесь очистили пропусканием потока аргона через раствор в течение 15 минут. Добавили катализатор Перлмана (гидроксид палладия на углероде (35 мг). Через раствор продували газообразный водород в течение 30 минут. После завершения (ТСХ, 10%  $\text{MeOH}$  в ДХМ, и ЖХМС), катализатор удалили фильтрованием (тефлоновый фильтр с переходной канюлей шприца, 0,45 мкм). Фильтрат концентрировали на ротационном испарителе и быстро высушили под высоким вакуумом с получением Соединения 153 (0,33 г, количественно). Данные ЖХМС согласовались с желаемым продуктом.

Соединение 153 (0,33 г, 0,18 ммоль) растворили в безводном ДМФА (5 мл) при перемешивании в атмосфере азота. К нему добавили *N,N*-диизопропилэтиламин (65 мкл, 0,37 ммоль) и PFP-ТФК (35 мкл, 0,28 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в атмосфере азота в течение ~30 минут. При соприкосновении реакционная смесь стала пурпурной и постепенно изменила цвет на оранжевый. pH реакционной смеси поддерживали при pH = 9-10 добавлением дополнительного количества *N,N*-диизопропилэтиламина. Ход реакции контролировали по ТСХ и ЖХМС. После завершения реакции большую часть растворителя удалили под пониженным давлением. Остаток разбавили  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 мл) и промыли насыщенным водным раствором  $\text{NaHCO}_3$ , затем насыщенным соевым раствором. Органический слой отделили, высушили над  $\text{MgSO}_4$ , отфильтровали и концентрировали до оранжевого сиропообразного вещества. Остаток очистили колоночной хроматографией и элюировали 2-10%  $\text{MeOH}$  в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  с получением Соединения 154 (0,29 г, 79%). Данные ЖХМС и  $^1\text{H}$  ЯМР согласовались с желаемым продуктом.

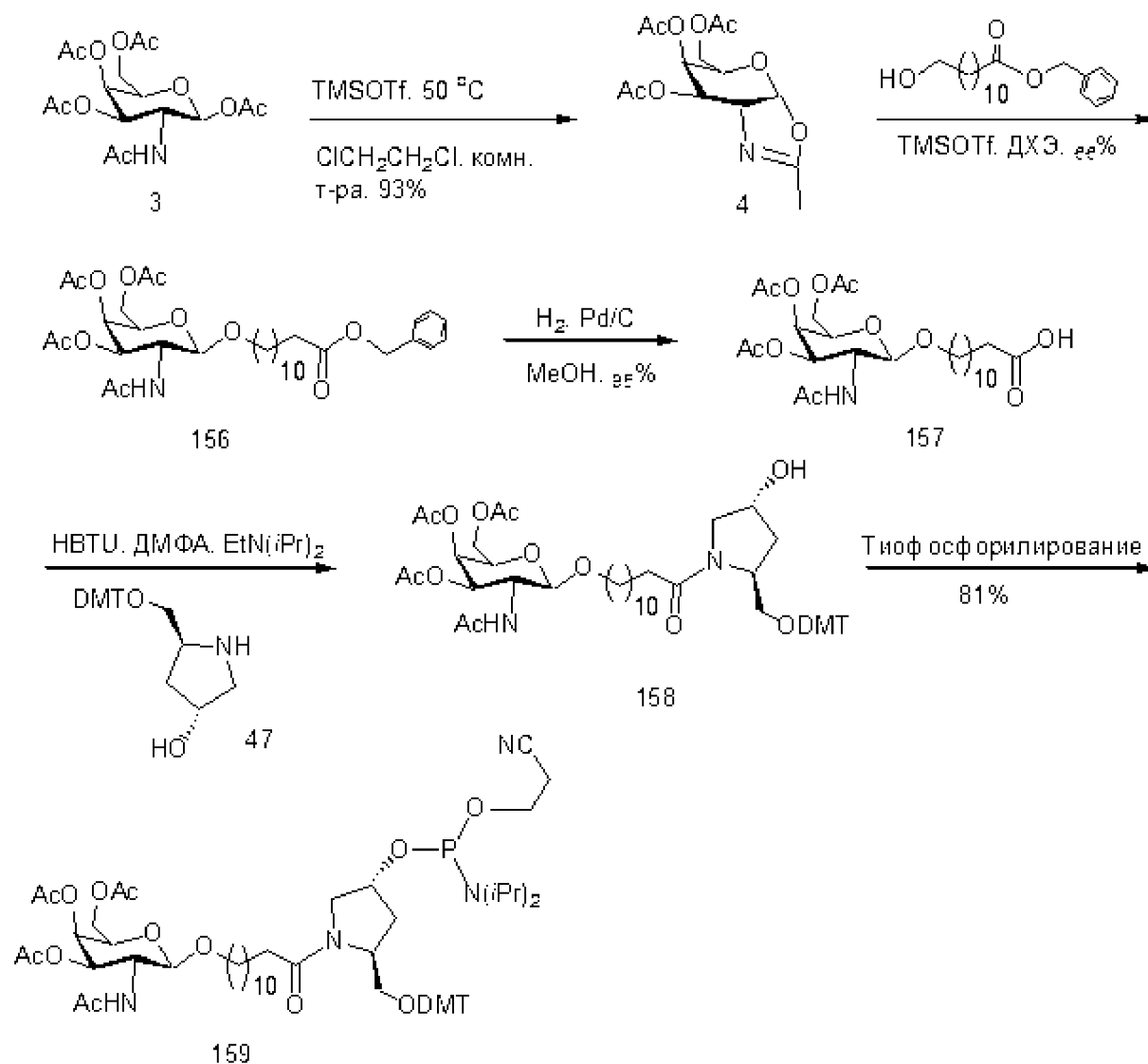


Олигомерное Соединение 155, содержащее конъюгирующую группу GalNAc<sub>3</sub>-6, получили по общим способам, представленным в Примере 46. Кластерная часть GalNAc<sub>3</sub> конъюгирующей группы GalNAc<sub>3</sub>-6 (GalNAc<sub>3</sub>-6<sub>a</sub>) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом для получения различных конъюгирующих групп. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент представляет собой -P(=O)(OH)-A<sub>d</sub>-P(=O)(OH)-.

Структура GalNAc<sub>3</sub>-6 (GalNAc<sub>3</sub>-6<sub>a</sub>-CM-) представлена ниже:



### Пример 52. Получение олигонуклеотида 160, содержащего GalNAc3-9



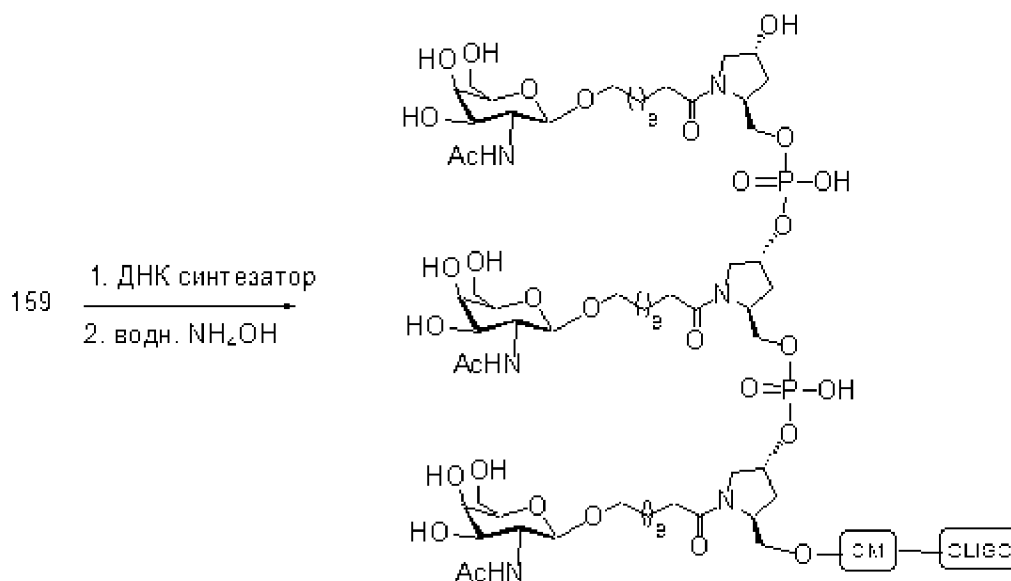
Соединение 156 синтезировали по способу, описанному в литературе (*J. Med. Chem.* 2004, 47, 5798-5808).

Соединение 156 (18,60 г, 29,28 ммоль) растворили в метаноле (200 мл). Добавили палладий на углероде (6,15 г, загрузка 10 масс. % (в пересчете на сухое вещество), матрица из порошкообразного углерода, влажный). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере водорода в течение 18 часов. Реакционную смесь отфильтровали через слой целита и тщательно промыли слой целита метанолом. Объединенный фильтрат промыли и концентрировали досуха. Остаток очистили

силикагелевой колоночной хроматографией и элюировали 5-10% метанола в дихлорметане с получением Соединения 157 (14,26 г, 89%). Масса  $m/z$  544,1 [M-H]<sup>-</sup>.

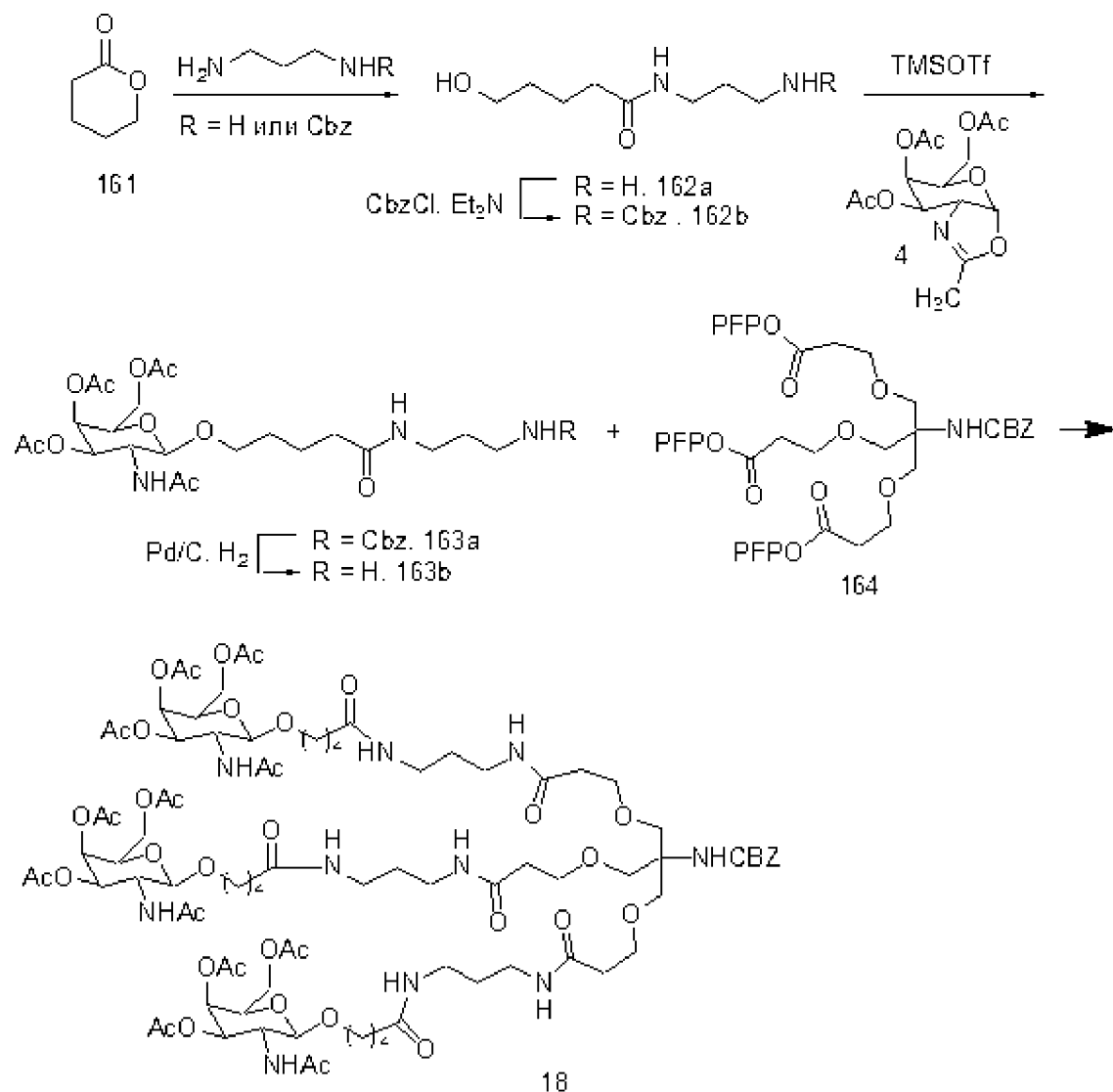
Соединение 157 (5 г, 9,17 ммоль) растворили в безводном ДМФА (30 мл). Добавили НВТУ (3,65 г, 9,61 ммоль) и *N,N*-диизопропилэтиламин (13,73 мл, 78,81 ммоль) и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 5 минут. К нему добавили раствор соединения 47 (2,96 г, 7,04 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 8 часов. Реакционную смесь вылили в насыщенный водный раствор NaHCO<sub>3</sub>. Смесь экстрагировали этилацетатом, а органический слой промыли насыщенным соевым раствором и высушили (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), отфильтровали и выпарили. Полученный остаток очистили силикагелевой колоночной хроматографией и элюировали 50% этилацетатом в гексане с получением Соединения 158 (8,25 г, 73,3%). Структуру подтвердили анализом МС и <sup>1</sup>Н ЯМР.

Соединение 158 (7,2 г, 7,61 ммоль) высушили над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> под пониженным давлением. Высушенное соединение растворили в безводном ДМФА (50 мл). К нему добавили 1Н-тетразол (0,43 г, 6,09 ммоль) и *N*-метилимидазол (0,3 мл, 3,81 ммоль), и цианоэтил-*N,N,N,N*-тетраизопропил-фосфородиамидит (3,65 мл, 11,50 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в атмосфере аргона в течение 4 часов. Реакционную смесь разбавили этилацетатом (200 мл). Реакционную смесь промыли насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> и насыщенным соевым раствором. Органическую фазу отделили, высушили (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), отфильтровали и выпарили. Остаток очистили силикагелевой колоночной хроматографией и элюировали 50-90% этилацетатом в гексане с получением Соединения 159 (7,82 г, 80,5%). Структуру подтвердили анализом ЖХМС и <sup>31</sup>Р ЯМР.





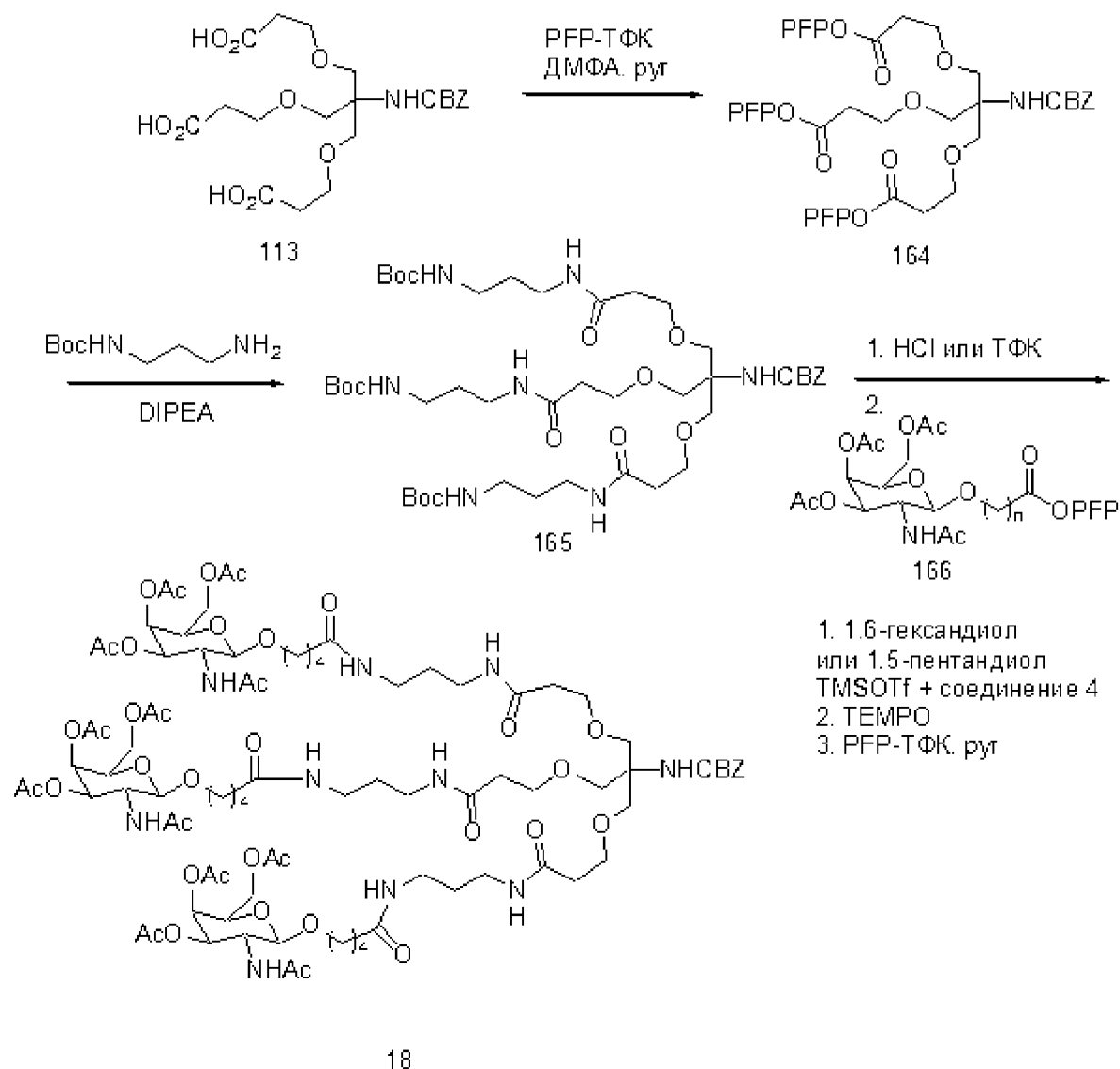
**Пример 53. Альтернативный способ получения Соединения 18 (GalNAc3-1a и GalNAc3-3a)**



Выполнили реакцию лактона 161 с диаминопропаном (3-5 экв.) или моно-Вос-защитинным диаминопропаном (1 экв.) с получением спирта 162a или 162b. При применении для описанной выше реакции незащищенного пропандиамина, избыток диамина удалили выпариванием под высоким вакуумом, а свободную аминогруппу в 162a защитили при помощи CbzCl с получением 162b в виде белого твердого вещества после очистки колоночной хроматографией. Спирт 162b затем взаимодействовал с соединением 4 в присутствии TMSOTf с получением 163a, которое преобразовали в 163b путем снятия Cbz группы при помощи каталитического гидрирования. Пентафторфениловый (PFP) эфир 164 получили взаимодействием трехкислотного соединения 113 (см. Пример 48) с PFP-ТФК (3,5 экв.) и пиридином (3,5 экв.) в ДМФА (от 0,1 до 0,5 М). Триэфир 164 непосредственно взаимодействовал с амином 163b (3-4 экв.) и DIPEA (3-4 экв.) с получением Соединения 18.

Представленный выше способ значительно облегчает очистку промежуточных соединений и минимизирует образование побочных продуктов, которые образуются при применении способа, описанного в Примере 4.

**Пример 54. Альтернативный способ получения Соединения 18 (GalNAc3-1a и GalNAc3-3a)**



Три-PFP эфир 164 получили из кислоты 113 по способу, приведенному выше в Примере 53, выполнили реакцию этого эфира с моно-Boc-защищенным диамином с получением 165 практически с количественным выходом. Boc группы сняли хлористоводородной кислотой или трифторуксусной кислотой с получением триамина, который взаимодействовал с активированной кислотой PFP 166 в присутствии подходящего основания, такого как DIPEA, с получением Соединения 18.



РФР-защищенную кислоту Gal-NAc 166 получили из соответствующей кислоты обработкой РФР-ТФК (1-1,2 экв.) и пиридином (1-1,2 экв.) в ДМФА. Кислоту-предшественник, в свою очередь, получили из соответствующего спирта окислением с применением ТЕМРО (0,2 экв.) и ВАИВ в ацетонитриле и воде. Спирт-предшественник получили из сахарного промежуточного соединения 4 взаимодействием с 1,6-гександиолом (или 1,5-гександиолом или другим диолом для других значений n) (2-4 экв.) и TMSOTf, применив условия, описанные ранее в Примере 47.

**Пример 55. Дозозависимое исследование олигонуклеотидов, содержащих либо 3', либо 5'-конъюгирующую группу (сравнение GalNAc<sub>3</sub>-1, 3, 8 и 9), нацеленных на SRB-1, *in vivo***

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже, испытали в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования SRB-1 у мышей. Неконъюгированный ISIS 353382 включили в качестве стандарта. Каждая из различных конъюгирующих групп GalNAc<sub>3</sub> была присоединена либо к 3', либо к 5'-концу соответствующего олигонуклеотида при помощи фосфодиэфир-связанного 2'-дезоксиаденозинового нуклеозида (расщепляемый фрагмент).

**Таблица 26**

**Модифицированные ASO, нацеленные на SRB-1**

ASO	Последовательность (от 5' к 3')	Мотив	Конъюгат	SEQ ID NO.
ISIS 353382 (исходное)	G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>e</sub>	5/10/5	нет	28
ISIS 655861	G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>eo</sub> <b>Ado'-GalNAc<sub>3</sub>-1<sub>a</sub></b>	5/10/5	<b>GalNAc<sub>3</sub>-1</b>	29
ISIS 664078	G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>eo</sub> <b>Ado'-GalNAc<sub>3</sub>-9<sub>a</sub></b>	5/10/5	<b>GalNAc<sub>3</sub>-9</b>	29
ISIS 661161	<b>GalNAc<sub>3</sub>-3<sub>a</sub>-o'-Ado</b> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>e</sub>	5/10/5	<b>GalNAc<sub>3</sub>-3</b>	30
ISIS 665001	<b>GalNAc<sub>3</sub>-8<sub>a</sub>-o'-Ado</b> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>e</sub>	5/10/5	<b>GalNAc<sub>3</sub>-8</b>	30

Заглавные буквы указывают азотистое основание для каждого нуклеозида, а <sup>m</sup>C означает 5-метилцитозин. Нижние индексы: «e» означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид; «d» означает β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; «s» означает тиофосфатную межнуклеозидную связь (PS); «o» означает фосфодиэфирную межнуклеозидную связь (PO); и «o'» означает -O-P(=O)(OH)-. Конъюгирующие группы выделены жирным шрифтом.

Структура GalNAc<sub>3</sub>-1<sub>a</sub> показана ранее в Примере 9. Структура GalNAc<sub>3</sub>-9 показана ранее в Примере 52. Структура GalNAc<sub>3</sub>-3 показана ранее в Примере 39. Структура GalNAc<sub>3</sub>-8 показана ранее в Примере 47.

### *Лечение*

Шестинедельным самцам мышей Balb/c (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) ввели однократную подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, соединения ISIS 353382, 655861, 664078, 661161, 665001 или солевого раствора. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей умертвили через 72 часов после последнего введения для определения уровней мРНК SRB-1 в печени при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней мРНК SRB-1 для каждой экспериментальной группы, нормализованных к контрольному образцу, обработанному солевым раствором.

Как показано в Таблице 27, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК SRB-1 дозозависимым образом. Действительно, антисмысловые олигонуклеотиды, содержащие фосфодиэфир-связанные конъюгаты GalNAc<sub>3</sub>-1 и GalNAc<sub>3</sub>-9 на 3'-конце (ISIS 655861 и ISIS 664078), а также конъюгаты GalNAc<sub>3</sub>-3 и GalNAc<sub>3</sub>-8, связанные на 5'-конце (ISIS 661161 и ISIS 665001) демонстрируют существенное улучшение эффективности, по сравнению с неконъюгированным антисмысловым олигонуклеотидом (ISIS 353382). Кроме того, ISIS 664078, содержащий конъюгат GalNAc<sub>3</sub>-9 на 3'-конце, был по существу настолько же эффективным, как ISIS 655861, который содержит конъюгат GalNAc<sub>3</sub>-1 на 3'-конце. 5'-конъюгированные антисмысловые олигонуклеотиды, ISIS 661161 и ISIS 665001, содержащие GalNAc<sub>3</sub>-3 или GalNAc<sub>3</sub>-9, соответственно, обладают повышенной эффективностью, по сравнению с 3'-конъюгированными антисмысловыми соединениями (ISIS 655861 и ISIS 664078).

Таблица 27

ASO, содержащие GalNac3-1, 3, 8 или 9, нацеленные на SRB-1

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% от солевого раствора)	Конъюгат
Солевой раствор	н.д.	100	
353382	3	88	нет
	10	68	
	30	36	
655861	0,5	98	GalNac3-1 (3')
	1,5	76	
	5	31	
	15	20	
664078	0,5	88	GalNac3-9 (3')
	1,5	85	
	5	46	
	15	20	
661161	0,5	92	GalNac3-3 (5')
	1,5	59	
	5	19	
	15	11	
665001	0,5	100	GalNac3-8 (5')
	1,5	73	
	5	29	
	15	13	

Уровни трансаминазы в печени, аланин-аминотрансферазы (ALT) и аспартат-аминотрансферазы (AST) в сыворотке измеряли относительно мышей, инъецированных солевым раствором, применяя стандартные протоколы. Оценили также общий билирубин и азот мочевины крови (АМК). Проверили изменение массы тела, которое существенно не отличалось от группы с солевым раствором. Значения ALT, AST, общего билирубина и АМК представлены ниже в таблице.

Таблица 28

ISIS №	Доза мг/кг	ALT	AST	Общий билирубин	АМК	Конъюгат
Солевой раствор		24	59	0,1	37,52	
353382	3	21	66	0,2	34,65	нет
	10	22	54	0,2	34,2	
	30	22	49	0,2	33,72	

655861	0,5	25	62	0,2	30,65	<b>GalNAc3-1 (3')</b>
	1,5	23	48	0,2	30,97	
	5	28	49	0,1	32,92	
	15	40	97	0,1	31,62	
664078	0,5	40	74	0,1	35,3	<b>GalNAc3-9 (3')</b>
	1,5	47	104	0,1	32,75	
	5	20	43	0,1	30,62	
	15	38	92	0,1	26,2	
661161	0,5	101	162	0,1	34,17	<b>GalNAc3-3 (5')</b>
	1,5 г	42	100	0,1	33,37	
	5 г	23	99	0,1	34,97	
	15	53	83	0,1	34,8	
665001	0,5	28	54	0,1	31,32	<b>GalNAc3-8 (5')</b>
	1,5	42	75	0,1	32,32	
	5	24	42	0,1	31,85	
	15	32	67	0,1	31,	

**Пример 56. Дозозависимое исследование олигонуклеотидов, содержащих либо 3', либо 5'-конъюгирующую группу (сравнение GalNAc3-1, 2, 3, 5, 6, 7 и 10), нацеленных на SRB-1, *in vivo***

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже, испытали в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования SRB-1 у мышей. Неконъюгированный ISIS 353382 включили в качестве стандарта. Каждая из различных конъюгирующих групп GalNAc3 была присоединена к 5'-концу соответствующего олигонуклеотида фосфодиэфир-связанным 2'-дезоксиаденозиновым нуклеозидом (расщепляемый фрагмент), за исключением ISIS 655861, в котором конъюгирующая группа GalNAc3 присоединена к 3'-концу.

Таблица 29

## Модифицированные ASO, нацеленные на SRB-1

ASO	Последовательность (от 5' к 3')	Мотив	Конъюгат	SEQ ID NO.
ISIS 353382 (исходное)	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	Без конъюгата	28
ISIS 655861	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{e0} A_{do}^m$ <b>GalNAc3-1a</b>	5/10/5	<b>GalNAc3-1</b>	29
ISIS 664507	<b>GalNAc3-2a-o'-Ado</b> $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	<b>GalNAc3-2</b>	30
ISIS 661161	<b>GalNAc3-3a-o'-Ado</b> $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	<b>GalNAc3-3</b>	30
ISIS 666224	<b>GalNAc3-5a-o'-Ado</b> $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	<b>GalNAc3-5</b>	30
ISIS 666961	<b>GalNAc3-6a-o'-Ado</b> $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	<b>GalNAc3-6</b>	30

ISIS 666981	<b>GalNAc<sub>3</sub>-7<sub>a-o'</sub>-Ado</b> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>e</sub>	5/10/5	<b>GalNAc<sub>3</sub>-7</b>	30
ISIS 666881	<b>GalNAc<sub>3</sub>-10<sub>a-o'</sub>-Ado</b> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>e</sub>	5/10/5	<b>GalNAc<sub>3</sub>-10</b>	30

Заглавные буквы указывают азотистое основание для каждого нуклеозида, а <sup>m</sup>C означает 5-метилцитозин. Нижние индексы: «e» означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид; «d» означает β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; «s» означает тиофосфатную межнуклеозидную связь(PS); «o» означает фосфодиэфирную межнуклеозидную связь(PO); и «o'» означает -O-P(=O)(OH)-. Конъюгирующие группы выделены жирным шрифтом.

Структура GalNAc<sub>3</sub>-1<sub>a</sub> показана ранее в Примере 9. Структура GalNAc<sub>3</sub>-2<sub>a</sub> показана ранее в Примере 37. Структура GalNAc<sub>3</sub>-3<sub>a</sub> показана ранее в Примере 39. Структура GalNAc<sub>3</sub>-5<sub>a</sub> показана ранее в Примере 49. Структура GalNAc<sub>3</sub>-6<sub>a</sub> показана ранее в Примере 51. Структура GalNAc<sub>3</sub>-7<sub>a</sub> показана ранее в Примере 48. Структура GalNAc<sub>3</sub>-10<sub>a</sub> показана ранее в Примере 46.

### *Лечение*

Шестинедельным самцам мышей Balb/c (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) ввели однократную подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, соединения ISIS 353382, 655861, 664507, 661161, 666224, 666961, 666981, 666881 или солевого раствора. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей умертвили через 72 часов после последнего введения для определения уровней мРНК SRB-1 в печени при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней мРНК SRB-1 для каждой экспериментальной группы, нормализованных к контрольному образцу, обработанному солевым раствором.

Как показано в Таблице 30, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК SRB-1 дозозависимым образом. Действительно, конъюгированные антисмысловые олигонуклеотиды демонстрируют значительное усиление эффективности, по сравнению с неконъюгированным антисмысловым олигонуклеотидом (ISIS 353382). 5'-конъюгированные антисмысловые олигонуклеотиды демонстрируют небольшое усиление эффективности, по сравнению с 3'-конъюгированным антисмысловым олигонуклеотидом.

**Таблица 30**

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% от солевого раствора)	Конъюгат
Солевой раствор	н.д.	100,0	
353382	3	96,0	нет
	10	73,1	
	30	36,1	
655861	0,5	99,4	GalNac <sub>3</sub> -1 (3')
	1,5	81,2	
	5	33,9	
	15	15,2	
664507	0,5	102,0	GalNac <sub>3</sub> -2 (5')
	1,5	73,2	
	5	31,3	
	15	10,8	
661161	0,5	90,7	GalNac <sub>3</sub> -3 (5')
	1,5	67,6	
	5	24,3	
	15	11,5	
666224	0,5	96,1	GalNac <sub>3</sub> -5 (5')
	1,5	61,6	
	5	25,6	
	15	11,7	
666961	0,5	85,5	GalNac <sub>3</sub> -6 (5')
	1,5	56,3	
	5	34,2	
	15	13,1	
666981	0,5	84,7	GalNac <sub>3</sub> -7 (5')
	1,5	59,9	
	5	24,9	
	15	8,5	
666881	0,5	100,0	GalNac <sub>3</sub> -10 (5')
	1,5	65,8	
	5	26,0	
	15	13,0	

Уровни трансаминазы в печени, аланин-аминотрансферазы (ALT) и аспартат-аминотрансферазы (AST) в сыворотке измеряли относительно мышей, инъецированных солевым раствором, применяя стандартные протоколы. Оценили также общий билирубин и азот мочевины крови (АМК). Проверили изменение массы тела, которое существенно не отличалось от группы с солевым раствором. Значения ALT, AST, общего билирубина и АМК представлены ниже в Таблице 31.

Таблица 31

ISIS №	Доза мг/кг	ALT	AST	Общий билирубин	АМК	Конъюгат
--------	------------	-----	-----	-----------------	-----	----------

Солевой раствор		26	57	0,2	27	
353382	3	25	92	0,2	27	нет
	10	23	40	0,2	25	
	30	29	54	0,1	28	
655861	0,5	25	71	0,2	34	GalNac <sub>3</sub> -1 (3')
	1,5	28	60	0,2	26	
	5	26	63	0,2	28	
	15	25	61	0,2	28	
664507	0,5	25	62	0,2	25	GalNac <sub>3</sub> -2 (5')
	1,5	24	49	0,2	26	
	5	21	50	0,2	26	
	15	59	84	0,1	22	
661161	0,5	20	42	0,2	29	GalNac <sub>3</sub> -3 (5')
	1,5 г	37	74	0,2	25	
	5 г	28	61	0,2	29	
	15	21	41	0,2	25	
666224	0,5	34	48	0,2	21	GalNac <sub>3</sub> -5 (5')
	1,5	23	46	0,2	26	
	5	24	47	0,2	23	
	15	32	49	0,1	26	
666961	0,5	17	63	0,2	26	GalNac <sub>3</sub> -6 (5')
	1,5	23	68	0,2	26	
	5	25	66	0,2	26	
	15	29	107	0,2	28	
666981	0,5	24	48	0,2	26	GalNac <sub>3</sub> -7 (5')
	1,5	30	55	0,2	24	
	5	46	74	0,1	24	
	15	29	58	0,1	26	
666881	0,5	20	65	0,2	27	GalNac <sub>3</sub> -10 (5')
	1,5	23	59	0,2	24	
	5	45	70	0,2	26	
	15	21	57	0,2	24	

**Пример 57. Исследование продолжительности действия олигонуклеотидов, содержащих 3'-конъюгирующую группу, на ApoC III, *in vivo***

Мышам однократно ввели инъекцию дозы, указанной ниже, и в течение 42 дней наблюдали уровни ApoC-III и триглицеридов в плазме (TG в плазме). Исследование выполнили, используя в каждой группе 3 трансгенных мышей, которые экспрессируют человеческий ApoC-III.

**Таблица 32**

**Модифицированные ASO, нацеленные на ApoC III**

ASO	Последовательность (от 5' к 3')	Связи	SEQ ID NO.
ISIS 304801	$A_{es}G_{es}^mC_{es}T_{es}T_{es}^mC_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^mC_{ds}^mC_{ds}A_{ds}G_{ds}^mC_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_e$	PS	20
ISIS 647535	$A_{es}G_{es}^mC_{es}T_{es}T_{es}^mC_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}$ $A_{ds}G_{ds}^mC_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{eo}A_{do}'\text{-GalNAc3-1a}$	PS	21
ISIS 647536	$A_{es}G_{eo}^mC_{eo}T_{eo}T_{eo}^mC_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}$ $A_{ds}G_{ds}^mC_{ds}T_{eo}T_{eo}T_{es}A_{es}T_{eo}A_{do}'\text{-GalNAc3-1a}$	PO/PS	21

Заглавные буквы указывают азотистое основание для каждого нуклеозида, а <sup>m</sup>C означает 5-метилцитозин. Нижние индексы: «e» означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид; «d» означает β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; «s» означает тиофосфатную межнуклеозидную связь(PS); «o» означает фосфодиэфирную межнуклеозидную связь(PO); и «o'» означает -O-P(=O)(OH)-. Конъюгирующие группы выделены жирным шрифтом.

Структура GalNAc<sub>3</sub>-1<sub>a</sub> показана ранее в Примере 9.

Таблица 33

**мРНК ApoC III (% от солевого раствора на 1-й день) и уровни TG в плазме (% от солевого раствора на 1-й день)**

ASO	Доза	Мишень	3-й день	7-й день	14-й день	35-й день	42-й день
Солевой раствор	0 мг/кг	ApoC-III	98	100	100	95	116
ISIS 304801	30 мг/кг	ApoC-III	28	30	41	65	74
ISIS 647535	10 мг/кг	ApoC-III	16	19	25	74	94
ISIS 647536	10 мг/кг	ApoC-III	18	16	17	35	51
Солевой раствор	0 мг/кг	TG в плазме	121	130	123	105	109
ISIS 304801	30 мг/кг	TG в плазме	34	37	50	69	69
ISIS 647535	10 мг/кг	TG в плазме	18	14	24	18	71
ISIS 647536	10 мг/кг	TG в плазме	21	19	15	32	35

Как можно видеть в представленной выше таблице, продолжительность действия увеличивается при добавлении 3'-конъюгирующие группы, по сравнению с неконъюгированным олигонуклеотидом. Дополнительное увеличение продолжительности



действия наблюдали для смешанного конъюгированного PO/PS олигонуклеотида 647536, по сравнению с конъюгированным олигонуклеотидом 647535, содержащим только PS.

**Пример 58. Дозозависимое исследование олигонуклеотидов, содержащих 3'-конъюгирующую группу (сравнение GalNAc<sub>3</sub>-1 и GalNAc<sub>4</sub>-11), нацеленных на SRB-1, *in vivo***

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже, испытали в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования SRB-1 у мышей. Неконъюгированный ISIS 440762 включили в качестве неконъюгированного стандарта. Каждая из конъюгирующих групп была присоединена к 3'-концу соответствующего олигонуклеотида при помощи расщепляемого фрагмента фосфодиэфир-связанного 2'-дезоксиденозинового нуклеозида.

Структура GalNAc<sub>3</sub>-1<sub>a</sub> показана ранее в Примере 9. Структура GalNAc<sub>3</sub>-11<sub>a</sub> показана ранее в Примере 50.

*Лечение*

Шестинедельным самцам мышей Balb/c (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) ввели однократную подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, соединения ISIS 440762, 651900, 663748 или солевого раствора. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей умертвили через 72 часов после последнего введения для определения уровней мРНК SRB-1 в печени при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней мРНК SRB-1 для каждой экспериментальной группы, нормализованных к контрольному образцу, обработанному солевым раствором.

Как показано в Таблице 34, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК SRB-1 дозозависимым образом. Антисмысловые олигонуклеотиды, содержащие фосфодиэфир-связанные конъюгаты GalNAc<sub>3</sub>-1 и GalNAc<sub>4</sub>-11 на 3'-конце (ISIS 651900 и ISIS 663748), демонстрируют значительное усиление эффективности, по сравнению с неконъюгированным антисмысловым олигонуклеотидом (ISIS 440762). Эти два конъюгированных олигонуклеотида, GalNAc<sub>3</sub>-1 и GalNAc<sub>4</sub>-11, были одинаково эффективными.

**Таблица 34**

**Модифицированные ASO, нацеленные на SRB-1**

ASO	Последовательность (от 5' к 3')	Доза, мг/кг	% от контроля с солевым раствором	SEQ ID NO.
Солевой раствор			100	
ISIS 440762	$T_{ks}^m C_{ks} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{ks}^m C_k$	0,6	73,45	22
		2	59,66	
		6	23,50	
ISIS 651900	$T_{ks}^m C_{ks} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{ks}^m C_{ko} A_{do'}-GalNAc3-1a$	0,2	62,75	23
		0,6	29,14	
		2	8,61	
		6	5,62	
ISIS 663748	$T_{ks}^m C_{ks} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{ks}^m C_{ko} A_{do'}-GalNAc4-11a$	0,2	63,99	23
		0,6	33,53	
		2	7,58	
		6	5,52	

Заглавные буквы указывают азотистое основание для каждого нуклеозида, а <sup>m</sup>C означает 5-метилцитозин. Нижние индексы: «e» означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид; «k» означает 6'-(S)-CH<sub>3</sub> бициклический нуклеозид; «d» означает β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; «s» означает тиофосфатные межнуклеозидные связи (PS); «o» означает фосфодиэфирные межнуклеозидные связи (PO); и «o'» означает -O-P(=O)(OH)-. Конъюгирующие группы выделены жирным шрифтом.

Уровни трансаминазы в печени, аланин-аминотрансферазы (ALT) и аспартат-аминотрансферазы (AST) в сыворотке измеряли относительно мышей, инъектированных солевым раствором, применяя стандартные протоколы. Оценили также общий билирубин и азот мочевины крови (АМК). Проверили изменение массы тела, которое существенно не отличалось от группы с солевым раствором. Значения ALT, AST, общего билирубина и АМК представлены ниже в Таблице 35.

Таблица 35

ISIS №	Доза мг/кг	ALT	AST	Общий билирубин	АМК	Конъюгат
Солевой раствор		30	76	0,2	40	
440762	0,60	32	70	0,1	35	нет
	2	26	57	0,1	35	
	6	31	48	0,1	39	
651900	0,2	32	115	0,2	39	GalNAc3-1 (3')
	0,6	33	61	0,1	35	
	2	30	50	0,1	37	
	6	34	52	0,1	36	

663748	0,2	28	56	0,2	36	<b>GalNac4-11</b> (3')
	0,6	34	60	0,1	35	
	2	44	62	0,1	36	
	6	38	71	0,1	33	

**Пример 59. Действие GalNac3-1-конъюгированных ASO, нацеленных на FXI, *in vivo***

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже, испытали в исследовании действия многократных нарастающих доз на антисмысловое ингибирование FXI у мышей. ISIS 404071 включили в качестве неконъюгированного стандарта. Каждая из конъюгирующих групп была присоединена к 3'-концу соответствующего олигонуклеотида при помощи расщепляемого фрагмента фосфодиэфир-связанного 2'-дезоксиденозинового нуклеозида.

**Таблица 36**

**Модифицированные ASO, нацеленные на FXI**

ASO	Последовательность (от 5' к 3')	Связи	SEQ ID NO.
ISIS 404071	T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> G <sub>es</sub> T <sub>es</sub> A <sub>es</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> G <sub>e</sub>	PS	31
ISIS 656172	T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> G <sub>es</sub> T <sub>es</sub> A <sub>es</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> G <sub>eo</sub> <b>A<sub>do</sub>'-</b> <b>GalNac3-1<sub>a</sub></b>	PS	32
ISIS 656173	T <sub>es</sub> G <sub>eo</sub> G <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> A <sub>eo</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>eo</sub> G <sub>eo</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> G <sub>eo</sub> <b>A<sub>do</sub>'-</b> <b>GalNac3-1<sub>a</sub></b>	PO/PS	32

Заглавные буквы указывают азотистое основание для каждого нуклеозида, а <sup>m</sup>C означает 5-метилцитозин. Нижние индексы: «e» означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид; «d» означает β-D-2'-деоксирибонуклеозид; «s» означает тиофосфатную межнуклеозидную связь(PS); «o» означает фосфодиэфирную межнуклеозидную связь(PO); и «o'» означает -O-P(=O)(OH)-. Конъюгирующие группы выделены жирным шрифтом.

Структура GalNac3-1<sub>a</sub> показана ранее в Примере 9.

*Лечение*

Шестинедельным самцам мышей Balb/c (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) дважды в неделю в течение 3 недель вводили подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, соединения ISIS 404071, 656172, 656173 или PBS в качестве контрольного образца. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей умертвили через 72 часов после последнего введения для определения уровней мРНК FXI в печени при помощи

ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Измерили также уровни белка FXI в плазме при помощи твердофазного иммуноферментного анализа. Уровни мРНК FXI определяли относительно общей РНК (при помощи RIBOGREEN®), затем нормализовали к контрольному образцу, обработанному PBS. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней мРНК FXI для каждой экспериментальной группы. Данные нормализовали к контрольному образцу, обработанному PBS, и обозначили как «% PBS». ED<sub>50</sub>s измеряли по таким же способам, как описаны ранее, и они представлены ниже.

Таблица 37

## мРНК фактора XI (% от солевого раствора)

ASO	Доза, мг/кг	% от контрольного образца	Конъюгат	Связи
Солевой раствор		100	нет	
ISIS 404071	3	92	нет	PS
	10	40		
	30	15		
ISIS 656172	0,7	74	GalNAc <sub>3</sub> -1	PS
	2	33		
	6	9		
ISIS 656173	0,7	49	GalNAc <sub>3</sub> -1	PO/PS
	2	22		
	6	1		

Как показано в Таблице 37, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК FXI дозозависимым образом. Олигонуклеотиды, содержащие конъюгирующую группу 3'-GalNAc<sub>3</sub>-1, демонстрируют значительное усиление эффективности, по сравнению с неконъюгированным антисмысловым олигонуклеотидом (ISIS 404071). Между эти двумя конъюгированными олигонуклеотидами дополнительное усиление эффективности было обеспечено за счет замены некоторых PS связей на PO (ISIS 656173).

Как показано в Таблице 37а, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни белка FXI дозозависимым образом. Олигонуклеотиды, содержащие конъюгирующую группу 3'-GalNAc<sub>3</sub>-1, демонстрируют значительное усиление эффективности, по сравнению с неконъюгированным антисмысловым олигонуклеотидом

(ISIS 404071). Между эти двумя конъюгированными олигонуклеотидами дополнительное усиление эффективности было обеспечено за счет замены некоторых PS связей на PO (ISIS 656173).

Таблица 37а

## Белок фактора XI (% от солевого раствора)

ASO	Доза, мг/кг	Белок (% от контрольного образца)	Конъюгат	Связи
Солевой раствор		100	нет	
ISIS 404071	3	127	нет	PS
	10	32		
	30	3		
ISIS 656172	0,7	70	GalNAc3-1	PS
	2	23		
	6	1		
ISIS 656173	0,7	45	GalNAc3-1	PO/PS
	2	6		
	6	0		

Уровни трансаминазы в печени, аланин-аминотрансферазы (ALT) и аспартат-аминотрансферазы (AST) в сыворотке измеряли относительно мышей, инъецированных солевым раствором, применяя стандартные протоколы. Оценили также общий билирубин, общий альбумин, CRE и азот мочевины крови (АМК). Проверили изменение массы тела, которое существенно не отличалось от группы с солевым раствором. Значения ALT, AST, общего билирубина и АМК представлены ниже в таблице.

Таблица 38

ISIS №	Доза мг/кг	ALT	AST	Общий альбумин	Общий билирубин	CRE	АМК	Конъюгат
Солевой раствор		71,8	84,0	3,1	0,2	0,2	22,9	
404071	3	152,8	176,0	3,1	0,3	0,2	23,0	нет
	10	73,3	121,5	3,0	0,2	0,2	21,4	
	30	82,5	92,3	3,0	0,2	0,2	23,0	
656172	0,7	62,5	111,5	3,1	0,2	0,2	23,8	GalNAc3-1 (3')
	2	33,0	51,8	2,9	0,2	0,2	22,0	
	6	65,0	71,5	3,2	0,2	0,2	23,9	
656173	0,7	54,8	90,5	3,0	0,2	0,2	24,9	GalNAc3-1 (3')
	2	85,8	71,5	3,2	0,2	0,2	21,0	
	6	114,0	101,8	3,3	0,2	0,2	22,7	

**Пример 60. Действие конъюгированных ASO, нацеленных на SRB-1, *in vitro***

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже, испытали в исследовании действия многократных нарастающих доз на антисмысловое ингибирование SRB-1 в первичных гепатоцитах мышей. ISIS 353382 включили в качестве неконоъюгированного стандарта. Каждая из конъюгирующих групп была присоединена к 3' или 5'-концу соответствующего олигонуклеотида при помощи расщепляемого фрагмента фосфодиэфир-связанного 2'-дезоксиденозинового нуклеозида.

**Таблица 39****Модифицированные ASO, нацеленные на SRB-1**

ASO	Последовательность (от 5' к 3')	Мотив	Конъюгат	SEQ ID NO.
ISIS 353382	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	нет	28
ISIS 655861	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{eo} A_{do}'-$ <b>GalNAc3-1a</b>	5/10/5	<b>GalNAc3-1</b>	29
ISIS 655862	$G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{eo}^m C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_{eo} A_{do}'-$ <b>GalNAc3-1a</b>	5/10/5	<b>GalNAc3-1</b>	29
ISIS 661161	<b>GalNAc3-3a-o'</b> $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	<b>GalNAc3-3</b>	30
ISIS 665001	<b>GalNAc3-8a-o'</b> $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	<b>GalNAc3-8</b>	30
ISIS 664078	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{eo} A_{do}'-$ <b>GalNAc3-9a</b>	5/10/5	<b>GalNAc3-9</b>	29
ISIS 666961	<b>GalNAc3-6a-o'</b> $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	<b>GalNAc3-6</b>	30
ISIS 664507	<b>GalNAc3-2a-o'</b> $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	<b>GalNAc3-2</b>	30
ISIS 666881	<b>GalNAc3-10a-o'</b> $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	<b>GalNAc3-10</b>	30
ISIS 666224	<b>GalNAc3-5a-o'</b> $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	<b>GalNAc3-5</b>	30
ISIS 666981	<b>GalNAc3-7a-o'</b> $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	<b>GalNAc3-7</b>	30

Заглавные буквы указывают азотистое основание для каждого нуклеозида, а  $^mC$  означает 5-метилцитозин. Нижние индексы: «e» означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид; «d» означает  $\beta$ -D-2'-дезоксирибонуклеозид; «s» означает тиофосфатную межнуклеозидную связь(PS); «o» означает фосфодиэфирную межнуклеозидную связь(PO); и «o'» означает -O-P(=O)(OH)-. Конъюгирующие группы выделены жирным шрифтом.

Структура GalNAc<sub>3</sub>-1<sub>a</sub> показана ранее в Примере 9. Структура GalNAc<sub>3</sub>-3<sub>a</sub> показана ранее в Примере 39. Структура GalNAc<sub>3</sub>-8<sub>a</sub> показана ранее в Примере 47. Структура GalNAc<sub>3</sub>-9<sub>a</sub> показана ранее в Примере 52. Структура GalNAc<sub>3</sub>-6<sub>a</sub> показана ранее в Примере 51. Структура GalNAc<sub>3</sub>-2<sub>a</sub> показана ранее в Примере 37. Структура GalNAc<sub>3</sub>-10<sub>a</sub> показана ранее в Примере 46. Структура GalNAc<sub>3</sub>-5<sub>a</sub> показана ранее в Примере 49. Структура GalNAc<sub>3</sub>-7<sub>a</sub> показана ранее в Примере 48.

### Лечение

Олигонуклеотиды, перечисленные выше, испытывали *in vitro* в первичных гепатоцитарных клетках мышей, помещенных на планшеты при плотности 25000 клеток на лунку и обработанных 0,03, 0,08, 0,24, 0,74, 2,22, 6,67 или 20 нМ модифицированного олигонуклеотида. После обработки в течение около 16 часов, из клеток выделили РНК и измерили уровни мРНК при помощи количественной ПЦР в реальном времени, а уровни мРНК SRB-1 III скорректировали в соответствии с общим содержанием РНК, измеренным при помощи RIBOGREEN®.

IC<sub>50</sub> рассчитали по стандартным способам, а результаты представлены в Таблице 40. Результаты показывают, что при условиях свободного поглощения, в которых не применяли никакие реагенты или электроимпульсные приемы для искусственного ускорения входа олигонуклеотидов в клетки, олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc, были существенно более эффективными в гепатоцитах, чем исходный олигонуклеотид (ISIS 353382), который не содержит конъюгат GalNAc.

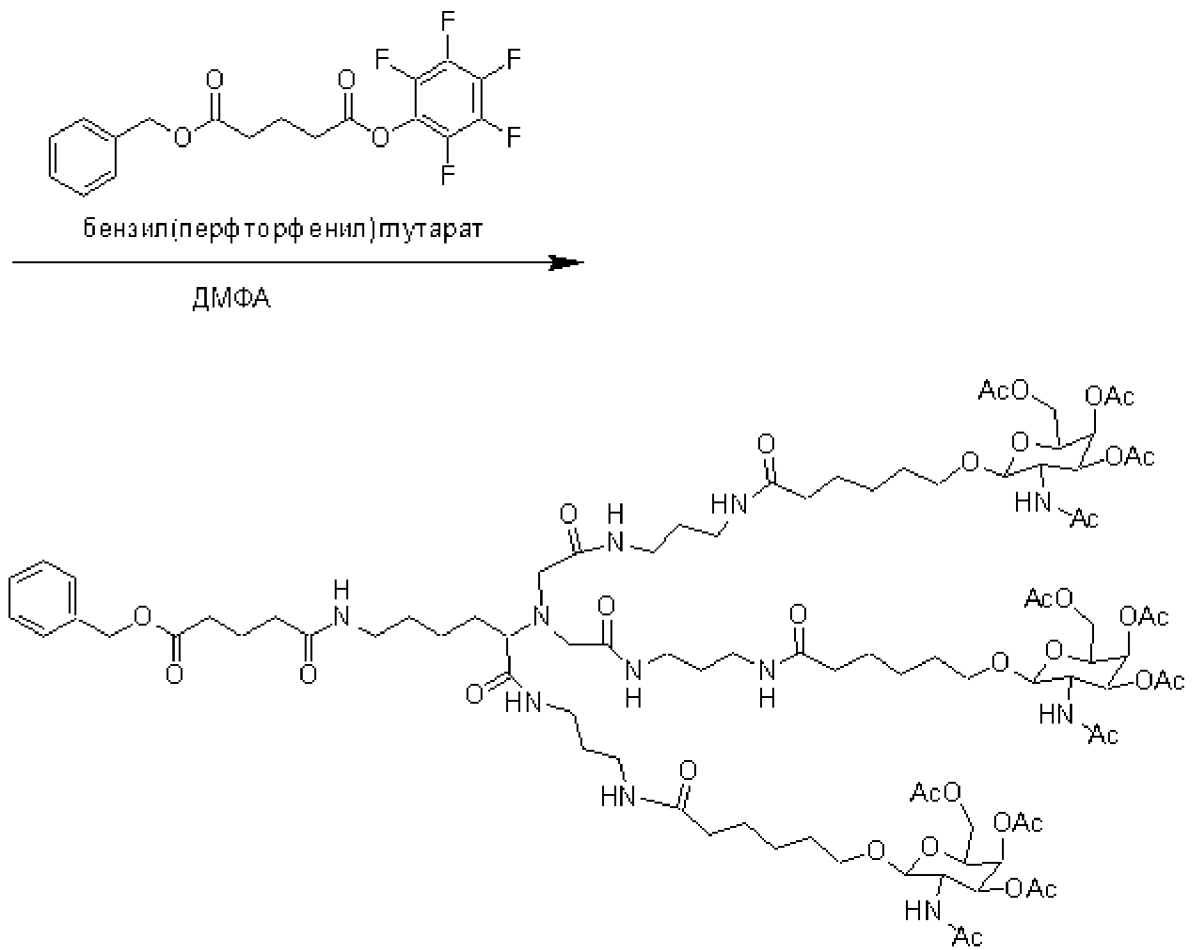
Таблица 40

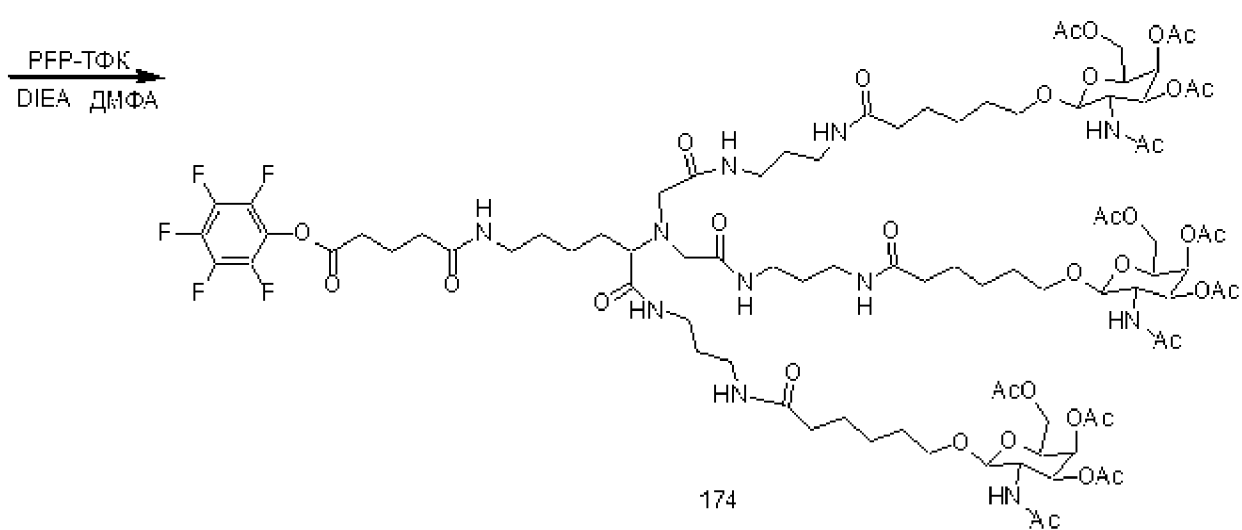
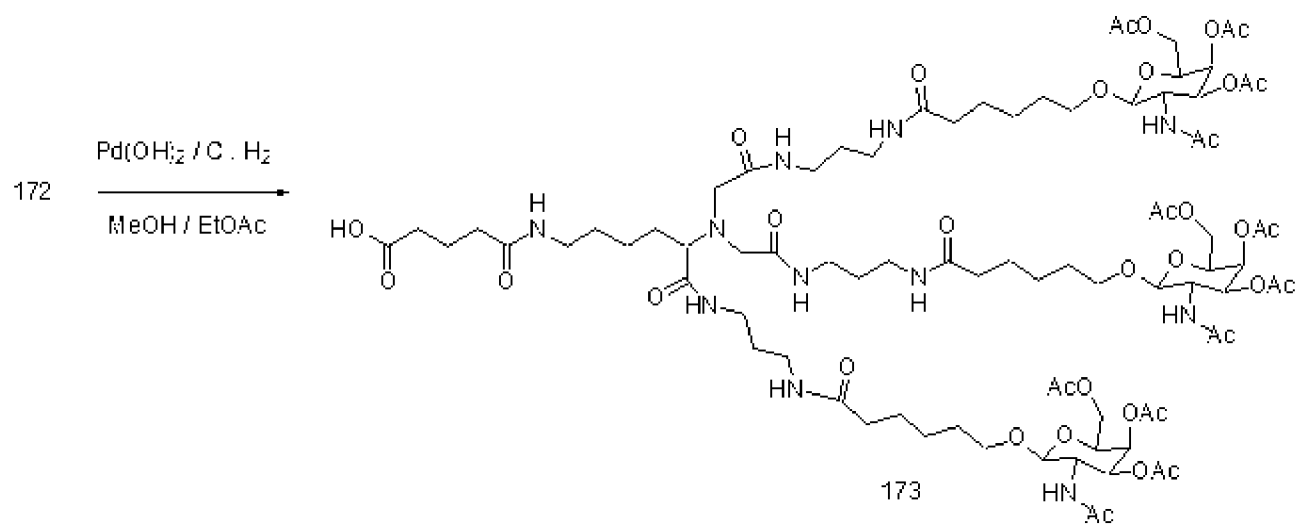
ASO	IC <sub>50</sub> (нМ)	Межнуклеозидные связи	Конъюгат	SEQ ID NO.
ISIS 353382	190 <sup>a</sup>	PS	нет	28
ISIS 655861	11 <sup>a</sup>	PS	GalNAc <sub>3</sub> -1	29
ISIS 655862	3	PO/PS	GalNAc <sub>3</sub> -1	29
ISIS 661161	15 <sup>a</sup>	PS	GalNAc <sub>3</sub> -3	30
ISIS 665001	20	PS	GalNAc <sub>3</sub> -8	30
ISIS 664078	55	PS	GalNAc <sub>3</sub> -9	29
ISIS 666961	22 <sup>a</sup>	PS	GalNAc <sub>3</sub> -6	30
ISIS 664507	30	PS	GalNAc <sub>3</sub> -2	30
ISIS 666881	30	PS	GalNAc <sub>3</sub> -10	30
ISIS 666224	30 <sup>a</sup>	PS	GalNAc <sub>3</sub> -5	30
ISIS 666981	40	PS	GalNAc <sub>3</sub> -7	30

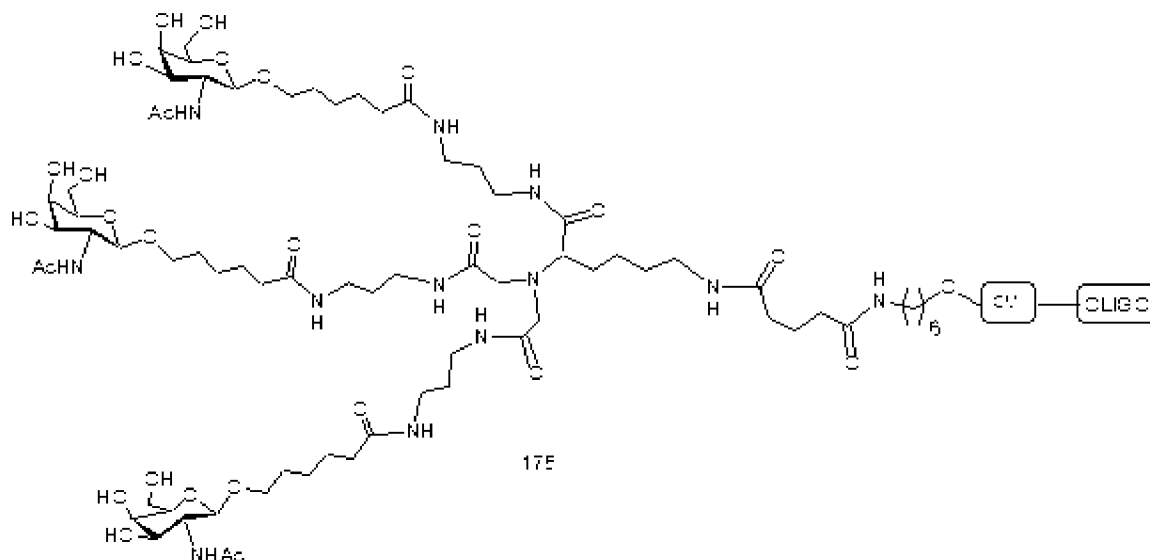
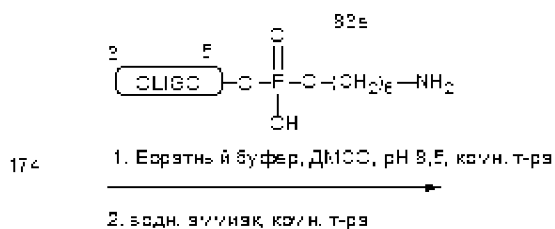
<sup>a</sup>Среднее для нескольких повторов.



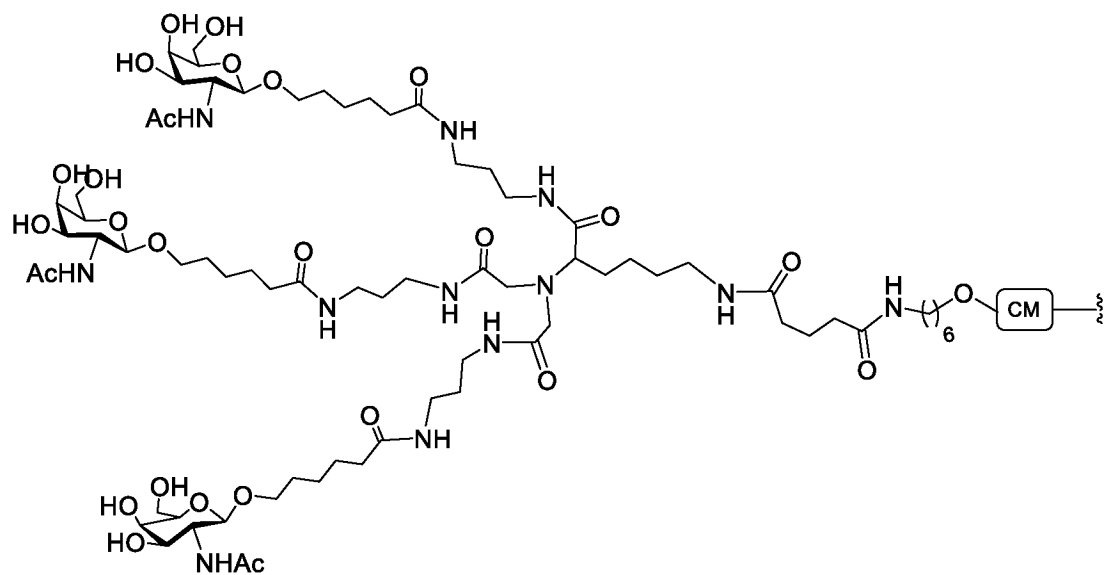




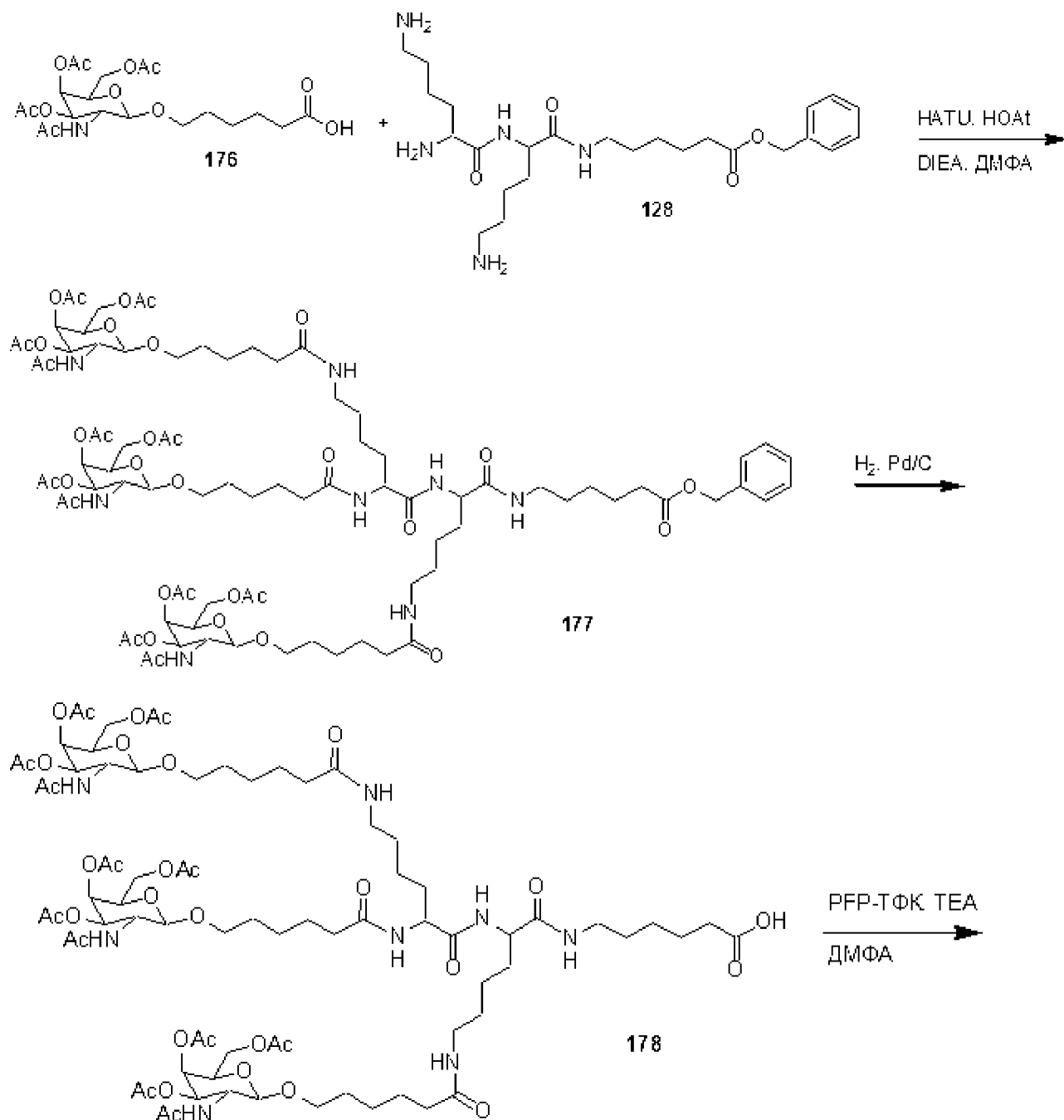


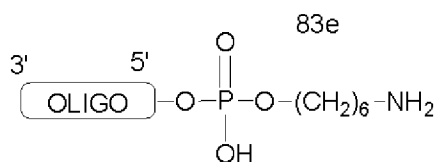
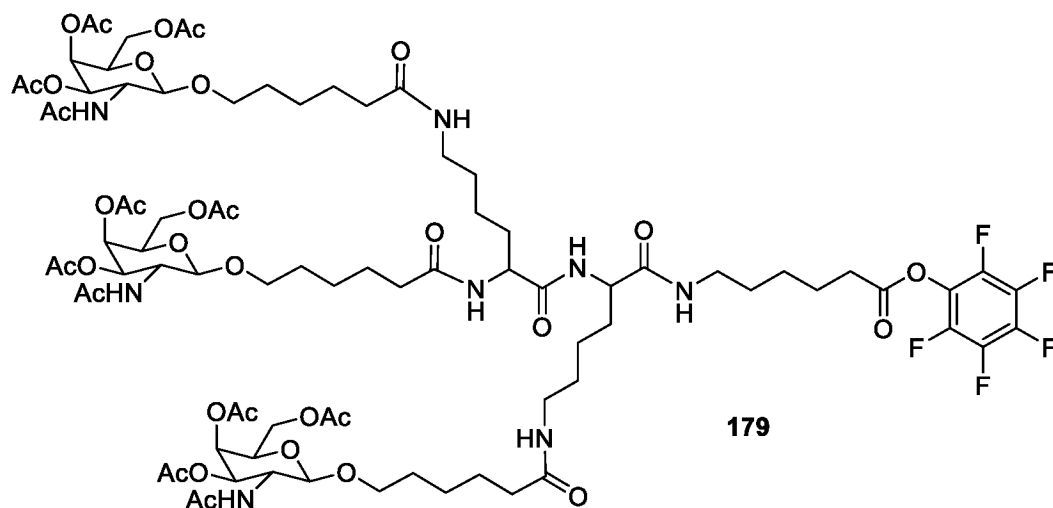


Соединение 169 имеется в продаже. Соединение 172 получили добавлением бензил(перфторфенил)глутарата к соединению 171. Бензил(перфторфенил)глутарат получили добавлением PFP-ТФК и DIEA к 5-(бензилокси)-5-оксопентановой кислоте в ДМФА. Олигомерное Соединение 175, содержащее конъюгирующую группу GalNAc<sub>3</sub>-12, получили из соединения 174 по общим способам, представленным в Примере 46. Кластерная часть GalNAc<sub>3</sub> конъюгирующей группы GalNAc<sub>3</sub>-12 (GalNAc<sub>3</sub>-12<sub>a</sub>) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом для получения различных конъюгирующих групп. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент представляет собой -P(=O)(OH)-A<sub>d</sub>-P(=O)(OH)-. Структура GalNAc<sub>3</sub>-12 (GalNAc<sub>3</sub>-12<sub>a</sub>-CM-) представлена ниже:



**Пример 62. Получение олигомерного соединения 180, содержащего GalNAc3-13**

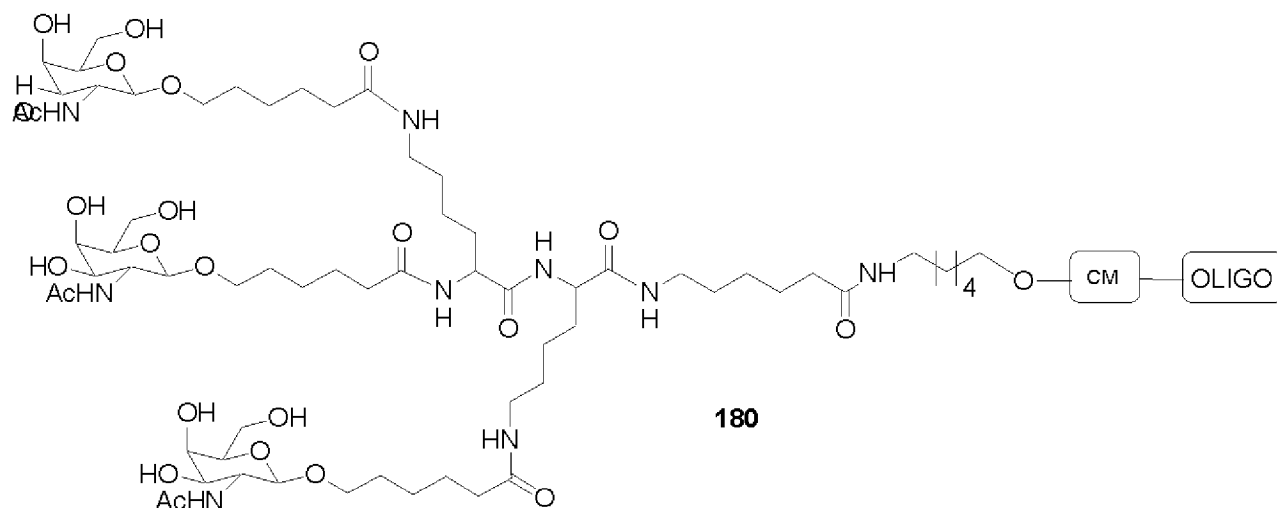




1. Боратный буфер, ДМСО, рН 8,5, комн. т-ра



2. водн. аммиак, комн. т-ра

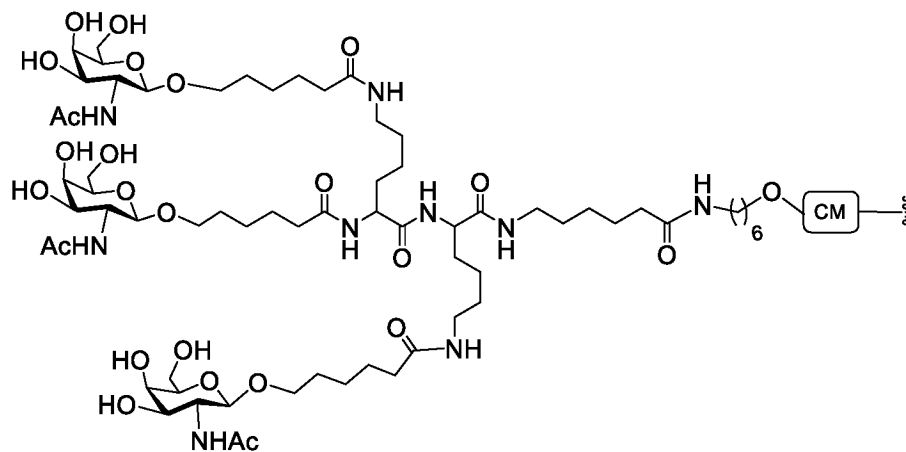


Соединение 176 получили по общему способу, представленному в Примере 2.

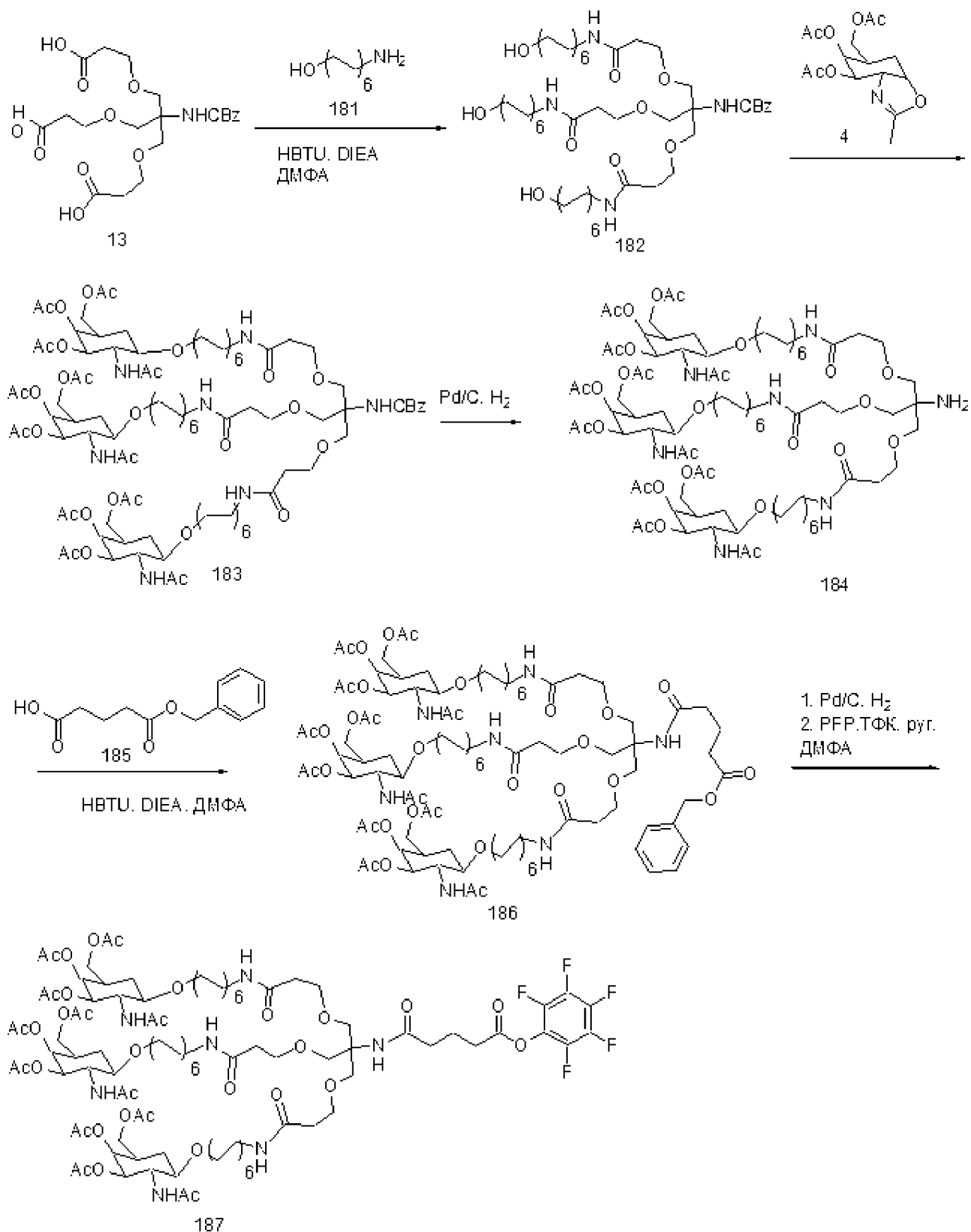
Олигомерное соединение 180, содержащее конъюгирующую группу GalNAc<sub>3</sub>-13, получили из соединения 177 по общим способам, представленным в Примере 49.

Кластерная часть GalNAc<sub>3</sub> конъюгирующей группы GalNAc<sub>3</sub>-13 (GalNAc<sub>3</sub>-13<sub>a</sub>) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом для получения различных конъюгирующих групп. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый

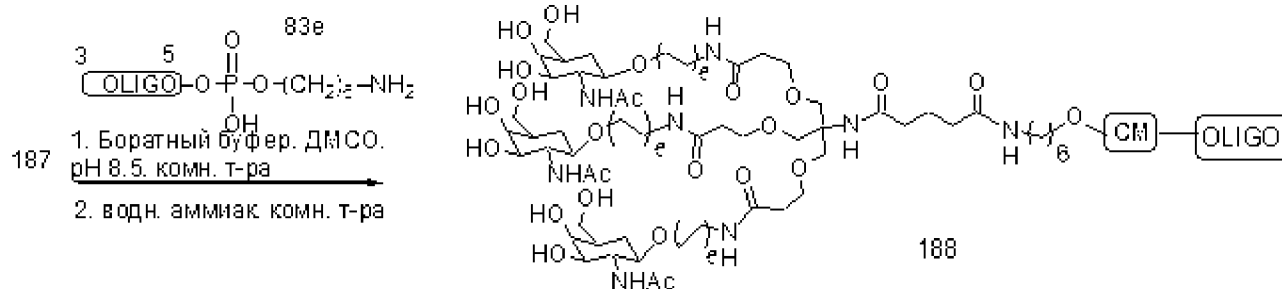
фрагмент представляет собой  $-P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-$ . Структура GalNAc<sub>3</sub>-13 (GalNAc<sub>3</sub>-13<sub>a</sub>-CM-) представлена ниже:



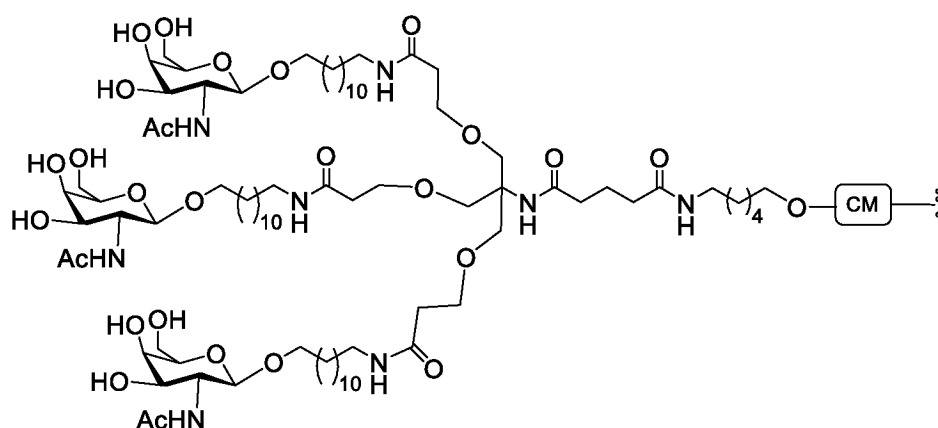
**Пример 63. Получение олигомерного соединения 188, содержащего GalNAc3-14**



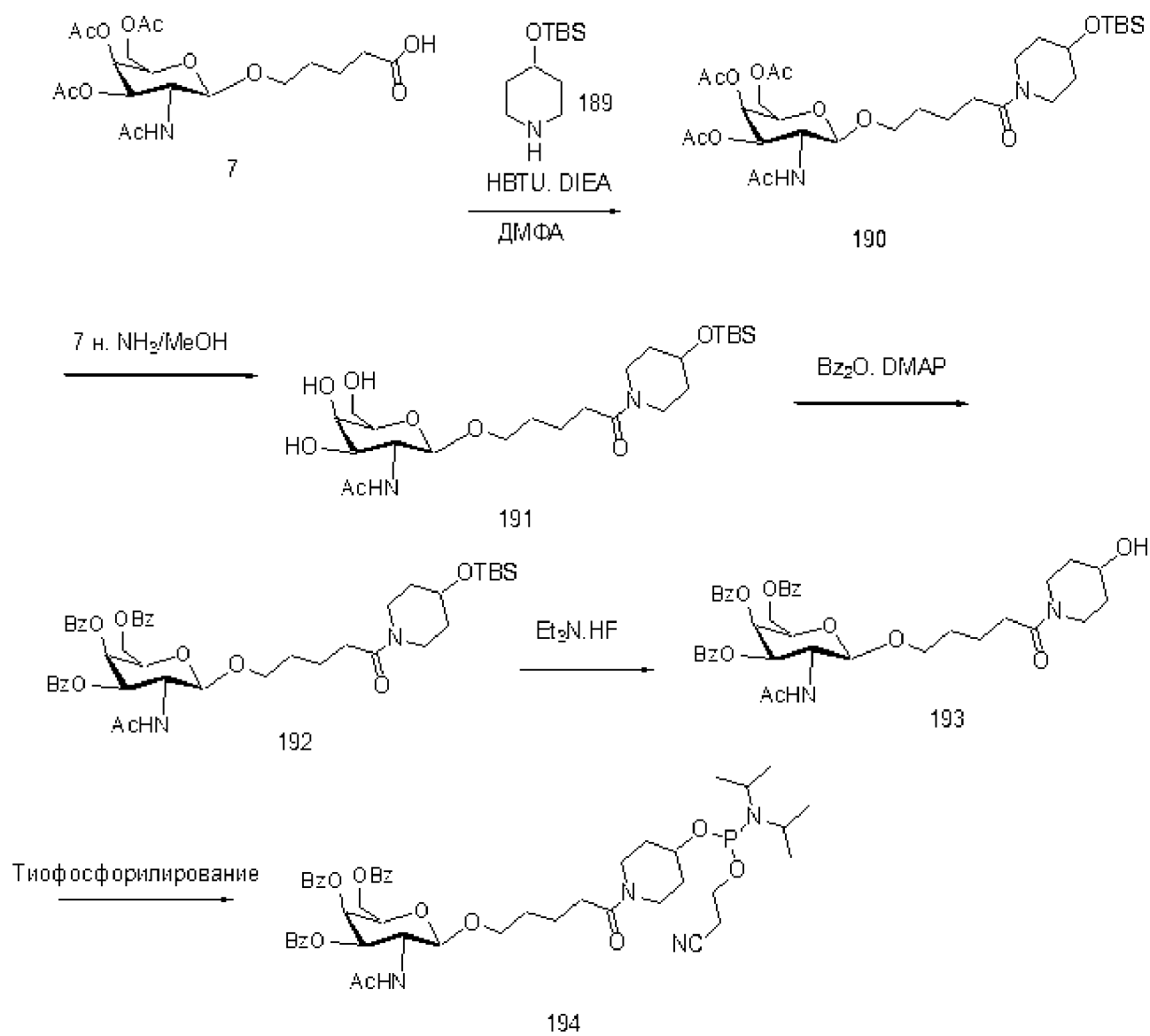


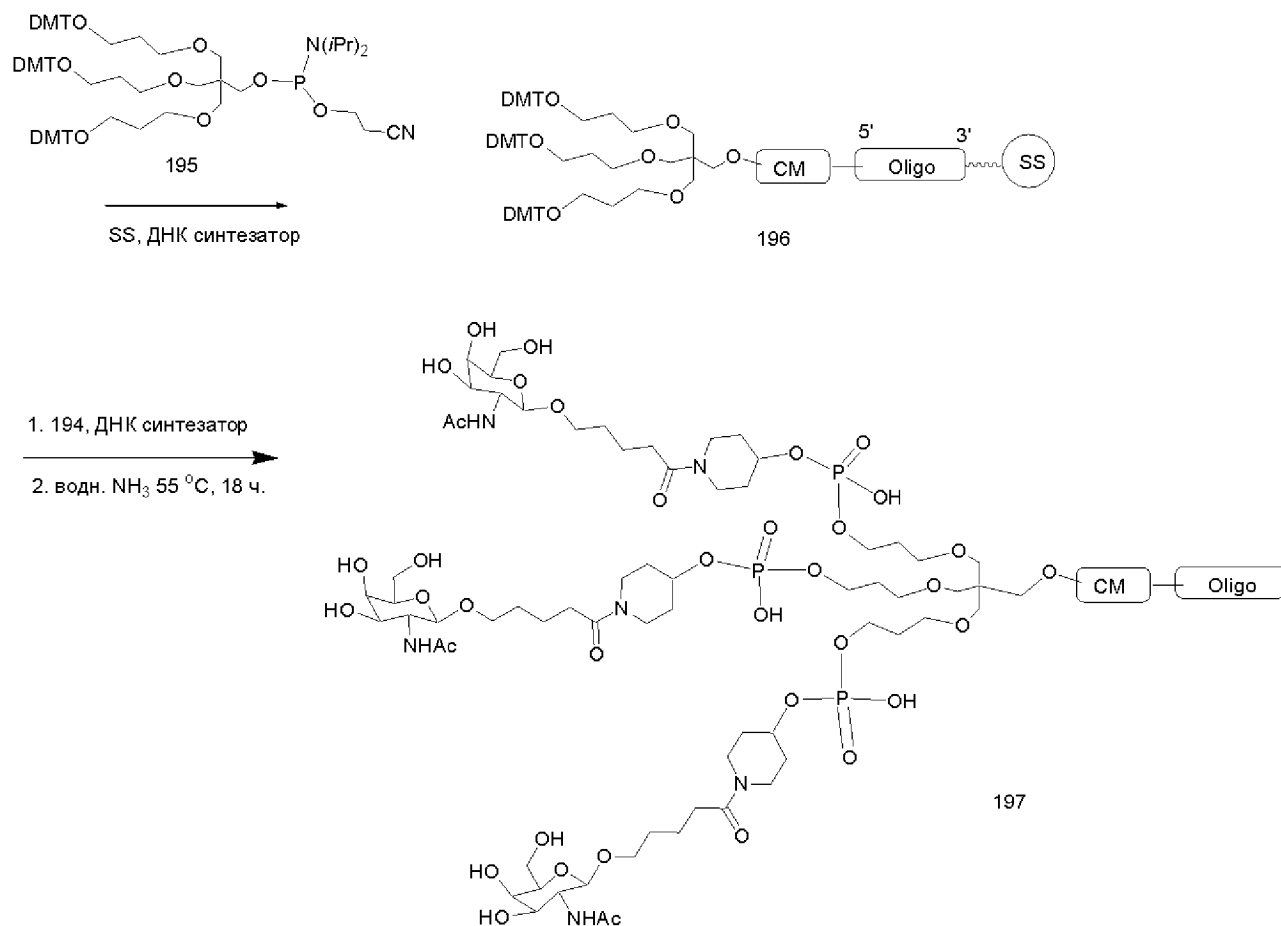


Соединения 181 и 185 имеются в продаже. Олигомерное Соединение 188, содержащее конъюгирующую группу GalNAc<sub>3</sub>-14, получили из соединения 187 по общим способам, представленным в Примере 46. Кластерная часть GalNAc<sub>3</sub> конъюгирующей группы GalNAc<sub>3</sub>-14 (GalNAc<sub>3</sub>-14<sub>a</sub>) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом для получения различных конъюгирующих групп. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент представляет собой -P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)-. Структура GalNAc<sub>3</sub>-14 (GalNAc<sub>3</sub>-14<sub>a</sub>-CM-) представлена ниже:

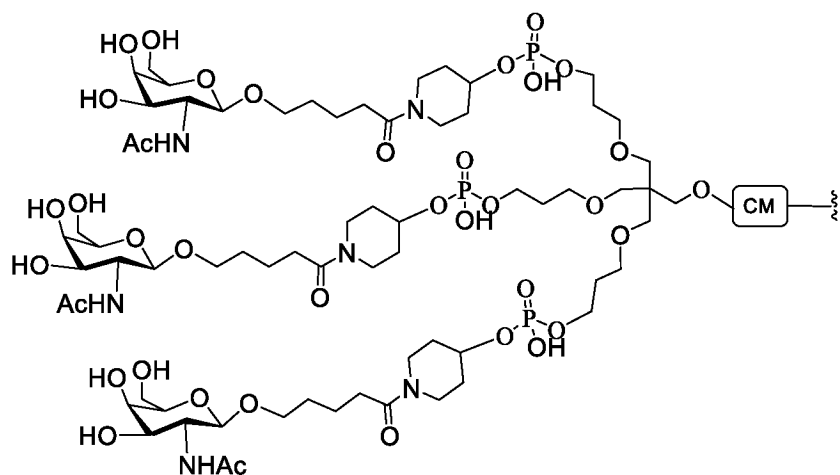


**Пример 64. Получение олигомерного соединения 197, содержащего GalNAc<sub>3</sub>-15**





Соединение 189 имеется в продаже. Соединение 195 получили по общему способу, представленному в Примере 31. Олигомерное соединение 197, содержащее конъюгирующую группу GalNAc<sub>3</sub>-15, получили из соединений 194 и 195, применив стандартные способы синтеза олигонуклеотидов. Кластерная часть GalNAc<sub>3</sub> конъюгирующей группы GalNAc<sub>3</sub>-15 (GalNAc<sub>3</sub>-15<sub>a</sub>) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных конъюгирующих групп. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент представляет собой -P(=O)(OH)-A<sub>d</sub>-P(=O)(OH)-. Структура GalNAc<sub>3</sub>-15 (GalNAc<sub>3</sub>-15<sub>a</sub>-CM-) представлена ниже:



**Пример 65.** Дозозависимое исследование олигонуклеотидов, содержащих 5'-конъюгирующую группу (сравнение GalNAc<sub>3</sub>-3, 12, 13, 14 и 15), нацеленных на SRB-1, *in vivo*

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже, испытали в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования SRB-1 у мышей. Неконъюгированный ISIS 353382 включили в качестве стандарта. Каждая из конъюгирующих групп GalNAc<sub>3</sub> была присоединена к 5'-концу соответствующего олигонуклеотида при помощи расщепляемого фрагмента фосфодиэфир-связанного 2'-дезоксиаденозинового нуклеозида.

**Таблица 41**

**Модифицированные ASO, нацеленные на SRB-1**

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Конъюгат	SEQ ID NO.
35338 2	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	нет	28
66116 1	<b>GalNAc<sub>3</sub>-3a-</b> $o'AdoG_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAc <sub>3</sub> -3	30
67114 4	<b>GalNAc<sub>3</sub>-12a-</b> $o'AdoG_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAc <sub>3</sub> -12	30
67006 1	<b>GalNAc<sub>3</sub>-13a-</b> $o'AdoG_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAc <sub>3</sub> -13	30
67126 1	<b>GalNAc<sub>3</sub>-14a-</b> $o'AdoG_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAc <sub>3</sub> -14	30

67126 2	<b>GalNAc<sub>3</sub>-15<sub>a</sub></b> o'AdoG <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>e</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -15	30
------------	--	-------------------------	----

Заглавные буквы указывают азотистое основание для каждого нуклеозида, а <sup>m</sup>C означает 5-метилцитозин. Нижние индексы: «e» означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид; «d» означает β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; «s» означает тиофосфатную межнуклеозидную связь(PS); «o'» означает фосфодиэфирную межнуклеозидную связь(PO); и «o'» означает -O-P(=O)(OH)-. Конъюгирующие группы выделены жирным шрифтом.

Структура GalNAc<sub>3</sub>-3<sub>a</sub> показана ранее в Примере 39. Структура GalNAc<sub>3</sub>-12<sub>a</sub> показана ранее в Примере 61. Структура GalNAc<sub>3</sub>-13<sub>a</sub> показана ранее в Примере 62. Структура GalNAc<sub>3</sub>-14<sub>a</sub> показана ранее в Примере 63. Структура GalNAc<sub>3</sub>-15<sub>a</sub> показана ранее в Примере 64.

#### *Лечение*

Шести-восьминедельным мышам C57bl6 (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) один или два раза ввели подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, соединения ISIS 353382, 661161, 671144, 670061, 671261, 671262 или солевого раствора. Мыши, которым вводили дозу два раза, вторую дозу вводили через три дня после первой дозы. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей умертвили через 72 часов после последнего введения для определения уровней мРНК SRB-1 в печени при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней мРНК SRB-1 для каждой экспериментальной группы, нормализованных к контрольному образцу, обработанному солевым раствором.

Как показано в Таблице 42, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК SRB-1 дозозависимым образом. Не наблюдали значительной разницы нокдауна мишени между животными, получавшими одну дозу, и животными, получавшими две дозы (см. ISIS 353382 в дозах 30 и 2 x 15 мг/кг; и ISIS 661161 в дозах 5 и 2 x 2,5 мг/кг). Антисмысловые олигонуклеотиды, содержащие фосфодиэфир-связанные конъюгаты GalNAc<sub>3</sub>-3, 12, 13, 14 и 15, демонстрируют существенное усиление эффективности, по сравнению с неконъюгированным антисмысловым олигонуклеотидом (ISIS 335382).

**Таблица 42**

**мРНК SRB-1 (% от солевого раствора)**

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% от солевого раствора)	ED <sub>50</sub> (мг/кг)	Конъюгат
Солевой раствор	н.д.	100,0	н.д.	н.д.
353382	3	85,0	22,4	нет
	10	69,2		
	30	34,2		
	2 x 15	36,0		
661161	0,5	87,4	2,2	GalNAc <sub>3</sub> -3
	1,5	59,0		
	5	25,6		
	2 x 2,5	27,5		
	15	17,4		
671144	0,5	101,2	3,4	GalNAc <sub>3</sub> -12
	1,5	76,1		
	5	32,0		
	15	17,6		
670061	0,5	94,8	2,1	GalNAc <sub>3</sub> -13
	1,5	57,8		
	5	20,7		
	15	13,3		
671261	0,5	110,7	4,1	GalNAc <sub>3</sub> -14
	1,5	81,9		
	5	39,8		
	15	14,1		
671262	0,5	109,4	9,8	GalNAc <sub>3</sub> -15
	1,5	99,5		
	5	69,2		
	15	36,1		

Уровни трансаминазы в печени, аланин-аминотрансферазы (ALT) и аспартат-аминотрансферазы (AST) в сыворотке измеряли относительно мышей, инъецированных солевым раствором, применяя стандартные протоколы. Оценили также общий билирубин и азот мочевины крови (АМК). Проверили изменение массы тела, которое существенно не отличалось от группы с солевым раствором (данные не показаны). Значения ALT, AST, общего билирубина и АМК представлены ниже в Таблице 43.

**Таблица 43**

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Общий билирубин (мг/дл)	АМК (мг/дл)	Конъюгат
Солевой раствор	н.д.	28	60	0,1	39	н.д.
353382	3	30	77	0,2	36	нет
	10	25	78	0,2	36	

	30	28	62	0,2	35	
	2 x 15	22	59	0,2	33	
661161	0,5	39	72	0,2	34	GalNAc <sub>3</sub> -3
	1,5	26	50	0,2	33	
	5	41	80	0,2	32	
	2 x 2,5	24	72	0,2	28	
	15	32	69	0,2	36	
671144	0,5	25	39	0,2	34	GalNAc <sub>3</sub> -12
	1,5	26	55	0,2	28	
	5	48	82	0,2	34	
	15	23	46	0,2	32	
670061	0,5	27	53	0,2	33	GalNAc <sub>3</sub> -13
	1,5	24	45	0,2	35	
	5	23	58	0,1	34	
	15	24	72	0,1	31	
671261	0,5	69	99	0,1	33	GalNAc <sub>3</sub> -14
	1,5	34	62	0,1	33	
	5	43	73	0,1	32	
	15	32	53	0,2	30	
671262	0,5	24	51	0,2	29	GalNAc <sub>3</sub> -15
	1,5	32	62	0,1	31	
	5	30	76	0,2	32	
	15	31	64	0,1	32	

**Пример 66. Влияние различных расщепляемых фрагментов на антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, нацеленных на SRB-1, содержащих кластер 5'-GalNAc<sub>3</sub>**

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже, испытали в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования SRB-1 у мышей. Каждая из конъюгирующих групп GalNAc<sub>3</sub> была присоединена к 5'-концу соответствующего олигонуклеотида при помощи фосфодиэфир-связанного нуклеозида (расщепляемый фрагмент (CM)).

**Таблица 44**

**Модифицированные ASO, нацеленные на SRB-1**

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM	SEQ ID NO.
661161	<b>GalNAc<sub>3</sub>-3a-о'</b> A <sub>do</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>e</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -3a	A <sub>d</sub>	30
670699	<b>GalNAc<sub>3</sub>-3a-о'</b> T <sub>do</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>e</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -3a	T <sub>d</sub>	33

67070 0	<b>GalNAc<sub>3</sub>-3<sub>a</sub>-</b> o' <b>A<sub>eo</sub>G<sub>es</sub><sup>m</sup>C<sub>eo</sub>T<sub>eo</sub>T<sub>eo</sub><sup>m</sup>C<sub>eo</sub>A<sub>ds</sub>G<sub>ds</sub>T<sub>ds</sub><sup>m</sup>C<sub>ds</sub>A<sub>ds</sub>T<sub>ds</sub></b> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>e</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -3a	A <sub>e</sub>	30
67070 1	<b>GalNAc<sub>3</sub>-3<sub>a</sub>-</b> o' <b>T<sub>eo</sub>G<sub>es</sub><sup>m</sup>C<sub>eo</sub>T<sub>eo</sub>T<sub>eo</sub><sup>m</sup>C<sub>eo</sub>A<sub>ds</sub>G<sub>ds</sub>T<sub>ds</sub><sup>m</sup>C<sub>ds</sub>A<sub>ds</sub>T<sub>ds</sub></b> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>e</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -3a	T <sub>e</sub>	33
67116 5	<b>GalNAc<sub>3</sub>-13<sub>a</sub>-</b> o' <b>A<sub>do</sub>G<sub>es</sub><sup>m</sup>C<sub>eo</sub>T<sub>eo</sub>T<sub>eo</sub><sup>m</sup>C<sub>eo</sub>A<sub>ds</sub>G<sub>ds</sub>T<sub>ds</sub><sup>m</sup>C<sub>ds</sub>A<sub>ds</sub>T<sub>ds</sub></b> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>e</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -13a	A <sub>d</sub>	30

Заглавные буквы указывают азотистое основание для каждого нуклеозида, а <sup>m</sup>C означает 5-метилцитозин. Нижние индексы: «e» означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид; «d» означает β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; «s» означает тиофосфатную межнуклеозидную связь(PS); «o» означает фосфодиэфирную межнуклеозидную связь(PO); и «o'» означает -O-P(=O)(OH)-. Конъюгирующие группы выделены жирным шрифтом.

Структура GalNAc<sub>3</sub>-3<sub>a</sub> показана ранее в Примере 39. Структура GalNAc<sub>3</sub>-13<sub>a</sub> показана ранее в Примере 62.

### *Лечение*

Шести-восьминедельным мышам C57bl6 (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) ввели однократную подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, соединения ISIS 661161, 670699, 670700, 670701, 671165 или солевого раствора. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей умертвили через 72 часов после последнего введения для определения уровней мРНК SRB-1 в печени при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней мРНК SRB-1 для каждой экспериментальной группы, нормализованных к контрольному образцу, обработанному солевым раствором.

Как показано в Таблице 45, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК SRB-1 дозозависимым образом. Все антисмысловые олигонуклеотиды, содержащие различные расщепляемые фрагменты, демонстрируют одинаковую эффективность.

**Таблица 45**

**мРНК SRB-1 (% от солевого раствора)**



ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% от солевого раствора)	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM
Солевой раствор	н.д.	100,0	н.д.	н.д.
661161	0,5	87,8	GalNAc <sub>3</sub> -3a	A <sub>d</sub>
	1,5	61,3		
	5	33,8		
	15	14,0		
670699	0,5	89,4	GalNAc <sub>3</sub> -3a	T <sub>d</sub>
	1,5	59,4		
	5	31,3		
	15	17,1		
670700	0,5	79,0	GalNAc <sub>3</sub> -3a	A <sub>e</sub>
	1,5	63,3		
	5	32,8		
	15	17,9		
670701	0,5	79,1	GalNAc <sub>3</sub> -3a	T <sub>e</sub>
	1,5	59,2		
	5	35,8		
	15	17,7		
671165	0,5	76,4	GalNAc <sub>3</sub> -13a	A <sub>d</sub>
	1,5	43,2		
	5	22,6		
	15	10,0		

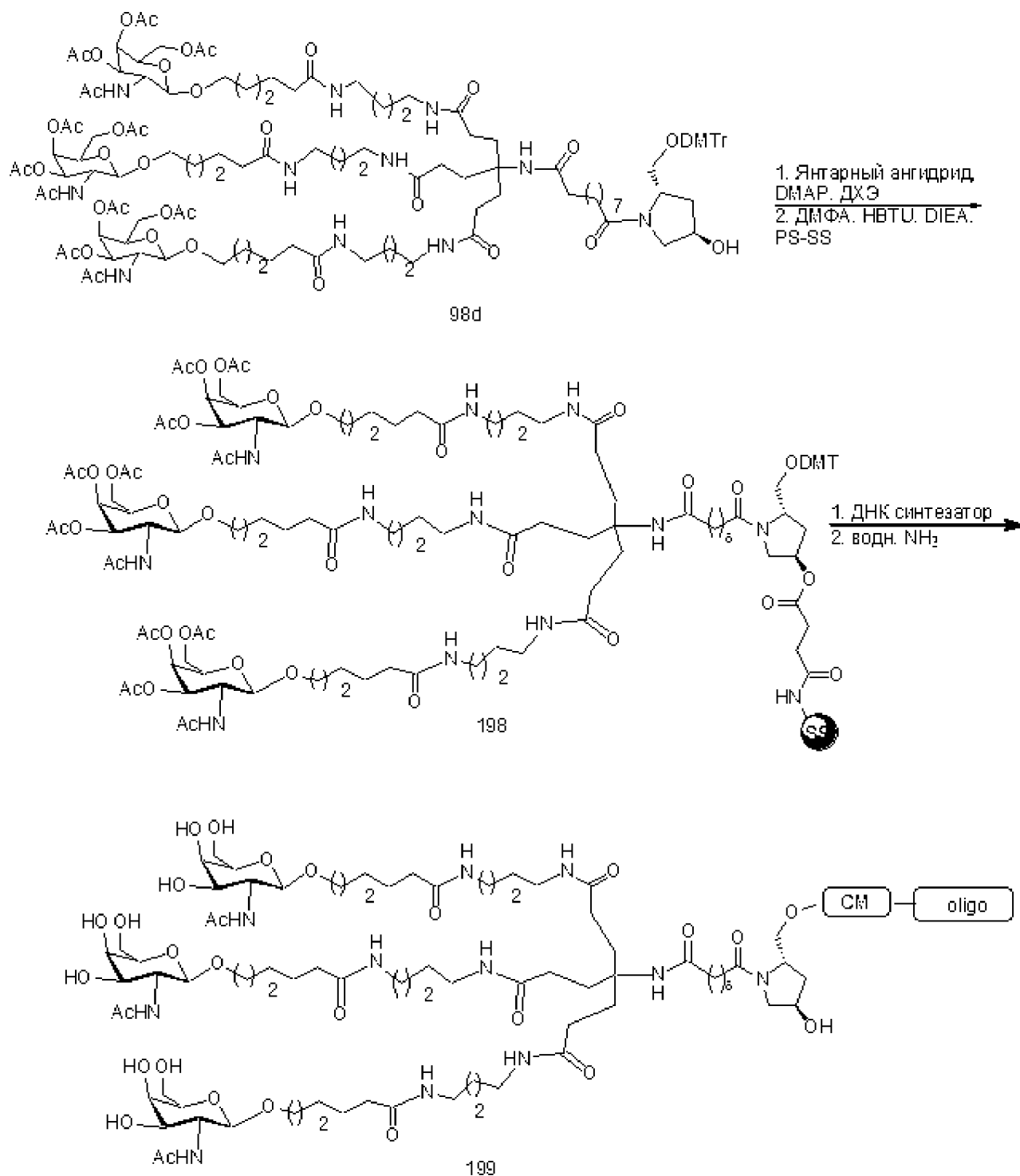
Уровни трансаминазы в печени, аланин-аминотрансферазы (ALT) и аспартат-аминотрансферазы (AST) в сыворотке измеряли относительно мышей, инъецированных солевым раствором, применяя стандартные протоколы. Оценили также общий билирубин и азот мочевины крови (АМК). Проверили изменение массы тела, которое существенно не отличалось от группы с солевым раствором (данные не показаны). Значения ALT, AST, общего билирубина и АМК представлены ниже в Таблице 46.

Таблица 46

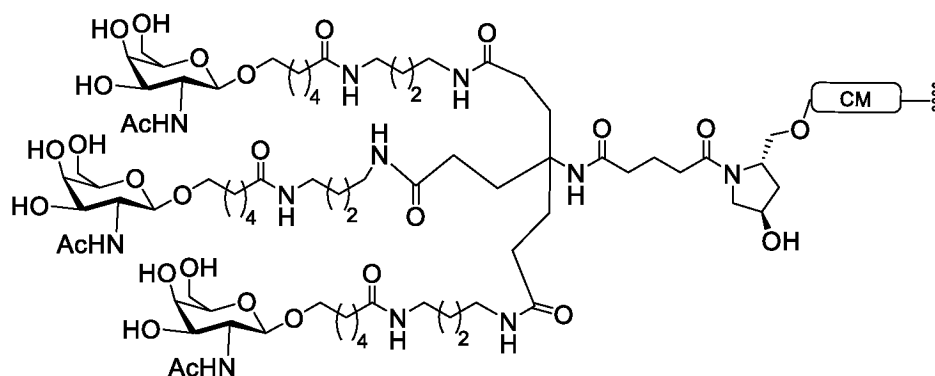
ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Общий билируб ин (мг/дл)	АМК (мг/дл)	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM
Солевой раствор	н.д.	24	64	0,2	31	н.д.	н.д.
661161	0,5	25	64	0,2	31	GalNAc <sub>3</sub> -3a	A <sub>d</sub>
	1,5	24	50	0,2	32		
	5	26	55	0,2	28		
	15	27	52	0,2	31		
670699	0,5	42	83	0,2	31	GalNAc <sub>3</sub> -3a	T <sub>d</sub>
	1,5	33	58	0,2	32		

	5	26	70	0,2	29		
	15	25	67	0,2	29		
670700	0,5	40	74	0,2	27	GalNAc <sub>3</sub> -3a	A <sub>e</sub>
	1,5	23	62	0,2	27		
	5	24	49	0,2	29		
	15	25	87	0,1	25		
670701	0,5	30	77	0,2	27	GalNAc <sub>3</sub> -3a	T <sub>e</sub>
	1,5	22	55	0,2	30		
	5	81	101	0,2	25		
	15	31	82	0,2	24		
671165	0,5	44	84	0,2	26	GalNAc <sub>3</sub> - 13a	A <sub>d</sub>
	1,5	47	71	0,1	24		
	5	33	91	0,2	26		
	15	33	56	0,2	29		

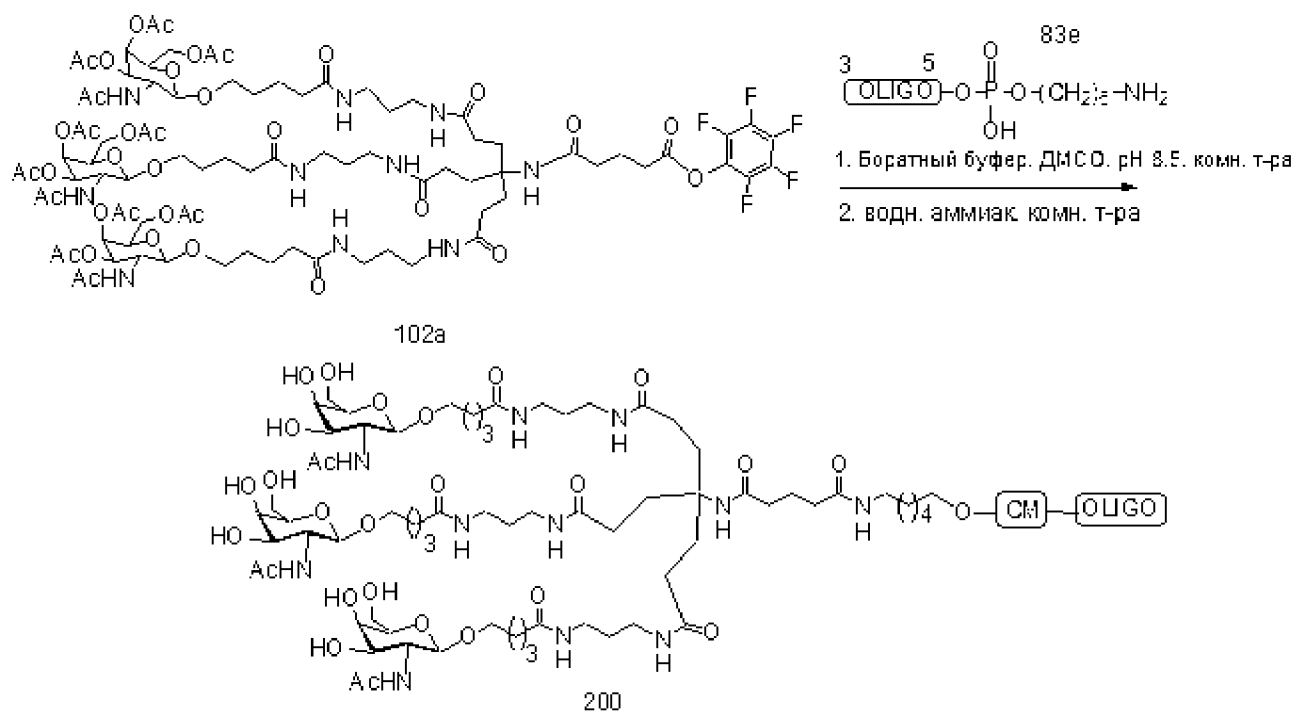
### Пример 67. Получение олигомерного соединения 199, содержащего GalNAc3-16



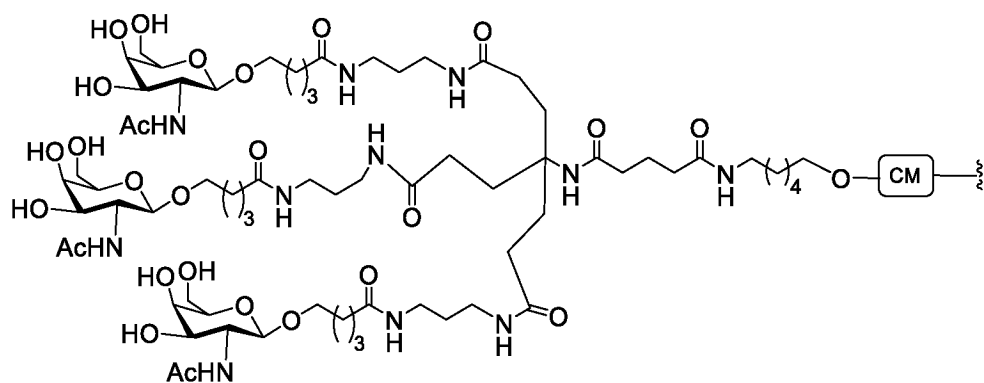
Олигомерное соединение 199, содержащее конъюгирующую группу GalNAc<sub>3</sub>-16, получили по общим способам, представленным в Примерах 7 и 9. Кластерная часть GalNAc<sub>3</sub> конъюгирующей группы GalNAc<sub>3</sub>-16 (GalNAc<sub>3</sub>-16<sub>a</sub>) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом для получения различных конъюгирующих групп. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент представляет собой -P(=O)(OH)-A<sub>d</sub>-P(=O)(OH)-. Структура GalNAc<sub>3</sub>-16 (GalNAc<sub>3</sub>-16<sub>a</sub>-CM-) представлена ниже:



**Пример 68. Получение олигомерного соединения 200, содержащего GalNAc<sub>3</sub>-17**

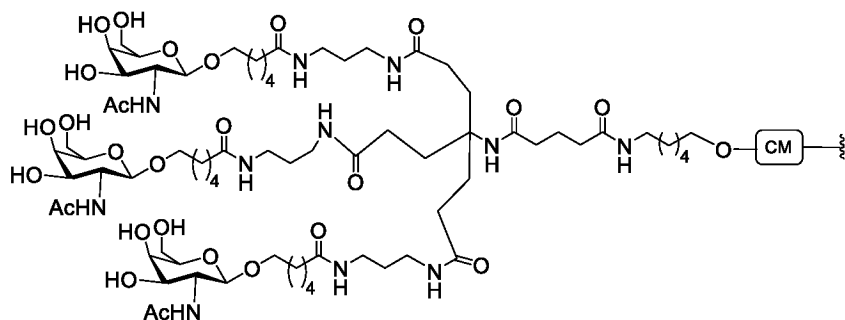


Олигомерное соединение 200, содержащее конъюгирующую группу GalNAc<sub>3</sub>-17, получили по общим способам, представленным в Примере 46. Кластерная часть GalNAc<sub>3</sub> конъюгирующей группы GalNAc<sub>3</sub>-17 (GalNAc<sub>3</sub>-17<sub>a</sub>) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом для получения различных конъюгирующих групп. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент представляет собой -P(=O)(OH)-A<sub>d</sub>-P(=O)(OH)-. Структура GalNAc<sub>3</sub>-17 (GalNAc<sub>3</sub>-17<sub>a</sub>-CM-) представлена ниже:



### Пример 69. Получение олигомерного соединения 201, содержащего GalNAc<sub>3</sub>-18

Олигомерное соединение 201, содержащее конъюгирующую группу GalNAc<sub>3</sub>-18, получили по общим способам, представленным в Примере 46. Кластерная часть GalNAc<sub>3</sub> конъюгирующей группы GalNAc<sub>3</sub>-18 (GalNAc<sub>3</sub>-18<sub>a</sub>) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом для получения различных конъюгирующих групп. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент представляет собой -P(=O)(OH)-A<sub>d</sub>-P(=O)(OH)-. Структура GalNAc<sub>3</sub>-18 (GalNAc<sub>3</sub>-18<sub>a</sub>-CM-) представлена ниже:

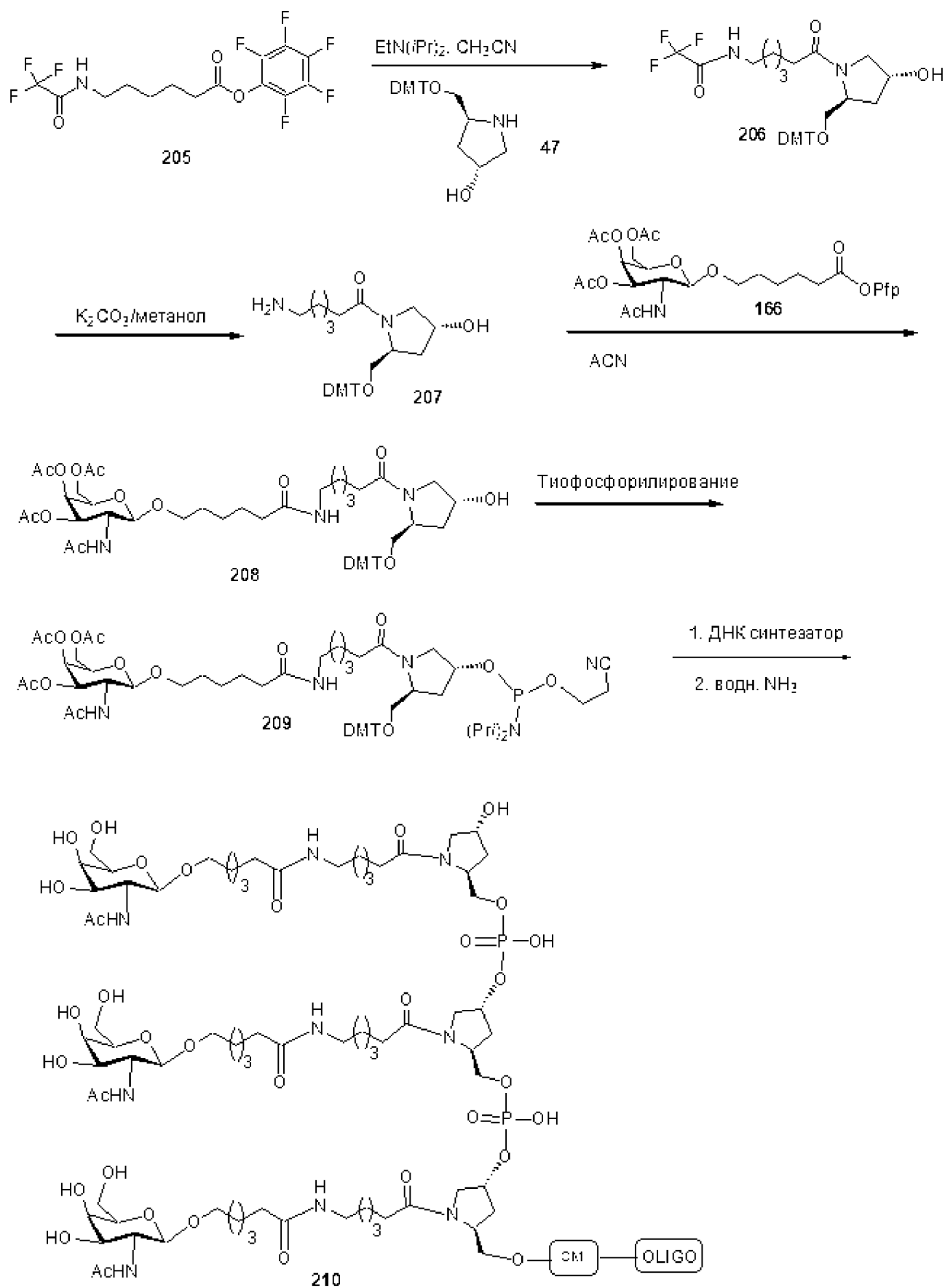


### Пример 70. Получение олигомерного соединения 204, содержащего GalNAc<sub>3</sub>-19



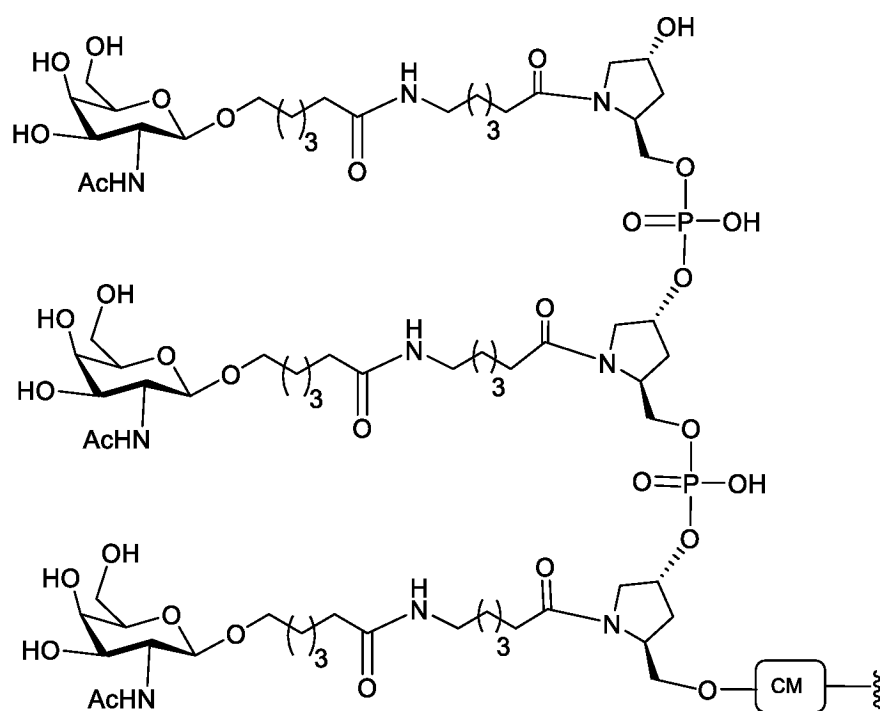


**Пример 71. Получение олигомерного соединения 210, содержащего GalNAc3-20**

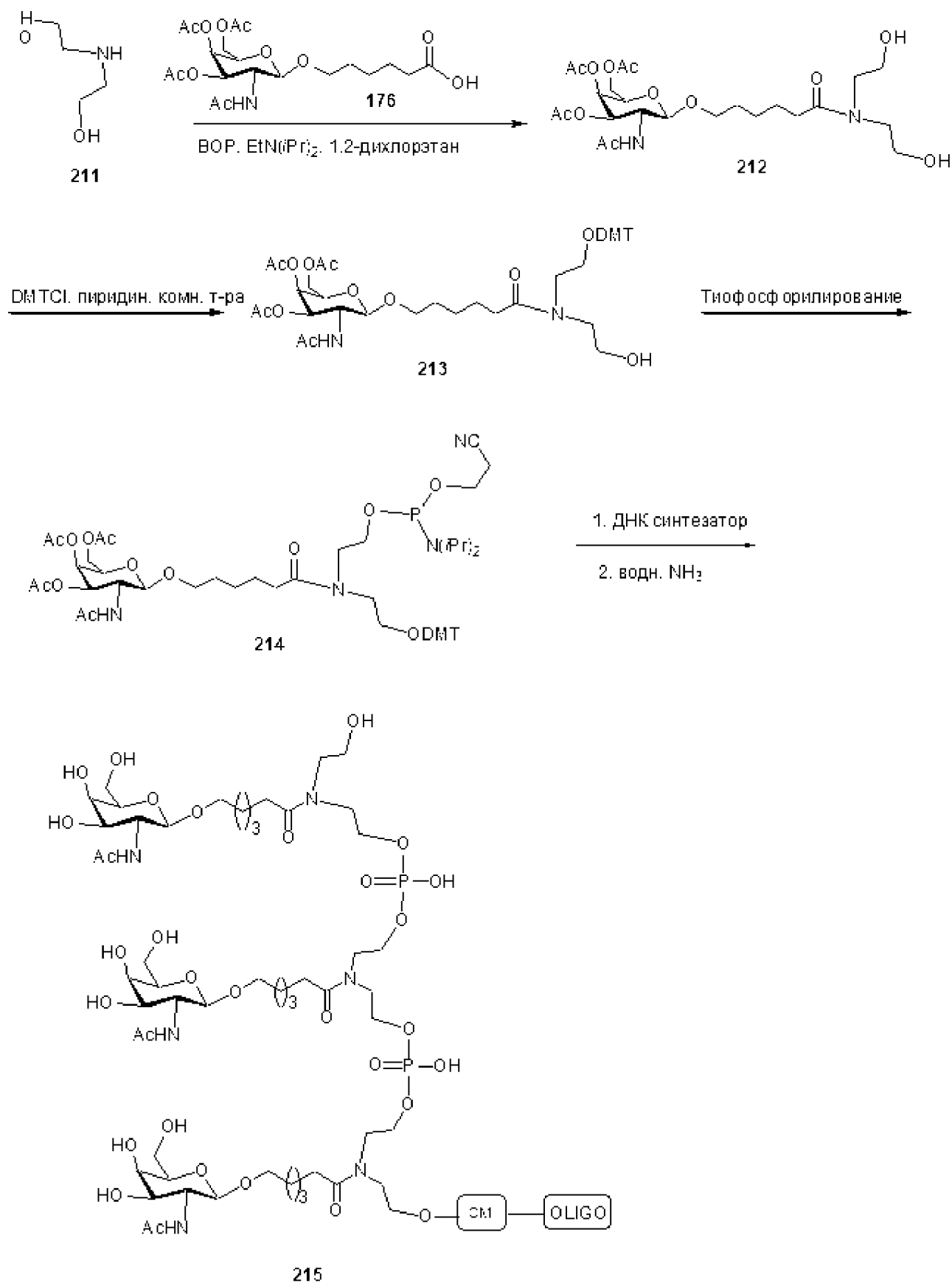




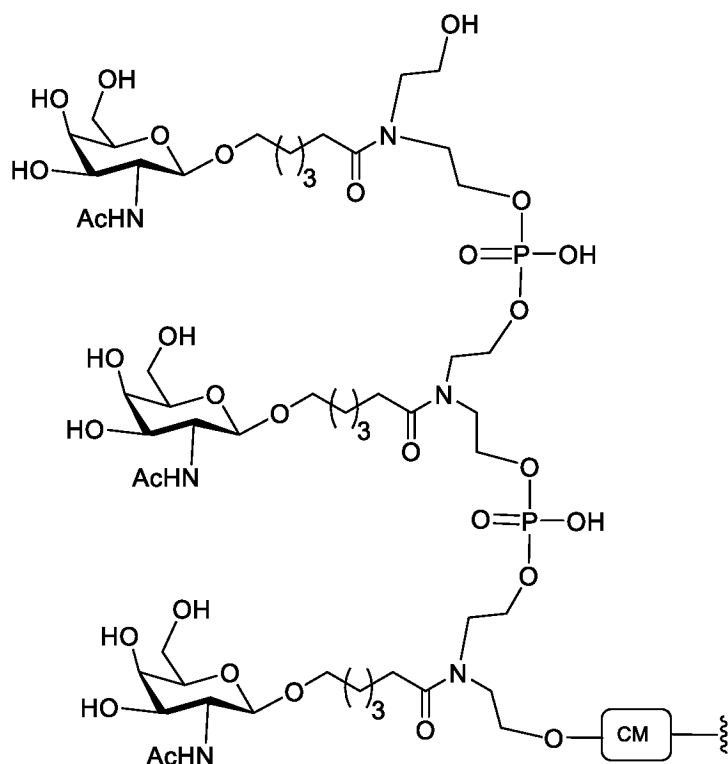
Соединение 205 получили добавлением PFP-ТФК и DIEA к 6-(2,2,2-трифторацетиламино)гексановой кислоте в ацетонитриле, которую получили добавлением трифторуксусного ангидрида к 6-аминогексановой кислоте. Реакционную смесь нагрели до 80 °С, затем охладили до комнатной температуры. Олигомерное Соединение 210, содержащее конъюгирующую группу GalNAc<sub>3</sub>-20, получили из соединения 208 по общим способам, представленным в Примере 52. Кластерная часть GalNAc<sub>3</sub> конъюгирующей группы GalNAc<sub>3</sub>-20 (GalNAc<sub>3</sub>-20<sub>a</sub>) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом для получения различных конъюгирующих групп. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент представляет собой -P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)-. Структура GalNAc<sub>3</sub>-20 (GalNAc<sub>3</sub>-20<sub>a</sub>-CM-) представлена ниже:



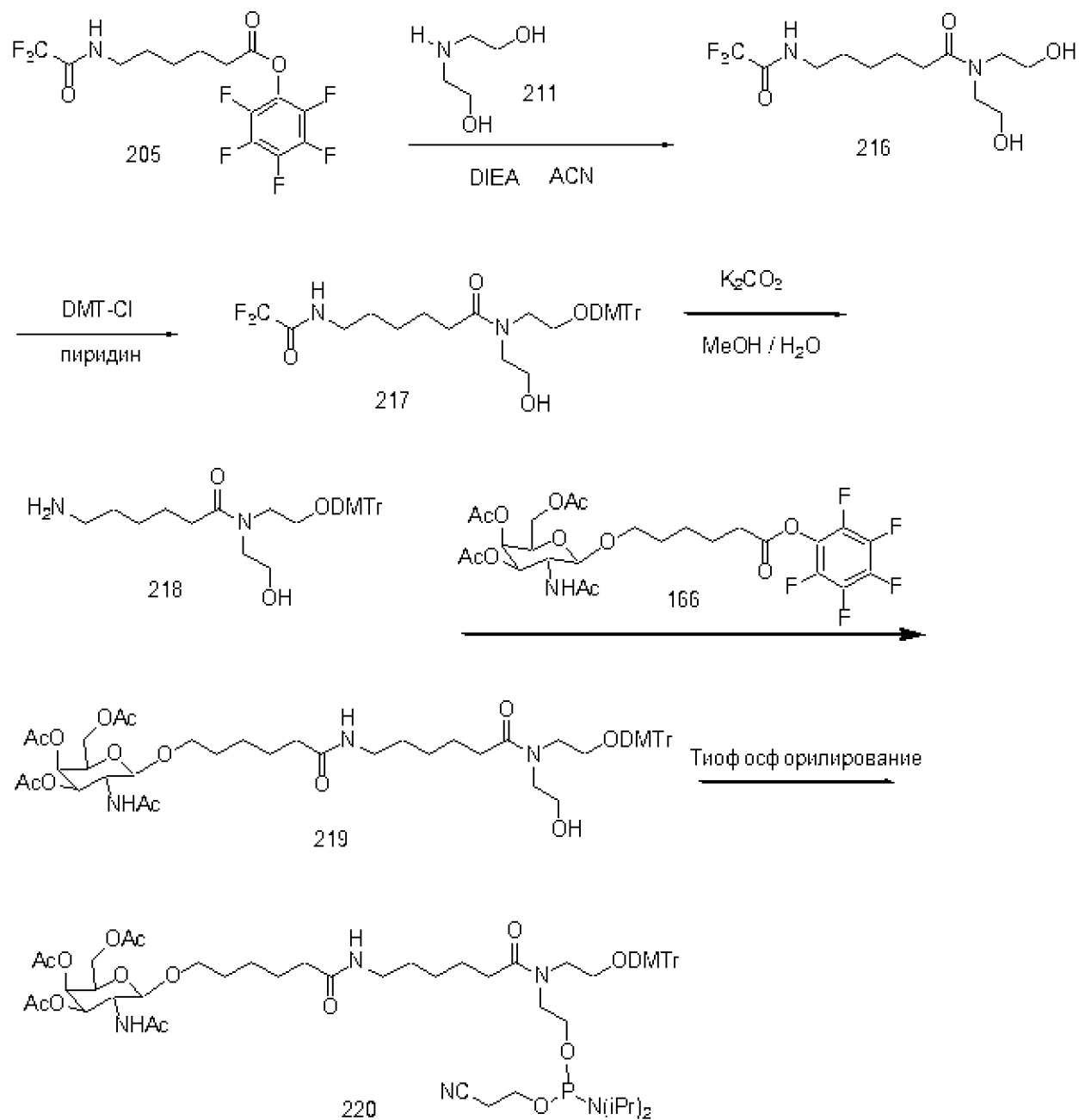
**Пример 72. Получение олигомерного соединения 215, содержащего GalNAc3-21**

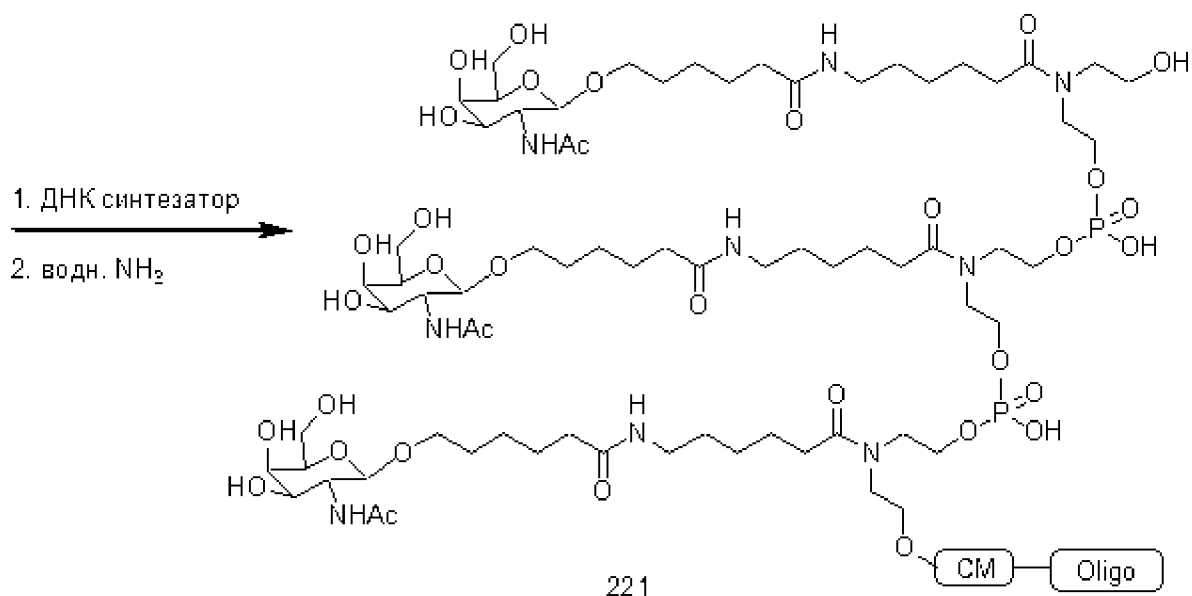


Соединение 211 имеется в продаже. Олигомерное Соединение 215, содержащее конъюгирующую группу GalNAc<sub>3</sub>-21, получили из соединения 213 по общим способам, представленным в Примере 52. Кластерная часть GalNAc<sub>3</sub> конъюгирующей группы GalNAc<sub>3</sub>-21 (GalNAc<sub>3</sub>-21<sub>a</sub>) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом для получения различных конъюгирующих групп. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент представляет собой -P(=O)(OH)-A<sub>d</sub>-P(=O)(OH)-. Структура GalNAc<sub>3</sub>-21 (GalNAc<sub>3</sub>-21<sub>a</sub>-CM-) представлена ниже:

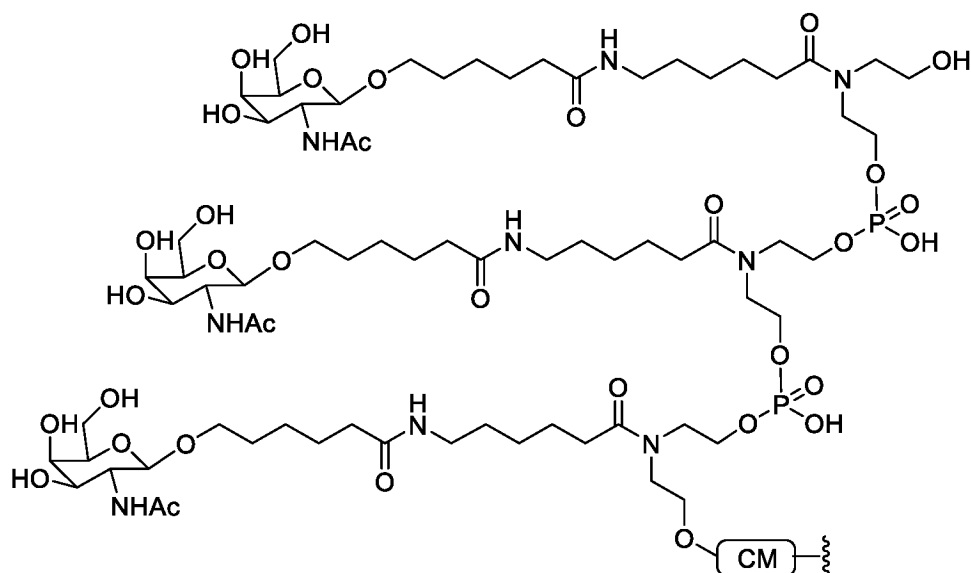


**Пример 73. Получение олигомерного соединения 221, содержащего GalNAc3-22**





Соединение 220 получили из соединения 219, применив тетразолид диизопропиламмония. Олигомерное соединение 221, содержащее конъюгирующую группу GalNAc<sub>3</sub>-21, получили из соединения 220 по общему способу, представленному в Примере 52. Кластерная часть GalNAc<sub>3</sub> конъюгирующей группы GalNAc<sub>3</sub>-22 (GalNAc<sub>3</sub>-22<sub>a</sub>) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом для получения различных конъюгирующих групп. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент представляет собой -P(=O)(OH)-A<sub>d</sub>-P(=O)(OH)-. Структура GalNAc<sub>3</sub>-22 (GalNAc<sub>3</sub>-22<sub>a</sub>-CM-) представлена ниже:



**Пример 74. Влияние различных расщепляемых фрагментов на антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, нацеленных на SRB-1, содержащих конъюгат 5'-GalNAc<sub>3</sub>**

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже, испытали в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования SRB-1 у мышей. Каждая из конъюгирующих групп GalNAc<sub>3</sub> была присоединена к 5'-концу соответствующего олигонуклеотида.

**Таблица 47**

**Модифицированные ASO, нацеленные на SRB-1**

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	С М	SEQ ID NO.
35338 2	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}$ $^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	н.д.	н.д.	28
66116 1	<b>GalNAc<sub>3</sub>-3a-o'</b> $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds}$ $G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAc <sub>3</sub> -3a	Ad	30
66690 4	<b>GalNAc<sub>3</sub>-3a-o'</b> $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds}$ $G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAc <sub>3</sub> -3a	PO	28
67544 1	<b>GalNAc<sub>3</sub>-17a-o'</b> $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds}$ $G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAc <sub>3</sub> -17a	Ad	30
67544 2	<b>GalNAc<sub>3</sub>-18a-o'</b> $A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds}$ $G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAc <sub>3</sub> -18a	Ad	30

Во всех таблицах заглавные буквы указывают азотистое основание для каждого нуклеотида, а <sup>m</sup>C означает 5-метилцитозин. Нижние индексы: «e» означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеотид; «d» означает β-D-2'-дезоксирибонуклеотид; «s» означает тиофосфатную межнуклеозидную связь(PS); «o» означает фосфодиэфирную межнуклеозидную связь(PO); и «o'» означает -O-P(=O)(OH)-. Конъюгирующие группы выделены жирным шрифтом.

Структура GalNAc<sub>3</sub>-3a показана ранее в Примере 39. Структура GalNAc<sub>3</sub>-17a показана ранее в Примере 68, а структура GalNAc<sub>3</sub>-18a показана ранее в Примере 69.

*Лечение*

Шести-восьминедельным мышам C57bl6 (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) ввели однократную подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, олигонуклеотида, перечисленного в Таблице 47, или солевого раствора. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей умертвили через 72 часов после

последнего введения для определения уровней мРНК SRB-1 в печени при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней мРНК SRB-1 для каждой экспериментальной группы, нормализованных к контрольному образцу, обработанному солевым раствором.

Как показано в Таблице 48, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК SRB-1 дозозависимым образом. Антисмысловые олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc, демонстрируют равные эффективности и являются значительно более эффективными, чем исходный олигонуклеотид, не имеющий конъюгата GalNAc.

**Таблица 48**  
**мРНК SRB-1 (% от солевого раствора)**

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% от солевого раствора)	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	СМ
Солевой раствор	н.д.	100,0	н.д.	н.д.
353382	3	79,38	н.д.	н.д.
	10	68,67		
	30	40,70		
661161	0,5	79,18	GalNAc <sub>3</sub> -3a	Ad
	1,5	75,96		
	5	30,53		
	15	12,52		
666904	0,5	91,30	GalNAc <sub>3</sub> -3a	PO
	1,5	57,88		
	5	21,22		
	15	16,49		
675441	0,5	76,71	GalNAc <sub>3</sub> -17a	Ad
	1,5	63,63		
	5	29,57		
	15	13,49		
675442	0,5	95,03	GalNAc <sub>3</sub> -18a	Ad
	1,5	60,06		
	5	31,04		
	15	19,40		

Уровни трансаминазы в печени, аланин-аминотрансферазы (ALT) и аспартат-аминотрансферазы (AST) в сыворотке измеряли относительно мышей, инъецированных солевым раствором, применяя стандартные протоколы. Оценили также общий билирубин

и азот мочевины крови (АМК). Проверили изменение массы тела, которое существенно не отличалось от группы с солевым раствором (данные не показаны). Значения ALT, AST, общего билирубина и АМК представлены ниже в Таблице 49.

Таблица 49

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Общий билирубин (мг/дл)	АМК (мг/дл)	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM
Солевой раствор	н.д.	26	59	0,16	42	н.д.	н.д.
353382	3	23	58	0,18	39	н.д.	н.д.
	10	28	58	0,16	43		
	30	20	48	0,12	34		
661161	0,5	30	47	0,13	35	GalNAc <sub>3</sub> -3a	Ad
	1,5	23	53	0,14	37		
	5	26	48	0,15	39		
	15	32	57	0,15	42		
666904	0,5	24	73	0,13	36	GalNAc <sub>3</sub> -3a	PO
	1,5	21	48	0,12	32		
	5	19	49	0,14	33		
	15	20	52	0,15	26		
675441	0,5	42	148	0,21	36	GalNAc <sub>3</sub> -17a	Ad
	1,5	60	95	0,16	34		
	5	27	75	0,14	37		
	15	24	61	0,14	36		
675442	0,5	26	65	0,15	37	GalNAc <sub>3</sub> -18a	Ad
	1,5	25	64	0,15	43		
	5	27	69	0,15	37		
	15	30	84	0,14	37		

#### Пример 75. Фармакокинетический анализ олигонуклеотидов, содержащих 5'-конъюгирующую группу

ФК ASO, представленных выше в Таблицах 41, 44 и 47, оценили с применением образцов печени, которые получили после выполнения способов лечения, описанных в Примерах 65, 66 и 74. Образцы печени измельчили и экстрагировали по стандартным протоколам, и анализировали при помощи ИП-ВЭЖХ-МС вместе с внутренним стандартом. Суммарный уровень (мкг/г) всех метаболитов в ткани измерили интегрированием соответствующих УФ пиков, а уровни в ткани ASO полной длины, не содержащих конъюгата («исходное», в данном случае Isis № 353382), измерили с применением подходящих ион-экстракционных хроматограмм (EIC).

Таблица 50

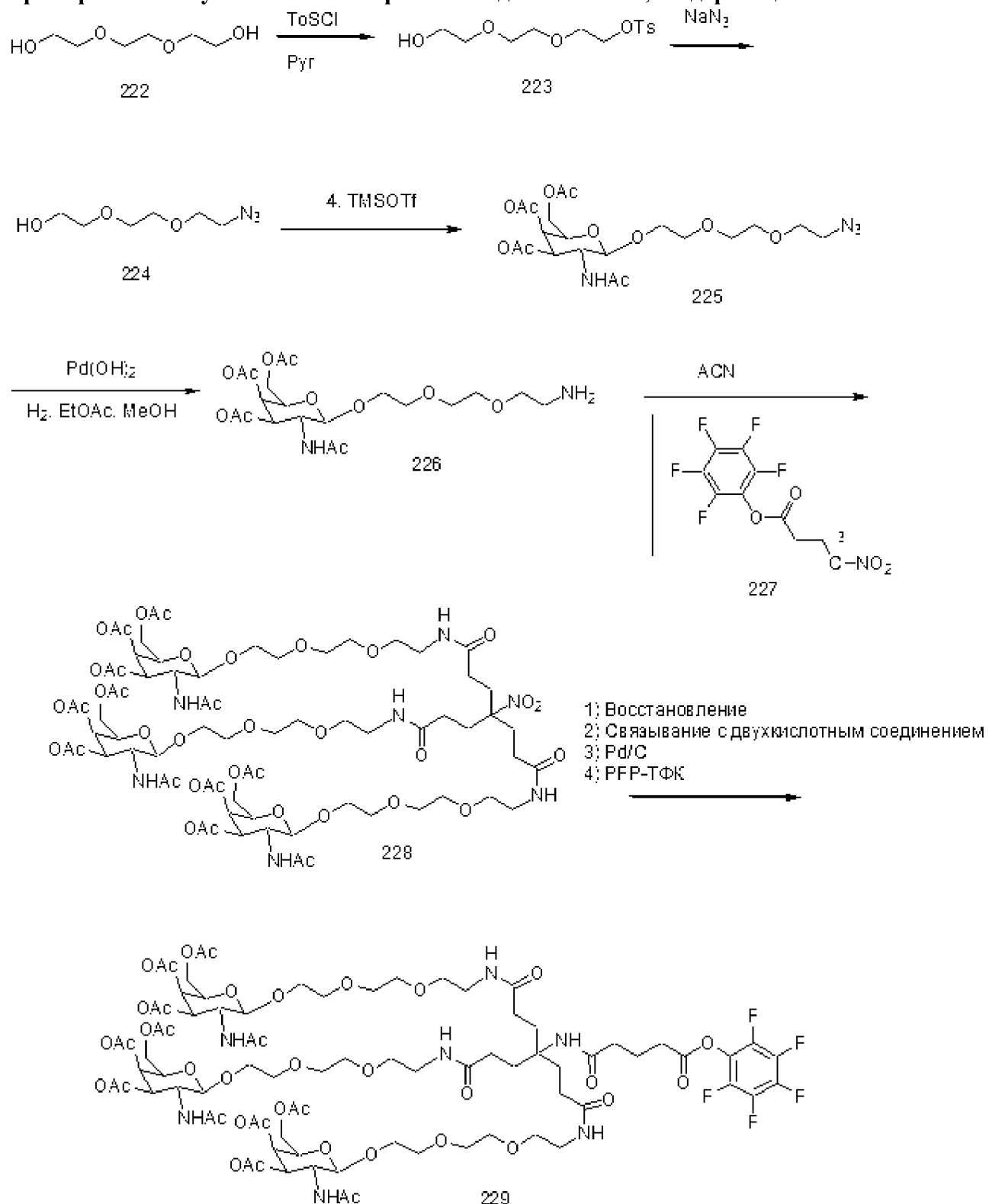


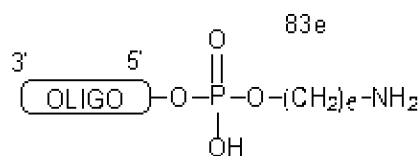
## ФК анализ в печени

ISIS №	Доза (мг/кг)	Общий уровень в печени по УФ (мкг/г)	Уровень исходного ASO в печени по EIC (мкг/г)	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM
353382	3	8,9	8,6	н.д.	н.д.
	10	22,4	21,0		
	30	54,2	44,2		
661161	5	32,4	20,7	GalNAc <sub>3</sub> -3a	Ad
	15	63,2	44,1		
671144	5	20,5	19,2	GalNAc <sub>3</sub> -12a	Ad
	15	48,6	41,5		
670061	5	31,6	28,0	GalNAc <sub>3</sub> -13a	Ad
	15	67,6	55,5		
671261	5	19,8	16,8	GalNAc <sub>3</sub> -14a	Ad
	15	64,7	49,1		
671262	5	18,5	7,4	GalNAc <sub>3</sub> -15a	Ad
	15	52,3	24,2		
670699	5	16,4	10,4	GalNAc <sub>3</sub> -3a	Td
	15	31,5	22,5		
670700	5	19,3	10,9	GalNAc <sub>3</sub> -3a	Ae
	15	38,1	20,0		
670701	5	21,8	8,8	GalNAc <sub>3</sub> -3a	Te
	15	35,2	16,1		
671165	5	27,1	26,5	GalNAc <sub>3</sub> -13a	Ad
	15	48,3	44,3		
666904	5	30,8	24,0	GalNAc <sub>3</sub> -3a	PO
	15	52,6	37,6		
675441	5	25,4	19,0	GalNAc <sub>3</sub> -17a	Ad
	15	54,2	42,1		
675442	5	22,2	20,7	GalNAc <sub>3</sub> -18a	Ad
	15	39,6	29,0		

Результаты, представленные выше в Таблице 50, демонстрируют, что наблюдали более высокие уровни в печени олигонуклеотидов, содержащих конъюгирующую группу GalNAc<sub>3</sub>, чем исходного олигонуклеотида, не содержащего конъюгирующую группу GalNAc<sub>3</sub> (ISIS 353382) через 72 часа после введения олигонуклеотида, особенно с учетом введения различных доз для олигонуклеотидов с группой конъюгата GalNAc<sub>3</sub> и без нее. Кроме того, через 72 часа 40-98% каждого олигонуклеотида, содержащего конъюгирующую группу GalNAc<sub>3</sub>, было метаболизировано до исходного соединения, что указывает на то, что конъюгирующие группы GalNAc<sub>3</sub> расщепляются в указанных олигонуклеотидах.

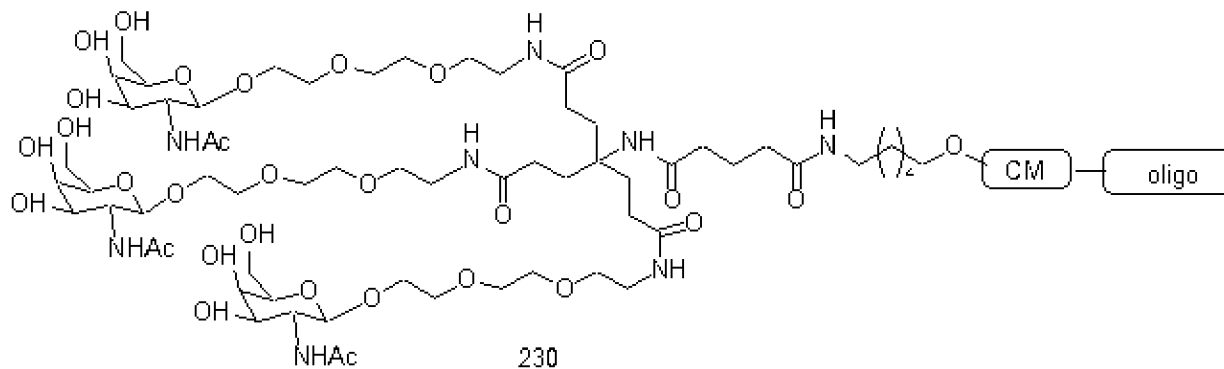
**Пример 76. Получение олигомерного соединения 230, содержащего GalNAc<sub>3</sub>-23**





1. Боратный буфер. ДМСО. pH 8.5. комн. т-ра

2. водн. аммиак. комн. т-ра



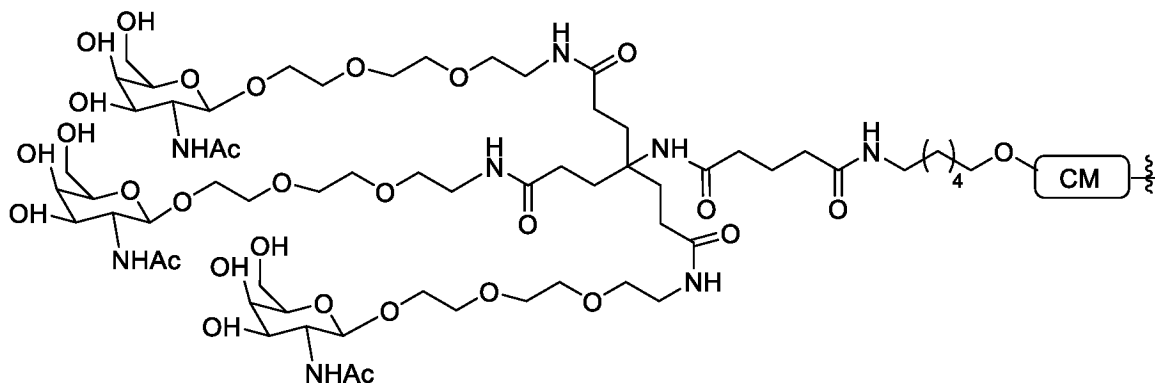
Соединение 222 имеется в продаже. 44,48 мл (0,33 моль) соединения 222 обрабатывали тозилхлоридом (25,39 г, 0,13 моль) в пиридине (500 мл) в течение 16 часов. Затем реакционную смесь выпарили до маслянистого вещества, растворили в EtOAc и промыли водой, насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$ , насыщенным солевым раствором и высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Этилацетат концентрировали досуха и очистили колоночной хроматографией, элюировали EtOAc в гексанах (1:1), затем 10% метанола в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  с получением соединения 223 в виде бесцветного маслянистого вещества. Данные ЖХМС и ЯМР согласовались с указанной структурой. 10 г (32,86 ммоль) 1-тозилтриэтиленгликоля (соединение 223) обрабатывали азидом натрия (10,68 г, 164,28 ммоль) в ДМСО (100 мл) при комнатной температуре в течение 17 часов. Затем реакционную смесь вылили в воду и экстрагировали EtOAc. Органический слой три раза промыли водой и высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Органический слой концентрировали досуха с получением 5,3 г соединения 224 (92%). Данные ЖХМС и ЯМР согласовались с указанной структурой. 1-Азидотриэтиленгликоль (соединение 224, 5,53 г, 23,69 ммоль) и соединение 4 (6 г, 18,22 ммоль) обработали 4А молекулярными ситами (5 г) и TMSOTf (1,65 мл, 9,11 ммоль) в дихлорметане (100 мл) под инертной атмосферой. Через 14 часов реакционную смесь отфильтровали для удаления сит, а органический слой промыли насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$ , водой, насыщенным солевым раствором и высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Органический слой концентрировали досуха и очистили колоночной хроматографией, элюировали градиентом от 2 до 4% метанола в дихлорметане с получением соединения 225. Данные ЖХМС и ЯМР согласовались со структурой. Соединение 225 (11,9 г, 23,59 ммоль)

гидрировали в EtOAc/метаноле (4:1, 250 мл) на катализаторе Перлмана. Через 8 часов катализатор удалили фильтрованием, а растворители удалили досуха с получением соединения 226. Данные ЖХМС и ЯМР согласовались со структурой.

Для получения соединения 227 раствор нитрометантриспропионовой кислоты (4,17 г, 15,04 ммоль) и основание Хюнига (10,3 мл, 60,17 ммоль) в ДМФА (100 мл) по каплям обработали пентафтортрифторацетатом (9,05 мл, 52,65 ммоль). Через 30 минут реакцию смесь вылили в ледяную воду и экстрагировали EtOAc. Органический слой промыли водой, насыщенным солевым раствором и высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Органический слой концентрировали досуха, а затем перекристаллизовали из гептана с получением соединения 227 в виде белого твердого вещества. Данные ЖХМС и ЯМР согласовались с указанной структурой. Соединение 227 (1,5 г, 1,93 ммоль) и соединение 226 (3,7 г, 7,74 ммоль) перемешивали при комнатной температуре в ацетонитриле (15 мл) в течение 2 часов. Затем реакцию смесь выпарили досуха и очистили колоночной хроматографией, элюируя градиентом от 2 до 10% метанола в дихлорметане, с получением соединения 228. Данные ЖХМС и ЯМР согласовались со структурой. Соединение 228 (1,7 г, 1,02 ммоль) обработали никелем Ренея (около 2 г, влажный) в этаноле (100 мл) в атмосфере водорода. Через 12 часов катализатор удалили фильтрованием, а органический слой выпарили до твердого вещества, которое применили непосредственно на следующей стадии. Данные ЖХМС и ЯМР согласовались с указанной структурой. Это твердое вещество (0,87 г, 0,53 ммоль) обработали бензилглутаровой кислотой (0,18 г, 0,8 ммоль), НВТУ (0,3 г, 0,8 ммоль) и DIEA (273,7 мкл, 1,6 ммоль) в ДМФА (5 мл). Через 16 часов ДМФА удалили под пониженным давлением при 65 °С до маслянистого вещества, и это маслянистое вещество растворили в дихлорметане. Органический слой промыли насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$ , насыщенным солевым раствором и высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . После выпаривания органического слоя соединение очистили колоночной хроматографией и элюировали градиентом от 2 до 20% метанола в дихлорметане с получением связанного продукта. Данные ЖХМС и ЯМР согласовались с указанной структурой. С бензилового эфира сняли защиту на катализаторе Перлмана в атмосфере водорода в течение 1 часа. Затем катализатор удалили фильтрованием, а растворители удалили досуха с получением кислоты. Данные ЖХМС и ЯМР согласовались с указанной структурой. Эту кислоту (486 мг, 0,27 ммоль) растворили в сухом ДМФА (3 мл). Добавили пиридин (53,61 мкл, 0,66 ммоль) и продули реакцию смесь аргоном. К реакционной смеси медленно добавили пентафтортрифторацетат (46,39 мкл, 0,4 ммоль). Цвет реакционной смеси изменился с бледно-желтого на винный, и появился легкий дымок, который улетучился с потоком аргона. Реакционную смесь оставили перемешиваться при комнатной температуре на один

час (завершение реакции подтвердили по ЖХМС). Растворитель удалили под пониженным давлением (ротационный испаритель) при 70 °С. Остаток разбавили ДХМ и промыли 1 н. NaHSO<sub>4</sub>, насыщенным соевым раствором, насыщенным раствором бикарбоната натрия и снова насыщенным соевым раствором. Органический слой высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, отфильтровали и концентрировали досуха с получением 225 мг соединения 229 в виде хрупкой желтой пены. Данные ЖХМС и ЯМР согласовались с указанной структурой.

Олигомерное Соединение 230, содержащее конъюгирующую группу GalNAc<sub>3</sub>-23, получили из соединения 229 по общим способам, представленным в Примере 46. Кластерная часть GalNAc<sub>3</sub> конъюгирующей группы GalNAc<sub>3</sub>-23 (GalNAc<sub>3</sub>-23<sub>a</sub>) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом для получения различных конъюгирующих групп. Структура GalNAc<sub>3</sub>-23 (GalNAc<sub>3</sub>-23<sub>a</sub>-CM) представлена ниже:



**Пример 77. Антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, нацеленных на SRB-1, содержащих конъюгат GalNAc<sub>3</sub>**

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже, испытали в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования SRB-1 у мышей.

**Таблица 51**

**Модифицированные ASO, нацеленные на SRB-1**

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM	SEQ ID NO.
66116 1	<b>GalNAc<sub>3</sub>-3<sub>a</sub>-</b> ${}^{\circ}\text{A}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{es}}^{\text{m}}\text{C}_{\text{es}}^{\text{m}}\text{T}_{\text{es}}^{\text{m}}\text{T}_{\text{es}}^{\text{m}}\text{C}_{\text{es}}^{\text{m}}\text{A}_{\text{ds}}^{\text{m}}\text{G}_{\text{ds}}^{\text{m}}\text{T}_{\text{ds}}^{\text{m}}\text{C}_{\text{ds}}^{\text{m}}\text{A}_{\text{ds}}^{\text{m}}\text{T}_{\text{ds}}^{\text{m}}$ $\text{G}_{\text{ds}}^{\text{m}}\text{A}_{\text{ds}}^{\text{m}}\text{C}_{\text{ds}}^{\text{m}}\text{T}_{\text{ds}}^{\text{m}}\text{T}_{\text{es}}^{\text{m}}\text{C}_{\text{es}}^{\text{m}}\text{C}_{\text{es}}^{\text{m}}\text{T}_{\text{es}}^{\text{m}}\text{T}_{\text{e}}$	GalNAc <sub>3</sub> -3 <sub>a</sub>	Ad	30
66690 4	<b>GalNAc<sub>3</sub>-3<sub>a</sub>-</b> $\text{G}_{\text{es}}^{\text{m}}\text{C}_{\text{es}}^{\text{m}}\text{T}_{\text{es}}^{\text{m}}\text{T}_{\text{es}}^{\text{m}}\text{C}_{\text{es}}^{\text{m}}\text{A}_{\text{ds}}^{\text{m}}\text{G}_{\text{ds}}^{\text{m}}\text{T}_{\text{ds}}^{\text{m}}\text{C}_{\text{ds}}^{\text{m}}\text{A}_{\text{ds}}^{\text{m}}\text{T}_{\text{ds}}^{\text{m}}$ $\text{G}_{\text{ds}}^{\text{m}}\text{A}_{\text{ds}}^{\text{m}}\text{C}_{\text{ds}}^{\text{m}}\text{T}_{\text{ds}}^{\text{m}}\text{T}_{\text{es}}^{\text{m}}\text{C}_{\text{es}}^{\text{m}}\text{C}_{\text{es}}^{\text{m}}\text{T}_{\text{es}}^{\text{m}}\text{T}_{\text{e}}$	GalNAc <sub>3</sub> -3 <sub>a</sub>	PO	28

67350 2	<b>GalNAc3-10a-</b> $\circ\text{Ado}G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds}$ $G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{eo}^m C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAc3-10a	Ad	30
67784 4	<b>GalNAc3-9a-</b> $\circ\text{Ado}G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds}$ $G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAc3-9a	Ad	30
67784 3	<b>GalNAc3-23a-</b> $\circ\text{Ado}G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds}$ $G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAc3-23a	Ad	30
65586 1	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_e$ $s C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{eo} \text{Ado}'\text{-GalNAc3-1a}$	GalNAc3-1a	Ad	29
67784 1	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_e$ $s C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{eo} \text{Ado}'\text{-GalNAc3-19a}$	GalNAc3-19a	Ad	29
67784 2	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds}$ $G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{eo} \text{Ado}'\text{-GalNAc3-20a}$	GalNAc3-20a	Ad	29

Структура GalNAc3-1a показана ранее в Примере 9, GalNAc3-3a показана в Примере 39, GalNAc3-9a показана в Примере 52, GalNAc3-10a показана в Примере 46, GalNAc3-19a показана в Примере 70, GalNAc3-20a показана в Примере 71, и GalNAc3-23a показана в Примере 76.

### Лечение

Шести-восьминедельным мышам C57bl6 (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) ввели однократную подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, олигонуклеотида, перечисленного в Таблице 51, или солевого раствора. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей умертвили через 72 часов после последнего введения для определения уровней мРНК SRB-1 в печени при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней мРНК SRB-1 для каждой экспериментальной группы, нормализованных к контрольному образцу, обработанному солевым раствором.

Как показано в Таблице 52, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК SRB-1 дозозависимым образом.

**Таблица 52**

**мРНК SRB-1 (% от солевого раствора)**

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% от солевого раствора)	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM
Солевой раствор	н.д.	100,0	н.д.	н.д.
661161	0,5	89,18	GalNAc <sub>3</sub> -3a	Ad
	1,5	77,02		
	5	29,10		
	15	12,64		
666904	0,5	93,11	GalNAc <sub>3</sub> -3a	PO
	1,5	55,85		
	5	21,29		
	15	13,43		
673502	0,5	77,75	GalNAc <sub>3</sub> -10a	Ad
	1,5	41,05		
	5	19,27		
	15	14,41		
677844	0,5	87,65	GalNAc <sub>3</sub> -9a	Ad
	1,5	93,04		
	5	40,77		
	15	16,95		
677843	0,5	102,28	GalNAc <sub>3</sub> -23a	Ad
	1,5	70,51		
	5	30,68		
	15	13,26		
655861	0,5	79,72	GalNAc <sub>3</sub> -1a	Ad
	1,5	55,48		
	5	26,99		
	15	17,58		
677841	0,5	67,43	GalNAc <sub>3</sub> -19a	Ad
	1,5	45,13		
	5	27,02		
	15	12,41		
677842	0,5	64,13	GalNAc <sub>3</sub> -20a	Ad
	1,5	53,56		
	5	20,47		
	15	10,23		

Измерили также уровни трансаминазы в печени, аланин-аминотрансферазы (ALT) и аспартат-аминотрансферазы (AST) в сыворотке, применяя стандартные протоколы. Оценили также общий билирубин и азот мочевины крови (АМК). Проверили изменение массы тела, которое существенно не отличалось от группы с солевым раствором (данные не показаны). Значения ALT, AST, общего билирубина и АМК представлены ниже в Таблице 53.

**Таблица 53**

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Общий билирубин (мг/дл)	АМК (мг/дл)	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM
Солевой раствор	н.д.	21	45	0,13	34	н.д.	н.д.
661161	0,5	28	51	0,14	39	GalNAc <sub>3</sub> -3a	Ad
	1,5	23	42	0,13	39		
	5	22	59	0,13	37		
	15	21	56	0,15	35		
666904	0,5	24	56	0,14	37	GalNAc <sub>3</sub> -3a	PO
	1,5	26	68	0,15	35		
	5	23	77	0,14	34		
	15	24	60	0,13	35		
673502	0,5	24	59	0,16	34	GalNAc <sub>3</sub> -10a	Ad
	1,5	20	46	0,17	32		
	5	24	45	0,12	31		
	15	24	47	0,13	34		
677844	0,5	25	61	0,14	37	GalNAc <sub>3</sub> -9a	Ad
	1,5	23	64	0,17	33		
	5	25	58	0,13	35		
	15	22	65	0,14	34		
677843	0,5	53	53	0,13	35	GalNAc <sub>3</sub> -23a	Ad
	1,5	25	54	0,13	34		
	5	21	60	0,15	34		
	15	22	43	0,12	38		
655861	0,5	21	48	0,15	33	GalNAc <sub>3</sub> -1a	Ad
	1,5	28	54	0,12	35		
	5	22	60	0,13	36		
	15	21	55	0,17	30		
677841	0,5	32	54	0,13	34	GalNAc <sub>3</sub> -19a	Ad
	1,5	24	56	0,14	34		
	5	23	92	0,18	31		
	15	24	58	0,15	31		
677842	0,5	23	61	0,15	35	GalNAc <sub>3</sub> -20a	Ad
	1,5	24	57	0,14	34		
	5	41	62	0,15	35		
	15	24	37	0,14	32		

**Пример 78. Антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, нацеленных на ангиотензиноген, содержащих конъюгат GalNAc<sub>3</sub>**

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже, испытали в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования ангиотензиногена (AGT) у нормотензивных мышей Спрага-Доули.

**Таблица 54**



**Модифицированные ASO, нацеленные на AGT**

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM	SEQ ID NO.
552668	<sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> G <sub>es</sub> A <sub>es</sub> T <sub>e</sub>	н.д.	н.д.	34
669509	<sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> G <sub>es</sub> A <sub>es</sub> T <sub>eo</sub> A <sub>do</sub> '-GalNAc3-1a	GalNAc <sub>3</sub> -1 <sub>a</sub>	A <sub>d</sub>	35

Структура GalNAc<sub>3</sub>-1<sub>a</sub> показана ранее в Примере 9.

*Лечение*

Шестинедельным самцам крыс Спрага-Дуули один раз в неделю вводили подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, в целом три дозы олигонуклеотида, перечисленного в Таблице 54, или PBS. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Крыс умертвили через 72 часа после последней дозы. Уровни мРНК AGT в печени измерили при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Уровни белка AGT в плазме измерили при помощи твердофазного иммуоферментного анализа для определения общего ангиотензиногена (кат. № JP27412, IBL International, Торонто, штат Онтарио) с разбавлением плазмы 1:20000. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент от уровней мРНК AGT в печени или от уровней белка AGT в плазме для каждой экспериментальной группы, нормализованных к контрольному образцу с PBS.

Как показано в Таблице 55, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК AGT в печени и уровни белка в плазме дозозависимым образом, и олигонуклеотид, содержащий конъюгат GalNAc, был значительно более эффективным, чем исходный олигонуклеотид, не содержащий конъюгата GalNAc.

**Таблица 55**

**Уровни мРНК AGT в печени и белка в плазме**

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК AGT в печени (% PBS)	Белок AGT в плазме (% PBS)	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM
PBS	н.д.	100	100	н.д.	н.д.
552668	3	95	122	н.д.	н.д.
	10	85	97		

	30	46	79		
	90	8	11		
669509	0,3	95	70	GalNAc <sub>3</sub> -1a	Ad
	1	95	129		
	3	62	97		
	10	9	23		

Измерили также уровни трансаминазы в печени, аланин-аминотрансферазы (ALT) и аспартат-аминотрансферазы (AST) в плазме, а также массу тела в момент умерщвления, применяя стандартные протоколы. Результаты представлены ниже в Таблице 56.

Таблица 56

## Уровни трансаминазы в печени и массы тела крыс

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Масса тела (% от исходного значения)	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM
PBS	н.д.	51	81	186	н.д.	н.д.
552668	3	54	93	183	н.д.	н.д.
	10	51	93	194		
	30	59	99	182		
	90	56	78	170		
669509	0,3	53	90	190	GalNAc <sub>3</sub> -1a	Ad
	1	51	93	192		
	3	48	85	189		
	10	56	95	189		

**Пример 79. Продолжительность действия *in vivo* олигонуклеотидов, нацеленных на АРОС-III, содержащих конъюгат GalNAc<sub>3</sub>**

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже в Таблице 57, испытали в исследовании однократной дозы на продолжительность действия у мышей.

Таблица 57

## Модифицированные ASO, нацеленные на АРОС-III

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM	SEQ ID NO.
30480 1	A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> A <sub>es</sub> T <sub>e</sub>	н.д.	н.д.	20

64753 5	$A_{es}G_{es}^mC_{es}T_{es}T_{es}^mC_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}A_{ds}G_{ds}^mC_{ds}T_{es}T_{es}A_{es}T_{eo}Ado'$ <b>GalNAc3-1a</b>	GalNAc3-1a	A <sub>d</sub>	21
66308 3	<b>GalNAc3-3a-</b> $o'AdoA_{es}G_{es}^mC_{es}T_{es}T_{es}^mC_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}A_{ds}G_{ds}^mC_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_e$	GalNAc3-3a	A <sub>d</sub>	36
67444 9	<b>GalNAc3-7a-</b> $o'AdoA_{es}G_{es}^mC_{es}T_{es}T_{es}^mC_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}A_{ds}G_{ds}^mC_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_e$	GalNAc3-7a	A <sub>d</sub>	36
67445 0	<b>GalNAc3-10a-</b> $o'AdoA_{es}G_{es}^mC_{es}T_{es}T_{es}^mC_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}A_{ds}G_{ds}^mC_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_e$	GalNAc3-10a	A <sub>d</sub>	36
67445 1	<b>GalNAc3-13a-</b> $o'AdoA_{es}G_{es}^mC_{es}T_{es}T_{es}^mC_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}A_{ds}G_{ds}^mC_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_e$	GalNAc3-13a	A <sub>d</sub>	36

Структура GalNAc3-1<sub>a</sub> показана ранее в Примере 9, GalNAc3-3<sub>a</sub> показана в Примере 39, GalNAc3-7<sub>a</sub> показана в Примере 48, GalNAc3-10<sub>a</sub> показана в Примере 46, и GalNAc3-13<sub>a</sub> показана в Примере 62.

#### Лечение

Шести-восьминедельным трансгенным мышам, экспрессирующим человеческий АРОС-III, ввели однократную подкожную инъекцию олигонуклеотида, перечисленного в Таблице 57, или PBS. Каждая экспериментальная группа состояла из 3 животных. Образцы крови брали до введения дозы для определения исходного значения, а также через 72 часа, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель и 6 недель после введения дозы. Уровни триглицеридов и белка АРОС-III в плазме измерили так, как описано в Примере 20. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент от уровней триглицеридов и АРОС-III в плазме для каждой экспериментальной группы, нормализованных и исходным значениям, и они демонстрируют, что олигонуклеотиды, содержащие конъюгирующую группу GalNAc, обладают более продолжительным действием, чем исходный олигонуклеотид, не содержащий конъюгирующую группу (ISIS 304801) даже несмотря на то, что доза исходного соединения была в три раза выше, чем доза олигонуклеотидов, содержащих конъюгирующую группу GalNAc.

Таблица 58

#### Уровни триглицеридов и белка АРОС-III в плазме трансгенных мышей

ISIS №	Доза (мг/кг)	Временные точки (дни)	Триглицериды (% от)	Белок АРОС-III	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	СМ
--------	--------------	-----------------------	---------------------	----------------	-----------------------------	----

		после введения дозы)	исходного значения)	(% от исходного значения)		
PBS	н.д.	3	97	102	н.д.	н.д.
		7	101	98		
		14	108	98		
		21	107	107		
		28	94	91		
		35	88	90		
		42	91	105		
304801	30	3	40	34	н.д.	н.д.
		7	41	37		
		14	50	57		
		21	50	50		
		28	57	73		
		35	68	70		
		42	75	93		
647535	10	3	36	37	GalNAc <sub>3</sub> -1a	Ad
		7	39	47		
		14	40	45		
		21	41	41		
		28	42	62		
		35	69	69		
		42	85	102		
663083	10	3	24	18	GalNAc <sub>3</sub> -3a	Ad
		7	28	23		
		14	25	27		
		21	28	28		
		28	37	44		
		35	55	57		
		42	60	78		
674449	10	3	29	26	GalNAc <sub>3</sub> -7a	Ad
		7	32	31		
		14	38	41		
		21	44	44		
		28	53	63		
		35	69	77		
		42	78	99		
674450	10	3	33	30	GalNAc <sub>3</sub> -10a	Ad
		7	35	34		
		14	31	34		
		21	44	44		
		28	56	61		
		35	68	70		
		42	83	95		
674451	10	3	35	33	GalNAc <sub>3</sub> -13a	Ad
		7	24	32		
		14	40	34		
		21	48	48		
		28	54	67		

		35	65	75		
		42	74	97		

**Пример 80. Антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, нацеленных на альфа-1 антитрипсин (A1AT), содержащих конъюгат GalNAc<sub>3</sub>**

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже в Таблице 59, испытали в исследовании дозозависимого ингибирования A1AT у мышей.

**Таблица 59**

**Модифицированные ASO, нацеленные на A1AT**

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM	SEQ ID NO.
476366	A <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>es</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> G <sub>es</sub> A <sub>e</sub>	н.д.	н.д.	37
656326	A <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>es</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> G <sub>es</sub> A <sub>eo</sub> <b>·Ado</b> <sup>·</sup> -GalNAc <sub>3</sub> -1a	GalNAc <sub>3</sub> -1a	A <sub>d</sub>	38
678381	<b>GalNAc<sub>3</sub>-3a-</b> o <sup>·</sup> AdoA <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>es</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> G <sub>es</sub> A <sub>e</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -3a	A <sub>d</sub>	39
678382	<b>GalNAc<sub>3</sub>-7a-</b> o <sup>·</sup> AdoA <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>es</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> G <sub>es</sub> A <sub>e</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -7a	A <sub>d</sub>	39
678383	<b>GalNAc<sub>3</sub>-10a-o</b> <sup>·</sup> AdoA <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>es</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> G <sub>es</sub> A <sub>e</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -10a	A <sub>d</sub>	39
678384	<b>GalNAc<sub>3</sub>-13a-o</b> <sup>·</sup> AdoA <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>es</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> G <sub>es</sub> A <sub>e</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -13a	A <sub>d</sub>	39

Структура GalNAc<sub>3</sub>-1a показана ранее в Примере 9, GalNAc<sub>3</sub>-3a показана в Примере 39, GalNAc<sub>3</sub>-7a показана в Примере 48, GalNAc<sub>3</sub>-10a показана в Примере 46, и GalNAc<sub>3</sub>-13a показана в Примере 62.

*Лечение*

Шестинедельным самцам мышей C57BL/6 (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) один раз в неделю вводили подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, в целом три дозы олигонуклеотида, перечисленного в Таблице 59, или PBS. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей умертвили через 72 часа после последнего введения. Уровни мРНК A1AT в печени определили при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Уровни белка A1AT в плазме определили при помощи твердофазного иммуноферментного анализа для определения мышинового альфа 1-антитрипсина (кат. № 41-A1AMS-E01, Alpcos, Салем, штат

Нью-Гэмпшир). Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней мРНК А1АТ в печени и белка в плазме для каждой экспериментальной группы, нормализованных к контрольному образцу с PBS.

Как показано в Таблице 60, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК А1АТ в печени и уровни белка А1АТ в плазме дозозависимым образом. Олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc, были значительно более эффективными, чем исходное соединение (ISIS 476366).

**Таблица 60**  
**Уровни мРНК А1АТ в печени и белка в плазме**

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК А1АТ в печени (% PBS)	Белок А1АТ в плазме (% PBS)	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	СМ
PBS	н.д.	100	100	н.д.	н.д.
476366	5	86	78	н.д.	н.д.
	15	73	61		
	45	30	38		
656326	0,6	99	90	GalNAc <sub>3</sub> -1a	Ad
	2	61	70		
	6	15	30		
	18	6	10		
678381	0,6	105	90	GalNAc <sub>3</sub> -3a	Ad
	2	53	60		
	6	16	20		
	18	7	13		
678382	0,6	90	79	GalNAc <sub>3</sub> -7a	Ad
	2	49	57		
	6	21	27		
	18	8	11		
678383	0,6	94	84	GalNAc <sub>3</sub> -10a	Ad
	2	44	53		
	6	13	24		
	18	6	10		
678384	0,6	106	91	GalNAc <sub>3</sub> -13a	Ad
	2	65	59		
	6	26	31		
	18	11	15		

Во время умерщвления измерили уровни трансаминазы в печени и АМК в плазме по стандартным протоколам. Измерили также массы тела и массы органов. Результаты представлены ниже в Таблице 61. Масса тела представлена как % относительно исходного значения. Массы органов представлены как % от массы тела относительно контрольной группы с PBS.

Таблица 61

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	АМК (мг/дл)	Масса тела (% от исходного значения)	Масса печени (% отн. массы тела)	Масса почек (% отн. массы тела)	Масса селезенки (% отн. массы тела)
PBS	н.д.	25	51	37	119	100	100	100
47636 6	5	34	68	35	116	91	98	106
	15	37	74	30	122	92	101	128
	45	30	47	31	118	99	108	123
65632 6	0,6	29	57	40	123	100	103	119
	2	36	75	39	114	98	111	106
	6	32	67	39	125	99	97	122
	18	46	77	36	116	102	109	101
67838 1	0,6	26	57	32	117	93	109	110
	2	26	52	33	121	96	106	125
	6	40	78	32	124	92	106	126
	18	31	54	28	118	94	103	120
67838 2	0,6	26	42	35	114	100	103	103
	2	25	50	31	117	91	104	117
	6	30	79	29	117	89	102	107
	18	65	112	31	120	89	104	113
67838 3	0,6	30	67	38	121	91	100	123
	2	33	53	33	118	98	102	121
	6	32	63	32	117	97	105	105
	18	36	68	31	118	99	103	108
67838 4	0,6	36	63	31	118	98	103	98
	2	32	61	32	119	93	102	114
	6	34	69	34	122	100	100	96
	18	28	54	30	117	98	101	104

**Пример 81.** Продолжительность действия *in vivo* олигонуклеотидов, нацеленных на A1AT, содержащих кластер GalNAc<sub>3</sub>

Олигонуклеотиды, перечисленные в Таблице 59, испытали в исследовании однократной дозы на продолжительность действия у мышей.

### Лечение

Шестинедельным самцам мышей C57BL/6 ввели однократную подкожную инъекцию олигонуклеотида, перечисленного в Таблице 59, или PBS. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Образцы крови брали за день до введения дозы для определения исходного значения, а также на 5, 12, 19 и 25 день после введения дозы. Уровни белка A1AT в плазме измерили при помощи твердофазного иммуноферментного анализа (см. Пример 80). Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней белка A1AT в плазме для каждой экспериментальной группы, нормализованных к исходным уровням. Результаты демонстрируют, что олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc, были более эффективными и имели более продолжительное действие, чем исходное соединение без конъюгата GalNAc (ISIS 476366). Кроме того, олигонуклеотиды, содержащие 5'-GalNAc конъюгат (ISIS 678381, 678382, 678383 и 678384), были, в целом, еще более эффективными с еще более продолжительным действием, чем олигонуклеотид, содержащий 3'-GalNAc конъюгат (ISIS 656326).

**Таблица 62**

**Уровни белка A1AT в плазме мышей**

ISIS №	Доза (мг/кг)	Временные точки (дни после введения дозы)	A1AT (% от исходного значения)	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM
PBS	н.д.	5	93	н.д.	н.д.
		12	93		
		19	90		
		25	97		
476366	100	5	38	н.д.	н.д.
		12	46		
		19	62		
		25	77		
656326	18	5	33	GalNAc <sub>3</sub> -1a	A <sub>d</sub>
		12	36		
		19	51		
		25	72		
678381	18	5	21	GalNAc <sub>3</sub> -3a	A <sub>d</sub>
		12	21		
		19	35		
		25	48		
678382	18	5	21	GalNAc <sub>3</sub> -7a	A <sub>d</sub>



		12	21		
		19	39		
		25	60		
678383	18	5	24	GalNAc <sub>3</sub> -10a	A <sub>d</sub>
		12	21		
		19	45		
		25	73		
678384	18	5	29	GalNAc <sub>3</sub> -13a	A <sub>d</sub>
		12	34		
		19	57		
		25	76		

**Пример 82. Антисмысловое ингибирование *in vitro* под действием олигонуклеотидов, нацеленных на SRB-1, содержащих конъюгат GalNAc<sub>3</sub>**

Первичные гепатоциты печени мышей высевали в 96-луночные планшеты при 15000 клеток на лунку за 2 часа до обработки. Олигонуклеотиды, перечисленные в Таблице 63, добавили в концентрации 2, 10, 50 или 250 нМ в среде Уильяма E, и инкубировали клетки в течение ночи при 37 °C в 5% CO<sub>2</sub>. Клетки лизировали через 16 часов после добавления олигонуклеотида, а общую РНК очистили при помощи RNease 3000 BioRobot (Qiagen). Уровни мРНК SRB-1 определили при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Значения IC<sub>50</sub> определили при помощи программы Prism 4 (GraphPad). Результаты демонстрируют, что олигонуклеотиды, содержащие множество различных конъюгирующих групп GalNAc и множество различных расщепляемых фрагментов, являются значительно более эффективными в *in vitro* эксперименте свободного поглощения, чем исходные олигонуклеотиды, не содержащие конъюгирующую группу GalNAc (ISIS 353382 и 666841).

**Таблица 63**

**Ингибирование экспрессии SRB-1 *in vitro***

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Связи	Кластер GalNAc	CM	IC <sub>50</sub> (нМ)	SEQ ID NO.
35338 2	G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>e</sub>	PS	н.д.	н.д.	250	28
65586 1	G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>eo</sub> <b>Ado'-GalNAc<sub>3</sub>-1a</b>	PS	GalNAc <sub>3</sub> -1a	A <sub>d</sub>	40	29
66116 1	<b>GalNAc<sub>3</sub>-3a-o'-Ado</b> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>e</sub>	PS	GalNAc <sub>3</sub> -3a	A <sub>d</sub>	40	30
66116 2	<b>GalNAc<sub>3</sub>-3a-o'-Ado</b> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>e</sub>	PO/ PS	GalNAc <sub>3</sub> -3a	A <sub>d</sub>	8	30

66407 8	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{eo} A_{do} \text{-GalNac3-9a}$	PS	GalNac 3-9a	Ad	20	29
66500 1	<b>GalNac3-8a-o'-Ado</b> $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{e}$	PS	GalNac 3-8a	Ad	70	30
66622 4	<b>GalNac3-5a-o'-Ado</b> $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{e}$	PS	GalNac 3-5a	Ad	80	30
66684 1	$G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} T_{ds} T_{eo}^m C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_{e}$	PO/ PS	н.д.	н.д.	>250	28
66688 1	<b>GalNac3-10a-o'-Ado</b> $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{e}$	PS	GalNac 3-10a	Ad	30	30
66690 4	<b>GalNac3-3a-o'-Ges</b> $^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds}$ $A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{e}$	PS	GalNac 3-3a	PO	9	28
66692 4	<b>GalNac3-3a-o'-Tdo</b> $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{e}$	PS	GalNac 3-3a	Td	15	33
66696 1	<b>GalNac3-6a-o'-Ado</b> $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{e}$	PS	GalNac 3-6a	Ad	150	30
66698 1	<b>GalNac3-7a-o'-Ado</b> $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{e}$	PS	GalNac 3-7a	Ad	20	30
67006 1	<b>GalNac3-13a-o'-Ado</b> $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{e}$	PS	GalNac 3-13a	Ad	30	30
67069 9	<b>GalNac3-3a-o'-Tdo</b> $G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{eo}^m C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_{e}$	PO/ PS	GalNac 3-3a	Td	15	33
67070 0	<b>GalNac3-3a-o'-Aeo</b> $G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{eo}^m C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_{e}$	PO/ PS	GalNac 3-3a	Ae	30	30
67070 1	<b>GalNac3-3a-o'-Teo</b> $G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{eo}^m C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_{e}$	PO/ PS	GalNac 3-3a	Te	25	33
67114 4	<b>GalNac3-12a-o'-Ado</b> $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{e}$	PS	GalNac 3-12a	Ad	40	30
67116 5	<b>GalNac3-13a-</b> <b>o'-Ado</b> $G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds}$ $G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{eo}^m C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_{e}$	PO/ PS	GalNac 3-13a	Ad	8	30
67126 1	<b>GalNac3-14a-o'-Ado</b> $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{e}$	PS	GalNac 3-14a	Ad	>250	30
67126 2	<b>GalNac3-15a-o'-Ado</b> $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{e}$	PS	GalNac 3-15a	Ad	>250	30
67350 1	<b>GalNac3-7a-o'-Ado</b> $G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{eo}^m C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_{e}$	PO/ PS	GalNac 3-7a	Ad	30	30
67350 2	<b>GalNac3-10a-</b> <b>o'-Ado</b> $G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{eo}^m C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_{e}$	PO/ PS	GalNac 3-10a	Ad	8	30
67544 1	<b>GalNac3-17a-o'-Ado</b> $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{e}$	PS	GalNac 3-17a	Ad	30	30

67544 2	<b>GalNAc3-18a-o'-Ado</b> $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	GalNAc 3-18a	Ad	20	30
67784 1	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{eo} \text{Ado}'$ - <b>GalNAc3-19a</b>	PS	GalNAc 3-19a	Ad	40	29
67784 2	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{eo} \text{Ado}'$ - <b>GalNAc3-20a</b>	PS	GalNAc 3-20a	Ad	30	29
67784 3	<b>GalNAc3-23a-o'-Ado</b> $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	GalNAc 3-23a	Ad	40	30

Структура GalNAc3-1a показана ранее в Примере 9, GalNAc3-3a показана в Примере 39, GalNAc3-5a показана в Примере 49, GalNAc3-6a показана в Примере 51, GalNAc3-7a показана в Примере 48, GalNAc3-8a показана в Примере 47, GalNAc3-9a показана в Примере 52, GalNAc3-10a показана в Примере 46, GalNAc3-12a показана в Примере 61, GalNAc3-13a показана в Примере 62, GalNAc3-14a показана в Примере 63, GalNAc3-15a показана в Примере 64, GalNAc3-17a показана в Примере 68, GalNAc3-18a показана в Примере 69, GalNAc3-19a показана в Примере 70, GalNAc3-20a показана в Примере 71, и GalNAc3-23a показана в Примере 76.

**Пример 83. Антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, нацеленных на фактор XI, содержащих кластер GalNAc3**

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже в Таблице 64, испытали в исследовании дозозависимого ингибирования фактора XI у мышей.

**Таблица 64**

**Модифицированные олигонуклеотиды, нацеленные на фактор XI**

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc	CM	SEQ ID NO.
40407 1	$T_{es} G_{es} G_{es} T_{es} A_{es} A_{ds} T_{ds}^m C_{ds}^m C_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{es} G_{es} A_{es} G_{es} G_e$	н.д.	н.д.	31
65617 3	$T_{es} G_{eo} G_{eo} T_{eo} A_{eo} A_{ds} T_{ds}^m C_{ds}^m C_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{eo}$ $G_{eo} A_{es} G_{es} G_{eo} \text{Ado}'$ - <b>GalNAc3-1a</b>	GalNAc3-1a	Ad	32
66308 6	<b>GalNAc3-3a-</b> $o' \text{Ado} T_{es} G_{eo} G_{eo} T_{eo} A_{eo} A_{ds} T_{ds}^m C_{ds}^m C_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds}$ $T_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{eo} G_{eo} A_{es} G_{es} G_e$	GalNAc3-3a	Ad	40
67834 7	<b>GalNAc3-7a-</b> $o' \text{Ado} T_{es} G_{eo} G_{eo} T_{eo} A_{eo} A_{ds} T_{ds}^m C_{ds}^m C_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds}$ $T_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{eo} G_{eo} A_{es} G_{es} G_e$	GalNAc3-7a	Ad	40
67834 8	<b>GalNAc3-10a-</b> $o' \text{Ado} T_{es} G_{eo} G_{eo} T_{eo} A_{eo} A_{ds} T_{ds}^m C_{ds}^m C_{ds} A_{ds}^m C_{ds}$ $T_{ds} T_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{eo} G_{eo} A_{es} G_{es} G_e$	GalNAc3-10a	Ad	40
67834 9	<b>GalNAc3-13a-</b> $o' \text{Ado} T_{es} G_{eo} G_{eo} T_{eo} A_{eo} A_{ds} T_{ds}^m C_{ds}^m C_{ds} A_{ds}^m C_{ds}$ $T_{ds} T_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{eo} G_{eo} A_{es} G_{es} G_e$	GalNAc3-13a	Ad	40

Структура GalNAc<sub>3</sub>-1<sub>a</sub> показана ранее в Примере 9, GalNAc<sub>3</sub>-3<sub>a</sub> показана в Примере 39, GalNAc<sub>3</sub>-7<sub>a</sub> показана в Примере 48, GalNAc<sub>3</sub>-10<sub>a</sub> показана в Примере 46, и GalNAc<sub>3</sub>-13<sub>a</sub> показана в Примере 62.

### Лечение

Шести-восьминедельным мышам один раз в неделю вводили подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, в целом три дозы олигонуклеотида, перечисленного ниже, или PBS. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей умертвили через 72 часа после последней дозы. Уровни мРНК фактора XI в печени измерили при помощи ПЦР в реальном времени и нормализовали к циклофилину по стандартным протоколам. Измерили также трансаминазы в печени, АМК и билирубин. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент для каждой экспериментальной группы, нормализованный к контролю с PBS.

Как показано в Таблице 65, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК фактора XI в печени дозозависимым образом. Результаты демонстрируют, что олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc, были более эффективными, чем исходное соединение без конъюгата GalNAc (ISIS 404071). Кроме того, олигонуклеотиды, содержащие 5'-GalNAc конъюгат (ISIS 663086, 678347, 678348 и 678349), были еще более эффективными, чем олигонуклеотид, содержащий 3'-GalNAc конъюгат (ISIS 656173).

**Таблица 65**

#### Уровни мРНК фактора XI в печени, трансаминазы в печени, АМК и билирубина

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК фактора XI (% от PBS)	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	АМК (мг/дл)	Билирубин (мг/дл)	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	SEQ ID NO.
PBS	н.д.	100	63	70	21	0,18	н.д.	н.д.
40407 1	3	65	41	58	21	0,15	н.д.	31
	10	33	49	53	23	0,15		
	30	17	43	57	22	0,14		
65617 3	0,7	43	90	89	21	0,16	GalNAc <sub>3</sub> -1a	32
	2	9	36	58	26	0,17		
	6	3	50	63	25	0,15		
66308 6	0,7	33	91	169	25	0,16	GalNAc <sub>3</sub> -3a	40
	2	7	38	55	21	0,16		
	6	1	34	40	23	0,14		
67834 7	0,7	35	28	49	20	0,14	GalNAc <sub>3</sub> -7a	40
	2	10	180	149	21	0,18		
	6	1	44	76	19	0,15		
67834 8	0,7	39	43	54	21	0,16	GalNAc <sub>3</sub> -10a	40
	2	5	38	55	22	0,17		

	6	2	25	38	20	0,14		
67834 9	0,7	34	39	46	20	0,16	GalNAc <sub>3</sub> - 13a	40
	2	8	43	63	21	0,14		
	6	2	28	41	20	0,14		

**Пример 84. Продолжительность действия *in vivo* олигонуклеотидов, нацеленных на фактор XI, содержащих конъюгат GalNAc<sub>3</sub>**

Олигонуклеотиды, перечисленные в Таблице 64, испытали в исследовании однократной дозы на продолжительность действия у мышей.

*Лечение*

Шести-восьминедельным мышам ввели однократную подкожную инъекцию олигонуклеотида, перечисленного в Таблице 64, или PBS. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Образцы крови брали из хвостовой вены за день до введения дозы для определения исходного значения, а также на 3, 10 и 17 день после введения дозы. Уровни белка фактора XI в плазме определяли твердофазным иммуноферментным анализом, применяя иммобилизованные и биотинилированные детекторные антитела для фактора XI производства R & D Systems, Миннеаполис, штат Миннесота (кат. № AF2460 и № BAF2460, соответственно), а также реагент OptEIA, набор В (кат. № 550534, BD Biosciences, Сан-Хосе, штат Калифорния). Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней белка фактора XI в плазме для каждой экспериментальной группы, нормализованных к исходным уровням. Результаты демонстрируют, что олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc, были более эффективными и имели более продолжительное действие, чем исходное соединение без конъюгата GalNAc (ISIS 404071). Кроме того, олигонуклеотиды, содержащие 5'-GalNAc конъюгат (ISIS 663086, 678347, 678348 и 678349), были еще более эффективными с еще более продолжительным действием, чем олигонуклеотид, содержащий 3'-GalNAc конъюгат (ISIS 656173).

**Таблица 66**

**Уровни белка фактора XI в плазме мышей**

ISIS №	Доза (мг/кг)	Временные точки (дни после введения дозы)	Фактор XI (% от исходного значения)	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM	SEQ ID NO.
PBS	н.д.	3	123	н.д.	н.д.	н.д.
		10	56			
		17	100			

404071	30	3	11	н.д.	н.д.	31
		10	47			
		17	52			
656173	6	3	1	GalNAc <sub>3</sub> -1a	A <sub>d</sub>	32
		10	3			
		17	21			
663086	6	3	1	GalNAc <sub>3</sub> -3a	A <sub>d</sub>	40
		10	2			
		17	9			
678347	6	3	1	GalNAc <sub>3</sub> -7a	A <sub>d</sub>	40
		10	1			
		17	8			
678348	6	3	1	GalNAc <sub>3</sub> -10a	A <sub>d</sub>	40
		10	1			
		17	6			
678349	6	3	1	GalNAc <sub>3</sub> -13a	A <sub>d</sub>	40
		10	1			
		17	5			

**Пример 85. Антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, нацеленных на SRB-1, содержащих конъюгат GalNAc<sub>3</sub>**

Олигонуклеотиды, перечисленные в Таблице 63, испытали в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования SRB-1 у мышей.

*Лечение*

Шести-восьминедельным мышам C57BL/6 один раз в неделю вводили подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, в целом три дозы олигонуклеотида, перечисленного в Таблице 63, или солевого раствора. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей умертвили через 48 часов после последнего введения для определения уровней мРНК SRB-1 в печени при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней мРНК SRB-1 в печени для каждой экспериментальной группы, нормализованных к контрольному образцу, обработанному солевым раствором.

Как показано в Таблицах 67 и 68, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК SRB-1 дозозависимым образом.

**Таблица 67**  
**мРНК SRB-1 в печени**

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% от солевого раствора)	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	СМ
Солевой раствор	н.д.	100	н.д.	н.д.
655861	0,1	94	GalNAc <sub>3</sub> -1a	A <sub>d</sub>
	0,3	119		
	1	68		
	3	32		
661161	0,1	120	GalNAc <sub>3</sub> -3a	A <sub>d</sub>
	0,3	107		
	1	68		
	3	26		
666881	0,1	107	GalNAc <sub>3</sub> -10a	A <sub>d</sub>
	0,3	107		
	1	69		
	3	27		
666981	0,1	120	GalNAc <sub>3</sub> -7a	A <sub>d</sub>
	0,3	103		
	1	54		
	3	21		
670061	0,1	118	GalNAc <sub>3</sub> -13a	A <sub>d</sub>
	0,3	89		
	1	52		
	3	18		
677842	0,1	119	GalNAc <sub>3</sub> -20a	A <sub>d</sub>
	0,3	96		
	1	65		
	3	23		

Таблица 68

## мРНК SRB-1 в печени

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% от солевого раствора)	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	СМ
661161	0,1	107	GalNAc <sub>3</sub> -3a	A <sub>d</sub>
	0,3	95		
	1	53		
	3	18		
677841	0,1	110	GalNAc <sub>3</sub> -19a	A <sub>d</sub>
	0,3	88		
	1	52		
	3	25		

Измерили также уровни трансаминазы в печени, общего билирубина, АМК и массы тела по стандартным протоколам. Средние значения для каждой экспериментальной группы представлены ниже в Таблице 69.

Таблица 69

ISIS №	Доза (мг/кг г)	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Билирубин (мг/дл)	АМК (мг/дл)	Масса тела (% от исходного значения)	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	СМ
Солевой раствор	н.д.	19	39	0,17	26	118	н.д.	н.д.
655861	0,1	25	47	0,17	27	114	GalNAc <sub>3</sub> -1a	Ad
	0,3	29	56	0,15	27	118		
	1	20	32	0,14	24	112		
	3	27	54	0,14	24	115		
661161	0,1	35	83	0,13	24	113	GalNAc <sub>3</sub> -3a	Ad
	0,3	42	61	0,15	23	117		
	1	34	60	0,18	22	116		
	3	29	52	0,13	25	117		
666881	0,1	30	51	0,15	23	118	GalNAc <sub>3</sub> -10a	Ad
	0,3	49	82	0,16	25	119		
	1	23	45	0,14	24	117		
	3	20	38	0,15	21	112		
666981	0,1	21	41	0,14	22	113	GalNAc <sub>3</sub> -7a	Ad
	0,3	29	49	0,16	24	112		
	1	19	34	0,15	22	111		
	3	77	78	0,18	25	115		
670061	0,1	20	63	0,18	24	111	GalNAc <sub>3</sub> -13a	Ad
	0,3	20	57	0,15	21	115		
	1	20	35	0,14	20	115		
	3	27	42	0,12	20	116		
677842	0,1	20	38	0,17	24	114	GalNAc <sub>3</sub> -20a	Ad
	0,3	31	46	0,17	21	117		
	1	22	34	0,15	21	119		
	3	41	57	0,14	23	118		

**Пример 86. Антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, нацеленных на TTR, содержащих кластер GalNAc<sub>3</sub>**

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже в Таблице 70, испытали в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования человеческого транстиретина (TTR) у трансгенных мышей, экспрессирующих человеческий TTR ген.

*Лечение*

Восьминедельным TTR трансгенным мышам один раз в неделю в течение трех недель, в целом три дозы, вводили подкожную инъекцию олигонуклеотида и дозы, перечисленных в представленных ниже таблицах, или PBS. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей умертвили через 72 часа после последнего введения. В течение эксперимента в различных временных точках брали образцы крови из хвостовой вены и измеряли уровни белка TTR в плазме, ALT и AST, которые представлены



в Таблицах 72-74. После умерщвления животных измерили уровни ALT, AST и человеческого TTR в плазме, а также массы тела, массы органов и уровни мРНК человеческого TTR в печени. Уровни белка TTR измерили при помощи клинического анализатора (AU480, Beckman Coulter, штат Калифорния). ПЦР в реальном времени и реагент для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) применяли по стандартным протоколам для определения уровней мРНК человеческого TTR в печени. Результаты, показанные в Таблицах 71-74, представляют собой средние значения для каждой экспериментальной группы. Уровни мРНК представляют собой средние значения относительно среднего значения для PBS группы. Уровни белка в плазме представляют собой средние значения относительно среднего значения для PBS группы в исходном состоянии. Массы тела представляют собой среднее процентное изменение массы от исходного значения до умерщвления для каждой отдельной экспериментальной группы. Представленные массы органов нормализованы к массе тела животного, а затем представлена средняя нормализованная масса органов для каждой экспериментальной группы относительно средней нормализованной массы органов для PBS группы.

В Таблицах 71-74 «BL» означает исходные значения измерений, выполненных непосредственно перед введением первой дозы. Как показано в Таблицах 71 и 72, лечение бессмысленными олигонуклеотидами снижает уровни экспрессии TTR дозозависимым образом. Олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc, были более эффективными, чем исходное соединение без конъюгата GalNAc (ISIS 420915). Кроме того, олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc и смешанные PS/PO межнуклеозидные связи, были еще более эффективными, чем олигонуклеотид, содержащий конъюгат GalNAc и только PS связи.

Таблица 70

## Олигонуклеотиды, нацеленные на человеческий TTR

Isis №	Последовательность от 5' к 3'	Связи	Кластер GalNAc	CM	SEQ ID NO.
42091 5	$T_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $A_{ds} A_{es} T_{es}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e$	PS	н.д.	н.д.	41
66026 1	$T_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $A_{ds} A_{es} T_{es}^m C_{es}^m C_{es}^m C_{eo} A_{do} \cdot \text{GalNAc}_3\text{-1a}$	PS	GalNAc <sub>3</sub> -1a	Ad	42
68288 3	<b>GalNAc<sub>3</sub>-3a-</b> $o \cdot T_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo} G_{eo} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds} A_{ds}$ $T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{eo} T_{eo}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e$	PS/PO	GalNAc <sub>3</sub> -3a	PO	74

68288 4	<b>GalNAc3-7a-</b> o'T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> G <sub>eo</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>e</sub>	PS/PO	GalNAc3-7a	PO	41
68288 5	<b>GalNAc3-10a-</b> o'T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> G <sub>eo</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>e</sub>	PS/PO	GalNAc3-10a	PO	41
68288 6	<b>GalNAc3-13a-</b> o'T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> G <sub>eo</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>e</sub>	PS/PO	GalNAc3-13a	PO	41
68405 7	T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> G <sub>eo</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>d</sub> sA <sub>ds</sub> A <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> A <sub>do</sub> '-GalNAc3-19a	PS/PO	GalNAc3-19a	Ad	42

Легенда для Таблицы 72 представлена в Примере 74. Структура GalNAc3-1 показана в Примере 9. Структура GalNAc3-3a показана в Примере 39. Структура GalNAc3-7a показана в Примере 48. Структура GalNAc3-10a показана в Примере 46. Структура GalNAc3-13a показана в Примере 62. Структура GalNAc3-19a показана в Примере 70.

Таблица 71

Антисмысловое ингибирование человеческого TTR *in vivo*

Isis №	Доза (мг/кг)	мРНК TTR (% PBS)	Белок TTR в плазме (% PBS)	Кластер GalNAc	CM	SEQ ID NO.
PBS	н.д.	100	100	н.д.	н.д.	
420915	6	99	95	н.д.	н.д.	41
	20	48	65			
	60	18	28			
660261	0,6	113	87	GalNAc3-1a	Ad	42
	2	40	56			
	6	20	27			
	20	9	11			

Таблица 72

Антисмысловое ингибирование человеческого TTR *in vivo*

Isis №	Доза (мг/кг)	мРНК TTR (% PBS)	Белок TTR в плазме (% PBS при BL)				Кластер GalNAc	CM	SEQ ID NO.
			BL	3-й день	10-й день	17-й день (после умерщвления)			
PBS	н.д.	100	100	96	90	114	н.д.	н.д.	
420915	6	74	106	86	76	83	н.д.	н.д.	41
	20	43	102	66	61	58			
	60	24	92	43	29	32			
682883	0,6	60	88	73	63	68	GalNAc3-3a	PO	41
	2	18	75	38	23	23			
	6	10	80	35	11	9			
682884	0,6	56	88	78	63	67	GalNAc3-7a	PO	41
	2	19	76	44	25	23			
	6	15	82	35	21	24			

682885	0,6	60	92	77	68	76	GalNAc <sub>3</sub> -10a	PO	41
	2	22	93	58	32	32			
	6	17	85	37	25	20			
682886	0,6	57	91	70	64	69	GalNAc <sub>3</sub> -13a	PO	41
	2	21	89	50	31	30			
	6	18	102	41	24	27			
684057	0,6	53	80	69	56	62	GalNAc <sub>3</sub> -19a	Ad	42
	2	21	92	55	34	30			
	6	11	82	50	18	13			

Таблица 73

## Уровни трансаминазы, изменение массы тела и относительные массы органов

Isis №	До за (мг/кг)	ALT (ед./л)				AST (ед./л)				Масса тела (% BL)	Печень (% PBS) BL	Селезенка (% PBS) 3 день	Почки (% PBS) 10 день	SEQ ID NO. 17 день
		BL	3 день	10 день	17 день	BL	3 день	10 день	Дау 17					
PBS	н.д.	33	34	33	24	58	62	67	52	105	100	100	100	н.д.
420915	6	34	33	27	21	64	59	73	47	115	99	89	91	41
	20	34	30	28	19	64	54	56	42	111	97	83	89	
	60	34	35	31	24	61	58	71	58	113	102	98	95	
660261	0,6	33	38	28	26	70	71	63	59	111	96	99	92	42
	2	29	32	31	34	61	60	68	61	118	100	92	90	
	6	29	29	28	34	58	59	70	90	114	99	97	95	
	20	33	32	28	33	64	54	68	95	114	101	106	92	

Таблица 74

## Уровни трансаминазы, изменение массы тела и относительные массы органов

Isis №	До за (мг/кг)	ALT (ед./л)				AST (ед./л)				Масса тела (% BL)	Печень (% PBS) BL	Селезенка (% PBS) 3 день	Почки (% PBS) 10 день	SEQ ID NO. 17 день
		BL	3 день	10 день	17 день	BL	3 день	10 день	Дау 17					
PBS	н.д.	32	34	37	41	62	78	76	77	104	100	100	100	н.д.
420915	6	32	30	34	34	61	71	72	66	102	103	102	105	41
	20	41	34	37	33	80	76	63	54	106	107	135	101	
	60	36	30	32	34	58	81	57	60	106	105	104	99	
682883	0,6	32	35	38	40	53	81	74	76	104	101	112	95	41
	2	38	39	42	43	71	84	70	77	107	98	116	99	
	6	35	35	41	38	62	79	103	65	105	103	143	97	
682884	0,6	33	32	35	34	70	74	75	67	101	100	130	99	41

	2	31	32	38	38	63	77	66	55	104	103	122	100	
	6	38	32	36	34	65	85	80	62	99	105	129	95	
682885	0,6	39	26	37	35	63	63	77	59	100	109	109	112	41
	2	30	26	38	40	54	56	71	72	102	98	111	102	
	6	27	27	34	35	46	52	56	64	102	98	113	96	
682886	0,6	30	40	34	36	58	87	54	61	104	99	120	101	41
	2	27	26	34	36	51	55	55	69	103	91	105	92	
	6	40	28	34	37	107	54	61	69	109	100	102	99	
684057	0,6	35	26	33	39	56	51	51	69	104	99	110	102	42
	2	33	32	31	40	54	57	56	87	103	100	112	97	
	6	39	33	35	40	67	52	55	92	98	104	121	108	

**Пример 87. Продолжительность действия *in vivo* однократных доз олигонуклеотидов, нацеленных на TTR, содержащих кластер GalNAc<sub>3</sub>**

ISIS № 420915 и 660261 (см. Таблицу 70) испытали в исследовании однократной дозы на продолжительность действия у мышей. ISIS № 420915, 682883 и 682885 (см. Таблицу 70) также испытали в исследовании однократной дозы на продолжительность действия у мышей.

*Лечение*

Восьминедельным самцам трансгенных мышей, которые экспрессируют человеческий TTR, ввели однократную подкожную инъекцию 100 мг/кг ISIS № 420915 или 13,5 мг/кг ISIS № 660261. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Образцы крови из хвостовой вены брали до введения дозы для определения исходных показателей и на 3-й, 7-й, 10-й, 17-й, 24-й и 39-й день после введения дозы. Уровни белка TTR в плазме измеряли так, как описано в Примере 86. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней TTR в плазме для каждой экспериментальной группы, нормализованных к исходным уровням.

**Таблица 75**

**Уровни белка TTR в плазме**

ISIS №	Доза (мг/кг)	Временные точки (дни после введения дозы)	TTR (% от исходного значения)	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM	SEQ ID NO.
420915	100	3	30	н.д.	н.д.	41
		7	23			
		10	35			
		17	53			
		24	75			
		39	100			

660261	13,5	3	27	GalNAc <sub>3</sub> - 1a	Ad	42
		7	21			
		10	22			
		17	36			
		24	48			
		39	69			

### Лечение

Восьминедельным самкам трансгенных мышей, которые экспрессируют человеческий TTR, ввели однократную подкожную инъекцию 100 мг/кг ISIS № 420915, 10,0 мг/кг ISIS № 682883 или 10,0 мг/кг ISIS № 682885. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Образцы крови из хвостовой вены брали до введения дозы для определения исходных показателей и на 3-й, 7-й, 10-й, 17-й, 24-й и 39-й день после введения дозы. Уровни белка TTR в плазме измеряли так, как описано в Примере 86. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней TTR в плазме для каждой экспериментальной группы, нормализованных к исходным уровням.

**Таблица 76**

### Уровни белка TTR в плазме

ISIS №	Доза (мг/кг)	Временные точки (дни после введения дозы)	TTR (% от исходного значения)	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM	SEQ ID NO.
420915	100	3	48	н.д.	н.д.	41
		7	48			
		10	48			
		17	66			
		31	80			
682883	10,0	3	45	GalNAc <sub>3</sub> -3a	PO	41
		7	37			
		10	38			
		17	42			
		31	65			
682885	10,0	3	40	GalNAc <sub>3</sub> - 10a	PO	41
		7	33			
		10	34			
		17	40			
		31	64			

Результаты в Таблицах 75 и 76 демонстрируют, что олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc, являются более эффективными и имеют более продолжительное действие, чем исходный олигонуклеотид без конъюгата (ISIS 420915).

**Пример 88. Сплайсинг-модулирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, нацеленных на SMN, содержащих конъюгат GalNAc<sub>3</sub>**

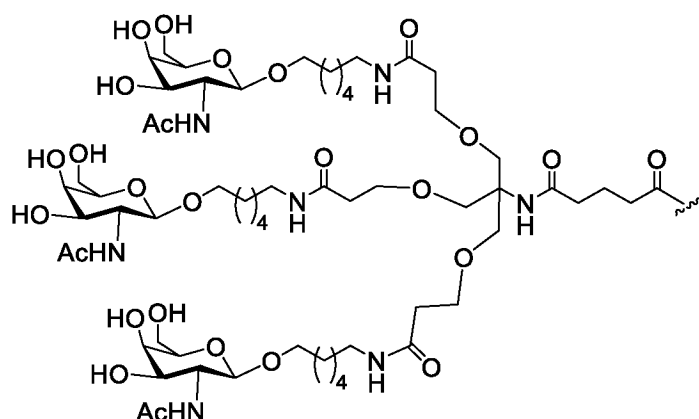
Олигонуклеотиды, перечисленные в Таблице 77, испытали на сплайсинг-модулирование человеческих генов выживаемости мотонейронов (SMN) у мышей.

**Таблица 77**

**Модифицированные ASO, нацеленные на SMN**

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM	SEQ ID NO.
38795 4	A <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> T <sub>es</sub> A <sub>es</sub> A <sub>es</sub> T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> G <sub>e</sub>	н.д.	н.д.	43
69981 9	<b>GalNAc<sub>3</sub>-7a-</b> o'A <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> T <sub>es</sub> A <sub>es</sub> A <sub>es</sub> T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> G <sub>e</sub>	GalNAc <sub>3</sub> - 7a	PO	43
69982 1	<b>GalNAc<sub>3</sub>-7a-</b> o'A <sub>es</sub> T <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> A <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> A <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> A <sub>eo</sub> A <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> G <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> G <sub>e</sub>	GalNAc <sub>3</sub> - 7a	PO	43
70000 0	A <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> T <sub>es</sub> A <sub>es</sub> A <sub>es</sub> T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> G <sub>eo</sub> <b>Ado'-GalNAc<sub>3</sub>-1a</b>	GalNAc <sub>3</sub> - 1a	Ad	44
70342 1	X-ATT <sup>m</sup> CA <sup>m</sup> CTTT <sup>m</sup> CATAATG <sup>m</sup> CTGG	н.д.	н.д.	43
70342 2	<b>GalNAc<sub>3</sub>-7b-X-ATT<sup>m</sup>CA<sup>m</sup>CTTT<sup>m</sup>CATAATG<sup>m</sup>CTGG</b>	GalNAc <sub>3</sub> - 7b	н.д.	43

Структура GalNAc<sub>3</sub>-7a показана ранее в Примере 48. «X» означает 5'-первичный амин, полученный компанией Gene Tools (Филомат, штат Орегон), а GalNAc<sub>3</sub>-7b означает структуру GalNAc<sub>3</sub>-7a, не содержащую часть -NH-C<sub>6</sub>-O связи, как показано ниже:



ISIS № 703421 и 703422 представляют собой морфолино-олигонуклеотиды, при этом каждый нуклеотид из двух олигонуклеотидов представляет собой морфолино-нуклеотид.

### Лечение

Шестинедельным трансгенным мышам, экспрессирующим человеческий SMN, ввели однократную подкожную инъекцию олигонуклеотида, перечисленного в Таблице 78, или солевого раствора. Каждая экспериментальная группа состояла из 2 самцов и 2 самок. Мышей умертвили через 3 дня после введения дозы для определения уровней мРНК человеческого SMN в печени с экзон 7 и без него, применив ПЦР в реальном времени по стандартным протоколам. Общую РНК измерили при помощи реагента Ribogreen. Уровни мРНК SMN нормализовали к общей мРНК, а затем нормализовали к средним значениям в группе, обработанной солевым раствором. Полученные средние отношения мРНК SMN, содержащей экзон 7, к мРНК SMN, не содержащей экзон 7, представлены в Таблице 78. Результаты демонстрируют, что полностью модифицированные олигонуклеотиды, которые модулируют сплайсинг и содержат конъюгат GalNAc, являются значительно более эффективными для изменения сплайсинга в печени, чем исходные олигонуклеотиды, не содержащие конъюгат GalNAc. Кроме того, эта тенденция сохраняется для химизма многократных модификаций, включая 2'-МОЕ и морфолино-модифицированные олигонуклеотиды.

**Таблица 78**

**Действие олигонуклеотидов, нацеленных на человеческий SMN, *in vivo***

ISIS №	Доза (мг/кг)	+экзон 7 / -экзон 7	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM	SEQ ID NO.
Солевой раствор	н.д.	1,00	н.д.	н.д.	н.д.
387954	32	1,65	н.д.	н.д.	43
387954	288	5,00	н.д.	н.д.	43
699819	32	7,84	GalNAc <sub>3</sub> -7a	PO	43
699821	32	7,22	GalNAc <sub>3</sub> -7a	PO	43
700000	32	6,91	GalNAc <sub>3</sub> -1a	A <sub>d</sub>	44
703421	32	1,27	н.д.	н.д.	43
703422	32	4,12	GalNAc <sub>3</sub> -7b	н.д.	43

**Пример 89. Антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, нацеленных на аполипопротеин А (Apo(a)), содержащих конъюгат GalNAc<sub>3</sub>**

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже в Таблице 79, испытали в исследовании дозозависимого ингибирования Apo(a) у трансгенных мышей.

**Таблица 79**

**Модифицированные ASO, нацеленные на Apo(a)**

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM	SEQ ID NO.
494372	T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>e</sub>	н.д.	н.д.	53
681257	<b>GalNAc<sub>3</sub>-7a</b> -o-T <sub>es</sub> G <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>eo</sub> G <sub>eo</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>e</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -7a	PO	53

Структура GalNAc<sub>3</sub>-7a показана в Примере 48.

*Лечение*

Восьминедельным самкам мышей C57BL/6 (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) один раз в неделю вводили подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, в целом шесть доз олигонуклеотида, перечисленного в Таблице 79, или PBS. Каждая экспериментальная группа состояла из 3-4 животных. Образцы крови из хвостовой вены брали за день до введения первой дозы и еженедельно после введения каждой дозы для определения уровней белка Apo(a) в плазме. Мышей умертвили через два дня после последнего введения. Уровни мРНК Apo(a) в печени определили при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Уровни белка Apo(a) в плазме определили при помощи твердофазного иммуноферментного анализа, и определили уровни трансаминазы в печени. Результаты анализа мРНК и белка в плазме в Таблице 80 представлены как среднее процентное значение для экспериментальной группы относительно группы, обработанной PBS. Уровни белка в плазме дополнительно нормализовали к исходному значению (BL) для группы с PBS. Средние абсолютные уровни трансаминазы и массы тела (% относительно среднего исходного значения) представлены в Таблице 81.

Как показано в Таблице 80, лечение олигонуклеотидами снижает уровни мРНК Apo(a) в печени и уровни белка в плазме дозозависимым образом. Кроме того, олигонуклеотид, содержащий конъюгат GalNAc, был значительно более эффективным с



более продолжительным действием, чем исходный олигонуклеотид, не содержащий конъюгат GalNAc. Как показано в Таблице 81, представленные олигонуклеотиды не влияют на уровни трансаминазы и массы тела, что указывает на хорошую переносимость олигонуклеотидов.

Таблица 80

## Уровни мРНК Apo(a) в печени и белка в плазме

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК Apo(a) (% PBS)	Белок Apo(a) в плазме (% PBS)						
			BL	Неделя 1	Неделя 2	Неделя 3	Неделя 4	Неделя 5	Неделя 6
PBS	н.д.	100	100	120	119	113	88	121	97
494372	3	80	84	89	91	98	87	87	79
	10	30	87	72	76	71	57	59	46
	30	5	92	54	28	10	7	9	7
681257	0,3	75	79	76	89	98	71	94	78
	1	19	79	88	66	60	54	32	24
	3	2	82	52	17	7	4	6	5
	10	2	79	17	6	3	2	4	5

Таблица 81

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Масса тела (% от исходного значения)
PBS	н.д.	37	54	103
494372	3	28	68	106
	10	22	55	102
	30	19	48	103
681257	0,3	30	80	104
	1	26	47	105
	3	29	62	102
	10	21	52	107

**Пример 90. Антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, нацеленных на TTR, содержащих кластер GalNAc<sub>3</sub>**

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже в Таблице 82, испытали в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования человеческого транстиретина (TTR) у трансгенных мышей, экспрессирующих человеческий TTR ген.

*Лечение*

TTR трансгенным мышам один раз в неделю в течение трех недель, в целом три дозы, вводили подкожную инъекцию олигонуклеотида и дозы, перечисленных в Таблице 83, или PBS. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Перед введением

первой дозы взяли образец крови из хвостовой вены для определения уровней белка TTR в плазме в исходном состоянии (BL). Мышей умертвили через 72 часа после последнего введения. Уровни белка TTR измерили при помощи клинического анализатора (AU480, Beckman Coulter, штат Калифорния). ПЦР в реальном времени и реагент для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) применяли по стандартным протоколам для определения уровней мРНК человеческого TTR в печени. Результаты, показанные в Таблице 83, представляют собой средние значения для каждой экспериментальной группы. Уровни мРНК представляют собой средние значения относительно среднего значения для PBS группы. Уровни белка в плазме представляют собой средние значения относительно среднего значения для PBS группы в исходном состоянии. «BL» означает исходные значения измерений, выполненных непосредственно перед введением первой дозы. Как показано в Таблице 83, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни экспрессии TTR дозозависимым образом. Олигонуклеотид, содержащий конъюгат GalNAc, был более эффективным, чем исходное соединение без конъюгата GalNAc (ISIS 420915), а олигонуклеотиды, содержащие фосфодиэфирный или дезоксиаденозиновый расщепляемый фрагмент, демонстрировали значительное усиление эффективности, по сравнению с исходным соединением, не содержащим конъюгата (см. ISIS № 682883 и 666943 по сравнению с 420915, а также см. Примеры 86 и 87).

Таблица 82

## Олигонуклеотиды, нацеленные на человеческий TTR

Isis №	Последовательность от 5' к 3'	Связи	Кластер GalNAc	CM	SEQ ID NO.
42091 5	T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>e</sub>	PS	н.д.	н.д.	41
68288 3	<b>GalNAc3-3a-</b> o'T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> G <sub>eo</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>e</sub>	PS/PO	GalNAc3-3a	PO	41
66694 3	<b>GalNAc3-3a-</b> o'AdoT <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> G <sub>eo</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>e</sub>	PS/PO	GalNAc3-3a	Ad	45
68288 7	<b>GalNAc3-7a-</b> o'AdoT <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> G <sub>eo</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>e</sub>	PS/PO	GalNAc3-7a	Ad	45
68288 8	<b>GalNAc3-10a-</b> o'AdoT <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> G <sub>eo</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>e</sub>	PS/PO	GalNAc3-10a	Ad	45
68288 9	<b>GalNAc3-13a-</b> o'AdoT <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> G <sub>eo</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>e</sub>	PS/PO	GalNAc3-13a	Ad	45

Легенда для Таблицы 82 представлена в Примере 74. Структура GalNAc<sub>3</sub>-3<sub>a</sub> показана в Примере 39. Структура GalNAc<sub>3</sub>-7<sub>a</sub> показана в Примере 48. Структура GalNAc<sub>3</sub>-10<sub>a</sub> показана в Примере 46. Структура GalNAc<sub>3</sub>-13<sub>a</sub> показана в Примере 62.

Таблица 83

Антисмысловое ингибирование человеческого TTR *in vivo*

Isis №	Доза (мг/кг)	мРНК TTR (% PBS)	Белок TTR (% BL)	Кластер GalNAc	CM
PBS	н.д.	100	124	н.д.	н.д.
420915	6	69	114	н.д.	н.д.
	20	71	86		
	60	21	36		
682883	0,6	61	73	GalNAc <sub>3</sub> -3 <sub>a</sub>	PO
	2	23	36		
	6	18	23		
666943	0,6	74	93	GalNAc <sub>3</sub> -3 <sub>a</sub>	Ad
	2	33	57		
	6	17	22		
682887	0,6	60	97	GalNAc <sub>3</sub> -7 <sub>a</sub>	Ad
	2	36	49		
	6	12	19		
682888	0,6	65	92	GalNAc <sub>3</sub> -10 <sub>a</sub>	Ad
	2	32	46		
	6	17	22		
682889	0,6	72	74	GalNAc <sub>3</sub> -13 <sub>a</sub>	Ad
	2	38	45		
	6	16	18		

**Пример 91. Антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, нацеленных на фактор VII, содержащих конъюгат GalNAc<sub>3</sub>, у приматов, не являющихся человеком**

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже в Таблице 84, испытали в нетерминальном исследовании повышения дозы на антисмысловое ингибирование фактора VII у обезьян.

*Лечение*

Обезьянам, ранее не подверженным экспериментам, на 0-й, 15-й и 29-й день вводили подкожные инъекции повышающихся доз олигонуклеотидов, перечисленных в Таблице 84, или PBS. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 самцов и 1 самки. Перед введением первой дозы и в различные временные точки после нее брали образцы крови для определения уровней белка фактора VII в плазме. Уровни белка фактора VII определяли с

помощью твердофазного иммуноферментного анализа. Результаты, показанные в Таблице 85, представляют собой средние значения для каждой экспериментальной группы относительно среднего значения для группы PBS в исходном состоянии (BL), измерения выполнены непосредственно перед введением первой дозы. Как показано в Таблице 85, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни экспрессии фактора VII дозозависимым образом, и олигонуклеотид, содержащий конъюгат GalNAc, был значительно более эффективным у обезьян, чем олигонуклеотид, не содержащий конъюгата GalNAc.

Таблица 84

## Олигонуклеотиды, нацеленные на фактор VII

Isis №	Последовательность от 5' к 3'	Связи	Кластер GalNAc	CM	SEQ ID NO.
40793 5	A <sub>es</sub> T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>d</sub> sT <sub>ds</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> A <sub>e</sub>	PS	н.д.	н.д.	46
68689 2	<b>GalNAc<sub>3</sub>-10<sub>a</sub></b> o'A <sub>es</sub> T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> A <sub>e</sub>	PS	GalNAc <sub>3</sub> - 10 <sub>a</sub>	PO	46

Легенда для Таблицы 84 представлена в Примере 74. Структура GalNAc<sub>3</sub>-10<sub>a</sub> показана в Примере 46.

Таблица 85

## Уровни белка фактора VII в плазме

ISIS №	День	Доза (мг/кг)	Фактор VII (% BL)
407935	0	н.д.	100
	15	10	87
	22	н.д.	92
	29	30	77
	36	н.д.	46
	43	н.д.	43
686892	0	3	100
	15	10	56
	22	н.д.	29
	29	30	19
	36	н.д.	15
	43	н.д.	11

**Пример 92. Антисмысловое ингибирование в первичных гепатоцитах под действием олигонуклеотидов, нацеленных на Apo-CIII, содержащих конъюгат GalNAc<sub>3</sub>**

Первичные мышечные гепатоциты высевали в 96-луночные планшеты при 15000 клеток на лунку и добавляли олигонуклеотиды, перечисленные в Таблице 86, нацеленные

на мышинный ApoC-III в концентрации 0,46, 1,37, 4,12 или 12,35, 37,04, 111,11 или 333,33 нМ, или 1,00 мкМ. После инкубации с олигонуклеотидами в течение 24 часов клетки лизировали и очистили общую РНК при помощи RNeasy (Qiagen). Уровни мРНК ApoC-III определили при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc.) по стандартным протоколам. Значения IC<sub>50</sub> определили при помощи программы Prism 4 (GraphPad). Результаты демонстрируют, что независимо от того, является ли расщепляемый фрагмент фосфодиэфиром или фосфодиэфир-связанным дезоксиаденозином, олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc, были значительно более эффективными, чем исходный олигонуклеотид, не содержащий конъюгата.

Таблица 86

## Ингибирование экспрессии мышинного ApoC-III в первичных гепатоцитах мышей

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	CM	IC <sub>50</sub> (нМ)	SEQ ID NO.
440670	<sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>e</sub>	н.д.	13,20	47
661180	<sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>eo</sub> Ado'-GalNAc3-1a	Ad	1,40	48
680771	GalNAc3-3a-o'- <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>e</sub>	PO	0,70	47
680772	GalNAc3-7a-o'- <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>e</sub>	PO	1,70	47
680773	GalNAc3-10a-o'- <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>e</sub>	PO	2,00	47
680774	GalNAc3-13a-o'- <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>e</sub>	PO	1,50	47
681272	GalNAc3-3a-o'- <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>eo</sub> G <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> A <sub>eo</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>e</sub>	PO	< 0,46	47
681273	GalNAc3-3a-o'-Ado' <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>e</sub>	Ad	1,10	49
683733	<sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>eo</sub> Ado'-GalNAc3-19a	Ad	2,50	48

Структура GalNAc3-1a показана ранее в Примере 9, GalNAc3-3a показана в Примере 39, GalNAc3-7a показана в Примере 48, GalNAc3-10a показана в Примере 46, и GalNAc3-13a показана в Примере 62, и GalNAc3-19a показана в Примере 70.

**Пример 93. Антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, нацеленных на SRB-1, содержащих смешанные крылья и 5'-GalNAc3 конъюгат**

Олигонуклеотиды, перечисленные в Таблице 87, испытали в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования SRB-1 у мышей.

Таблица 87

## Модифицированные ASO, нацеленные на SRB-1

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM	SEQ ID NO.
44909 3	T <sub>ks</sub> T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>ks</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>k</sub>	н.д.	н.д.	50
69980 6	<b>GalNAc<sub>3</sub>-3a-o'</b> T <sub>ks</sub> T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>ks</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>k</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -3a	PO	50
69980 7	<b>GalNAc<sub>3</sub>-7a-o'</b> T <sub>ks</sub> T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>ks</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>k</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -7a	PO	50
69980 9	<b>GalNAc<sub>3</sub>-7a-o'</b> T <sub>ks</sub> T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>ks</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>e</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -7a	PO	50
69981 1	<b>GalNAc<sub>3</sub>-7a-o'</b> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>k</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -7a	PO	50
69981 3	<b>GalNAc<sub>3</sub>-7a-o'</b> T <sub>ks</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ks</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>k</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -7a	PO	50
69981 5	<b>GalNAc<sub>3</sub>-7a-o'</b> T <sub>es</sub> T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>ks</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>e</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -7a	PO	50

Структура GalNAc<sub>3</sub>-3a показана ранее в Примере 39, а структура GalNAc<sub>3</sub>-7a показана ранее в Примере 48. Нижние индексы: «e» означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид; «d» означает β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; «k» означает 6'-(S)-CH<sub>3</sub> бициклический нуклеозид (сEt); «s» означает тиофосфатные межнуклеозидные связи (PS); «o» означает фосфодизфирные межнуклеозидные связи (PO). Верхний индекс «m» означает 5-метилцитозины.

*Лечение*

Шести-восьминедельным мышам C57bl6 (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) ввели однократную подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, олигонуклеотида, перечисленного в Таблице 87, или солевого раствора. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей умертвили через 72 часа после последнего введения. Уровни мРНК SRB-1 в печени измерили при помощи ПЦР в реальном времени. Уровни мРНК SRB-1 нормализовали к уровням мРНК циклофилина по стандартным протоколам. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней мРНК SRB-1 для каждой экспериментальной группы, по сравнению с контрольной группой, обработанной солевым раствором. Как показано в Таблице 88, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК SRB-1 дозозависимым образом, а гэдмерные олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc и имеющие крылья, которые представляют собой либо полностью сEt, либо смешанные сахарные модификации, были существенно более эффективными, чем исходный

олигонуклеотид, не содержащий конъюгата и содержащий полностью сEt модифицированные крылья.

Измерили также массы тела, уровни трансаминазы в печени, общий билирубин и АМК, а средние значения для каждой экспериментальной группы представлены в Таблице 88. Масса тела показана как средний процент массы тела относительно исходной массы тела (% BL), измеренный непосредственно перед введением дозы олигонуклеотида.

**Таблица 88**

**Уровни мРНК SRB-1, ALT, AST, АМК и общего билирубина, а также массы тела**

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% PBS)	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Билирубин	АМК	Масса тела (% BL)
PBS	н.д.	100	31	84	0,15	28	102
449093	1	111	18	48	0,17	31	104
	3	94	20	43	0,15	26	103
	10	36	19	50	0,12	29	104
699806	0,1	114	23	58	0,13	26	107
	0,3	59	21	45	0,12	27	108
	1	25	30	61	0,12	30	104
699807	0,1	121	19	41	0,14	25	100
	0,3	73	23	56	0,13	26	105
	1	24	22	69	0,14	25	102
699809	0,1	125	23	57	0,14	26	104
	0,3	70	20	49	0,10	25	105
	1	33	34	62	0,17	25	107
699811	0,1	123	48	77	0,14	24	106
	0,3	94	20	45	0,13	25	101
	1	66	57	104	0,14	24	107
699813	0,1	95	20	58	0,13	28	104
	0,3	98	22	61	0,17	28	105
	1	49	19	47	0,11	27	106
699815	0,1	93	30	79	0,17	25	105
	0,3	64	30	61	0,12	26	105
	1	24	18	41	0,14	25	106

**Пример 94. Антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, нацеленных на SRB-1, содержащих 2'-сахарные модификации и 5'-GalNAc3 конъюгат**

Олигонуклеотиды, перечисленные в Таблице 89, испытали в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования SRB-1 у мышей.

**Таблица 89**

**Модифицированные ASO, нацеленные на SRB-1**

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM	SEQ ID NO.
35338 2	G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>e</sub>	н.д.	н.д.	28
70098 9	G <sub>ms</sub> C <sub>ms</sub> U <sub>ms</sub> U <sub>ms</sub> C <sub>ms</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> U <sub>ms</sub> C <sub>ms</sub> C <sub>ms</sub> U <sub>ms</sub> U <sub>m</sub>	н.д.	н.д.	51
66690 4	<b>GalNAc<sub>3</sub>-3a-</b> o <sup>•</sup> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>e</sub>	GalNAc <sub>3</sub> - 3a	PO	28
70099 1	<b>GalNAc<sub>3</sub>-7a-o<sup>•</sup></b> G <sub>ms</sub> C <sub>ms</sub> U <sub>ms</sub> U <sub>ms</sub> C <sub>ms</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> U <sub>ms</sub> C <sub>ms</sub> C <sub>ms</sub> U <sub>ms</sub> U <sub>m</sub>	GalNAc <sub>3</sub> - 7a	PO	51

Нижний индекс «m» означает 2'-О-метил-модифицированный нуклеозид. Полная легенда к таблице представлена в Примере 74. Структура GalNAc<sub>3</sub>-3a показана ранее в Примере 39, а структура GalNAc<sub>3</sub>-7a показана ранее в Примере 48.

### Лечение

Исследование выполнили по протоколу, описанному в Примере 93. Результаты представлены ниже в Таблице 90 и демонстрируют, что и 2'-МОЕ, и 2'-ОМе-модифицированные олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc, были значительно более эффективными, чем соответствующие исходные олигонуклеотиды, не содержащие конъюгата. Результаты измерений массы тела, трансаминазы в печени, общего билирубина и АМК демонстрируют, что эти соединения хорошо переносятся.

**Таблица 90**  
**мРНК SRB-1**

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% PBS)
PBS	н.д.	100
353382	5	116
	15	58
	45	27
700989	5	120
	15	92
	45	46
666904	1	98
	3	45
	10	17
700991	1	118
	3	63
	10	14



**Пример 95. Антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, нацеленных на SRB-1, содержащих бициклические нуклеозиды и 5'-GalNAc<sub>3</sub> конъюгат**

Олигонуклеотиды, перечисленные в Таблице 91, испытали в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования SRB-1 у мышей.

Таблица 91

**Модифицированные ASO, нацеленные на SRB-1**

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM	SEQ ID No
440762	T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>ks</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>k</sub>	н.д.	н.д.	22
666905	<b>GalNAc<sub>3</sub>-3a-o'</b> T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>ks</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>k</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -3 <sub>a</sub>	PO	22
699782	<b>GalNAc<sub>3</sub>-7a-o'</b> T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>ks</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>k</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -7 <sub>a</sub>	PO	22
699783	<b>GalNAc<sub>3</sub>-3a-o'</b> T <sub>ls</sub> <sup>m</sup> C <sub>ls</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ls</sub> <sup>m</sup> C <sub>l</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -3 <sub>a</sub>	PO	22
653621	T <sub>ls</sub> <sup>m</sup> C <sub>ls</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ls</sub> <sup>m</sup> C <sub>lo</sub> <b>Ado'</b> -GalNAc <sub>3</sub> -1 <sub>a</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -1 <sub>a</sub>	Ad	23
439879	T <sub>gs</sub> <sup>m</sup> C <sub>gs</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>d</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>gs</sub> <sup>m</sup> C <sub>g</sub>	н.д.	н.д.	22
699789	<b>GalNAc<sub>3</sub>-3a-o'</b> T <sub>gs</sub> <sup>m</sup> C <sub>gs</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>d</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>gs</sub> <sup>m</sup> C <sub>g</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -3 <sub>a</sub>	PO	22

Нижний индекс «g» означает фтор-HNA нуклеозид, нижний индекс «l» означает закрытый нуклеозид, содержащий мостик 2'-O-CH<sub>2</sub>-4'. Другие сокращения представлены в легенде таблицы Примера 74. Структура GalNAc<sub>3</sub>-1<sub>a</sub> показана ранее в Примере 9, структура GalNAc<sub>3</sub>-3<sub>a</sub> показана ранее в Примере 39, а структура GalNAc<sub>3</sub>-7<sub>a</sub> показана ранее в Примере 48.

*Лечение*

Исследование выполнили по протоколу, описанному в Примере 93. Результаты представлены ниже в Таблице 92 и демонстрируют, что олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc и различные бициклические нуклеозидные модификации, были значительно более эффективными, чем исходный олигонуклеотид, не содержащий конъюгата и содержащий бициклические нуклеозидные модификации. Кроме того, олигонуклеотид, содержащий конъюгат GalNAc и фтор-HNA модификации, был существенно более эффективным, чем исходное соединение, не содержащее конъюгата и содержащее фтор-HNA модификации. Результаты измерений массы тела, трансаминазы в печени, общего билирубина и АМК демонстрируют, что эти соединения хорошо переносятся.

Таблица 92

**Уровни мПНК SRB-1, ALT, AST, АМК и общего билирубина, а также массы тела**

ISIS №	Доза (мг/кг)	мПНК SRB-1 (% PBS)
PBS	н.д.	100

440762	1	104
	3	65
	10	35
666905	0,1	105
	0,3	56
	1	18
699782	0,1	93
	0,3	63
	1	15
699783	0,1	105
	0,3	53
	1	12
653621	0,1	109
	0,3	82
	1	27
439879	1	96
	3	77
	10	37
699789	0,1	82
	0,3	69
	1	26

**Пример 96. Связывание белка плазмы антисмысловыми олигонуклеотидами, содержащими конъюгирующую группу GalNAc<sub>3</sub>**

Олигонуклеотиды, перечисленные в Таблице 57, нацеленные на ApoC-III, и олигонуклеотиды в Таблице 93, нацеленные на Apo(a), испытали в анализе ультрафильтрации для оценки связывания белка в плазме.

**Таблица 93**

**Модифицированные олигонуклеотиды, нацеленные на Apo(a)**

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM	SEQ ID No
494372	T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>e</sub>	н.д.	н.д.	53
693401	T <sub>es</sub> G <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>eo</sub> G <sub>eo</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>e</sub>	н.д.	н.д.	53
681251	<b>GalNAc<sub>3</sub>-7a-o'</b> T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>e</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -7 <sub>a</sub>	PO	53
681257	<b>GalNAc<sub>3</sub>-7a-o'</b> T <sub>es</sub> G <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>eo</sub> G <sub>eo</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>e</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -7 <sub>a</sub>	PO	53

Легенда таблицы представлена в Примере 74. Структура GalNAc<sub>3</sub>-7a показана ранее в Примере 48.

Элементы для ультрафильтрации Ultrafree-МС (номинальное ограничение молекулярной массы 30000, слабосвязывающая регенерированная целлюлозная мембрана, Millipore, Бедфорд, штат Массачусетс) предварительно кондиционировали с 300 мкл 0,5% Tween 80 и центрифугировали при 2000 g в течение 10 минут, затем с 300 мкл 300 мкг/мл раствора контрольного олигонуклеотида в H<sub>2</sub>O и центрифугировали при 2000 g в течение 16 минут. Для оценки неспецифического связывания с фильтрами каждого исследуемого олигонуклеотида из Таблиц 57 и 93, применяемых в испытаниях, 300 мкл 250 нг/мл раствора олигонуклеотида в in при pH 7,4 поместили в предварительно кондиционированные фильтры и центрифугировали при 2000 г в течение 16 минут. Нефильтрованные и фильтрованные образцы анализировали твердофазным иммуноферментным анализом для определения концентраций олигонуклеотидов. Для получения средней концентрации для каждого образца применяли три экземпляра. Среднюю концентрацию фильтрованного образца относительно нефильтрованного образца применяли для определения процента олигонуклеотида, прошедшего через фильтр без плазмы (% выделения).

Замороженные образцы цельной плазмы, собранные в КЗ-ЭДТК и полученные от здоровых, не принимающих лекарства людей-добровольцев, яванских макаков и мышей CD-1, приобрели у компании Bioreclamation LLC (Вестбери, штат Нью-Йорк). Исследуемые олигонуклеотиды добавляли к 1,2 мл аликвотам плазмы в двух концентрациях (5 и 150 мкг/мл). Аликвоту (300 мкл) каждого маркированного образца плазмы поместили на предварительно кондиционированный фильтровальный элемент и инкубировали при 37 °C в течение 30 минут, затем сразу выполнили центрифугирование при 2000 g в течение 16 минут. Аликвоты фильтрованных и нефильтрованных маркированных образцов плазмы анализировали твердофазным иммуноферментным анализом для определения концентрации олигонуклеотида в каждом образце. Применили три экземпляра каждой концентрации для определения среднего процента связанного и несвязанного олигонуклеотида в каждом образце. Среднюю концентрацию фильтрованного образца относительно концентрации нефильтрованного образца применили для определения процента олигонуклеотида в плазме, не связанного с белками плазмы (% несвязанного). Окончательные значения несвязанного олигонуклеотида корректировали на неспецифическое связывание путем деления % несвязанного на % выделения для каждого олигонуклеотида. Окончательные значения % связанного олигонуклеотида определили вычитанием окончательных значений % несвязанного из 100. Результаты показаны в Таблице 94 для двух концентраций испытанного олигонуклеотида (5 и 150 мкг/мл) в плазме

каждого вида. Результаты демонстрируют, что конъюгирующие группы GalNAc не оказывают существенного влияния на связывание белка плазмы. Кроме того, олигонуклеотиды, содержащие только PS межнуклеозидные связи и смешанные PO/PS связи, - оба варианта связывают белки плазмы, при этом олигонуклеотиды, содержащие только PS связи, связывают белки плазмы в несколько большей степени, чем олигонуклеотиды, содержащие смешанные PO/PS связи.

Таблица 94

## Процент модифицированного олигонуклеотида, связанного с белками плазмы

ISIS №	Плазма человека		Плазма обезьян		Плазма мышей	
	5 мкг/мл	150 мкг/мл	5 мкг/мл	150 мкг/мл	5 мкг/мл	150 мкг/мл
304801	99,2	98,0	99,8	99,5	98,1	97,2
663083	97,8	90,9	99,3	99,3	96,5	93,0
674450	96,2	97,0	98,6	94,4	94,6	89,3
494372	94,1	89,3	98,9	97,5	97,2	93,6
693401	93,6	89,9	96,7	92,0	94,6	90,2
681251	95,4	93,9	99,1	98,2	97,8	96,1
681257	93,4	90,5	97,6	93,7	95,6	92,7

Пример 97. Модифицированные олигонуклеотиды, нацеленные на TTR, содержащие конъюгирующую группу GalNAc<sub>3</sub>

Олигонуклеотиды, представленные в Таблице 95, содержащие конъюгат GalNAc, предназначены для воздействия на TTR.

Таблица 95

## Модифицированные олигонуклеотиды, нацеленные на TTR

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM	SEQ ID No
666941	<b>GalNAc<sub>3</sub>-3a-o'</b> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>e</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -3	Ad	45
666942	T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> G <sub>eo</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> <b>GalNAc<sub>3</sub>-3a</b>	GalNAc <sub>3</sub> -1	Ad	42
682876	<b>GalNAc<sub>3</sub>-3a-o'</b> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>e</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -3	PO	41
682877	<b>GalNAc<sub>3</sub>-7a-o'</b> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>e</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -7	PO	41
682878	<b>GalNAc<sub>3</sub>-10a-o'</b> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>e</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -10	PO	41
682879	<b>GalNAc<sub>3</sub>-13a-o'</b> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>e</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -13	PO	41

682880	$\text{GalNAc}_3\text{-7a-o'-Ado}$ $T_{es}^m C_{es}$ $T_{es}$ $T_{es}$ $G_{es}$ $G_{ds}$ $T_{ds}$ $T_{ds}$ $A_{ds}^m C_{ds}$ $A_{ds}$ $T_{ds}$ $G_{ds}$ $A_{ds}$ $A_{ds}$ $A_{es}$ $T_{es}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e$	GalNAc <sub>3</sub> -7	A <sub>d</sub>	45
682881	$\text{GalNAc}_3\text{-10a-o'-Ado}$ $T_{es}^m C_{es}$ $T_{es}$ $T_{es}$ $G_{es}$ $G_{ds}$ $T_{ds}$ $T_{ds}$ $A_{ds}^m C_{ds}$ $A_{ds}$ $T_{ds}$ $G_{ds}$ $A_{ds}$ $A_{ds}$ $A_{es}$ $T_{es}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e$	GalNAc <sub>3</sub> -10	A <sub>d</sub>	45
682882	$\text{GalNAc}_3\text{-13a-o'-Ado}$ $T_{es}^m C_{es}$ $T_{es}$ $T_{es}$ $G_{es}$ $G_{ds}$ $T_{ds}$ $T_{ds}$ $A_{ds}^m C_{ds}$ $A_{ds}$ $T_{ds}$ $G_{ds}$ $A_{ds}$ $A_{ds}$ $A_{es}$ $T_{es}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e$	GalNAc <sub>3</sub> -13	A <sub>d</sub>	45
684056	$T_{es}^m C_{es}$ $T_{es}$ $T_{es}$ $G_{es}$ $G_{ds}$ $T_{ds}$ $T_{ds}$ $A_{ds}^m C_{ds}$ $A_{ds}$ $T_{ds}$ $G_{ds}$ $A_{ds}$ $A_{ds}$ $A_{es}$ $T_{es}^m C_{es}^m C_{es}^m C_{eo}$ $\text{Ado}'\text{-GalNAc}_3\text{-19a}$	GalNAc <sub>3</sub> -19	A <sub>d</sub>	42

Легенда для Таблицы 95 представлена в Примере 74. Структура GalNAc<sub>3</sub>-1 показана в Примере 9. Структура GalNAc<sub>3</sub>-3<sub>a</sub> показана в Примере 39. Структура GalNAc<sub>3</sub>-7<sub>a</sub> показана в Примере 48. Структура GalNAc<sub>3</sub>-10<sub>a</sub> показана в Примере 46. Структура GalNAc<sub>3</sub>-13<sub>a</sub> показана в Примере 62. Структура GalNAc<sub>3</sub>-19<sub>a</sub> показана в Примере 70.

### Пример 98. Оценка провоспалительного действия олигонуклеотидов, содержащих конъюгат GalNAc, в анализе hPMBC

Олигонуклеотиды, перечисленные в Таблице 96, исследовали на провоспалительное действие в анализе hPMBC, описанном в Примерах 23 и 24 (см. Таблицы 17, 70, 82 и 95, где представлено описание олигонуклеотидов). ISIS 353512 обладает высоким ответом, и его применяли в качестве положительного контроля, а другие олигонуклеотиды описаны в Таблицах 70, 82 и 95. Результаты, представленные в Таблице 96, получены с применением крови, полученной от одного донора-добровольца. Результаты демонстрируют, что олигонуклеотиды, содержащие смешанные PO/PS межнуклеозидные связи, вызывают значительно более слабые провоспалительные реакции, по сравнению с теми же олигонуклеотидами, содержащими только PS связи. Кроме того, в этом анализе конъюгирующая группа GalNAc не оказывает существенного влияния.

Таблица 96

ISIS №	E <sub>max</sub> /EC <sub>50</sub>	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	Связи	CM
353512	3630	н.д.	PS	н.д.
420915	802	н.д.	PS	н.д.
682881	1311	GalNAc <sub>3</sub> -10	PS	A <sub>d</sub>
682888	0,26	GalNAc <sub>3</sub> -10	PO/PS	A <sub>d</sub>
684057	1,03	GalNAc <sub>3</sub> -19	PO/PS	A <sub>d</sub>

### Пример 99. Связывающие аффинности олигонуклеотидов, содержащих конъюгат GalNAc, в отношении асиалогликопротеинового рецептора

Связывающие аффинности олигонуклеотидов, перечисленных в Таблице 97 (см. Таблицу 63, в которой представлено описание олигонуклеотидов), в отношении асиалогликопротеинового рецептора испытали в анализе конкурентного связывания рецепторов. Конкурирующий лиганд,  $\alpha$ 1-кислый гликопротеин (AGP), инкубировали в 50 мМ ацетатно-натриевом буфере (pH 5) с 1 ед. нейраминидазы-агарозы в течение 16 часов при 37 °С, а > 90% дезаилирование подтвердили анализом с сиаловой кислотой или эксклюзионной хроматографией (SEC). Для йодирования АГФ применили монохлорид йода по способу, описанному авторами Atsma et al. (см. J Lipid Res. январь 1991 г.; 32(1):173-81.) В этом способе дезаилированный  $\alpha$ 1-кислый гликопротеин (de-AGP) добавляли к 10 мМ хлориду йода, Na<sup>125</sup>I и 1 М глицина в 0,25 М NaOH. После инкубации в течение 10 минут при комнатной температуре, <sup>125</sup>I -меченный de-AGP отделили от свободного <sup>125</sup>I двукратным концентрированием смеси с применением спин-колонки с номинальным отсечением по молекулярной массе 3 кД. Белок испытали на эффективность мечения и чистоту на системе ВЭЖХ, оснащенной колонкой Agilent SEC-3 (7,8x300 мм) и счетчиком  $\beta$ -RAM. Конкуретные исследования с применением <sup>125</sup>I-меченного de-AGP и ASO, содержащих различные GalNAc-кластеры, выполнили следующим образом. Человеческие клетки HepG2 (10<sup>6</sup> клеток/мл) поместили на 6-луночные планшеты в 2 мл соответствующей питательной среды. Применяли среду MEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 2 мМ L-глутамин и 10 мМ HEPES. Клетки выращивали в течение 16-20 часов при 37 °С с 5% и 10% CO<sub>2</sub>, соответственно. Перед экспериментом клетки промыли средой без FBS. Клетки выращивали в течение 30 минут при 37 °С с 1 мл конкурентной смеси, содержащей соответствующую питательную среду с 2% FBS, 10<sup>-8</sup> М <sup>125</sup>I-меченным de-AGP и ASO, содержащим GalNAc-кластер в концентрациях в диапазоне от 10<sup>-11</sup> до 10<sup>-5</sup> М. Неспецифическое связывание определили в присутствии 10<sup>-2</sup> М GalNAc сахара. Клетки дважды промыли средой без FBS для удаления несвязанного <sup>125</sup>I-меченного de-AGP и конкурирующего GalNAc ASO. Клетки лизировали с применением буфера RLT производства компании Qiagen, содержащего 1%  $\beta$ -меркаптоэтанола. Лизаты перенесли в круглодонные аналитические пробирки после быстрого 10-минутного цикла замораживания/оттаивания, и анализировали на  $\gamma$ -счетчике. Неспецифическое связывание вычли, а затем разделили импульсы белка <sup>125</sup>I на значение импульсов при самой низкой концентрации GalNAc-ASO. Кривые ингибирования построили по уравнению моносайтового конкурентного связывания, применив алгоритм нелинейной регрессии для расчета связывающей аффинности (K<sub>D</sub>).

Результаты в Таблице 97 были получены в экспериментах, выполненных в пять разных дней. Результаты для олигонуклеотидов, отмеченных верхним индексом «а»,

представляют собой средние значения экспериментов, выполненных в два разных дня. Результаты демонстрируют, что олигонуклеотиды, содержащие конъюгирующую группу GalNAc на 5'-конце, связывают асиалогликопротеиновый рецептор человеческих клеток HepG2 с аффинностью, которая в 1,5-16 раз больше, чем для олигонуклеотидов, содержащих конъюгирующую группу GalNAc на 3'-конце.

Таблица 97

## Результаты анализа связывания асиалогликопротеинового рецептора

ISIS №	Конъюгат GalNAc	Конец олигонуклеотида, к которому присоединен конъюгат GalNAc	K <sub>D</sub> (нМ)
661161 <sup>a</sup>	GalNAc <sub>3</sub> -3	5'	3,7
666881 <sup>a</sup>	GalNAc <sub>3</sub> -10	5'	7,6
666981	GalNAc <sub>3</sub> -7	5'	6,0
670061	GalNAc <sub>3</sub> -13	5'	7,4
655861 <sup>a</sup>	GalNAc <sub>3</sub> -1	3'	11,6
677841 <sup>a</sup>	GalNAc <sub>3</sub> -19	3'	60,8

**Пример 100. Антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, содержащих конъюгирующую группу GalNAc, нацеленных на Apo(a), *in vivo***

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже в Таблице 98а, испытали в исследовании однократной дозы на продолжительность действия у мышей.

Таблица 98а

## Модифицированные ASO, нацеленные на Apo(a)

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM	SEQ ID NO.
68125 1	<b>GalNAc<sub>3</sub>-7<sub>a</sub></b> -o' T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>e</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -7 <sub>a</sub>	PO	53
68125 7	<b>GalNAc<sub>3</sub>-7<sub>a</sub></b> -o' T <sub>es</sub> G <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>eo</sub> G <sub>eo</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>e</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -7 <sub>a</sub>	PO	53

Структура GalNAc<sub>3</sub>-7<sub>a</sub> показана в Примере 48.

*Лечение*

Каждой самке трансгенных мышей, экспрессирующих человеческий Apo(a), один раз в неделю, в целом 6 доз, вводили подкожную инъекцию олигонуклеотида и дозы, перечисленной в Таблице 98b, или PBS. Каждая экспериментальная группа состояла из 3

животных. Образцы крови брали за день до введения дозы для определения исходных уровней белка Apo(a) в плазме, а также через 72 часа, 1 неделю и 2 недели после введения первой дозы. Дополнительные пробы крови брали через 3 недели, 4 недели, 5 недель и 6 недель после введения первой дозы. Уровни белка Apo(a) в плазме измеряли при помощи твердофазного иммуноферментного анализа. Результаты в Таблице 98b представлены как средний процент от уровней белка Apo(a) в плазме для каждой экспериментальной группы, нормализованных к исходным уровням (% BL). Результаты показывают, что олигонуклеотиды, содержащие конъюгирующую группу GalNAc, демонстрируют эффективное снижение экспрессии Apo(a). Этот мощный эффект наблюдали для олигонуклеотида, содержащего только PS межнуклеозидные связи, и для олигонуклеотида, содержащего смешанные PO и PS связи.

**Таблица 98b**

**Уровни белка Apo(a) в плазме**

ISIS №	Доза (мг/кг)	Apo(a) через 72 часа (% BL)	Apo(a) через 1 неделю (% BL)	Apo(a) через 3 недели (% BL)
PBS	н.д.	116	104	107
681251	0,3	97	108	93
	1,0	85	77	57
	3,0	54	49	11
	10,0	23	15	4
681257	0,3	114	138	104
	1,0	91	98	54
	3,0	69	40	6
	10,0	30	21	4

**Пример 101. Антисмысловое ингибирование олигонуклеотидами, содержащими кластер GalNAc, связанный через стабильный фрагмент**

Олигонуклеотиды, перечисленные в Таблице 99, испытали на ингибирование экспрессии мышиноного APOC-III *in vivo*. Мышам C57Bl/6 ввели однократную подкожную инъекцию олигонуклеотида, перечисленного в Таблице 99, или PBS. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Каждой мышце, обработанной соединением ISIS 440670, ввели дозу 2, 6, 20 или 60 мг/кг. Каждой мышце, обработанной соединением ISIS 680772 или 696847, ввели 0,6, 2, 6 или 20 мг/кг. Конъюгирующая группа GalNAc в ISIS 696847 связана через стабильный фрагмент, тиофосфатную связь, вместо легко расщепляемого фосфодизэфир-содержащей связи. Животных умертвили через 72 часа после введения дозы. Уровни мРНК APOC-III в печени измерили при помощи ПЦР в



реальном времени. Уровни мРНК АРОС-III нормализовали к уровням мРНК циклофилина по стандартным протоколам. Результаты представлены в Таблице 99 как средний процент уровней мРНК АРОС-III для каждой экспериментальной группы, по сравнению с контрольной группой, обработанной солевым раствором. Результаты демонстрируют, что олигонуклеотиды, содержащие конъюгирующую группу GalNAc, были существенно более эффективными, чем олигонуклеотид, не содержащий конъюгирующую группу. Кроме того, олигонуклеотид, содержащий конъюгирующую группу GalNAc, связанную с олигонуклеотидом через расщепляемый фрагмент (ISIS 680772), был еще более эффективным, чем олигонуклеотид, содержащий конъюгирующую группу GalNAc, связанную с олигонуклеотидом через стабильный фрагмент (ISIS 696847).

Таблица 99

## Модифицированные олигонуклеотиды, нацеленные на мышинный АРОС-III

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	С М	Доза (мг/кг)	мРНК АРОС-III (% PBS)	SEQ ID NO.
440670	${}^mC_{es}A_{es}G_{es}{}^mC_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}$ $G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^mC_{es}A_{es}G_{es}{}^mC_{es}A_e$	н.д	2	92	47
			6	86	
			20	59	
			60	37	
680772	<b>GalNAc<sub>3</sub>-7<sub>a-o</sub></b> - ${}^mC_{es}A_{es}G_{es}{}^mC_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^mC_{es}A_{es}G_{es}{}^mC_{es}A_e$	PO	0,6	79	47
			2	58	
			6	31	
			20	13	
696847	<b>GalNAc<sub>3</sub>-7<sub>a-s</sub></b> - ${}^mC_{es}A_{es}G_{es}{}^mC_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^mC_{es}A_{es}G_{es}{}^mC_{es}A_e$	н.д (PS )	0,6	83	47
			2	73	
			6	40	
			20	28	

Структура GalNAc<sub>3</sub>-7<sub>a</sub> показана в Примере 48.

### Пример 102. Распределение в печени антисмысловых олигонуклеотидов, содержащих конъюгат GalNAc

Оценили распределение в печени ISIS 353382 (см. Таблицу 23), который не содержит конъюгата GalNAc, и ISIS 655861 (см. Таблицу 23), который содержит конъюгат GalNAc. Самцам мышей balb/c ввели однократную подкожную инъекцию ISIS 353382 или 655861 в дозе, перечисленной в Таблице 100. Каждая экспериментальная группа состояла из 3 животных, за исключением группы с дозой 18 мг/кг для ISIS 655861, которая состояла из 2 животных. Животных умертвили через 48 часов после введения дозы для определения распределения олигонуклеотидов в печени. Для измерения количества молекул

антисмыслового олигонуклеотида на клетку, метку трис-бипиридина рутения (II) (MSD TAG, Meso Scale Discovery) конъюгировали с олигонуклеотидным образцом, применяемым для обнаружения антисмысловых олигонуклеотидов. Результаты, представленные в Таблице 100, представляют собой средние концентрации олигонуклеотида для каждой экспериментальной группы в единицах измерения миллионов молекул олигонуклеотида на клетку. Результаты демонстрируют, что при равных дозах олигонуклеотид, содержащий конъюгат GalNAc, содержался в более высоких концентрациях в целом в печени и в гепатоцитах, чем олигонуклеотид, не содержащий конъюгата GalNAc. Кроме того, олигонуклеотид, содержащий конъюгат GalNAc, содержался в более низких концентрациях в непаренхиматозных клетках печени, чем олигонуклеотид, не содержащий конъюгата GalNAc. И тогда как концентрации ISIS 655861 в гепатоцитах и непаренхиматозных клетках печени были одинаковыми в расчете на одну клетку, содержание гепатоцитов в печени составляет около 80% по объему. Следовательно, основная часть олигонуклеотида ISIS 655861, содержащегося в печени, находилась в гепатоцитах, тогда как основная часть олигонуклеотида ISIS 353382, содержащегося в печени, находилась в непаренхиматозных клетках печени.

Таблица 100

ISIS №	Доза (мг/кг)	Концентрация в печени в целом (молекул*10 <sup>60</sup> на клетку)	Концентрация в гепатоцитах (молекул*10 <sup>60</sup> на клетку)	Концентрация в непаренхиматозных клетках печени (молекул*10 <sup>60</sup> на клетку)
353382	3	9,7	1,2	37,2
	10	17,3	4,5	34,0
	20	23,6	6,6	65,6
	30	29,1	11,7	80,0
	60	73,4	14,8	98,0
	90	89,6	18,5	119,9
655861	0.5	2,6	2,9	3,2
	1	6,2	7,0	8,8
	3	19,1	25,1	28,5
	6	44,1	48,7	55,0
	18	76,6	82,3	77,1

**Пример 103. Продолжительность действия *in vivo* олигонуклеотидов, нацеленных на АРОС-III, содержащих конъюгат GalNAc**

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже в Таблице 101, испытали в исследовании однократной дозы на продолжительность действия у мышей.

Таблица 101

## Модифицированные ASO, нацеленные на АРОС-III

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM	SEQ ID NO.
30480 1	A <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> T <sub>es</sub> A <sub>es</sub> T <sub>e</sub>	н.д.	н.д.	20
66308 4	<b>GalNAc3-3a-0'-Ado</b> A <sub>es</sub> G <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> T <sub>es</sub> A <sub>es</sub> T <sub>e</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -3a	A <sub>d</sub>	36
67924 1	A <sub>es</sub> G <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> T <sub>es</sub> A <sub>es</sub> T <sub>eo</sub> <b>Ado'-GalNAc3-19a</b>	GalNAc <sub>3</sub> - 19a	A <sub>d</sub>	21

Структура GalNAc<sub>3</sub>-3a показана в примере 39, а GalNAc<sub>3</sub>-19a показана в Примере 70.

*Лечение*

Самкам трансгенных мышей, экспрессирующим человеческий АРОС-III, ввели однократную подкожную инъекцию олигонуклеотида, перечисленного в Таблице 101, или PBS. Каждая экспериментальная группа состояла из 3 животных. Образцы крови из брали до введения дозы для определения исходных показателей и на 3-й, 7-й, 14-й, 21-й, 28-й, 35-й и 42-й день после введения дозы. Уровни триглицеридов и белка АРОС-III в плазме измеряли так, как описано в Примере 20. Результаты в Таблице 102 представлены как средний процент уровней триглицеридов и АРОС-III в плазме для каждой экспериментальной группы, нормализованных к исходным уровням. Сравнение результатов в Таблице 58 примера 79 с результатами, представленными ниже в Таблице 102, демонстрирует, что олигонуклеотиды, содержащие смесь фосфодиэфирных и тиофосфатных межнуклеозидных связей, обладают увеличенной продолжительностью действия, чем эквивалентные олигонуклеотиды, содержащие только тиофосфатные межнуклеозидные связи.

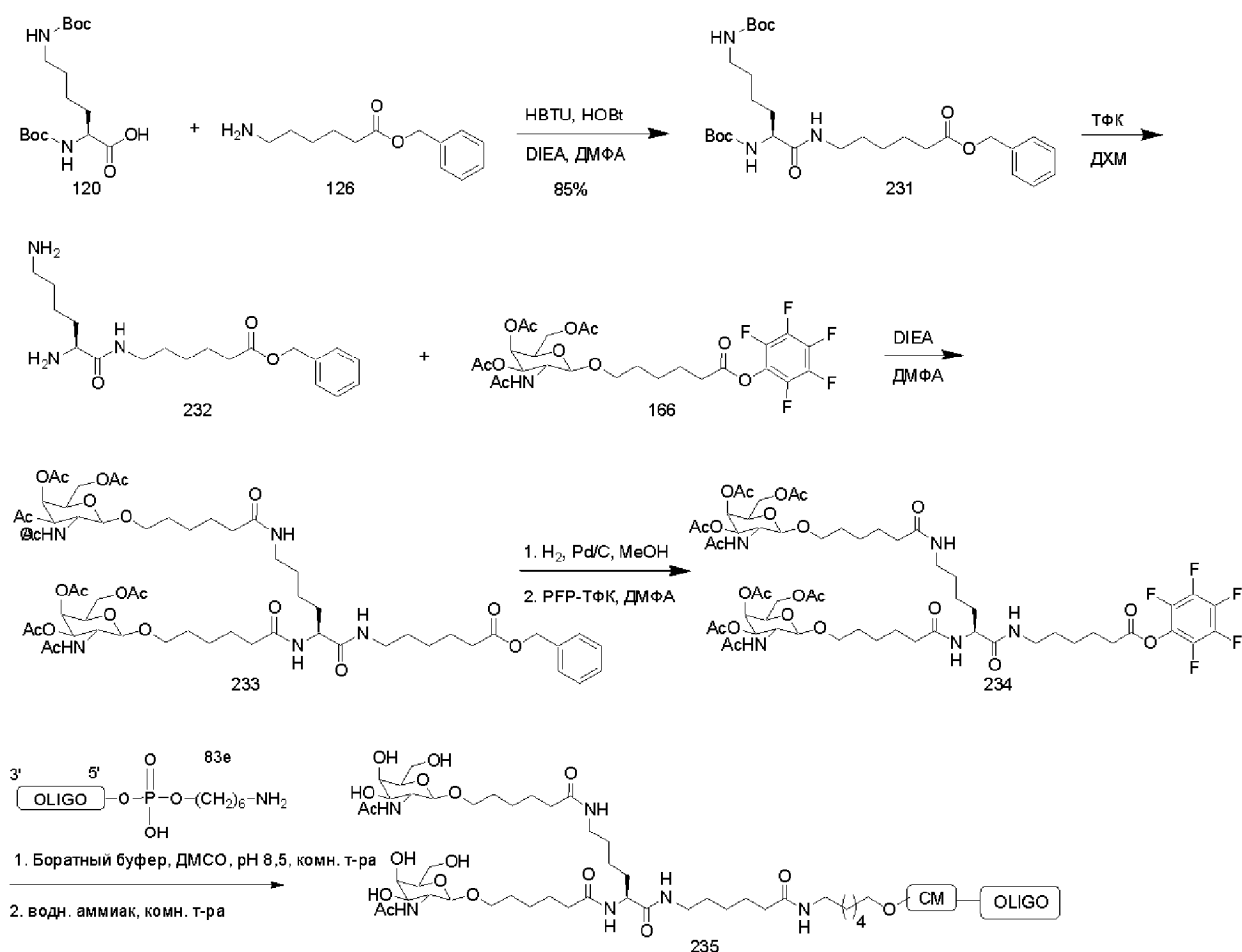
Таблица 102

## Уровни триглицеридов и белка АРОС-III в плазме трансгенных мышей

ISIS №	Доза (мг/кг)	Временные точки (дни после)	Триглицериды (% от исходного значения)	Белок АРОС-III (% от)	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM
--------	--------------	-----------------------------	--	-----------------------	-----------------------------	----

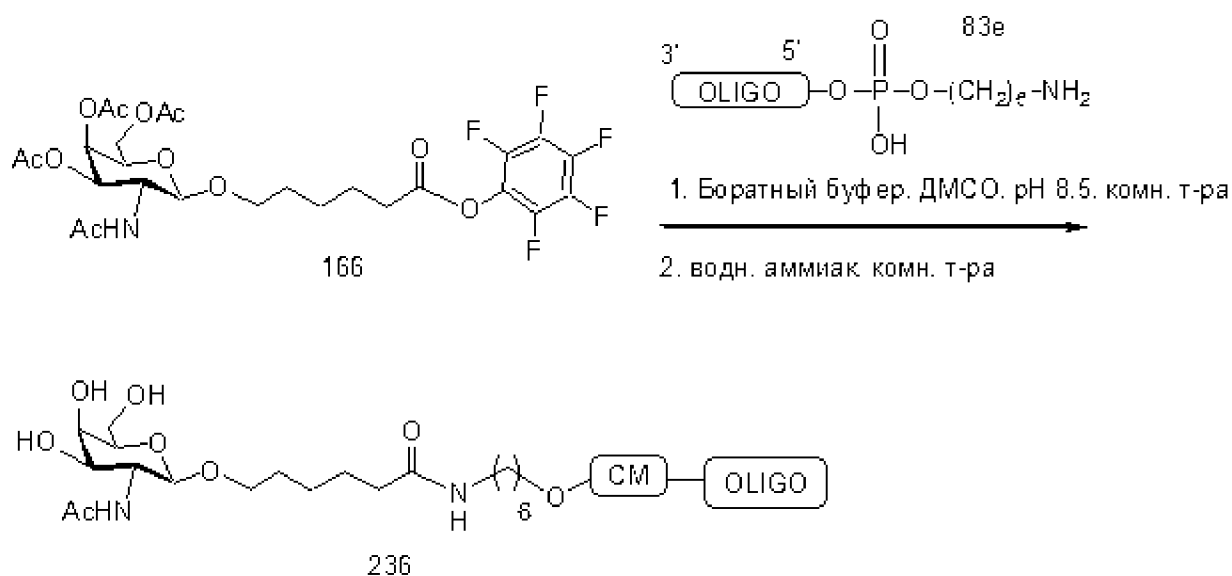
		введения дозы)		исходного значения)		
PBS	н.д.	3	96	101	н.д.	н.д.
		7	88	98		
		14	91	103		
		21	69	92		
		28	83	81		
		35	65	86		
		42	72	88		
304801	30	3	42	46	н.д.	н.д.
		7	42	51		
		14	59	69		
		21	67	81		
		28	79	76		
		35	72	95		
		42	82	92		
663084	10	3	35	28	GalNAc <sub>3</sub> - 3a	Ad
		7	23	24		
		14	23	26		
		21	23	29		
		28	30	22		
		35	32	36		
		42	37	47		
679241	10	3	38	30	GalNAc <sub>3</sub> - 19a	Ad
		7	31	28		
		14	30	22		
		21	36	34		
		28	48	34		
		35	50	45		
		42	72	64		

### Пример 104. Синтез олигонуклеотидов, содержащих конъюгат 5'-GalNAc<sub>2</sub>



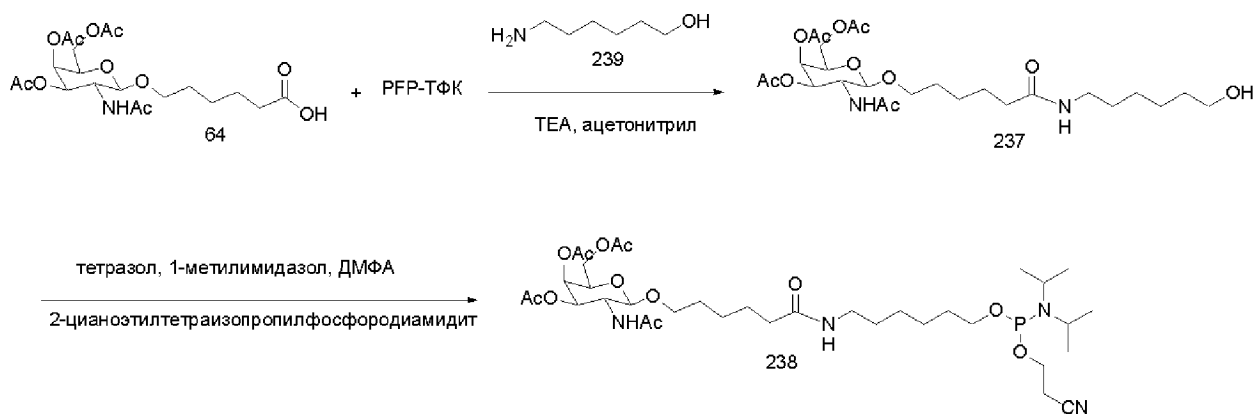
Соединение 120 имеется в продаже, а синтез соединения 126 описан в Примере 49. Соединение 120 (1 г, 2,89 ммоль), HBTU (0,39 г, 2,89 ммоль) и HOBT (1,64 г, 4,33 ммоль) растворили в ДМФА (10 мл) и добавили *N,N*-диизопропилэтиламин (1,75 мл, 10,1 ммоль). Примерно через 5 минут в реакционную смесь добавили бензиловый эфир аминокснковой кислоты (1,36 г, 3,46 ммоль). Через 3 часа реакционную смесь вылили в 100 мл 1 М раствора NaHSO<sub>4</sub> и экстрагировали 2 x 50 мл этилацетата. Органические слои объединили и промыли 3 x 40 мл насыщенного раствора NaHCO<sub>3</sub> и 2 x насыщенным солевым раствором, высушили при помощи Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, отфильтровали и концентрировали. Продукт очистили силикагелевой колоночной хроматографией (ДХМ:ЕА:гексаны, 1:1:1) с получением соединения 231. Данные ЖХМС и ЯМР согласовались со структурой. Соединение 231 (1,34 г, 2,438 ммоль) растворили в дихлорметане (10 мл) и добавили трифторуксусную кислоту (10 мл). После перемешивания при комнатной температуре в течение 2 часов, реакционную смесь концентрировали под пониженным давлением и выпарили вместе с толуолом (3 x 10 мл). Остаток высушили под пониженным давлением с получением соединения 232 в виде трифторацетатной соли. Синтез соединения 166 описан в Примере 54. Соединение 166 (3,39



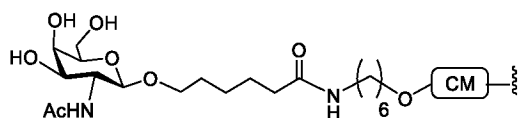


Синтез соединения 166 описан в Примере 54. Олигонуклеотид 236 получили по общему способу, описанному в Примере 46.

Альтернативно, олигонуклеотид 236 синтезировали по схеме, изображенной ниже, а соединение 238 применяли для получения олигонуклеотида 236 по способам, описанным в Примере 10.



Кластерная часть GalNAc<sub>1</sub> (GalNAc<sub>1</sub>-25<sub>a</sub>) конъюгирующей группы GalNAc<sub>1</sub>-25 может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом, содержащемся в олигонуклеотиде, с получением различных конъюгирующих групп. Структура GalNAc<sub>1</sub>-25 (GalNAc<sub>1</sub>-25<sub>a</sub>-CM) представлена ниже:



**Пример 106. Антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, нацеленных на SRB-1, содержащих конъюгат 5'-GalNAc<sub>2</sub> или 5'-GalNAc<sub>3</sub>**

Олигонуклеотиды, перечисленные в Таблицах 103 и 104, испытали в дозозависимых исследованиях антисмыслового ингибирования SRB-1 у мышей.

*Лечение*

Шестинедельным самцам мышей C57BL/6 (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) ввели однократную подкожную инъекцию 2, 7 или 20 мг/кг ISIS № 440762; или 0,2, 0,6, 2, 6 или 20 мг/кг ISIS № 686221, 686222 или 708561; или солевого раствора. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей умертвили через 72 часа после последнего введения. Уровни мРНК SRB-1 в печени измерили при помощи ПЦР в реальном времени. Уровни мРНК SRB-1 нормализовали к уровням мРНК циклофилина по стандартным протоколам. Антисмысловые олигонуклеотиды снижают уровни мРНК SRB-1 дозозависимым образом, а результаты ED<sub>50</sub> представлены в Таблицах 103 и 104. Хотя в предыдущих исследованиях показано, что тривалентные GalNAc-конъюгированные олигонуклеотиды существенно более эффективны, чем двухвалентные GalNAc-конъюгированные олигонуклеотиды, которые, в свою очередь, существенно более эффективны, чем одновалентные GalNAc-конъюгированные олигонуклеотиды (см., например, Khorev et al., *Bioorg. & Med. Chem.*, том 16, 5216-5231 (2008)), обработка антисмысловыми олигонуклеотидами, содержащими одновалентные, двухвалентные и тривалентные кластеры GalNAc, приводит к снижению уровней мРНК SRB-1 с одинаковой эффективностью, как показано в Таблицах 103 и 104.

**Таблица 103**

**Модифицированные олигонуклеотиды, нацеленные на SRB-1**

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc	ED <sub>50</sub> (мг/кг)	SEQ ID No
44076 2	T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>ks</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>k</sub>	н.д.	4,7	22
68622 1	<b>GalNAc<sub>2</sub>-24a-o'-Ado</b> T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>ks</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>k</sub>	GalNAc <sub>2</sub> -24a	0,39	26
68622 2	<b>GalNAc<sub>3</sub>-13a-o'-Ado</b> T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>ks</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>k</sub>	GalNAc <sub>3</sub> -13a	0,41	26

Легенда к таблице представлена в Примере 93. Структура GalNAc<sub>3</sub>-13a показана в Примере 62, а структура GalNAc<sub>2</sub>-24a показана в Примере 104.



Таблица 104

## Модифицированные олигонуклеотиды, нацеленные на SRB-1

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc	ED <sub>50</sub> (мг/кг)	SEQ ID No
44076 2	T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>ks</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>k</sub>	н.д.	5	22
70856 1	<b>GalNAc<sub>1</sub>-25<sub>a</sub>-o'</b> T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>ks</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>k</sub>	GalNAc <sub>1</sub> -25 <sub>a</sub>	0,4	22

Легенда к таблице представлена в Примере 93. Структура GalNAc<sub>1</sub>-25a показана в Примере 105.

Оценили также концентрации олигонуклеотидов, представленных в Таблицах 103 и 104, в печени, применив способы, описанные в Примере 75. Результаты, показанные ниже в Таблицах 104a и 104b, представляют собой средние значения общего содержания антисмысловых олигонуклеотидов в тканях для каждой экспериментальной группы, измеренные по УФ, в единицах измерения мкг олигонуклеотида на грамм ткани печени. Результаты демонстрируют, что олигонуклеотиды, содержащие конъюгирующую группу GalNAc, накапливаются в печени в существенно более высоких количествах, чем при той же дозе олигонуклеотида, не содержащего конъюгирующую группу GalNAc. Кроме того, антисмысловые олигонуклеотиды, содержащие один, два или три лиганда GalNAc в своих соответствующих группах конъюгата, накапливаются в печени в равных количествах. Этот результат является неожиданным с учетом данных, представленных выше в литературном источнике Khorev et al., и он согласуется с данными активности, представленными выше в Таблицах 103 и 104.

Таблица 104a

Концентрации в печени олигонуклеотидов, содержащих конъюгирующую группу GalNAc<sub>2</sub> или GalNAc<sub>3</sub>

ISIS №	Доза (мг/кг)	[Антисмысловый олигонуклеотид] (мкг/г)	Кластер GalNAc	CM
440762	2	2,1	н.д.	н.д.
	7	13,1		
	20	31,1		
686221	0,2	0,9	GalNAc <sub>2</sub> -24 <sub>a</sub>	A <sub>d</sub>
	0,6	2,7		
	2	12,0		
	6	26,5		
686222	0,2	0,5	GalNAc <sub>3</sub> -13 <sub>a</sub>	A <sub>d</sub>

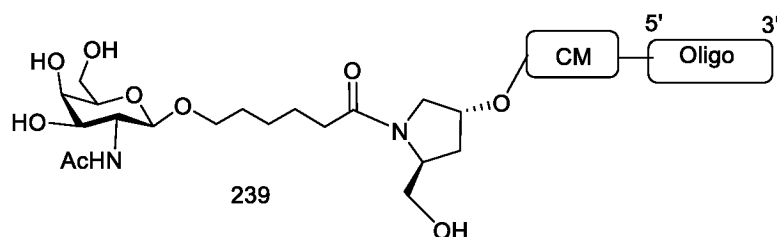
	0,6	1,6		
	2	11,6		
	6	19,8		

Таблица 104b

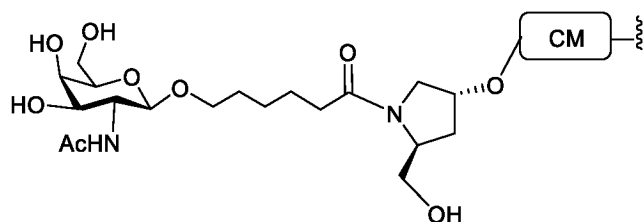
**Концентрации в печени олигонуклеотидов, содержащих конъюгирующую группу GalNAc<sub>1</sub>**

ISIS №	Доза (мг/кг)	[Антисмысловый олигонуклеотид] (мкг/г)	Кластер GalNAc	CM
440762	2	2,3	н.д.	н.д.
	7	8,9		
	20	23,7		
708561	0,2	0,4	GalNAc <sub>1</sub> -25 <sub>a</sub>	PO
	0,6	1,1		
	2	5,9		
	6	23,7		
	20	53,9		

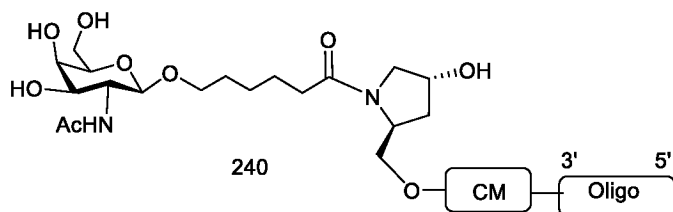
**Пример 107. Синтез олигонуклеотидов, содержащих конъюгат GalNAc<sub>1</sub>-26 или GalNAc<sub>1</sub>-27**



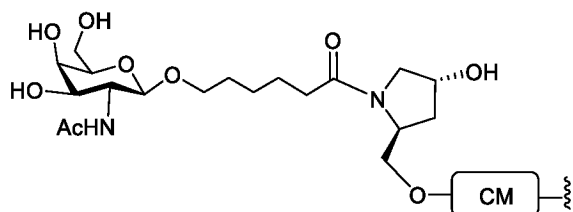
Олигонуклеотид 239 синтезировали связыванием соединения 47 (см. Пример 15) с кислотой 64 (см. Пример 32), применяя HBTU и DIEA в ДМФА. Полученное амид-содержащее соединение тиофосфорилировали, затем присоединили к 5'-концу олигонуклеотида по способам, описанным в Примере 10. Кластерная часть GalNAc<sub>1</sub> (GalNAc<sub>1</sub>-26<sub>a</sub>) конъюгирующей группы GalNAc<sub>1</sub>-26 может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом, содержащимся в олигонуклеотиде, с получением различных конъюгирующих групп. Структура GalNAc<sub>1</sub>-26 (GalNAc<sub>1</sub>-26<sub>a</sub>-CM) представлена ниже:



Для присоединения конъюгирующие группы GalNAc<sub>1</sub> к 3'-концу олигонуклеотида амид, образованный по реакции соединений 47 и 64, присоединили к твердой подложке по способам, описанным в Примере 7. Затем выполнили синтез олигонуклеотида по способам, описанным в Примере 9, с получением олигонуклеотида 240.



Кластерная часть GalNAc<sub>1</sub> (GalNAc<sub>1</sub>-27<sub>a</sub>) конъюгирующей группы GalNAc<sub>1</sub>-27 может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом, содержащемся в олигонуклеотиде, с получением различных конъюгирующих групп. Структура GalNAc<sub>1</sub>-27 (GalNAc<sub>1</sub>-27<sub>a</sub>-CM) представлена ниже:



### Пример 108. Антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, содержащих конъюгирующую группу GalNAc, нацеленных на Apo(a), *in vivo*

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже в Таблице 105, испытали в исследовании однократной дозы на мышах.

Таблица 105

#### Модифицированные ASO, нацеленные на Apo(a)

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc <sub>3</sub>	CM	SEQ ID NO.
49437 2	T <sub>es</sub> G <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> T <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>es</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> G <sub>ds<sup>m</sup>C<sub>ds</sub> T<sub>ds</sub>T<sub>es</sub>G<sub>es</sub>T<sub>es</sub>T<sub>es</sub><sup>m</sup>C<sub>e</sub></sub>	н.д.	н.д.	53

68125 1	<b>GalNAc3-7a-o'</b> <sup>T<sub>es</sub>G<sub>es</sub><sup>m</sup>C<sub>es</sub>T<sub>es</sub><sup>m</sup>C<sub>es</sub><sup>m</sup>C<sub>ds</sub>G<sub>ds</sub>T<sub>ds</sub>T<sub>ds</sub>G<sub>ds</sub>G<sub>ds</sub> T<sub>ds</sub>G<sub>ds</sub><sup>m</sup>C<sub>ds</sub>T<sub>ds</sub>T<sub>es</sub>G<sub>es</sub>T<sub>es</sub>T<sub>es</sub><sup>m</sup>C<sub>e</sub></sup>	GalNAc3-7a	PO	53
68125 5	<b>GalNAc3-3a-o'</b> <sup>T<sub>es</sub>G<sub>eo</sub><sup>m</sup>C<sub>eo</sub>T<sub>eo</sub><sup>m</sup>C<sub>eo</sub><sup>m</sup>C<sub>ds</sub>G<sub>ds</sub>T<sub>ds</sub>T<sub>ds</sub>G<sub>ds</sub>G<sub>ds</sub> T<sub>ds</sub>G<sub>ds</sub><sup>m</sup>C<sub>ds</sub>T<sub>ds</sub>T<sub>eo</sub>G<sub>eo</sub>T<sub>es</sub>T<sub>es</sub><sup>m</sup>C<sub>e</sub></sup>	GalNAc3-3a	PO	53
68125 6	<b>GalNAc3-10a-o'</b> <sup>T<sub>es</sub>G<sub>eo</sub><sup>m</sup>C<sub>eo</sub>T<sub>eo</sub><sup>m</sup>C<sub>eo</sub><sup>m</sup>C<sub>ds</sub>G<sub>ds</sub>T<sub>ds</sub>T<sub>ds</sub>G<sub>ds</sub>G<sub>ds</sub> T<sub>ds</sub>G<sub>ds</sub><sup>m</sup>C<sub>ds</sub>T<sub>ds</sub>T<sub>eo</sub>G<sub>eo</sub>T<sub>es</sub>T<sub>es</sub><sup>m</sup>C<sub>e</sub></sup>	GalNAc3-10a	PO	53
68125 7	<b>GalNAc3-7a-o'</b> <sup>T<sub>es</sub>G<sub>eo</sub><sup>m</sup>C<sub>eo</sub>T<sub>eo</sub><sup>m</sup>C<sub>eo</sub><sup>m</sup>C<sub>ds</sub>G<sub>ds</sub>T<sub>ds</sub>T<sub>ds</sub>G<sub>ds</sub>G<sub>ds</sub> T<sub>ds</sub>G<sub>ds</sub><sup>m</sup>C<sub>ds</sub>T<sub>ds</sub>T<sub>eo</sub>G<sub>eo</sub>T<sub>es</sub>T<sub>es</sub><sup>m</sup>C<sub>e</sub></sup>	GalNAc3-7a	PO	53
68125 8	<b>GalNAc3-13a-o'</b> <sup>T<sub>es</sub>G<sub>eo</sub><sup>m</sup>C<sub>eo</sub>T<sub>eo</sub><sup>m</sup>C<sub>eo</sub><sup>m</sup>C<sub>ds</sub>G<sub>ds</sub>T<sub>ds</sub>T<sub>ds</sub>G<sub>ds</sub>G<sub>ds</sub> T<sub>ds</sub>G<sub>ds</sub><sup>m</sup>C<sub>ds</sub>T<sub>ds</sub>T<sub>eo</sub>G<sub>eo</sub>T<sub>es</sub>T<sub>es</sub><sup>m</sup>C<sub>e</sub></sup>	GalNAc3-13a	PO	53
68126 0	<sup>T<sub>es</sub>G<sub>eo</sub><sup>m</sup>C<sub>eo</sub>T<sub>eo</sub><sup>m</sup>C<sub>eo</sub><sup>m</sup>C<sub>ds</sub>G<sub>ds</sub>T<sub>ds</sub>T<sub>ds</sub>G<sub>ds</sub>G<sub>ds</sub> T<sub>ds</sub>G<sub>ds</sub><sup>m</sup>C<sub>ds</sub>T<sub>ds</sub>T<sub>eo</sub>G<sub>eo</sub>T<sub>es</sub>T<sub>es</sub><sup>m</sup>C<sub>e</sub></sup> <b>Ado'-GalNAc3-19</b>	GalNAc3-19a	Ad	52

Структура GalNAc3-7a показана в Примере 48.

### Лечение

Самцам трансгенных мышей, экспрессирующим человеческий Apo(a), ввели однократную подкожную инъекцию олигонуклеотида и дозы, перечисленных в Таблице 106, или PBS. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Образцы крови брали за день до введения дозы для определения исходных уровней белка Apo(a) в плазме, а также через 1 неделю после введения первой дозы. Образцы крови брали дополнительно еженедельно в течение около 8 недель. Уровни белка Apo(a) в плазме измеряли при помощи твердофазного иммуоферментного анализа. Результаты в Таблице 106 представлены как средний процент от уровней белка Apo(a) в плазме для каждой экспериментальной группы, нормализованных к исходным уровням (% BL). Результаты показывают, что антисмысловые олигонуклеотиды снижают экспрессию белка Apo(a). Кроме того, олигонуклеотиды, содержащие конъюгирующую группу GalNAc, демонстрируют еще более эффективное снижение экспрессии Apo(a), чем олигонуклеотид, не содержащий конъюгирующую группу.

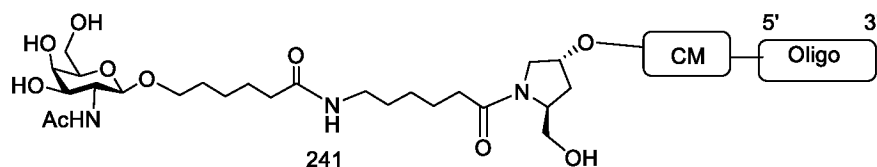
**Таблица 106**

### Уровни белка Apo(a) в плазме

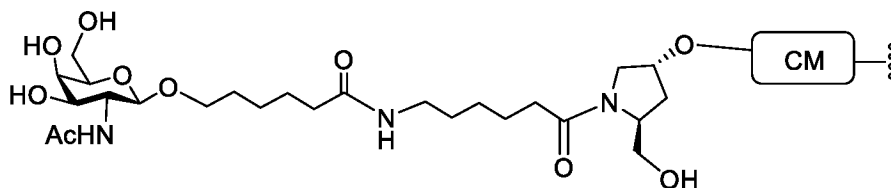
ISIS №	Доза (мг/кг)	Apo(a) через 1 неделю (% BL)
PBS	н.д.	143
494372	50	58
681251	10	15
681255	10	14
681256	10	17

681257	10	24
681258	10	22
681260	10	26

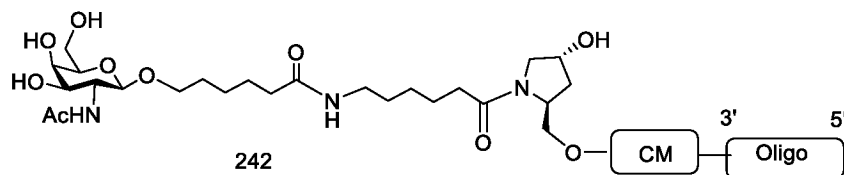
**Пример 109. Синтез олигонуклеотидов, содержащих конъюгат GalNAc<sub>1</sub>-28 или GalNAc<sub>1</sub>-29**



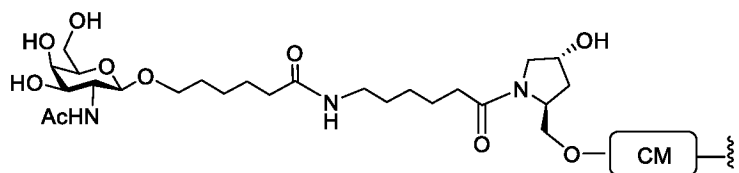
Олигонуклеотид 241 синтезировали по таким же способам, как описаны в Примере 71, с получением фосфорамидитного промежуточного соединения, после чего выполнили приемы, описанные в Примере 10, для синтеза олигонуклеотида. Кластерная часть GalNAc<sub>1</sub> (GalNAc<sub>1</sub>-28<sub>a</sub>) конъюгирующей группы GalNAc<sub>1</sub>-28 может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом, содержащемся в олигонуклеотиде, с получением различных конъюгирующих групп. Структура GalNAc<sub>1</sub>-28 (GalNAc<sub>1</sub>-28<sub>a</sub>-CM) представлена ниже:



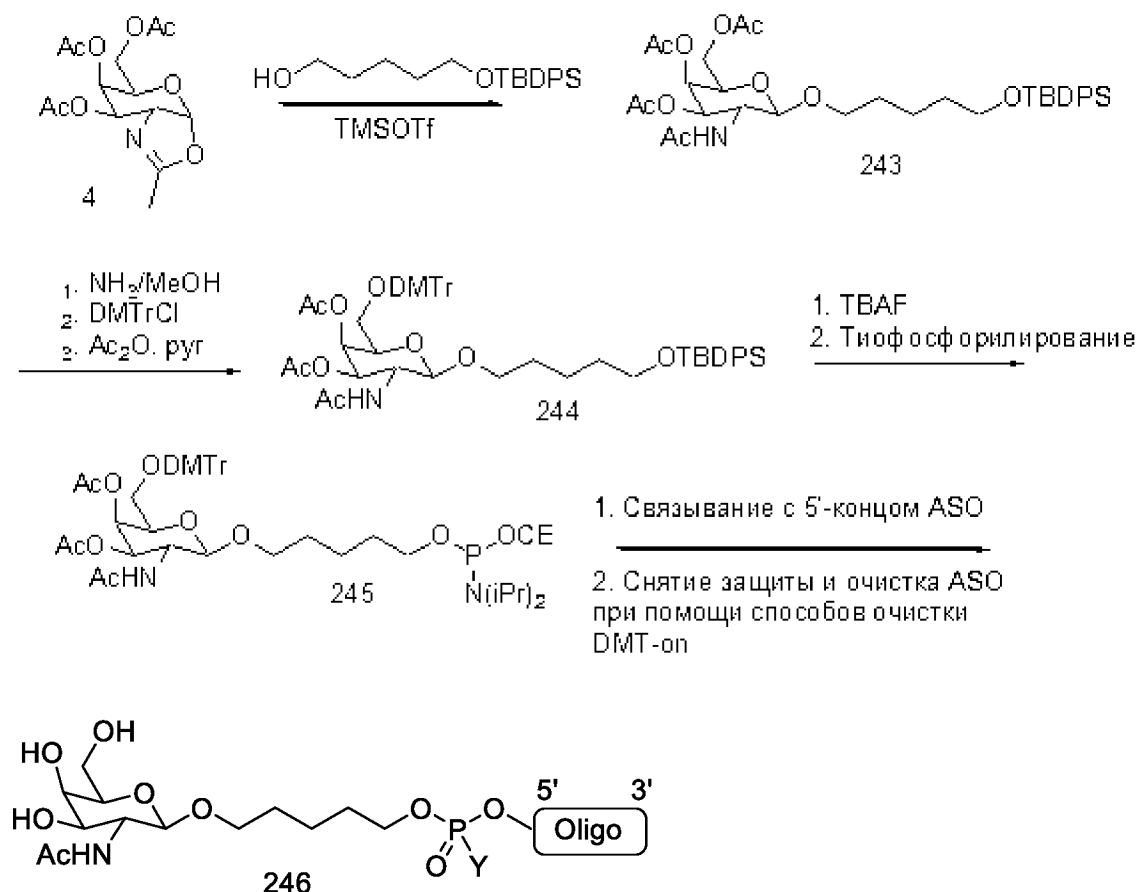
Для присоединения конъюгирующие группы GalNAc<sub>1</sub> к 3'-концу олигонуклеотида применяли такие же способы, как описаны в Примере 71, с получение гидроксильного промежуточного соединения, которое затем присоединили к твердой подложке по способам, описанным в Примере 7. Затем выполнили синтез олигонуклеотида по способам, описанным в Примере 9, с получением олигонуклеотида 242.



Кластерная часть GalNAc<sub>1</sub> (GalNAc<sub>1</sub>-29<sub>a</sub>) конъюгирующей группы GalNAc<sub>1</sub>-29 может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом, содержащемся в олигонуклеотиде, с получением различных конъюгирующих групп. Структура GalNAc<sub>1</sub>-29 (GalNAc<sub>1</sub>-29<sub>a</sub>-CM) представлена ниже:

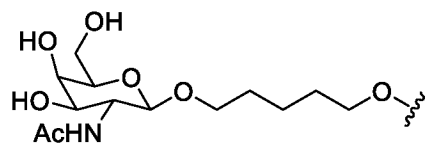


### Пример 110. Синтез олигонуклеотидов, содержащих конъюгат GalNAc<sub>1</sub>-30

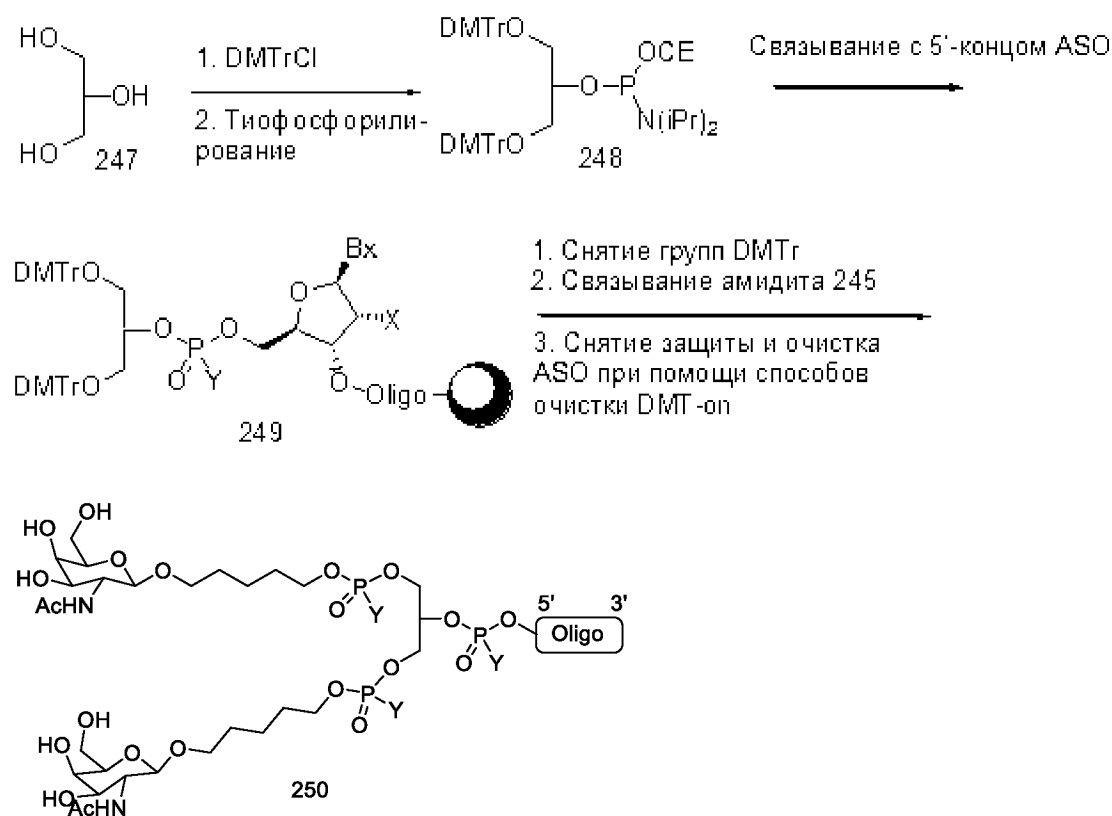


Олигонуклеотид 246, содержащий конъюгирующую группу GalNAc<sub>1</sub>-30, где Y выбран из O, S, замещенного или незамещенного C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкила, amino, замещенного amino, азидо, алкенила или алкинила, синтезировали так, как показано выше. Кластерная часть GalNAc<sub>1</sub> (GalNAc<sub>1</sub>-30<sub>a</sub>) конъюгирующей группы GalNAc<sub>1</sub>-30 может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных конъюгирующих групп. В некоторых вариантах реализации изобретения Y представляет собой часть расщепляемого фрагмента. В некоторых вариантах реализации изобретения Y

представляет собой часть стабильного фрагмента, а расщепляемый фрагмент находится в олигонуклеотиде. Структура GalNAc<sub>1</sub>-30<sub>a</sub> представлена ниже:



### Пример 111. Синтез олигонуклеотидов, содержащих конъюгат GalNAc<sub>2</sub>-31 или GalNAc<sub>2</sub>-32

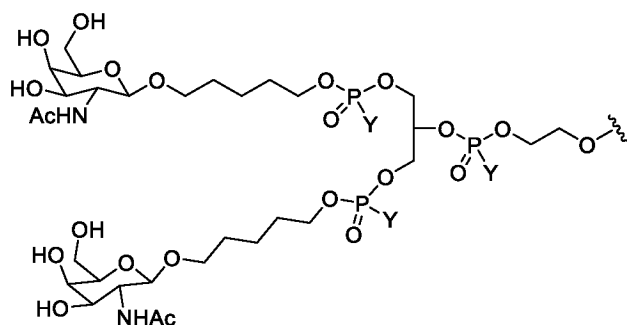


Олигонуклеотид 250, содержащий конъюгирующую группу GalNAc<sub>2</sub>-31, где Y выбран из O, S, замещенного или незамещенного C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкила, amino, замещенного amino, азидо, алкенила или алкинила, синтезировали так, как показано выше. Кластерная часть GalNAc<sub>2</sub> (GalNAc<sub>2</sub>-31<sub>a</sub>) конъюгирующей группы GalNAc<sub>2</sub>-31 может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных конъюгирующих групп. В некоторых вариантах реализации изобретения Y-содержащая группа, которая находится непосредственно возле 5'-конца олигонуклеотида, представляет собой часть расщепляемого фрагмента. В некоторых вариантах реализации





олигонуклеотида, представляет собой часть стабильного фрагмента, а расщепляемый фрагмент находится в олигонуклеотиде. Структура GalNAc<sub>2</sub>-32<sub>a</sub> представлена ниже:



### Пример 112. Модифицированные олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc<sub>1</sub>

Олигонуклеотиды в Таблице 107, нацеленные на SRB-1, были синтезированы с группой конъюгата GalNAc<sub>1</sub> для дополнительной проверки эффективности олигонуклеотидов, содержащих конъюгирующие группы, которые содержат лиганд GalNAc.

Таблица 107

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc	CM	SEQ ID NO.
711461	<b>GalNAc<sub>1</sub>-25a-o'-Ado</b> G <sup>es</sup> mC <sup>es</sup> T <sup>es</sup> T <sup>es</sup> mC <sup>es</sup> A <sup>ds</sup> G <sup>ds</sup> T <sup>ds</sup> mC <sup>ds</sup> A <sup>ds</sup> T <sup>ds</sup> G <sup>ds</sup> A <sup>ds</sup> mC <sup>ds</sup> T <sup>ds</sup> T <sup>es</sup> mC <sup>es</sup> mC <sup>es</sup> T <sup>es</sup> T <sup>e</sup>	GalNAc <sub>1</sub> -25 <sub>a</sub>	Ad	30
711462	<b>GalNAc<sub>1</sub>-25a-o'-G<sup>es</sup> mC<sup>es</sup> T<sup>es</sup> T<sup>es</sup> mC<sup>es</sup> A<sup>ds</sup> G<sup>ds</sup> T<sup>ds</sup> mC<sup>ds</sup></b> A <sup>ds</sup> T <sup>ds</sup> G <sup>ds</sup> A <sup>ds</sup> mC <sup>ds</sup> T <sup>ds</sup> T <sup>es</sup> mC <sup>es</sup> mC <sup>es</sup> T <sup>es</sup> T <sup>e</sup>	GalNAc <sub>1</sub> -25 <sub>a</sub>	PO	28
711463	<b>GalNAc<sub>1</sub>-25a-o'-G<sup>es</sup> mC<sup>eo</sup> T<sup>eo</sup> T<sup>eo</sup> mC<sup>eo</sup> A<sup>ds</sup> G<sup>ds</sup> T<sup>ds</sup> mC<sup>ds</sup></b> A <sup>ds</sup> T <sup>ds</sup> G <sup>ds</sup> A <sup>ds</sup> mC <sup>ds</sup> T <sup>ds</sup> T <sup>eo</sup> mC <sup>eo</sup> mC <sup>es</sup> T <sup>es</sup> T <sup>e</sup>	GalNAc <sub>1</sub> -25 <sub>a</sub>	PO	28
711465	<b>GalNAc<sub>1</sub>-26a-o'-Ado</b> G <sup>es</sup> mC <sup>es</sup> T <sup>es</sup> T <sup>es</sup> mC <sup>es</sup> A <sup>ds</sup> G <sup>ds</sup> T <sup>ds</sup> mC <sup>ds</sup> A <sup>ds</sup> T <sup>ds</sup> G <sup>ds</sup> A <sup>ds</sup> mC <sup>ds</sup> T <sup>ds</sup> T <sup>es</sup> mC <sup>es</sup> mC <sup>es</sup> T <sup>es</sup> T <sup>e</sup>	GalNAc <sub>1</sub> -26 <sub>a</sub>	Ad	30
711466	<b>GalNAc<sub>1</sub>-26a-o'-G<sup>es</sup> mC<sup>es</sup> T<sup>es</sup> T<sup>es</sup> mC<sup>es</sup> A<sup>ds</sup> G<sup>ds</sup> T<sup>ds</sup> mC<sup>ds</sup></b> A <sup>ds</sup> T <sup>ds</sup> G <sup>ds</sup> A <sup>ds</sup> mC <sup>ds</sup> T <sup>ds</sup> T <sup>es</sup> mC <sup>es</sup> mC <sup>es</sup> T <sup>es</sup> T <sup>e</sup>	GalNAc <sub>1</sub> -26 <sub>a</sub>	PO	28
711467	<b>GalNAc<sub>1</sub>-26a-o'-G<sup>es</sup> mC<sup>eo</sup> T<sup>eo</sup> T<sup>eo</sup> mC<sup>eo</sup> A<sup>ds</sup> G<sup>ds</sup> T<sup>ds</sup> mC<sup>ds</sup></b> A <sup>ds</sup> T <sup>ds</sup> G <sup>ds</sup> A <sup>ds</sup> mC <sup>ds</sup> T <sup>ds</sup> T <sup>eo</sup> mC <sup>eo</sup> mC <sup>es</sup> T <sup>es</sup> T <sup>e</sup>	GalNAc <sub>1</sub> -26 <sub>a</sub>	PO	28
711468	<b>GalNAc<sub>1</sub>-28a-o'-Ado</b> G <sup>es</sup> mC <sup>es</sup> T <sup>es</sup> T <sup>es</sup> mC <sup>es</sup> A <sup>ds</sup> G <sup>ds</sup> T <sup>ds</sup> mC <sup>ds</sup> A <sup>ds</sup> T <sup>ds</sup> G <sup>ds</sup> A <sup>ds</sup> mC <sup>ds</sup> T <sup>ds</sup> T <sup>es</sup> mC <sup>es</sup> mC <sup>es</sup> T <sup>es</sup> T <sup>e</sup>	GalNAc <sub>1</sub> -28 <sub>a</sub>	Ad	30
711469	<b>GalNAc<sub>1</sub>-28a-o'-G<sup>es</sup> mC<sup>es</sup> T<sup>es</sup> T<sup>es</sup> mC<sup>es</sup> A<sup>ds</sup> G<sup>ds</sup> T<sup>ds</sup> mC<sup>ds</sup></b> A <sup>ds</sup> T <sup>ds</sup> G <sup>ds</sup> A <sup>ds</sup> mC <sup>ds</sup> T <sup>ds</sup> T <sup>es</sup> mC <sup>es</sup> mC <sup>es</sup> T <sup>es</sup> T <sup>e</sup>	GalNAc <sub>1</sub> -28 <sub>a</sub>	PO	28
711470	<b>GalNAc<sub>1</sub>-28a-o'-G<sup>es</sup> mC<sup>eo</sup> T<sup>eo</sup> T<sup>eo</sup> mC<sup>eo</sup> A<sup>ds</sup> G<sup>ds</sup> T<sup>ds</sup> mC<sup>ds</sup></b> A <sup>ds</sup> T <sup>ds</sup> G <sup>ds</sup> A <sup>ds</sup> mC <sup>ds</sup> T <sup>ds</sup> T <sup>eo</sup> mC <sup>eo</sup> mC <sup>es</sup> T <sup>es</sup> T <sup>e</sup>	GalNAc <sub>1</sub> -28 <sub>a</sub>	PO	28
713844	G <sup>es</sup> mC <sup>es</sup> T <sup>es</sup> T <sup>es</sup> mC <sup>es</sup> A <sup>ds</sup> G <sup>ds</sup> T <sup>ds</sup> mC <sup>ds</sup> A <sup>ds</sup> T <sup>ds</sup> G <sup>ds</sup> A <sup>ds</sup> mC <sup>ds</sup> T <sup>ds</sup> T <sup>es</sup> mC <sup>es</sup> mC <sup>es</sup> T <sup>es</sup> T <sup>eo</sup> ·GalNAc <sub>1</sub> -27 <sub>a</sub>	GalNAc <sub>1</sub> -27 <sub>a</sub>	PO	28
713845	G <sup>es</sup> mC <sup>eo</sup> T <sup>eo</sup> T <sup>eo</sup> mC <sup>eo</sup> A <sup>ds</sup> G <sup>ds</sup> T <sup>ds</sup> mC <sup>ds</sup> A <sup>ds</sup> T <sup>ds</sup> G <sup>ds</sup> A <sup>ds</sup> mC <sup>ds</sup> T <sup>ds</sup> T <sup>eo</sup> mC <sup>eo</sup> mC <sup>es</sup> T <sup>es</sup> T <sup>eo</sup> ·GalNAc <sub>1</sub> -27 <sub>a</sub>	GalNAc <sub>1</sub> -27 <sub>a</sub>	PO	28

713846	$G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds}$ $A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{eo}^m C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_{eo} Ado' \cdot GalNAc1-27a$	GalNAc1-27a	Ad	29
713847	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds}$ $A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{eo}' \cdot GalNAc1-29a$	GalNAc1-29a	PO	28
713848	$G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds}$ $A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{eo}^m C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_{eo}' \cdot GalNAc1-29a$	GalNAc1-29a	PO	28
713849	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds}$ $A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{eo} Ado' \cdot GalNAc1-29a$	GalNAc1-29a	Ad	29
713850	$G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds}$ $A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{eo}^m C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_{eo} Ado' \cdot GalNAc1-29a$	GalNAc1-29a	Ad	29

**Пример 113. Модифицированные олигонуклеотиды, содержащие конъюгирующую группу GalNAc, нацеленные на вирус гепатита В (HBV)**

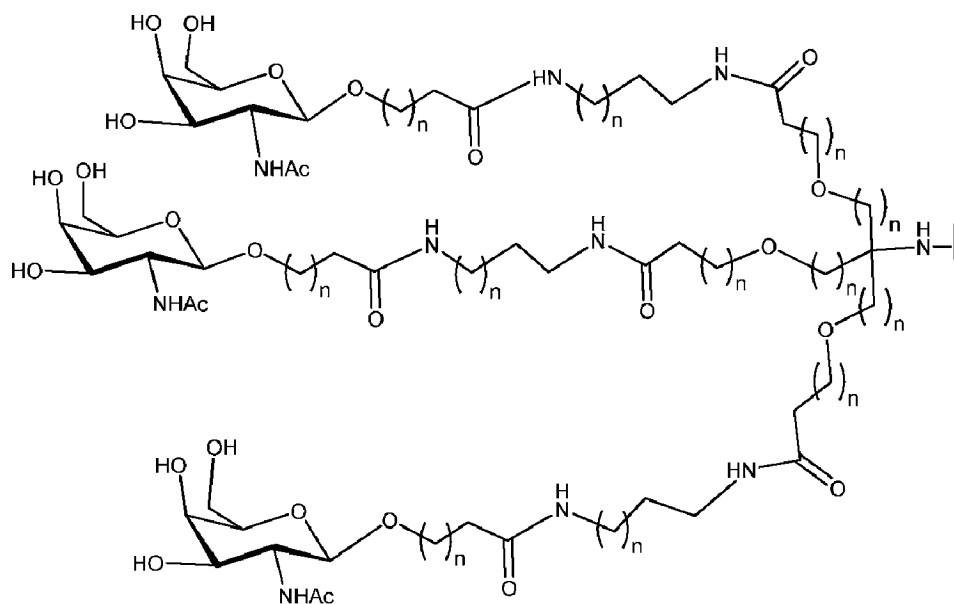
Олигонуклеотиды, перечисленные ниже в Таблице 108, предназначены для воздействия на HBV. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент представляет собой фосфодиэфирную связь.

**Таблица 108**

Последовательность (от 5' к 3')	SEQ ID No.
<b>GalNAc3-3-<math>G_{es}^m C_{es} A_{es} G_{es} A_{es} G_{ds} G_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} G_{ds}^m C_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{es} G_{es} T_{es} G_{es}^m C_e</math></b>	3
<b>GalNAc3-3-<math>G_{es}^m C_{eo} A_{eo} G_{eo} A_{eo} G_{ds} G_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} G_{ds}^m C_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{eo} G_{eo} T_{es} G_{es}^m C_e</math></b>	3
<b>GalNAc3-7-<math>G_{es}^m C_{es} A_{es} G_{es} A_{es} G_{ds} G_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} G_{ds}^m C_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{es} G_{es} T_{es} G_{es}^m C_e</math></b>	3
<b>GalNAc3-7-<math>G_{es}^m C_{eo} A_{eo} G_{eo} A_{eo} G_{ds} G_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} G_{ds}^m C_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{eo} G_{eo} T_{es} G_{es}^m C_e</math></b>	3
<b>GalNAc3-10-<math>G_{es}^m C_{es} A_{es} G_{es} A_{es} G_{ds} G_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} G_{ds}^m C_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{es} G_{es} T_{es} G_{es}^m C_e</math></b>	3
<b>GalNAc3-10-<math>G_{es}^m C_{eo} A_{eo} G_{eo} A_{eo} G_{ds} G_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} G_{ds}^m C_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{eo} G_{eo} T_{es} G_{es}^m C_e</math></b>	3
<b>GalNAc3-13-<math>G_{es}^m C_{es} A_{es} G_{es} A_{es} G_{ds} G_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} G_{ds}^m C_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{es} G_{es} T_{es} G_{es}^m C_e</math></b>	3
<b>GalNAc3-13-<math>G_{es}^m C_{eo} A_{eo} G_{eo} A_{eo} G_{ds} G_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} G_{ds}^m C_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{eo} G_{eo} T_{es} G_{es}^m C_e</math></b>	3
<b><math>G_{es}^m C_{es} A_{es} G_{es} A_{es} G_{ds} G_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} G_{ds}^m C_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{es} G_{es} T_{es} G_{es}^m C_e</math>-GalNAc3-19</b>	3
<b><math>G_{es}^m C_{eo} A_{eo} G_{eo} A_{eo} G_{ds} G_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} G_{ds}^m C_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{eo} G_{eo} T_{es} G_{es}^m C_e</math>-GalNAc3-19</b>	3
<b>GalNAc3-24-<math>G_{es}^m C_{es} A_{es} G_{es} A_{es} G_{ds} G_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} G_{ds}^m C_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{es} G_{es} T_{es} G_{es}^m C_e</math></b>	3
<b>GalNAc3-24-<math>G_{es}^m C_{eo} A_{eo} G_{eo} A_{eo} G_{ds} G_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} G_{ds}^m C_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{eo} G_{eo} T_{es} G_{es}^m C_e</math></b>	3
<b>GalNAc3-25-<math>G_{es}^m C_{es} A_{es} G_{es} A_{es} G_{ds} G_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} G_{ds}^m C_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{es} G_{es} T_{es} G_{es}^m C_e</math></b>	3
<b>GalNAc3-25-<math>G_{es}^m C_{eo} A_{eo} G_{eo} A_{eo} G_{ds} G_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} G_{ds}^m C_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{eo} G_{eo} T_{es} G_{es}^m C_e</math></b>	3

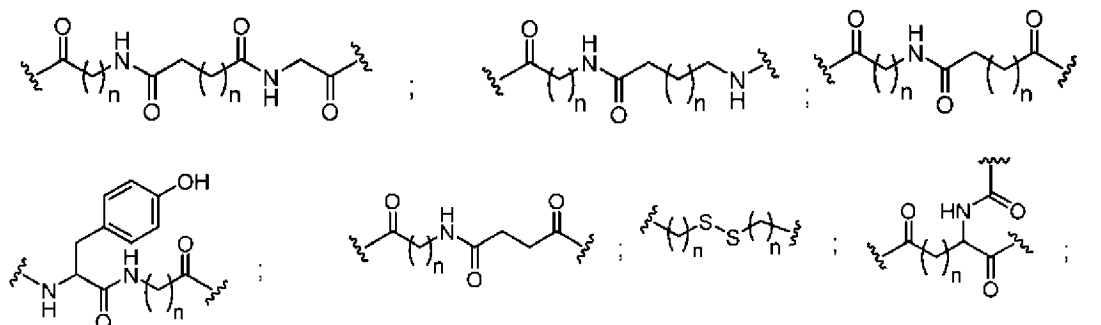
## Формула изобретения

1. Соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид и конъюгирующую группу, при этом модифицированный олигонуклеотид состоит из 12-30 связанных нуклеозидов и по меньшей мере на 80% комплементарен равной по длине части азотистых оснований SEQ ID NO: 2 по всей длине, и где последовательность азотистых оснований модифицированного олигонуклеотида содержит по меньшей мере 8 смежных азотистых оснований SEQ ID NO: 12, и где конъюгирующая группа связана с модифицированным олигонуклеотидом через линкер конъюгата, при этом конъюгирующая группа содержит:

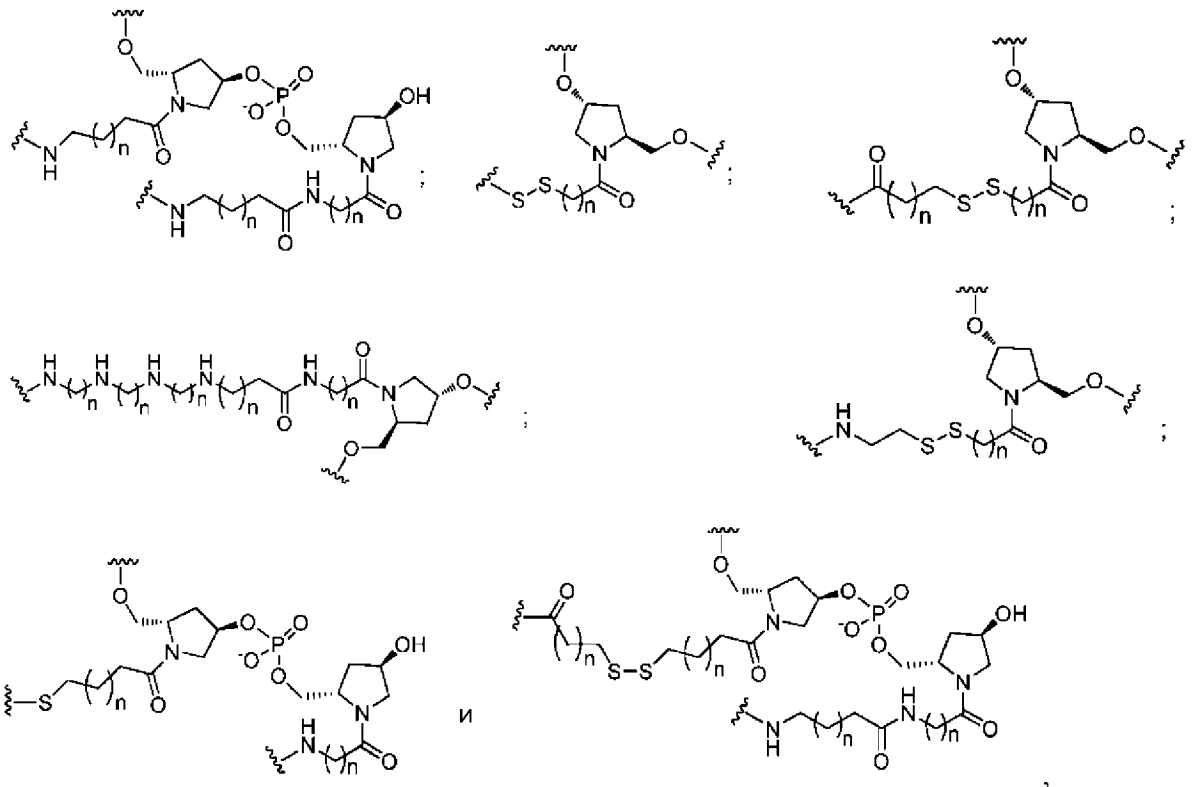


где каждый  $n$  независимо равен от 1 до 20; и

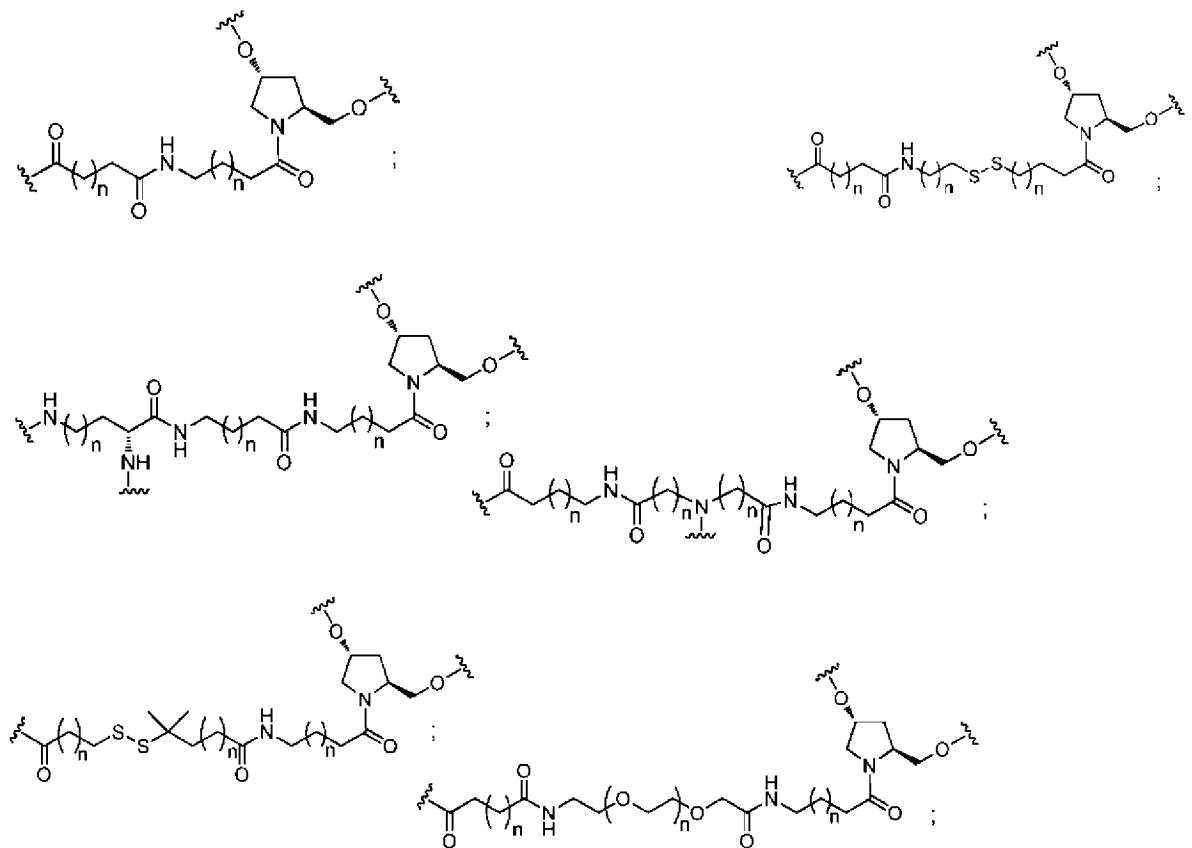
где линкер конъюгата имеет структуру, выбранную из:

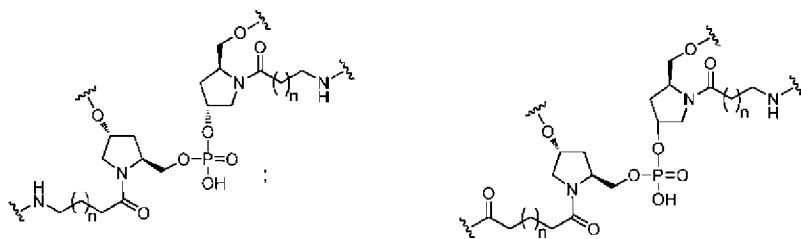




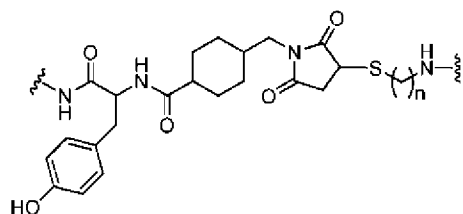


где каждый  $n$  независимо равен от 1 до 20; и  $r$  равен от 1 до 6; или

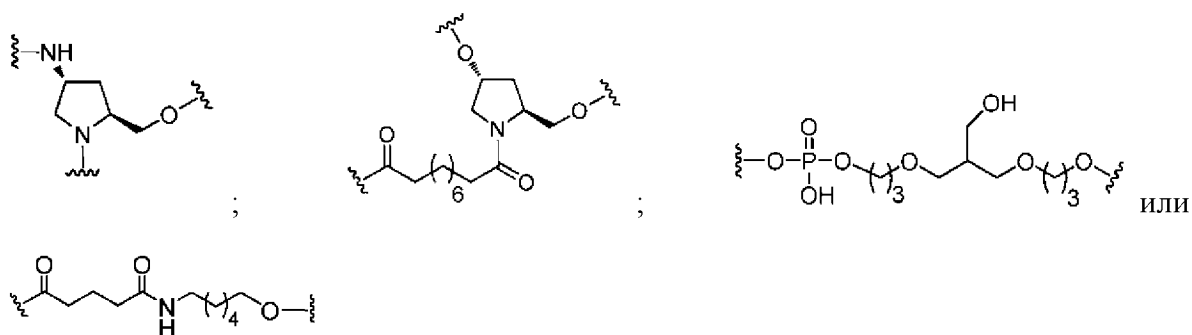




И



где каждый n независимо равен от 1 до 20; или



2. Соединение по п. 1, в котором последовательность азотистых оснований модифицированного олигонуклеотида по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95 % или на 100 % комплементарна SEQ ID NO: 2.

3. Соединение по п. 1, в котором модифицированный олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь.

4. Соединение по п. 3, в котором модифицированная межнуклеозидная связь представляет собой тиофосфатную межнуклеозидную связь.

5. Соединение по п. 1, в котором модифицированный олигонуклеотид содержит по меньшей мере один модифицированный сахар.

6. Соединение по п. 5, в котором по меньшей мере один модифицированный сахар выбран из бициклического сахара, 2'-О-метоксиэтилмодифицированного сахара,

стерически затрудненного этил модифицированного сахара, 3'-фтор-ННА или 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-2' мостик, где n равен 1 или 2.

7. Соединение по п. 1, в котором по меньшей мере один нуклеозид содержит модифицированное азотистое основание.

8. Соединение по п. 7, в котором модифицированное азотистое основание представляет собой 5-метилцитозин.

9. Соединение по п. 1, в котором модифицированный олигонуклеотид состоит из 20 связанных нуклеозидов, имеющих последовательность азотистых оснований, состоящую из SEQ ID NO: 12, и при этом модифицированный олигонуклеотид содержит:

сегмент гэта, состоящий из десяти связанных дезокси-нуклеозидов;

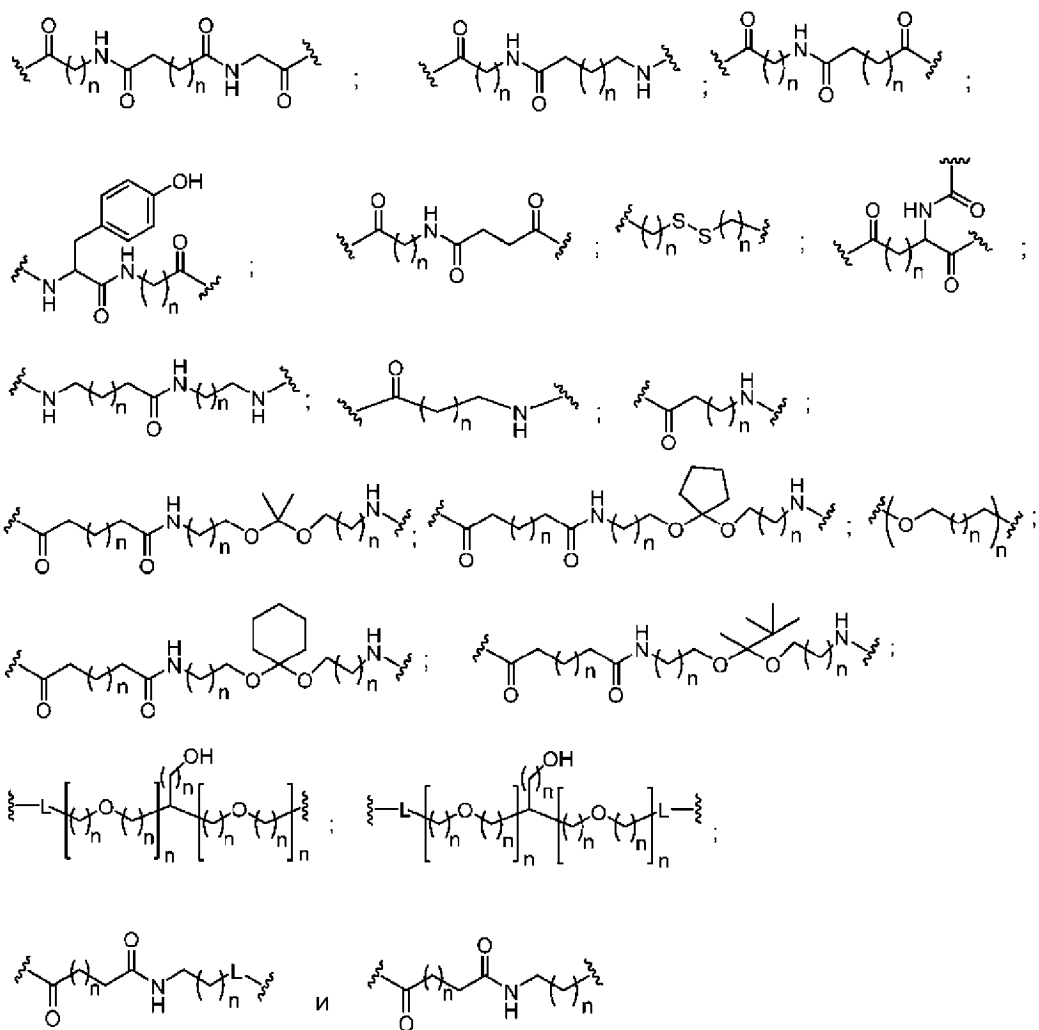
сегмент 5'-крыла, состоящий из пяти связанных нуклеозидов;

сегмент 3'-крыла, состоящий из пяти связанных нуклеозидов;

при этом сегмент гэта расположен между сегментом 5'-крыла и сегментом 3'-крыла, где каждый нуклеозид каждого сегмента крыла содержит 2'-O-метоксиэтил-сахар, и при этом каждый остаток цитозина представляет собой 5-метилцитозин.

10. Соединение по п. 1, отличающееся тем, что каждая межнуклеозидная связь в сегменте гэта модифицированного олигонуклеотида представляет собой тиофосфатную связь.

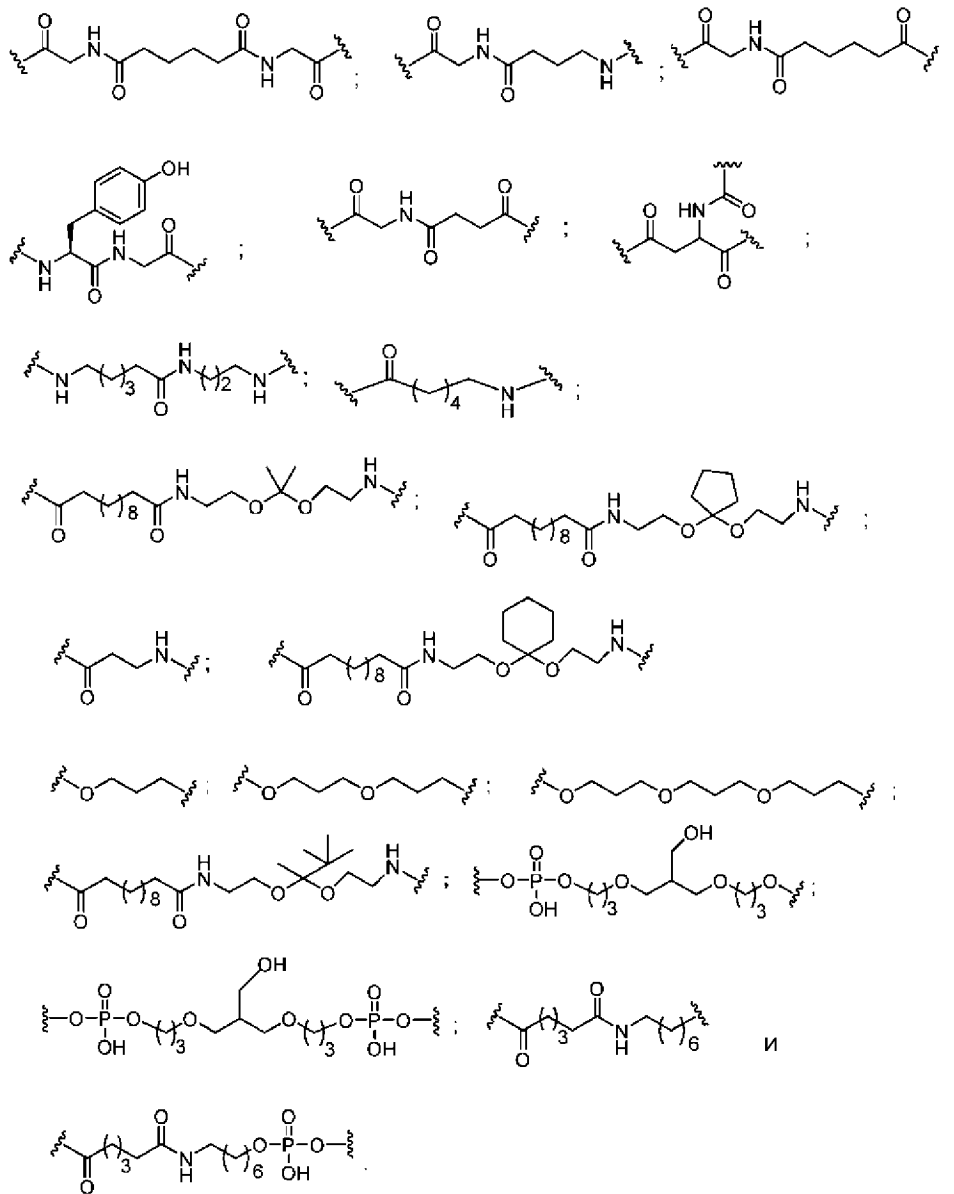
11. Соединение по п. 1, в котором линкер конъюгата имеет структуру, выбранную из:



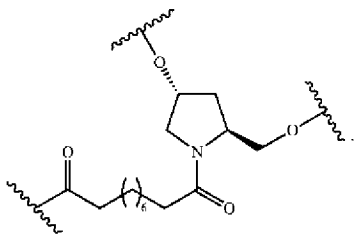
где каждый L независимо представляет собой фосфорную связывающую группу или нейтральную связывающую группу; и каждый n независимо равен от 1 до 20.

12. Соединение по п.1, в котором линкер конъюгата имеет структуру, выбранную из:

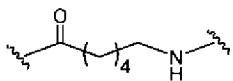




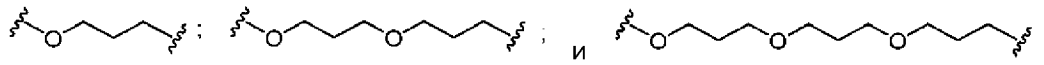
13. Соединение по п.1, в котором линкер конъюгата имеет структуру:



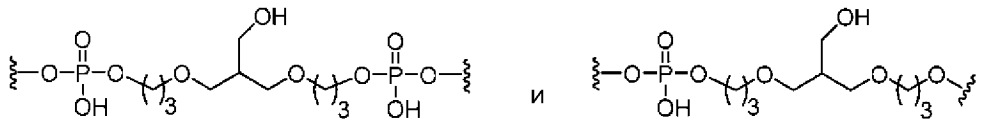
14. Соединение по п.1, в котором линкер конъюгата имеет структуру:



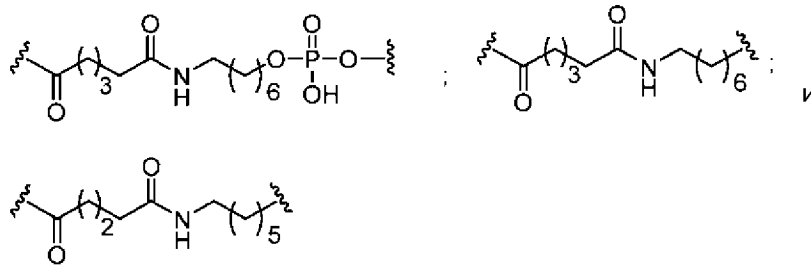
15. Соединение по п.1, в котором линкер конъюгата имеет структуру, выбранную из:



16. Соединение по п.1, в котором линкер конъюгата имеет структуру, выбранную из:



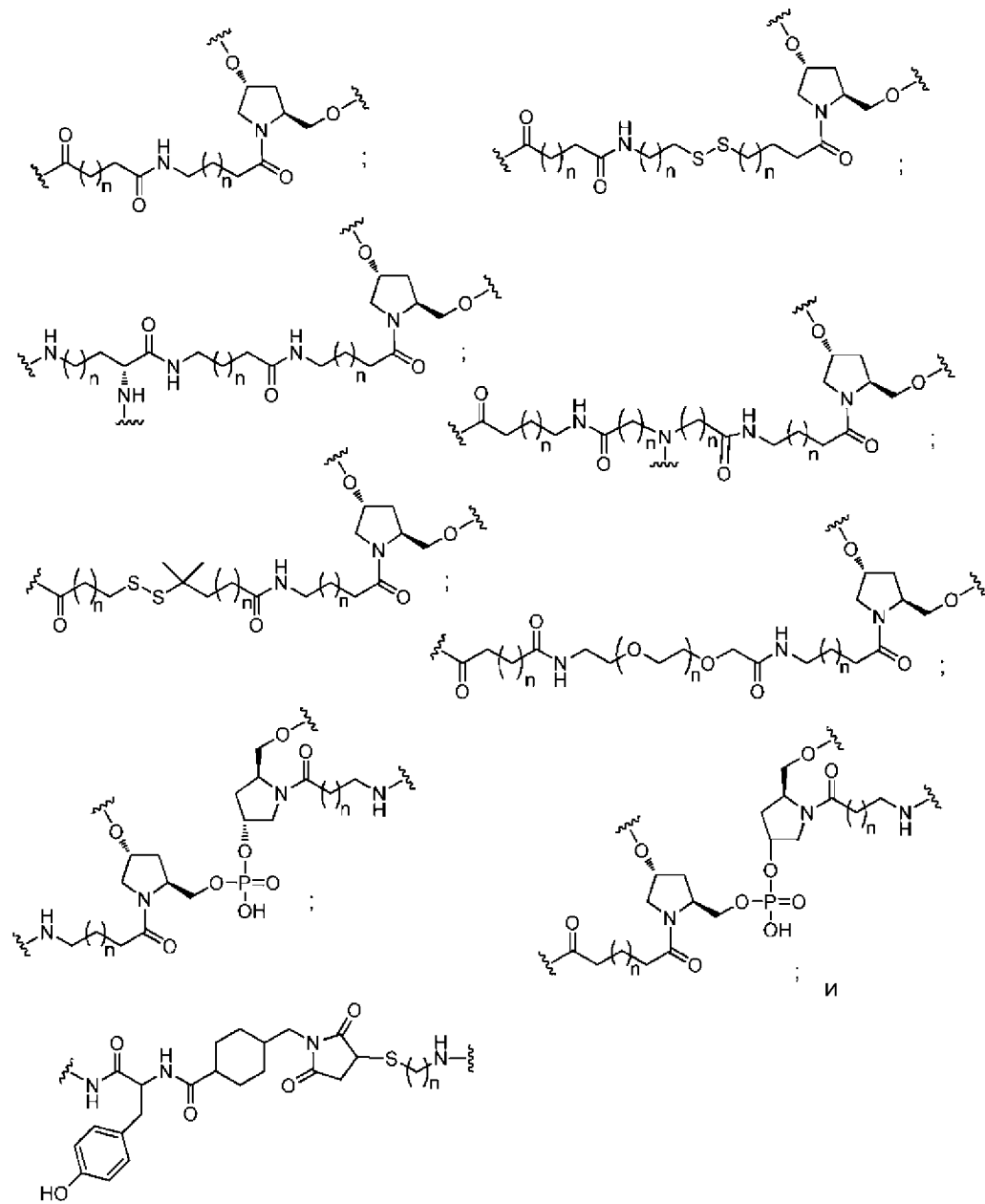
17. Соединение по п.1, в котором линкер конъюгата имеет структуру, выбранную из:



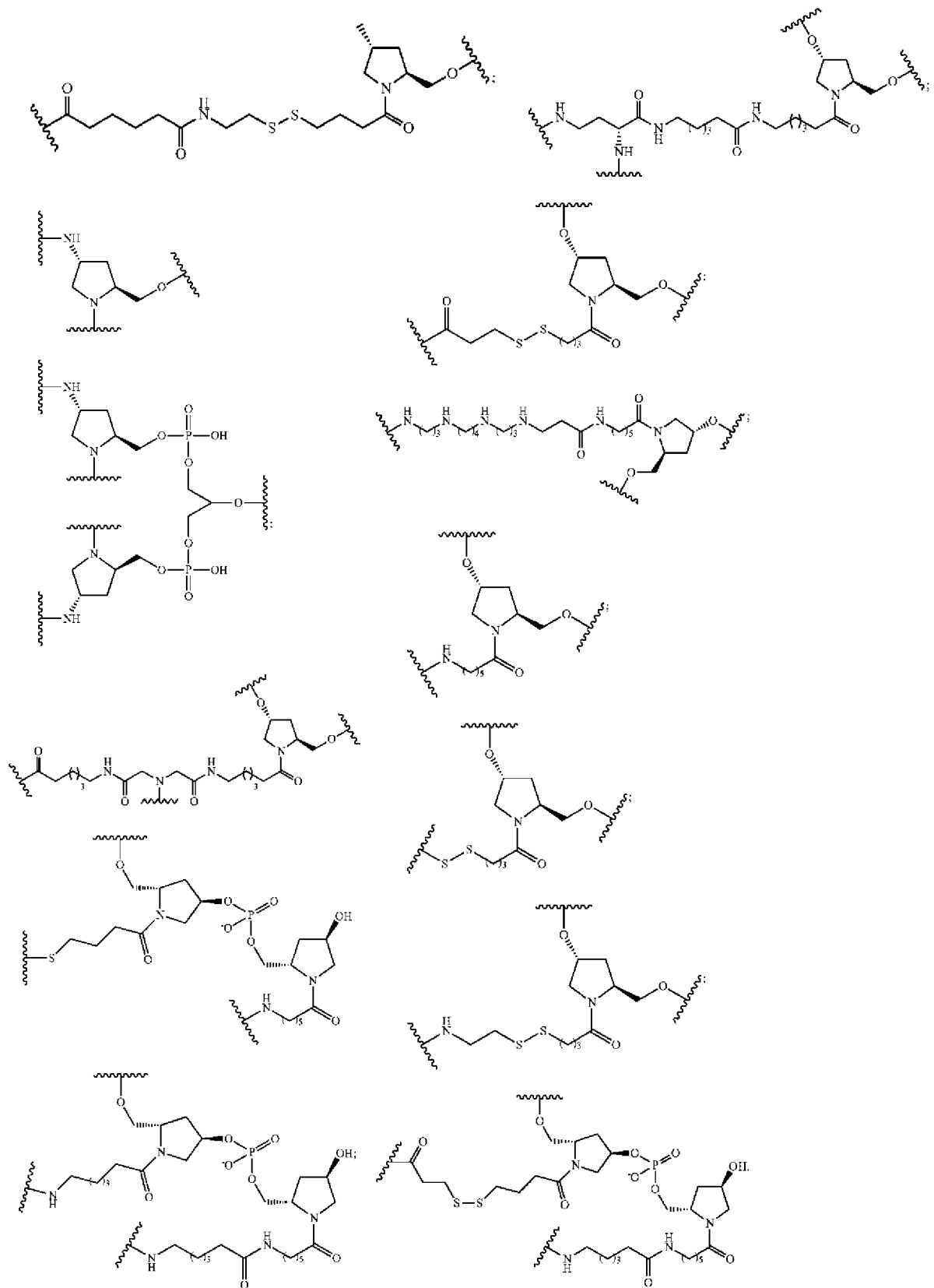
18. Соединение по п.1, в котором линкер конъюгата имеет структуру, выбранную из:



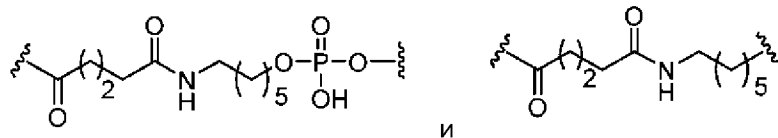
19. Соединение по п.1, в котором линкер конъюгата имеет структуру, выбранную из:



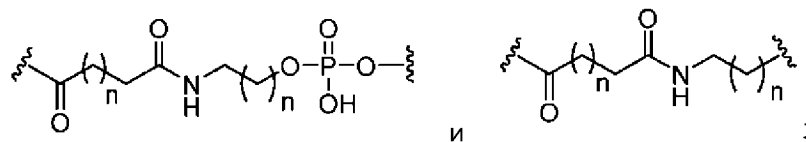
20. Соединение по п.1, в котором линкер конъюгата имеет структуру, выбранную из:



21. Соединение по п.1, в котором линкер конъюгата имеет структуру, выбранную из:

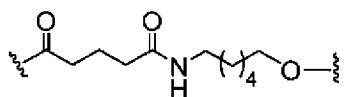


22. Соединение по п.1, в котором линкер конъюгата имеет структуру, выбранную из:

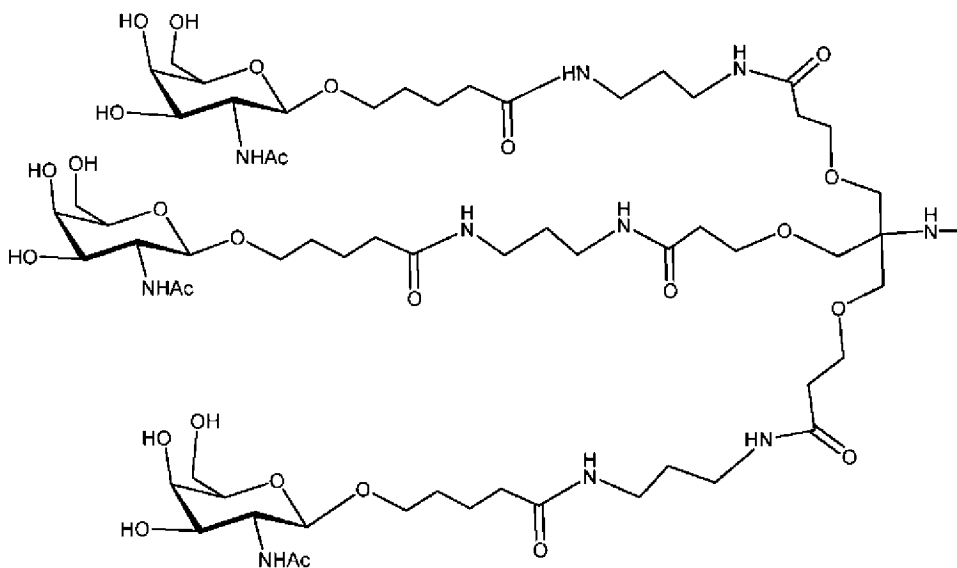


где каждый  $n$  независимо равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7.

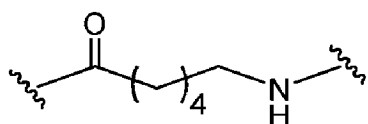
23. Соединение по п.1, в котором линкер конъюгата имеет структуру:



24. Соединение по п.1, в котором конъюгирующая группа содержит:

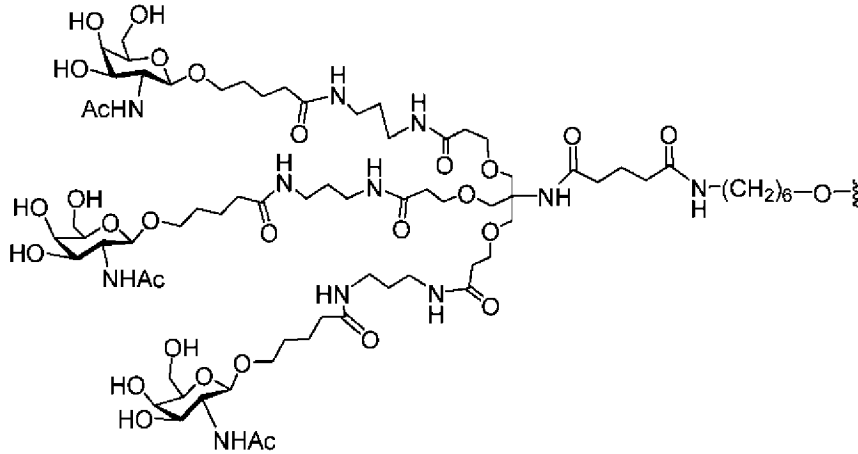


и линкер конъюгата имеет структуру:



25. Соединение по п.1, в котором конъюгирующая группа содержит расщепляемый фрагмент, выбранный из: фосфодиэфира, амида и сложного эфира.

26. Соединение по п.1, в котором конъюгат содержит:



27. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по п.1 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.