

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491462 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.10.18

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.12.16

(54) ДЦРНК, СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 202111542797.4

(32) 2021.12.16

(33) CN

(86) PCT/CN2022/139488

(87) WO 2023/109938 2023.06.22

(71) Заявитель:
ТОЦЗЕ БИОТЕК (ШАНХАЙ) КО.,
ЛТД. (CN)

(72) Изобретатель:
Ли Юньфэй, Чжан Чжэнь, Хоу Чже,
Гэн Цзюнь, Чжан Цзяньюй, Чжоу
Яцинь, Хуан Лунфэй (CN)

(74) Представитель:
Хмара М.В. (RU)

(57) Двухцепочечная рибонуклеиновая кислота (дцРНК), способ ее получения и ее применение. Фармацевтическая композиция, содержащая данную дцРНК, клетка или набор. дцРНК может влиять на экспрессию генов вируса гепатита В (HBV) с целью предупреждения и/или лечения связанных с ним заболеваний.

202491462
A1

202491462

A1

дцРНК, СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Настоящее изобретение испрашивает приоритет заявки на патент Китая № 202111542797.4, поданной 16 декабря 2021 г., которая включена в данное описание
5 посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к двухцепочечной рибонуклеиновой кислоте (дцРНК), которая может быть направленно доставлена в клетку для
10 оказания эффекта РНК-интерференции. Настоящее изобретение также относится к способу получения дцРНК и к ее применению.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

РНК-интерференция (РНКи) является эффективным способом подавления
15 экспрессии генов. По статистике, примерно более 80% белков, связанных с заболеваниями у людей, являются белками, не поддающимися лекарственному воздействию, поскольку на них невозможно воздействовать традиционными низкомолекулярными лекарственными средствами и композициями на основе биологических макромолекул. Используя технологию РНК-интерференции, можно
20 сконструировать надлежащие малые интерферирующие РНК (миРНК), соответствующие мРНК, кодирующим эти белки, чтобы специфически нацеливаться на целевые мРНК и разрушать их, тем самым ингибируя образование соответствующих белков. Таким образом, миРНК обладают очень важными перспективами в отношении разработки лекарственных средств. Однако, чтобы
25 достичь терапевтического эффекта РНК-интерференции *in vivo*, необходимо осуществить доставку молекул миРНК *in vivo* к конкретным клеткам.

Одним из эффективных способов доставки лекарственных средств является конъюгирование миРНК с лигандом для направленной доставки, чтобы она могла проникнуть в клетку посредством эндоцитоза с использованием связывания
30 лиганда для направленной доставки и молекулы рецептора на поверхности клеточной мембраны. Например, асиалогликопротеиновые рецепторы (ASGPR) представляют собой рецепторы, специфически экспрессируемые гепатоцитами, и на поверхности гепатоцитов характеризуются своим высоким относительным содержанием и быстро протекаемым внутриклеточным и внеклеточным
35 превращением. Молекулы моносахаридов и полисахаридов, таких как галактоза, галактозамин и N-ацетилгалактозамин, обладают высоким сродством к ASGPR.

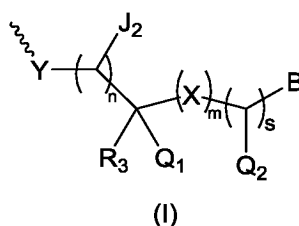
Согласно литературным источникам (10.16476/j.pibb.2015.0028) миРНК можно эффективно доставлять в гепатоциты с использованием кластеров молекул N-ацетилгалактозаминов (GalNAc); при конструировании молекул GalNAc в виде трехвалентных или тетравалентных молекулярных кластеров способность
 5 одновалентных или двухвалентных молекул GalNAc нацеливаться на гепатоциты может значительно улучшаться.

Существенное влияние на активность миРНК *in vivo* оказывают разные структуры молекулярных кластеров и разные способы соединения с РНК, и более высокая активность означает достижение лучшего терапевтического эффекта или
 10 применение более низкой дозы лекарственного средства. Применение более низкой дозы лекарственного средства, обеспечивающей эквивалентный терапевтический эффект, означает наличие меньшей токсической реакции.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

15 дцРНК

Согласно первому аспекту настоящего изобретения предложена дцРНК, содержащая миРНК и один или несколько конъюгированных с ней лигандов, при этом миРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, и данная антисмысловая цепь содержит химическую модификацию формулы (I),
 20 таутомерную форму этой модификации или ее фармацевтически приемлемую соль по меньшей мере в одном из нуклеотидных положений 2-8 от своего 5'-конца:



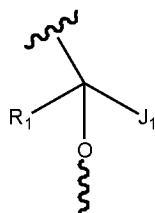
где Y выбран из группы, состоящей из O, NH и S;

каждый X независимо выбран из группы, состоящей из CR₄(R₄'), S, NR₅ и
 25 NH-CO, где каждый из R₄, R₄' и R₅ независимо представляет собой H или C₁-C₆алкил;

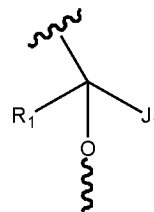
J₂ представляет собой H или C₁-C₆алкил;

n равно 0, 1 или 2; m равно 0, 1 или 2; s равно 0 или 1;

R₃ выбран из группы, состоящей из H, OH, галогена, NH₂, C₁-C₆алкила,
 30 C₁-C₆алкокси, C₂-C₆алкенила, C₂-C₆алкинила, S-CH₃, NCH₃(CH₃), OCH₂CH₂OCH₃,
 -O-алкиламино и (CH₂)_pR₆, при этом R₆ выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N₃, C₂-C₆алкенила и C₂-C₆алкинилп, и p равно 1, 2 или 3;



Q₁ представляет собой , а Q₂ представляет собой R₂; или



Q₁ представляет собой R₂, а Q₂ представляет собой ;

где

R₁ выбран из группы, состоящей из H, C₁-C₆алкила, C₁-C₆алкокси, C₂-C₆алкенила, C₂-C₆алкинила и (CH₂)_qR₇, при этом R₇ выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N₃, C₂-C₆алкенила и C₂-C₆алкинила, и q равно 1, 2 или 3;

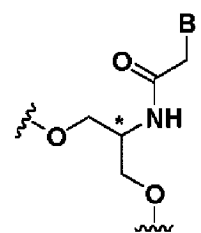
J₁ представляет собой H или C₁-C₆алкил;

R₂ выбран из группы, состоящей из H, OH, галогена, NH₂, C₁-C₆алкила, C₁-C₆алкокси, C₂-C₆алкенила, C₂-C₆алкинила, S-CH₃, NCH₃(CH₃), OCH₂CH₂OCH₃, -O-алкиламино и (CH₂)_rR₈, при этом R₈ выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N₃, C₂-C₆алкенила и C₂-C₆алкинила, и r равно 1, 2 или 3;

возможно, R₁ и R₂ связаны напрямую с образованием кольца;

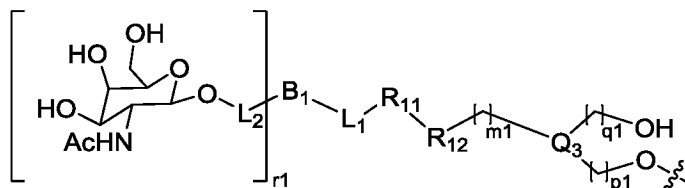
B представляет собой основание;

химическая модификация формулы (I), ее таутомерная форма или ее



фармацевтически приемлемая соль не представляет собой

лиганд представляет собой соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль:

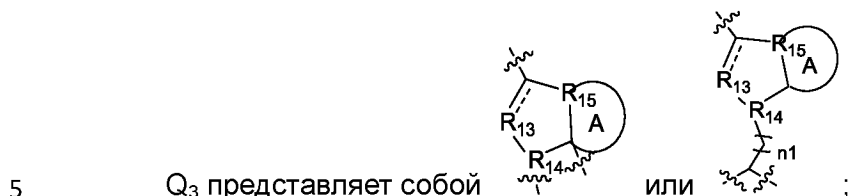




(II)


где L₁ представляет собой C₁-C₃₀алкильную цепь или содержит

C₁-C₃₀алкильную цепь, прерванную одним или несколькими атомами кислорода, серы или азота либо группой C=O;

R₁₁ и R₁₂ независимо представляют собой химические связи, NR₁₆, C=O или -OC(=O)-;



 представляет собой одинарную связь или двойную связь, и когда  представляет собой одинарную связь, тогда R₁₃ независимо представляет собой CR₁₇R₁₈, NR₁₆, O или S;

когда  представляет собой двойную связь, тогда R₁₃ представляет собой независимо CR₁₉ или N;

R₁₄ независимо представляет собой CR₁₉ или N;

кольцо A представляет собой циклоалкил, гетероциклоалкил, арил или гетероарил, когда присутствует, или отсутствует, и когда кольцо A присутствует, тогда R₁₅ независимо представляет собой CR₁₉ или N; когда кольцо A отсутствует, тогда R₁₅ представляет собой независимо CR₁₇R₁₈, NR₁₆ или O;

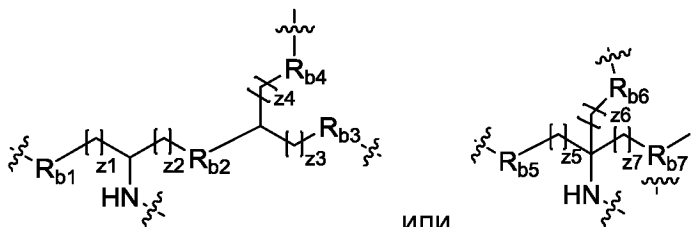
R₁₆ и R₁₉ независимо представляют собой атом водорода, дейтерий, алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклоалкил, арил, гетероарил, SR', S(=O)R', S(=O)₂R', S(=O)₂NR'(R''), NR'(R''), C(=O)R', C(=O)OR' или C(=O)NR'(R''), при этом алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклоалкил, арил или гетероарил возможно замещен одной или несколькими группами, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксид, оксо, нитро, циано, C₁₋₆алкила, C₁₋₆алкокси, C₃₋₇циклоалкила, 3-12-членного гетероциклоалкила, 6-12-членного арила, 5-12-членного гетероарила, SR', S(=O)R', S(=O)₂R', S(=O)₂NR'(R''), NR'(R''), C(=O)R', C(=O)OR' и C(=O)NR'(R'');

R₁₇ и R₁₈ независимо представляют собой атом водорода, дейтерий, алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклоалкил, арил, гетероарил, SR', S(=O)R', S(=O)₂R', S(=O)₂NR'(R''), NR'(R''), C(=O)R', C(=O)OR' или C(=O)NR'(R''), при этом алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклоалкил, арил или гетероарил возможно замещен одной или несколькими группами, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксид, оксо, нитро, циано, C₁₋₆алкила, C₁₋₆алкокси, C₃₋₇циклоалкила, 3-12-членного гетероциклоалкила, 6-12-членного арила, 5-12-членного гетероарила, SR', S(=O)R', S(=O)₂R', S(=O)₂NR'(R''), NR'(R''), C(=O)R', C(=O)OR' и C(=O)NR'(R'');

R' и R'' независимо представляют собой атом водорода, дейтерий, гидроксид,

алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклоалкил, арил или гетероарил, при этом алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклоалкил, арил или гетероарил возможно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксигруппы, оксо-, нитро- и циано-;

5 m_1, n_1, p_1 и q_1 независимо равны 0, 1, 2, 3 или 4;



V1 представляет собой

или

$R_{b1}, R_{b2}, R_{b3}, R_{b4}, R_{b5}, R_{b6}$ и R_{b7} независимо представляют собой $-C(=O)-$, $-NHC(=O)-$, $-C(=O)O-$, $-C(=O)-(CH_2)_{z8}-O-$ или $-NHC(=O)-(CH_2)_{z9}-O-$;

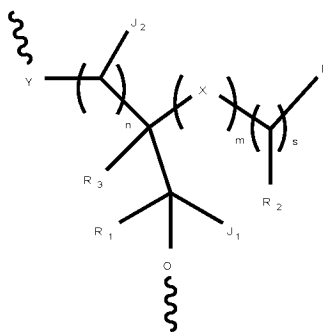
10 $z_1, z_2, z_3, z_4, z_5, z_6, z_7, z_8$ и z_9 независимо равны целым числам в диапазоне 0-10;

L_2 представляет собой C_1-C_{30} алкильную цепь или содержит C_1-C_{30} алкильную цепь, прерванную одним или несколькими атомами кислорода, серы или азота либо группой $C=O$;

r_1 представляет собой целое число в диапазоне 1-10.

15 В некоторых воплощениях, когда X представляет собой $NH-CO$, тогда R_1 не является H .

В некоторых воплощениях химическая модификация формулы (I) представляет собой химическую модификацию формулы (I-1):



(I-1),

20

где Y выбран из группы, состоящей из O, NH и S ;

каждый X независимо выбран из группы, состоящей из $CR_4(R_4')$, S, NR_5 и $NH-CO$, при этом каждый из R_4, R_4' и R_5 независимо представляет собой H или C_1-C_6 алкил;

25

каждый J_1 и каждый J_2 независимо представляет собой H или C_1-C_6 алкил;

n равно 0, 1 или 2; m равно 0, 1 или 2; s равно 0 или 1;

R_3 выбран из группы, состоящей из H, OH, галогена, NH_2 , C_1 - C_6 алкила, C_1 - C_6 алкокси, C_2 - C_6 алкенила, C_2 - C_6 алкинила, $S-CH_3$, $NCH_3(CH_3)$, $OCH_2CH_2OCH_3$, -О-алкиламино и $(CH_2)_pR_6$, при этом R_6 выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N_3 , C_2 - C_6 алкенила и C_2 - C_6 алкинила, и p равно 1, 2 или 3;

5 R_1 выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_6 алкила, C_1 - C_6 алкокси, C_2 - C_6 алкенила, C_2 - C_6 алкинила и $(CH_2)_qR_7$, при этом R_7 выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N_3 , C_2 - C_6 алкенила и C_2 - C_6 алкинила, и q равно 1, 2 или 3;

10 R_2 выбран из группы, состоящей из H, OH, галогена, NH_2 , C_1 - C_6 алкила, C_1 - C_6 алкокси, C_2 - C_6 алкенила, C_2 - C_6 алкинила, $S-CH_3$, $NCH_3(CH_3)$, $OCH_2CH_2OCH_3$, -О-алкиламино и $(CH_2)_rR_8$, где R_8 выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N_3 , C_2 - C_6 алкенила и C_2 - C_6 алкинила, и r равно 1, 2 или 3;

возможно, R_1 и R_2 связаны напрямую с образованием кольца;

В является таким, как определено в формуле (I).

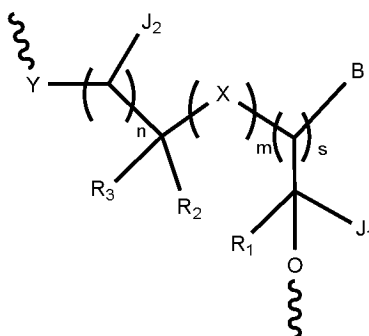
15 В некоторых воплощениях формулы (I-1) В выбрано из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях формулы (I-1) В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, C2-модифицированного
20 пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, O6-алкилгуанина, 7-деазапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, C5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

25 В некоторых воплощениях формулы (I-1) В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях формулы (I-1) В представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в соответствующем положении
30 антисмысловой цепи не модифицирован.

В некоторых воплощениях химическая модификация формулы (I) представляет собой химическую модификацию формулы (I-2):



(I-2),

где Y выбран из группы, состоящей из O, NH и S;

каждый X независимо выбран из группы, состоящей из $CR_4(R_4')$, S, NR_5 и NH-CO, при этом каждый из R_4 , R_4' и R_5 независимо представляет собой H или C_1 - C_6 алкил;

n равно 0, 1 или 2; m равно 0, 1 или 2; s равно 0 или 1;

каждый J_1 и каждый J_2 независимо представляет собой H или C_1 - C_6 алкил;

R_3 выбран из группы, состоящей из H, OH, галогена, NH_2 , C_1 - C_6 алкила, C_1 - C_6 алкокси, C_2 - C_6 алкенила, C_2 - C_6 алкинила, S- CH_3 , $NCH_3(CH_3)$, $OCH_2CH_2OCH_3$, -O-алкиламино и $(CH_2)_pR_6$, при этом R_6 выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N_3 , C_2 - C_6 алкенила и C_2 - C_6 алкинила, и p равно 1, 2 или 3;

R_1 выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_6 алкила, C_1 - C_6 алкокси, C_2 - C_6 алкенила, C_2 - C_6 алкинила и $(CH_2)_qR_7$, при этом R_7 выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N_3 , C_2 - C_6 алкенила и C_2 - C_6 алкинила, и q равно 1, 2 или 3;

R_2 выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_6 алкила, C_1 - C_6 алкокси, S- CH_3 , $NCH_3(CH_3)$, $OCH_2CH_2OCH_3$, -O-алкиламино и $(CH_2)_rR_8$, при этом R_8 выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N_3 , C_2 - C_6 алкенила и C_2 - C_6 алкинила, и r равно 1, 2 или 3;

возможно, R_1 и R_2 связаны напрямую с образованием кольца;

B является таким, как определено в формуле (I).

В некоторых воплощениях формулы (I-2) B выбрано из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях формулы (I-2) B выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, Об-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, C5-модифицированного пиримидина, тимина, индола,

5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях формулы (I-2) В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

5 В некоторых воплощениях формулы (I-2) В представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в соответствующем положении антисмысловой цепи не модифицирован.

10 В некоторых воплощениях каждый X независимо выбран из группы, состоящей из $CR_4(R_4')$, S, NR_5 и NH-CO, при этом каждый из R_4 , R_4' и R_5 независимо представляет собой H или C_1 - C_3 алкил;

n равно 0, 1 или 2; m равно 0, 1 или 2; s равно 0 или 1;

каждый J_1 и каждый J_2 независимо представляет собой H или C_1 - C_3 алкил;

15 R_3 выбран из группы, состоящей из H, OH, галогена, NH_2 , C_1 - C_3 алкила, C_1 - C_3 алкокси, C_2 - C_4 алкенила, C_2 - C_4 алкинила, S- CH_3 , $NCH_3(CH_3)$, $OCH_2CH_2OCH_3$, -O-алкиламино и $(CH_2)_pR_6$, при этом R_6 выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N_3 , C_2 - C_6 алкенила и C_2 - C_6 алкинила, и p равно 1, 2 или 3;

20 R_1 выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_3 алкила, C_1 - C_3 алкокси, C_2 - C_4 алкенила, C_2 - C_4 алкинила и $(CH_2)_qR_7$, при этом R_7 выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N_3 , C_2 - C_4 алкенила и C_2 - C_4 алкинила, и q равно 1, 2 или 3;

R_2 выбран из группы, состоящей из H, OH, галогена, NH_2 , C_1 - C_3 алкила, C_1 - C_3 алкокси, C_2 - C_4 алкенила, C_2 - C_4 алкинила, S- CH_3 , $NCH_3(CH_3)$, $OCH_2CH_2OCH_3$, -O-алкиламино и $(CH_2)_rR_8$, при этом R_8 выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N_3 , C_2 - C_4 алкенила и C_2 - C_4 алкинила, и r равно 1, 2 или 3;

25 возможно, R_1 и R_2 связаны напрямую с образованием кольца;

В является таким, как определено в формуле (I).

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

30 В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, C2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, Об-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, C5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 35 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина,

гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в соответствующем положении антисмысловой цепи не модифицирован.

В некоторых воплощениях каждый X независимо выбран из группы, состоящей из $CR_4(R_4')$, S, NR_5 и $NH-CO$, при этом каждый из R_4 , R_4' и R_5 независимо представляет собой H, метила, этила, *n*-пропила или изопропила;

n равно 0, 1 или 2; *m* равно 0, 1 или 2; *s* равно 0 или 1;

каждый J_1 и каждый J_2 независимо представляет собой H или метил;

R_3 выбран из группы, состоящей из H, OH, F, Cl, NH_2 , метила, этила, *n*-пропила, изопропила, метокси, этокси, *n*-пропокси, изопропокси, винила, аллила, этинила, пропаргила, $S-CH_3$, $NCH_3(CH_3)$, $OCH_2CH_2OCH_3$, -O-метиламино, -O-этиламино и $(CH_2)_pR_6$, при этом R_6 выбран из группы, состоящей из OH, F, Cl, метокси, этокси, N_3 , винила, аллила, этинила и пропаргила, и *p* равно 1 или 2;

R_1 выбран из группы, состоящей из H, метила, этила, *n*-пропила, изопропила, метокси, этокси, *n*-пропокси, изопропокси, винила, аллила, этинила, пропаргила и $(CH_2)_qR_7$, при этом R_7 выбран из группы, состоящей из OH, F, Cl, метокси, этокси, N_3 , винила, аллила, этинила и пропаргила, и *q* равно 1 или 2;

R_2 выбран из группы, состоящей из H, OH, F, Cl, NH_2 , метила, этила, *n*-пропила, изопропила, метокси, этокси, *n*-пропокси, изопропокси, винила, аллила, этинила, пропаргила, $S-CH_3$, $NCH_3(CH_3)$, $OCH_2CH_2OCH_3$, -O-метиламино, -O-этиламино и $(CH_2)_rR_8$, при этом R_8 выбран из группы, состоящей из OH, F, Cl, метокси, этокси, N_3 , винила, аллила, этинила и пропаргила, и *r* равно 1 или 2;

возможно, R_1 и R_2 связаны напрямую с образованием кольца;

В является таким, как определено в формуле (I).

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, C2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, O6-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, C5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина,

гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в соответствующем положении антисмысловой цепи не модифицирован.

В некоторых воплощениях Y представляет собой O или NH; каждый X независимо выбран из группы, состоящей из NH-CO, CH₂ и NH;

n равно 0 или 1; m равно 0 или 1; s равно 0 или 1;

каждый J₁ и каждый J₂ независимо представляет собой H;

R₁ выбран из группы, состоящей из H, метила и CH₂OH;

R₂ выбран из группы, состоящей из H, OH, NH₂, метила и CH₂OH;

R₃ выбран из группы, состоящей из H, OH, NH₂, метила и CH₂OH;

возможно, R₁ и R₂ связаны напрямую с образованием кольца;

В является таким, как определено в формуле (I).

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, C2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, O6-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, C5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в соответствующем положении антисмысловой цепи не модифицирован.

В некоторых воплощениях Y представляет собой O или NH; каждый X независимо выбран из группы, состоящей из NH-CO, CH₂ и NH;

n равно 0 или 1; m равно 0 или 1; s равно 0 или 1;

каждый J₁ и каждый J₂ независимо представляет собой H;

R₁ выбран из группы, состоящей из H, метила и CH₂OH;

R₂ выбран из группы, состоящей из H, метила и CH₂OH;

R₃ выбран из группы, состоящей из H, OH, NH₂, метила и CH₂OH;

возможно, R_1 и R_2 связаны напрямую с образованием кольца;

В является таким, как определено в формуле (I).

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

5 В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, С2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, Об-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 10 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, С5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

15 В некоторых воплощениях В представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в соответствующем положении антисмысловой цепи не модифицирован.

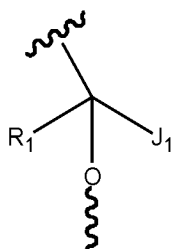
В некоторых воплощениях Y представляет собой O или NH;

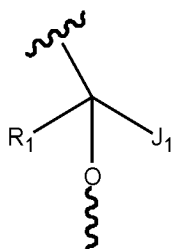
каждый X независимо выбран из группы, состоящей из $CR_4(R_4')$, NR_5 и 20 NH-CO, при этом каждый из R_4 , R_4' и R_5 независимо представляет собой H или C_1 - C_6 алкил;

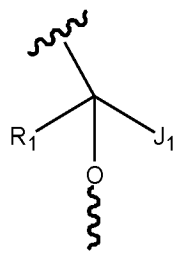
J_2 представляет собой H или C_1 - C_6 алкил;

n равно 0 или 1; m равно 0 или 1; s равно 0 или 1;

R_3 выбран из группы, состоящей из H, OH, NH_2 , C_1 - C_6 алкила, C_1 - C_6 алкокси и 25 $(CH_2)_pR_6$, при этом R_6 выбран из группы, состоящей из OH, метокси и этокси, и p равно 1, 2 или 3;



Q_1 представляет собой , а Q_2 представляет собой R_2 ; или Q_1



представляет собой R_2 , а Q_2 представляет собой

R_1 выбран из H, OH, C_1 - C_6 алкила, C_1 - C_6 алкокси и $(CH_2)_qR_7$, при этом R_7 выбран из группы, состоящей из OH, метокси и этокси, и q равно 1, 2 или 3;

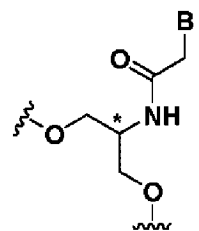
J_1 представляет собой H или C_1 - C_6 алкил;

5 R_2 выбран из группы, состоящей из H, OH, C_1 - C_6 алкила, C_1 - C_6 алкокси и $(CH_2)_rR_8$, при этом R_8 выбран из группы, состоящей из OH, метокси и этокси, и r равно 1, 2 или 3;

возможно, R_1 и R_2 связаны напрямую с образованием 3-6-членного кольца;

V представляет собой основание;

10 химическая модификация формулы (I), ее таутомерная форма или ее



фармацевтически приемлемая соль не представляет собой

В некоторых воплощениях X независимо выбран из группы, состоящей из $CR_4(R_4')$ и NH-CO.

15 В некоторых воплощениях X независимо выбран из группы, состоящей из $CR_4(R_4')$.

В некоторых воплощениях R_3 выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_6 алкила и $(CH_2)_pR_6$.

В некоторых воплощениях R_3 выбран из группы, состоящей из H и C_1 - C_6 алкила.

20 В некоторых воплощениях R_1 выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_6 алкила и $(CH_2)_qR_7$.

В некоторых воплощениях R_1 выбран из группы, состоящей из H и C_1 - C_6 алкила.

25 В некоторых воплощениях R_2 выбран из группы, состоящей из H, OH, C_1 - C_6 алкила и $(CH_2)_rR_8$.

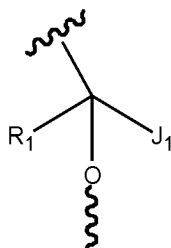
В некоторых воплощениях R_2 выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_6 алкила и $(CH_2)_rR_8$.

В некоторых воплощениях Y представляет собой O;

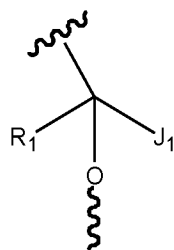
каждый X независимо выбран из группы, состоящей из $CR_4(R_4')$ и $NH-CO$, при этом каждый из R_4 и R_4' независимо представляет собой H или C_1-C_6 алкил;

J_2 представляет собой H или C_1-C_6 алкил;

5 R_3 выбран из группы, состоящей из H, C_1-C_6 алкила и $(CH_2)_pR_6$, при этом R_6 выбран из OH, и p равно 1, 2 или 3;



Q_1 представляет собой , а Q_2 представляет собой R_2 ; или Q_1



представляет собой R_2 , а Q_2 представляет собой ;

10 R_1 выбран из группы, состоящей из H, C_1-C_6 алкила и $(CH_2)_qR_7$, при этом R_7 выбран из OH, и q равно 1, 2 или 3;

J_1 представляет собой H или C_1-C_6 алкил;

R_2 выбран из группы, состоящей из H, OH, C_1-C_6 алкила и $(CH_2)_rR_8$, при этом R_8 выбран из OH, и r равно 1, 2 или 3;

возможно, R_1 и R_2 связаны напрямую с образованием 5-6-членного кольца;

15 В представляет собой основание.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

20 В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, C2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, Об-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, C5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

25 В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

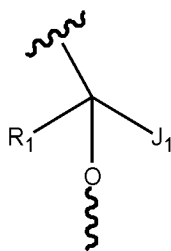
В некоторых воплощениях В представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в соответствующем положении антисмысловой цепи не модифицирован.

В некоторых воплощениях Y представляет собой O;

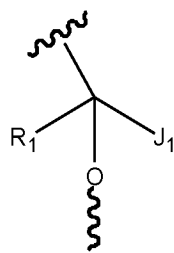
5 каждый X независимо выбран из $CR_4(R_4')$, при этом каждый из R_4 и R_4' независимо представляет собой H или C_1 - C_6 алкил;

J_2 представляет собой H;

R_3 выбран из группы, состоящей из H и C_1 - C_6 алкила;



Q_1 представляет собой , а Q_2 представляет собой R_2 ; или Q_1



10 представляет собой R_2 , а Q_2 представляет собой ;

R_1 выбран из группы, состоящей из H и C_1 - C_6 алкила;

J_1 представляет собой H или C_1 - C_6 алкил;

R_2 выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_6 алкила и $(CH_2)_rR_8$, при этом R_8 выбран из OH, и r равно 1, 2 или 3;

15 возможно, R_1 и R_2 связаны напрямую с образованием 5-6-членного кольца;

В представляет собой основание.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, C2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, Об-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, C5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

25

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина,

урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в соответствующем положении антисмысловой цепи не модифицирован.

5 В некоторых воплощениях Y представляет собой O.

В некоторых воплощениях X независимо выбран из группы, состоящей из $CR_4(R_4')$, NR_5 и $NH-CO$, при этом каждый из R_4 , R_4' и R_5 независимо представляет собой H, метил, этил, *n*-пропил или изопропил. В некоторых воплощениях X независимо выбран из группы, состоящей из $NH-CO$, CH_2 и NH . В некоторых воплощениях X независимо выбран из группы, состоящей из $NH-CO$ и CH_2 . В некоторых воплощениях X представляет собой CH_2 .

В некоторых воплощениях J_2 представляет собой H или метил. В некоторых воплощениях J_2 представляет собой H.

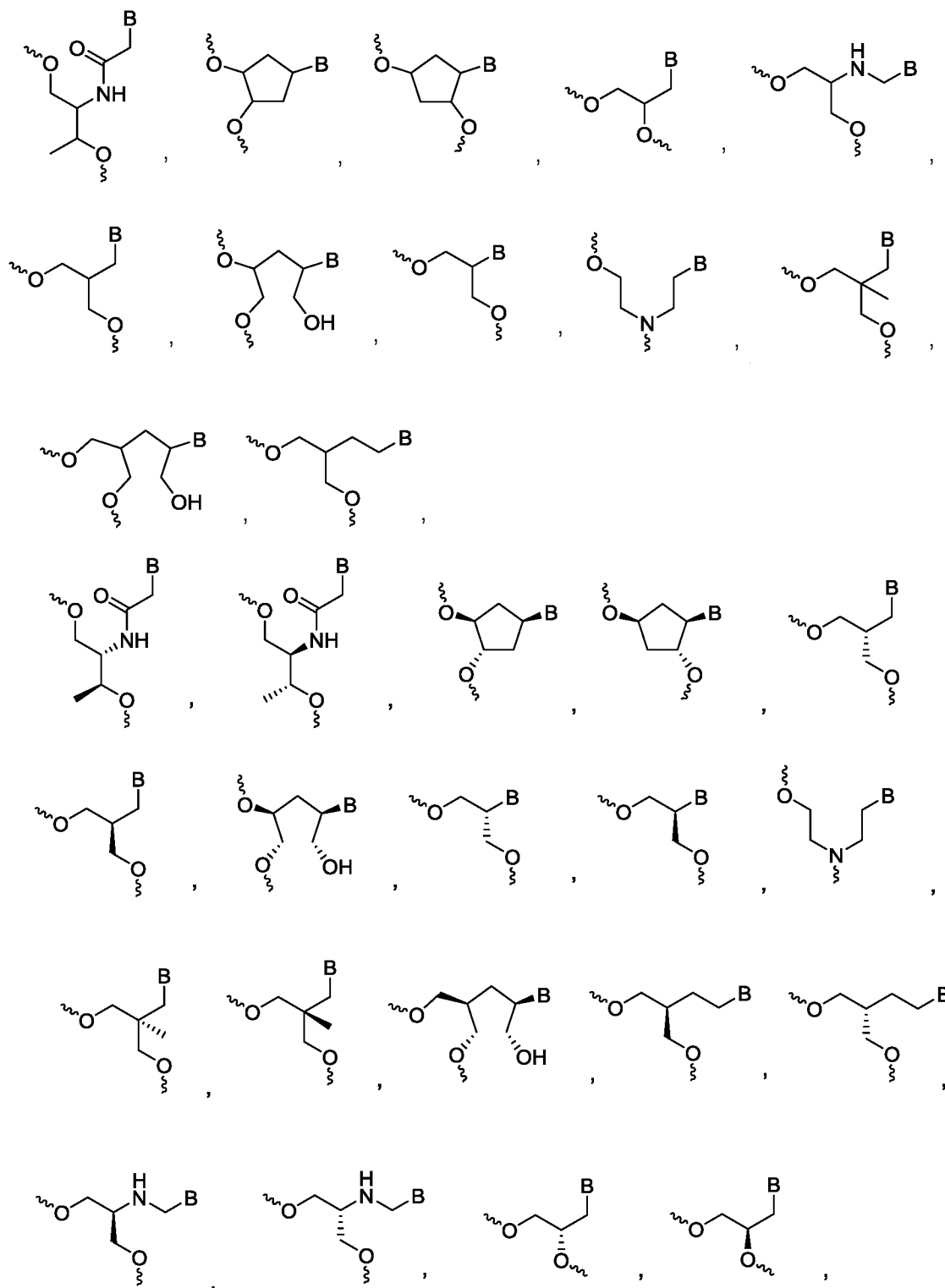
В некоторых воплощениях R_3 выбран из группы, состоящей из H, OH, NH_2 , метила, этила, *n*-пропила, изопропила, метокси, этокси, *n*-пропокси, изопропокси и $(CH_2)_pR_6$, при этом R_6 выбран из группы, состоящей из OH, метокси и этокси, и *p* равно 1 или 2. В некоторых воплощениях R_3 выбран из группы, состоящей из H, метила, этила, *n*-пропила, изопропила и $(CH_2)_pR_6$, при этом R_6 выбран из OH, и *p* равно 1 или 2. В некоторых воплощениях R_3 выбран из группы, состоящей из H и метила.

В некоторых воплощениях R_1 выбран из группы, состоящей из H, OH, метила, этила, *n*-пропила, изопропила, метокси, этокси, *n*-пропокси, изопропокси и $(CH_2)_qR_7$, при этом R_7 выбран из OH, и *q* равно 1 или 2. В некоторых воплощениях R_1 выбран из группы, состоящей из H, метила, этила, *n*-пропила, изопропила и $(CH_2)_qR_7$, при этом R_7 выбран из OH, и *q* равно 1 или 2. В некоторых воплощениях R_1 выбран из группы, состоящей из H и метила.

В некоторых воплощениях R_2 выбран из группы, состоящей из H, OH, метила, этила, *n*-пропила, изопропила, метокси, этокси, *n*-пропокси, изопропокси и $(CH_2)_rR_8$, при этом R_8 выбран из OH, и *r* равно 1 или 2. В некоторых воплощениях R_2 выбран из группы, состоящей из H, OH, метила, этила, *n*-пропила, изопропила и $(CH_2)_rR_8$, при этом R_8 выбран из OH, и *r* равно 1 или 2. В некоторых воплощениях R_2 выбран из группы, состоящей из H, метила и CH_2OH .

В некоторых воплощениях R_1 и R_2 связаны напрямую с образованием 5-6-членного кольца. В некоторых воплощениях R_1 и R_2 связаны напрямую с образованием 3-6-членного циклоалкила. В некоторых воплощениях R_1 и R_2 связаны напрямую с образованием циклопентила или циклогексила.

В некоторых воплощениях химическая модификация формулы (I) выбрана из любой из следующих структур:



5 при этом В выбрано из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

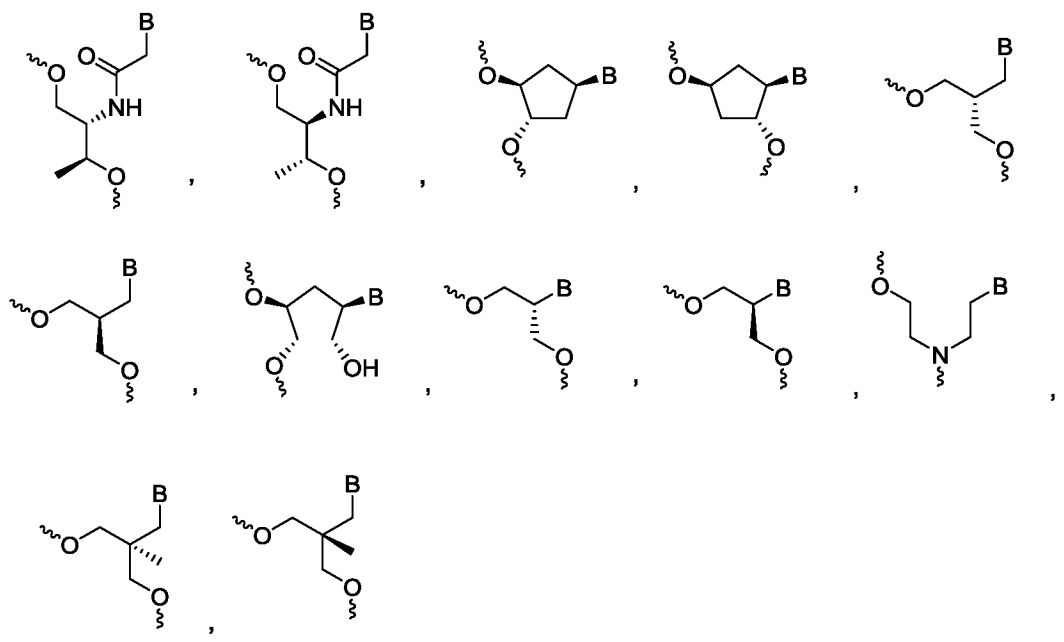
В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина,

гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, С2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, Об-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, С5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в соответствующем положении антисмысловой цепи не модифицирован.

В некоторых воплощениях химическая модификация формулы (I) выбрана из любой из следующих структур:



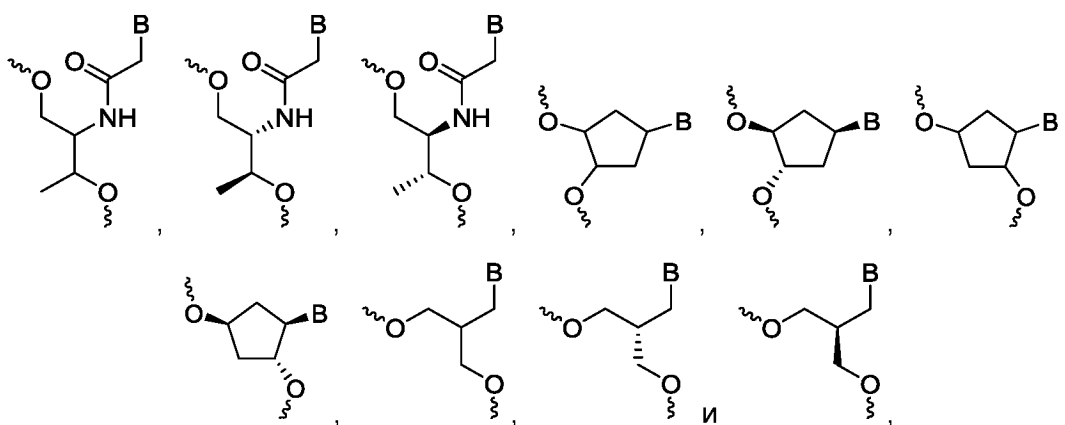
где В выбрано из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, С2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, Об-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, С5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в соответствующем положении антисмысловой цепи не модифицирован.

В некоторых воплощениях химическая модификация формулы (I) выбрана из любой из следующих структур:



10

где В выбрано из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, С2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, Об-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, С5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

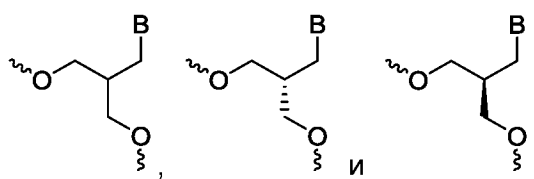
20

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в соответствующем положении антисмысловой цепи не модифицирован.

25

В некоторых воплощениях химическая модификация формулы (I) выбрана из любой из следующих структур:



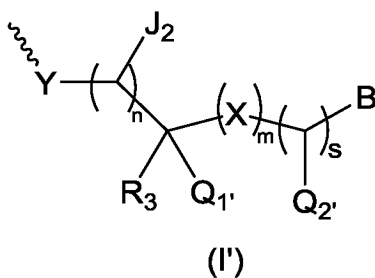
где В выбрано из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, С2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, Об-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, С5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в соответствующем положении антисмысловой цепи не модифицирован.

В некоторых воплощениях нуклеотид, содержащий химическую модификацию формулы (I), ее таутомер или ее фармацевтически приемлемую соль, представляет собой нуклеотид, содержащий химическую модификацию формулы (I'), ее таутомер или ее фармацевтически приемлемую соль:



где Y выбран из группы, состоящей из O, NH и S;

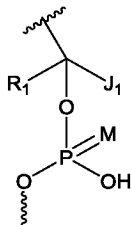
каждый X независимо выбран из группы, состоящей из CR₄(R₄'), S, NR₅ и NH-CO, при этом каждый из R₄, R₄' и R₅ независимо представляет собой H или C₁-C₆алкил;

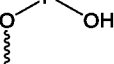
J₂ представляет собой H или C₁-C₆алкил;

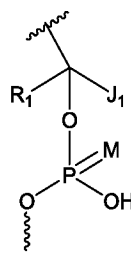
n равно 0, 1 или 2; m равно 0, 1 или 2; s равно 0 или 1;


R₃ выбран из группы, состоящей из H, OH, галогена, NH₂, C₁-C₆алкила,

C₁-C₆алкокси, C₂-C₆алкенила, C₂-C₆алкинила, S-CH₃, NCH₃(CH₃), OCH₂CH₂OCH₃, -O-алкиламино и (CH₂)_pR₆, при этом R₆ выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N₃, C₂-C₆алкенила и C₂-C₆алкинила, и p равно 1, 2 или 3;



Q₁ представляет собой , а Q₂ представляет собой R₂; или Q₁,



5 представляет собой R₂, а Q₂ представляет собой  ;

где

R₁ выбран из группы, состоящей из H, C₁-C₆алкила, C₁-C₆алкокси, C₂-C₆алкенила, C₂-C₆алкинила и (CH₂)_qR₇, при этом R₇ выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N₃, C₂-C₆алкенила и C₂-C₆алкинила, и q равно 1, 2

10 или 3;

J₁ представляет собой H или C₁-C₆алкил;

R₂ выбран из группы, состоящей из H, OH, галогена, NH₂, C₁-C₆алкила, C₁-C₆алкокси, C₂-C₆алкенила, C₂-C₆алкинила, S-CH₃, NCH₃(CH₃), OCH₂CH₂OCH₃, -O-алкиламино и (CH₂)_rR₈, при этом R₈ выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N₃, C₂-C₆алкенила и C₂-C₆алкинила, и r равно 1, 2 или 3;

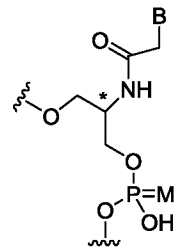
15

возможно, R₁ и R₂ связаны напрямую с образованием кольца;

B представляет собой основание;

M представляет собой O или S;

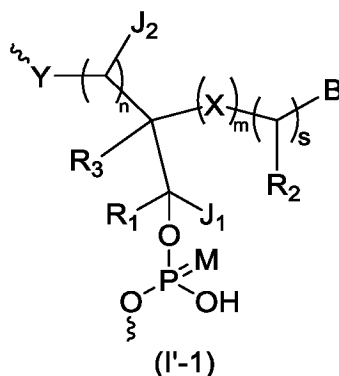
химическая модификация формулы (I'), ее таутомерная форма или ее



20 фармацевтически приемлемая соль не представляет собой .

В некоторых воплощениях, когда X представляет собой NH-CO, тогда R₁ не является H.

В некоторых воплощениях химическая модификация формулы (I') представляет собой химическую модификацию формулы (I'-1):



где Y выбран из группы, состоящей из O, NH и S;

каждый X независимо выбран из группы, состоящей из CR₄(R₄'), S, NR₅ и NH-CO, при этом каждый из R₄, R₄' и R₅ независимо представляет собой H или C₁-C₆алкил;

каждый J₁ и каждый J₂ независимо представляет собой H или C₁-C₆алкил;

n равно 0, 1 или 2; m равно 0, 1 или 2; s равно 0 или 1;

R₃ выбран из группы, состоящей из H, OH, галогена, NH₂, C₁-C₆алкил, C₁-C₆алкокси, C₂-C₆алкенила, C₂-C₆алкинила, S-CH₃, NCH₃(CH₃), OCH₂CH₂OCH₃, -O-алкиламино и (CH₂)_pR₆, при этом R₆ выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N₃, C₂-C₆алкенила и C₂-C₆алкинила, и p равно 1, 2 или 3;

R₁ выбран из группы, состоящей из H, C₁-C₆алкила, C₁-C₆алкокси, C₂-C₆алкенила, C₂-C₆алкинила и (CH₂)_qR₇, при этом R₇ выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N₃, C₂-C₆алкенила и C₂-C₆алкинила, и q равно 1, 2 или 3;

R₂ выбран из группы, состоящей из H, OH, галогена, NH₂, C₁-C₆алкила, C₁-C₆алкокси, C₂-C₆алкенила, C₂-C₆алкинила, S-CH₃, NCH₃(CH₃), OCH₂CH₂OCH₃, -O-алкиламино и (CH₂)_rR₈, при этом R₈ выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N₃, C₂-C₆алкенила и C₂-C₆алкинила, и r равно 1, 2 или 3;

M представляет собой O или S;

возможно, R₁ и R₂ связаны напрямую с образованием кольца;

V является таким, как определено в формуле (I').

В некоторых воплощениях формулы (I'-1) V выбрано из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

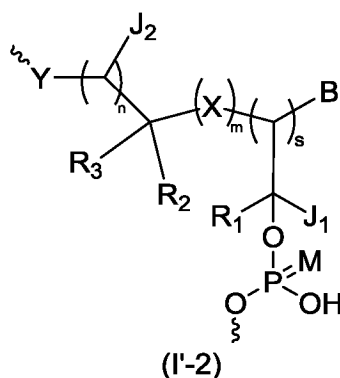
В некоторых воплощениях формулы (I'-1) V выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, C2-модифицированного

пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, O6-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, C5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях формулы (I'-1) В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях формулы (I'-1) В представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в соответствующем положении антисмысловой цепи не модифицирован.

В некоторых воплощениях химическая модификация формулы (I') представляет собой химическую модификацию формулы (I'-2):



где Y выбран из группы, состоящей из O, NH и S;

каждый X независимо выбран из группы, состоящей из $CR_4(R_4')$, S, NR_5 и $NH-CO$, при этом каждый из R_4 , R_4' и R_5 независимо представляет собой H или C_1-C_6 алкил;

n равно 0, 1 или 2; m равно 0, 1 или 2; s равно 0 или 1;

каждый J_1 и каждый J_2 независимо представляет собой H или C_1-C_6 алкил;

R_3 выбран из группы, состоящей из H, OH, галогена, NH_2 , C_1-C_6 алкила, C_1-C_6 алкокси, C_2-C_6 алкенила, C_2-C_6 алкинила, $S-CH_3$, $NCH_3(CH_3)$, $OCH_2CH_2OCH_3$, -O-алкиламино и $(CH_2)_pR_6$, при этом R_6 выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N_3 , C_2-C_6 алкенила и C_2-C_6 алкинила, и p равно 1, 2 или 3;

R_1 выбран из группы, состоящей из H, C_1-C_6 алкила, C_1-C_6 алкокси, C_2-C_6 алкенила, C_2-C_6 алкинила и $(CH_2)_qR_7$, при этом R_7 выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N_3 , C_2-C_6 алкенила и C_2-C_6 алкинила, и q равно 1, 2 или 3;

R_2 выбран из группы, состоящей из H, C_1-C_6 алкила, C_1-C_6 алкокси, $S-CH_3$,

$\text{NCH}_3(\text{CH}_3)$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, -О-алкиламино и $(\text{CH}_2)_r\text{R}_8$, при этом R_8 выбран из группы, состоящей из ОН, галогена, метокси, этокси, N_3 , C_2 - C_6 алкенила и C_2 - C_6 алкинила, и r равно 1, 2 или 3;

возможно, R_1 и R_2 связаны напрямую с образованием кольца;

5 M представляет собой О или S;

V является таким, как определено в формуле (I').

В некоторых воплощениях формулы (I'-2) V выбрано из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

10 В некоторых воплощениях формулы (I'-2) V выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, C_2 -модифицированного пурина, N_8 -модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N_6 -алкиладенина, O_6 -алкилгуанина, 7-деазапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, C_5 -модифицированного пиримидина, тимины, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях формулы (I'-2) V выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимины, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

20 В некоторых воплощениях формулы (I'-2) V представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в соответствующем положении антисмысловой цепи не модифицирован.

В некоторых воплощениях каждый X независимо выбран из группы, состоящей из $\text{CR}_4(\text{R}_4')$, S, NR_5 и NH-CO , при этом каждый из R_4 , R_4' и R_5 независимо представляет собой H или C_1 - C_3 алкил;

n равно 0, 1 или 2; m равно 0, 1 или 2; s равно 0 или 1;

каждый J_1 и каждый J_2 независимо представляет собой H или C_1 - C_3 алкил;

30 R_3 выбран из группы, состоящей из H, ОН, галогена, NH_2 , C_1 - C_3 алкила, C_1 - C_3 алкокси, C_2 - C_4 алкенила, C_2 - C_4 алкинила, S- CH_3 , $\text{NCH}_3(\text{CH}_3)$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, -О-алкиламино и $(\text{CH}_2)_p\text{R}_6$, при этом R_6 выбран из группы, состоящей из ОН, галогена, метокси, этокси, N_3 , C_2 - C_6 алкенила и C_2 - C_6 алкинила, и p равно 1, 2 или 3;

R_1 выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_3 алкила, C_1 - C_3 алкокси, C_2 - C_4 алкенила, C_2 - C_4 алкинила и $(\text{CH}_2)_q\text{R}_7$, при этом R_7 выбран из группы, состоящей из ОН, галогена, метокси, этокси, N_3 , C_2 - C_4 алкенила и C_2 - C_4 алкинила, и q равно 1, 2 или 3;

R_2 выбран из группы, состоящей из H, ОН, галогена, NH_2 , C_1 - C_3 алкила,

C₁-C₃алкокси, C₂-C₄алкенила, C₂-C₄алкинила, S-CH₃, NCH₃(CH₃), OCH₂CH₂OCH₃, -O-алкиламино и (CH₂)_rR₈, при этом R₈ выбран из группы, состоящей из OH, галогена, метокси, этокси, N₃, C₂-C₄алкенила и C₂-C₄алкинила, и r равно 1, 2 или 3;

возможно, R₁ и R₂ связаны напрямую с образованием кольца;

5 В является таким, как определено в формуле (I').

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, C2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, Об-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, C5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

15 В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в соответствующем положении антисмысловой цепи не модифицирован.

В некоторых воплощениях каждый X независимо выбран из группы, состоящей из CR₄(R₄'), S, NR₅ и NH-CO, при этом каждый из R₄, R₄' и R₅ независимо представляет собой H, метил, этил, *n*-пропил или изопропил;

n равно 0, 1 или 2; m равно 0, 1 или 2; s равно 0 или 1;

25 каждый J₁ и каждый J₂ независимо представляет собой H или метил;

R₃ выбран из группы, состоящей из H, OH, F, Cl, NH₂, метила, этила, *n*-пропила, изопропила, метокси, этокси, *n*-пропокси, изопропокси, винила, аллила, этинила, пропаргила, S-CH₃, NCH₃(CH₃), OCH₂CH₂OCH₃, -O-метиламино, -O-этиламино и (CH₂)_pR₆, при этом R₆ выбран из группы, состоящей из OH, F, Cl, метокси, этокси, N₃, винила, аллила, этинила и пропаргила, и p равно 1 или 2;

R₁ выбран из группы, состоящей из H, метила, этила, *n*-пропила, изопропила, метокси, этокси, *n*-пропокси, изопропокси, винила, аллила, этинила, пропаргила и (CH₂)_qR₇, при этом R₇ выбран из группы, состоящей из OH, F, Cl, метокси, этокси, N₃, винила, аллила, этинила и пропаргила, и q равно 1 или 2;

35 R₂ выбран из группы, состоящей из H, OH, F, Cl, NH₂, метила, этила, *n*-пропила, изопропила, метокси, этокси, *n*-пропокси, изопропокси, винила, аллила,

этинила, пропаргила, $S-CH_3$, $NCH_3(CH_3)$, $OCH_2CH_2OCH_3$, -О-метиламино, -О-этиламино и $(CH_2)_rR_8$, при этом R_8 выбран из группы, состоящей из OH, F, Cl, метокси, этокси, N_3 , винила, аллила, этинила и пропаргила, и r равно 1 или 2;

возможно, R_1 и R_2 связаны напрямую с образованием кольца;

5 В является таким, как определено в формуле (I').

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, C2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, Об-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, C5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

15 В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в соответствующем положении антисмысловой цепи не модифицирован.

В некоторых воплощениях Y представляет собой O или NH; каждый X независимо выбран из группы, состоящей из NH-CO, CH_2 и NH;

n равно 0 или 1; m равно 0 или 1; s равно 0 или 1;

каждый J_1 и каждый J_2 независимо представляет собой H;

25 R_1 выбран из группы, состоящей из H, метила и CH_2OH ;

R_2 выбран из группы, состоящей из H, OH, NH_2 , метила и CH_2OH ;

R_3 выбран из группы, состоящей из H, OH, NH_2 , метила и CH_2OH ;

возможно, R_1 и R_2 связаны напрямую с образованием кольца;

В является таким, как определено в формуле (I').

30 В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, C2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, Об-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила,

2-тиоуридина, 4-тиоуридина, С5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в соответствующем положении антисмысловой цепи не модифицирован.

В некоторых воплощениях Y представляет собой O или NH; каждый X независимо выбран из группы, состоящей из NH-CO, CH₂ и NH;

n равно 0 или 1; m равно 0 или 1; s равно 0 или 1;

каждый J₁ и каждый J₂ независимо представляет собой H;

R₁ выбран из группы, состоящей из H, метила и CH₂OH;

R₂ выбран из группы, состоящей из H, метила и CH₂OH;

R₃ выбран из группы, состоящей из H, OH, NH₂, метила и CH₂OH;

возможно, R₁ и R₂ связаны напрямую с образованием кольца;

В является таким, как определено в формуле (I').

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, С2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, O6-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, С5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в соответствующем положении антисмысловой цепи не модифицирован.

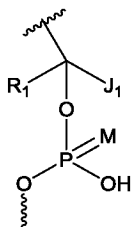
В некоторых воплощениях Y представляет собой O или NH;

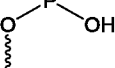
каждый X независимо выбран из группы, состоящей из CR₄(R₄'), NR₅ и NH-CO, при этом каждый из R₄, R₄' и R₅ независимо представляет собой H или C₁-C₆алкил;

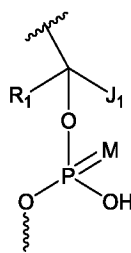
J_2 представляет собой H или C_1 - C_6 алкил;

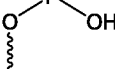
n равно 0 или 1; m равно 0 или 1; s равно 0 или 1;

R_3 выбран из группы, состоящей из H, OH, NH_2 , C_1 - C_6 алкила, C_1 - C_6 алкокси и $(CH_2)_pR_6$, при этом R_6 выбран из группы, состоящей из OH, метокси и этокси, и p равно 1, 2 или 3;



Q_1 представляет собой , а Q_2 представляет собой R_2 ; или Q_1 ,



представляет собой R_2 , а Q_2 представляет собой  ;

R_1 выбран из H, OH, C_1 - C_6 алкила, C_1 - C_6 алкокси и $(CH_2)_qR_7$, при этом R_7 выбран из группы, состоящей из OH, метокси и этокси, и q равно 1, 2 или 3;

10 J_1 представляет собой H или C_1 - C_6 алкил;

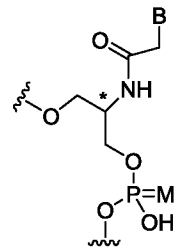
R_2 выбран из группы, состоящей из H, OH, C_1 - C_6 алкила, C_1 - C_6 алкокси и $(CH_2)_rR_8$, при этом R_8 выбран из группы, состоящей из OH, метокси и этокси, и r равно 1, 2 или 3;

возможно, R_1 и R_2 связаны напрямую с образованием 3-6-членного кольца;

15 M представляет собой O или S;

V представляет собой основание;

химическая модификация формулы (I'), ее таутомерная форма или ее



фармацевтически приемлемая соль не представляет собой

20 В некоторых воплощениях X независимо выбран из группы, состоящей из $CR_4(R_4')$ и $NH-CO$.

В некоторых воплощениях X независимо выбран из группы, состоящей из $CR_4(R_4')$.

В некоторых воплощениях R_3 выбран из группы, состоящей из H,

C_1 - C_6 алкила и $(CH_2)_pR_6$.

В некоторых воплощениях R_3 выбран из группы, состоящей из H и C_1 - C_6 алкила.

В некоторых воплощениях, R_1 выбран из группы, состоящей из H,
5 C_1 - C_6 алкила и $(CH_2)_qR_7$.

В некоторых воплощениях R_1 выбран из группы, состоящей из H и C_1 - C_6 алкила.

В некоторых воплощениях R_2 выбран из группы, состоящей из H, OH,
10 C_1 - C_6 алкила и $(CH_2)_rR_8$.

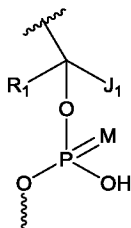
В некоторых воплощениях R_2 выбран из группы, состоящей из H,
10 C_1 - C_6 алкила и $(CH_2)_rR_8$.

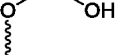
В некоторых воплощениях Y представляет собой O;

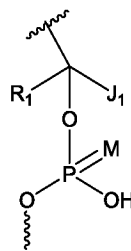
каждый X независимо выбран из группы, состоящей из $CR_4(R_4')$ и NH-CO, при этом каждый из R_4 и R_4' независимо представляет собой H или C_1 - C_6 алкил;


15 J_2 представляет собой H или C_1 - C_6 алкил;

R_3 выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_6 алкила и $(CH_2)_pR_6$, при этом R_6 выбран из OH, и p равно 1, 2 или 3;



Q_1 представляет собой , а Q_2 представляет собой R_2 ; или Q_1 ,



представляет собой R_2 , а Q_2 представляет собой  ;

20 R_1 выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_6 алкила и $(CH_2)_qR_7$, при этом R_7 выбран из OH, и q равно 1, 2 или 3;

J_1 представляет собой H или C_1 - C_6 алкил;

R_2 выбран из группы, состоящей из H, OH, C_1 - C_6 алкила и $(CH_2)_rR_8$, при этом R_8 выбран из OH, и r равно 1, 2 или 3;

25 возможно, R_1 и R_2 связаны напрямую с образованием 5-6-членного кольца;

M представляет собой O или S;

V представляет собой основание.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, С2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, Об-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, С5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

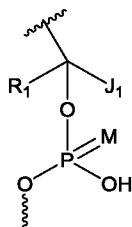
В некоторых воплощениях В представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в соответствующем положении антисмысловой цепи не модифицирован.


В некоторых воплощениях Y представляет собой O;

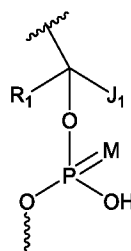
каждый X независимо выбран из $CR_4(R_4')$, при этом каждый из R_4 и R_4' независимо представляет собой H или C_1 - C_6 алкил;


J_2 представляет собой H;

R_3 выбран из группы, состоящей из H и C_1 - C_6 алкила;



Q_1 представляет собой , а Q_2 представляет собой R_2 ; или Q_1 ,



представляет собой R_2 , а Q_2 представляет собой  ;

R_1 выбран из группы, состоящей из H и C_1 - C_6 алкила;

J_1 представляет собой H или C_1 - C_6 алкил;

R_2 выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_6 алкила и $(CH_2)_rR_8$, при этом R_8 выбран из OH, и r равно 1, 2 или 3;

возможно, R_1 и R_2 связаны напрямую с образованием 5-6-членного кольца;

М представляет собой О или S;

В представляет собой основание.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

5 В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, С2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, Об-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила,
10 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, С5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

15 В некоторых воплощениях В представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в соответствующем положении антисмысловой цепи не модифицирован.

В некоторых воплощениях Y представляет собой О.

В некоторых воплощениях X независимо выбран из группы, состоящей из
20 $CR_4(R_4')$, NR_5 и $NH-CO$, при этом каждый из R_4 , R_4' и R_5 независимо представляет собой H, метил, этил, *n*-пропил или изопропил. В некоторых воплощениях X независимо выбран из группы, состоящей из $NH-CO$, CH_2 и NH . В некоторых воплощениях X независимо выбран из группы, состоящей из $NH-CO$ и CH_2 . В некоторых воплощениях X представляет собой CH_2 .

25 В некоторых воплощениях J_2 представляет собой H или метил. В некоторых воплощениях J_2 представляет собой H.

В некоторых воплощениях R_3 выбран из группы, состоящей из H, OH, NH_2 , метила, этила, *n*-пропила, изопропила, метокси, этокси, *n*-пропокси, изопропокси и $(CH_2)_pR_6$, при этом R_6 выбран из группы, состоящей из OH, метокси и этокси, и р
30 равно 1 или 2. В некоторых воплощениях R_3 выбран из группы, состоящей из H, метила, этила, *n*-пропила, изопропила и $(CH_2)_pR_6$, при этом R_6 выбран из OH, и р равно 1 или 2. В некоторых воплощениях R_3 выбран из группы, состоящей из H и метила.

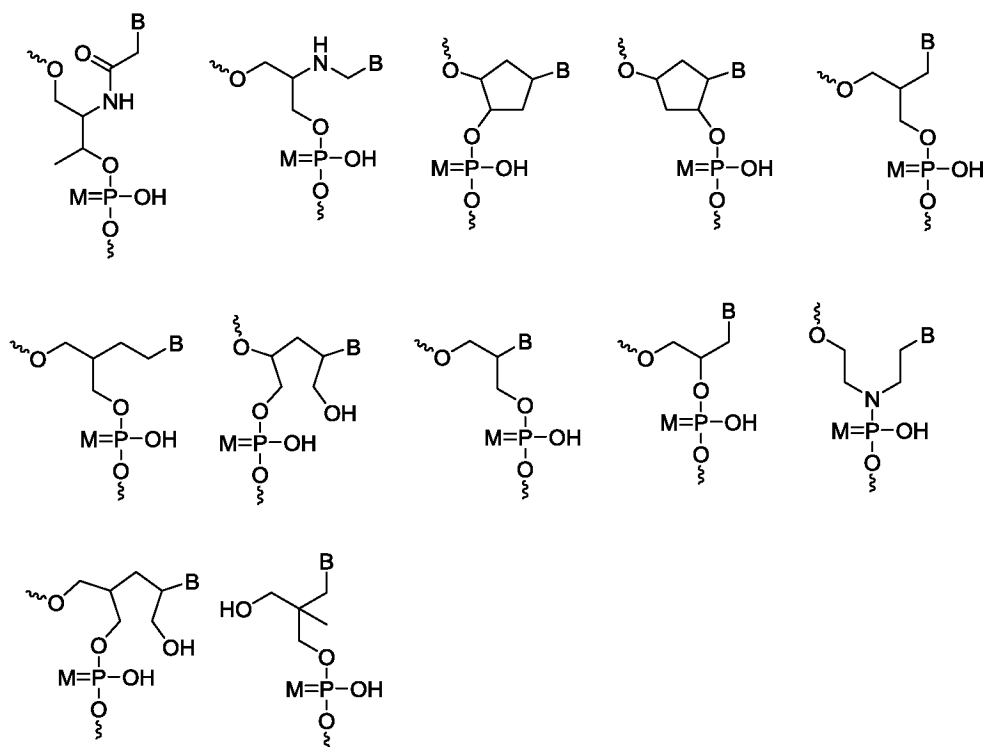
В некоторых воплощениях R_1 выбран из группы, состоящей из H, OH, метила,
35 этила, *n*-пропила, изопропила, метокси, этокси, *n*-пропокси, изопропокси и $(CH_2)_qR_7$, при этом R_7 выбран из OH, и q равно 1 или 2. В некоторых воплощениях R_1 выбран

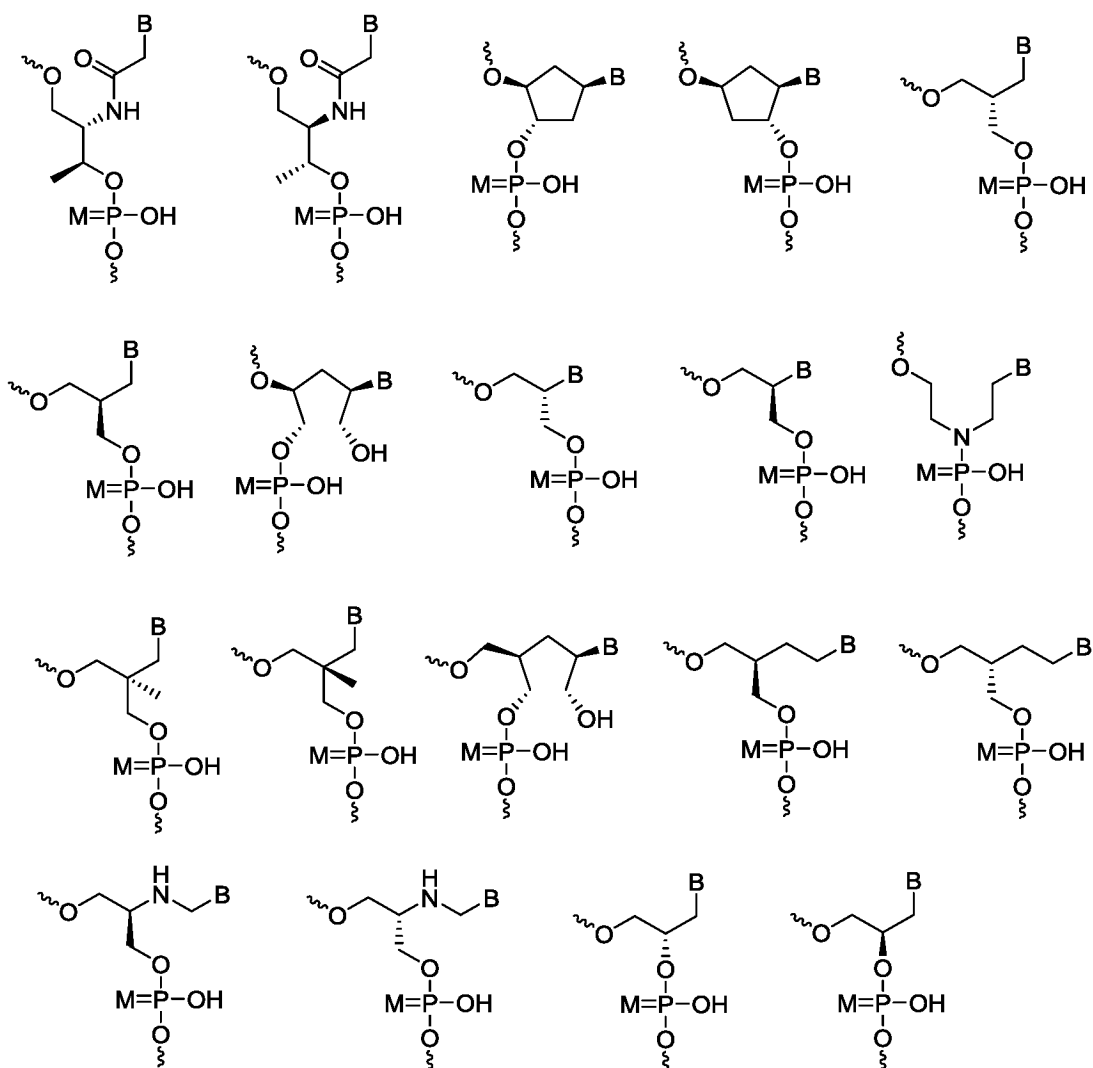
из группы, состоящей из H, метила, этила, *n*-пропила, изопропила и $(\text{CH}_2)_q\text{R}_7$, при этом R_7 выбран из OH, и q равно 1 или 2. В некоторых воплощениях R_1 выбран из группы, состоящей из H и метила.

В некоторых воплощениях R_2 выбран из группы, состоящей из H, OH, метила, этила, *n*-пропила, изопропила, метокси, этокси, *n*-пропокси, изопропокси и $(\text{CH}_2)_r\text{R}_8$, при этом R_8 выбран из OH, и r равно 1 или 2. В некоторых воплощениях R_2 выбран из группы, состоящей из H, OH, метила, этила, *n*-пропила, изопропила и $(\text{CH}_2)_r\text{R}_8$, при этом R_8 выбран из OH, и r равно 1 или 2. В некоторых воплощениях R_2 выбран из группы, состоящей из H, метила и CH_2OH .

В некоторых воплощениях R_1 и R_2 связаны напрямую с образованием 5-6-членного кольца. В некоторых воплощениях R_1 и R_2 связаны напрямую с образованием 3-6-членного циклоалкила. В некоторых воплощениях R_1 и R_2 связаны напрямую с образованием цикlopентила или циклогексила.

В некоторых воплощениях химическая модификация формулы (I') выбрана из любой из следующих структур:





где М представляет собой О или S;

В выбрано из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

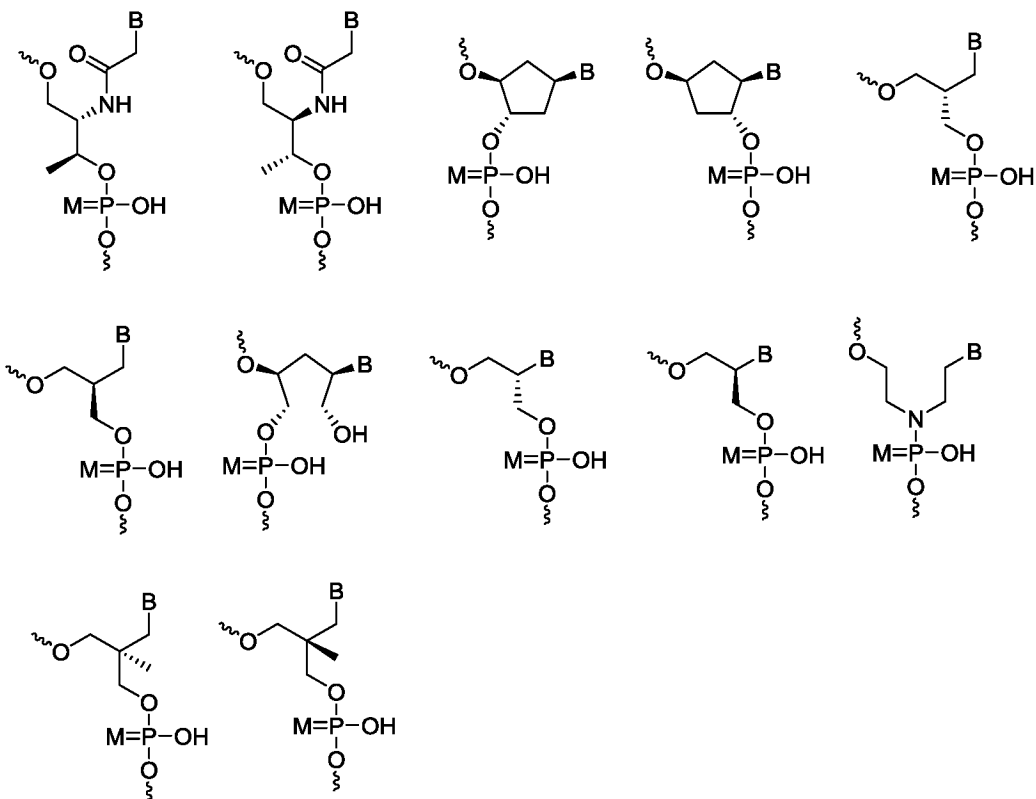
- 5 В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, С2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, O6-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 10 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, С5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

- 15 В некоторых воплощениях В представляет собой такое же основание, как и в

том случае, когда нуклеотид в соответствующем положении антисмысловой цепи не модифицирован.

В некоторых воплощениях химическая модификация формулы (I') выбрана из любой из следующих структур:



5

где М представляет собой О или S;

В выбрано из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, C2-модифицированного пурина, N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, O6-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, C5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

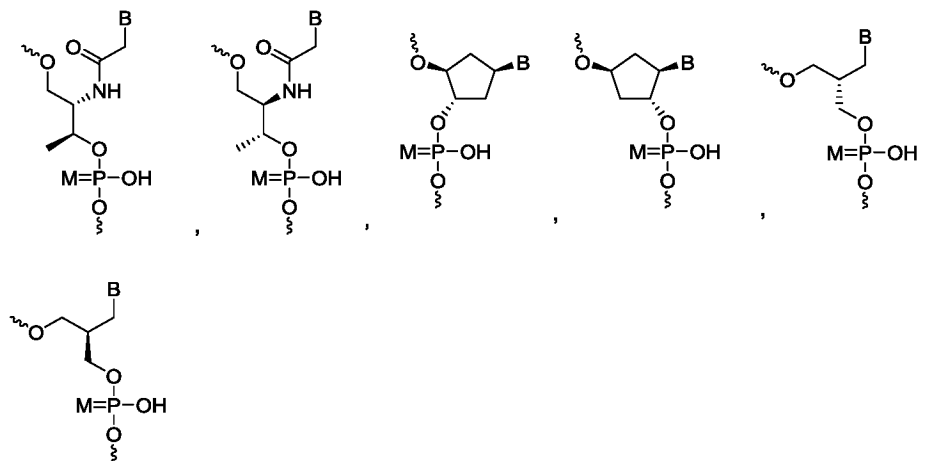
В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в соответствующем положении антисмысловой цепи не

20

модифицирован.

В некоторых воплощениях химическая модификация формулы (I') выбрана из любой из следующих структур:



5 где M представляет собой O или S;

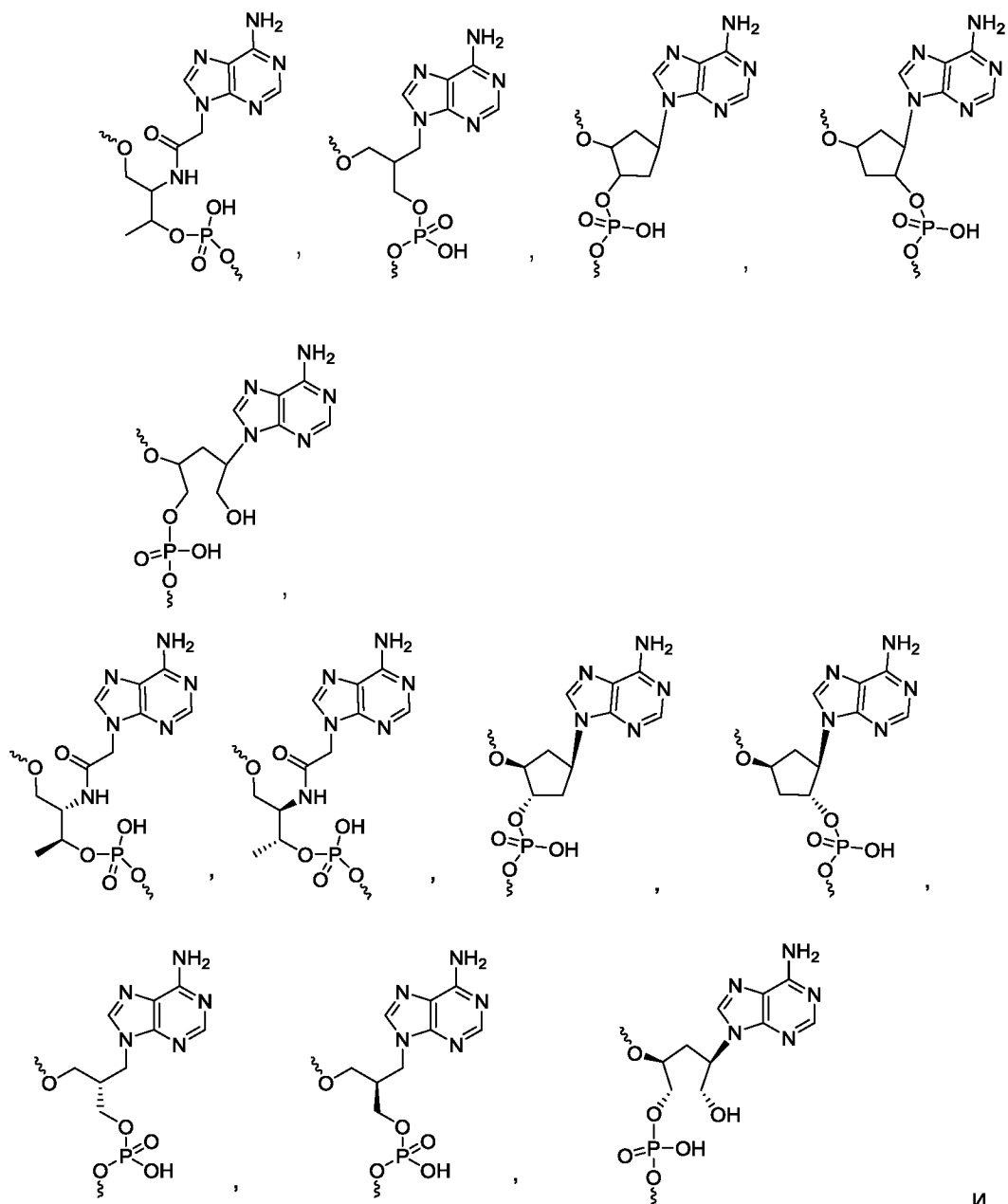
В выбрано из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, C2-модифицированного пурина,
 10 N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, Об-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, C5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

15 В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в соответствующем положении антисмысловой цепи не
 20 модифицирован.

В некоторых воплощениях химическая модификация формулы (I') выбрана из любой из следующих структур:



и таких,

- 5 когда аденин в структуре заменен на гуанин, цитозин, урацил или тимин.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из пуриновых оснований, пиримидиновых оснований, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

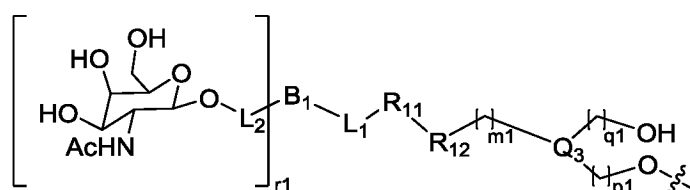
- В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, изогуанина, гипоксантина, ксантина, С2-модифицированного пурина, 10 N8-модифицированного пурина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, N6-алкиладенина, O6-алкилгуанина, 7-дезапурина, цитозина, 5-метилцитозина, изоцитозина, псевдоцитозина, урацила, псевдоурацила,

2-тиоуридина, 4-тиоуридина, C5-модифицированного пиримидина, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

В некоторых воплощениях В представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в соответствующем положении антисмысловой цепи не модифицирован.

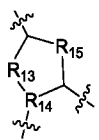
В некоторых воплощениях лиганд представляет собой соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль:



(II) , где

L₁ представляет собой C₁-C₃₀алкильную цепь или содержит C₁-C₃₀алкильную цепь, прерванную одним или несколькими атомами кислорода, серы или азота либо группой C=O;

R₁₁ и R₁₂ независимо представляют собой химические связи, NR₁₆ или C=O;



Q₃ представляет собой ;

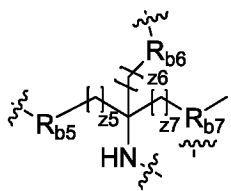
R₁₃ представляет собой CR₁₇R₁₈, NR₁₆, O или S;

R₁₄ представляет собой CR₁₉;

R₁₅ независимо представляет собой CR₁₇R₁₈, NR₁₆ или O;

радикалы от R₁₆ до R₁₉ независимо представляют собой атом водорода, дейтерий или алкил;

m₁, p₁ и q₁ независимо равны 0, 1, 2, 3 или 4;



B₁ представляет собой ;

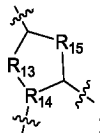
R_{b5}, R_{b6} и R_{b7} независимо представляют собой -C(=O)-, -NHC(=O)-, -C(=O)O-, -C(=O)-(CH₂)₂₈-O- или -NHC(=O)-(CH₂)₂₉-O-;

z₅, z₆, z₇, z₈ и z₉ независимо равны целым числам в диапазоне 0-10;

L_2 представляет собой C_1 - C_{30} алкильную цепь или содержит C_1 - C_{30} алкильную цепь, прерванную одним или несколькими атомами кислорода, серы или азота либо группой $C=O$;

r_1 представляет собой целое число в диапазоне 1-10.

- 5 В некоторых воплощениях L_1 представляет собой $-(CH_2)_{j_{11}}-C(=O)-(CH_2)_{j_{12}}-$;
 R_{11} и R_{12} независимо представляют собой химические связи, NR_{16} или $C=O$;
 R_{16} представляет собой атом водорода или C_{1-6} алкил;



Q_3 представляет собой

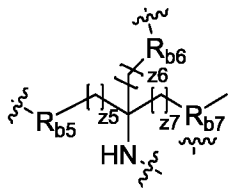
R_{13} представляет собой $CR_{17}R_{18}$ или O ;

- 10 R_{14} представляет собой CR_{19} ;

R_{15} независимо представляет собой $CR_{17}R_{18}$ или O ;

радикалы от R_{16} до R_{19} независимо представляют собой атом водорода или алкил;

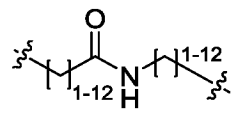
m_1 , p_1 и q_1 независимо равны 0 или 1;



- 15 B_1 представляет собой

R_{b5} , R_{b6} и R_{b7} независимо представляют собой $-C(=O)-(CH_2)_{z8}-O-$ или $-NHC(=O)-(CH_2)_{z9}-O-$;

z_8 и z_9 независимо равны целым числам в диапазоне 0-10;



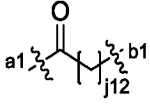
- 20 L_2 представляет собой $-(CH_2)_{j_{15}}-(OCH_2CH_2)_{1-4}-(CH_2)_{j_{16}}-$ или

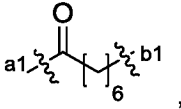
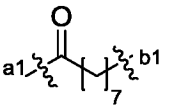
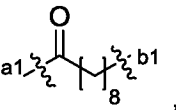
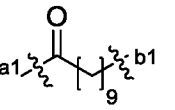
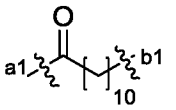
j_{15} и j_{16} независимо равны целым числам в диапазоне 0-4;

r_1 равно 3, 4, 5 или 6.

- 25 В некоторых воплощениях L_1 может представлять собой L_3 или $L_3-R_{110}-R_{111}-L_3$, при этом L_3 независимо представляет собой C_1 - C_{12} алкильную цепь, $-(CH_2)_{j_{11}}-C(=O)-(CH_2)_{j_{12}}-$ или $-(CH_2)_{j_{13}}-(CH_2CH_2O)_{1-4}-(CH_2)_{j_{14}}-$; R_{110} и R_{111} независимо представляют собой химические связи, $-NR_{112}-$, $-C(=O)-$ или $-OC(=O)-$; R_{112} представляет собой атом водорода или C_1 - C_{12} алкил; j_{11} , j_{12} , j_{13} и j_{14} независимо равны целым числам в диапазоне 0-10. В некоторых воплощениях j_{11} , j_{12} , j_{13} и j_{14} независимо равны целым числам в диапазоне 0-2 или 4-10. В некоторых воплощениях j_{11} , j_{12} , j_{13} и j_{14} независимо равны 0, 1, 2, 6, 7, 8, 9 или 10.

В некоторых воплощениях L_1 может представлять собой $-(CH_2)_{j11}-C(=O)-(CH_2)_{j12}-$, где $j11$ и $j12$ являются такими, как определено в любом из предшествующих воплощений.

В некоторых воплощениях L_1 может представлять собой , а $j12$ является таким, как определено в любом из предшествующих воплощений, при этом конец $a1$ присоединен к B_1 , а конец $b1$ присоединен к R_{11} .

В некоторых воплощениях L_1 может представлять собой , , ,  или , при этом конец $a1$ присоединен к B_1 , а конец $b1$ присоединен к R_{11} .

В некоторых воплощениях R_{11} может представлять собой химическую связь, а R_{12} может представлять собой $C=O$.

В некоторых воплощениях R_{11} может представлять собой химическую связь, а R_{12} может представлять собой NR_{16} , при этом R_{16} является таким, как определено в любом из предшествующих воплощений.

В некоторых воплощениях R_{11} может представлять собой химическую связь, а R_{12} может представлять собой $-OC(=O)-$.

В некоторых воплощениях R_{11} может представлять собой NR_{16} , а R_{12} может представлять собой $C=O$, при этом R_{16} является таким, как определено в любом из предшествующих воплощений.

В некоторых воплощениях R_1 может представлять собой NR_{16} , а R_{12} может представлять собой $-OC(=O)-$, при этом R_{16} является таким, как определено в любом из предшествующих воплощений.

В некоторых воплощениях R_{12} может представлять собой NR_{16} , а R_{11} может представлять собой $C=O$, при этом R_{16} является таким, как определено в любом из предшествующих воплощений.

В некоторых воплощениях R_{12} может представлять собой NR_{16} , а R_{11} может представлять собой $-OC(=O)-$, при этом R_{16} является таким, как определено в любом из предшествующих воплощений.

В некоторых воплощениях R_{11} может представлять собой NH , а R_{12} может представлять собой $C=O$.

В некоторых воплощениях R_{12} может представлять собой NH , а R_{11} может

представлять собой C=O.

В некоторых воплощениях R_{16} может представлять собой атом водорода или C_{1-6} алкил.

В некоторых воплощениях R_{16} может представлять собой атом водорода, метил, этил, пропил или изопропил.

В некоторых воплощениях R_{16} может представлять собой атом водорода.

В некоторых воплощениях R_{17} и R_{18} могут представлять собой атом водорода.

В некоторых воплощениях R_{19} может представлять собой атом водорода.

В некоторых воплощениях, когда присутствует кольцо А, тогда кольцо А может представлять собой C_{6-12} арил.

В некоторых воплощениях кольцо А может представлять собой фенил.

В некоторых воплощениях m_1 может составлять 0 или 1.

В некоторых воплощениях m_1 может составлять 3.

В некоторых воплощениях n_1 может составлять 0 или 1.

В некоторых воплощениях p_1 и q_1 независимо составляют 0 или 1.

В некоторых воплощениях p_1 равно 1, и q_1 равно 1.

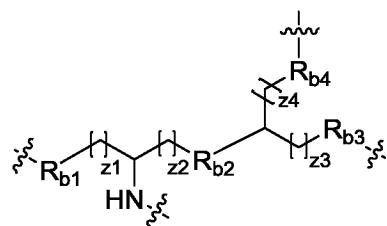
В некоторых воплощениях p_1 равно 1, а q_1 равно 0.

В некоторых воплощениях p_1 равно 0, а q_1 равно 1.

В некоторых воплощениях p_1 равно 0, и q_1 равно 0.

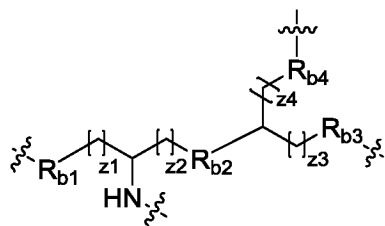
В некоторых воплощениях $z_1, z_2, z_3, z_4, z_5, z_6, z_7, z_8$ и z_9 могут независимо составлять целые числа в диапазоне 0-4. В некоторых воплощениях $z_1, z_2, z_3, z_4, z_5, z_6, z_7, z_8$ и z_9 могут независимо составлять целые числа 0, 1 или 2.

В некоторых воплощениях V_1 может представлять собой



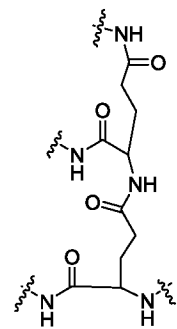
, при этом R_{b1}, R_{b2}, R_{b3} и R_{b4} независимо представляют собой -C(=O)- или -NHC(=O)-; атом N присоединен к L_1 ; z_1, z_2, z_3 и z_4 являются такими, как определено в любом из предшествующих воплощений.

В некоторых воплощениях V_1 может представлять собой

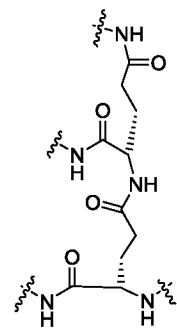


5 , при этом R_{b1} , R_{b2} , R_{b3} и R_{b4} независимо представляют собой $-C(=O)-$ или $-NHC(=O)-$; атом N присоединен к L_1 ; R_{b1} , R_{b3} и R_{b4} являются одинаковыми; $z1$, $z2$, $z3$ и $z4$ являются такими, как определено в любом из предшествующих воплощений.

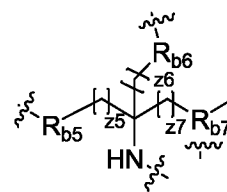
В некоторых воплощениях V_1 может представлять собой



В некоторых воплощениях V_1 может представлять собой

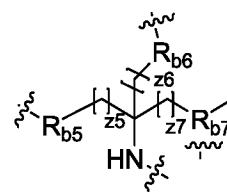


В некоторых воплощениях V_1 может представлять собой



10 при этом R_{b5} , R_{b6} и R_{b7} независимо представляют собой $-C(=O)-(CH_2)_{z8}-O-$ или $-NHC(=O)-(CH_2)_{z9}-O-$; атом N присоединен к L_1 ; $z5$, $z6$, $z7$, $z8$ и $z9$ являются такими, как определено в любом из предшествующих воплощений.

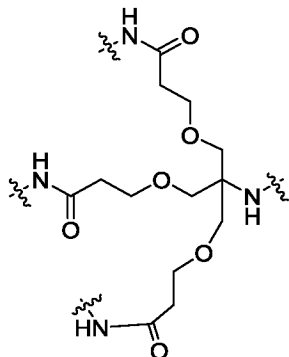
В некоторых воплощениях V_1 может представлять собой



при этом R_{b5} , R_{b6} и R_{b7} независимо представляют собой $-C(=O)-(CH_2)_{z8}-O-$ или $-NHC(=O)-(CH_2)_{z9}-O-$; атом N присоединен к L_1 ; R_{b5} , R_{b6} и R_{b7} являются одинаковыми;

z5, z6, z7, z8 и z9 являются такими, как определено в любом из предшествующих воплощений.

В некоторых воплощениях В₁ может представлять собой



- 5 В некоторых воплощениях L₂ может представлять собой L₄ или L₄-R₁₃-R₁₄-L₄, при этом L₄ независимо представляет собой C₁-C₁₂алкильную цепь или -(CH₂)_{j15}-(OCH₂CH₂)₁₋₄-(CH₂)_{j16}-; R₁₃ и R₁₄ независимо представляют собой химические связи, -NR₁₁₅-, -C(=O)- или -OC(=O)-; R₁₁₅ независимо представляет собой атом водорода или C₁-C₁₂алкил; j15 и j16 независимо равны целым числам в диапазоне 0-10. В некоторых воплощениях j15 и j16 независимо равны целым числам в диапазоне 0-6. В некоторых воплощениях j15 и j16 независимо равны 0, 1, 2, 3 или 4.

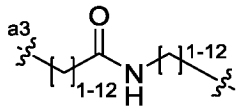
- 15 В некоторых воплощениях L₂ может представлять собой -(CH₂)_{j15}-(OCH₂CH₂)₁₋₄-(CH₂)_{j16}-, где j15 и j16 являются такими, как определено в любом из предшествующих воплощений.

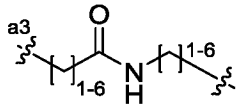
В некоторых воплощениях L₂ может представлять собой или . В некоторых воплощениях L₂ может представлять собой , при этом одна сторона присоединена к атому O, а другая сторона присоединена к В₁.

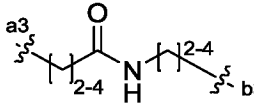
- 20 В некоторых воплощениях L₂ может представлять собой C₁-C₁₂алкильную цепь.

В некоторых воплощениях L₂ может представлять собой , , или .

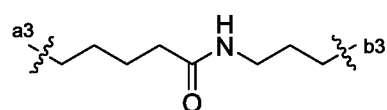
- 25 В некоторых воплощениях L₂ может представлять собой . В

некоторых воплощениях L_2 может представлять собой  . В

некоторых воплощениях L_2 может представлять собой  . В

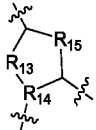
некоторых воплощениях L_2 может представлять собой  , где конец a_3 присоединен к атому О, а конец b_3 присоединен к B_1 .

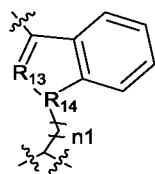
5 В некоторых воплощениях L_2 может представлять собой

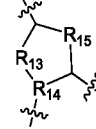


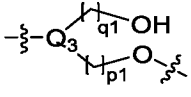
, где конец a_3 присоединен к атому О, а конец b_3 присоединен к B_1 .

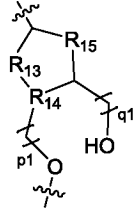
В некоторых воплощениях r_1 может составлять 3, 4, 5 или 6. В некоторых воплощениях r_1 может составлять 3.

10 В некоторых воплощениях Q_3 может представлять собой  или

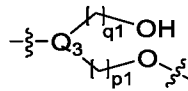


. В некоторых воплощениях Q_3 может представлять собой  , где R_{13} , R_{14} , R_{15} и n_1 являются такими, как определено в любом из предшествующих воплощений.

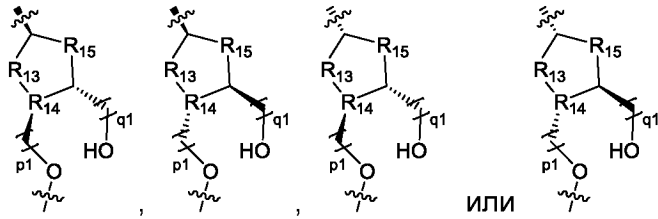
В некоторых воплощениях  может представлять собой

15  , где R_{13} , R_{14} , R_{15} , p_1 и q_1 являются такими, как определено в любом из предшествующих воплощений.

В некоторых воплощениях



может представлять собой

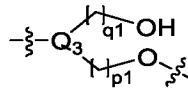


или

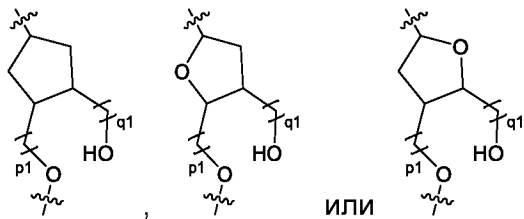
, где R₁₃, R₁₄, R₁₅, p1 и q1 являются

такими, как определено в любом из предшествующих воплощений.

В некоторых воплощениях



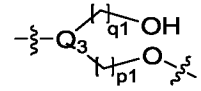
может представлять собой



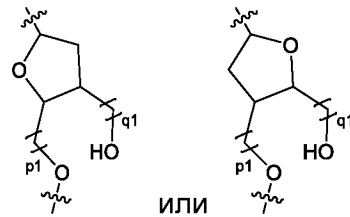
5

или

. В некоторых воплощениях

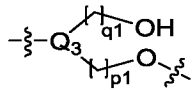


может представлять собой

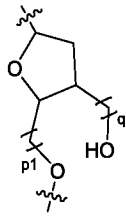


или

. В некоторых воплощениях



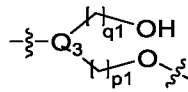
может представлять собой



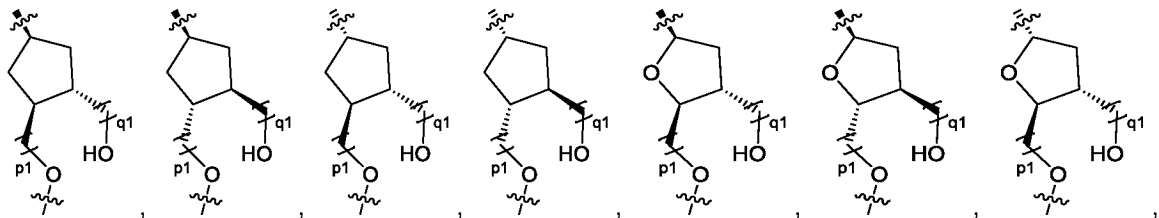
. p1 и q1 являются такими, как

определено в любом из предшествующих воплощений.

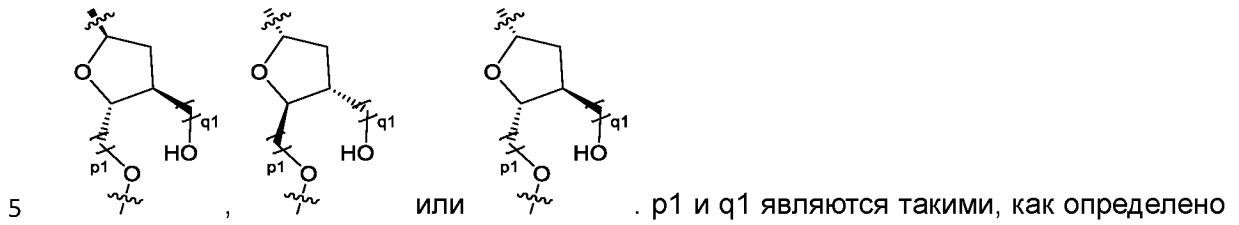
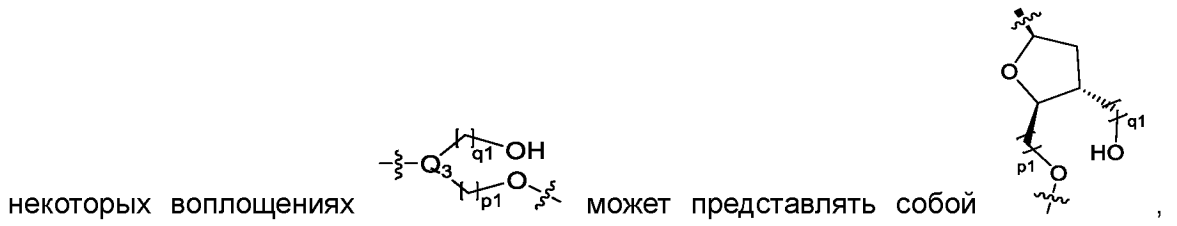
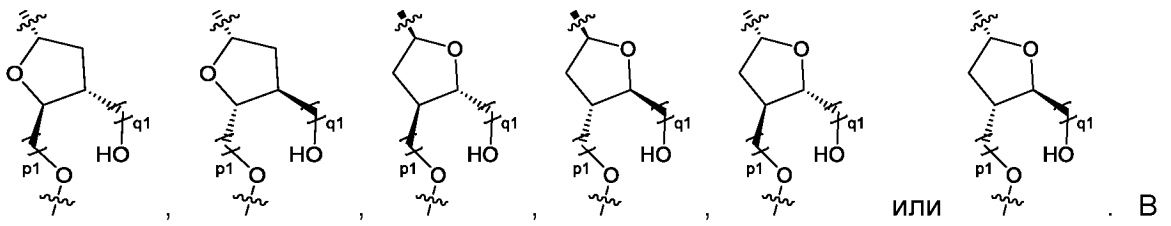
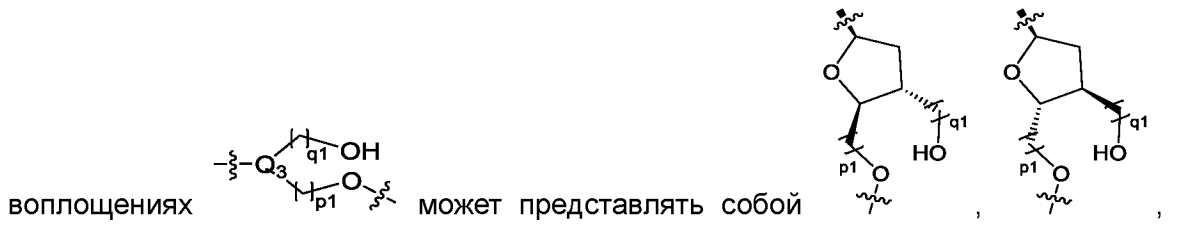
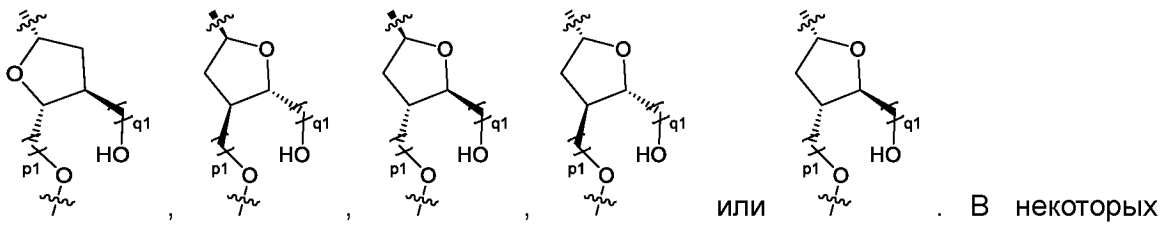
В некоторых воплощениях



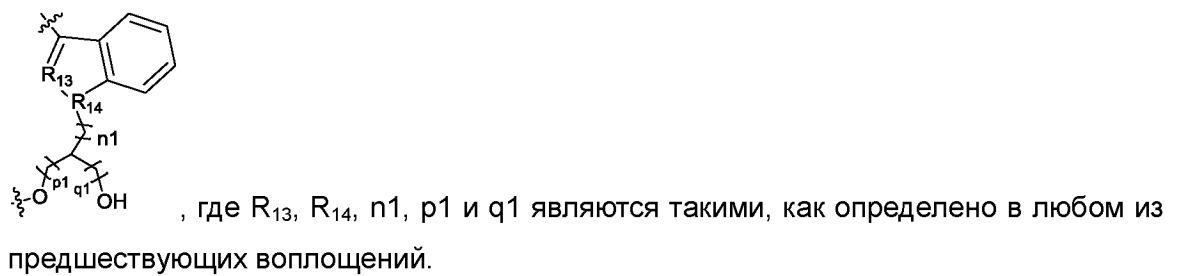
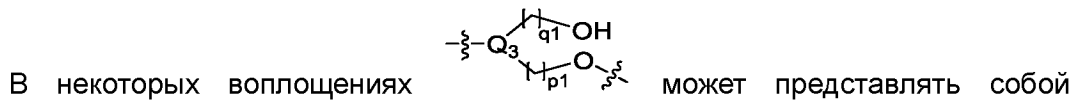
может представлять собой

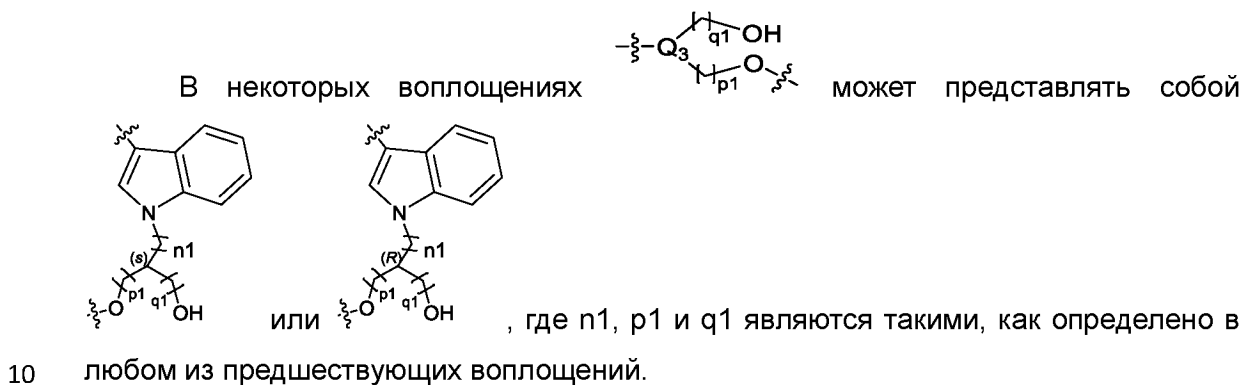
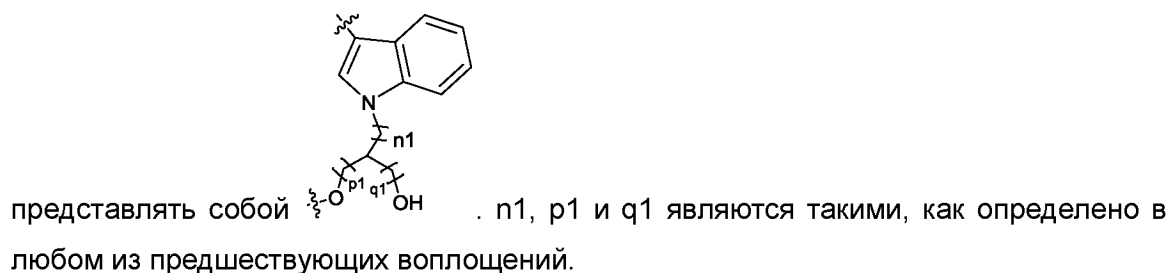
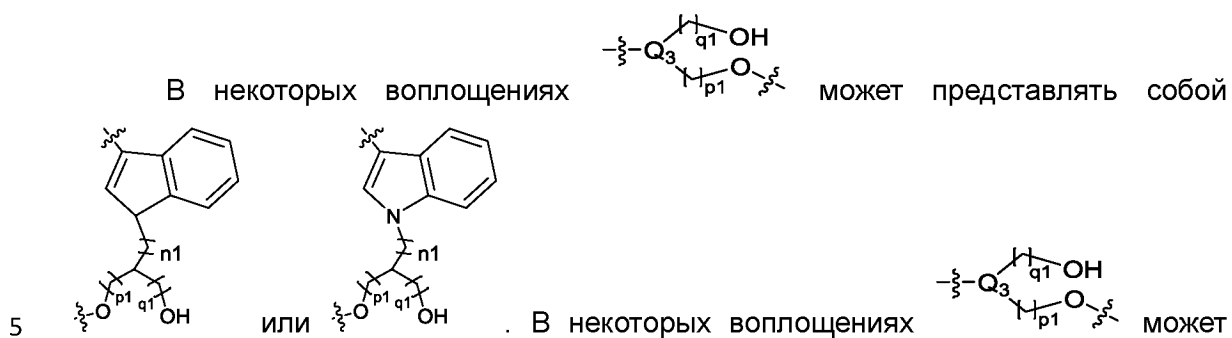
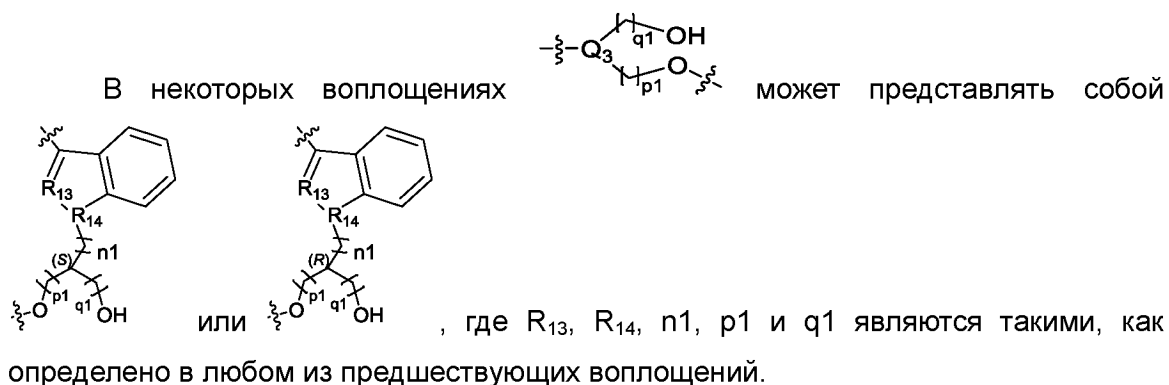


10

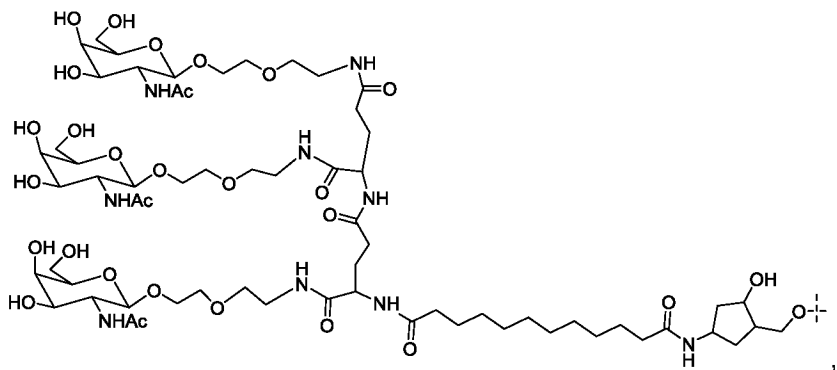
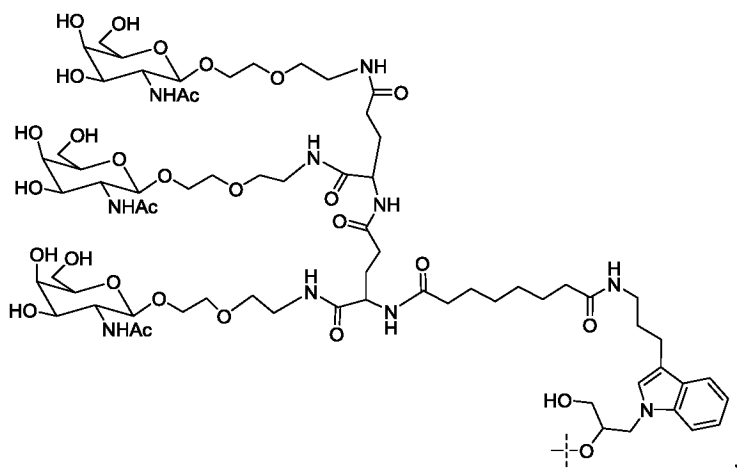
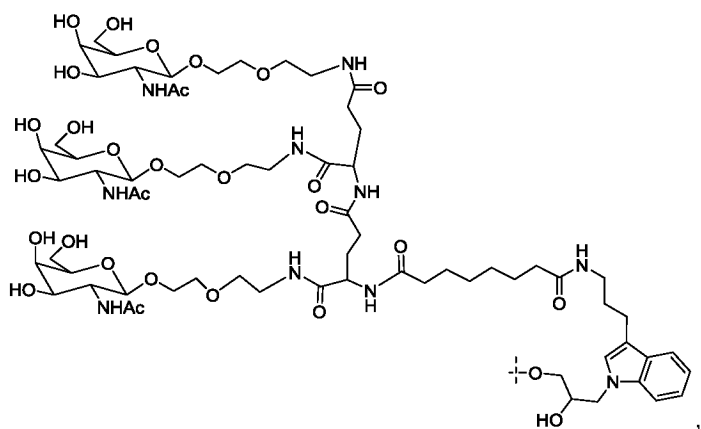


в любом из предшествующих воплощений.

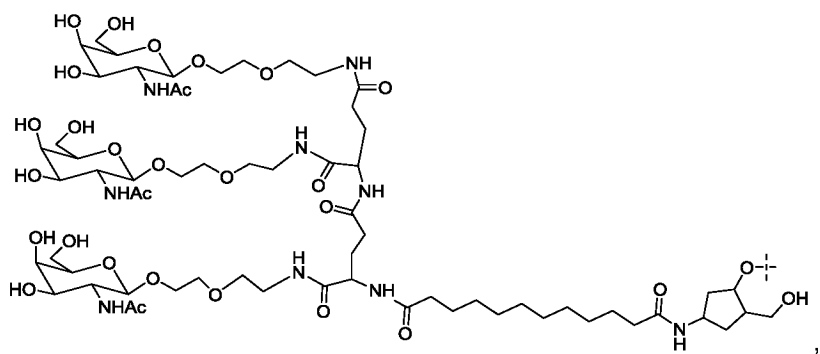


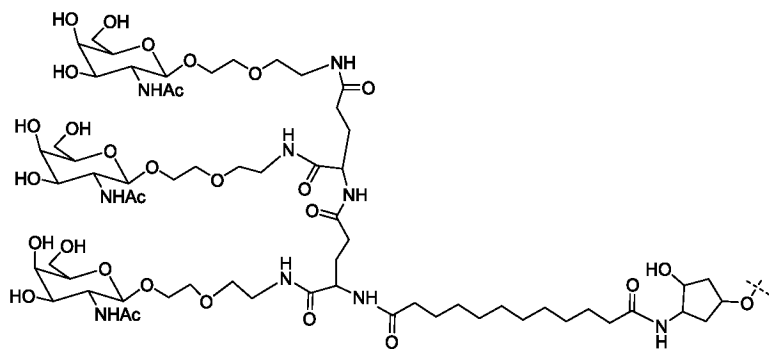
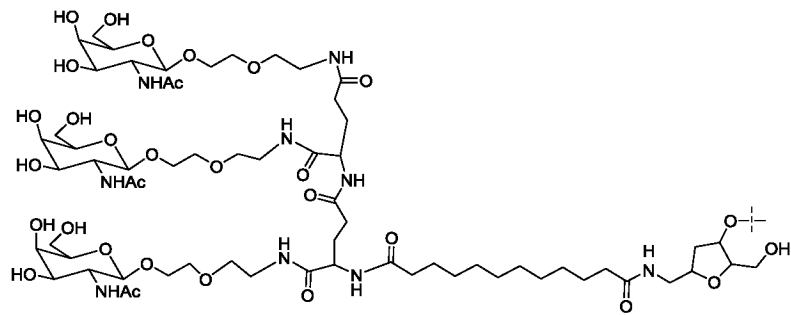
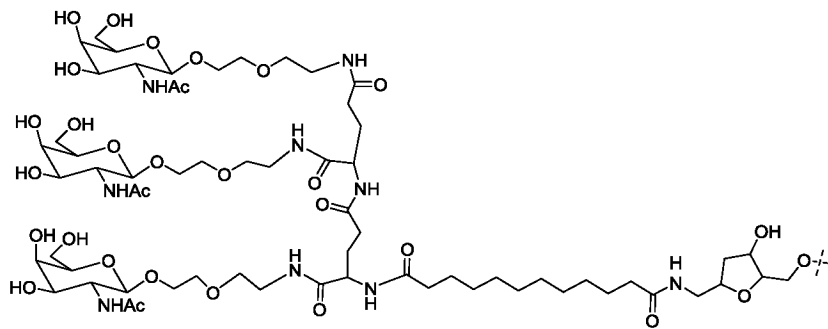
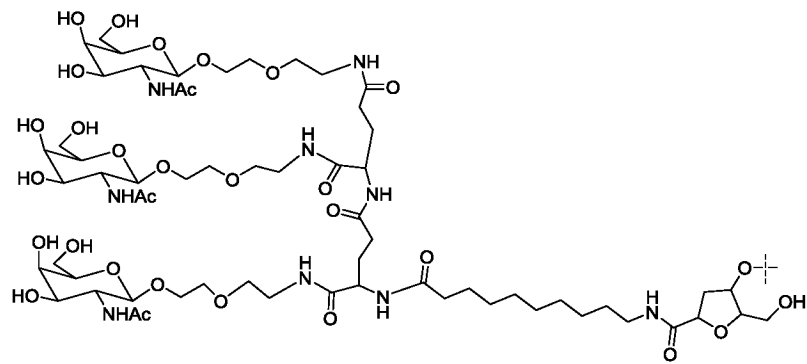
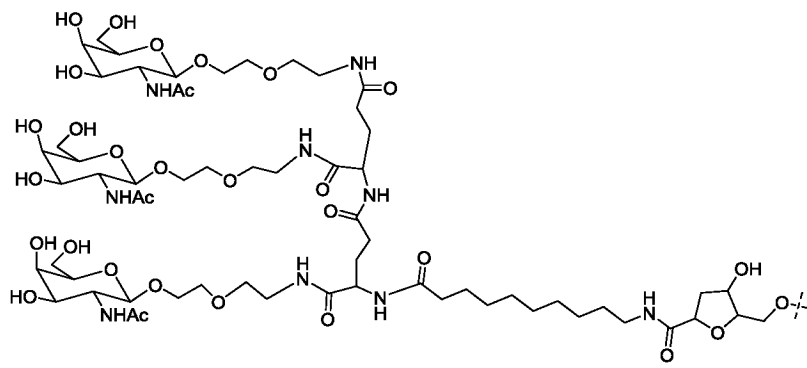


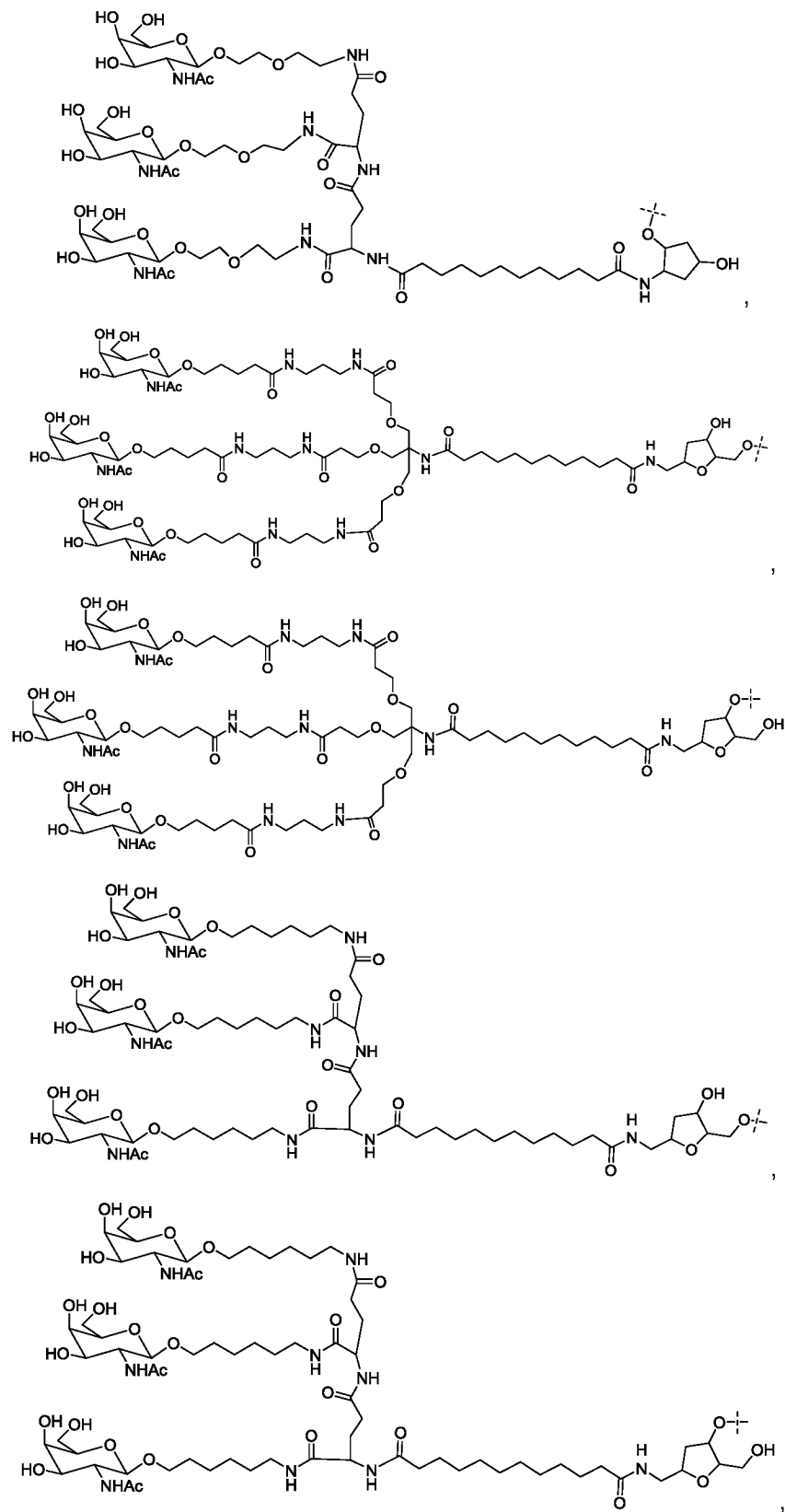
В некоторых воплощениях лиганд может представлять собой любую из следующих структур или ее фармацевтически приемлемую соль:

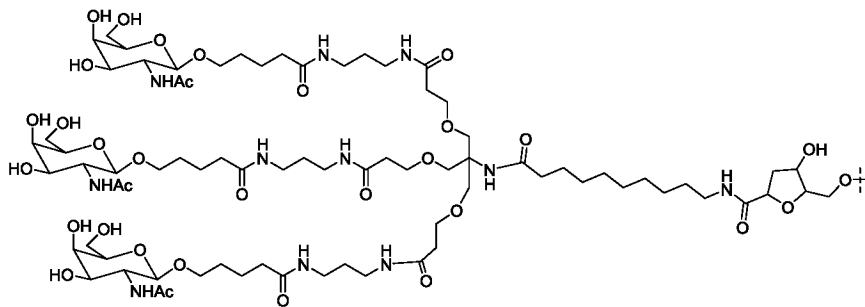
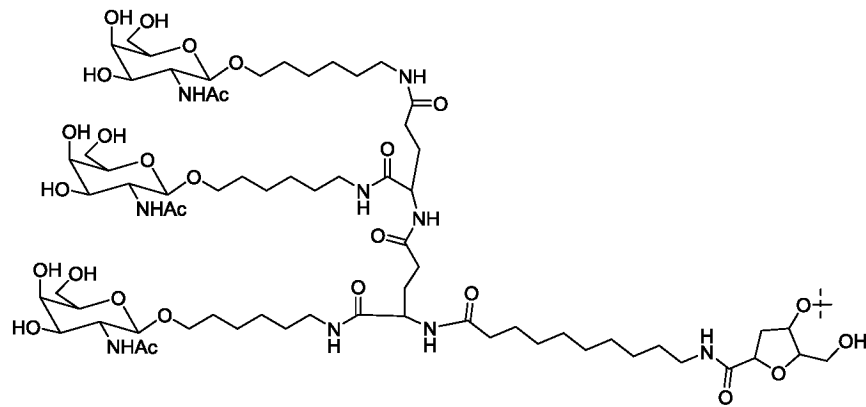
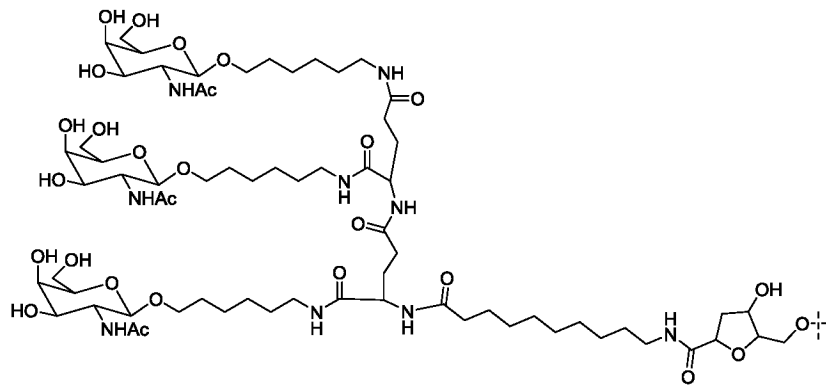


5

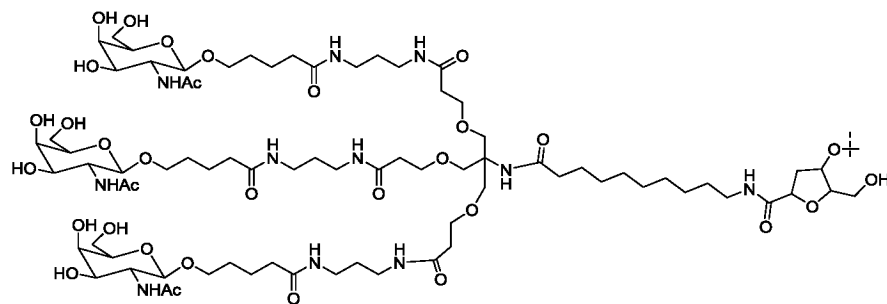




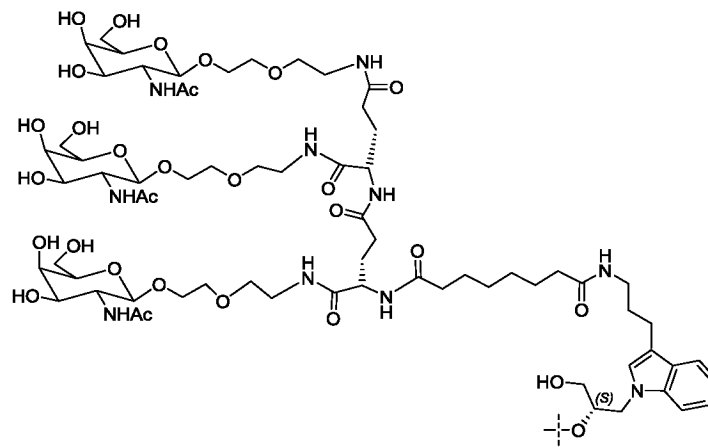
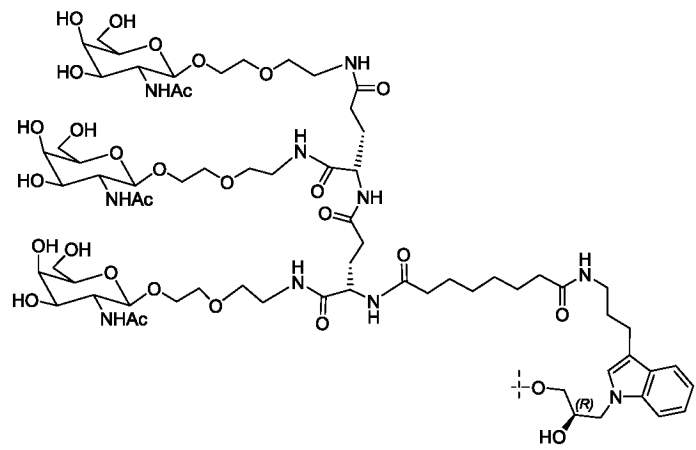
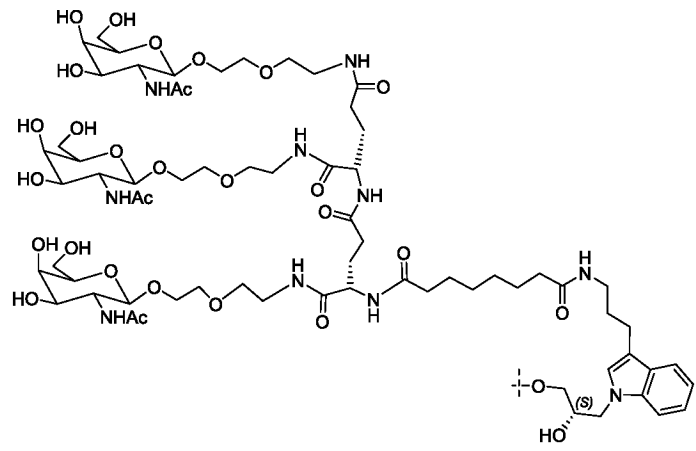


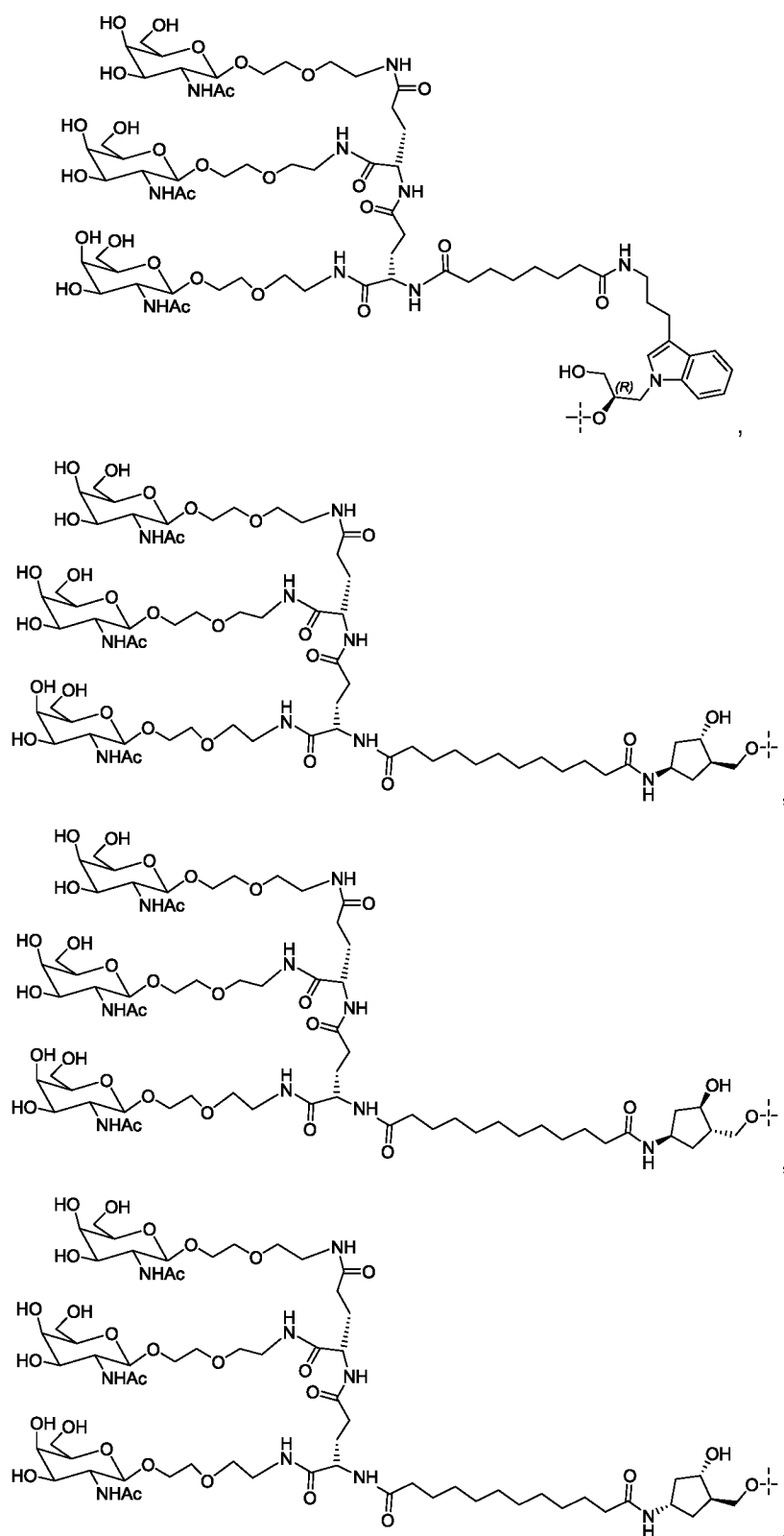


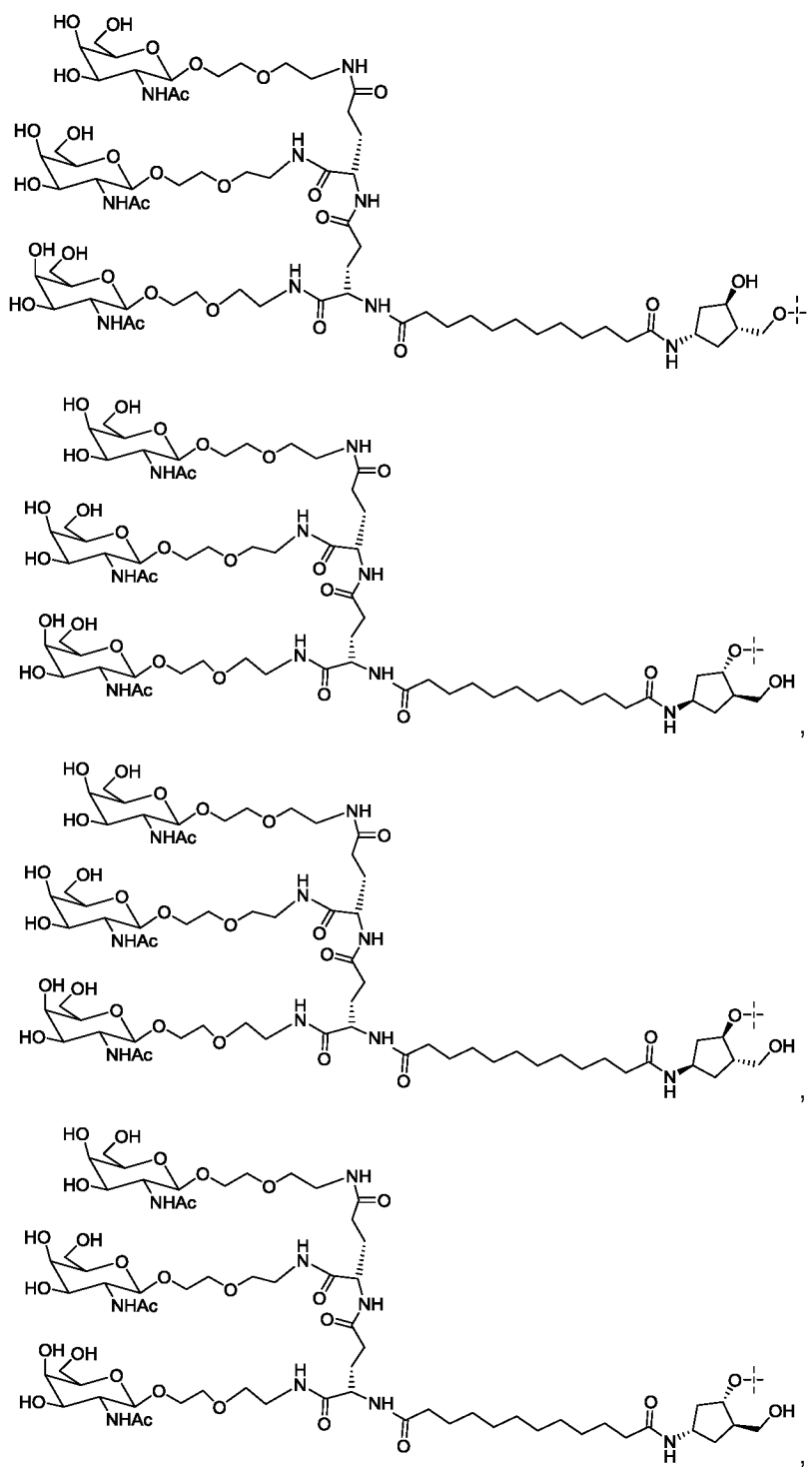
ИЛИ

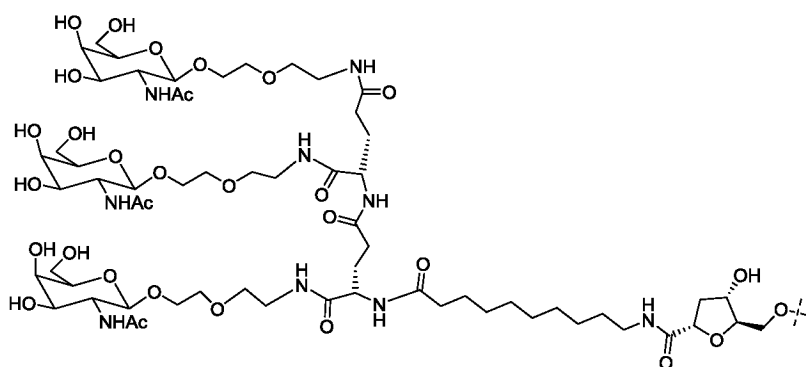
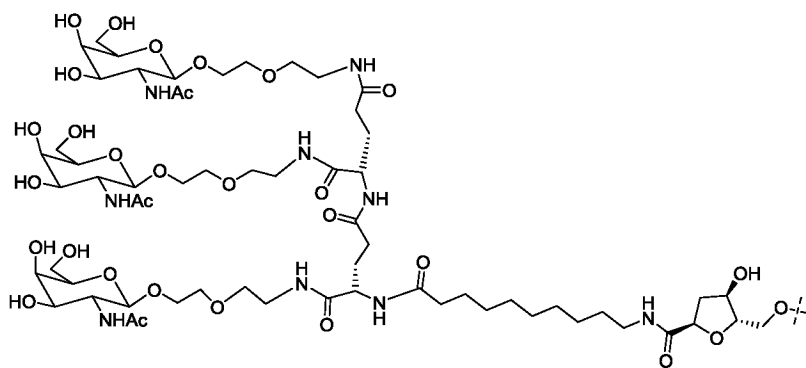
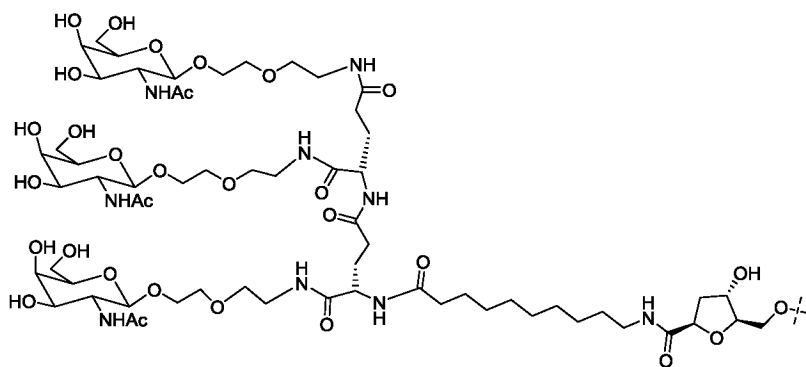
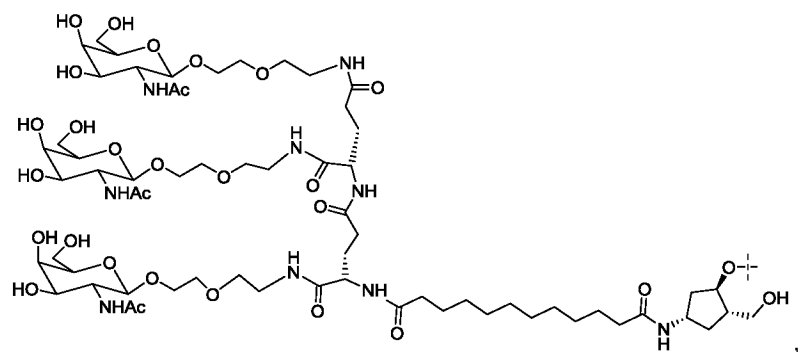


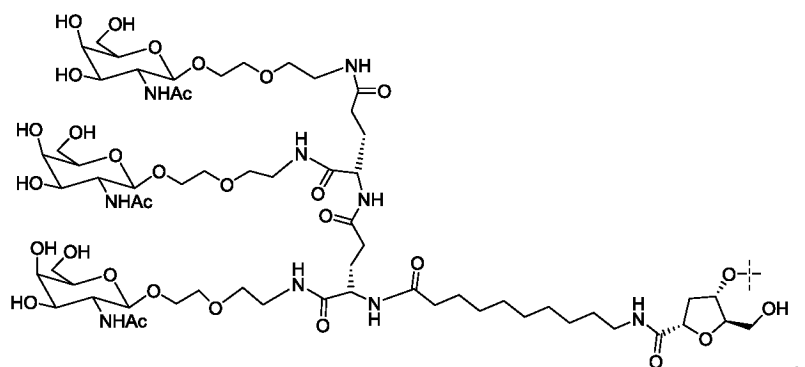
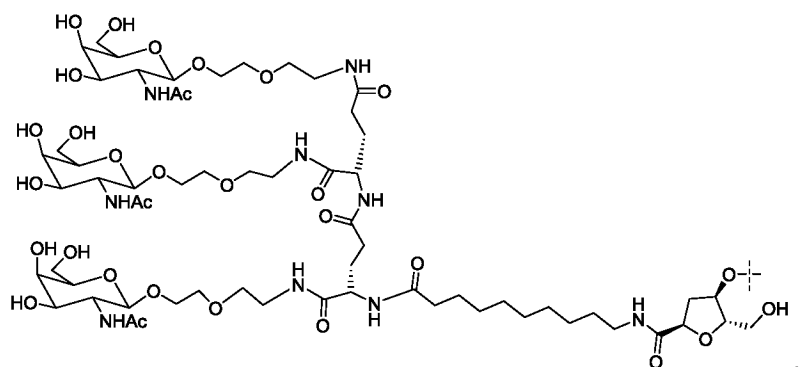
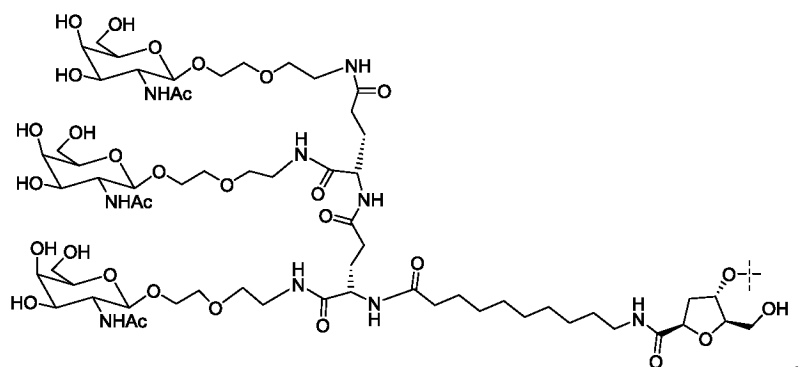
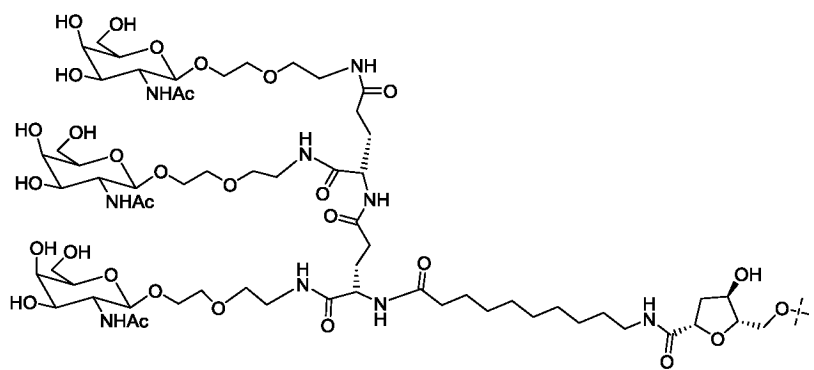
В некоторых воплощениях лиганд может представлять собой любую из следующих структур или ее фармацевтически приемлемую соль:

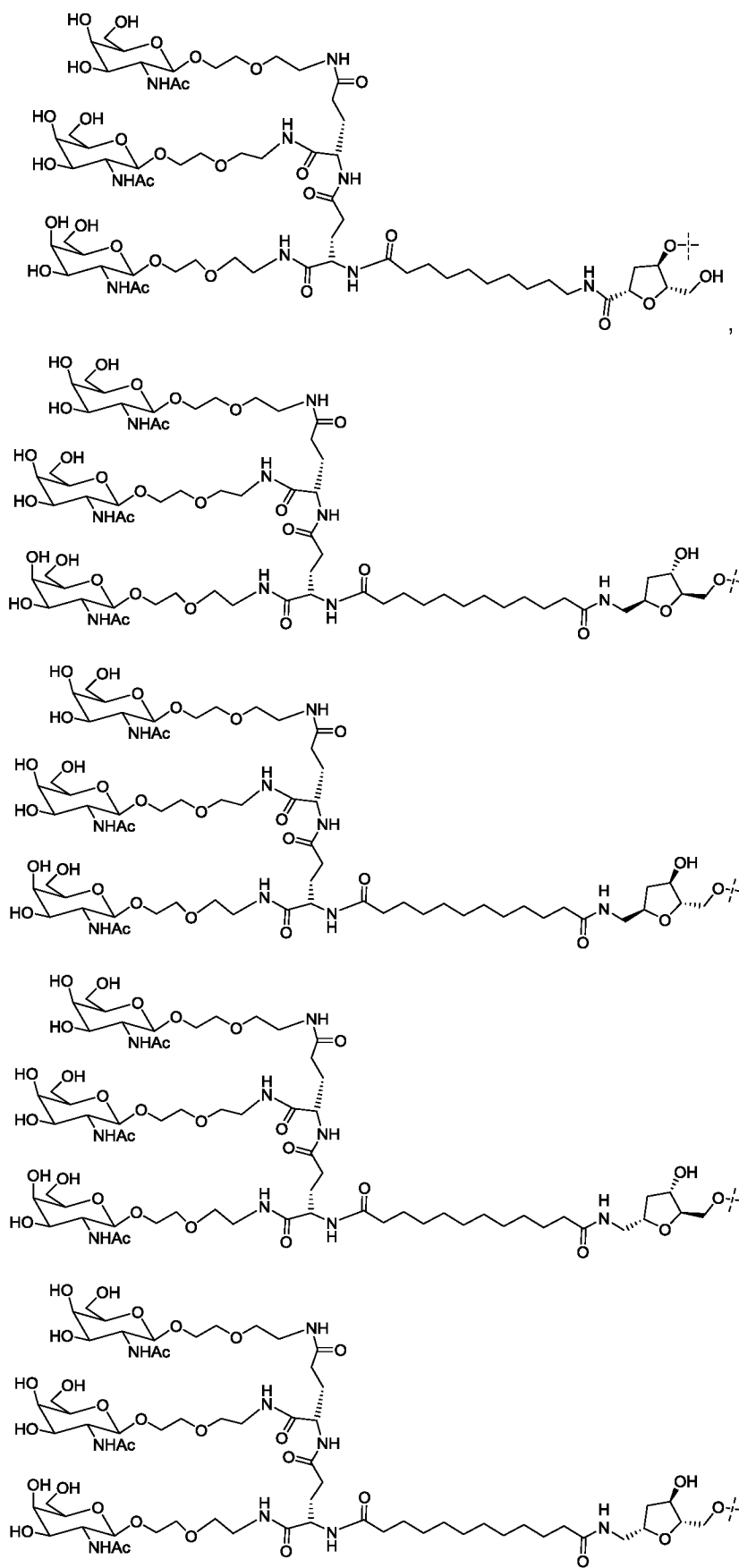


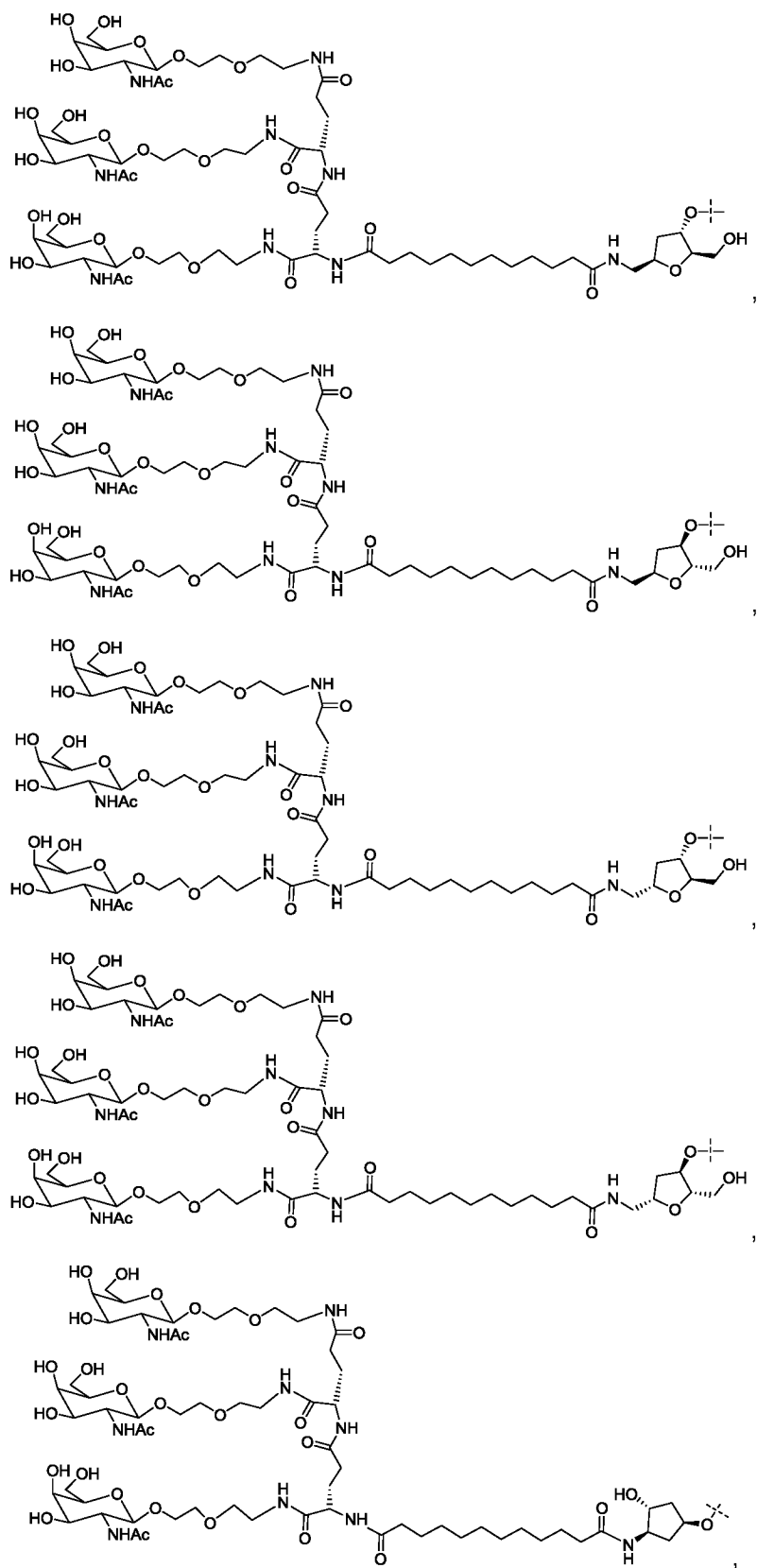


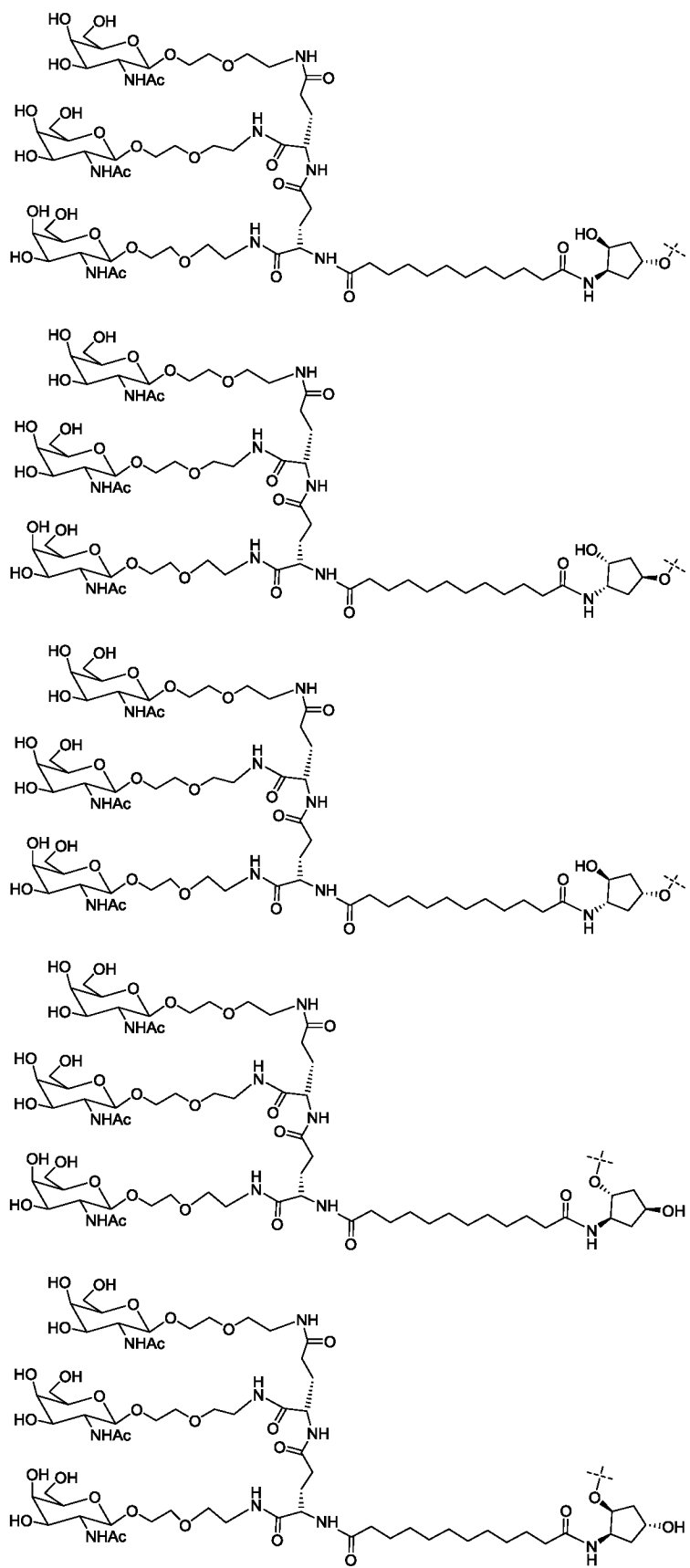


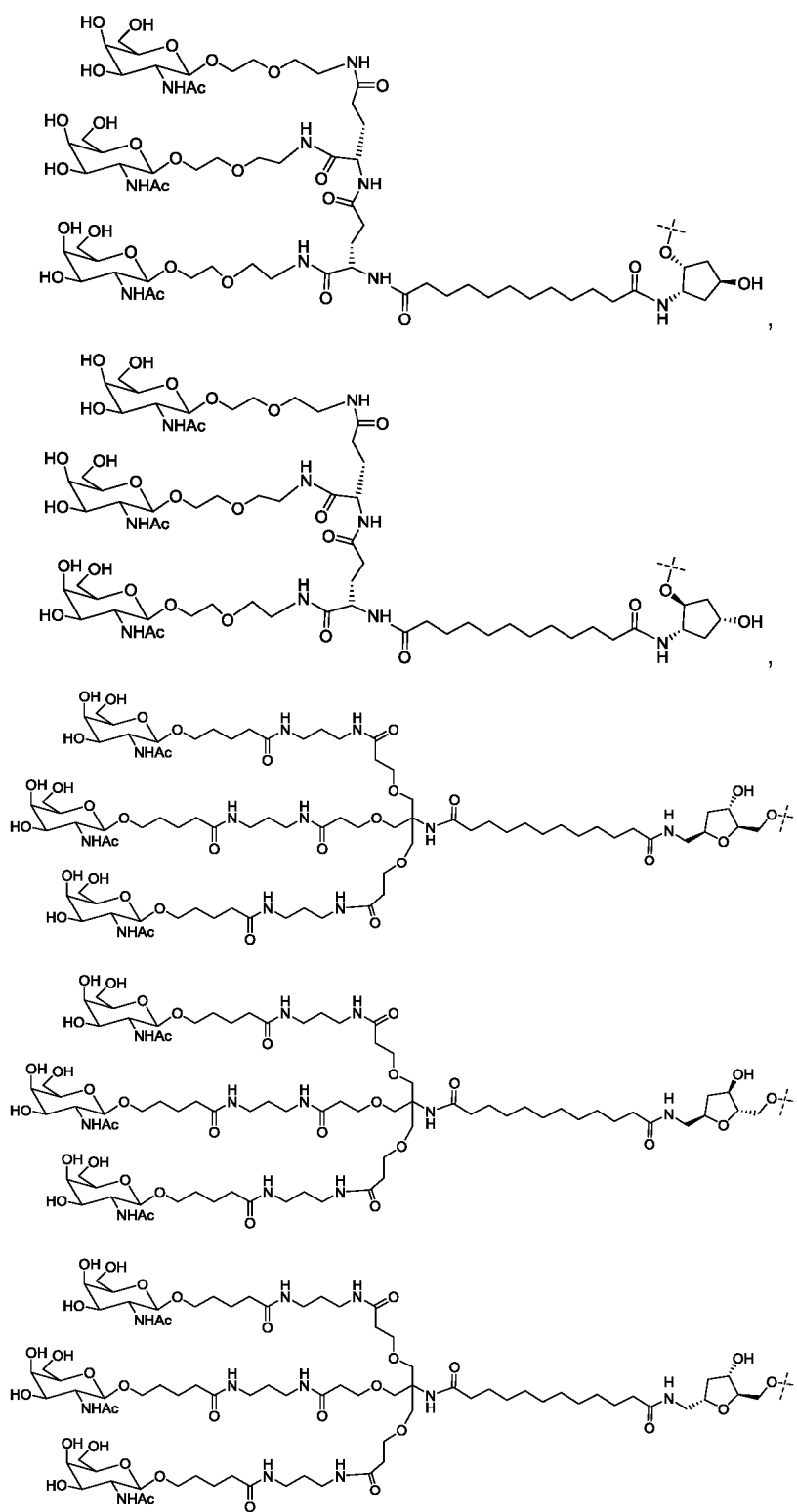


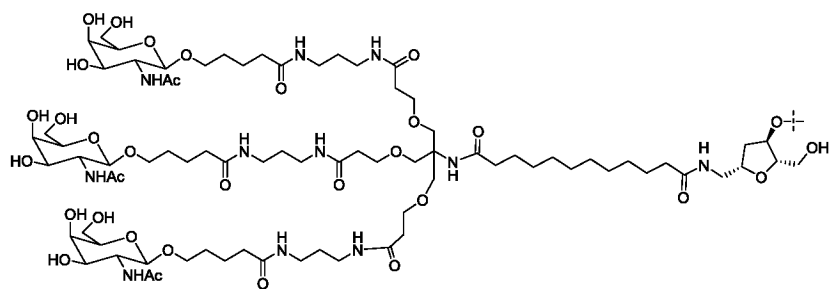
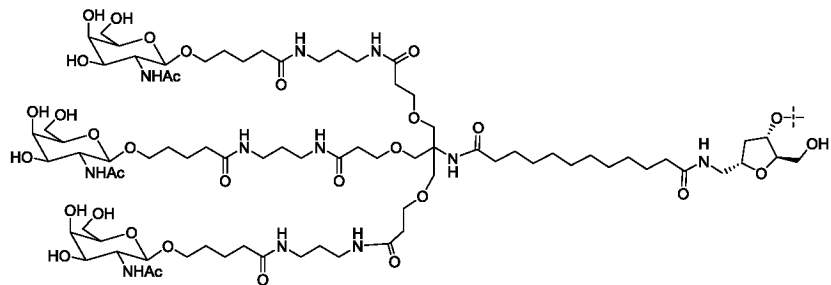
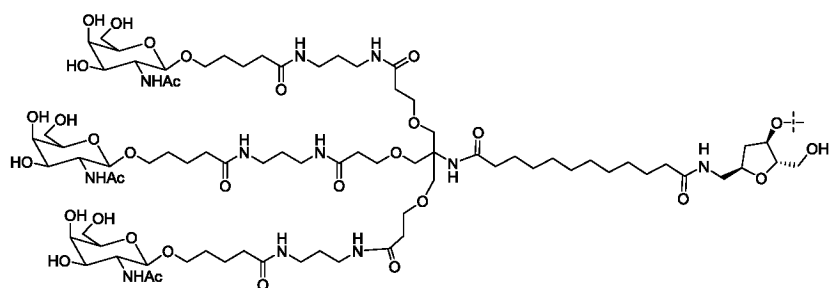
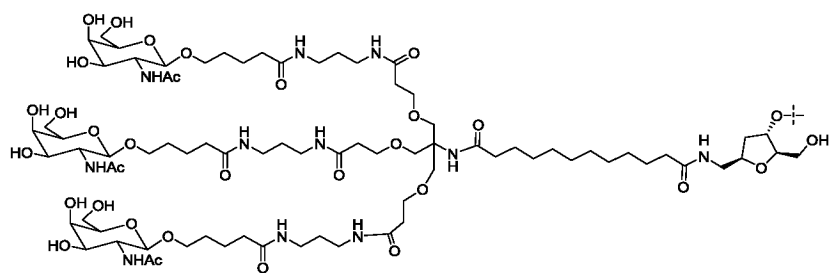
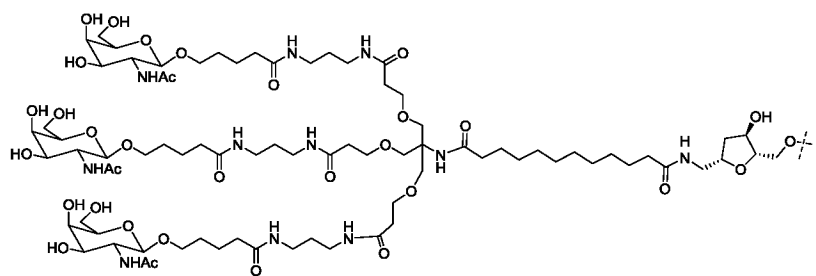


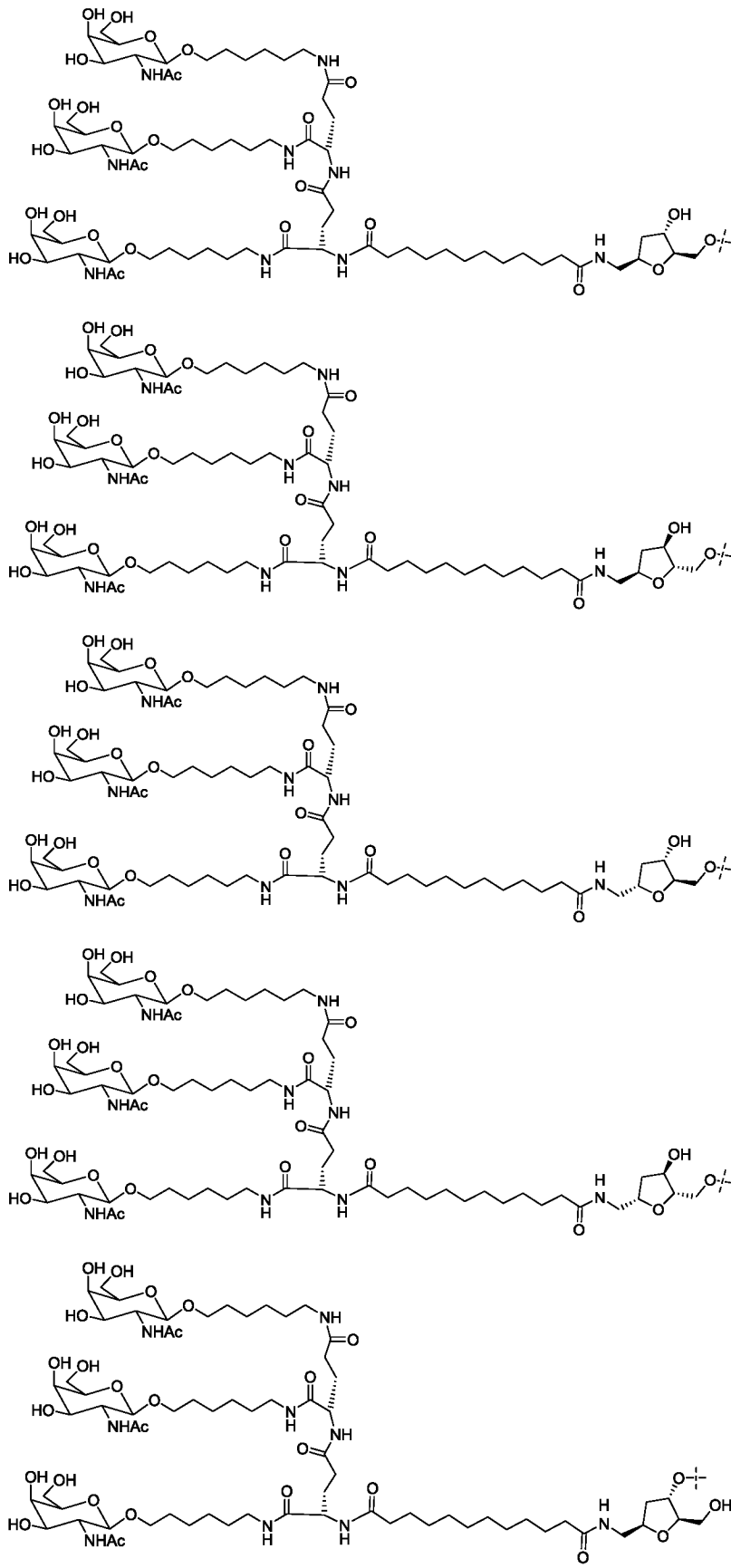


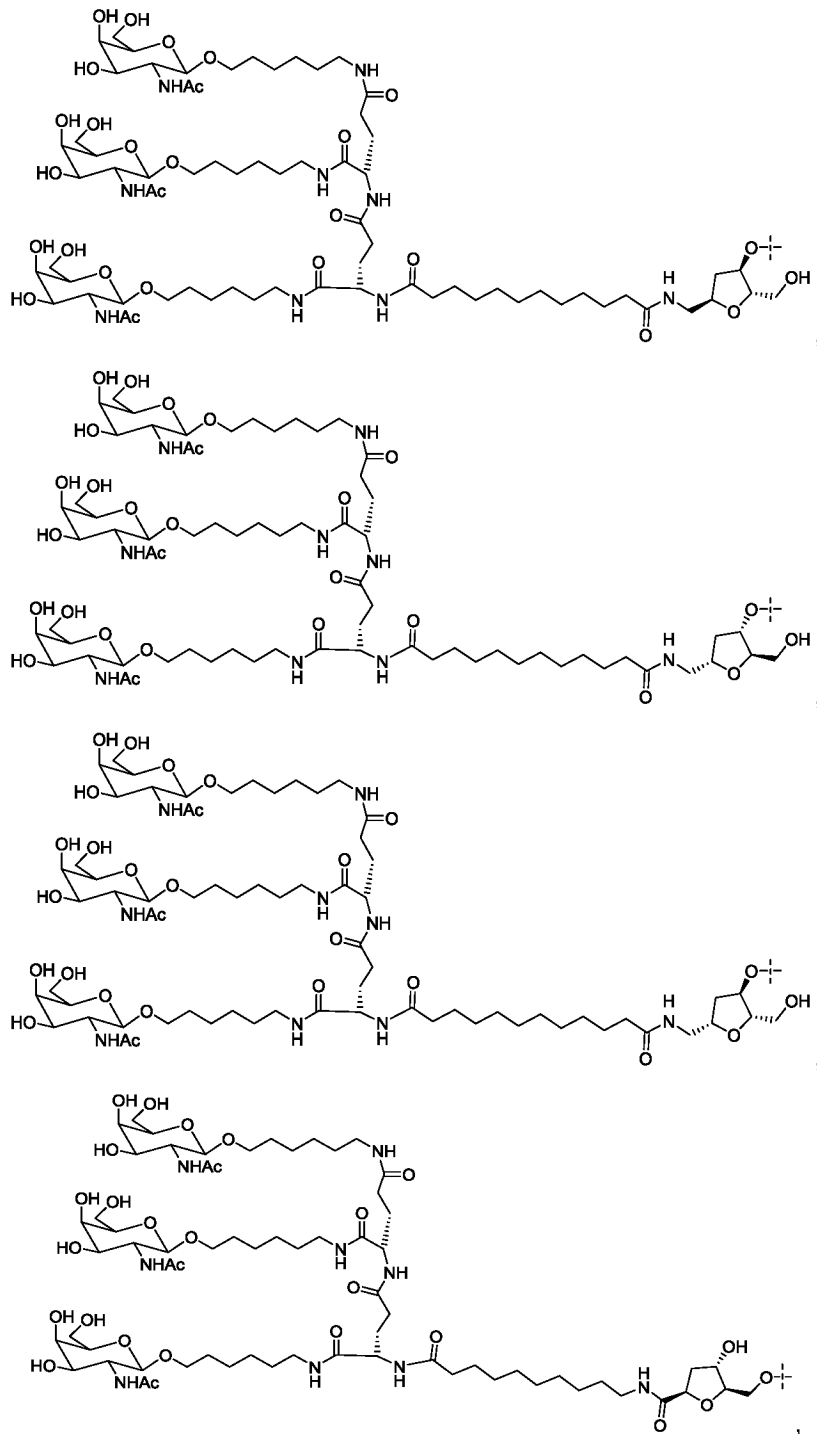


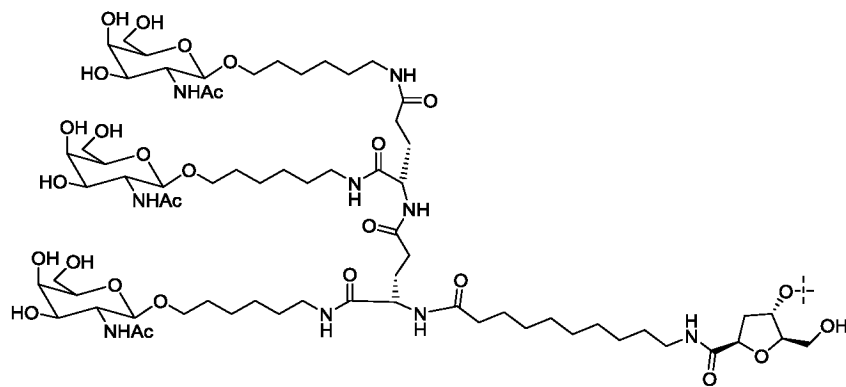
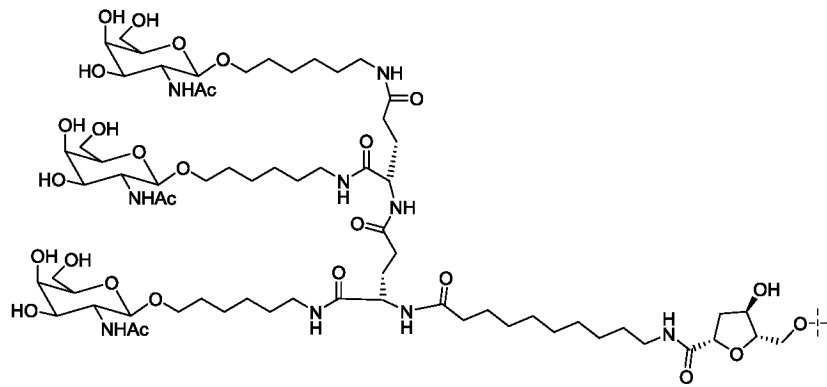
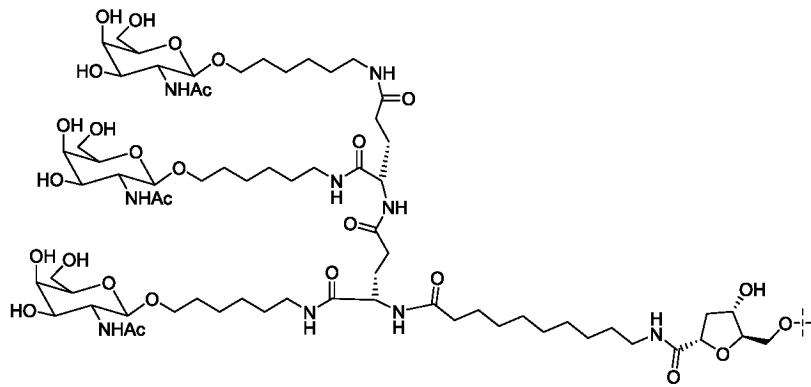
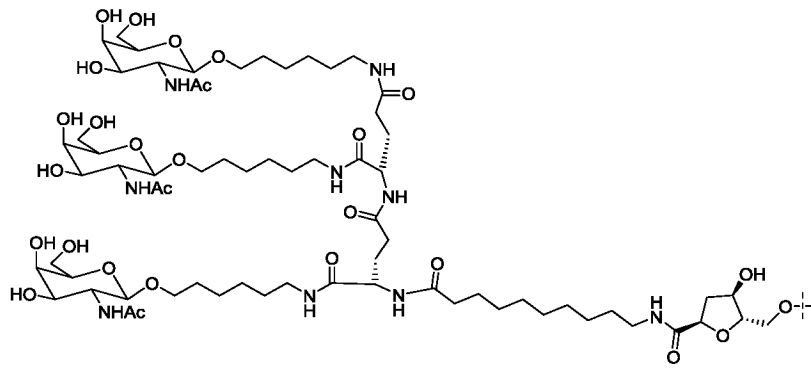


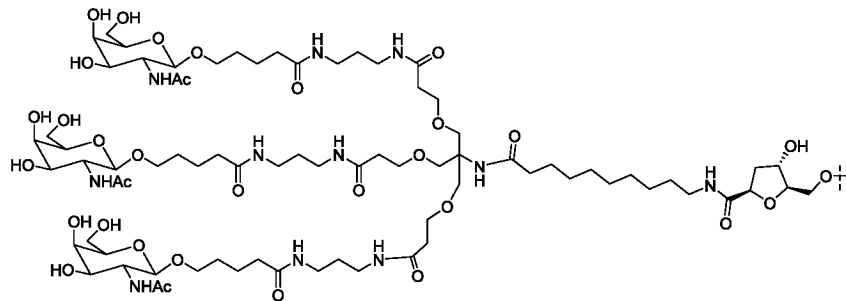
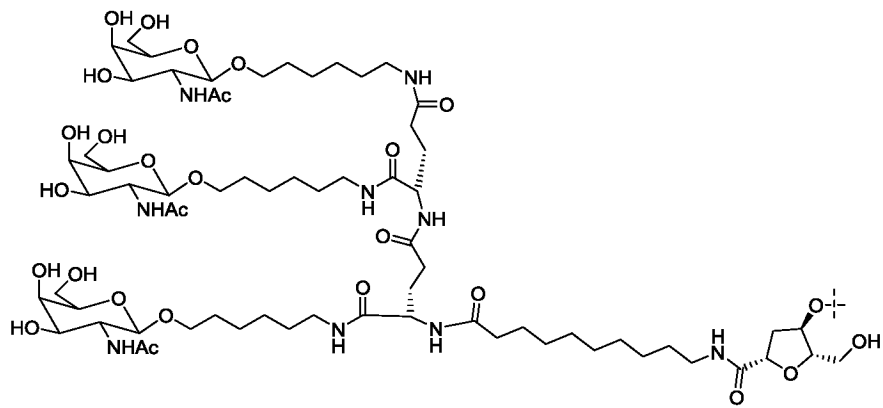
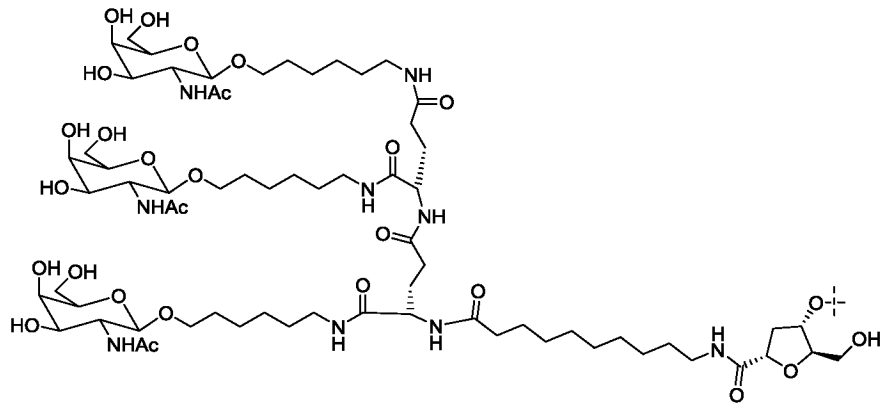
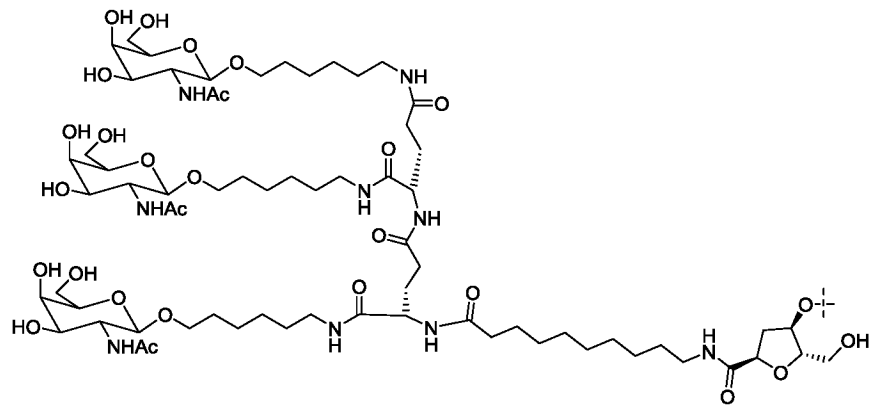


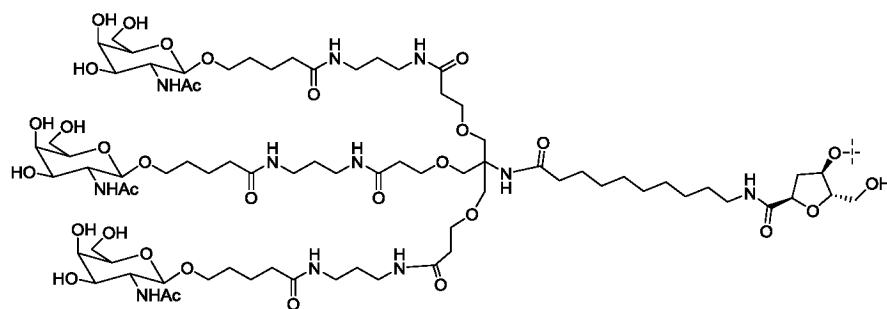
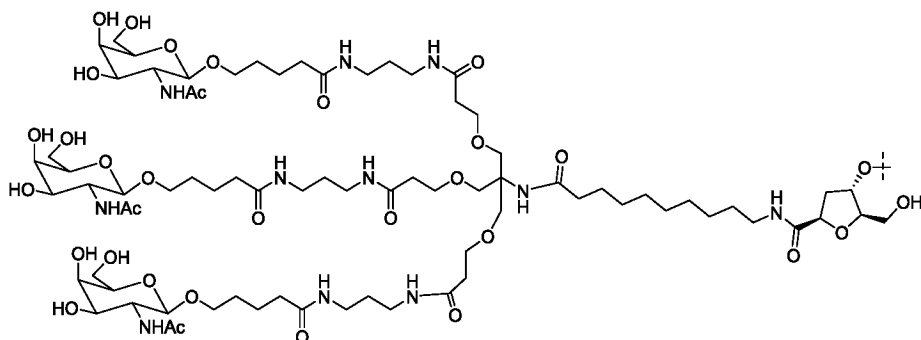
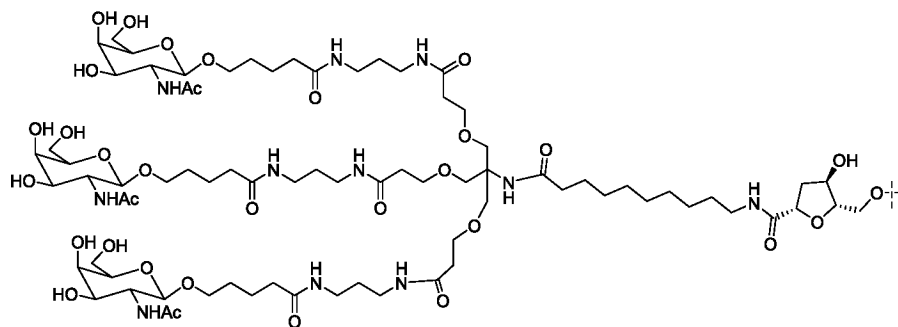
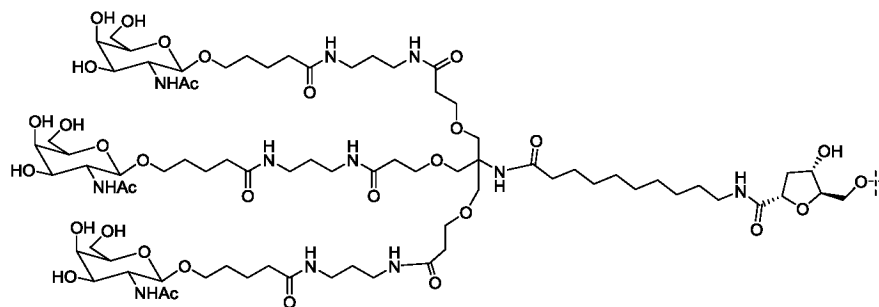
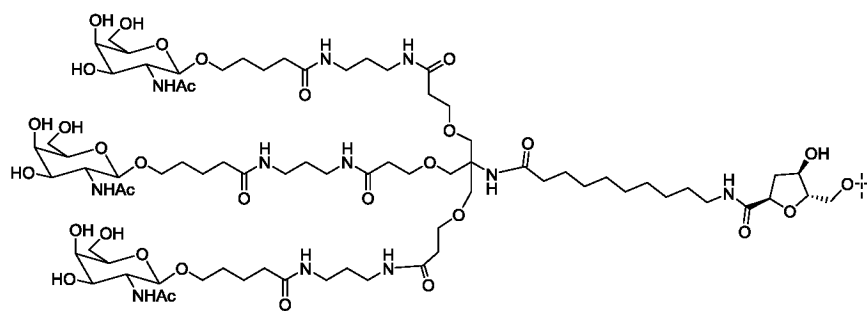


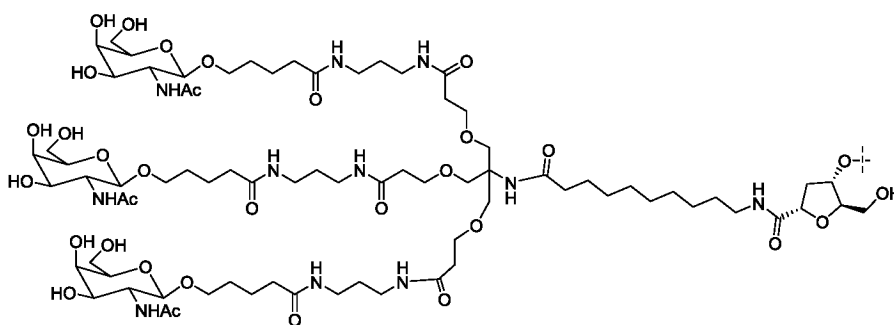




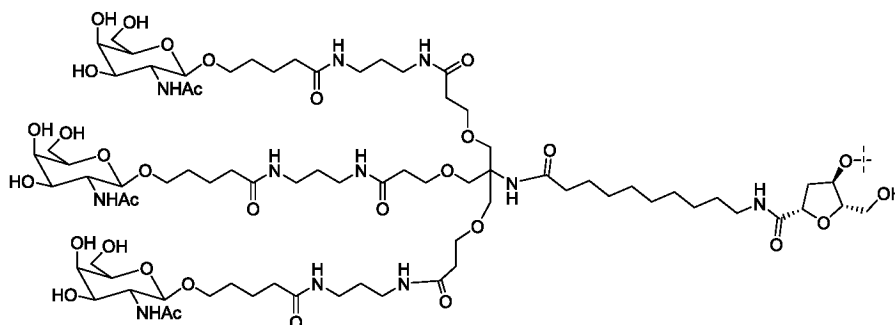




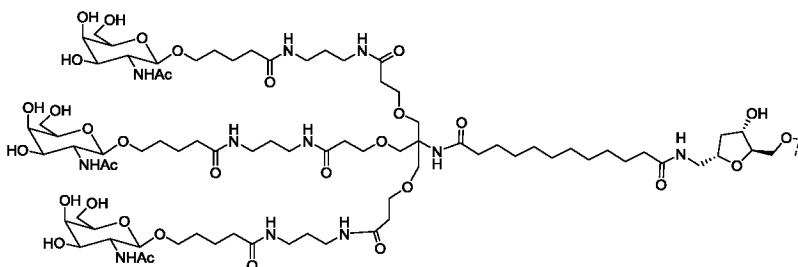




ИЛИ

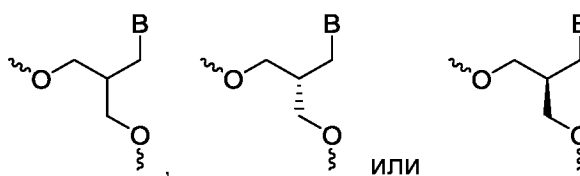


В некоторых воплощениях лиганд выбран из группы, состоящей из следующей структуры или ее фармацевтически приемлемой соли:

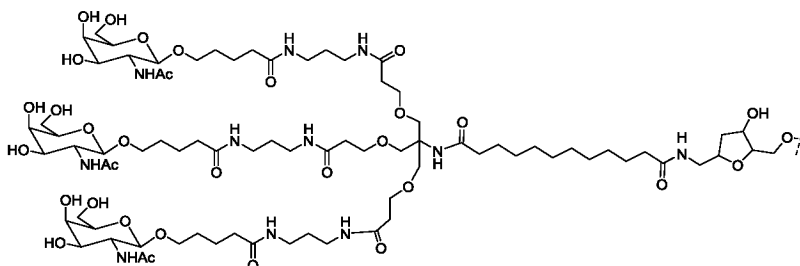


5

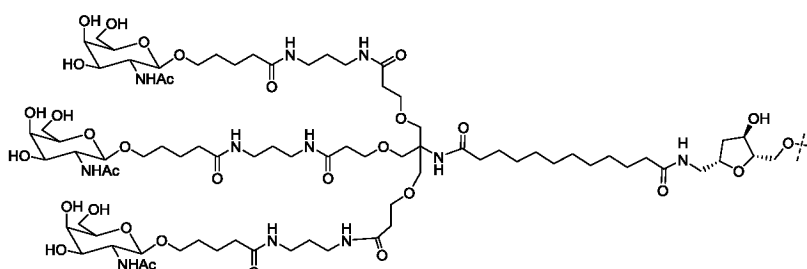
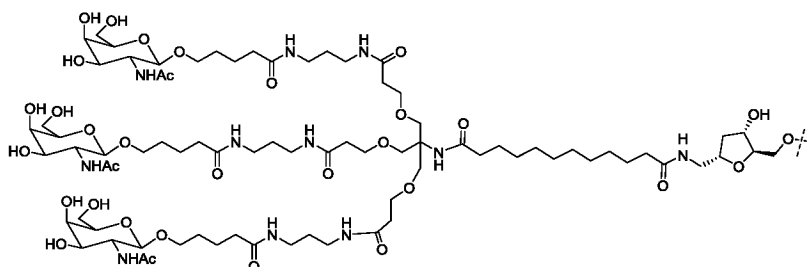
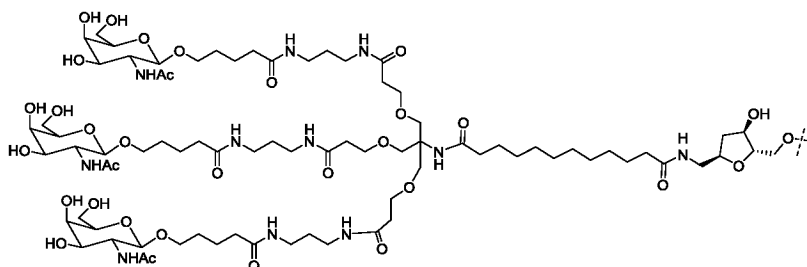
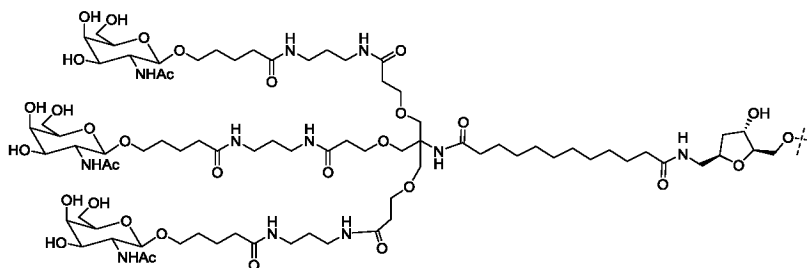
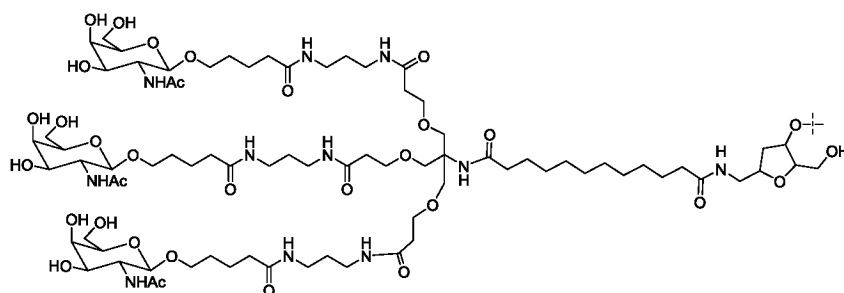
В некоторых воплощениях химическая модификация формулы (I)



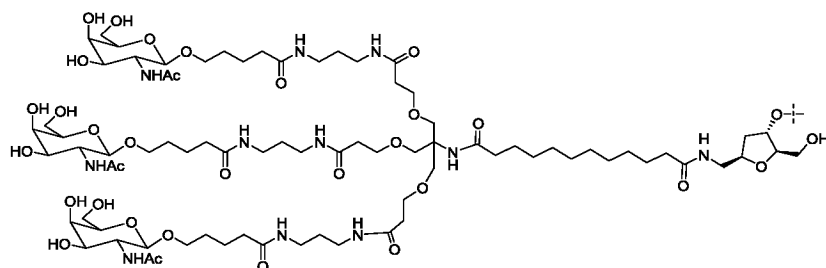
представляет собой , или , B выбрано из группы, состоящей из гуанина, аденина, цитозина и урацила, и лиганд представляет собой любую из следующих структур или ее фармацевтически приемлемую соль:

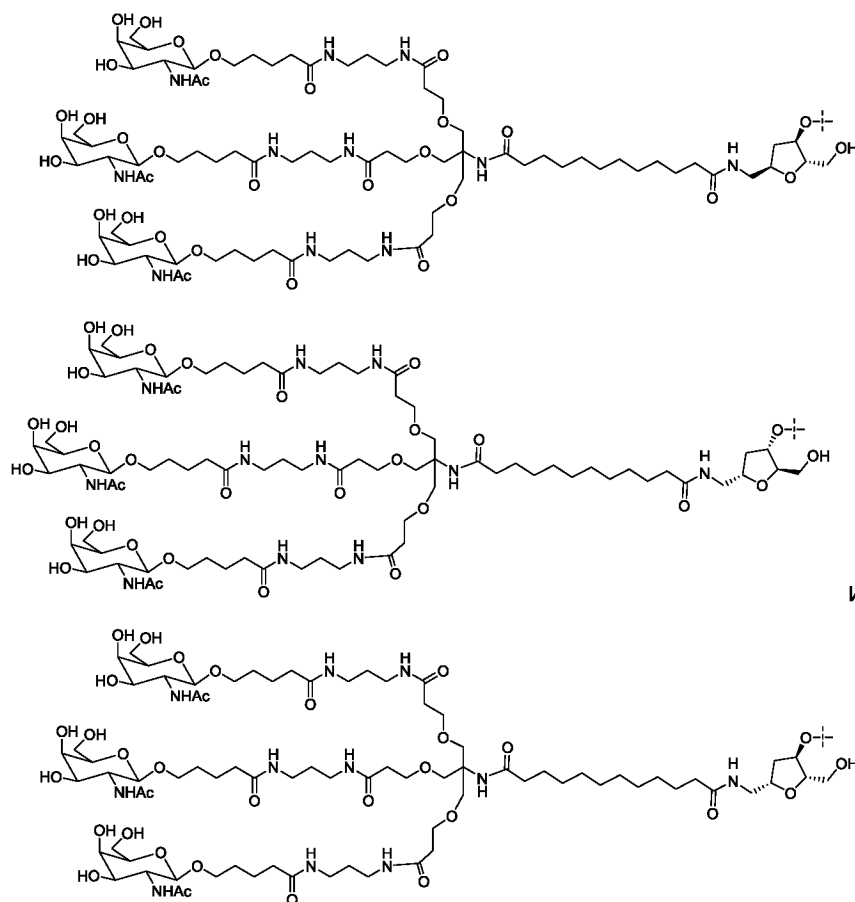


10

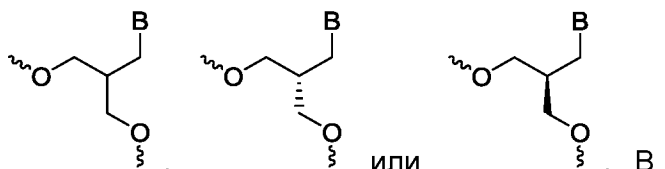


5

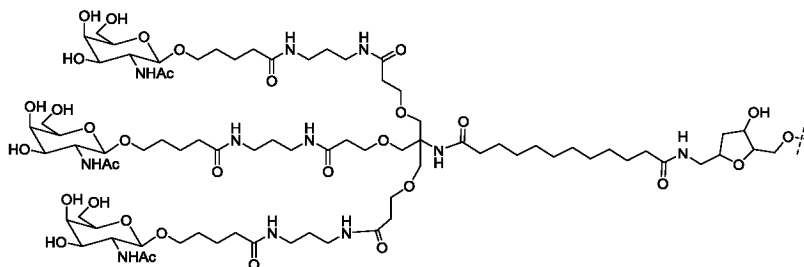


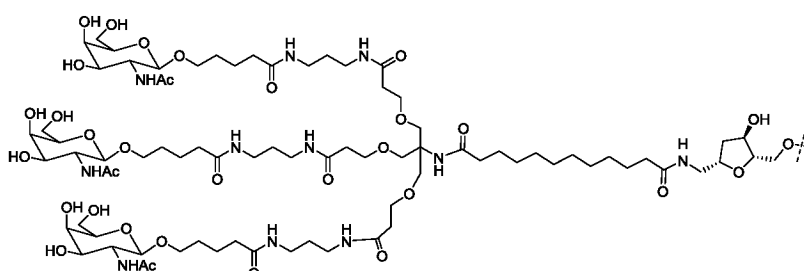
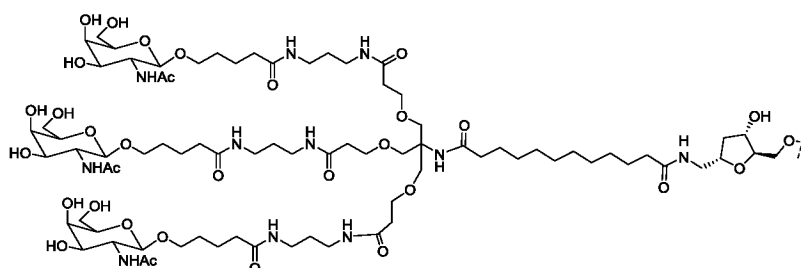
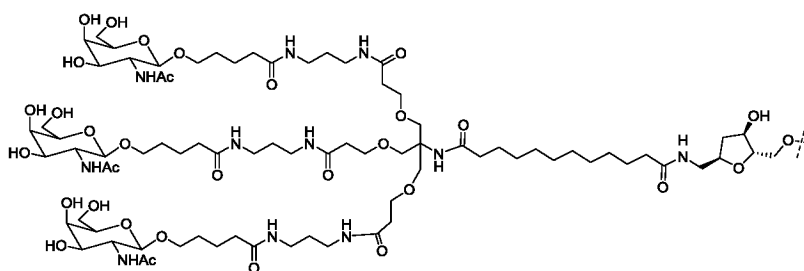
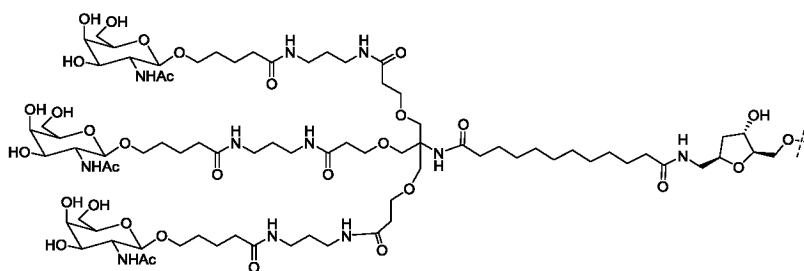


В некоторых воплощениях химическая модификация формулы (I)



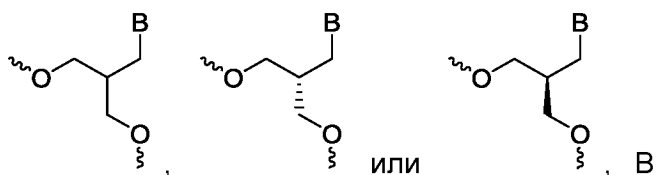
5 представляет собой , или , В выбрано из группы, состоящей из гуанина, аденина, цитозина и урацила, и лиганд представляет собой любую из следующих структур или ее фармацевтически приемлемую соль:



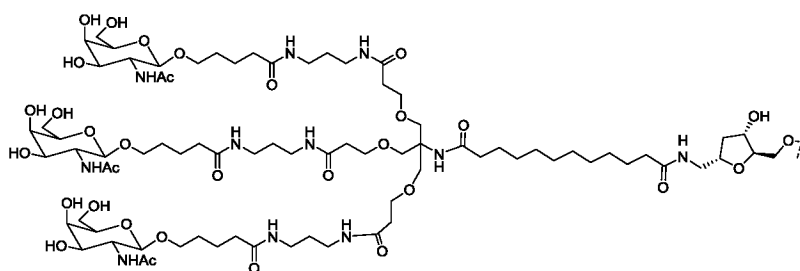


ИЛИ

5 В некоторых воплощениях химическая модификация формулы (I)



представляет собой , или , В выбрано из группы, состоящей из гуанина, аденина, цитозина и урацила, и лиганд представляет собой следующую структуру или ее фармацевтически приемлемую соль:



В некоторых воплощениях группировка N-ацетил-галактозамина в указанном выше лиганде может быть заменена на N-трифторацетилгалактозамин, N-пропионилгалактозамин, N-н-бутирилгалактозамин или N-изобутирилгалактозамин.

5 В некоторых воплощениях миРНК и лиганд связаны ковалентной или нековалентной связью.

В некоторых воплощениях 3'-конец и/или 5'-конец смысловой цепи может быть конъюгирован с лигандом.

10 В некоторых воплощениях 3'-конец смысловой цепи может быть конъюгирован с лигандом.

В некоторых воплощениях лиганд связан с концом миРНК через фосфоэфирную группу или фосфотиоатную группу.

В некоторых воплощениях лиганд связан с концом миРНК через фосфодиефирную группу или фосфотиоатную диэфирную группу.

15 В некоторых воплощениях лиганд связан с концом миРНК через фосфодиефирную группу.

В некоторых воплощениях лиганд связан с концом миРНК через фосфоэфирную группу или фосфотиоатную группу опосредованно.

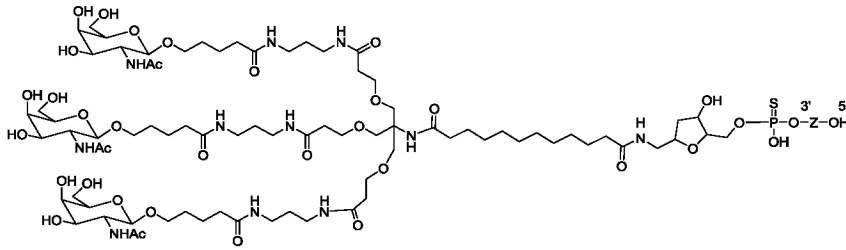
20 В некоторых воплощениях лиганд напрямую связан с концом миРНК через фосфоэфирную группу или фосфотиоатную группу.

В некоторых воплощениях лиганд напрямую связан с 3'-концом смысловой цепи миРНК через фосфоэфирную группу или фосфотиоатную группу.

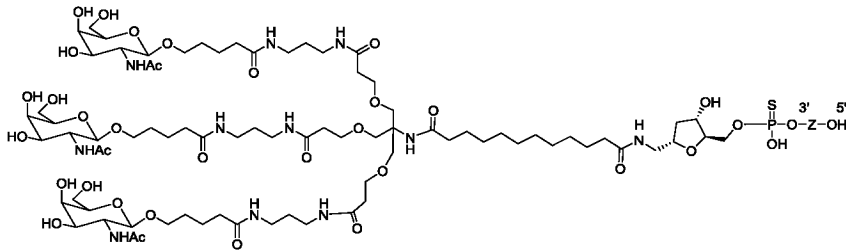
25 В некоторых воплощениях фосфоэфирная группа представляет собой фосфомоноэфирную группу или фосфодиефирную группу. В некоторых воплощениях фосфоэфирная группа представляет собой фосфодиефирную группу.

В некоторых воплощениях фосфотиоатная группа представляет собой фосфотиоатную моноэфирную группу или фосфотиоатную диэфирную группу. В некоторых воплощениях фосфотиоатная группа представляет собой фосфотиоатную диэфирную группу.

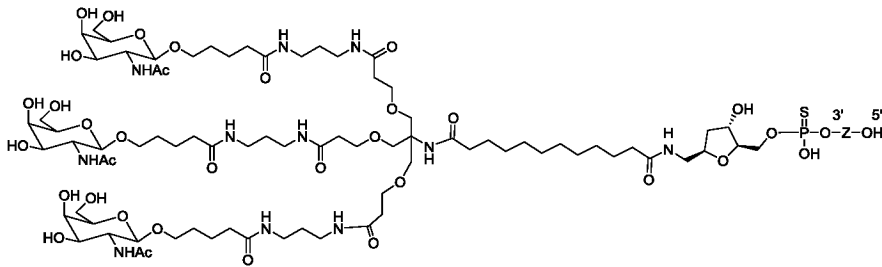
В некоторых воплощениях дцРНК может представлять собой любую из следующих структур или ее фармацевтически приемлемую соль:



I



II

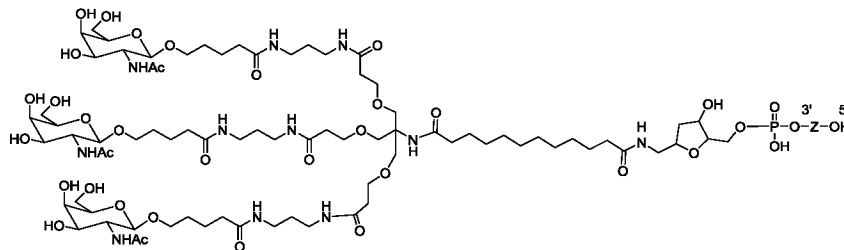


5

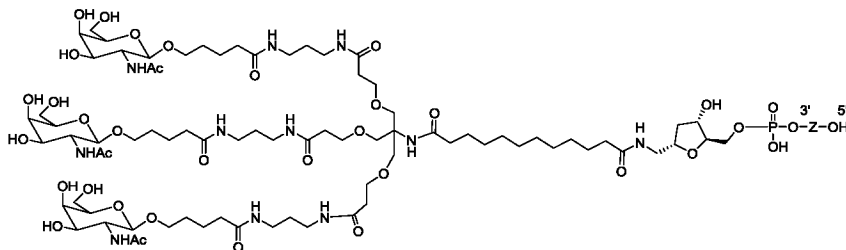
, где Z

представляет собой миРНК; 3'-конец смысловой цепи миРНК напрямую связан с лигандом через фосфотиоатную дизфирную группу, и миРНК является такой, как определено в описании настоящего изобретения.

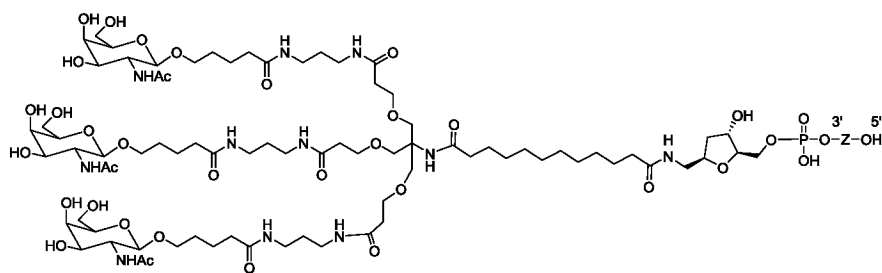
10 В некоторых воплощениях дцРНК может представлять собой любую из следующих структур или ее фармацевтически приемлемую соль:



I

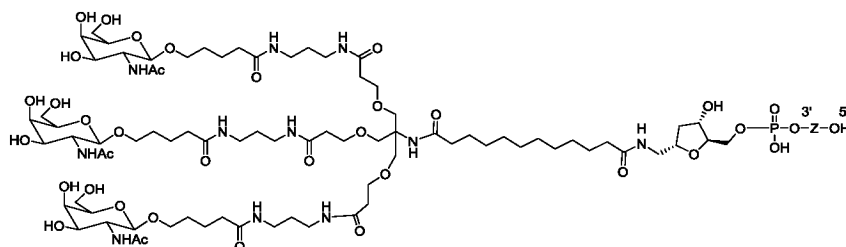


II



где Z представляет собой миРНК; 3'-конец смысловой цепи миРНК напрямую связан с лигандом через фосфодиэфирную группу, и миРНК является такой, как определено в описании настоящего изобретения.

- 5 В некоторых воплощениях дцРНК может представлять собой следующую структуру или ее фармацевтически приемлемую соль:



- 10 где Z представляет собой миРНК; 3'-конец смысловой цепи миРНК напрямую связан с лигандом через фосфодиэфирную группу, и миРНК является такой, как определено в описании настоящего изобретения.

- 15 В некоторых воплощениях, чтобы способствовать проникновению миРНК в клетку, на конец смысловой цепи миРНК можно ввести липофильную группу, такую как холестерин, и эту липофильную группу можно связать с миРНК ковалентной связью; например, холестерин, липопротеин, витамин Е и т.д. вводят на этот конец для облегчения прохождения через клеточную мембрану, состоящую из липидного бислоя и взаимодействующую с мРНК в клетке. При этом миРНК также может быть модифицирована путем образования нековалентной связи, например, путем связывания с молекулой фосфолипида, с полипептидом, катионным полимером и т.д. гидрофобной связью или ионной связью для повышения стабильности и биологической активности.

В некоторых воплощениях нуклеотид, содержащий химическую модификацию формулы (I), ее таутомер или ее фармацевтически приемлемую соль, локализован в положении 5, 6 или 7 от 5'-конца антисмысловой цепи.

- 25 В некоторых воплощениях нуклеотид, содержащий химическую модификацию формулы (I), ее таутомер или ее фармацевтически приемлемую соль, локализован в положении 7 5'-конца антисмысловой цепи.

В некоторых воплощениях, когда химическая модификация формулы (I), ее

таутомерная форма или ее фармацевтически приемлемая соль находится в положении 5 от 5'-конца антисмысловой цепи, В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

5 В некоторых воплощениях, когда химическая модификация формулы (I), ее таутомерная форма или ее фармацевтически приемлемая соль находится в положении 6 от 5'-конца антисмысловой цепи, В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

10 В некоторых воплощениях, когда химическая модификация формулы (I), ее таутомерная форма или ее фармацевтически приемлемая соль находится в положении 7 от 5'-конца антисмысловой цепи, В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

15 В некоторых воплощениях, когда химическая модификация формулы (I), ее таутомерная форма или ее фармацевтически приемлемая соль находится в положении 8 от 5'-конца антисмысловой цепи, В выбрано из группы, состоящей из аденина, гуанина, 2,6-диаминопурина, 6-диметиламинопурина, 2-аминопурина, цитозина, урацила, тимина, индола, 5-нитроиндола и 3-нитропиррола.

20 В некоторых воплощениях В представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в положении 5 от 5'-конца антисмысловой цепи не модифицирован.

В некоторых воплощениях В представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в положении 6 от 5'-конца антисмысловой цепи не модифицирован.

25

В некоторых воплощениях В представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в положении 7 от 5'-конца антисмысловой цепи не модифицирован.

30 В некоторых воплощениях В представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в положении 8 от 5'-конца антисмысловой цепи не модифицирован.

В некоторых воплощениях в остальных положениях смысловой цепи и/или антисмысловой цепи, отличающихся от положения, содержащего химическую модификацию формулы (I), по меньшей мере один дополнительный нуклеотид представляет собой модифицированный нуклеотид.

35

В некоторых воплощениях модифицированный нуклеотид выбран из группы,

состоящей из: 2'-метокси-модифицированного нуклеотида, модифицированного 2'-замещенной алкоксигруппой нуклеотида, 2'-алкил-модифицированного нуклеотида, модифицированного 2'-замещенным алкилом нуклеотида, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, модифицированного 2'-замещенной
5 аминоксигруппой нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксинуклеотида, 2'-дезоксид-2'-фтор-модифицированного нуклеотида, нуклеотида 3'-дезоксид-тимина, изонуклеотида, "закрытой" нуклеиновой кислоты (LNA), нуклеиновой кислоты с этиленовым мостиком (ENA), конформационно затрудненной этилом нуклеиновой кислоты (сET), незамкнутой нуклеиновой
10 кислоты (UNA) и гликоль-нуклеиновой кислоты (GNA). В некоторых воплощениях каждый из модифицированных нуклеотидов независимо выбран из группы, состоящей из: 2'-метокси-модифицированного нуклеотида или 2'-фтор-модифицированного нуклеотида.

В некоторых воплощениях смысловая цепь содержит три смежных
15 нуклеотида с одной и той же модификацией.

В некоторых воплощениях этими тремя нуклеотидами с одной и той же модификацией являются 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды.

В некоторых воплощениях, в направлении от 5'-конца к 3'-концу, каждый из нуклеотидов в положениях 2, 4, 6, 10, 12, 14, 16 и 18 антисмысловой цепи
20 независимо представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид.

В некоторых воплощениях антисмысловая цепь по меньшей мере частично обратнoкомплементарна целевой последовательности. В некоторых воплощениях имеется не более 5, не более 4, не более 3, не более 2 ошибочных спариваний или не более 1 ошибочного спаривания между антисмысловой цепью и целевой
25 последовательностью. В некоторых воплощениях антисмысловая цепь полностью обратнo комплементарна целевой последовательности.

В некоторых воплощениях смысловая цепь по меньшей мере частично обратнoкомплементарна антисмысловой цепи, чтобы образовать двухцепочечный участок. В некоторых воплощениях имеется не более 5, не более 4, не более 3, не
30 более 2 случаев или не более 1 случая ошибочного спаривания между смысловой цепью и антисмысловой цепью. В некоторых воплощениях смысловая цепь полностью обратнoкомплементарна антисмысловой цепи.

В некоторых воплощениях каждая цепь из смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо имеет 16-35, 16-34, 17-34, 17-33, 18-33, 18-32, 18-31, 18-30, 18-29,
35 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 19-25, 19-24 или 19-23 нуклеотида (например, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотида).

В некоторых воплощениях смысловая цепь и антисмысловая цепь по длине являются одинаковыми или разными; длина смысловой цепи составляет 19-23 нуклеотида (например, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотида), а длина антисмысловой цепи составляет 19-26 нуклеотидов. Соотношение длины смысловой цепи к длине антисмысловой цепи в дцРНК, предложенной согласно настоящему изобретению, может составлять 19/19, 19/20, 19/21, 19/22, 19/23, 19/24, 19/25, 19/26, 20/19, 20/20, 20/21, 20/22, 20/23, 20/24, 20/25, 20/26, 21/20, 21/21, 21/22, 21/23, 21/24, 21/25, 21/26, 22/20, 22/21, 22/22, 22/23, 22/24, 22/25, 22/26, 23/20, 23/21, 23/22, 23/23, 23/24, 23/25 или 23/26. В некоторых воплощениях соотношение длины смысловой цепи к длине антисмысловой цепи составляет 19/21, 21/23 или 23/25. В некоторых воплощениях соотношение длины смысловой цепи к длине антисмысловой цепи составляет 19/21.

В некоторых воплощениях миРНК содержит один или два “тупых” конца.

В некоторых конкретных воплощениях каждая цепь миРНК независимо содержит 1-2 неспаренных нуклеотида, образующих выступы.

В некоторых воплощениях миРНК содержит выступ на 3'-конце антисмысловой цепи.

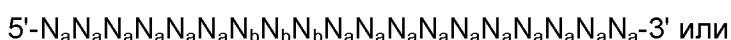
В некоторых воплощениях тремя смежными нуклеотидами в положениях 7-9 5'-конца в смысловой цепи миРНК являются 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды.

В некоторых воплощениях смысловая цепь содержит нуклеотиды формулы, показанной ниже (5'-3'):



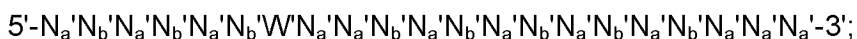
где каждый X независимо представляет собой N_a или N_b ; N_a представляет собой 2'-метокси-модифицированный нуклеотид, а N_b представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид.

В некоторых воплощениях смысловая цепь содержит нуклеотиды формулы, показанной ниже:



где N_a представляет собой 2'-метокси-модифицированный нуклеотид, а N_b представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид.

В некоторых воплощениях антисмысловая цепь содержит нуклеотиды формулы, показанной ниже:

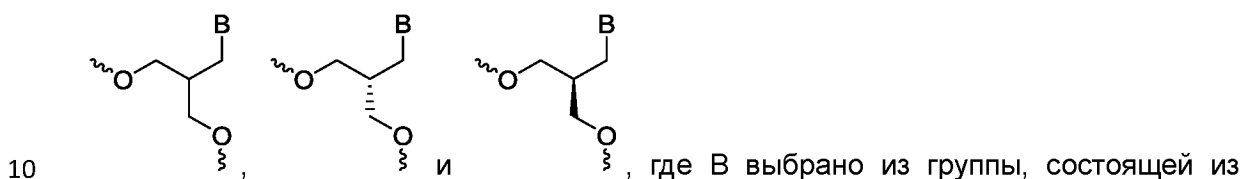


где N_a' представляет собой 2'-метокси-модифицированный нуклеотид, а N_b'

представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид; W' представляет собой 2'-метокси-модифицированный нуклеотид или нуклеотид, содержащий химическую модификацию формулы (I), ее таутомерную форму или ее модификацию в форме фармацевтически приемлемой соли.

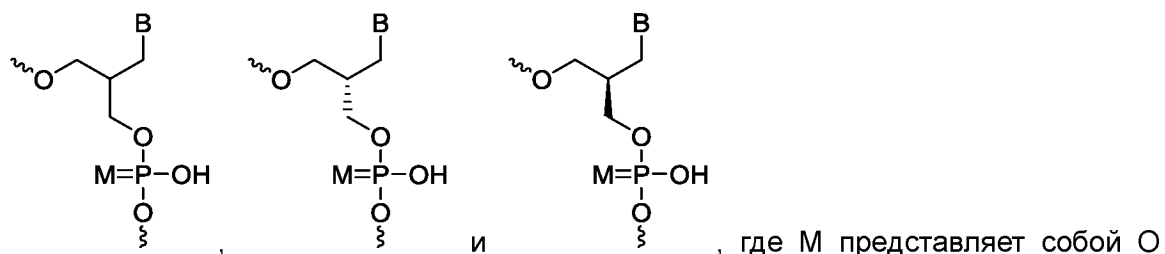
- 5 В некоторых конкретных воплощениях W' представляет собой нуклеотид, химическую модификацию формулы (I), ее таутомер или ее фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых конкретных воплощениях химическая модификация формулы (I) выбрана из группы, состоящей из:



гуанина, аденина, цитозина и урацила. В некоторых конкретных воплощениях B представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в положении 7 от 5'-конца антисмысловой цепи не модифицирован.

- 15 В некоторых конкретных воплощениях химическая модификация формулы (I) выбрана из группы, состоящей из:



- 20 или S; B выбрано из группы, состоящей из гуанина, аденина, цитозина или урацила. В некоторых конкретных воплощениях B представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в положении 7 от 5'-конца антисмысловой цепи не модифицирован.

В некоторых конкретных воплощениях M представляет собой S. В некоторых конкретных воплощениях M представляет собой O.

- 25 В некоторых воплощениях по меньшей мере одна фосфоэфирная группа в смысловой цепи и/или антисмысловой цепи представляет собой фосфоэфирную группу с модифицирующей группой. Модифицирующая группа придает миРНК повышенную стабильность в биологическом образце или среде. В некоторых воплощениях фосфоэфирная группа с модифицирующей группой представляет собой фосфотиоатную группу. В некоторых воплощениях фосфоэфирная группа с модифицирующей группой представляет собой фосфотиоатную дизфирную группу.

В некоторых воплощениях фосфотиоатная диэфирная группа находится по меньшей мере в одном из следующих положений:

- положении между 1-ым и 2-ым нуклеотидами 5'-конца смысловой цепи;
- положении между 2-ым и 3-ым нуклеотидами 5'-конца смысловой цепи;
- 5 положении между 1-ым и 2-ым нуклеотидами 5'-конца антисмысловой цепи;
- положении между 2-ым и 3-ым нуклеотидами 5'-конца антисмысловой цепи;
- положении между 1-ым и 2-ым нуклеотидами 3'-конца антисмысловой цепи;

и

- положении между 2-ым и 3-ым нуклеотидами 3'-конца антисмысловой цепи.
- 10 В некоторых воплощениях смысловая цепь и/или антисмысловая цепь содержат множество фосфотиоатных диэфирных групп, которые находятся:

- между 1-ым и 2-ым нуклеотидами 5'-конца смысловой цепи; и
- между 2-ым и 3-ым нуклеотидами 5'-конца смысловой цепи; и
- между 1-ым и 2-ым нуклеотидами 5'-конца антисмысловой цепи; и
- 15 между 2-ым и 3-ым нуклеотидами 5'-конца антисмысловой цепи; и
- между 1-ым и 2-ым нуклеотидами 3'-конца антисмысловой цепи; и
- между 2-ым и 3-ым нуклеотидами 3'-конца антисмысловой цепи.

В некоторых воплощениях смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность показанной ниже формулы:

- 20 $5'-NmsNmsNmNmNfNmNfNfNmNmNmNmNmNmNmNmNmNmNm-3'$ или
 $5'-NmsNmsNmNmNmNmNfNfNfNmNmNmNmNmNmNmNmNmNmNm-3'$,

- где Nm представляет собой любой 2'-метокси-модифицированный нуклеотид, такой как 2'-метокси-модифицированный C, G, U или A; Nf представляет собой любой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид, такой как 2'-фтор-модифицированный C, G,
 25 U или A;

- строчная буква s указывает на то, что два нуклеотида, примыкающие к букве s, связаны через фосфотиоатную диэфирную группу; строчная буква s, когда стоит первой на 3'-конце, указывает на то, что конец нуклеотида, примыкающего к букве s
 30 вверх по течению (в 5'-направлении), представляет собой фосфотиоатную диэфирную группу.

В некоторых воплощениях антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность показанной ниже формулы:

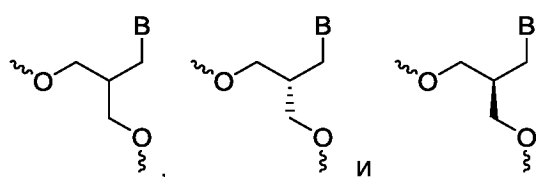
- $5'-Nm'sNf'sNm'Nf'Nm'Nf'W'Nm'Nm'Nf'Nm'Nf'Nm'Nf'Nm'Nf'Nm'sNm'sNm'-3'$;
- 35 где Nm' представляет собой любой 2'-метокси-модифицированный нуклеотид, такой как 2'-метокси-модифицированный C, G, U или A; Nf' представляет собой любой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид, такой как 2'-фтор-модифицированный C, G,

U или A;

строчная буква s указывает на то, что два нуклеотида, примыкающие к букве s, связаны через фосфотиоатную диэфирную группу; строчная буква s, когда стоит первой на 3'-конце, указывает на то, что конец нуклеотида, примыкающего к букве s
5 вверх по течению, представляет собой фосфотиоатную диэфирную группу;

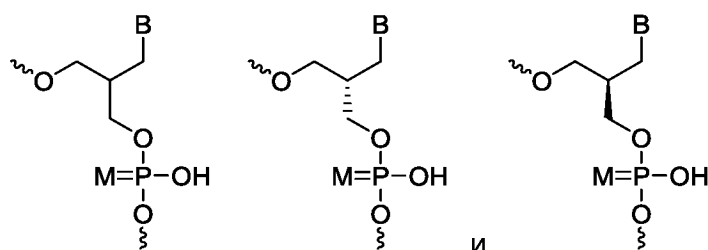
W представляет собой 2'-метокси-модифицированный нуклеотид или нуклеотид, содержащий химическую модификацию формулы (I), ее таутомерную форму или ее модификацию в форме фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых воплощениях химическая модификация формулы (I) выбрана из
10 группы, состоящей из:



, где B выбрано из группы, состоящей из гуанина, аденина, цитозина и урацила. В некоторых воплощениях B представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в положении 7 от 5'-конца антисмысловой цепи не модифицирован.

В некоторых воплощениях химическая модификация формулы (I) выбрана из
15 группы, состоящей из:



, где M представляет собой O или S; B выбрано из группы, состоящей из гуанина, аденина, цитозина или урацила. В некоторых конкретных воплощениях B представляет собой такое же основание,
20 как и в том случае, когда нуклеотид в положении 7 от 5'-конца антисмысловой цепи не модифицирован.

В некоторых воплощениях M представляет собой S. В некоторых конкретных воплощениях M представляет собой O.

25 **дцРНК, нацеленная на HBV**

В некоторых воплощениях миРНК представляет собой миРНК, нацеленную на ген вируса гепатита В (HBV).

В некоторых воплощениях миРНК представляет собой миРНК, нацеленную на ген HBV-S.

В некоторых конкретных воплощениях смысловая цепь и антисмысловая цепь миРНК, нацеленной на HBV-S, выбраны из любой из следующих цепей:

смысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 2, и антисмысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 6.

В некоторых воплощениях миРНК представляет собой миРНК, нацеленную на ген HBV-X.

В некоторых конкретных воплощениях смысловая цепь и антисмысловая цепь миРНК, нацеленной на HBV-X, выбраны из любой из следующих цепей:

смысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 1, и антисмысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 5;

смысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 4, и антисмысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 5; и

смысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 1, и антисмысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 8.

В некоторых воплощениях смысловая цепь миРНК содержит последовательность, отличающуюся не более чем на 3 нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 4, и содержит по меньшей мере 15 (в некоторых воплощениях выбранных по меньшей мере из 19) смежных нуклеотидов, и/или

антисмысловая цепь содержит последовательность, отличающуюся не более чем на 3 нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 8, и содержит по меньшей мере 19 (в некоторых воплощениях по меньшей мере 21) смежных нуклеотидов.

В некоторых воплощениях, в миРНК, нуклеотидная последовательность смысловой цепи содержит любую последовательность SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 4, и/или нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи содержит любую последовательность SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 8.

В некоторых воплощениях смысловая цепь и антисмысловая цепь миРНК выбраны из любой из следующих цепей:

смысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 1, и антисмысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 5;

смысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 2, и антисмысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 6;

5 смысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 3, и антисмысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 7;

смысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 4, и антисмысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 5; и

10 смысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 1, и антисмысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 8.

В некоторых воплощениях смысловая цепь и антисмысловая цепь мРНК выбраны из любой из следующих цепей:

15 смысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 1, и антисмысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 5;

20 смысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 2, и антисмысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 6;

смысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 3, и антисмысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 7;

25 смысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 4, и антисмысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 5; и

смысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 1, и антисмысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 8.

30 В описании настоящего изобретения в направлении 5'-3':

SEQ ID NO: 1 представляет собой GUGUGCACUUCGCUUCACC;

SEQ ID NO: 2 представляет собой CUUUUGUCUUUGGGUAUAU;

SEQ ID NO: 3 представляет собой UUACCAAUUUUCUUUUGUU;

SEQ ID NO: 4 представляет собой GUGUGCACUUCGCUUCACU;

35 SEQ ID NO: 5 представляет собой AGUGAAGCGAAGUGCACACGG;

SEQ ID NO: 6 представляет собой AUAUACCCAAAGACAAAAGAA;

SEQ ID NO: 7 представляет собой AACAAAAGAAAAUUGGUAACA; и

SEQ ID NO: 8 представляет собой IGUGAAGCGAAGUGCACACGG.

В некоторых воплощениях миРНК представляет собой TJR100381 и TJR100382.

5 В некоторых воплощениях в дцРНК, описанной в настоящем изобретении, смысловая цепь содержит любую из последовательностей SEQ ID NO: 9 - SEQ ID NO: 15, и/или

нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи содержит любую из последовательностей SEQ ID NO: 17 - SEQ ID NO: 20.

10 В некоторых воплощениях дцРНК выбрана из любой из следующих структур: дцРНК, имеющей смысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 9, и антисмысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 17;

дцРНК, имеющей смысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 11, и антисмысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 18;

15 дцРНК, имеющей смысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 13, и антисмысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 19;

дцРНК, имеющей смысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 10, и антисмысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 17;

20 дцРНК, имеющей смысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 12, и антисмысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 18;

дцРНК, имеющей смысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 14, и антисмысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 19;

дцРНК, имеющей смысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 9, и антисмысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 20; и

25 дцРНК, имеющей смысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 15, и антисмысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 17.

В некоторых воплощениях дцРНК представляет собой любой из следующих вариантов:

30 дцРНК, содержащую смысловую цепь с SEQ ID NO: 9 и антисмысловую цепь с SEQ ID NO: 17;

дцРНК, содержащую смысловую цепь с SEQ ID NO: 11 и антисмысловую цепь с SEQ ID NO: 18;

дцРНК, содержащую смысловую цепь с SEQ ID NO: 13 и антисмысловую цепь с SEQ ID NO: 19;

35 дцРНК, содержащую смысловую цепь с SEQ ID NO: 10 и антисмысловую цепь с SEQ ID NO: 17;

дцPHK, содержащую смысловую цепь с SEQ ID NO: 12 и антисмысловую цепь с SEQ ID NO: 18;

дцPHK, содержащую смысловую цепь с SEQ ID NO: 14 и антисмысловую цепь с SEQ ID NO: 19;

5 дцPHK, содержащую смысловую цепь с SEQ ID NO: 9 и антисмысловую цепь с SEQ ID NO: 20; и

дцPHK, содержащую смысловую цепь с SEQ ID NO: 15 и антисмысловую цепь с SEQ ID NO: 17.

В некоторых воплощениях дцPHK выбрана из любой из следующих структур:

10 дцPHK, содержащей SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 17;

дцPHK, содержащей SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 18;

дцPHK, содержащей SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 19;

дцPHK, содержащей SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 17;

дцPHK, содержащей SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 18;

15 дцPHK, содержащей SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 19;

дцPHK, содержащей SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 20; и

дцPHK, содержащей SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 17.

В некоторых воплощениях дцPHK представляет собой любой из следующих вариантов:

20 дцPHK с SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 17;

дцPHK с SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 18;

дцPHK с SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 19;

дцPHK с SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 17;

дцPHK с SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 18;

25 дцPHK с SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 19;

дцPHK с SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 20; и

дцPHK с SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 17.

В некоторых воплощениях дцPHK выбрана из любой из следующих структур:

30 дцPHK, содержащей смысловую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 9, и антисмысловую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 17, или выбранной из группы, состоящей из смысловой цепи, приведенной в SEQ ID NO: 9, и антисмысловой цепи, приведенной в SEQ ID NO: 17;

35 дцPHK, содержащей смысловую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 9, и антисмысловую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 20, или выбранной из группы, состоящей из смысловой цепи, приведенной в SEQ ID NO: 9, и антисмысловой цепи, приведенной в SEQ ID NO: 20;

дцРНК, содержащей смысловую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 11, и антисмысловую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 18, или выбранной из группы, состоящей из смысловой цепи, приведенной в SEQ ID NO: 11, и антисмысловой цепи, приведенной в SEQ ID NO: 18;

5 дцРНК, содержащей смысловую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 13, и антисмысловую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 19, или выбранной из группы, состоящей из смысловой цепи, приведенной в SEQ ID NO: 13, и антисмысловой цепи, приведенной в SEQ ID NO: 19;

10 дцРНК, содержащей смысловую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 10, и антисмысловую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 17, или выбранной из группы, состоящей из смысловой цепи, приведенной в SEQ ID NO: 10, и антисмысловой цепи, приведенной в SEQ ID NO: 17;

15 дцРНК, содержащей смысловую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 12, и антисмысловую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 18, или выбранной из группы, состоящей из смысловой цепи, приведенной в SEQ ID NO: 12, и антисмысловой цепи, приведенной в SEQ ID NO: 18;

20 дцРНК, содержащей смысловую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 14, и антисмысловую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 19, или выбранной из группы, состоящей из смысловой цепи, приведенной в SEQ ID NO: 14, и антисмысловой цепи, приведенной в SEQ ID NO: 19; и

дцРНК, содержащей смысловую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 15, и антисмысловую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 17, или выбранной из группы, состоящей из смысловой цепи, приведенной в SEQ ID NO: 15, и антисмысловой цепи, приведенной в SEQ ID NO: 17.

25 В некоторых конкретных воплощениях дцРНК, нацеленная на HBV-X, представляет собой любой из следующих вариантов:

дцРНК с SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 17;

дцРНК с SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 17;

дцРНК с SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 20; и

30 дцРНК с SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 17.

В некоторых конкретных воплощениях дцРНК, нацеленная на HBV-S, представляет собой любой из следующих вариантов:

дцРНК с SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 18;

дцРНК с SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 19;

35 дцРНК с SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 18; и

дцРНК с SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 19.

В описании настоящего изобретения в направлении 5'-3':

SEQ ID NO: 9 представляет собой

GmsUmsGmUmGmCmAfCfUfUmCmGmCmUmUmCmAmCmCm-NAG0052';

SEQ ID NO: 10 представляет собой

5 GmsUmsGmUmGfCmAfCfUfUmCmGmCmUmUmCmAmCmCm-NAG0052';

SEQ ID NO: 11 представляет собой

CmsUmsUmUmUfGmUfCfUfUmUmGmGmGmUmAmUmAmUm-NAG0052';

SEQ ID NO: 12 представляет собой

CmsUmsUmUmUmGmUfCfUfUmUmGmGmGmUmAmUmAmUm-NAG0052';

10 SEQ ID NO: 13 представляет собой

UmsUmsAmCmCfAmAfUfUfUmUmCmUmUmUmUmGmUmUm-NAG0052';

SEQ ID NO: 14 представляет собой

UmsUmsAmCmCmAmAfUfUfUmUmCmUmUmUmUmGmUmUm-NAG0052';

SEQ ID NO: 15 представляет собой

15 GmsUmsGmUmGmCmAfCfUfUmCmGmCmUmUmCmAmCmUm-NAG0052';

SEQ ID NO: 17 представляет собой

AmsGfsUmGfAmAf(-)hmpNA(G)CmGmAfAmGfUmGfCmAfCmAfCmsGmsGm;

SEQ ID NO: 18 представляет собой

AmsUfsAmUfAmCf(-)hmpNA(C)CmAmAfAmGfAmCfAmAfAmAfGmsAmsAm;

20 SEQ ID NO: 19 представляет собой

AmsAfsCmAfAmAf(-)hmpNA(A)GmAfAmAfUmUfGmGfUmAfAmsCmsAm; и

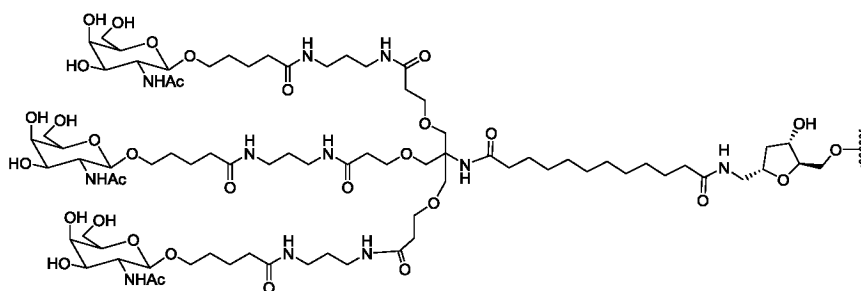
SEQ ID NO: 20 представляет собой

lmsGfsUmGfAmAf(-)hmpNA(G)CmGmAfAmGfUmGfCmAfCmAfCmsGmsGm;

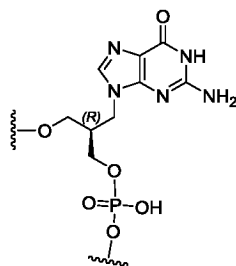
25 где Af означает аденин-2'-F-рибонуклеозид; Cf означает цитозин-2'-F-рибонуклеозид; Uf означает урацил-2'-F-рибонуклеозид; Gf означает гуанин-2'-F-рибонуклеозид; Am означает аденин-2'-ОМе-рибонуклеозид; Cm означает цитозин-2'-ОМе-рибонуклеозид; Gm означает гуанин-2'-ОМе-рибонуклеозид; Um означает урацил-2'-ОМе-рибонуклеозид; lm означает гипоксантин-2'-ОМе-рибонуклеозид;

30 s указывает на то, что два нуклеотида, примыкающие к букве s, связаны через фосфотиоатную дизфирную группу;

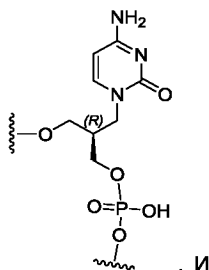
NAG0052' представляет собой



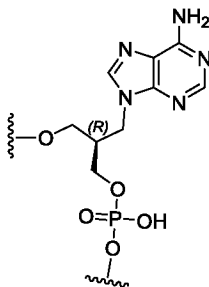
(-)-hmpNA(G) представляет собой



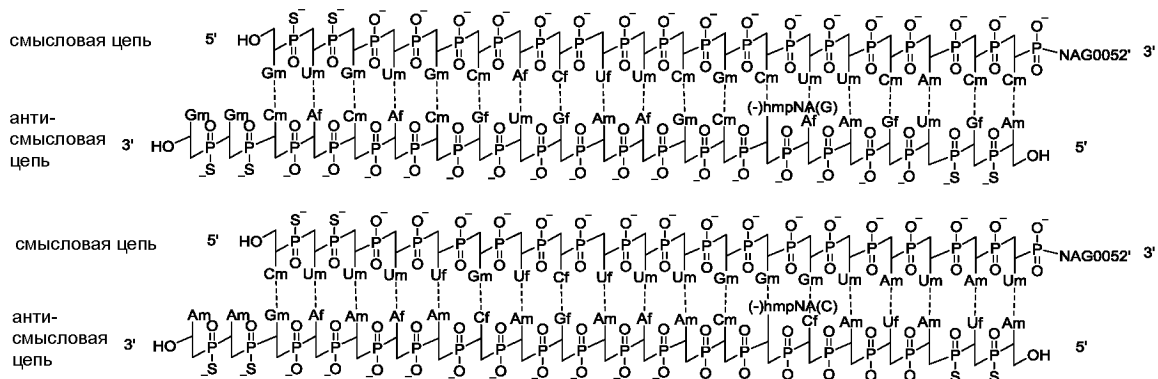
(-)-hmpNA(C) представляет собой

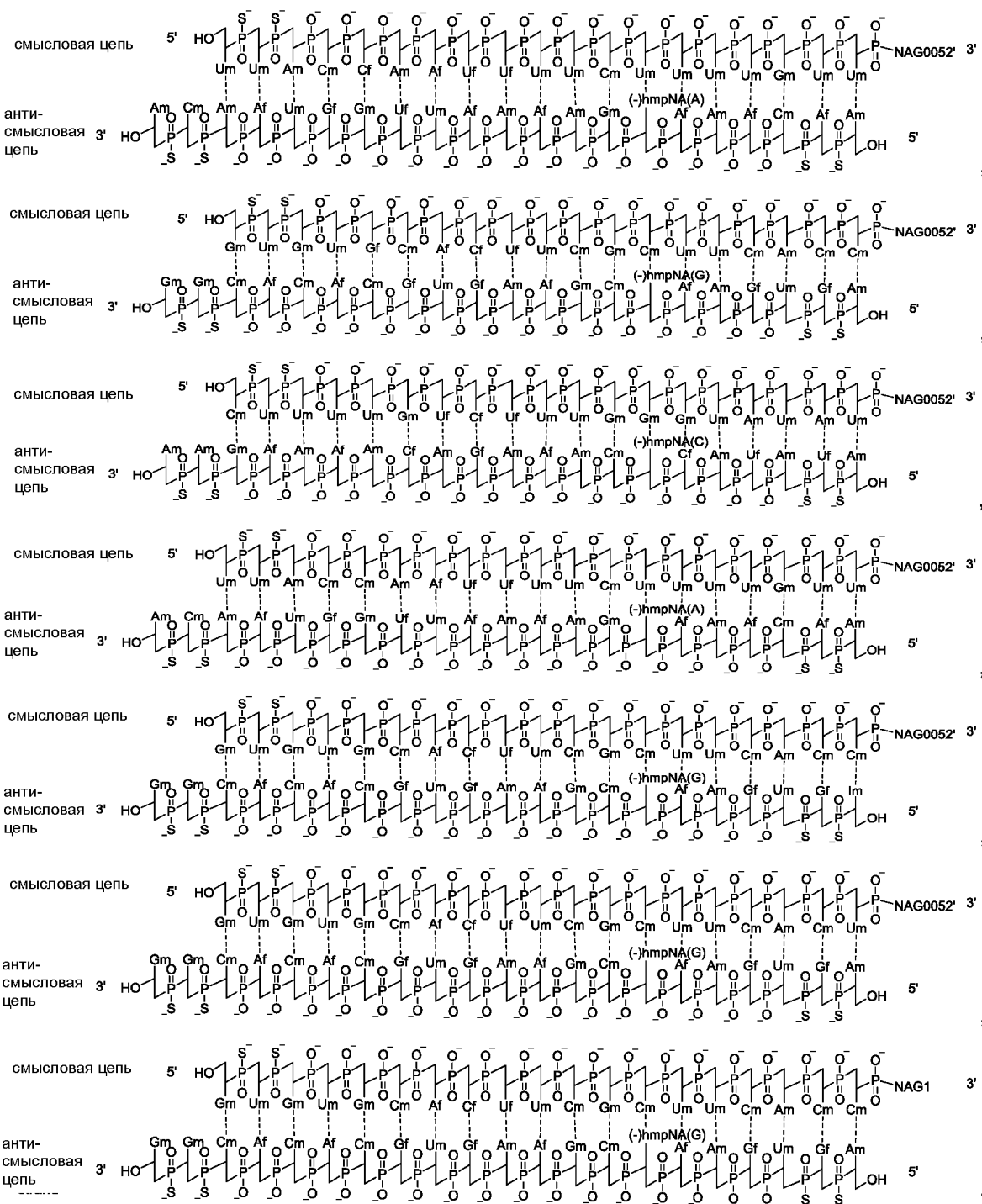


(-)-hmpNA(A) представляет собой



- 5 В некоторых воплощениях дцРНК выбрана из группы, состоящей из следующих структур или их фармацевтически приемлемых солей:





5

10

где

Af означает аденин-2'-F-рибонуклеозид;

Cf означает цитозин-2'-F-рибонуклеозид;

Gf означает гуанин-2'-F-рибонуклеозид;

Uf означает урацил-2'-F-рибонуклеозид;

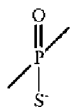
Am означает аденин-2'-ОМе-рибонуклеозид;

Cm означает цитозин-2'-ОМе-рибонуклеозид;

Gm означает гуанин-2'-ОМе-рибонуклеозид;

Um означает урацил-2'-ОМе-рибонуклеозид;

Im означает инозин-2'-ОМе-рибонуклеозид;



представляет собой фосфотиоатную диэфирную группу,

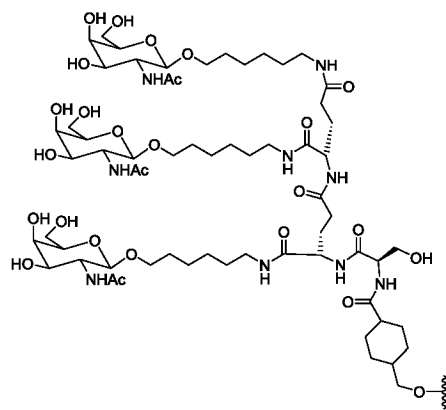
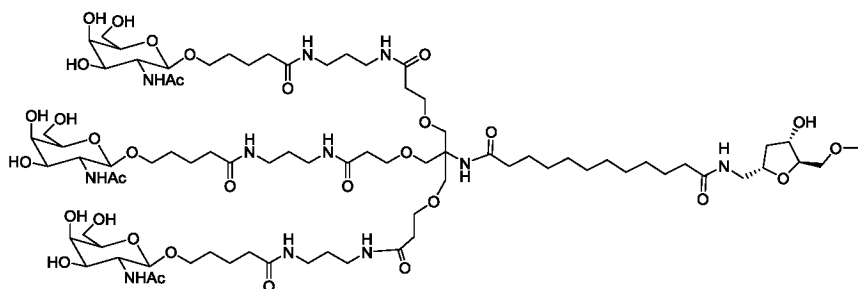


5 представляет собой фосфодиэфирную группу,

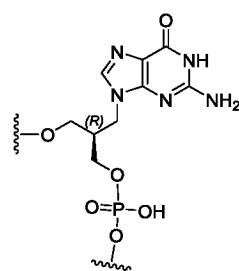
NAG0052'

представляет

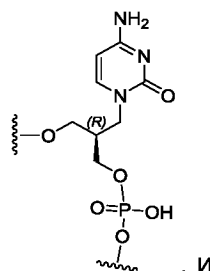
собой



NAG1 представляет собой



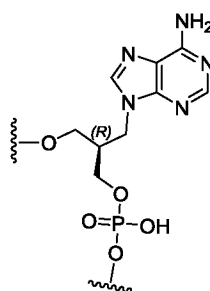
(-)hmpNA(G) представляет собой



10

(-)hmpNA(C) представляет собой

, И

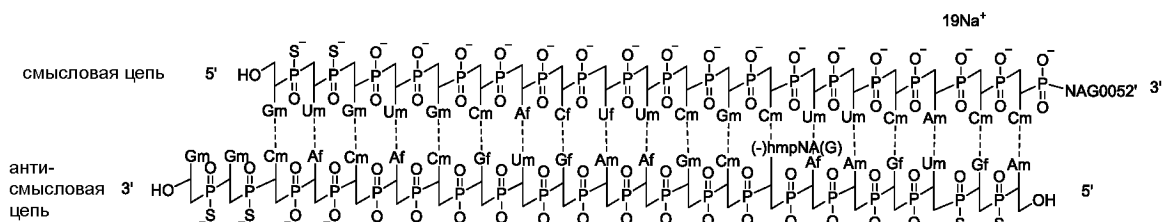


(-)hmpNA(A) представляет собой

В некоторых воплощениях фармацевтически приемлемой солью может быть традиционная в данной области техники соль, включая, но не ограничиваясь этим: соли натрия, соли калия, соли аммония, соли аминов и так далее.

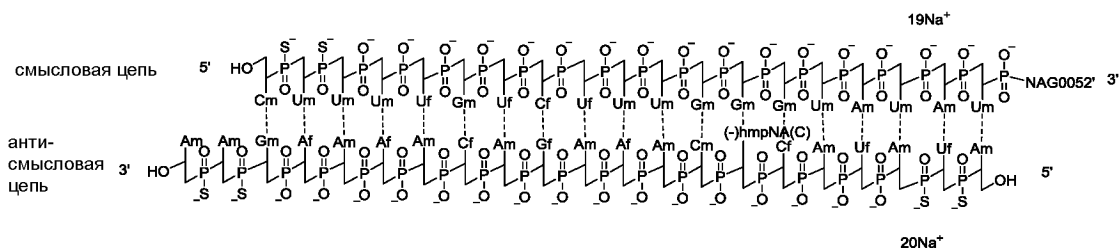
5 В некоторых конкретных воплощениях дцРНК выбрана из группы, состоящей из TRD007970, TRD007994, TRD007995, TRD007970-1, TRD007994-1, TRD007995-1, TJR100259 или TJR100260.

В некоторых воплощениях дцРНК представляет собой TRD007970 следующей структуры:

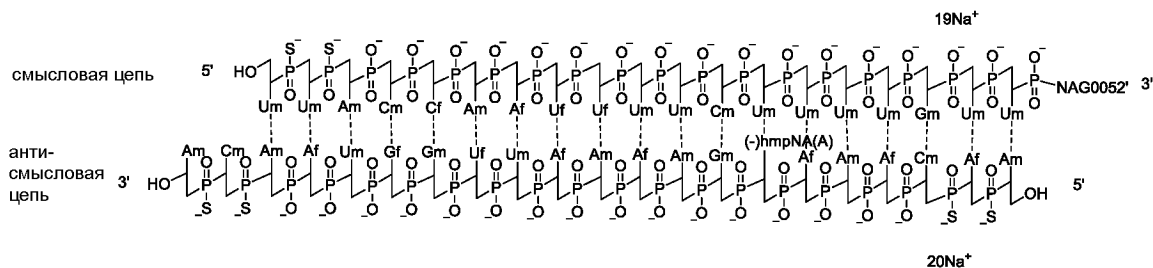


10

В некоторых воплощениях дцРНК представляет собой TRD007994 следующей структуры:

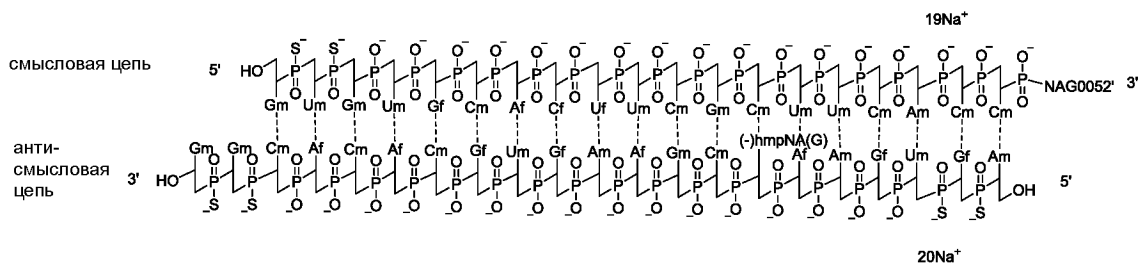


15 В некоторых воплощениях дцРНК представляет собой TRD007995 следующей структуры:

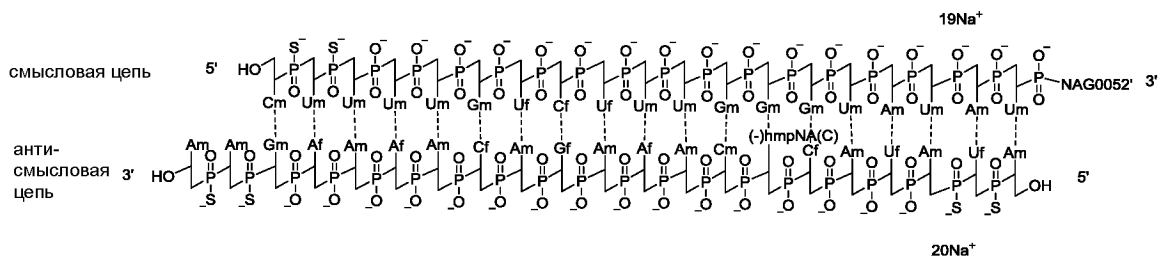


В некоторых воплощениях дцРНК представляет собой TRD007970-1 следующей

структуры:

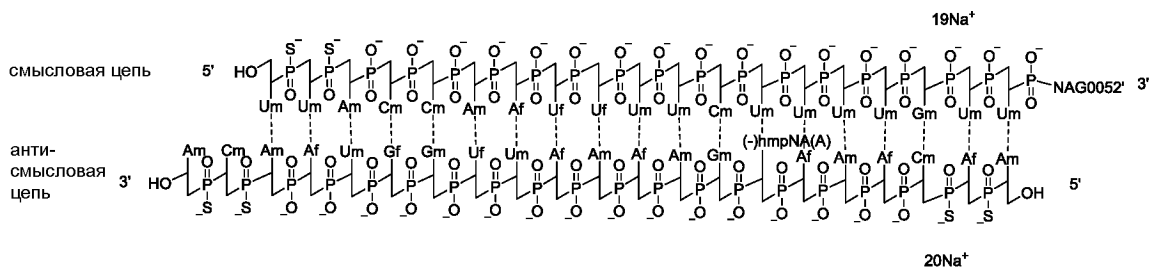


В некоторых воплощениях дцРНК представляет TRD007994-1 следующей структуры:



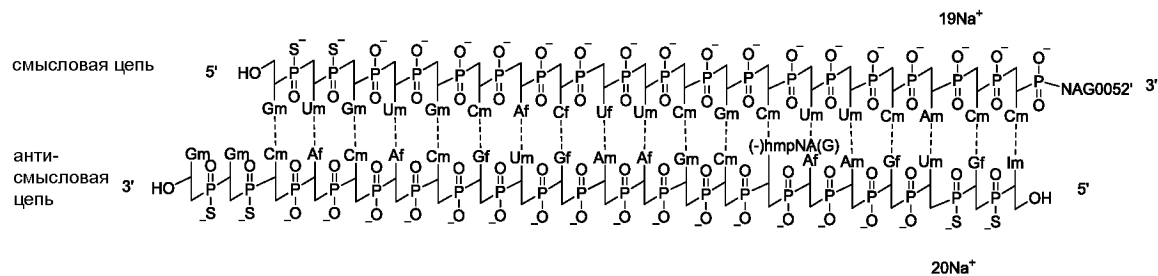
5

В некоторых воплощениях дцРНК представляет собой TRD007995-1 следующей структуры:

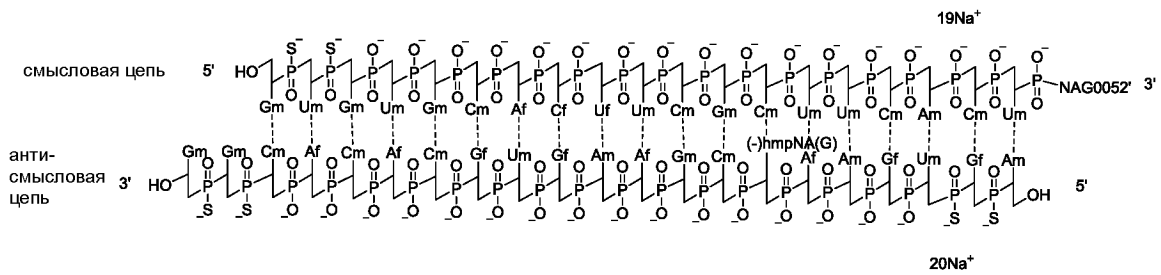


10

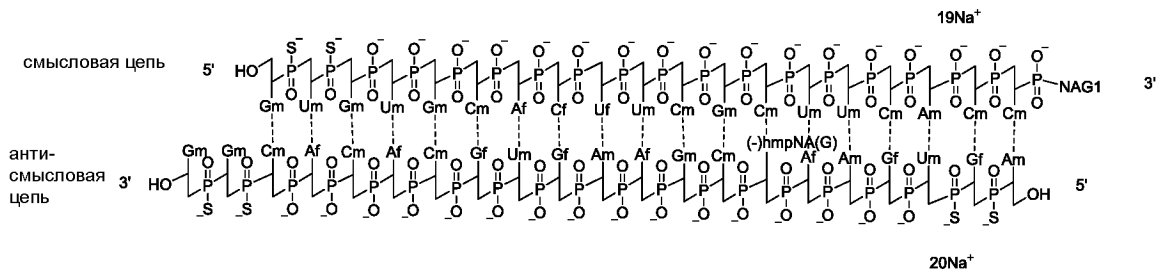
В некоторых воплощениях дцРНК представляет собой TJR100259 следующей структуры:



В некоторых воплощениях дцРНК представляет собой TJR100260 следующей структуры:

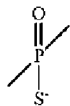


В некоторых воплощениях дцРНК представляет собой TJR100410 следующей структуры:

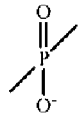


5 где Af означает аденин-2'-F-рибонуклеозид; Cf означает цитозин-2'-F-рибонуклеозид; Gf означает гуанин-2'-F-рибонуклеозид; Uf означает урацил-2'-F-рибонуклеозид;

Am означает аденин-2'-ОМе-рибонуклеозид; Cm означает цитозин-2'-ОМе-рибонуклеозид; Gm означает гуанин-2'-ОМе-рибонуклеозид; Um означает урацил-2'-ОМе-рибонуклеозид; Im означает инозин-2'-ОМе-рибонуклеозид;



представляет собой фосфотиоатную диэфирную группу,

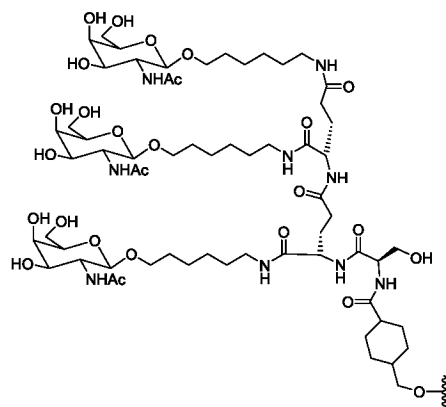
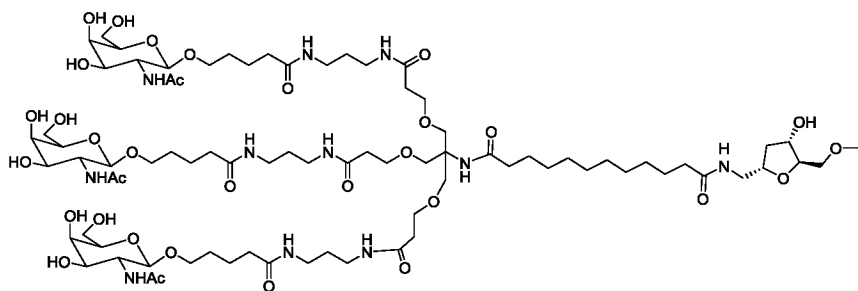


представляет собой фосфодиэфирную группу,

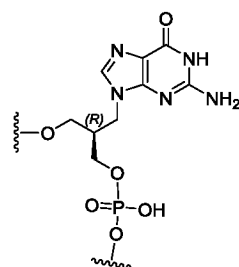
NAG0052'

представляет

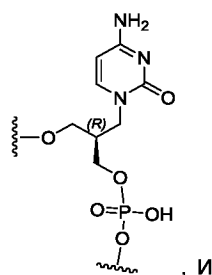
собой



NAG1 представляет собой

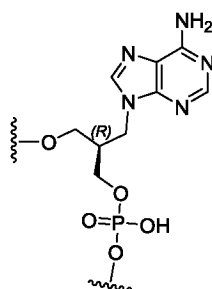


(-)hmpNA(G) представляет собой



5

(-)hmpNA(C) представляет собой



(-)hmpNA(A) представляет собой

В некоторых воплощениях фармацевтически приемлемой солью может быть традиционная в данной области техники соль, включая, но не ограничиваясь этим: соли натрия, соли калия, соли аммония, соли аминов и так далее.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена дцРНК, содержащая смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечный участок, при этом смысловая цепь и антисмысловая цепь выбраны из любой из следующих цепей:

5 смысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 1, и антисмысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 5;

смысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 2, и антисмысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 6;

10 смысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 3, и антисмысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 7;

15 смысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 4, и антисмысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 5; и

смысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 1, и антисмысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 8.

20 В некоторых воплощениях смысловая цепь и антисмысловая цепь дцРНК выбраны из любой из следующих цепей:

смысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 1, и антисмысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 5;

25 смысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 2, и антисмысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 6;

30 смысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 3, и антисмысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 7;

смысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 4, и антисмысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 5; и

35 смысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 1, и антисмысловой цепи, имеющей нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 8.

миРНК и дцРНК, описанные в настоящем изобретении, выбраны из группы, состоящей из таковых синтетического происхождения или полученных *in vitro*.

Фармацевтическая композиция

5 Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено соединение синтетического происхождения или соединение, полученное *in vitro*, выбранное из дцРНК, описанной в настоящем изобретении.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая дцРНК, описанную выше.

10 В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция дополнительно содержит один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция дополнительно содержит один или несколько дополнительных терапевтических агентов.

15 В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция содержит дцРНК, описанную в настоящем изобретении, и один или несколько дополнительных терапевтических агентов в качестве активных ингредиентов.

В некоторых воплощениях дцРНК в фармацевтической композиции используют в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами.

20 В некоторых конкретных воплощениях дополнительный терапевтический агент выбран из группы, состоящей из противовирусных агентов, ингибиторов обратной транскриптазы, иммуностимуляторов, терапевтических вакцин, ингибиторов проникновения вируса, олигонуклеотидов, ингибирующих секрецию или высвобождение поверхностного антигена вируса гепатита В (HbsAg),
25 ингибиторов сборки капсида и ингибиторов ковалентно замкнутой кольцевой (кзк) ДНК HBV.

Известны различные системы доставки, и их можно использовать для дцРНК или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, например, инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные
30 клетки, способные экспрессировать данное соединение, рецептор-опосредуемый эндоцитоз и конструирование нуклеиновой кислоты как части ретровирусного вектора или других векторов.

В некоторых воплощениях дцРНК или фармацевтическую композицию, описанные в настоящем изобретении, вводят традиционным способом, который
35 может быть осуществлен посредством местного введения (например, прямой инъекции или имплантации) или системного введения либо пероральным,

ректальным или парентеральным путями. Парентеральные пути включают, но не ограничиваются этим, подкожную инъекцию, внутривенную инъекцию, внутримышечную инъекцию, внутрибрюшинную инъекцию, трансдермальное введение, ингаляционное введение (например, аэрозольное), мукозальное
5 введение (например, сублингвальное или интраназальное введение), введение в интракраниальное пространство и так далее.

В некоторых воплощениях дцРНК или фармацевтическую композицию, предложенные согласно настоящему изобретению, можно вводить путем инъекции, например, внутривенной, внутримышечной, интрадермальной, подкожной,
10 интрадуоденальной или внутрибрюшинной инъекции.

В некоторых воплощениях дцРНК или фармацевтическая композиция, предложенные согласно настоящему изобретению, могут быть упакованы в составе набора.

Применение и способ лечения

15 Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено применение дцРНК или фармацевтической композиции, описанных в настоящем изобретении, для приготовления лекарственного средства.

В некоторых воплощениях лекарственное средство можно использовать для предупреждения и/или лечения инфекции вирусом гепатита В (HBV) у субъекта.

20 В некоторых воплощениях лекарственное средство можно использовать для предупреждения и/или лечения заболевания, связанного с вирусом гепатита В. В некоторых воплощениях заболевание, связанное с вирусом гепатита В, представляет собой хронический гепатит, и субъект дает положительный результат в тесте на HBeAg или отрицательный результат в тесте на HBeAg.

25 В некоторых воплощениях заболевание, связанное с вирусом гепатита В, представляет собой острый гепатит В, хронический гепатит В, инфекцию вирусом гепатита D, гепатит D, фиброз печени, прогрессирующее заболевание печени и гепатоклеточную карциному.

В некоторых воплощениях эффективное количество или эффективная доза
30 дцРНК или фармацевтической композиции составляет от примерно 0,001 мг/кг массы тела до примерно 200 мг/кг массы тела, от примерно 0,01 мг/кг массы тела до примерно 100 мг/кг массы тела или от примерно 0,5 мг/кг массы тела до примерно 50 мг/кг массы тела.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ
35 предупреждения и/или лечения заболевания, включающий введение субъекту эффективного количества или эффективной дозы дцРНК или фармацевтической

композиции, описанных в настоящем изобретении.

В некоторых воплощениях заболевание выбрано из инфекции вирусом гепатита В (HBV). В некоторых воплощениях заболевание выбрано из заболевания, связанного с вирусом гепатита В. В некоторых воплощениях заболевание, связанное с вирусом гепатита В, представляет собой хронический гепатит, и субъект дает положительный результат в тесте на HBeAg или отрицательный результат в тесте на HBeAg.

В некоторых воплощениях заболевание, связанное с вирусом гепатита В, представляет собой острый гепатит В, хронический гепатит В, инфекцию вирусом гепатита D, гепатит D, фиброз печени, прогрессирующее заболевание печени и гепатоклеточную карциному. В некоторых воплощениях способ по настоящему изобретению дополнительно включает введение субъекту одного дополнительного терапевтического агента.

В некоторых воплощениях дополнительный терапевтический агент выбран из группы, состоящей из противовирусных агентов, ингибиторов обратной транскриптазы, иммуностимуляторов, терапевтических вакцин, ингибиторов проникновения вируса, олигонуклеотидов, ингибирующих секрецию или высвобождение HbsAg, ингибиторов сборки капсида, ингибиторов кзкДНК и комбинаций любых из перечисленного выше.

В некоторых воплощениях эффективное количество или эффективная доза дцРНК или фармацевтической композиции составляет от примерно 0,001 мг/кг массы тела до примерно 200 мг/кг массы тела, от примерно 0,01 мг/кг массы тела до примерно 100 мг/кг массы тела или от примерно 0,5 мг/кг массы тела до примерно 50 мг/кг массы тела. Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ сайленсинга целевого гена или его мРНК в клетке *in vivo* или *in vitro*, включающий стадию введения в эту клетку описанной выше дцРНК или описанной выше фармацевтической композиции.

В некоторых воплощениях целевой ген включает, но не ограничивается этим, гены, нацеленные на HBV (например, HBV-S и HBV-X).

30

Способ ингибирования целевого гена

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ ингибирования экспрессии целевого гена или его мРНК, включающий введение субъекту эффективного количества или эффективной дозы дцРНК, описанной в настоящем изобретении, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем изобретении.

35

В некоторых воплощениях целевой ген включает, но не ограничивается этим, ген HBV (например, HBV-S и HBV-X).

В некоторых воплощениях у субъекта ранее было идентифицировано патологическое повышение уровня экспрессии целевого гена или его мРНК в целевой клетке, популяции клеток, ткани или организме субъекта.

Кроме того, согласно настоящему изобретению предложен способ ингибирования репликации вируса гепатита В (HBV) в клетке, включающий приведение в контакт клетки с дцРНК и/или фармацевтической композицией по настоящему изобретению, в результате чего осуществляется ингибирование репликации HBV в данной клетке. В некоторых воплощениях клетка находится в организме субъекта. В некоторых воплощениях клетка находится *in vitro*.

Кроме того, согласно настоящему изобретению предложен способ снижения уровня антигена вируса гепатита В (HBV) у субъекта, инфицированного HBV, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества дцРНК и/или фармацевтической композиции, описанной в настоящем изобретении, в результате чего наблюдается снижение уровня антигена HBV у субъекта. В некоторых воплощениях антиген HBV представляет собой HBsAg. В некоторых воплощениях антиген HBV представляет собой HBeAg. В некоторых воплощениях субъект дает положительный результат в тесте на HBeAg. В некоторых воплощениях субъект дает отрицательный результат в тесте на HBeAg.

Способ доставки

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ доставки олигонуклеотида в печень, включающий введение субъекту эффективного количества или эффективной дозы дцРНК, описанной выше, или фармацевтической композиции, описанной выше.

В некоторых воплощениях эффективное количество или эффективная доза дцРНК или фармацевтической композиции составляет от примерно 0,001 мг/кг массы тела до примерно 200 мг/кг массы тела, от примерно 0,01 мг/кг массы тела до примерно 100 мг/кг массы тела или от примерно 0,5 мг/кг массы тела до примерно 50 мг/кг массы тела.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен реагент для РНКи (РНК-интерференции), содержащий дцРНК, описанную выше, или фармацевтическую композицию, описанную выше.

В некоторых воплощениях эффективное количество или эффективная доза дцРНК или фармацевтической композиции составляет от примерно 0,001 мг/кг

массы тела до примерно 200 мг/кг массы тела, от примерно 0,01 мг/кг массы тела до примерно 100 мг/кг массы тела или от примерно 0,5 мг/кг массы тела до примерно 50 мг/кг массы тела.

Кроме того, согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена
5 клетка, содержащая дцРНК, описанную выше, или фармацевтическую композицию, описанную выше.

Кроме того, согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен набор или состоящий из частей набор, содержащий дцРНК, описанную выше, или фармацевтическую композицию, описанную выше.

10 В настоящей заявке, когда описанная выше дцРНК или фармацевтическая композиция находится в контакте с клеткой, экспрессирующей целевой ген, то описанная выше дцРНК или фармацевтическая композиция ингибирует экспрессию
15 целевого гена по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%,
20 по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по
25 меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% по результатам измерений, например, посредством скрининга активности с применением psiCHECK, анализа репортерного гена люциферазы, методов полимеразной цепной реакции (ПЦР) или методов, основанных на измерении
30 разветвленной ДНК (разветвл. ДНК), либо методов, основанных на измерении белков, таких как иммунофлуоресцентный анализ, вестерн-блоттинг или проточная цитометрия.

В настоящей заявке, когда описанная выше дцРНК или фармацевтическая композиция находится в контакте с клеткой, экспрессирующей целевой ген, то в
30 результате воздействия описанной выше дцРНК или фармацевтической композиции наблюдается выраженная в процентах остаточная экспрессия мРНК целевого гена, составляющая не более 99%, не более 95%, не более 90%, не более 85%, не более 80%, не более 75%, не более 70%, не более 65%, не более 60%, не более 55%, не более 50%, не более 45%, не более 40%, не более 35%, не более 30%, не более
35 25%, не более 20%, не более 15% или не более 10%, по результатам измерений, например, посредством скрининга активности с применением psiCHECK, анализа

репортерного гена люциферазы, ПЦР или методов, основанных на измерении разветвленной ДНК (разветвл. ДНК), либо методов, основанных на измерении белков, таких как иммунофлуоресцентный анализ, вестерн-блоттинг или проточная цитометрия.

5 В настоящей заявке, когда описанная выше дцРНК или фармацевтическая композиция находится в контакте с клеткой, экспрессирующей целевой ген, то дцРНК снижает нецелевую активность по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%,
10 по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70% или по меньшей мере на 75% при одновременном поддержании целевой активности, по результатам измерений, например, посредством скрининга активности с применением psiCHECK, анализа репортерного гена люциферазы, ПЦР или методов, основанных на измерении разветвленной ДНК (разветвл. ДНК), либо
15 методов, основанных на измерении белков, таких как иммунофлуоресцентный анализ, вестерн-блоттинг или проточная цитометрия.

В настоящей заявке, когда описанная выше дцРНК или фармацевтическая композиция находится в контакте с клеткой, экспрессирующей целевой ген, то дцРНК снижает нецелевую активность по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%,
20 по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70% или по меньшей мере на 75% при одновременном снижении целевой активности не более чем на 20%, не более чем на 19%, не более чем на 15%, не более чем на
25 10%, не более чем на 5% или не более чем на 1%, по результатам измерений, например, посредством скрининга активности с применением psiCHECK, анализа репортерного гена люциферазы, ПЦР или методов, основанных на измерении разветвленной ДНК (разветвл. ДНК), либо методов, основанных на измерении белков, таких как иммунофлуоресцентный анализ, вестерн-блоттинг или проточная
30 цитометрия.

В настоящей заявке, когда описанная выше дцРНК или фармацевтическая композиция находится в контакте с клеткой, экспрессирующей целевой ген, то дцРНК снижает нецелевую активность по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%,
35 по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70% или

по меньшей мере на 75%, при одновременном увеличении целевой активности по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по 5 меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75% или по меньшей мере на 80%, по результатам измерений, например, посредством скрининга активности с применением psiCHECK и анализа репортерного гена люциферазы, ПЦР или методов, основанных на измерении 10 разветвленной ДНК (разветвл. ДНК), либо методов, основанных на измерении белков, таких как иммунофлуоресцентный анализ, вестерн-блоттинг или проточная цитометрия.

Кроме того, согласно настоящему изобретению предложен способ получения дцРНК или фармацевтической композиции, включающий: синтез лиганда, миРНК, 15 дцРНК или фармацевтической композиции, описанных в настоящем изобретении.




Термины и определения

Чтобы облегчить понимание настоящего изобретения, ниже специально приведены определения некоторых технических и научных терминов. Если в 20 данном описании конкретно не указано иное, то все другие технические и научные термины, использованные в данном описании, имеют значения, обычно понимаемые специалистом средней квалификации в области техники, к которой настоящее изобретение относится.

Соединения по настоящему изобретению могут существовать в конкретных 25 геометрических или стереоизомерных формах. Настоящее изобретение охватывает все такие соединения, в том числе *цис*- и *транс*-изомеры, (-)- и (+)-энантиомеры, (*R*)- и (*S*)-энантиомеры, диастереомеры, (*D*)-изомер, (*L*)-изомер и их рацемические смеси и другие их смеси, такие как энантиомерно или диастереомерно обогащенные смеси, и все они включены в объем настоящего изобретения. В 30 заместителях, таких как алкильная группа, могут присутствовать дополнительные асимметрические атомы углерода. Все такие изомеры и их смеси включены в объем настоящего изобретения. Соединения по настоящему изобретению, содержащие асимметрические атомы углерода, могут быть выделены в оптически активной чистой форме или в рацемической форме. Оптически активная чистая форма может 35 быть выделена из рацемической смеси или синтезирована с использованием хиральных исходных веществ или хиральных реагентов.

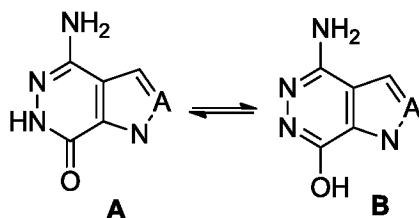
Оптически активные (*R*)- и (*S*)-энантиомеры и *D*- и *L*-изомеры могут быть получены методом хирального синтеза, с использованием хиральных реагентов или другими традиционными методами. Если желателен один из энантиомеров определенного соединения по настоящему изобретению, то он может быть получен методом асимметрического синтеза или дериватизации с использованием хирального вспомогательного вещества, при этом выполняют разделение полученной смеси диастереомеров и отщепление группы вспомогательного вещества с получением чистого желаемого энантиомера. Альтернативно, если молекула содержит основную функциональную группу (например, amino) или кислотную функциональную группу (например, карбоксил), то, используя соответствующие оптически активные кислоту или основание, образуют соли диастереомеров, затем выполняют разделение диастереомеров традиционными методами, известными в данной области техники, и путем извлечения получают чистые энантиомеры. Кроме того, для разделения энантиомеров и диастереомеров обычно проводят хроматографию с использованием хиральной неподвижной фазы, возможно в сочетании с химической дериватизацией (например, образованием карбаматов из аминов).

В химических структурах соединений по настоящему изобретению связь “/” означает нахождение в неконкретизированной конфигурации; то есть, если в данных химических структурах имеются хиральные изомеры, то связь “/” может представлять собой связь “.....” или “/” либо одновременно включать связи обеих конфигураций “.....” и “/”. В химических структурах соединений по настоящему изобретению конфигурация связи “//” не конкретизирована; то есть, конфигурацией для связи “//” может быть *E*-конфигурация или *Z*-конфигурация, либо она включает как *E*-конфигурацию, так и *Z*-конфигурацию.

В химических структурных формулах в описании настоящего изобретения символ “”, “” или “” может означать связывание с любой группой или любыми группами в соответствии с объемом данного изобретения, описанным в данной заявке; звездочка “*” указывает на хиральный центр.

Если конфигурация не конкретизирована, то соединения и промежуточные соединения по настоящему изобретению также могут существовать в разных таутомерных формах, и все такие формы включены в объем настоящего изобретения. Термин “таутомер” или “таутомерная форма” относится к структурным изомерам разных энергий, взаимопревращение которых может происходить через низкий энергетический барьер. Например, протонные таутомеры (также известные

как таутомеры с переносом протонов) наблюдаются при взаимопревращении, обусловленном миграцией протонов, как например, в случае кето-енольной и имин-енаминной, лактим-лактаминной изомерии. Представлен пример лактим-лактаминного равновесия между формами А и В, как показано ниже.



5

Все соединения в описании настоящего изобретения можно изобразить в виде формы А или формы В. Все таутомерные формы попадают в объем настоящего изобретения. Названия соединений не исключают любые таутомеры.

Настоящее изобретение также включает меченные изотопом соединения, которые идентичны соединениям, упомянутым в данном описании, но характеризуются заменой одного или более чем одного атома на атом, имеющий атомную массу или массовое число, отличающиеся от атомной массы или массового числа, обычно встречающихся в природе. Примеры изотопов, которые могут быть инкорпорированы в соединения по настоящему изобретению, включают

10 изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фосфора, серы, фтора, йода и хлора, такие как ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F , ^{123}I , ^{125}I и ^{36}Cl .

Если не указано иное, то когда какое-либо положение конкретно обозначено как дейтерий (D), следует понимать, что в этом положении относительное

20 содержание дейтерия по меньшей мере в 1000 раз превышает содержание дейтерия в природе (которое составляет 0,015%) (т.е. с инкорпорированием по меньшей мере 10% дейтерия). Соединения из примеров содержат дейтерий с относительным содержанием, превышающим содержание дейтерия в природе по

25 меньшей мере в 1000 раз, превышающим содержание дейтерия в природе по меньшей мере в 2000 раз, превышающим содержание дейтерия в природе по меньшей мере в 3000 раз, превышающим содержание дейтерия в природе по

30 меньшей мере в 4000 раз, превышающим содержание дейтерия в природе по меньшей мере в 5000 раз, превышающим содержание дейтерия в природе по меньшей мере в 6000 раз или превышающим содержание дейтерия в природе в большее число раз. Настоящее изобретение также включает различные дейтерированные формы соединений формулы (I), формулы (I') и формулы (II). Каждый доступный атом водорода, связанный с атомом углерода, может быть

независимо заменен на атом дейтерия. Специалисты в данной области техники могут синтезировать дейтерированные формы соединений формулы (I), формулы (I') и формулы (II), руководствуясь релевантными литературными источниками. При получении дейтерированных форм соединений формулы (I), формулы (I') и формулы (II) можно использовать имеющиеся в продаже дейтерированные исходные вещества, или их можно синтезировать традиционными методами с использованием дейтерированных реагентов, включая, но не ограничиваясь этим, дейтерированный боргидрид, содержащий три атома дейтерия боргидрид в тетрагидрофуране, дейтерированный алюмогидрид лития, дейтерированный иодэтан, дейтерированный иодметан и тому подобное.

Если не указано иное, то “возможно”, “возможный”, “альтернативно” или “альтернативный” означает, что событие или обстоятельство, описываемое далее, может произойти, но происходит не обязательно, и такое описание включает случаи, в которых данное событие или обстоятельство происходит либо не происходит. Например, “возможно, R_1 и R_2 связаны напрямую с образованием кольца”, означает, что связывание R_1 и R_2 напрямую с образованием кольца может происходить, но происходит не обязательно, и такое описание включает случай, когда R_1 и R_2 связаны напрямую с образованием кольца, и случай, когда R_1 и R_2 не образуют кольца.

Термины “примерно” и “приблизительно” означают, что численное значение находится в пределах приемлемого диапазона погрешностей для этого конкретного значения, определенного специалистом средней квалификации в данной области техники, и численное значение частично зависит от того, каким образом измерено или определено это значение (т.е. от ограничений системы измерения). Например, “примерно” может означать нахождение в пределах диапазона стандартного отклонения. Альтернативно, термин “примерно” или “по существу включающий” может означать нахождение в диапазоне не более 20%, например, изменение в диапазоне от 1% до 15%, от 1% до 10%, от 1% до 5%, от 0,5% до 5% или от 0,5% до 1%. В описании настоящего изобретения каждый случай, когда числу или численному диапазону предшествует термин “примерно” также включает воплощение для данного числа. Если не указано иное, то когда в настоящей заявке и формуле изобретения указано конкретное значение, следует полагать, что значение “примерно” или “по существу включающий” находится в пределах приемлемого диапазона погрешностей для этого конкретного значения.

В описании настоящего изобретения термин “содержат” может быть заменен на “состоят из”.

Если не указано иное, то каждый из терминов “соединение”, “химическая модификация”, “лиганд”, “дцРНК”, “нуклеиновая кислота” и “РНКи” по настоящему изобретению может независимо относиться к форме соли, смеси солей или несоли (например, к свободной кислоте или свободному основанию). При отнесении к

5 форме соли или смеси солей речь может идти о фармацевтически приемлемой соли.

“Фармацевтически приемлемая соль” может быть выбрана из группы, состоящей из неорганических или органических солей, и также может включать фармацевтически приемлемые соли присоединения кислоты и фармацевтически

10 приемлемые соли присоединения основания.

“Фармацевтически приемлемая соль присоединения кислоты” относится к солям, которые способны сохранять биологическую эффективность свободных оснований без оказания каких-либо нежелательных эффектов и которые образуются с неорганическими или органическими кислотами. Соли неорганических

15 кислот включают, но не ограничиваются этим, гидрохлориды, гидробромиды, сульфаты, нитраты, фосфаты и т.д.; соли органических кислот включают, но не ограничиваются этим, формиаты, ацетаты, 2,2-дихлорацетаты, трифторацетаты, пропионаты, капроаты, каприлаты, капраты, ундеценаты, гликоляты, глюконаты, лактаты, себакаты, адипаты, глутараты, малонаты, оксалаты, малеаты, сукцинаты,

20 фумараты, тартраты, цитраты, пальмитаты, стеараты, олеаты, циннаматы, лаураты, малаты, глутаматы, пироглутаматы, аспартаты, бензоаты, мезилаты, бензолсульфонаты, *p*-толуолсульфонаты, альгинаты, аскорбаты, салицилаты, 4-аминосалицилаты, нападизилаты и так далее. Эти соли могут быть получены с использованием способов, известных в данной области техники.

“Фармацевтически приемлемая соль присоединения основания” относится к солям, которые способны сохранять биологическую эффективность свободных кислот без оказания каких-либо нежелательных эффектов и которые образуются с неорганическими основаниями или органическими основаниями. Соли, происходящие из неорганических оснований, включают, но не ограничиваются этим,

30 соли натрия, соли калия, соли лития, соли аммония, соли кальция, соли магния, соли железа, соли цинка, соли меди, соли марганца, соли алюминия и так далее. Предпочтительными неорганическими солями являются соли аммония, соли натрия, соли калия, соли кальция и соли магния; предпочтительны соли натрия. Соли, происходящие из органических оснований, включают, но не ограничиваются

35 этим, соли следующих соединений: первичных, вторичных и третичных аминов, замещенных аминов, в том числе природных замещенных аминов, циклических

аминов и основных ионообменных смол, например, аммиака, изопропиламина, триметиламина, диэтиламина, триэтиламина, трипропиламина, этаноламина, диэтанолламина, триэтанолламина, диметилэтанолламина, 2-диметиламиноэтанолла, 2-диэтиламиноэтанолла, дициклогексиламина, лизина, аргинина, гистидина, кофеина, прокаина, холина, бетаина, этилендиаминла, глюкозаминла, метилглюкамина, теоброминла, пурина, пиперазинла, пиперидинла, N-этилпиперидинла, полиаминных смол и так далее. Предпочтительные органические основания включают изопропиламин, диэтиламин, этаноламин, триметиламин, дициклогексиламин, холин и кофеин. Эти соли могут быть получены с использованием способов, известных в данной области техники.

“Алкил” относится к насыщенной алифатической углеводородной группе, которая включает, например, линейные и разветвленные группы, содержащие 1-30 атомов углерода (C₁-C₃₀алкил), в качестве другого примера, алкил, содержащий 1-6 атомов углерода (C₁-C₆алкил) и в качестве еще одного примера алкил с 1-3 атомами углерода (C₁-C₃алкил). Неограничивающие примеры включают метил, этил, *n*-пропил, изопропил, *n*-бутил, изобутил, *трет*-бутил, *втор*-бутил, *n*-пентил, 1,1-диметилпропил, 1,2-диметилпропил, 2,2-диметилпропил, их различные разветвленные изомеры и тому подобное.

Термин “алкенил” относится к углеводородной группе, содержащей по меньшей мере одну двойную связь. Неограничивающие примеры алкенила включают, но не ограничиваются этим, этенил, 1-пропенил, 2-пропенил, 1-бутенил или 2-бутенил и их различные разветвленные изомеры.

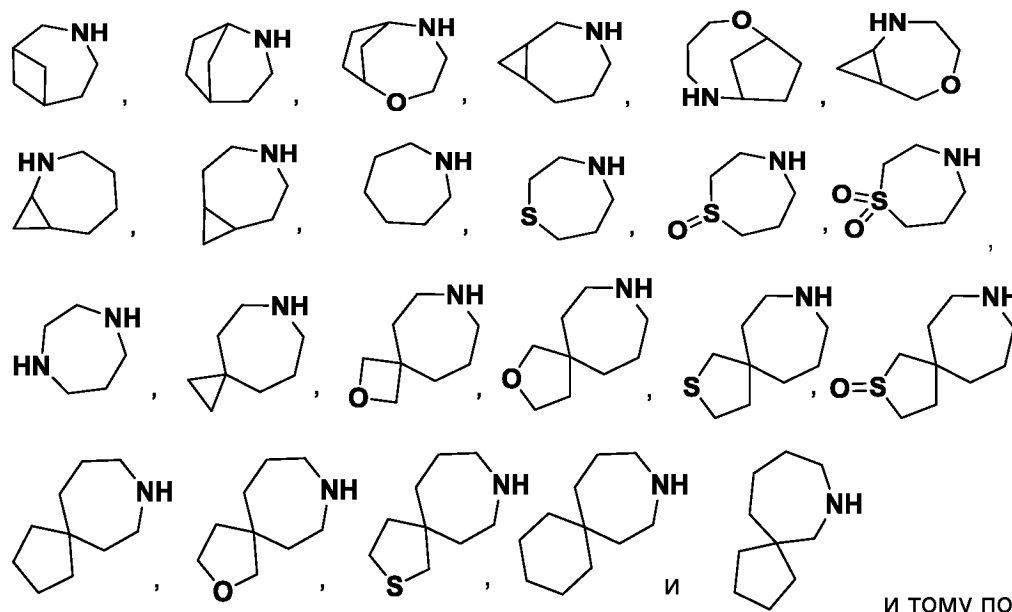
Термин “алкинил” относится к углеводородной группе, содержащей по меньшей мере одну тройную связь. Неограничивающие примеры алкинила включают, но не ограничиваются этим, этинил, 1-пропинил, 2-пропинил, 1-бутинил или 2-бутинил и их различные разветвленные изомеры.

Термин “алкокси” относится к группе -O-(алкил), где алкил является таким, как определено выше. Неограничивающие примеры алкокси включают: метокси, этокси, пропокси и бутокси.

“Циклоалкил” относится к насыщенному или частично ненасыщенному моноциклическому или полициклическому углеводородному заместителю; циклоалкильное кольцо содержит 3-20 атомов углерода, предпочтительно 3-6 атомов углерода и более предпочтительно 5-6 атомов углерода. Неограничивающие примеры моноциклического циклоалкила включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентенил, циклогексил, циклогексенил, циклогексаденил и тому подобное. Полициклический циклоалкил включает спироциклоалкил,

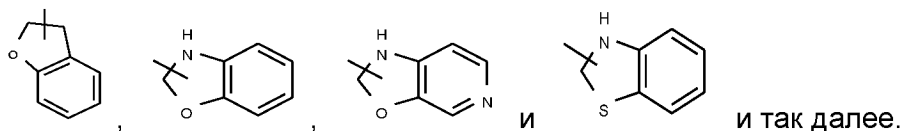
конденсированный циклоалкил и мостиковый циклоалкил.

“Гетероциклоалкил” относится к насыщенному или частично ненасыщенному, моноциклическому или полициклическому углеводородному заместителю, содержащему 3-20 атомов в кольце, один или несколько из которых представляют собой гетероатомы, выбранные из группы, состоящей из атома азота, атома кислорода и группы $S(O)_m$ (где m представляет собой целое число от 0 до 2), но не содержащему в кольце группировки $-O-O-$, $-O-S-$ или $-S-S-$, а другими атомами в кольце являются атомы углерода. Предпочтительно он содержит 3-12 атомов в кольце, среди которых от 1 до 4 являются гетероатомами; более предпочтительно, он содержит 3-7 атомов в кольце. Неограничивающие примеры “гетероциклоалкильных” групп включают:



и тому подобное.

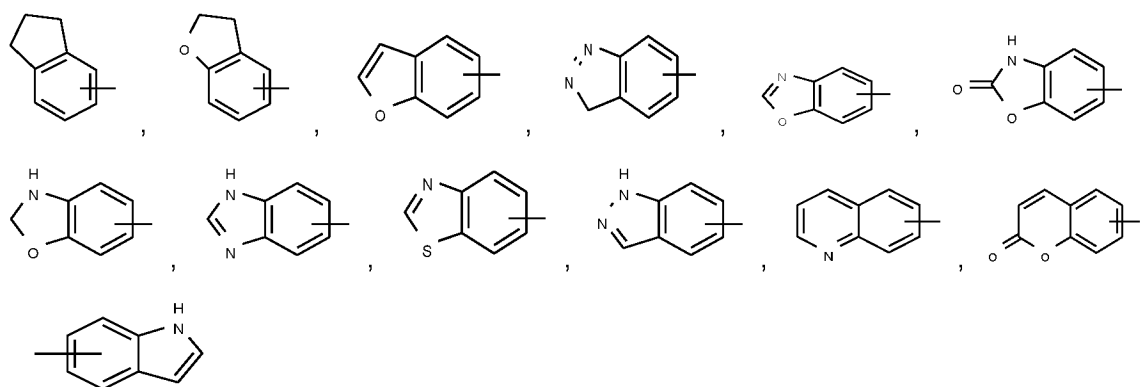
Гетероциклоалкильное кольцо может быть конденсировано с арильным или гетероарильным кольцом, при этом кольцо, присоединенным к исходной структуре, является гетероциклоалкил; его неограничивающие примеры включают:



и так далее.

“Арил” относится к 6-14-членной, предпочтительно 6-12-членной, состоящей полностью из атомов углерода моноциклической или конденсированной полициклической группе (т.е. к кольцам, имеющим общую пару соседних атомов углерода), имеющей сопряженную π -электронную систему, такой как фенил и нафтил. Арильное кольцо может быть конденсировано с гетероарильным, гетероциклоалкильным или циклоалкильным кольцом, при этом кольцом,

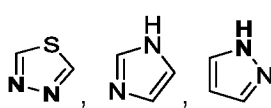
присоединенным к исходной структуре, является арильное кольцо; его неограничивающие примеры включают:



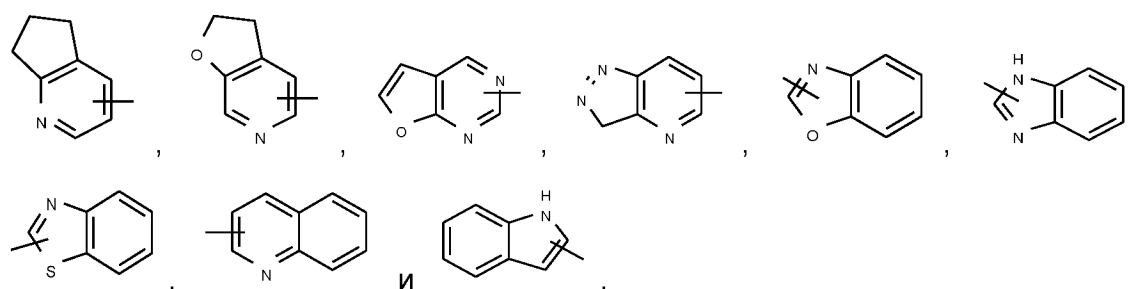
5 И

“Гетероарил” относится к гетероароматической системе, содержащей 1-4 гетероатома и 5-14 атомов в кольце, при этом гетероатомы выбраны из группы, состоящей из атомов кислорода, серы и азота. Гетероарил предпочтительно является 6-12-членным и более предпочтительно является 5- или 6-членным.

10 Например, его неограничивающие примеры включают: имидазолил, фуранил, тиенил, тиазолил, пиразолил, оксазолил, изоксазолил, пирролил, тетразолил, пиридинил, пиримидинил, триадиазол, пиразинил, триазолил, индазолил,

бензимидазолил,  и тому подобное.

15 Гетероарильное кольцо может быть конденсировано с арильным, гетероциклоалкильным или циклоалкильным кольцом, при этом кольцом, присоединенным к исходной структуре, является гетероарильное кольцо; его неограничивающие примеры включают:



20 Термин “гидрокси” относится к группе -ОН.

Термин “галоген” относится к фтору, хлору, бромю или йоду.

Термин “циано” относится к -CN.

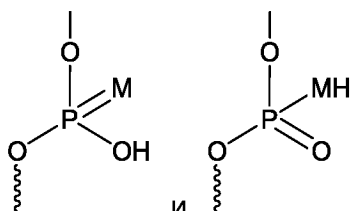
Термин “амино” относится к -NH₂.

Термин “нитро” относится к -NO₂.

25 Термин “оксо” относится к заместителю =O.

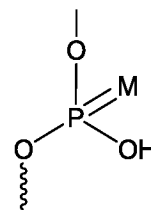
В описании настоящего изобретения термин “фосфоэфирная группа” может означать фосфомоноэфирную группу, фосфодиэфирную группу или фосфотриэфирную группу, предпочтительно фосфодиэфирную группу.

В описании настоящего изобретения термин “фосфотиоатная диэфирная группа” означает фосфодиэфирную группу, модифицированную путем замены
5 одного немостикового атома кислорода на атом серы, и используется

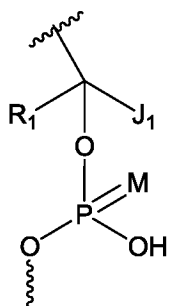


взаимозаменяемо с $\text{P}(=\text{M})(\text{OH})\text{O}$ и $\text{P}(=\text{MN})(\text{OH})\text{O}$ (M представляет собой атом S).

“Замещение” или “замещенный” означает, что один или более атомов
10 водорода, предпочтительно до 5 атомов водорода включительно и более предпочтительно 1-3 атома водорода, в группе независимо замещены соответствующим числом заместителей. Если заместителем является кетон или оксо (т.е. =O), то на атоме углерода заменены два (2) атома водорода.



В контексте настоящего изобретения группа $\text{P}(=\text{M})(\text{OH})\text{O}$ в группе



15 может быть заменена на любую группу, способную связываться с соседним нуклеотидом.

Термин “связываться”, “соединяться” или “присоединяться”, применительно
к взаимосвязи между двумя молекулами, означает, что эти две молекулы соединены ковалентной связью или что эти две молекулы объединены посредством нековалентной связи (например, водородной связи или ионной связи), и включает в
20 себя прямую связь и опосредованную связь.

Термин “связанные напрямую” означает, что первое соединение или первая группа связано(а) со вторым соединением или второй группой без участия какого либо атома или какой-либо группы атомов, располагающихся между ними.

Термин “связанные опосредованно” означает, что первое соединение или первая группа связано(а) со вторым соединением или второй группой через промежуточную группу, промежуточное соединение или промежуточную молекулу (например, соединяющую группу).

5 “Фармацевтическая композиция” относится к смеси, содержащей одно или несколько соединений или их физиологически/фармацевтически приемлемых солей или пролекарств, описанных в данной заявке, и другие химические компоненты, а также такие другие компоненты, как физиологически/фармацевтически приемлемые носители и эксципиенты. Предполагается, что нахождение в составе
10 фармацевтической композиции содействует введению в организм и облегчает всасывание активного ингредиента, тем самым способствуя проявлению биологической активности.

Термин “фармацевтически приемлемый эксципиент” включает в себя, но не ограничивается этим, любое вспомогательное вещество, носитель, глидант,
15 подсластитель, разбавитель, консервант, краситель/окрашивающее вещество, корригент, поверхностно-активное вещество, увлажняющий агент, диспергирующее вещество, суспендирующий агент, стабилизатор, изотонический агент, забуферивающий агент, растворитель или эмульгатор, которые одобрены как приемлемые для применения на людях или сельскохозяйственных животных.

20 Используемый в данном описании термин “ингибировать” применяется взаимозаменяемо с терминами “снижать”, “выключать”, “отрицательно регулировать”, “подавлять” и другими похожими терминами и подразумевает любой уровень ингибирования. Ингибирование можно оценить с точки зрения снижения абсолютного или относительного уровня одной или нескольких из этих переменных
25 относительно контрольного уровня. Контрольным уровнем может быть контрольный уровень любого типа, применяемый в данной области техники, как например, базовый уровень до введения дозы или уровень, определяемый у схожих субъекта, клетки или образца, не подвергнутых обработке или подвергнутых обработке контрольным веществом (например, только буфером в качестве контроля или
30 контрольным инертным агентом). Например, уровень остаточной экспрессии мРНК можно использовать, чтобы охарактеризовать степень ингибирования экспрессии целевого гена под действием миРНК (или дцРНК); например, уровень остаточной экспрессии мРНК составляет не более 99%, не более 95%, не более 90%, не более 85%, не более 80%, не более 75%, не более 70%, не более 65%, не более 60%, не
35 более 55%, не более 50%, не более 45%, не более 40%, не более 35%, не более 30%, не более 25%, не более 20%, не более 15% или не более 10%. Степень

ингибирования экспрессии целевого гена можно измерить, используя систему для анализа люциферазы Dual-Glo®: прочитывают каждое из значений - значение хемилюминесценции для люциферазы светлячков (Fir) и значение хемилюминесценции для люциферазы коралла renilla (Ren) - и рассчитывают относительную величину - соотношение = Ren/Fir и степень ингибирования (%) = 1 - (соотношение + только мiРНК/репортерный ген)×100%; в описании настоящего изобретения соотношение уровня остаточной экспрессии мРНК (или оставшейся активности, %) = 100% - степень ингибирования (%).

Термин “эффективное количество” или “эффективная доза” включает в себя количество, достаточное для уменьшения интенсивности или предотвращения симптома или признака медицинского расстройства. Эффективное количество также относится к количеству, достаточному для содействия проведению или для облегчения проведения диагностики. Эффективное количество для конкретного пациента или ветеринарного субъекта может варьировать в зависимости от таких факторов, как подлежащее лечению расстройство, общее состояние здоровья пациента, способ, путь и доза введения, а также тяжесть побочных эффектов. Эффективное количество может относиться к максимальной дозе или режиму введения, позволяющим избежать значительных побочных эффектов или токсических эффектов.

Использованные в данном описании термины “объект”, “пациент”, “субъект” и “индивид” применяются взаимозаменяемо и включают в себя человека или не являющихся человеком животных, например, млекопитающих, таких как люди или обезьяны.

Использованный в данном описании термин смысловая цепь (также называемая как SS или SS-цепь) относится к цепи, содержащей последовательность, которая идентична или по существу идентична последовательности целевой мРНК; антисмысловая цепь (также называемая как AS или AS-цепь) относится к цепи, имеющей последовательность, комплементарную последовательности целевой мРНК.

В описании настоящего изобретения термины “5'-участок”, “5'-конец” и “5'-концевая часть” смысловой или антисмысловой цепи используются взаимозаменяемо. Например, нуклеотиды в положениях 2-8 5'-участка антисмысловой цепи могут быть заменены на нуклеотиды в положениях 2-8 из 5'-конца антисмысловой цепи. Аналогичным образом, термины “3'-участок”, “3'-конец” и “3'-концевая часть” смысловой или антисмысловой цепи также используются взаимозаменяемо.

В контексте описания смысловой цепи мРНК, описанной в данной заявке, подразумевается, что термин “последовательность, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 4 и содержащая по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов” означает, что смысловая цепь мРНК, описанная в данной заявке, содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов любой из смысловых цепей в последовательностях SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 4 или содержит последовательность, отличающуюся не более чем на 3 нуклеотида (возможно, не более чем на 2 нуклеотида; возможно, на 1 нуклеотид) от по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов любой из смысловых цепей в последовательностях SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 4. Возможно, смысловая цепь мРНК, описанная в данной заявке, содержит по меньшей мере 16 смежных нуклеотидов любой из смысловых цепей в последовательностях SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 4 или содержит последовательность, отличающуюся не более чем на 3 нуклеотида (возможно, не более чем на 2 нуклеотида; возможно, на 1 нуклеотид) от по меньшей мере 16 смежных нуклеотидов любой из смысловых цепей в последовательностях SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 4.

В контексте описания антисмысловой цепи мРНК, описанной в данной заявке, подразумевается, что термин “последовательность, отличающаяся не более чем на 3 нуклеотида от любой из антисмысловых цепей с последовательностями SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 8 и содержащая по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов” означает, что антисмысловая цепь мРНК, описанная в данной заявке, содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов любой из антисмысловых цепей в последовательностях SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 8 или содержит последовательность, отличающуюся не более чем на 3 нуклеотида (возможно, не более чем на 2 нуклеотида; возможно, на 1 нуклеотид) от по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов любой из антисмысловых цепей в последовательностях SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 8.

Если не указано иное, то в контексте настоящего изобретения каждый из “G”, “C”, “A”, “T” и “U” представляет собой нуклеотид и содержит основания гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил, соответственно. В контексте настоящего изобретения, I эквивалентен нуклеотиду, содержащему нуклеотидное основание гипоксантин. В некоторых воплощениях термин “инозин”, использованный в данном описании, эквивалентен нуклеозиду, содержащему гипоксантин и сахар или модифицированный сахар.

Если не указано иное, то в контексте настоящего изобретения, строчная буква d указывает на то, что нуклеотид, располагающийся вниз по течению

относительно буквы d и соседствующий с буквой d, представляет собой дезоксирибонуклеотид; строчная буква m указывает на то, что нуклеотид, располагающийся вверх по течению относительно буквы m и соседствующий с буквой m, представляет собой 2'-метокси-модифицированный нуклеотид; строчная

5 буква f указывает на то, что нуклеотид, располагающийся вверх по течению относительно буквы f и соседствующий с буквой f, представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид; строчная буква s указывает на то, что два нуклеотида, примыкающие к букве s, связаны через фосфотиоатную дизфирную группу.

10 Использованный в данном описании термин “2'-фтор (2'-F)-модифицированный нуклеотид” относится к нуклеотиду, гидроксигруппа которого в положении 2' рибозильной группы нуклеотида заменена на атом фтора, а “модифицированный не атомом фтора нуклеотид” относится к нуклеотиду или нуклеотидному аналогу, гидроксигруппа которого в положении 2' рибозильной

15 группы нуклеотида заменена на атом, не являющийся группой фтора.

Использованный в описании настоящего изобретения термин “2'-метокси (2'-OMe)-модифицированный нуклеотид” относится к нуклеотиду, у которого 2'-гидроксигруппа рибозильной группы заменена на группу метокси.

В контексте настоящего изобретения термин “нуклеотидное различие” между

20 одной нуклеотидной последовательностью и другой нуклеотидной последовательностью означает, что предшествующий вариант имеет изменение в типе основания нуклеотида в одном и том же положении по сравнению с последующим вариантом; например, если одно нуклеотидное основание в последующем варианте представляет собой А, в том случае, когда

25 соответствующее нуклеотидное основание в этом же положении в предшествующем варианте представляет собой U, C, G или T, то считается, что существует нуклеотидное различие в данном положении между этими двумя нуклеотидными последовательностями. В некоторых воплощениях замену нуклеотида в его исходном положении на нуклеотид с удаленным азотистым

30 основанием или его эквивалент также можно рассматривать как создание нуклеотидного различия в этом положении.

Использованные в данном описании термины “комплементарный” и “обратнокомплементарный” применяются взаимозаменяемо и имеют значение, хорошо известное специалистам в данной области техники; то есть, в молекуле

35 двухцепочечной нуклеиновой кислоты основания одной цепи спариваются с основаниями другой цепи с учетом принципа комплементарности. В случае ДНК,

пуриновое основание аденин всегда спаривается с пиримидиновым основанием тиминном (или урацилом в случае РНК), а пуриновое основание гуанин всегда спаривается с пиримидиновым основанием цитозином. Каждая пара оснований содержит пурин и пиримидин. Если аденины одной цепи всегда спариваются с тиминами (или урацилами) другой цепи, а гуанины всегда спариваются с цитозинами, то считается, что эти две цепи комплементарны друг другу, и последовательности этих цепей установлены на основании последовательности комплементарных им цепей. Соответственно, термин “ошибочное спаривание” в данной области техники означает, что основания в соответствующих положениях в двухцепочечной нуклеиновой кислоте не спариваются с учетом принципа комплементарности.

Термин “химическая модификация” или “модификация” включает все изменения, выполненные в отношении нуклеотида химическими способами, такими как присоединение или удаление химической группировки либо замена одной химической группировки на другую.

Термин “дцРНК” относится к молекуле двухцепочечной РНК, способной участвовать в РНК-интерференции, содержащей смысловую цепь и антисмысловую цепь.

Термин “основание” охватывает любые известные основания, присутствующие в ДНК и РНК, и аналоги оснований, таких как пурины или пиримидины, а также включает в себя природные соединения аденин, тимин, гуанин, цитозин, урацил, инозин и природные аналоги. Аналогами оснований также могут быть универсальные основания.

Термины “тупой конец” и “с тупым концом” используются взаимозаменяемо и означают, что на данном конце миРНК нет никаких неспаренных нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, т.е. нет никаких выступающих нуклеотидов. В большинстве случаев, миРНК, оба конца которой являются тупыми, будет двухцепочечной по всей своей длине.

миРНК, предложенную согласно настоящему изобретению, можно получить, используя традиционный в данной области техники метод получения (например, твердофазный синтез и жидкофазный синтез). Твердофазный синтез доступен в виде услуги по индивидуальному заказу. Группу модифицированного нуклеотида можно ввести в миРНК, описанную в настоящем изобретении, используя нуклеозидный мономер с соответствующей модификацией. Способы получения нуклеозидного мономера с соответствующей модификацией и введения группы модифицированного нуклеотида в миРНК также хорошо известны специалистам в

данной области техники.

Термин “применяемый в комбинации” или “комбинированное применение”, использованный в данном описании, означает способ введения и относится к введению по меньшей мере одной дозы дцРНК и по меньшей мере одной дозы
5 дополнительного терапевтического агента в течение определенного периода времени, при этом все введенные агенты демонстрируют фармакологические эффекты. дцРНК и дополнительный терапевтический агент можно вводить одновременно или последовательно. Такой период времени включает лечение, при
10 котором дцРНК и дополнительный терапевтический агент вводят либо одним и тем же путем введения, либо разными путями введения. Режим введения комбинации, описанной в настоящем изобретении, выбран из группы, состоящей из одновременного введения, приготовления отдельных композиций и их совместного
15 введения, а также приготовления отдельных композиций и их последовательного введения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На ФИГ. 1 показаны уровни остаточной экспрессии мРНК гена транстиретина (TTR) на 7-е сутки после введения TRD002218 и TRD007205.

На ФИГ. 2 показаны уровни остаточной экспрессии мРНК гена TTR на 28-е
20 сутки после введения TRD002218 и TRD007205.

На ФИГ. 3 показаны результаты эксперимента по устойчивости к экзонуклеазе методом гель-электрофореза.

На ФИГ. 4 показаны количественные результаты эксперимента по устойчивости к 5'-экзонуклеазе.

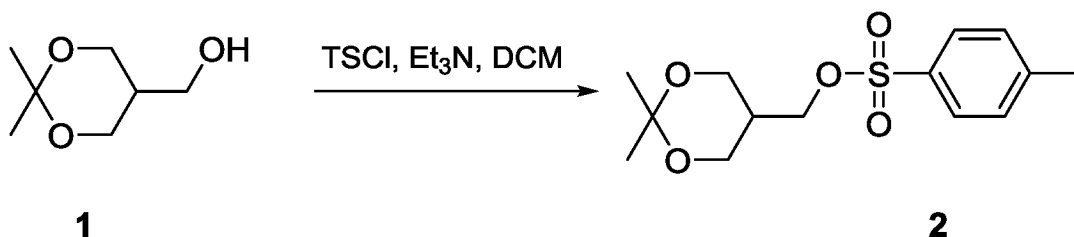
25 На ФИГ. 5 показаны количественные результаты эксперимента по устойчивости к 3'-экзонуклеазе.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

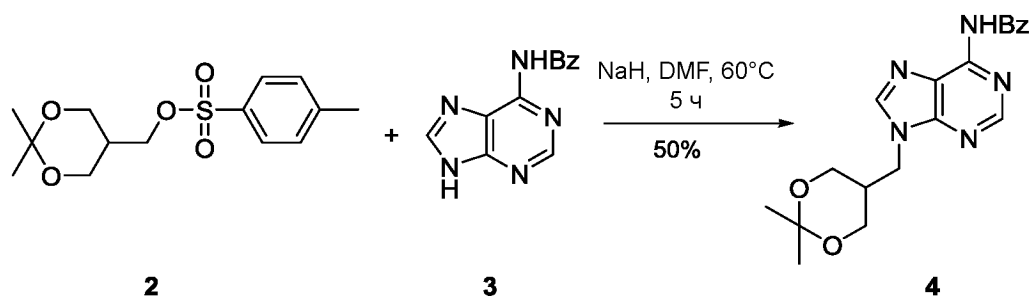
Кроме того, настоящее изобретение описано ниже со ссылкой на примеры, которые не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.
30 Экспериментальные методики, приведенные в примерах настоящего изобретения без конкретизации условий, обычно проводили в традиционных условиях или условиях, рекомендованных производителями исходных веществ или коммерческих продуктов. Если источник реагента не показан, то этот реагент может быть получен
35 от любого поставщика реагентов для молекулярной биологии с уровнем качества/чистоты, подходящим для применения в молекулярной биологии.

Пример 1. Получение химических модификаций

1.1. Синтез соединения 1-1a и соединения 1-1b

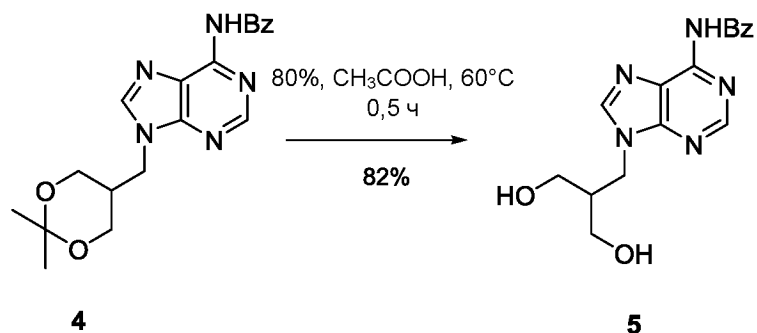


Соединение 1 (500 мг; 3,42 ммоль) и триэтиламин (Et_3N ; 692 мг; 6,84 ммоль; 0,95 мл) растворяли в дихлорметане (DCM; 10 мл). По каплям добавляли раствор 4-толуолсульфонилхлорида (TsCl; 717 мг; 3,76 ммоль) в дихлорметане (10 мл) в ледяной бане. После завершения добавления по каплям реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. После завершения реакции смесь гасили водой. Водную фазу три раза экстрагировали дихлорметаном (15 мл). Органические фазы объединяли, промывали сначала насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (10 мл), затем насыщенным солевым раствором (20 мл) и далее концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, получая неочищенный продукт **2** (820 мг; 80%). Затем неочищенный продукт непосредственно использовали на следующей стадии. MS (масс-спектрометрия) m/z : $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{O}_5\text{S}$, $[\text{M}+\text{H}]^+$ рассчитано: 301,10; обнаружено: 301,2.

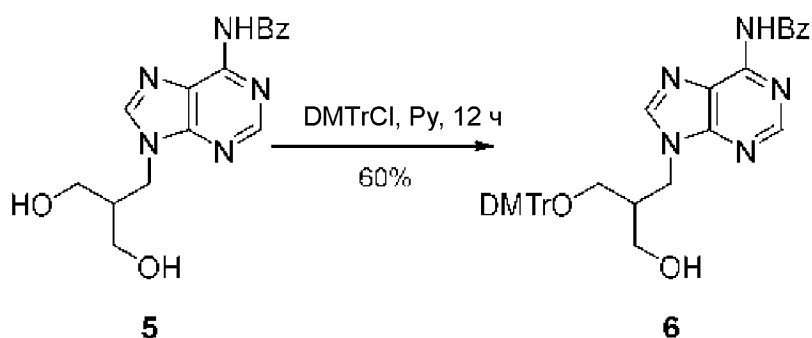


Соединение **3** (239 мг; 1,22 ммоль) растворяли в диметилформамиде (DMF; 10 мл). Добавляли раствор NaH (60%-ный в минеральном масле; 93 мг; 2,33 ммоль) в ледяной бане. Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин и затем по каплям добавляли соединение **2** (350 мг; 1,16 ммоль). После завершения добавления по каплям реакционную смесь перемешивали при 60°C в течение 5 ч. После завершения реакции смесь гасили водой. Водную фазу три раза экстрагировали этилацетатом (15 мл). Органические фазы объединяли, промывали сначала три раза водой (10 мл), затем насыщенным солевым раствором (10 мл) и далее концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя. Остаток очищали препаративной обращенно-фазовой высоко-эффективной

жидкостной хроматографией (HPLC; C_{18} ; условия: 5-50% (A: H_2O , B: CH_3CN); скорость потока: 70 мл/мин) и лиофилизировали, получая соединение **4** (220 мг). MS m/z: $C_{19}H_{21}N_5O_3Na$, $[M+Na]^+$ рассчитано: 390,16; обнаружено: 390,3.

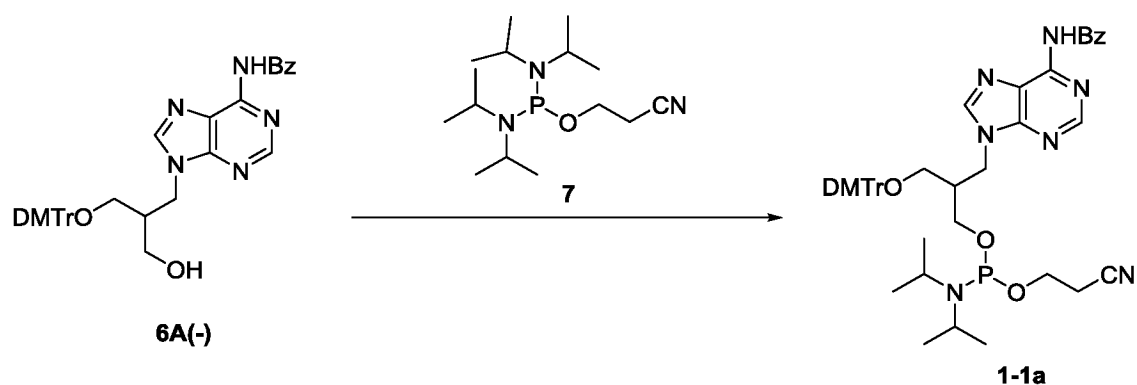


5 Соединение **4** (1,50 г; 4,08 ммоль) растворяли в 20 мл раствора смеси уксусной кислоты и воды (4:1) при комнатной температуре и смесь перемешивали при 60°C в течение 30 мин. После завершения реакции смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя. Остаток очищали препаративной обращенно-фазовой HPLC (C_{18} ; условия: 5-25% (A: H_2O , B: CH_3CN);
10 скорость потока: 70 мл/мин) и лиофилизировали, получая соединение **5** (1,10 г). MS m/z: $C_{16}H_{18}N_5O_3$, $[M+H]^+$ рассчитано: 328,13; обнаружено: 328,4.

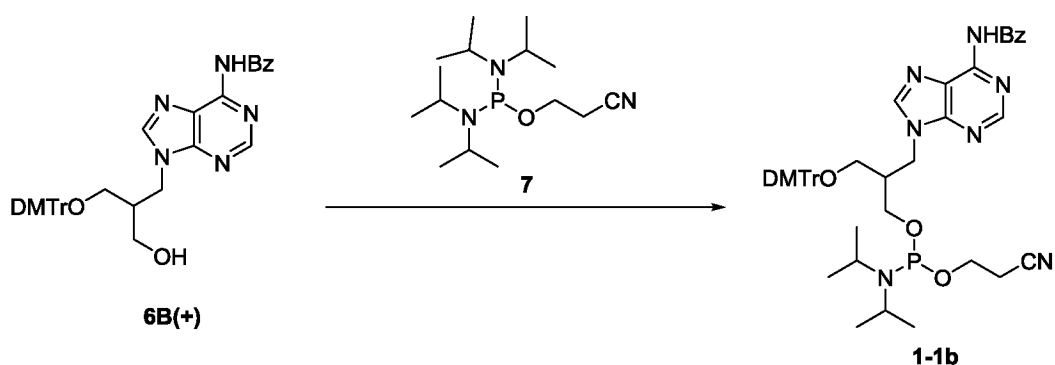


15 Соединение **5** (1,00 г; 3,05 ммоль) растворяли в пиридине (Py; 10 мл). По каплям добавляли раствор 4,4'-диметокситритилхлорида (DMTrCl; 1,50 г; 4,58 ммоль) в пиридине (5 мл) в ледяной бане. После завершения добавления по каплям реакцию смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. После завершения реакции смесь гасили водой и концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя. Остаток очищали препаративной обращенно-фазовой HPLC (C_{18} ; условия: 5-80% (A: H_2O , B: CH_3CN);
20 скорость потока: 70 мл/мин) и лиофилизировали, получая смесь **6** (1,00 г). MS m/z: $C_{37}H_{36}N_5O_5$, $[M-H]^+$ рассчитано: 630,26; обнаружено: 630,5. Рацемическую смесь **6** разделяли с использованием колонки для хиральной хроматографии (CHIRALPAK® IE, 250 × 4,6 мм; 5 мкм, от Daicel; A: *n*-гексан, B: этанол) на соединение **6A(-)** (410 мг)

и соединение **6B(+)** (435 мг).



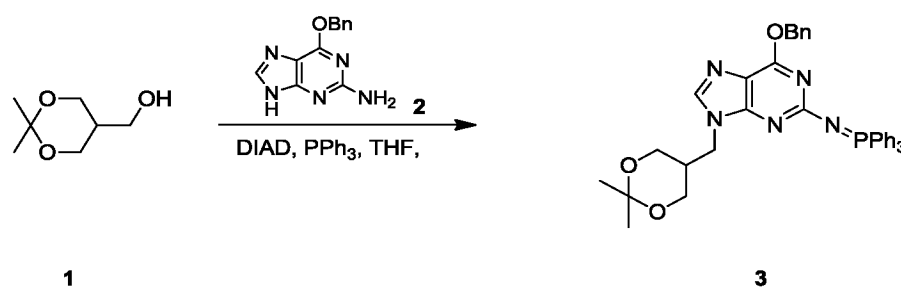
Соединение **6A(-)** (200 мг; 0,32 ммоль), тетразол (11 мг; 0,16 ммоль), N-метилимидазол (5 мг; 0,06 ммоль) и молекулярное сито 3Å (500 мг) растворяли в 10 мл ацетонитрила. Добавляли соединение **7** (144 мг; 0,48 ммоль) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. После завершения реакции молекулярное сито отфильтровывали и добавляли дихлорметан (30 мл). Смесь три раза промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (10 мл) и затем насыщенным солевым раствором (20 мл). Фильтрат концентрировали досуха путем упаривания на роторном испарителе и остаток очищали препаративной обращенно-фазовой HPLC (C₁₈; условия: 5-100% (A: вода, B: CH₃CN); скорость потока: 70 мл/мин) и лиофилизировали, получая соединение **1-1a** (200 мг). MS m/z: C₄₀H₃₉N₆O₇P, [M-диизопропил+OH]⁺ рассчитано: 747,26; обнаружено: 747,6. ¹H ЯМР (400 МГц; ацетонитрил-d₃) δ 7.56, 7.54 (2s, 1H), 7.36-7.27 (m, 2H), 7.24-7.21 (m, 7H), 6.83-6.80 (m, 4H), 4.12-4.10 (m, 2H), 3.75-3.68 (m, 10H), 3.20-2.80 (m, 2H), 2.68-2.54 (m, 4H), 1.22-1.04 (m, 18H).



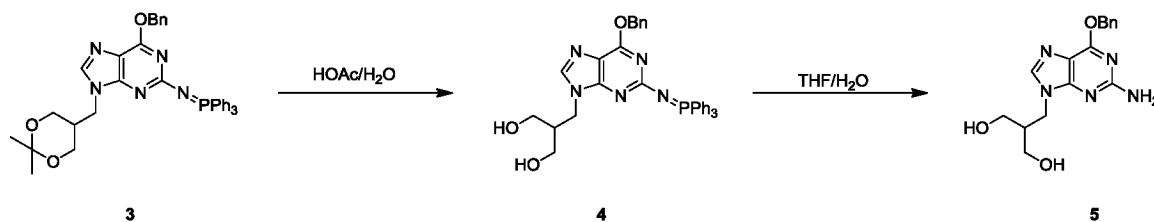
Соединение **6B(+)** (200 мг; 0,32 ммоль), тетразол (11 мг; 0,16 ммоль), N-метилимидазол (5 мг; 0,06 ммоль) и молекулярное сито 3Å (500 мг) растворяли в 10 мл ацетонитрила. Добавляли соединение **7** (144 мг; 0,48 ммоль) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. После завершения реакции молекулярное сито отфильтровывали и добавляли

дихлорметан (30 мл). Смесь три раза промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (10 мл) и затем насыщенным соевым раствором (20 мл). Фильтрат концентрировали досуха путем упаривания на роторном испарителе и остаток очищали препаративной обращенно-фазовой HPLC (C₁₈; условия: 5-100% (A: вода, B: CH₃CN); скорость потока: 70 мл/мин) и лиофилизировали, получая соединение **1-1b** (200 мг). MS m/z: C₄₀H₃₉N₆O₇P, [M-диизопропил+OH]⁺ рассчитано: 747,26; обнаружено: 747,5.

1.2. Синтез соединения 1-6a

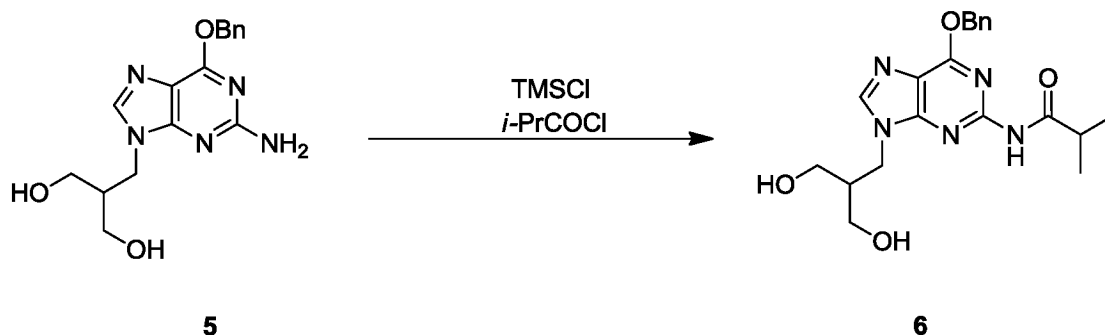


Соединение **1** (10 г; 68,404 ммоль), соединение **2** (15 г; 62,186 ммоль) и трифенилфосфин (PPh₃; 32,62 г; 124,371 ммоль) растворяли в безводном тетрагидрофуране (THF; 30 мл). Медленно по каплям добавляли диизопропилазодикарбоксилат (DIAD; 24,656 мл; 124,371 ммоль) при 0°C. Реакционную смесь оставляли взаимодействовать при 25°C в течение 12 ч, и результаты анализа посредством ЖХ-МС показали, что реакция завершилась. Реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (200 мл) и водой (200 мл). Органическую фазу сушили. Фильтрат концентрировали и полученный остаток очищали с использованием колонки с нормальной фазой (DCM/MeOH = 10/1), получая целевой продукт **3** (20 г).



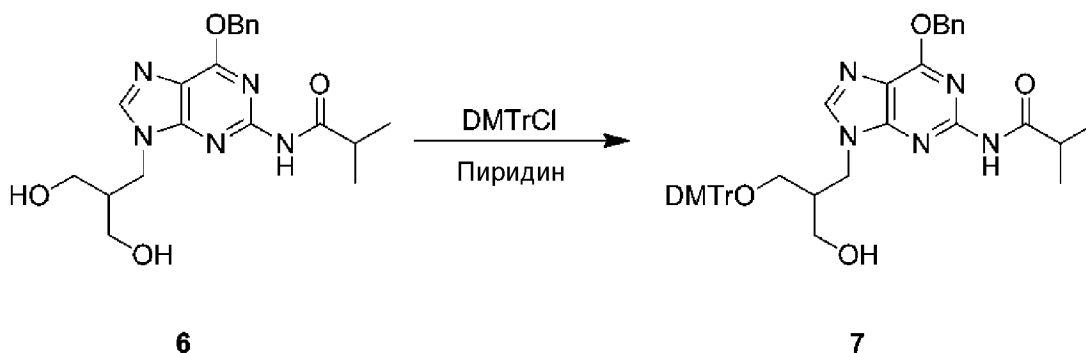
Соединение **3** (20 г; 28,585 ммоль) растворяли в уксусной кислоте (24 мл; 426,016 ммоль) и H₂O (12 мл). Раствор перемешивали при 60°C в течение 1 ч. Реакционную смесь затем концентрировали досуха путем упаривания на роторном испарителе. Добавляли THF (12 мл) и H₂O (12 мл). Смесь перемешивали при 80°C в течение 7 ч. Результаты ЖХ-МС анализа показали завершение реакции. Реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (200 мл) и водой (100 мл). К водной фазе добавляли твердый карбонат натрия, пока из водной фазы не

выпадало в осадок большое количество твердого вещества. Это твердое вещество собирали фильтрованием и промывали водой. Осадок на фильтре сушили с использованием масляного насоса, получая целевое соединение **5** (9 г).



5 Соединение **5** (6,8 г; 18,581 ммоль) растворяли в пиридине (80 мл) в атмосфере азота. Медленно при 0°C добавляли TMSCl (14,250 мл; 111,489 ммоль). Смесь перемешивали в течение 2 ч. Затем добавляли изобутирилхлорид (2,044 мл; 19,511 ммоль) при 0°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 ч, и результаты ЖХ-МС анализа показали, что завершение реакции. Смесь экстрагировали

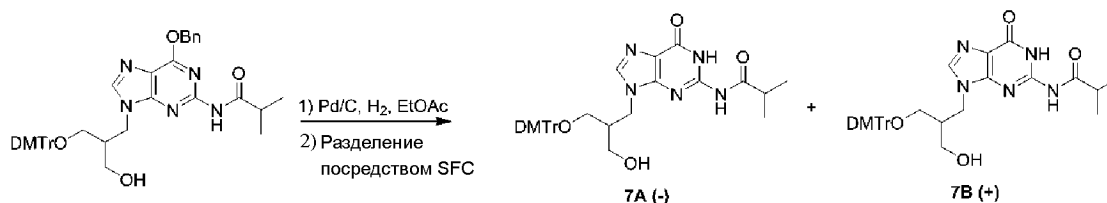
10 дихлорметаном (200 мл) и водой (200 мл). После сушки и концентрирования органической фазы досуха путем упаривания на роторном испарителе получали подлежащий очистке образец. Образец очищали с использованием колонки с нормальной фазой (с элюированием смесью DCM:MeOH = 10:1, пик при 4,8%), получая соединение **6** в виде желтого масла (12 г).



15 Соединение **6** (5,5 г; 12,392 ммоль) растворяли в пиридине (30 мл) в атмосфере азота. Добавляли молекулярное сито 4Å 1/16 (7 г; 12,392 ммоль) и затем порциями добавляли твердый DMTrCl (5,04 г; 14,870 ммоль) при 0°C. Смесь оставляли взаимодействовать при 25°C в течение 2 ч, и результаты анализа с

20 применением тонкослойной хроматографии (TLC) (PE:EtOAc (петролейный эфир:этилацетат) = 1:1; R_f (фактор удерживания) = 0,69) показали завершение реакции. Реакционную смесь и TJN200879-040-P1 объединяли и проводили совместную обработку. Реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (200 мл) и

водой (200 мл). После сушки и концентрирования органической фазы досуха путем упаривания на роторном испарителе получали подлежащий очистке образец. Образец очищали с использованием колонки с нормальной фазой (элюирование смесью PE:EtOAc, пик при 84%), получая соединение 7 в виде желтого масла (12 г).



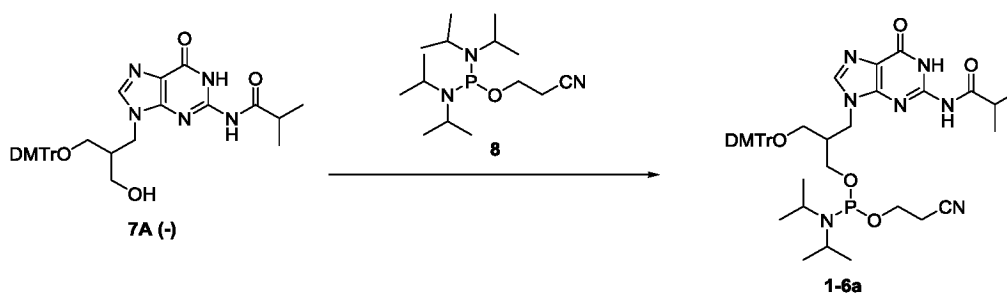
5

7

Соединение 7 (12 г; 15,389 ммоль) растворяли в EtOAc (140 мл). Добавляли влажный палладий на угле Pd/C (7 г; 15,389 ммоль). Реакционную смесь оставляли взаимодействовать при 25°C в атмосфере водорода (15 ф/кв. дюйм (104 кПа)) в течение 2 ч. Результаты TLC анализа (PE:EtOAc = 0:1; R_f = 0,09) показали завершение реакции. Реакционную смесь фильтровали. После трехкратной промывки осадка на фильтре этилацетатом (30 мл) фильтрат собирали. После концентрирования фильтрата досуха путем упаривания на роторном испарителе добавляли 50 мл дихлорметана и 2 мл триэтиламина, получая подлежащий очистке образец. Образец очищали с использованием колонки с нормальной фазой (элюирование смесью DCM:MeOH = 10:1, пик при 0,5%), получая смесь в виде желтого пенообразного твердого вещества (9 г). Полученную рацемическую смесь разделяли с использованием сверхкритической флюидной хроматографии (SFC), получая продукты - целевое соединение 7A(-) (3,9 г) и целевое соединение 7B(+) (3,8 г).

10

15



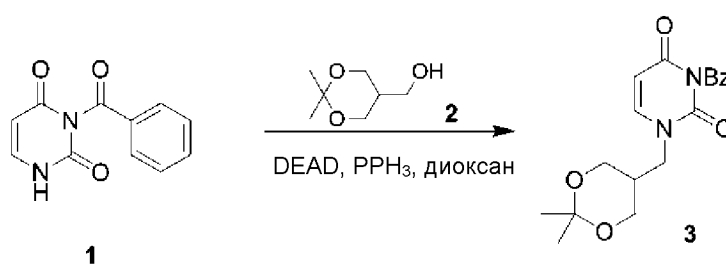
20

25

Соединение 7A(-) (3,30 г; 5,40 ммоль), тетразол (190 мг; 2,70 ммоль), 1-метилимидазол (90 мг; 1,10 ммоль) и молекулярное сито 3Å (500 мг) растворяли в 30 мл ацетонитрила. Добавляли соединение 8 (2,50 г; 8,10 ммоль) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. После завершения реакции молекулярное сито отфильтровывали и добавляли DCM (150 мл). Смесь промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия

(30 мл × 3), затем насыщенным соевым раствором (30 мл). Фильтрат концентрировали досуха путем упаривания на роторном испарителе, остаток очищали препаративной обращенно-фазовой HPLC (C₁₈; условия: 5-100% (А: вода, В: CH₃CN); скорость потока: 70 мл/мин) и лиофилизировали, получая соединение **1-6a** (2,9 г; 66%). MS m/z: C₄₃H₅₅N₇O₇P [M+H]⁺, рассчитано: 812,38; обнаружено: 812,5. ¹H ЯМР (400 МГц, ацетонитрил-d₃) δ 7.56, 7.54 (2s, 1H), 7.36-7.27 (m, 2H), 7.24-7.21 (m, 7H), 6.83-6.80 (m, 4H), 4.12-4.10 (m, 2H), 3.75-3.68 (m, 10H), 3.20-2.80 (m, 2H), 2.68-2.54 (m, 4H), 1.22-1.04 (m, 18H).

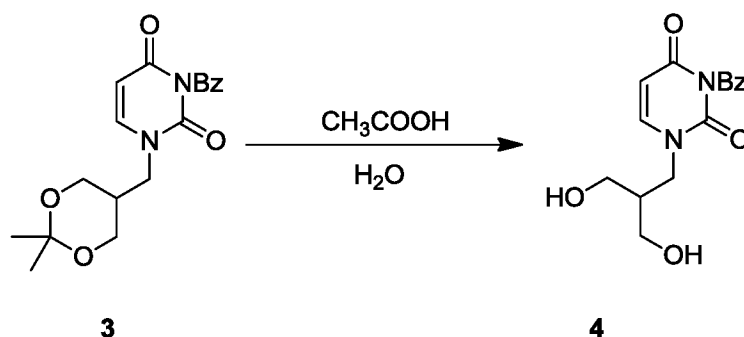
1.3. Синтез соединения 1-7a



10

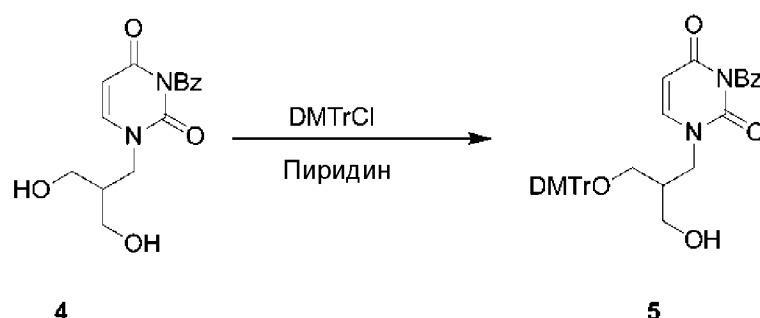
Соединение **1** (5 г; 23,1272 ммоль), соединение **2** (6,76 г; 46,254 ммоль) и трифенилфосфин (7,28 г; 27,753 ммоль) растворяли в 30 мл диоксана в атмосфере азота. Медленно при 0°C по каплям добавляли диэтилазодикарбоксилат (DEAD; 5,502 мл; 27,753 ммоль). После завершения добавления по каплям реакцию смесь медленно нагревали до 25°C и оставляли взаимодействовать в течение еще одного часа. Реакционную смесь экстрагировали, используя 100 мл H₂O и 100 мл EtOAc. После объединения, сушки, фильтрования и концентрирования органических фаз получали подлежащий очистке образец. Образец очищали с использованием колонки с нормальной фазой (элюирование смесью PE:EtOAc =1:1), получая целевой продукт (4 г).

20

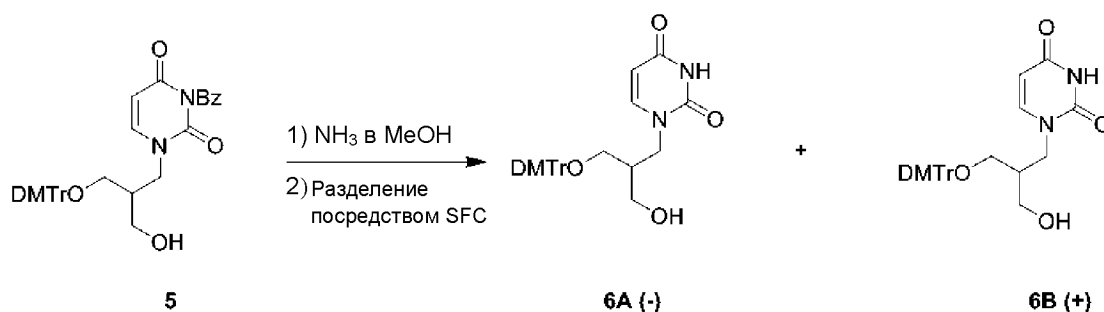


Соединение **3** (3,3 г) растворяли в HOAc (16 мл) и H₂O (4 мл) и раствор нагревали в масляной бане при 60°C в течение 0,5 ч. Реакционную смесь концентрировали досуха путем упаривания на роторном испарителе и полученный

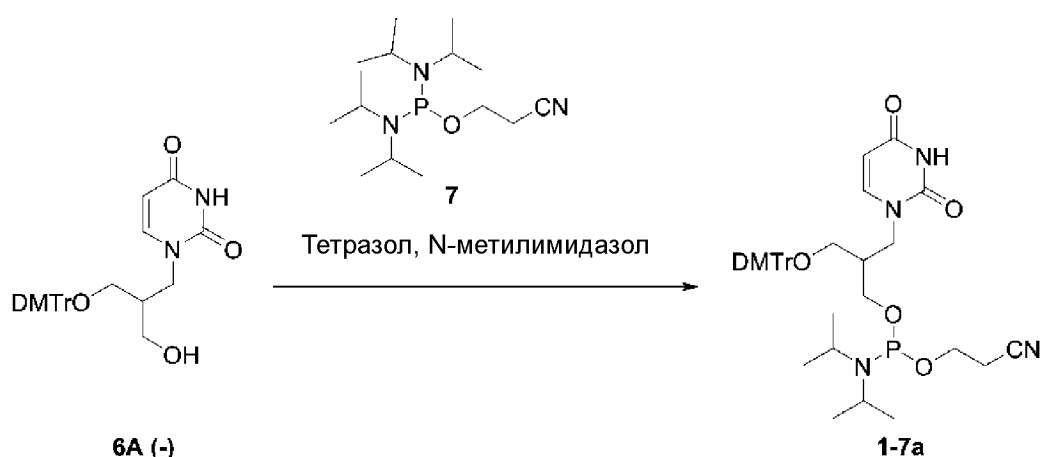
остаток очищали с использованием колонки с нормальной фазой (элюирование смесью PE:EtOAc = 0:1), получая целевой продукт 4 (3 г).



Соединение 4 (3 г; 8,873 ммоль) растворяли в 5 мл пиридина. Медленно по каплям добавляли раствор DMTrCl (3,91 г; 11,535 ммоль) в 10 мл пиридина при 0°C в атмосфере азота. После завершения добавления по каплям реакционную смесь нагревали до 25°C и оставляли взаимодействовать в течение еще одного часа. Далее реакционную смесь экстрагировали 50 мл воды и 100 мл этилацетата. После этого водную фазу трижды экстрагировали 100 мл этилацетата. Органические фазы объединяли, сушили, фильтровали и концентрировали и остаток очищали с использованием колонки с нормальной фазой (PE:EtOAc = 2:1), получая целевой продукт 5 (4 г).

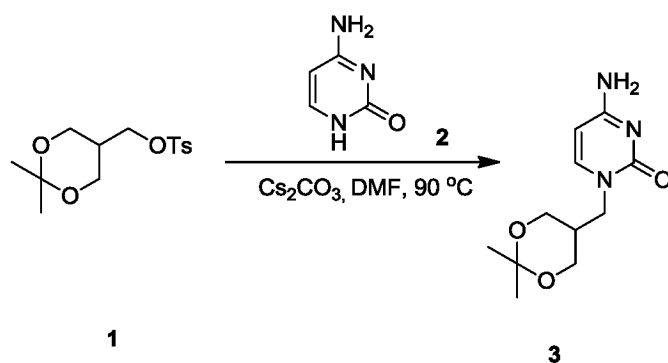


Соединение 5 (4 г; 5,769 ммоль) растворяли в метаноле (10 мл). Добавляли насыщенный раствор NH₃ в метаноле (40 мл). Смесь оставляли взаимодействовать при 0°C в течение 6 ч. Реакционную смесь концентрировали досуха путем упаривания на роторном испарителе и остаток очищали с использованием колонки с нормальной фазой (PE:EtOAc = 0:1), получая рацемическую смесь (2,4 г). Рацемическую смесь разделяли с использованием SFC, получая целевой продукт 6A (750 мг; чистотой 100%) и целевой продукт 6B (400 мг; чистотой 99,16%).



Соединение 6A(-) (700 мг; 1,40 ммоль), тетразол (50 мг; 0,70 ммоль), 1-метилимидазол (23 мг; 0,28 ммоль) и молекулярное сито 3Å (500 мг) растворяли в 10 мл ацетонитрила. Добавляли соединение 7 (630 мг; 2,10 ммоль) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. После завершения реакции молекулярное сито отфильтровывали и добавляли DCM (50 мл). Смесь промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (10 мл × 3), затем насыщенным солевым раствором (20 мл). Фильтрат концентрировали досуха путем упаривания на роторном испарителе и остаток очищали препаративной обращенно-фазовой HPLC (C₁₈; условия: 5-100% (A: вода, B: CH₃CN); скорость потока: 70 мл/мин) и лиофилизировали, получая соединение 1-7a (700 мг; 72%). MS m/z: C₃₈H₄₇N₄O₇PNa [M+Na]⁺, рассчитано: 725,32; обнаружено: 725,5.

1.4. Синтез соединения 1-8a

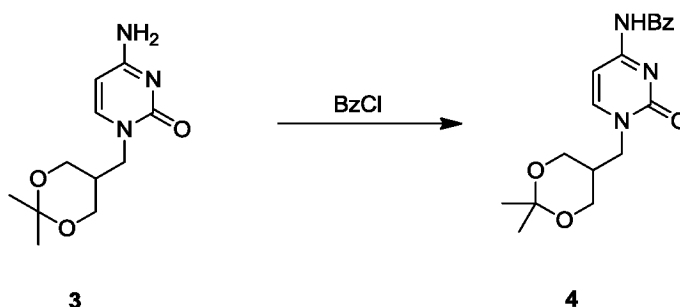


15

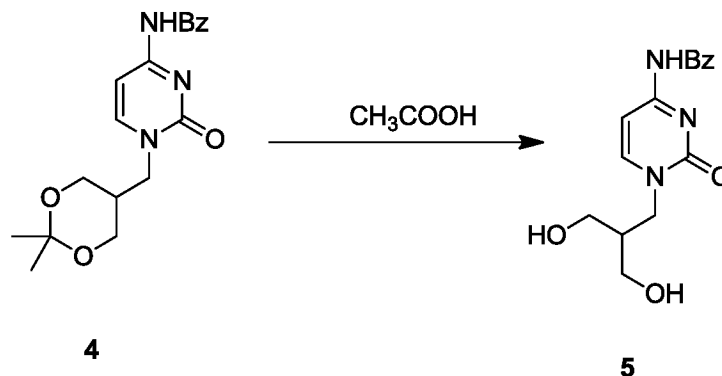
Соединение 1 (8,5 г; 76,508 ммоль) и соединение 2 (30,64 г; 91,809 ммоль) растворяли в DMF (150 мл). Добавляли Cs₂CO₃ (29,91 г; 91,809 ммоль). Реакционную смесь оставляли взаимодействовать в атмосфере азота при 90°C в течение 12 ч. Результаты ЖХ-МС анализа показали завершение реакции. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали досуха путем упаривания на роторном испарителе с использованием масляного насоса, и остаток разделяли и

20

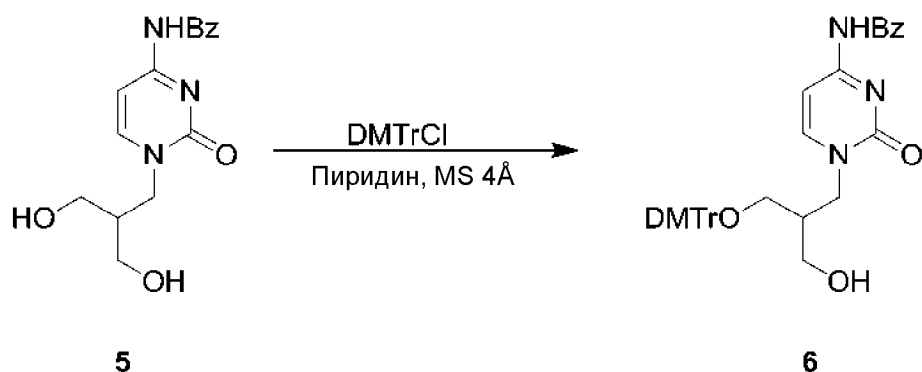
очищали с использованием колонки с нормальной фазой (80 г; DCM/MeOH от 10/1 до 5/1), получая целевой продукт **3** (13,5 г; чистотой 80%).



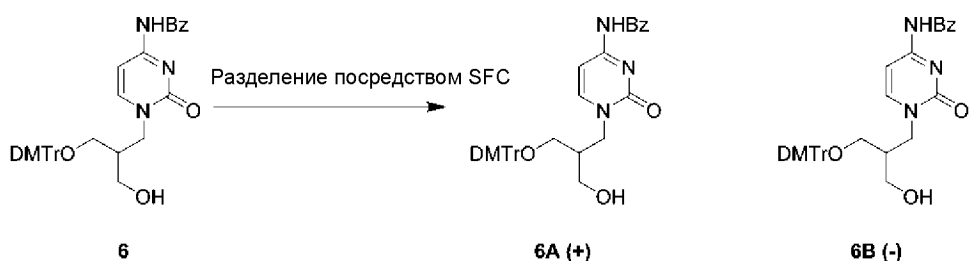
Соединение **3** (10,5 г; 35,105 ммоль) растворяли в пиридине (65 мл) и CH_3CN (65 мл). К этому раствору по каплям добавляли BzCl (4,894 мл; 42,126 ммоль). Смесь оставляли взаимодействовать при 25°C в течение 2 ч. Результаты ЖХ-МС анализа показали израсходование большей части исходного вещества. Реакционную смесь гасили H_2O (100 мл) и экстрагировали EtOAc (100 мл \times 3). Органическую фазу сушили и концентрировали досуха путем упаривания на роторном испарителе, остаток разделяли (объединяя с TJN200872-101) и очищали колоночной хроматографией (80 г; PE/ EtOAc от 10/1 до 0/1, DCM/MeOH = 10/1), получая целевой продукт **4** (14 г; чистотой 90%).



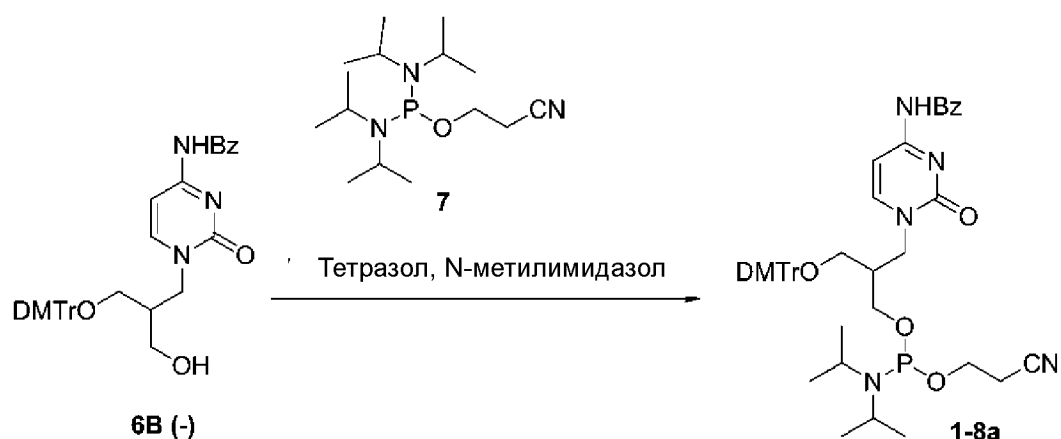
Соединение **4** (14 г; 36,694 ммоль) растворяли в HOAc (56 мл; 314,796 ммоль) и H_2O (14 мл). Раствор оставляли взаимодействовать при 60°C в течение 2 ч, и результаты ЖХ-МС анализа показали завершение реакции. Реакционную смесь концентрировали с использованием масляного насоса и остаток разделяли с использованием колонки с нормальной фазой (40 г; DCM/MeOH от 1/0 до 5/1), получая целевой продукт **5** (8,4 г с чистотой 90% и 2,4 г с чистотой 80%).



Соединение 5 (7,4 г; 21,957 ммоль), 4-диметиламинопиридин (DMAP; 0,54 г; 4,391 ммоль) и молекулярное сито 4Å (MS; 11,1 г; 2,967 ммоль) растворяли в пиридине (60 мл). Раствор перемешивали в ледяной бане в течение 10 мин и затем добавляли DMTTrCl (8,93 г; 26,348 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 1,8 ч, и результаты ЖХ-МС анализа показали, что в смеси оставалось примерно 19% исходного вещества, а примерно 60% имели целевую картину MS. Реакционную смесь и TJN200872-105&106 объединяли и очищали совместно. К реакционной смеси добавляли H₂O (50 мл) и проводили экстракцию, используя DCM (50 мл × 3). Органическую фазу сушили и концентрировали досуха путем упаривания на роторном испарителе и остаток разделяли колоночной хроматографией (120 г; PE/(EA (этилацетат):DCM:TEA (триэтиламин) = 1:1:0,05) от 1/0 до 0/1 и до DCM/MeOH = 10/1), получая целевое соединение 6 (11 г; чистотой 89%, TJN200872-105&106&107). Извлекали исходное вещество (3,0 г; чистотой 70%).



Соединение 6 (15 г; 22,041 ммоль) разделяли с использованием SFC (CHIRALPAK AD от DAICEL (250 мм × 50 мм, 10 мкм); 0,1% NH₃ H₂O EtOH, В: 45%-45%; 200 мл/мин), получая целевой продукт 6A (5,33 г; чистотой 94,29%) и целевой продукт 6B (6,14 г; чистотой 97,91%). Извлекали 1,0 г соединения 6.



Соединение 6B(-) (5,4 г; 8,92 ммоль), тетразол (312 мг; 4,46 ммоль), 1-метилимидазол (146 мг; 1,78 ммоль) и молекулярное сито 3Å (500 мг) растворяли в 40 мл ацетонитрила. Добавляли соединение 7 (4 г; 13,4 ммоль) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. После завершения реакции молекулярное сито отфильтровывали и добавляли DCM (200 мл). Смесь промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (30 мл × 3) затем насыщенным соевым раствором (50 мл). Фильтрат концентрировали досуха путем упаривания на роторном испарителе и остаток очищали препаративной обращенно-фазовой HPLC (C₁₈; условия: 5-100% (A: вода, B: CH₃CN); скорость потока: 70 мл/мин) и лиофилизировали, получая соединение 1-8a (5,8 г; 80%). MS m/z: C₄₅H₅₁N₅O₇P, [M+H]⁺, рассчитано: 804,36; обнаружено: 804,4.

Пример 2. Синтез мРНК

Синтез дцРНК проводили аналогично традиционному методу твердофазного синтеза с использованием фосфорамидитов. При синтезе модифицированного нуклеотида в положении 7 5'-конца антисмысловой (AS) цепи исходный нуклеотид родительской последовательности заменяли на синтезированный выше фосфорамидитный мономер. Ниже кратко описан процесс синтеза: фосфорамидитные нуклеозидные мономеры присоединяли один за другим согласно программе синтеза на синтезаторе Dr. Oligo 48 (Biolytic), начиная от универсальной подложки из стекла с регулируемым размером (CPG). За исключением фосфорамидитного мономера в положении 7 5'-конца AS-цепи, описанной выше, другие нуклеозидные мономерные вещества, 2'-F-РНК, 2'-О-метил-РНК и другие фосфорамидитные нуклеозидные мономеры приобретали у Hongene, Шанхай, или Genepharma, Сучжоу. В качестве активатора использовали 5-этилтио-1Н-тетразол (ЕТТ) (0,6 М раствор в ацетонитриле), в качестве сульфорирующего реагента - 0,22 М раствор фенилацетил-дисульфида (PADS) в

ацетонитриле и коллидине (смеси 1:1 по объему) (Kroma, Сучжоу), а в качестве окислителя - раствор йодпиридина в воде (Kroma).

После завершения твердофазного синтеза олигорибонуклеотиды отщепляли от твердой подложки и погружали в раствор 28%-ного водного аммиака и этанола (3:1) при 50°C на 16 ч. Смесь центрифугировали и супернатант переносили в другую центрифужную пробирку. После концентрирования супернатанта досуха путем упаривания остаток очищали обращенно-фазовой (C₁₈) хроматографией, используя 0,1 М раствор ацетата триэтиламмония (TEAA) и ацетонитрил в качестве подвижной фазы, и диметокситритильную группу (DMTr) удаляли, используя 3%-ый раствор трифторуксусной кислоты. Целевые олигонуклеотиды собирали, затем лиофилизировали, идентифицировали как целевые продукты, применяя жидкостную хроматографию-масс-спектрометрию (LC-MS) и выполняли количественное определение под ультрафиолетовым светом (УФ; 260 нм).

Спаривание полученных одноцепочечных олигонуклеотидов проводили в эквимольном соотношении с учетом принципа комплементарности и отжигали. Конечную двухцепочечную дцРНК растворяли в 1×PBS (забуференном фосфатом физиологическом растворе) и концентрацию раствора подвели до значения, необходимого для проведения данного эксперимента с тем, чтобы он был готов к использованию.

Пример 3. Скрининг активности с применением psiCHECK

Синтез образцов дцРНК описан ранее. Плазмиды получали от Sangon Biotech (Шанхай) Co., Ltd. Материалы, расходуемые в эксперименте с применением psiCHECK, показаны в Таблице 1.

Таблица 1. Расходуемые материалы и реагенты, использованные в эксперименте с применением psiCHECK

Реагенты и расходуемые материалы				
Название	Фирма	№ по каталогу/модель	№ партии	Срок хранения
Клетки Huh 7	Cobioer, Нанкин	ATCC-Cobioer/CBP60202	/	/
Система для анализа люциферазы Dual-Glo®	Promega	E2940	0000363099	2020.05.13

Липофектамин® 2000	Invitrogen	11668-019	/	2021.06.14
--------------------	------------	-----------	---	------------

ATCC означает Американскую коллекцию типовых культур.

Методика эксперимента: выполняли посев клеток и трансфекцию клеток. Конкретные количества для приготовления комплекса для трансфекции показаны в
5 Таблице 2.

Таблица 2. Количества, необходимые для комплекса для трансфекции, в каждой лунке 96-луночного планшета

	Количество/лунка	Opti-MEM
Смесь плазмид	0,05 мкл	10 мкл
Липофектамин-2000	0,2 мкл	10 мкл

Примечания: Lipo (липофектамин): 0,2 мкл/лунка; плаزمид: 0,05 мкл/лунка;
10 Opti-MEM: 10 мкл/лунка.

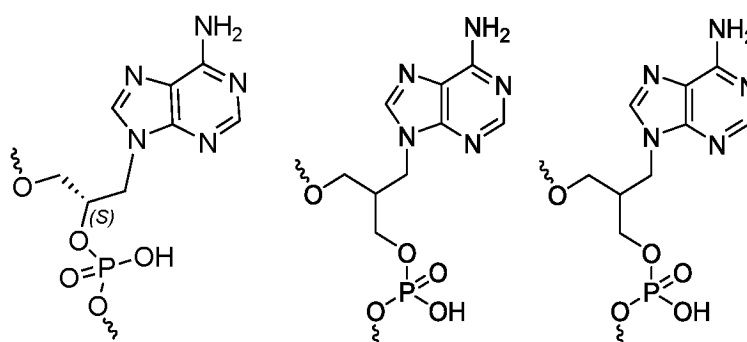
Разведения с разными концентрациями готовили согласно Таблице 3 в зависимости от различных экспериментальных требований, чтобы использовать в качестве рабочих растворов для незамедлительного применения. Через 24 ч после
15 трансфекции проводили анализы согласно инструкциям из набора для системы анализа люциферазы Dual-Glo®. Расчет относительной величины: соотношение = Ren/Fig (соотношение в случаях кораллов/светлячков); расчет степени ингибирования: $1 - (\text{соотношение} + \text{только дцРНК/репортерный ген}) \times 100\% = \text{степень ингибирования (\%)}$. В настоящем изобретении % оставшейся активности (также
20 называемый как уровень остаточной экспрессии мРНК (%)) или соотношение остаточной экспрессии мРНК = $100\% - \text{степень ингибирования (\%)}$.

Таблица 3. Протокол многократного разведения образцов дцРНК для получения разных концентраций

Конечная концентрация (нМ)	Добавление воды и дцРНК
40	4 мкл дцРНК (20 мкМ) + 96 мкл H ₂ O
13,33333333	30 мкл дцРНК + 60 мкл H ₂ O
4,444444444	30 мкл дцРНК + 60 мкл H ₂ O
1,481481481	30 мкл дцРНК + 60 мкл H ₂ O
0,49382716	30 мкл дцРНК + 60 мкл H ₂ O

0,164609053	30 мкл дцРНК + 60 мкл H ₂ O
0,054869684	30 мкл дцРНК + 60 мкл H ₂ O
0,018289895	30 мкл дцРНК + 60 мкл H ₂ O
0,006096632	30 мкл дцРНК + 60 мкл H ₂ O
0,002032211	30 мкл дцРНК + 60 мкл H ₂ O
0,000677404	30 мкл дцРНК + 60 мкл H ₂ O

Пример 4. Определение характеристик разных химических модификаций



5 **GNA(A)** **(-)hmpNA(A)** **(+)hmpNA(A)**

при этом нуклеотид, синтезированный с использованием 2-гидроксиметил-1,3-пропандиола (hmp) в качестве исходного вещества, определяли как hmpNA;

(+)hmpNA(A) получали твердофазным синтезом, используя фосфорамидитный нуклеозидный мономер 1-1b из раздела 1.1. примеров, и его абсолютная конфигурация представляла собой (S)-hmpNA(A);

(-)hmpNA(A) получали твердофазным синтезом, используя фосфорамидитный нуклеозидный мономер 1-1a из раздела 1.1. примеров, и его абсолютная конфигурация представляла собой (R)-hmpNA(A).

15 Аналогичным образом, следующие далее структуры получали твердофазным синтезом и путем замены вида основания в hmpNA, а также определяли их абсолютные конфигурации:

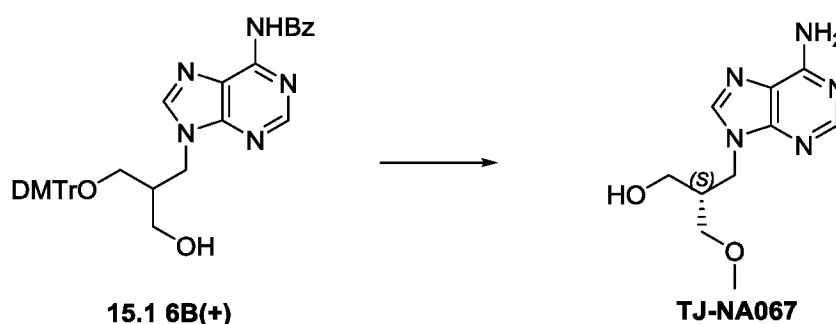
(+)hmpNA(G), с абсолютной конфигурацией (S)-hmpNA(G);
 (-)hmpNA(G), с абсолютной конфигурацией (R)-hmpNA(G);
 20 (+)hmpNA(C), с абсолютной конфигурацией (S)-hmpNA(C);
 (-)hmpNA(C), с абсолютной конфигурацией (R)-hmpNA(C);
 (+)hmpNA(U), с абсолютной конфигурацией (R)-hmpNA(U); и

(-)-hmpNA(U), с абсолютной конфигурацией (S)-hmpNA(U).

Абсолютные конфигурации (S)-hmpNA(G), (R)-hmpNA(G), (S)-hmpNA(C), (R)-hmpNA(C), (S)-hmpNA(U) и (R)-hmpNA(U) определяли на основании их промежуточных соединений или производных методом дифракции рентгеновских

5 лучей.

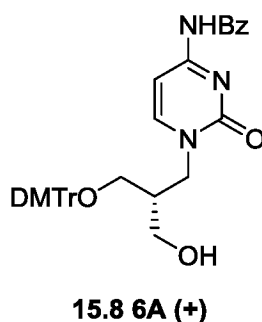
Приведены структуры промежуточных соединений или производных:



TJ-NA067: определено как бесцветный массивный кристалл (0,30×0,10×0,04 мм³), принадлежащий моноклинной кристаллической системе с пространственной группой P21. Параметры решетки: $a = 16,0496(5) \text{ \AA}$, $b = 4,86260(10) \text{ \AA}$, $c = 16,4686(5) \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 118,015(4)^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, $V = 1134,65(7) \text{ \AA}^3$, и $Z = 4$. Расчетное значение плотности $D_c = 1,389 \text{ г/см}^3$; число электронов в элементарной ячейке $F(000) = 504,0$; линейный коэффициент поглощения элементарной ячейки $\mu \text{ (Cu-K}\alpha) = 0,840 \text{ мм}^{-1}$; температура в эксперименте по

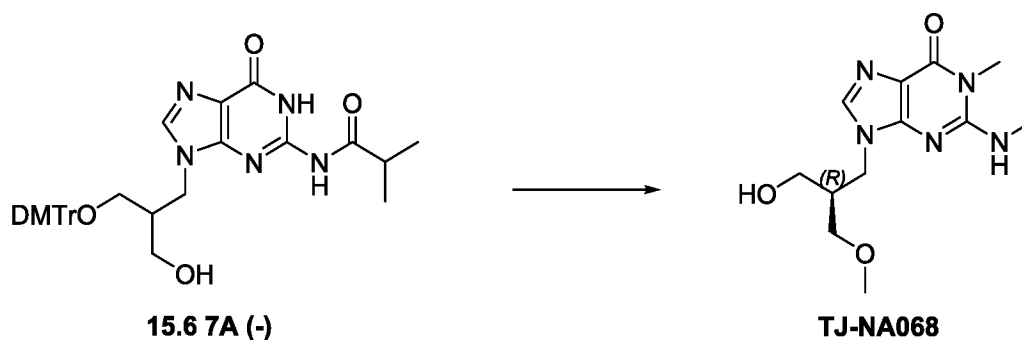
10

15 дифракции $T = 150,00(11) \text{ K}$.

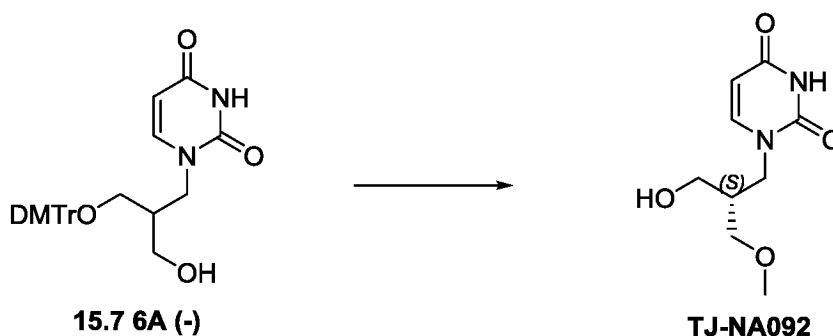


6A(+): определено как бесцветный массивный кристалл (0,30×0,20×0,10 мм³), принадлежащий моноклинной кристаллической системе с пространственной группой P21. Параметры решетки: $a = 22,6688(7) \text{ \AA}$, $b = 8,5595(2) \text{ \AA}$, $c = 23,3578(5) \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 113,876(3)^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, $V = 4144,3(2) \text{ \AA}^3$, и $Z = 2$. Расчетное значение плотности $D_c = 0,999 \text{ г/см}^3$; число электронов в элементарной ячейке $F(000) = 1318,0$; линейный коэффициент поглощения элементарной ячейки $\mu \text{ (Cu-K}\alpha) = 0,570 \text{ мм}^{-1}$; температура в эксперименте по дифракции $T = 100,01(18) \text{ K}$.

20



TJ-NA048: определено как бесцветный игольчатый кристалл (0,30×0,04×0,04 мм³), принадлежащий моноклинной кристаллической системе с пространственной группой P1. Параметры решетки: $a = 7,6165(4) \text{ \AA}$, $b = 11,3423(5) \text{ \AA}$, $c = 17,3991(8) \text{ \AA}$, $\alpha = 85,007(4)^\circ$, $\beta = 88,052(4)^\circ$, $\gamma = 70,532(4)^\circ$, $V = 1411,75(12) \text{ \AA}^3$, и $Z = 2$. Расчетное значение плотности $D_c = 1,366 \text{ г/см}^3$; число электронов в элементарной ячейке $F(000) = 620,0$; линейный коэффициент поглощения элементарной ячейки μ (Cu-K α) = 0,856 мм⁻¹; температура в эксперименте по дифракции $T = 150,00(13) \text{ K}$.



TJ-NA092: определено как бесцветный призматический кристалл (0,30×0,10×0,10 мм³), принадлежащий триклинной кристаллической системе с пространственной группой P1. Параметры решетки: $a = 5,17960(10) \text{ \AA}$, $b = 8,0667(2) \text{ \AA}$, $c = 12,4077(2) \text{ \AA}$, $\alpha = 93,146(2)^\circ$, $\beta = 101,266(2)^\circ$, $\gamma = 96,134(2)^\circ$, $V = 503,993(18) \text{ \AA}^3$, и $Z = 2$. Расчетное значение плотности $D_c = 1,412 \text{ г/см}^3$; число электронов в элементарной ячейке $F(000) = 228,0$; линейный коэффициент поглощения элементарной ячейки μ (Cu-K α) = 0,945 мм⁻¹; температура в эксперименте по дифракции $T = 100,00(10) \text{ K}$.

Пример 5. Эксперимент по зависимости от последовательности образцов миРНК, содержащих разные химические модификации

Известно, что модификация с удалением азотистого основания зависит от последовательности дцРНК, поэтому авторы изобретения тестировали химические

модификации по настоящему изобретению на нескольких разных последовательностях. Использовали миРНК, нацеленные на мРНК трех разных генов (ANGPTL3, HBV-S и HBV-X) (их последовательности показаны в Таблице 4), модифицированные в положении 7 5'-конца AS-цепи с использованием соединений (+)hmpNA(A) и (-)hmpNA(A) из примера 1 и контрольного соединения GNA(A) (последовательности показаны в Таблице 5), и затем сравнивали с родительскими последовательностями с точки зрения целевой активности и нецелевой активности.

Таблица 4. Последовательности миРНК, нацеленных на разные гены

Целевой ген дцРНК	SEQ ID NO	SS-цепь, 5'-3'
ANGPTL3	21	GmsAmsAmCmUfAmCfUfCfCmCmUmUmUmCmUmUmCmAm
HBV-S	22	CmsCmsAmUmUfUmGfUfUfCmAmGmUmGmGmUmUmCmsGm
HBV-X	23	CmsAmsCmCmUfCmUfGfCfAmCmGmUmCmGmCmAmUmsGm

10

В приведенной выше таблице прописные буквы G, A, C и U представляют нуклеотиды, содержащие гуанин, аденин, цитозин и урацил, соответственно, строчная буква m означает модификацию 2'-метокси-, строчная буква f означает модификацию 2'-фтор-, а строчная буква s указывает на то, что два нуклеотида, примыкающие к букве s, связаны через фосфотиоатную диэфирную группу; то же самое применимо и далее.

15

Таблица 5. Последовательности миРНК, нацеленных на разные гены и содержащих химический модификации

Целевая мРНК	дцРНК	SEQ ID NO	AS-цепь с модификацией
ANGPTL3	TRD5840	24	UmsGfsAmAfGmAfAmAmGfGmGmAfGmUfAmGfUmUfCmsUmsUm
	TRD5841	25	UmsGfsAmAfGmAfGNA(A)AmGfGmGmAfGmUfAmGfUmUfCmsUmsUm
	TRD5845	26	UmsGfsAmAfGmAf(+)hmpNA(A)AmGfGmGmAfGmUfAmGfUmUfCmsUmsUm

	TRD5846	27	UmsGfsAmAfGmAf(-)hmpNA(A)AmGfGmGmAfGmUfAmGfUmUfCmsUmsUm
HBV-S	TRD5847	28	UmsGfsAmAmCmCfAmCmUmGmAmAmCmAfAmAfUmGmGmsCmsAm
	TRD5848	29	UmsGfsAmAmCmCfGNA(A)CmUmGmAmAmCmAfAmAfUmGmGmsCmsAm
	TRD5852	30	UmsGfsAmAmCmCf(+)hmpNA(A)CmUmGmAmAmCmAfAmAfUmGmGmsCmsAm
	TRD5853	31	UmsGfsAmAmCmCf(-)hmpNA(A)CmUmGmAmAmCmAfAmAfUmGmGmsCmsAm
HBV-X	TRD5854	32	UmsAfsUmGfCmGfAmCmGfUmGmCfAmGfAmGfGmUfGmsAmsAm
	TRD5855	33	UmsAfsUmGfCmGfGNA(A)CmGfUmGmCfAmGfAmGfGmUfGmsAmsAm
	TRD5859	34	UmsAfsUmGfCmGf(+)hmpNA(A)CmGfUmGmCfAmGfAmGfGmUfGmsAmsAm
	TRD5860	35	UmsAfsUmGfCmGf(-)hmpNA(A)CmGfUmGmCfAmGfAmGfGmUfGmsAmsAm

Результаты эксперимента по целевой активности показаны в Таблице 6. Для GNA(A) продемонстрирована значительная зависимость от последовательности, и разные последовательности обладали значимо различной целевой активностью.

- 5 При использовании в этом эксперименте соединений по настоящему изобретению не продемонстрирована значительная зависимость от последовательности, и это указывает на то, что они найдут более универсальное применение.

- 10 Результаты эксперимента по нецелевой активности показаны в Таблице 7. Можно видеть, что при использовании в данном эксперименте соединений по настоящему изобретению нецелевая активность миРНК значительно снижалась по сравнению с родительскими последовательностями.

Таблица 6. Результаты по целевой активности для образцов мРНК в случае разных целевых последовательностей

Код двойной цепи	Процент остаточной экспрессии мРНК целевого гена (целевой активности) (среднее значение)											Знач. IC ₅₀ (нМ)
	40 нМ	13,3 нМ	4,44 нМ	1,48 нМ	0,493 нМ	0,164 нМ	0,054 нМ	0,0182 нМ	0,00609 нМ	0,00203 нМ	0,00067 нМ	
TRD 5840	28,0%	24,2%	30,9%	52,8%	48,9%	86,7%	92,7%	89,8%	92,4%	95,8%	102,4%	0,8710
TRD 5841	57,5%	51,1%	55,5%	68,3%	76,5%	85,9%	82,9%	87,8%	81,5%	64,0%	97,8%	>40
TRD 5845	28,2%	30,5%	41,7%	55,0%	63,9%	78,0%	77,1%	84,1%	95,8%	83,2%	91,9%	1,9953
TRD 5846	31,6%	26,8%	34,1%	59,1%	84,8%	102,1%	97,2%	108,9%	95,6%	107,2%	102,1%	1,9055
TRD 5847	9,3%	7,2%	6,3%	8,5%	17,9%	47,2%	80,6%	94,7%	100,5%	106,1%	110,6%	0,1380
TRD 5848	46,5%	35,1%	26,6%	36,0%	67,3%	76,3%	88,4%	104,1%	91,6%	95,1%	98,1%	0,7943
TRD 5852	24,7%	17,5%	13,1%	21,1%	40,5%	64,1%	84,3%	94,5%	88,4%	100,2%	95,1%	0,2951
TRD 5853	17,5%	11,5%	9,9%	13,5%	30,3%	54,5%	74,6%	86,3%	90,3%	91,0%	84,1%	0,1905
TRD 5854	37,9%	32,4%	35,3%	50,3%	70,6%	89,7%	98,8%	101,1%	106,1%	99,6%	114,7%	1,3804
TRD 5855	41,3%	40,7%	36,9%	73,6%	71,7%	87,0%	89,0%	85,8%	94,9%	104,4%	101,6%	4,2658
TRD 5860	43,5%	37,1%	34,1%	50,8%	77,6%	88,5%	86,6%	100,0%	95,1%	97,8%	110,8%	1,5488

IC₅₀ означает концентрацию, вызывающую 50%-ное ингибирование.

Таблица 7. Результаты по нецелевой активности образцов миРНК для разных целевых последовательностей

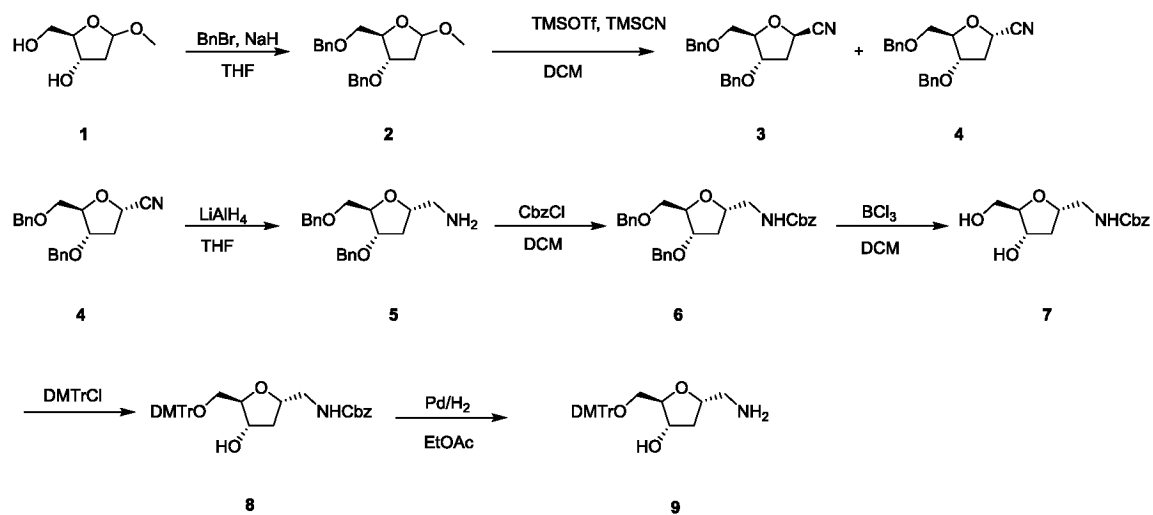
Код двойной цепи	Процент остаточной экспрессии мРНК целевого гена (нецелевой активности) (среднее значение)										
	40 нМ	13,3 нМ	4,44 нМ	1,48 нМ	0,493 нМ	0,164 нМ	0,054 нМ	0,0182 нМ	0,00609 нМ	0,00203 нМ	0,00067 нМ
TRD 5854	36,9%	32,7%	36,1%	39,8%	62,9%	81,3%	87,6%	87,0%	95,8%	93,6%	99,8%
TRD 5855	71,1%	78,2%	81,6%	92,0%	91,0%	94,1%	87,3%	93,6%	99,4%	119,9%	96,6%
TRD 5859	79,8%	81,0%	86,0%	96,4%	101,9%	98,8%	99,8%	118,4%	101,3%	93,3%	103,2%
TRD 5860	78,4%	75,6%	80,6%	86,1%	83,2%	95,9%	91,6%	91,5%	95,6%	97,3%	98,6%

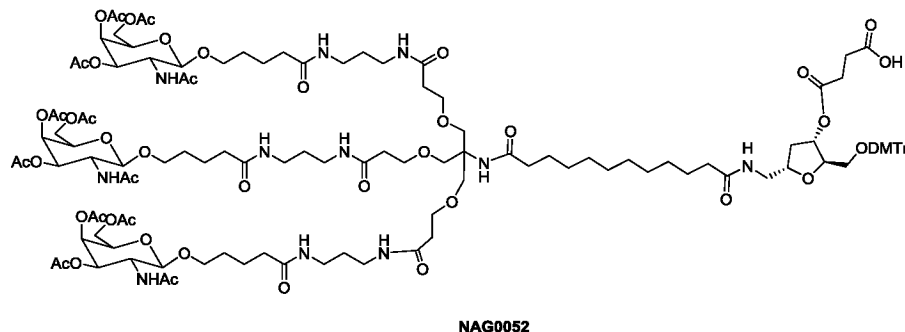
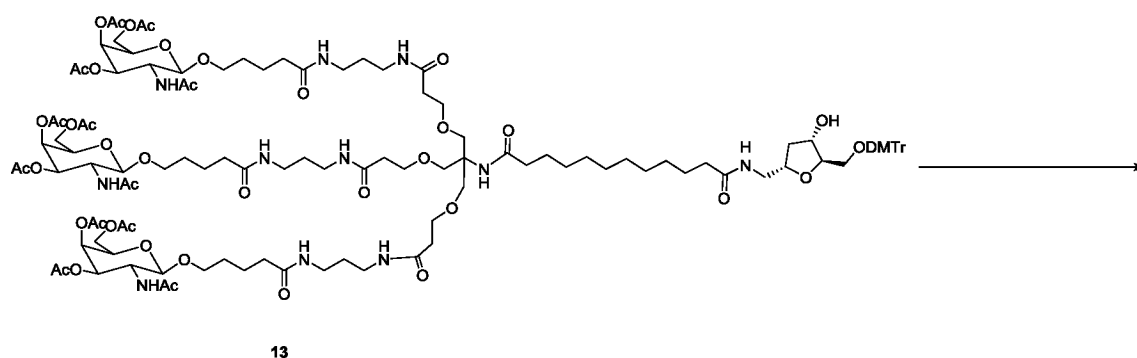
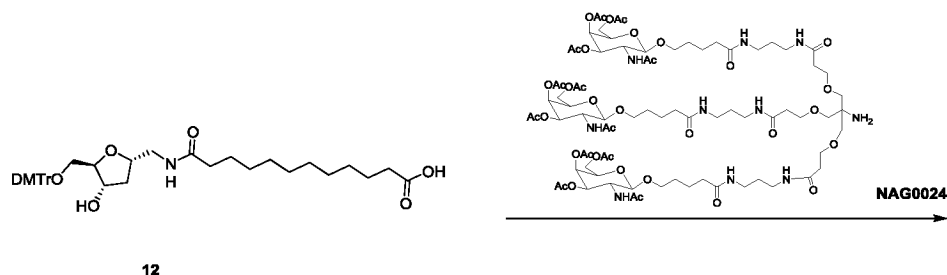
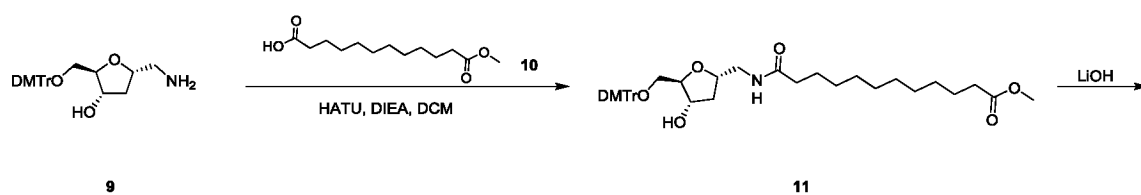
Пример 6. Получение лигандов (NAG0052 и L96)

5 Соединения NAG0024 и NAG0026 приобретали у WuXi AppTec (Тяньцзинь) Co. Ltd. Если не указано иное, все реагенты, использованные в приведенных далее примерах, имелись в продаже.

Синтез соединения NAG0052

Исходное соединение 1 приобретали у Jiangsu Beida Pharmatech Ltd.





Соединение 2

К раствору соединения 1 (12,3 мл; 101 ммоль) в THF (300 мл) при 0°C в атмосфере азота порциями добавляли NaN (12,2 г; 304 ммоль; с чистотой 60%). Смесь перемешивали при 20°C в течение 1 ч и затем снова охлаждали до 0°C. Далее к системе по каплям добавляли бензибромид (36,3 мл; 304 ммоль) и смесь перемешивали при 20°C в течение 12 ч. Реакционную смесь гасили, используя H₂O (100 мл), и затем экстрагировали EtOAc (200 мл × 2). Органические фазы объединяли, промывали насыщенным солевым раствором (100 мл), сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали и полученный остаток разделяли хроматографией на колонке с силикагелем, получая целевое соединение 2 (20,0 г; 51,8 ммоль; выход 51%).

ЖХ-МС: t_R (время удерживания) = 2,615 и 2,820 мин в режиме: 30-90%AB_7 мин_220 и 254 нм_Shimadzu.lcm (колонка: Xtime C18, 3 мкм, 2,1 × 30 мм), MS (электрораспылительная ионизация (ESI)) $m/z = 351,2 [M+Na]^+$.

1H ЯМР: (400 МГц, $CDCl_3$) δ млн $^{-1}$ 7.35-7.12 (m, 10H), 5.06-4.95 (m, 1H),
5 4.51-4.39 (m, 4H), 4.24-3.87 (m, 2H), 3.50-3.40 (m, 2H), 3.38-3.20 (m, 3H), 2.20-1.91 (m, 2H).

Соединение 3 и соединение 4

Триметилсилилцианид (TMSCN; 13,5 мл; 101 ммоль) добавляли за один прием к раствору соединения **2** (13,0 г; 33,6 ммоль) в DCM (300 мл) при 20°C в атмосфере азота и затем по каплям добавляли раствор
10 триметилсилилтрифторметансульфоната (TMSOTf; 9,14 мл; 50,5 ммоль) в DCM (30 мл). Реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 15 ч. После завершения реакции систему гасили насыщенным водным раствором $NaHCO_3$ (80 мл) и экстрагировали DCM (150 мл × 2). Органические фазы объединяли,
15 промывали насыщенным солевым раствором (80 мл), сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали. Остаток разделяли хроматографией на колонке с силикагелем, получая целевое соединение **3** (3,30 г; 9,18 ммоль; выход 27%) и соединение **4** (8,50 г; 9,18 ммоль; выход 70%) в виде бледно-желтой маслянистой жидкости.

20 Соединение 3

1H ЯМР: (400 МГц, $CDCl_3$) δ млн $^{-1}$ 7.42-7.29 (m, 10H), 4.81 (t, $J = 7,8$ Гц, 1H), 4.65-4.49 (m, 4H), 4.30-4.21 (m, 2H), 3.65-3.57 (m, 1H), 3.57-3.49 (m, 1H), 2.49-2.40 (m, 2H).

Соединение 4

25 **1H ЯМР:** (400 МГц, $CDCl_3$) δ млн $^{-1}$ 7.42-7.26 (m, 10H), 4.93-4.87 (m, 1H), 4.65-4.48 (m, 4H), 4.43-4.38 (m, 1H), 4.21-4.17 (m, 1H), 3.79-3.70 (m, 1H), 3.54 (d, $J = 4,0$ Гц, 1H), 2.45-2.37 (m, 2H).

Соединение 5

30 Раствор соединения **4** (3,00 г; 9,28 ммоль) в THF (15 мл) по каплям добавляли к раствору $LiAlH_4$ (0,79 г; 20,9 ммоль) в THF (15 мл) при 0°C в атмосфере азота. После завершения добавления по каплям систему оставляли взаимодействовать при 0°C в течение 1 ч. Результаты мониторинга с использованием TLC (PE:EtOAc = 3:1) показали полное израсходование исходного вещества. К реакционной смеси медленно добавляли сульфата натрия декагидрат,
35 пока не переставали образовываться пузырьки. Затем реакционную смесь фильтровали и осадок на фильтре три раза промывали дихлорметаном (60 мл).

Фильтрат собирали и концентрировали досуха путем упаривания на роторном испарителе, получая целевое соединение **5** (3,00 г; выход 90%).

¹H ЯМР: (400 МГц, дейтерированный диметилсульфоксид (DMSO-*d*₆)) δ млн⁻¹
7.40-7.14 (m, 10H), 4.54-4.38 (m, 4H), 4.06-3.99 (m, 2H), 3.91 (q, *J* = 6,4 Гц, 1H),
5 3.48-3.37 (m, 2H), 2.67-2.52 (m, 2H), 2.21-2.18 (m, 1H), 1.77-1.73 (m, 1H).

Соединение 6

Соединение **5** (3,00 г; 8,25 ммоль) растворяли в DCM (30 мл) в атмосфере азота и добавляли TEA (3,44 мл; 24,7 ммоль) и CbzCl (1,76 мл; 12,4 ммоль). Смесь оставляли взаимодействовать при 20°C в течение 2 ч. Результаты ЖХ-МС анализа
10 показали завершение реакции. Реакционную смесь экстрагировали дихлорметаном (30 мл) и водой (60 мл). Органическую фазу три раза промывали водой (60 мл × 3), сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали и остаток очищали с использованием колонки с нормальной фазой (PE:EtOAc = 1:1), получая целевое
соединение **6** (2,5 г; выход 90%).

15 ЖХ-МС: *t*_R = 0,810 мин в режиме: 5-95%AB_1 мин, MS (ESI) *m/z* = 462,2 [M+H]⁺.

¹H ЯМР: (400 МГц, CDCl₃) δ млн⁻¹ 7.39-7.29 (m, 15H), 5.35 (s, 1H), 5.15-5.01 (m, 2H), 4.72 (d, *J* = 6,0 Гц, 1H), 4.54-4.40 (m, 3H), 4.26 (s, 1H), 4.23-4.18 (m, 1H), 4.11-4.04
20 (m, 1H), 3.54-3.41 (m, 3H), 3.37-3.25 (m, 1H), 2.34-2.23 (m, 1H), 1.85-1.79 (m, 1H).

Соединение 7

Соединение **6** (2,00 г; 3,90 ммоль) растворяли в DCM (5 мл) в атмосфере азота и при -78°C добавляли раствор BCl₃ в THF (1 M; 27,3 мл). Смесь оставляли взаимодействовать в течение 1 ч. Результаты мониторинга с использованием TLC (DCM:MeOH = 10:1) показали полное израсходование исходного вещества.
25 Реакционную смесь гасили метанолом (20 мл) при -78°C и концентрировали и остаток очищали с использованием колонки с нормальной фазой (DCM:MeOH = 10:1), получая целевое соединение **7** (2,00 г; выход 60%).

¹H ЯМР: (400 МГц, CD₃OD) δ млн⁻¹ 7.41-7.23 (m, 5H), 5.08 (s, 2H), 4.25-4.07 (m, 2H), 3.85-3.75 (m, 1H), 3.63-3.56 (m, 1H), 3.54-3.48 (m, 1H), 3.30-3.27 (m, 2H),
30 2.34-2.21 (m, 1H), 1.71-1.64 (m, 1H).

Соединение 8

Соединение **7** (0,50 г; 1,78 ммоль) растворяли в пиридине (5 мл) в атмосфере азота и при 0°C добавляли молекулярное сито 4Å (500 мг) и DMTrCl (0,66 мл; 2,13 ммоль). Далее смесь нагревали до 20°C и оставляли взаимодействовать в течение
35 1,5 ч. Результаты мониторинга с использованием TLC (PE:EtOAc = 2:1) показали полное израсходование исходного вещества. Реакционную смесь экстрагировали

этилацетатом (60 мл) и водой (60 мл). Органическую фазу три раза промывали водой (60 мл × 3), затем сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали и остаток очищали с использованием колонки с нормальной фазой (PE:EtOAc = 1:1), получая целевое соединение **8** (800 мг; выход 90%).

5 $^1\text{H ЯМР}$: (400 МГц, CDCl_3) δ млн⁻¹ 7.44 (d, J = 7,6 Гц, 2H), 7.37-7.23 (m, 11H), 7.22-7.15 (m, 1H), 6.84 (d, J = 8,8 Гц, 4H), 5.09 (s, 2H), 4.31-4.17 (m, 2H), 4.02-3.91 (m, 1H), 3.84-3.73 (m, 6H), 3.33 (s, 1H), 3.28 (s, 1H), 3.19-3.01 (m, 2H), 2.34-2.25 (m, 1H), 1.70-1.62 (m, 1H).

Соединение 9

10 Соединение **8** (800 мг; 1,234 ммоль) растворяли в EtOAc (5 мл) и добавляли 10%-ный Pd/C (800 мг; 7,517 ммоль). Смесь оставляли взаимодействовать в атмосфере H_2 (15 ф/кв. дюйм (104 кПа)) при 20°C в течение 1 ч. Результаты ЖХ-МС анализа показали завершение реакции. Реакционную смесь фильтровали и осадок на фильтре три раза промывали дихлорметаном (100 мл) и метанолом (100 мл).
15 Фильтрат концентрировали и остаток разделяли с использованием колонки для обращенно-фазовой хроматографии, получая соединение **9** (300 мг; 54%).

ЖХ-МС : $t_R = 2,586$ мин в режиме: 10-80%CD_3 мин, MS (ESI) $m/z = 450,2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Соединение 11

20 Соединение **10** (435 мг; 1,780 ммоль) растворяли в DCM (10 мл) и добавляли диизопропилэтиламин (DIEA; 0,441 мл; 2,67 ммоль) и гексафторфосфат O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония (HATU; 677 мг; 1,78 ммоль). Затем добавляли соединение **9** (400 мг; 0,890 ммоль). Смесь оставляли взаимодействовать при 20°C в течение 1 ч. Результаты мониторинга с
25 использованием TLC (DCM:MeOH = 10:1) показали завершение реакции. Реакционную смесь экстрагировали дихлорметаном (60 мл) и водой (60 мл). Органическую фазу три раза промывали водой (60 мл × 3), сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали и остаток очищали с использованием колонки с нормальной фазой (элюирование смесью PE:EtOAc = 0:1, пик продукта при 100%),
30 получая целевое соединение **11** (600 мг; выход 90%).

ЖХ-МС : $t_R = 2,745$ мин в режиме: 30-90%CD_3 мин, MS (ESI) $m/z = 698,4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

35 $^1\text{H ЯМР}$: (400 МГц, CD_3OD) δ млн⁻¹ 7.46-7.38 (m, 2H), 7.35-7.24 (m, 6H), 7.22-7.16 (m, 1H), 6.90-6.78 (m, 4H), 4.29-4.21 (m, 2H), 4.02-3.95 (m, 1H), 3.77 (s, 6H), 3.66-3.62 (m, 3H), 3.41 (s, 1H), 3.18-3.04 (m, 2H), 2.36-2.17 (m, 5H), 1.71-1.50 (m, 5H), 1.39-1.25 (m, 14H).

Соединение 12

В THF (3 мл) и H₂O (1 мл) растворяли соединение **11** (600 мг; 0,799 ммоль) и добавляли LiOH·H₂O (134 мг; 3,20 ммоль). Смесь оставляли взаимодействовать при 20°C в течение 12 ч. Результаты анализа с использованием TLC (DCM:MeOH = 10:1) показали завершение реакции. Реакционную смесь концентрировали досуха путем упаривания на роторном испарителе. Остаток растворяли в воде (5 мл) и метаноле (5 мл) и очищали с использованием колонки для обращенно-фазовой хроматографии (H₂O:CH₃CN = 1:1, пик при примерно 35%), получая целевое соединение **12** (460 мг; выход 100%, литиевая соль).

ЖХ-МС: $t_R = 1,346$ мин в режиме: 10-80%CD_3 мин, MS (ESI) $m/z = 684,3$ [M+Na]⁺.

HPLC: $t_R = 1,879$ мин в режиме: 10-80%CD_6 мин.

¹H ЯМР: (400 МГц, CD₃OD) δ млн⁻¹ 7.47-7.39 (m, 2H), 7.35-7.24 (m, 6H), 7.22-7.15 (m, 1H), 6.91-6.79 (m, 4H), 4.31-4.18 (m, 2H), 4.02-3.95 (m, 1H), 3.78 (s, 6H), 3.44-3.33 (m, 2H), 3.18-3.04 (m, 2H), 2.35-2.27 (m, 1H), 2.24-2.10 (m, 4H), 1.70-1.51 (m, 5H), 1.31-1.23 (m, 12H).

Соединение 13

В безводном THF (2 мл) и безводном DMF (4 мл) при комнатной температуре в атмосфере азота растворяли соединение **NAG0024** (271 мг; 0,151 ммоль) и добавляли молекулярное сито 3Å. Затем последовательно добавляли соединение **12** (100 мг; 0,151 ммоль), гидроксibenзотриазол (HOBT; 25 мг; 0,181 ммоль), дициклогексилкарбодиимид (DCC; 38 мг; 0,181 ммоль) и DIEA (39 мг; 0,302 ммоль). Реакционную смесь оставляли взаимодействовать при 45°C в течение 16 ч. После завершения реакции по результатам ЖХ-МС анализа реакционную смесь гасили водой и фильтровали. Фильтрат концентрировали и затем остаток очищали с использованием колонки с обращенной фазой C18 (H₂O/ацетонитрил (MeCN)), получая соединение **13** (210 мг; выход 57%).

Соединение NAG0052

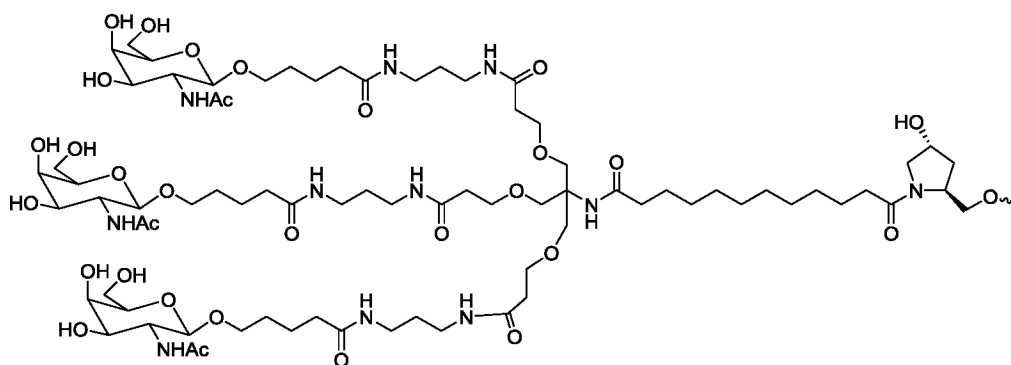
Соединение **13** (230 мг; 0,094 ммоль) растворяли в пиридине (5 мл) при комнатной температуре и добавляли молекулярное сито. Добавляли DMAP (12 мг; 0,283 ммоль) и янтарны ангидрид (28 мг; 0,283 ммоль). Смесь перемешивали при 50°C в течение 16 ч в атмосфере азота. Результаты ЖХ-МС анализа показали завершение реакции. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали досуха путем упаривания на роторном испарителе. После очистки на колонке с обращенной фазой C18 проводили вторую очистку препаративной HPLC, получая целевое соединение **NAG0052** (123 мг; 0,048 ммоль; выход 51%).

MS (ESI) $m/z = 2535,3 [M-1]$. Рассчитано: 2536,2.

^1H ЯМР (400 МГц, ацетонитрил- d_3) δ 7.48-7.43 (m, 2H), 7.37-7.12 (m, 11H), 7.00-6.85 (m, 10H), 6.66 (s, 1H), 5.31 (dd, $J = 3,4$; 1,1 Гц, 3H), 5.20-5.13 (m, 1H), 5.05 (dd, $J = 11,3$; 3,4 Гц, 3H), 4.56 (d, $J = 8,5$ Гц, 3H), 4.30 (dd, $J = 7,7$; 5,3 Гц, 1H), 4.18-3.93 (m, 14H), 3.79 (s, 10H), 3.65 (q, $J = 4,7$; 3,6 Гц, 13H), 3.56-3.07 (m, 24H), 2.56 (s, 6H), 2.37 (t, $J = 5,8$ Гц, 10H), 2.17 (t, $J = 7,5$ Гц, 9H), 2.02-1.96 (m, 20H), 1.88 (s, 8H), 1.82-1.73 (m, 2H), 1.60 (dt, $J = 15,0$; 7,3 Гц, 16H), 1.27 (s, 13H).

Соединение NAG0052 связывали с последовательностью методом твердофазного синтеза и после аминолиза удаляли часть функциональных групп структуры NAG0052 с образованием NAG0052'.

Синтез L96



Соединение получали согласно способу, описанному в патентной заявке № WO2014025805A1.

15

Пример 7. Синтез дцРНК

1. Собственное приготовление смолы в качестве подложки

Содержащее карбоксильные группы соединение **NAG0052** (157 мг; 0,062 ммоль) растворяли в безводном DMF (3 мл). После полного растворения субстрата последовательно добавляли безводный ацетонитрил (4 мл), DIEA (0,03 мл; 0,154 ммоль; 2,5 экв.) и гексафторфосфат O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуруния (HBTU; 35 мг; 0,093 ммоль; 1,5 экв.). После хорошего перемешивания реакционной смеси добавляли макропористую аминотетил-смола (476 мг; холостая загрузка 0,41 ммоль/г; целевая загрузка 0,1 ммоль/г). Реакционную смесь встряхивали в течение ночи на шейкере (температура: 25°C; скорость вращения: 200 об./мин). Реакционную смесь фильтровали и осадок на фильтре промывали DCM и затем безводным ацетонитрилом. Твердое вещество собирали и сушили в течение ночи под вакуумом.

Твердое вещество с предыдущей стадии диспергировали в безводном ацетонитриле (5 мл) и пиридине (0,18 мл), после этого добавляли DMAP (3 мг), N-метилимидазол (NMI; 0,12 мл) и CapB1 (2,68 мл). Реакционную смесь встряхивали на шейкере (температура: 25°C; скорость вращения: 200 об./мин) в течение 2 ч. Реакционную смесь фильтровали и осадок на фильтре промывали безводным ацетонитрилом. Твердое вещество собирали и сушили в течение ночи под вакуумом, получая смолу в качестве подложки. Загрузку определяли на уровне 0,1 ммоль/г.

2. В случае, когда к смоле было присоединено **NAG0052**, эту смолу использовали в качестве места старта и нуклеозидные мономеры присоединяли один за другим в направлении 3'-5' в том порядке, в котором располагались нуклеотиды. Каждый раз при связывании нуклеозидного мономера выполняли четыре реакции - удаление защиты, осуществление реакции сочетания, введение кэпирующих групп и окисление или сульфирование. Данная методика является общепринятой в данной области техники.

Полученные образцы дцРНК имели смысловую и антисмысловую цепи, показанные в Таблице 8 и Таблице 9-1.

Таблица 8. Список образцов дцРНК

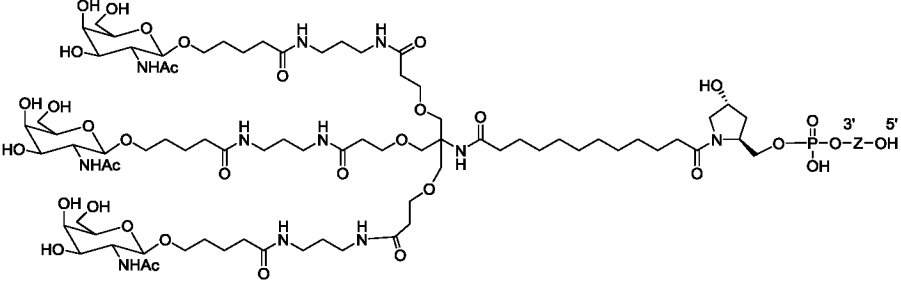
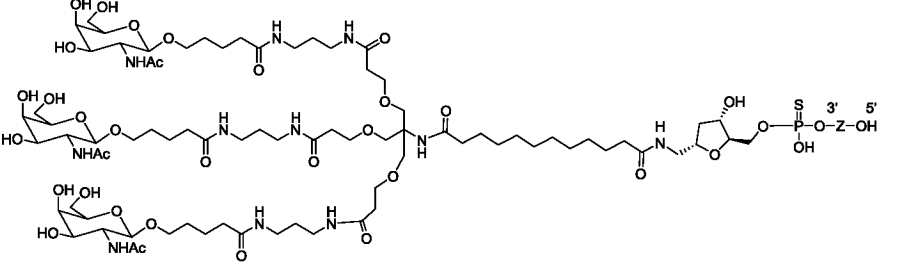
№ дцРНК	№ смысловой цепи	№ антисмысловой цепи
TRD002218	TJR4373-SS	TJR0414-AS
TRD007205	TJR013485S	TJR0414-AS

Таблица 9-1. Нуклеиновокислотные последовательности смысловой и антисмысловой цепей в образцах дцРНК

		SEQ ID NO	Направление в последовательности 5'-3'
Смысловая цепь	TJR4373-SS	36	CmsAmsGm UmGfUm UfCfUf UmGmCm UmCmUm AmUmAm Am-L96
	TJR013485S	37	CmsAmsGm UmGfUm UfCfUf UmGmCm UmCmUm AmUmAms Ams-NAG0052'
Анти-смысловая цепь	TJR0414-AS	38	UmsUfsAm UmAmGf AmGmCm AmAmGm AmAfCm AfCmUm GmsUmsUm

Структуры приведенных выше образцов дцРНК показаны ниже.

Таблица 9-2. Структуры образцов дцРНК

№ смысловой цепи дцРНК	Структура
TJR4373-SS	
TJR013485S	

Соединение TRD002218 использовали в качестве референсного

5 положительного контроля.

Пример 8. Ингибирование *in vivo* уровня экспрессии мРНК целевого гена под действием дцРНК

В этом эксперименте исследовали эффективность образцов дцРНК по
10 настоящему изобретению, конъюгированных с разными структурами, в отношении ингибирования уровня экспрессии мРНК целевого гена *in vivo*.

Самцов мышей C57BL/6 в возрасте 6-8 недель случайным образом
15 подразделяли на группы по 6 особей, из расчета по 3 мыши на одну временную точку. Этим группам мышей вводили TRD007205, соединение TRD002218 в качестве референсного положительного контроля и PBS.

Всем животным вводили однократную дозу подкожной (п.к.) инъекцией с
учетом массы их тела. Образцы дцРНК вводили в дозе 1 мг/кг (рассчитанной с
учетом миРНК без лиганда), при этом объем составлял 5 мл/кг. Мышей умерщвляли
20 через 7 суток или 28 суток после введения, отбирали у них печень и хранили, используя реагент RNeasy (Qiagen). Затем, печеночную ткань

гомогенизировали, используя гомогенизатор для тканей, и из печеночной ткани экстрагировали общую РНК с использованием набора для экстракции РНК из тканей (FireGen Biomedicals, FG0412), следуя методике, описанной в инструкциях. Общую РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК и измеряли уровень экспрессии мРНК TTR в печеночной ткани посредством количественной флуоресцентной ПЦР в режиме реального времени. В методе количественной флуоресцентной ПЦР в качестве внутреннего стандарта использовали ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) и уровни экспрессии мРНК TTR и GAPDH измеряли, используя зонд-праймеры типа Taqman для TTR и GAPDH, соответственно.

Таблица 10. Группы, получающие соединения для эксперимента *in vivo* на мышах

№ соединения	Доза	Количественное определение мРНК на	Количество животных	Примечание
PBS	-	7-е, 28-е сут	6	3 мыши на одну временную точку
TRD002218	1 мг/кг, п.к.	7-е, 28-е сут	6	3 мыши на одну временную точку
TRD007205	1 мг/кг, п.к.	7-е, 28-е сут	6	3 мыши на одну временную точку

Последовательности праймеров для выявления показаны в Таблице 11.

15

Таблица 11. Последовательности праймеров

Название праймера	Последовательность праймера
mTTR-F	GGGAAGACCGCGGAGTCT (SEQ ID NO: 39)
mTTR-R	CAGTTCTACTCTGTACACTCCTTCTACAAA (SEQ ID NO: 40)
mTTR-P	CTGCACGGGCTCACCACAGATGA (SEQ ID NO: 41)
mGAPDH-F	CGGCAAATTCAACGGCACAG (SEQ ID NO: 42)
mGAPDH-R	CCACGACATACTCAGCACCG (SEQ ID NO: 43)
mGAPDH-P	ACCATCTTCCAGGAGCGAGACCCCACT (SEQ ID NO: 44)

Уровень экспрессии мРНК TTR рассчитывали согласно приведенному ниже уравнению:

уровень экспрессии мРНК TTR = [(уровень экспрессии мРНК TTR в тестируемой группе/уровень экспрессии мРНК GAPDH в тестируемой группе)/(уровень экспрессии мРНК TTR в контрольной группе/уровень экспрессии мРНК GAPDH в контрольной группе)] × 100%.

5 Эффективность образцов дцРНК по настоящему изобретению, конъюгированных с разными структурами, с точки зрения ингибирования уровня экспрессии мРНК целевого гена *in vivo* через 7 суток и 28 суток после введения показаны на ФИГ. 1 и ФИГ. 2, соответственно. Как можно видеть по результатам, представленным на ФИГ. 1, соединение TRD007205 хорошо ингибировало
10 экспрессию мРНК TTR через 7 суток после введения. Как можно видеть на ФИГ. 2, через 28 суток после введения TRD007205 наблюдали более значительное ингибирование уровня экспрессии мРНК целевого гена, чем в случае TRD002218.

Пример 9. Синтез дцРНК

15 1. Собственное приготовление смолы в качестве подложки

Методика аналогична описанной в примере 7.

2. Смолу с **NAG0052** использовали в качестве места старта и нуклеозидные мономеры присоединяли один за другим в направлении 3'-5' в том порядке, в котором располагались нуклеотиды. Каждый раз при связывании нуклеозидного
20 мономера выполняли четыре реакции - удаление защиты, осуществление реакции сочетания, введение кэпирующих групп и окисление или сульфирование. В частности, упомянут способ синтеза из примера 2.

Полученные образцы дцРНК имели смысловую и антисмысловую цепи, показанные в Таблице 12 и Таблице 14.

25

Таблица 12. Список образцов дцРНК

Мишень	№ дцРНК	№ смысловой цепи	№ антисмысловой цепи
HBV	TRD007970	TJR014881S	TJR013124A
	TRD007994	TJR014931S	TJR013130A
	TRD007995	TJR014932S	TJR013131A
	TRD007970-1	TJR014881S-1	TJR013124A
	TRD007994-1	TJR014931S-1	TJR013130A
	TRD007995-1	TJR014932S-1	TJR013131A
	TJR100259	TJR014881S	A0166
	TJR100260	S0186	TJR013124A

Примечания: TRD007970, TRD007970-1, TJR100259 и TJR100260 направлены воздействуют на HBV-X;

TRD007994, TRD007995, TRD007994-1 и TRD007995-1 направлены воздействуют на HBV-S.

5

Таблица 13. Соответствующие “голые” последовательности смысловой и антисмысловой цепей образцов дцРНК

	№ соответств. смысловой цепи	SEQ ID NO “голой” последов.	“Голая” последов-ть, направление последов. 5'-3'	№ соответств. смысловой цепи	SEQ ID NO “голой” последов.	“Голая” последов-ть, направление последов. 5'-3'
Смысловая цепь	TJR014881S	1	GUGUGCACUU CGCUUCACC	TJR014881S-1	1	GUGUGCACUU CGCUUCACC
	TJR014931S	2	CUUUUGUCUU UGGGUAUUAU	TJR014931S-1	2	CUUUUGUCUU UGGGUAUUAU
	TJR014932S	3	UUACCAUUUU UCUUUUUGUU	TJR014932S-1	3	UUACCAUUUU UCUUUUUGUU
	S0186	4	GUGUGCACUU CGCUUCACU	S0186-1	4	GUGUGCACUU CGCUUCACU
	№ соответств. антисмыслов. цепи	SEQ ID NO “голой” последов.	“Голая” последовательность, направление 5'-3'			
Антисмысловая цепь	TJR013124A	5	AGUGAAGCGAAGUGCACACGG			
	TJR013130A	6	AUAUACCCAAAGACAAAAGAA			
	TJR013131A	7	AACAAAAGAAAAUUGGUAACA			
	A0166	8	IGUGAAGCGAAGUGCACACGG			

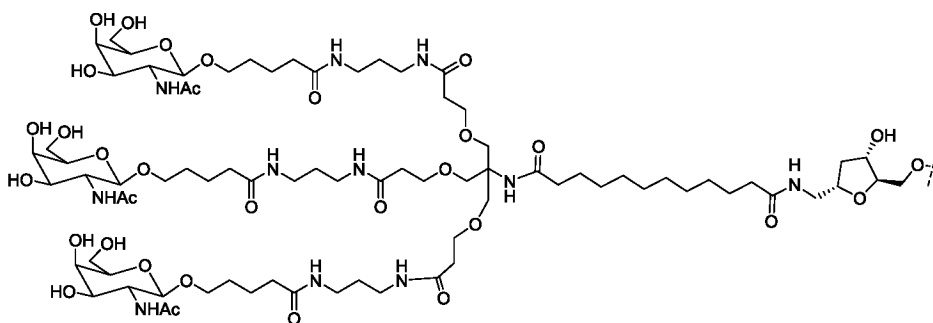
Таблица 14. Смысловая и антисмысловая цепи образцов дцРНК

	№ смысловой цепи	SEQ ID NO	Направление последовательности 5'-3'	№ смысловой цепи	SEQ ID NO	Направление последовательности 5'-3'
Смысловая цепь	TJR014881S	9	GmsUmsGmUmGmCmAf CfUfUmCmGmCmUmUm CmAmCmCm-NAG0052'	TJR014881S-1	10	GmsUmsGmUmGfCmAf CfUfUmCmGmCmUmUm CmAmCmCm-NAG0052'
	TJR014931S	11	CmsUmsUmUmUfGmUfC fUfUmUmGmGmGmUmA mUmAmUm-NAG0052'	TJR014931S-1	12	CmsUmsUmUmUmGmUf CfUfUmUmGmGmGmUm AmUmAmUm-NAG0052'
	TJR014932S	13	UmsUmsAmCmCfAmAfU fUfUmUmCmUmUmUmU mGmUmUm-NAG0052'	TJR014932S-1	14	UmsUmsAmCmCmAmAf UfUfUmUmCmUmUmUm UmGmUmUm-NAG0052'

	S0186	15	GmsUmsGmUmGmCmAf CfUfUmCmGmCmUmUm CmAmCmUm-NAG0052'	S0186-1	16	GmsUmsGmUmGfCmAf CfUfUmCmGmCmUmUm CmAmCmUm-NAG0052'
Анти- смысловая цепь	TJR013124A	17	AmsGfsUmGfAmAf(-)hmpNA(G)CmGmAfAmGfUmGfCmAfCmAfCmsGms Gm			
	TJR013130A	18	AmsUfsAmUfAmCf(-)hmpNA(C)CmAmAfAmGfAmCfAmAfAmAfGmsAmsA m			
	TJR013131A	19	AmsAfsCmAfAmAf(-)hmpNA(A)GmAmAfAmAfUmUfGmGfUmAfAmsCmsA m			
	A0166	20	lmsGfsUmGfAmAf(-)hmpNA(G)CmGmAfAmGfUmGfCmAfCmAfCmsGmsG m			

Для структур (-)hmpNA(A), (-)hmpNA(G), (-)hmpNA(C) и (-)hmpNA(U) см. пример 4.

Структура NAG0052' представлена ниже:



5

Пример 10. Целевая активность дцРНК в отношении HBV

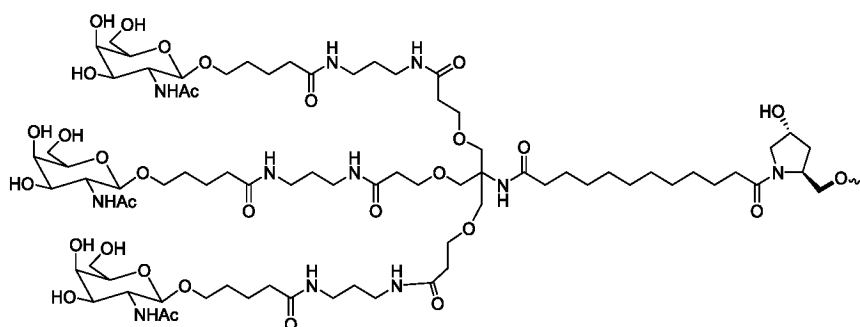
Соединение в качестве положительного контроля представлено в Таблице 15.

Таблица 15. Последовательности соединения в качестве положительного контроля

№ соединения в качестве положительного контроля	SEQ ID NO	Смысловая цепь (5'-3')	SEQ ID NO	Антисмысловая цепь (5'-3')
AD81890	45	GmsUmsGmUmGfCm AfCfUfUmCmGmCmU mUmCmAmCmAm-L96	46	UmsGfsUmGmAmGNA (A)GmCfGfAmAmGmUm GfCmAfCmAmCmsUmsUm

10

AD81890 получали, руководствуясь CN201980053789.8; структура L96 представлена ниже:



Проводили моделирование на молекулярном уровне *in vitro* последовательностей дцРНК, представленных в Таблице 14 и Таблице 15, на предмет скрининга целевой активности в клетках почки эмбриона человека, линии 293А (HEK293А), используя градиенты концентрации по 11 точкам.

Соответствующие целевые последовательности образцов дцРНК конструировали исходя из гена HBV и встраивали в плазмиды psiCHECK-2. Плазмиды содержали ген люциферазы из кораллов и ген люциферазы светлячков. Такие плазмиды представляли собой системы с двумя репортерными генами. Целевую последовательность дцРНК встраивали в 3'-нетранслируемую область (UTR) гена люциферазы из кораллов. Активность дцРНК в отношении целевой последовательности отражали измерениями экспрессии люциферазы из кораллов, скорректированной на люциферазу светлячков. Для измерений использовали аналитическую систему с двумя репортерными генами люциферазы (Promega, E2940).

Клетки HEK293А культивировали при 37°C и 5% CO₂ в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) с высоким уровнем глюкозы, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (FBS). За 24 ч до трансфекции содержимое 96-луночного планшета инокулировали клетками HEK293А с плотностью 8×10³ клеток на одну лунку, при этом каждая лунка содержала 100 мкл среды.

Клетки совместно трансфицировали дцРНК и соответствующей плазмидой, используя липофектамин-2000 (ThermoFisher, 11668019) согласно инструкциям. Для каждой лунки использовали по 0,2 мкл липофектамина-2000. Количество плазмиды для трансфекции составляло 20 нг на одну лунку. Для содержащих целевую последовательность плазмид было выбрано в общей сложности 11 точек, соответствующих разным концентрациям образцов дцРНК, при этом конечная концентрация для точки с самой высокой концентрацией составляла 20 нМ. Выполнили 3-кратные серийные разведения, получая в результате 20 нМ,

6,6667 нМ, 2,2222 нМ, 0,7407 нМ, 0,2469 нМ, 0,0823 нМ, 0.0274 нМ, 0,0091 нМ, 0,0030 нМ, 0,0010 нМ и 0,0003 нМ растворы. Через 24 ч после трансфекции определяли уровни целевой активности, используя аналитическую систему с двумя репортерными генами люциферазы (Promega, E2940).

5 **Методика скрининга активности с применением psiCHECK приведена ниже.**

В клетках линии HEK293A путем проведения скрининга с применением psi-CHECK определяли целевую активность последовательностей дцРНК. И использованные в эксперименте материалы и приборы показаны в Таблице 16 и
10 Таблице 17.

Плазмиды psi-CHECK приобретали у Sangon Biotech (Шанхай) Co., Ltd.

Таблица 16. Расходуемые материалы и реагенты, использованные в эксперименте с применением psiCHECK,

Реагенты и расходуемые материалы				
Название	Фирма	№ по каталогу/модель	№ партии	Срок хранения
Клетки HEK293A	Cobioer, Нанкин	ATCC- Cobioer/CBP60202	/	/
ОПТИ-МЕМ	GIBCO	31985-070	2085556	2022.01.30
DMEM	GIBCO	11965-092	2061113	2022.02.28
FBS	GIBCO	10091-148	1989478	Май-23
Трипсин	GIBCO	25200-056	/	/
Система для анализа люциферазы Dual-Glo®	Promega	E2940	0000363099	2020.05.13
Липофектамин® 2000	Invitrogen	11668-019	/	2021.06.14
PBS(1x)	Corning	21-040-CVR	26318001	Сент-20

15

Таблица 17. Приборы, использованные в эксперименте с применением psi-CHECK

Приборы		
Название	Фирма	№ по каталогу/модель
Спектрофотометр NanoDrop	Thermo	NanoDrop One

Микропланшетный ридер	PerkinElmer	EnVision 2105
Одноканальная пипетка	Rainin	SL-2XLS+/10XLS+/20XLS+/200XLS+/1000 XLSC+
8-канальная/12-канальная пипетка	Rainin	E8-200XLS+/E12-200XLS+
Инкубатор с CO ₂	Thermo	Forma™ Steri-Cycle™ i160
Бокс микробиологической безопасности	Esco	AC2-4S1
Центрифуга	Thermo	Fresco 21
Программное обеспечение для получения графических изображений	/	Graph Prism 5

Методика эксперимента с применением psiCHECK

(I) Посев клеток

1. Подготовка к эксперименту

5 1.1. Подготовка клеток HEK293A

Клетки приобретали у Cobiaer, Нанкин. После полного отщепления прикрепившихся клеток необходимо подсчитывать их количество. Клетки можно использовать, если жизнеспособность клеток составляла значение большее или равное 95%.

10 1.2. Полную среду DMEM (DMEM + 10% FBS) хранили при 4°C и перед проведением эксперимента оставляли для достижения комнатной температуры.

1.3. Готовили 96-луночные планшеты с клетками.

2. Посев клеток

15 За 18 ч до трансфекции клетки HEK293A подсчитывали и затем ими с плотностью 8×10^3 клеток/лунка инокулировали содержимое 96-луночного планшета, при этом каждая лунка содержала 100 мкл среды.

2.1. Эту среду инкубировали в водяной бане при 37°C в течение 20 мин для дальнейшего применения.

20 2.2. Отбирали 100 мкл однородной клеточной суспензии и хорошо перемешивали с 5 мкл красителя для подсчета клеток. Смесь оставляли на 1 мин для осуществления окрашивания. Затем отбирали 15 мкл суспензии и вводили в планшет для подсчета клеток с целью расчета количества жизнеспособных клеток (зеленый цвет). Жизнеспособность клеток составляла 98,7%.

2.3. На основании результата подсчета клеток добавляли надлежащий объем культуральной среды и смесь вносили в 96-луночный планшет из расчета 100 мкл/лунка, чтобы обеспечить плотность клеток 8×10^3 клеток/лунка. Затем планшет с клетками помещали в инкубатор при 37°C и 5% CO₂ для проведения культивирования.

(II) Трансфекция клеток

1. Подготовка к эксперименту

1.1. Приготовление образцов дцРНК и плазмиды: для каждого образца дцРНК выполняли количественное определение с целью достижения концентрации 20 мкМ и измеряли концентрацию плазмиды psi-CHECK. Их хранили при -20°C для дальнейшего применения, и перед использованием их необходимо было центрифугировать в течение короткого периода времени.

1.2. Реагент для трансфекции липофектамин-2000 хранили при 4°C.

1.3. Готовили пробирки для 96-луночного планшета для ПЦР и стрипы с восемью пробирками для ПЦР.

1.4. Готовили среду Opti-MEM.

2. Трансфекция клеток

2.1. Перед проведением трансфекции среду Opti-MEM предварительно нагревали и среду в планшете заменяли на среду Opti-MEM из расчета 80 мкл среды/лунка.

2.2. Приготовление комплекса для трансфекции: для каждой концентрации использовали по 2 лунки в параллели, и конкретные количества для приготовления комплекса для трансфекции показаны в Таблице 18.

Состав комплекса для трансфекции приведен ниже.

Таблица 18. Количества, необходимые для комплекса для трансфекции, в каждой лунке планшета

Название	Количество/лунка	Opti-MEM
Плазида	20 нг	10 мкл
Липофектамин-2000	0,2 мкл	10 мкл

В соответствующие стрипы с 8 пробирками вносили аликвоты полученной плазмиды в объеме 22 мкл/пробирка, при этом такие стрипы помечали как: пробирка А.

2.3. Замена среды: из каждой лунки отсасывали целиком полную среду DMEM с высоким уровнем глюкозы (H-DMEM), содержащую 10% FBS, и заменяли

на 80 мкл среды Opti-MEM для обработки в условиях голодания в течение 1,5 ч.

2.4. Разведение образцов дцРНК: хранящиеся при -20°C образцы дцРНК доставали, размораживали, хорошо перемешивали и разбавляли согласно Таблице 19 для получения разных концентраций в зависимости от различных требований эксперимента, чтобы использовать в качестве рабочих растворов для незамедлительного применения.

Таблица 19. Протокол многократного разведения образцов дцРНК для получения разных концентраций

Конечная концентрация дцРНК (нМ)	Добавление воды и дцРНК
20	4 мкл дцРНК (концентрированного раствора) + 36 мкл H_2O
6,6667	10 мкл дцРНК + 20 мкл H_2O
2,2222	10 мкл дцРНК + 20 мкл H_2O
0,7407	10 мкл дцРНК + 20 мкл H_2O
0,2469	10 мкл дцРНК + 20 мкл H_2O
0,0823	10 мкл дцРНК + 20 мкл H_2O
0,0274	10 мкл дцРНК + 20 мкл H_2O
0,0091	10 мкл дцРНК + 20 мкл H_2O
0,0030	10 мкл дцРНК + 20 мкл H_2O
0,0010	10 мкл дцРНК + 20 мкл H_2O
0,0003	10 мкл дцРНК + 20 мкл H_2O

10

2.5. Разбавленные образцы дцРНК добавляли в стрип с 8 пробирками соответствующей пробирки А в объеме 2,2 мкл/пробирка для незамедлительного применения.

2.6. Приготовление смеси липофектамина-2000: липофектамин-2000 разбавляли средой Opti-MEM и выдерживали в течение 5 мин, и конкретные количества для приготовления смеси с Lipo показаны в Таблице 19.

2.7. Затем в стрип с 8 пробирками соответствующей пробирки А вносили аликвоты приготовленной смеси с Lipo в объеме 22 мкл/пробирка и смеси хорошо перемешивали посредством пипетирования (пока не переставали появляться пузырьки) и затем инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин.

2.8. Смеси, приготовленные выше в случае пробирки А, добавляли к клеткам

в объеме 20 мкл/лунка, достигая конечного объема 100 мкл на одну лунку вместе с исходными 80 мкл среды Opti-MEM. Через 4 ч инкубирования в инкубаторе в каждую лунку дополнительно добавляли по 100 мкл среды H-DMEM, содержащей 20% FBS.

2.9. Клетки культивировали в инкубаторе при 37°C и CO₂ в течение 24 ч.

5 (III) Анализ с использованием системы для анализа люциферазы Dual-Glo®

1. Подготовка к эксперименту

1.1. Компоненты и метод приготовления из набора для анализа с двумя репортерными генами люциферазы (Promega, кат. № E2940): буфер для люциферазы Dual-Glo® и содержимое флакона с субстратом для люциферазы Dual-Glo® (лиофилизированным) смешивали заблаговременно и затем вносили аликвоты в центрифужные пробирки емкостью 15 мл в объеме 7,5 мл на одну пробирку. Заблаговременно вносили аликвоты буфера Stop & Glo® из системы Dual-Glo® в объеме 12 мл на одну пробирку. До проведения эксперимента смесь с люциферазой Dual-Glo® размораживали и оставляли достигать комнатной температуры. Затем в каждую пробирку добавляли по 7,5 мл DMEM, чтобы приготовить смесь для незамедлительного применения. Буфер Stop & Glo® из системы Dual-Glo® размораживали, оставляли достигать комнатной температуры и затем добавляли смесь с субстратом Stop & Glo® из системы Dual-Glo® в соотношении 100:1, чтобы приготовить смесь для незамедлительного применения.

20 2. Сбор сигналов

2.1. Отсасывание: из лунок 96-луночного культурального планшета отсасывали исходную среду.

2.2. Добавление субстрата (для люциферазы Dual-Glo®): в каждую лунку добавляли по 150 мкл субстрата LARII и смесь встряхивали на шейкере в течение 10 мин.

2.3. Пипетирование: отбирали по 120 мкл субстрата (смеси для люциферазы Dual-Glo®), переносили в лунки 96-луночного микропланшета и прочитывали значения хемилюминесценции в случае светлячков.

2.4. Добавление субстрата Stop & Glo из системы Dual-Glo®: далее в каждую лунку добавляли по 60 мкл субстрата Stop & Glo из системы Dual-Glo® и смесь встряхивали на шейкере в течение 10 мин. Прочитывали значения хемилюминесценции в случае кораллов.

2.5. Расчет относительной величины: соотношение = Ren/Fig (соотношение в случаях кораллов/светлячков).

2.6. Расчет степени ингибирования: $1 - (\text{соотношение} + \text{только дцРНК/репортерный ген}) \times 100\% = \text{степень ингибирования } (\%)$.

В настоящем изобретении % оставшейся активности (также называемый уровень остаточной экспрессии мРНК (%)) или соотношение остаточной экспрессии мРНК) = 100% - степень ингибирования (%).

2.7. Для получения графических изображений использовали GraphPad Prism5.

Результаты показаны в Таблице 20.

Таблица 20. Результаты скрининга целевой активности образцов дцРНК с применением psiCHECK

Процент остаточной экспрессии мРНК целевого гена (среднее значение)						
Код двойной цепи	20 нМ	6,6667 нМ	2,2222 нМ	0,7407 нМ	0,2469 нМ	0,0823 нМ
TRD007970	24,36%	19,14%	17,48%	15,74%	26,85%	46,52%
TRD007994	4,48%	3,56%	3,49%	2,58%	8,30%	9,56%
TRD007995	2,40%	2,39%	3,12%	3,96%	9,01%	22,05%
AD81890	13,55%	11,18%	22,11%	35,64%	77,98%	117,71%
Код двойной цепи	0,0274 нМ	0,0091 нМ	0,0030 нМ	0,0010 нМ	0,0003 нМ	IC ₅₀ (нМ) для целевой активности (GSCM)
TRD007970	79,91%	91,37%	96,59%	103,89%	100,30%	0,0719
TRD007994	21,64%	49,57%	84,84%	101,38%	91,45%	0,0098
TRD007995	52,23%	87,29%	100,43%	105,82%	91,01%	0,0309
AD81890	119,76%	118,33%	114,44%	119,64%	104,42%	0,4677

10

Приведенные выше результаты указывают на то, что по сравнению с референсным контрольным соединением AD81890 соединения TRD007970, TRD007994 и TRD007995 показывали высокие уровни целевой ингибирующей активности в отношении гена HBV в системе psiCHECK.

15

Результаты для другой партии показаны в Таблице 21.

Таблица 21. Результаты скрининга целевой активности образцов дцРНК с применением psiCHECK

Процент остаточной экспрессии мРНК целевого гена (среднее значение)						
Код двойной цепи	20 нМ	6,6667 нМ	2,2222 нМ	0,7407 нМ	0,2469 нМ	0,0823 нМ
TRD007970	33,1%	19,4%	17,6%	18,1%	28,7%	53,1%
TJR100259	28,1%	16,8%	16,8%	24,2%	40,9%	68,6%
TJR100260	37,0%	20,8%	18,8%	26,9%	48,4%	69,9%
AD81890	11,6%	13,2%	28,3%	54,4%	82,3%	99,8%
Код двойной цепи	0,0274 нМ	0,0091 нМ	0,0030 нМ	0,0010 нМ	0,0003 нМ	IC ₅₀ (нМ) для целевой активности (GSCM)
TRD007970	76,9%	93,3%	99,3%	101,2%	96,5%	0,0819
TJR100259	85,7%	98,3%	98,3%	104,1%	93,9%	0,1457
TJR100260	89,2%	104,4%	104,8%	111,1%	96,9%	0,1765
AD81890	108,0%	115,5%	108,6%	105,0%	121,7%	0,8191

Приведенные выше результаты указывают на то, что по сравнению с референсным контрольным соединением AD81890, соединения TRD007970, TJR100259 и TJR100260 по настоящему изобретению показывали высокие уровни целевой ингибирующей активности в отношении гена HBV в системе psiCHECK.

Пример 11. Оценка *in vitro* анти-HBV активности образцов дцРНК с использованием клеток линии гепатоклеточной карциномы человека HepG2.2.15

Оценку *in vitro* анти-HBV активности образцов дцРНК проводили на клетках HepG2.2.15, используя градиенты концентрации по 8 точкам.

В 1-е сутки клетками HepG2.2.15 инокулировали содержимое 96-луночного планшета из расчета 20 тысяч клеток на одну лунку. В ходе инокулирования клетки HepG2.2.15 трансфицировали дцРНК в разных концентрациях, используя реагент для трансфекции RNAiMax. На 4-е сутки собирали супернатант клеточной культуры и тестировали на предмет HBsAg методом иммуноферментного твердофазного анализа (ELISA) (оставшийся супернатант замораживали для

дальнейшего применения). В конце клетки собирали и из клеток экстрагировали РНК. Содержание общей РНК HBV (включая РНК размером 3,5 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.) + 2,4 т.п.н. + 2,1 т.п.н. + 0,7 т.п.н.) и РНК HBV размером 3,5 т.п.н. (включая прегеномную РНК (пгРНК) + предъядерную РНК (пяРНК)) измеряли методом ПЦР с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР), и при этом РНК гена GAPDH использовали в качестве внутреннего стандарта. Для каждого тестируемого соединения использовали 8 точек, соответствующих разным концентрациям, и анализ проводили в 2 лунках в параллели. Конечная концентрация DMSO в культуре составляла 0,5%.

10 Процент ингибирования рассчитывали, используя приведенные ниже формулы:

% степени ингибирования HBsAg = $(1 - \text{содержание HBsAg в образце} / \text{содержание HBsAg в группе с DMSO в качестве контроля}) \times 100$;

15 % степени ингибирования РНК HBV = $(1 - \text{содержание РНК HBV в образце} / \text{содержание РНК HBV в группе с DMSO в качестве контроля}) \times 100$;

% жизнеспособности клеток = $(\text{поглощение в случае образца} - \text{поглощение в случае культуральной среды в качестве контроля}) / (\text{поглощение в случае DMSO в качестве контроля} - \text{поглощение в случае культуральной среды в качестве контроля}) \times 100$.

20 Значения эффективной концентрации, вызывающей эффект величиной 50% (EC₅₀) рассчитывали в анализе с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (четырёхпараметрических логистических уравнений).

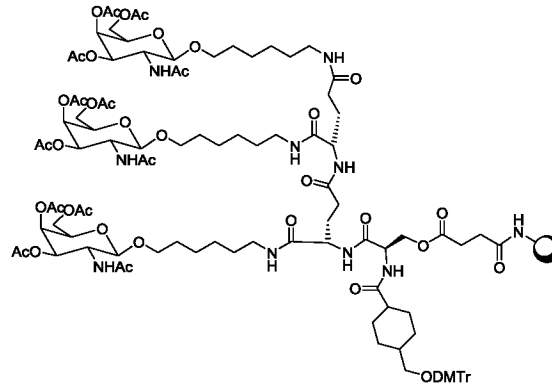
25 Результаты, представленные в Таблице 22, показывают, что по сравнению с референсным контролем AD81890 и в зависимости от тест-индикаторов противовирусной активности тестируемые соединения TRD007970, TRD007994 и TRD007995 показали превосходную противовирусную активность на клетках HepG2.2.15.

Таблица 22. Противовирусная активность образцов дцРНК на клетках HepG2.2.15

№ соединения	EC ₅₀ (нМ) для HBsAg	IC ₅₀ (нМ) для пгРНК	IC ₅₀ (нМ) для общей РНК
TRD007970	0,0027	0,0097	0,0792
TRD007994	0,0083	0,0398	0,1204
TRD007995	0,0012	0,0073	0,0134
AD81890	0,0212	0,0449	0,1428

Пример 12. Оценка разных модификаций в положениях 9 и 10 AS цепей

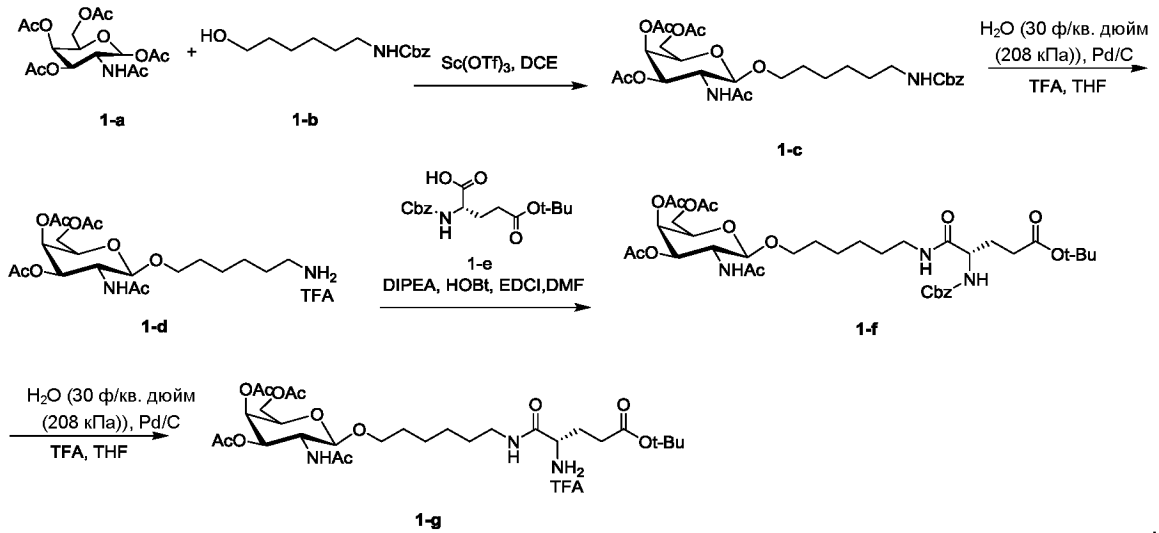
1. Синтез галактозамин-содержащего соединения 1-t, связанного с твердофазным носителем:



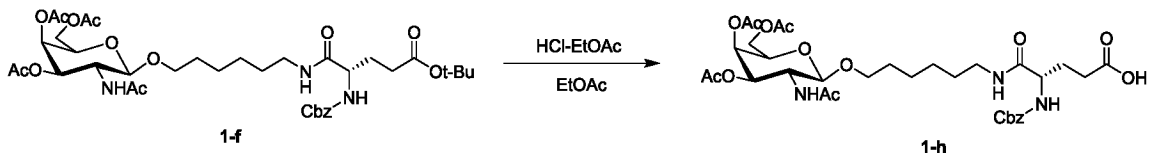
5

Схемы синтеза приведены ниже.

1) Схема синтеза соединения 1-g

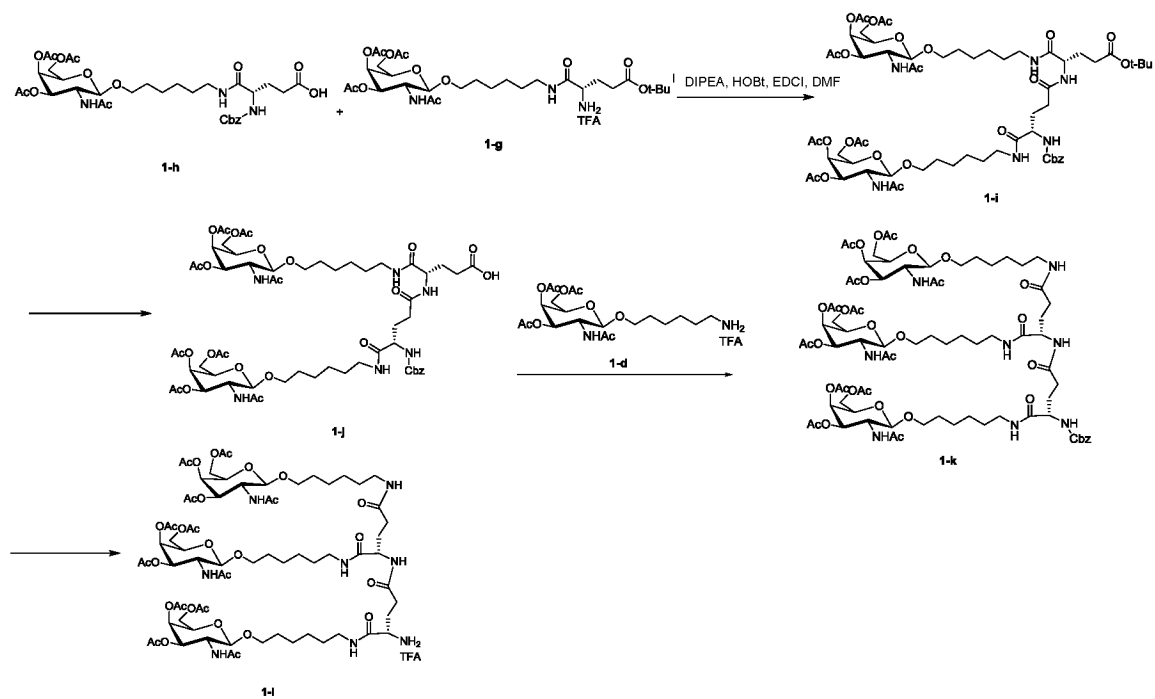


2) Схема синтеза соединения 1-h

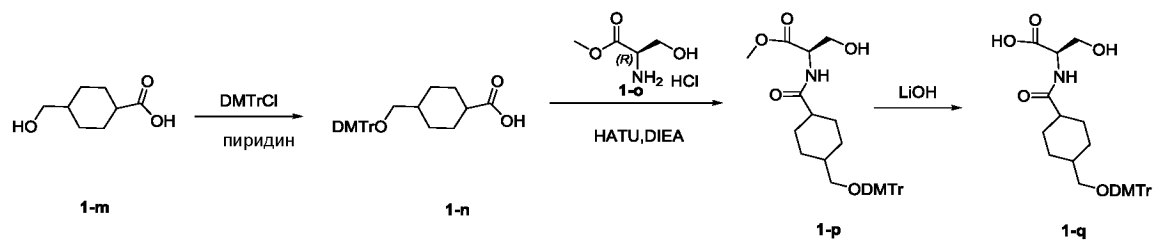


10

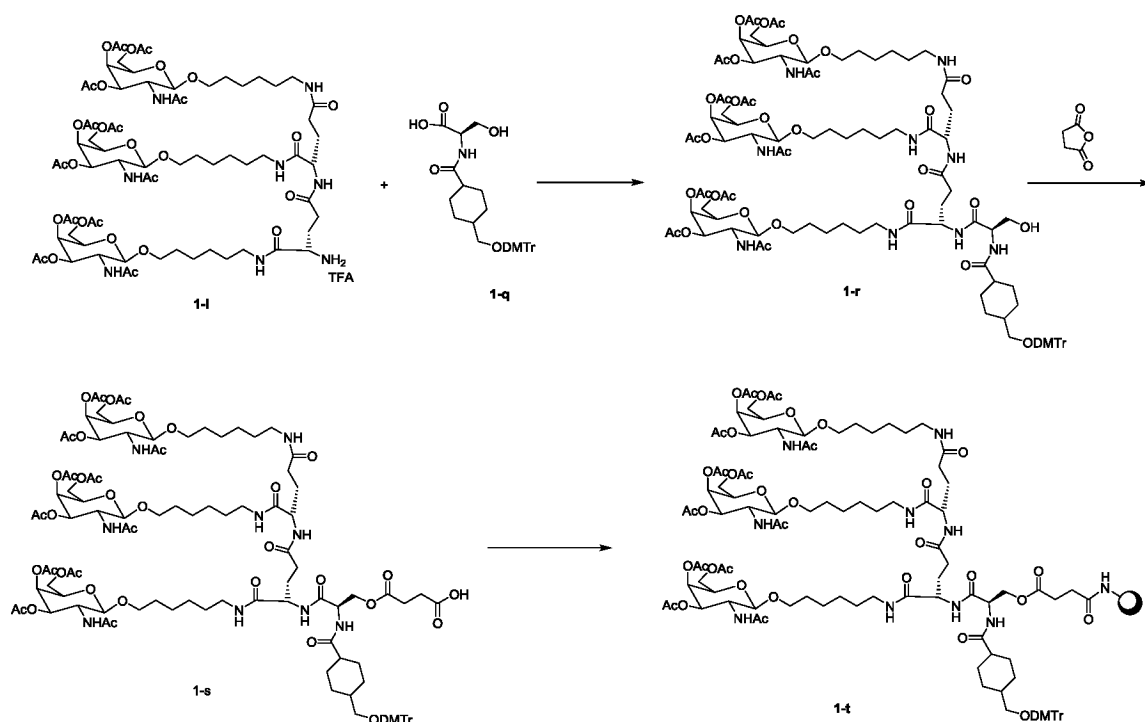
3) Схема синтеза соединения 1-l



4) Синтез соединения 1-q



5) Синтез галактозамин-содержащего соединения **1-t**, связанного с твердофазным носителем



Стадия 1

5 Исходное вещество **1-a** (297 г; 763 ммоль) и исходное вещество **1-b** (160 г; 636 ммоль) растворяли в 960 мл дихлорэтана (DCE). Добавляли Sc(OTf)₃ (15,6 г; 31,8 ммоль) при 5°C. Далее реакционную смесь нагревали до 85°C и перемешивали в течение 2 ч. После завершения реакции добавляли 1,5 л насыщенного раствора NaHCO₃ для остановки реакции. Органическую фазу отделяли, промывали 1,5 л насыщенного солевого раствора, сушили над безводным Na₂SO₄ и фильтровали. Фильтрат подвергали дистилляции при пониженном давлении и остаток очищали хроматографией на колонке с силикагелем (петролейный эфир:этилацетат от 5:1 до 0:1), получая целевой продукт **1-c** (328 г; 544 ммоль, выход: 85,5%; чистота: 96,4%).

15 ¹H-ЯМР: (400 МГц, CDCl₃) δ 7.44-7.29 (m, 5H), 5.83 (d, J = 8,8 Гц, 1H), 5.40-5.23 (m, 2H), 5.18-5.06 (m, 2H), 4.86 (s, 1H), 4.66 (d, J = 8,4 Гц, 1H), 4.21-4.07 (m, 2H), 4.04-3.77 (m, 3H), 3.51-3.45 (m, 1H), 3.31-3.11 (m, 2H), 2.18 (d, J = 2,0 Гц, 1H), 2.14 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.03-1.99 (m, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.64-1.46 (m, 4H), 1.43-1.29 (m, 4H).

MS, C₂₈H₄₀N₂O¹¹; обнаружено: M⁺ 581,3.

Стадия 2

20 Соединение, полученное на стадии 1, разделяли на 2 порции для осуществления параллельных реакций, каждую из которых проводили так, как приведено ниже: соединение **1-c** (72,0 г; 124 ммоль) добавляли к 432 мл THF. В

атмосфере аргона добавляли Pd/C (20,0 г; чистотой 10%) и затем добавляли трифторуксусную кислоту (TFA; 14,1 г; 124 ммоль; 9,18 мл). В реакционный раствор вводили газообразный водород и давление газа поддерживали при 30 ф/кв. дюйм (208 кПа). Реакционный раствор нагревали до 30°C и перемешивали в течение 16 ч.

5 После завершения реакции реакционные смеси с этих двух параллельных реакций объединяли и фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток разбавляли дихлорметаном и концентрировали при пониженном давлении; этот процесс повторяли три раза. Остаток сушили при пониженном давлении, получая целевое соединение **1-d** (139 г).

10 ^1H -ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 7.85 (d, $J = 9,2$ Гц, 1H), 7.74 (s, 3H), 5.21 (d, $J = 3,6$ Гц, 1H), 4.97 (dd, $J = 2,8; 10,8$ Гц, 1H), 4.48 (d, $J = 8,8$ Гц, 1H), 4.06-3.98 (m, 3H), 3.93-3.82 (m, 1H), 3.73-3.68 (m, 1H), 3.63-3.56 (m, 1H), 3.43-3.38 (m, 1H), 2.82-2.71 (m, 2H), 2.13-2.09 (m, 3H), 2.01-1.97 (m, 3H), 1.91-1.87 (m, 3H), 1.77 (s, 3H), 1.76-1.73 (m, 1H), 1.52-1.44 (m, 4H), 1.28 (s, 4H).

15 Стадия 3

Соединение **1-d** (139 г; 247 ммоль) и соединение **1-e** (75,3 г; 223 ммоль) добавляли к раствору DMF (834 мл) и затем при 0°C добавляли диизопропилэтиламин (DIPEA; 41,6 г; 322 ммоль, 56,1 мл), HOBT (36,8 г; 272 ммоль) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDCI; 52,2 г; 272 ммоль).

20 Реакционную смесь перемешивали при 5°C в течение 16 ч. После завершения реакции реакционную смесь разбавляли дихлорметаном (400 мл) и затем последовательно промывали насыщенным раствором хлорида аммония (1 л), насыщенным раствором NaHCO₃ (1,00 л) и насыщенным соевым раствором. Органическую фазу отделяли, сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и подвергали дистилляции при пониженном давлении для удаления растворителя. Остаток очищали хроматографией на колонке с силикагелем (петролейный эфир:этилацетат от 5:1 до 0:1), получая целевое соединение **1-f** (108 г; выход: 56,8%).

30 ^1H -ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 7.89-7.78 (m, 2H), 7.41-7.27 (m, 6H), 5.21 (d, $J = 3,2$ Гц, 1H), 5.08-4.92 (m, 3H), 4.48 (d, $J = 8,4$ Гц, 1H), 4.07-3.99 (m, 3H), 3.97-3.81 (m, 2H), 3.75-3.64 (m, 1H), 3.42-3.37 (m, 1H), 3.13-2.93 (m, 2H), 2.20 (t, $J = 8,0$ Гц, 2H), 2.10 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.89 (s, 3H), 1.87-1.79 (m, 1H), 1.76 (s, 3H), 1.74-1.64 (m, 1H), 1.48-1.41 (m, 2H), 1.38 (s, 12H), 1.29-1.20 (m, 4H), 1.19-1.14 (m, 1H).

MS, C₃₇H₅₅N₃O₁₄; обнаружено: M⁺ 766,4.

35 Стадия 4

Полученное выше соединение **1-f** разделяли на две порции для проведения

параллельных реакций, каждую из которых осуществляли так, как приведено ниже: соединение **6** (47,0 г; 61,3 ммоль) добавляли к 280 мл THF. В атмосфере аргона добавляли Pd/C (15,0 г; чистотой 10%) и затем добавляли TFA (7,00 г; 61,3 ммоль; 4,54 мл). В реакционный раствор вводили газообразный водород и давление газа поддерживали при 30 ф/кв. дюйм (208 кПа). Реакционный раствор нагревали до 30°C и перемешивали в течение 16 ч. После завершения реакции реакционные смеси с этих двух параллельных реакций объединяли и фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток разбавляли дихлорметаном и концентрировали при пониженном давлении; этот процесс повторяли три раза. Остаток сушили при пониженном давлении, получая целевое соединение **1-g** (94,0 г; неочищенный продукт).

^1H -ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 8.38 (s, 1H), 8.10 (s, 3H), 7.83 (d, $J = 9,2$ Гц, 1H), 5.21 (d, $J = 3,2$ Гц, 1H), 4.96 (dd, $J = 3,6; 11,2$ Гц, 1H), 4.47 (d, $J = 8,4$ Гц, 1H), 4.06-3.98 (m, 3H), 3.92-3.82 (m, 1H), 3.75-3.67 (m, 2H), 3.60 (s, 1H), 3.43-3.37 (m, 1H), 3.18-3.04 (m, 2H), 2.30-2.24 (m, 2H), 2.10 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.95-1.90 (m, 2H), 1.89 (s, 3H), 1.78-1.75 (m, 3H), 1.49-1.41 (m, 3H), 1.40 (s, 9H), 1.26 (s, 4H).

Стадия 5

Полученное выше соединение **1-f** разделяли на две порции для проведения параллельных реакций, каждую из которых осуществляли так, как приведено ниже: соединение **1-f** (46,0 г; 60 ммоль) добавляли к раствору HCl-EtOAc (2,00 M, 276 мл) и реакционную смесь перемешивали при 5°C в течение 16 ч. После завершения реакции реакционные растворы с этих двух реакций объединяли и концентрировали посредством дистилляции при пониженном давлении. Остаток разбавляли дихлорметаном и концентрировали при пониженном давлении; этот процесс повторяли три раза. Остаток сушили при пониженном давлении, получая целевое соединение **1-h** (91,0 г; неочищенный продукт).

^1H -ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 7.91-7.80 (m, 2H), 7.42-7.26 (m, 6H), 5.21 (d, $J = 3,2$ Гц, 1H), 5.07-4.92 (m, 4H), 4.48 (d, $J = 8,4$ Гц, 1H), 4.06-3.98 (m, 3H), 3.98-3.82 (m, 3H), 3.73-3.65 (m, 1H), 3.44-3.35 (m, 1H), 3.12-2.94 (m, 2H), 2.22 (t, $J = 8,0$ Гц, 2H), 2.10 (s, 3H), 2.01-1.97 (m, 4H), 1.94-1.90 (m, 1H), 1.89 (s, 3H), 1.87-1.79 (m, 2H), 1.76 (s, 3H), 1.74-1.67 (m, 1H), 1.49-1.40 (m, 2H), 1.40-1.32 (m, 2H), 1.24 (d, $J = 4,0$ Гц, 4H), 1.19-1.13 (m, 1H).

MS, $\text{C}_{33}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_{14}$; обнаружено: M^+ 710,3.

Стадия 6

Проводили две параллельные реакции, каждую из которых осуществляли так, как приведено ниже: к 270 мл DMF добавляли соединение **1-g** (45,0 г;

60,3 ммоль) и соединение **1-h** (38,5 г; 54,3 ммоль). Затем при 0°C добавляли DIPEA (10,1 г; 78,4 ммоль; 13,6 мл) и далее добавляли HOBT (8,97 г; 66,3 ммоль) и EDCI (12,7 г; 66,3 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 5°C в течение 16 ч. После завершения реакции реакционные растворы с этих двух реакций
5 объединяли, разбавляли 300 мл DCM и последовательно промывали насыщенным раствором хлорида аммония (800 мл), насыщенным раствором NaHCO₃ (800 мл) и насыщенным соевым раствором (800 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na₂SO₄. После фильтрования фильтрат концентрировали путем упаривания при повышенном давлении. Остаток очищали хроматографией на колонке с силикагелем (петролейный эфир:этилацетат от 5:1 до 0:1), получая целевое соединение **1-i** (66,0 г; 47,4 ммоль; выход: 39,3%; чистота 95,1%).

¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 7.96-7.78 (m, 5H), 7.41-7.25 (m, 6H), 5.21 (d, *J* = 3,6 Гц, 2H), 5.05-4.92 (m, 4H), 4.48 (d, *J* = 8,8 Гц, 2H), 4.22-4.12 (m, 1H), 4.02 (s, 6H), 3.94-3.80 (m, 3H), 3.74-3.64 (m, 2H), 3.45-3.35 (m, 2H), 3.11-2.92 (m, 4H), 2.20-2.12 (m,
15 4H), 2.10 (s, 6H), 1.99 (s, 6H), 1.89 (s, 6H), 1.82-1.79 (m, 2H), 1.76 (s, 6H), 1.74-1.63 (m, 2H), 1.44 (d, *J* = 6,0 Гц, 4H), 1.37 (s, 12H), 1.24 (s, 9H).

MS: C₆₂H₉₄N₆O₂₅; обнаружено: *m/z* 1323,8.

Стадия 7

Для проведения этой стадии выполняли 11 реакций, каждую из которых
20 осуществляли так, как приведено ниже: добавляли соединение **1-i** (5,00 г; 3,78 ммоль) и толуол (300 мл) и добавляли силикагель (45,0 г). Смесь перемешивали при 100°C в течение 40 ч. После завершения реакции реакционные смеси с этих 11 реакций объединяли и подвергали дистилляции при пониженном давлении для удаления растворителя. К остатку добавляли изопропанол и
25 дихлорметан и смесь перемешивали в течение 20 мин. Нерастворенное вещество удаляли фильтрованием и осадок на фильтре промывали изопропанолом до тех пор, пока продукт не растворялся в изопропаноле. Полученный раствор концентрировали для удаления растворителя и остаток сушили при пониженном давлении, получая целевое соединение **1-j** (43,2 г; 34,0 ммоль, выход: 82,0%).

¹H-ЯМР: (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 8.01 (d, *J* = 7,6 Гц, 1H), 7.93-7.79 (m, 2H), 7.39-7.27 (m, 3H), 5.21 (d, *J* = 3,2 Гц, 1H), 5.06-4.91 (m, 2H), 4.48 (d, *J* = 8,0 Гц, 1H), 4.07-3.97 (m, 3H), 3.94-3.82 (m, 2H), 3.73-3.65 (m, 1H), 3.45-3.36 (m, 2H), 3.10-2.94 (m, 2H), 2.15 (d, *J* = 7,6 Гц, 2H), 2.10 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.89 (s, 3H), 1.86-1.79 (m, 1H), 1.77 (s, 3H), 1.74-1.65 (m, 1H), 1.44 (s, 2H), 1.37 (d, *J* = 5,2 Гц, 2H), 1.24 (s, 4H).

35 MS: C₅₈H₈₆N₆O₂₅; обнаружено: *m/z* = 1267,8.

Стадия 8

Для проведения этой стадии выполняли две параллельные реакции, каждую из которых осуществляли так, как приведено ниже: к 70 мл DMF добавляли соединение 1-d (11,8 г; 21,0 ммоль) и соединение 1-j (21,3 г; 16,8 ммоль). Затем добавляли DIPEA (3,54 г; 27,3 ммоль; 4,77 мл) при 0°C и далее добавляли HOBT (3,13 г; 23,1 ммоль) и EDCI (4,44 г; 23,1 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 5°C в течение 16 ч. После завершения реакции реакционные растворы с этих двух реакций объединяли, разбавляли 500 мл DCM и последовательно промывали насыщенным раствором хлорида аммония (1,5 л), насыщенным раствором NaHCO₃ (1,5 мл) и насыщенным соевым раствором (1,5 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na₂SO₄. После фильтрования фильтрат концентрировали путем упаривания при повышенном давлении. Остаток очищали хроматографией на колонке с силикагелем (дихлорметан:метанол от 50:1 до 10:1), получая целевое соединение 1-k (54,0 г; 31,8 ммоль; выход: 75,6%).

¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 7.91 (d, J = 7,6 Гц, 1H), 7.87-7.78 (m, 5H), 7.73 (t, J = 5,2 Гц, 1H), 7.42-7.24 (m, 6H), 5.21 (d, J = 3,6 Гц, 3H), 5.06-4.92 (m, 5H), 4.48 (d, J = 8,4 Гц, 3H), 4.19-4.09 (m, 2H), 4.07-3.97 (m, 10H), 3.94-3.80 (m, 4H), 3.76-3.64 (m, 3H), 3.42-3.37 (m, 4H), 3.08-2.94 (m, 6H), 2.20-2.12 (m, 2H), 2.10 (s, 9H), 2.08-2.01 (m, 2H), 1.99 (s, 9H), 1.89 (s, 9H), 1.87-1.79 (m, 2H), 1.77 (s, 9H), 1.74-1.63 (m, 2H), 1.44 (d, J = 5,6 Гц, 6H), 1.40-1.31 (m, 6H), 1.24 (s, 13H).

MS: C₇₈H₁₁₈N₈O₃₃; обнаружено: m/z = 1696,1.

Стадия 9

Для проведения этой стадии выполняли 3 параллельные реакции, каждую из которых осуществляли так, как приведено ниже: добавляли соединение 1-k (17,0 г; 10,0 ммоль) и THF (100 мл). В атмосфере аргона добавляли Pd/C (5,0 г; чистотой 10%) и затем добавляли TFA (1,14 г; 10,0 ммоль; 742 мкл). В реакционный раствор вводили газообразный водород и давление газа поддерживали на уровне 15 ф/кв. дюйм (104 кПа). Реакционный раствор нагревали до 30°C и перемешивали в течение 4 ч. После завершения реакции реакционные смеси с этих 3 параллельных реакций объединяли и фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток разбавляли дихлорметаном и концентрировали при пониженном давлении; этот процесс повторяли три раза. Остаток очищали препаративной жидкостной хроматографией (C18, подвижная фаза А: 0,1% TFA в воде, подвижная фаза В: 10-40% CAN, 20 мин), получая целевое соединение 1-l (17,3 г; 10,2 ммоль; выход: 34,0%).

¹H-ЯМР: (400 МГц, DMSO-d₆) δ 8.45 (t, J = 5,2 Гц, 1H), 8.14 (d, J = 5,2 Гц, 3H),

7.97 (t, $J = 5,2$ Гц, 1H), 7.90-7.77 (m, 4H), 5.21 (d, $J = 2,8$ Гц, 3H), 4.96 (dd, $J = 3,2; 11,6$ Гц, 3H), 4.47 (d, $J = 8,4$ Гц, 3H), 4.20-4.10 (m, 1H), 4.02 (s, 8H), 3.87 (q, $J = 9,6$ Гц, 3H), 3.75-3.61 (m, 4H), 3.46-3.34 (m, 3H), 3.21-2.93 (m, 6H), 2.21 (s, 2H), 2.14-2.02 (m, 11H), 1.99 (s, 9H), 1.96-1.82 (m, 12H), 1.80-1.65 (m, 10H), 1.44 (d, $J = 5,6$ Гц, 8H), 1.36 (d, $J = 6,4$ Гц, 4H), 1.30-1.17 (m, 12H).

MS: $C_{70}H_{112}N_8O_{31}$; обнаружено: $m/z = 781,8$.

Стадия 10

Соединение **1-m** (2 г; 12,64 ммоль) растворяли в пиридине (10 мл). По каплям при комнатной температуре добавляли раствор DMTrCl (4,71 г; 13,90 ммоль) в пиридине (10 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч. После завершения реакции реакционную смесь гасили метанолом и концентрировали при пониженном давлении, получая неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали, используя силикагель (элюирование смесью 10:1 петролейный эфир:этилацетат). Содержащий продукт элюат собирали и концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, получая соединение **1-n** (4 г).

MS m/z : $C_{29}H_{32}O_5$, $[M+H]^+$ обнаружено: 461,3.

Стадия 11

Соединение **1-n** (2 г; 4,34 ммоль), *N,N*-диизопропилэтиламин (DIEA; 1,43 мл; 8,68 ммоль) и NATU (2,47 г; 6,51 ммоль) растворяли в DMF (10 мл). При комнатной температуре добавляли раствор соединения **1-o** в DMF (5 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 8 ч. После завершения реакции добавляли воду для гашения реакции. Водную фазу экстрагировали этилацетатом. Органические фазы объединяли, промывали сначала водой, затем насыщенным солевым раствором (20 мл), затем концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя. Остаток очищали препаративной обращенно-фазовой HPLC (колонка: Boston Green ODS, 150 × 30 мм × 5 мкм; условия: 25-80% (A: вода, 0,075% $NH_3 \cdot H_2O$, B: CH_3CN); скорость потока: 55 мл/мин) и лиофилизировали, получая соединение **1-p** (2,4 г).

MS m/z : $C_{33}H_{39}NO_7$, $[M+H]^+$ обнаружено: 562,4.

Стадия 12

Соединение **1-p** (2,4 г; 4,27 ммоль) растворяли в 15 мл раствора смеси метанола и воды (2:1). При комнатной температуре добавляли LiOH (0,36 г; 8,54 ммоль). Смесью перемешивали в течение ночи. После завершения реакции смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя. Остаток очищали препаративной обращенно-фазовой HPLC (колонка: Boston Green

ODS, 150 × 30 мм × 5 мкм; условия: 25-75% (А: вода, 0,075% NH₃·H₂O, В: CH₃CN); скорость потока: 55 мл/мин) и лиофилизировали, получая соединение **1-q** (2 г).

MS m/z: C₃₂H₃₇NO₇, [M+H]⁺ обнаружено: 548,6.

Стадия 13

5 Соединение **1-q** (0,37 г; 0,69 ммоль), DIEA (0,19 мл; 1,15 ммоль) и HATU (0,32 г; 0,86 ммоль) растворяли в 2 мл DMF. Добавляли раствор соединения **1-l** (0,9 г; 0,69 ммоль) в DMF (2 мл) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. После завершения реакции
10 реакционную смесь разбавляли дихлорметаном (10 мл) и последовательно промывали насыщенным раствором NaHCO₃ (20 мл) и насыщенным соевым раствором (20 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и затем концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали препаративной обращенно-фазовой HPLC (колонка: Boston Green ODS, 150 × 30 мм × 5 мкм; условия: 25-65% (А: вода, 0,075% NH₃·H₂O, В: CH₃CN); скорость
15 потока: 45 мл/мин) и лиофилизировали, получая соединение **1-r** (0,5 г).

MS m/z: C₁₀₂H₁₄₇N₉O₃₇, [M-H]⁺ обнаружено: 2088,5.

Стадия 14

Соединение **1-r** (300 мг; 0,14 ммоль) и янтарный ангидрид (28,70 мг; 0,28 ммоль) растворяли в тетрагидрофуране. К реакционному раствору добавляли
20 DMAP (3,50 мг; 0,028 ммоль) и смесь перемешивали при 40°C в течение ночи. После завершения реакции добавляли метанол (18,8 мг). Реакционную смесь перемешивали в течение 10 мин, затем разбавляли дихлорметаном (3 мл) и дважды промывали насыщенным раствором NaHCO₃ (5 мл). Органическую фазу концентрировали досуха при пониженном давлении и очищали препаративной
25 обращенно-фазовой HPLC (колонка: Boston Green ODS, 150 × 30 мм × 5 мкм; условия: 25-65% (А: вода, 0,075% NH₃·H₂O, В: CH₃CN); скорость потока: 35 мл/мин) и лиофилизировали, получая соединение **1-s** (140 мг).

MS m/z: C₁₀₆H₁₅₁N₉O₄₀, [M-H]⁺ обнаружено: 2189,4.

Стадия 15

30 Соединение **1-r** (140 мг; 64 мкмоль), полученное на предыдущей стадии, добавляли к ацетонитрилу (5 мл). Затем добавляли HBTU (48,7 мг; 128 мкмоль), добавляли твердофазный носитель, модифицированный аминогруппами на поверхности (CPG-NH₂; 2,3 г), и добавляли DIEA (41,5 мг; 320 мкмоль; 55 мкл). Смесь оставляли взаимодействовать со встряхиванием при 30°C в течение 16 ч.
35 После завершения реакции смесь фильтровали и последовательно промывали метанолом (8 мл × 4) и дихлорметаном (8 мл × 4). Это твердое вещество добавляли

к смеси пиридин:уксусный ангидрид (об.:об. = 4:1; 10,0 мл) и смесь оставляли взаимодействовать со встряхиванием при 30°C в течение еще 16 ч. После завершения реакции смесь фильтровали и последовательно промывали метанолом (8 мл × 4) и дихлорметаном (8 мл × 4), получая соединение 1-t, связанное с

5 твердофазным носителем (2,1 г).

2. Синтез образцов дцРНК

Представленные в Таблице 23 образцы дцРНК синтезировали, используя фосфорамидитный метод твердофазного синтеза.

3. Тестирование

10 В этом эксперименте исследовали эффективность образцов дцРНК по настоящему изобретению, имеющих 2'-фтор-модификации в разных сайтах, на предмет ингибирования уровня экспрессии мРНК целевого гена *in vivo*. Самцов

мышей C57BL/6 в возрасте 6-8 недель случайным образом подразделяли на группы по 6 особей, из расчета по 3 мыши на одну временную точку. Этим группам мышей

15 вводили тестируемые образцы (2 образца - TRD007047 и TRD006870), контрольный образец (TRD002218) и PBS. Всем животным вводили однократную дозу подкожной инъекцией с учетом массы их тела. Образцы дцРНК вводили в дозе 1 мг/кг (рассчитанной с учетом миРНК без лиганда), при этом объем составлял 5 мл/кг. Мышей умерщвляли через 7 суток после введения, отбирали у них печень и

20 хранили, используя реагент RNeasy (Sigma-Aldrich). Затем печеночную ткань гомогенизировали, используя гомогенизатор для тканей, и из печеночной ткани экстрагировали общую РНК с использованием набора для экстракции РНК из тканей (FireGen Biomedicals, FG0412), следуя методике, описанной в инструкциях. Общую РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК и измеряли уровень

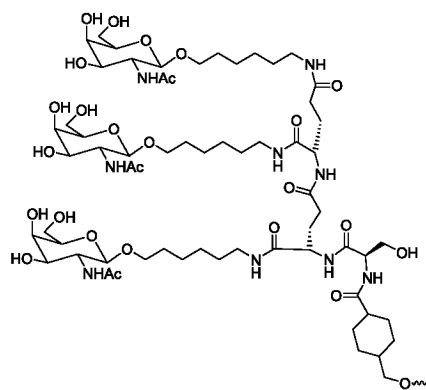
25 экспрессии мРНК TTR в печеночной ткани посредством количественной флуоресцентной ПЦР в режиме реального времени. В методе количественной флуоресцентной ПЦР в качестве внутреннего стандарта использовали ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) и уровни экспрессии мРНК TTR и GAPDH измеряли, используя зонд-праймеры типа Taqman для TTR и GAPDH,

30 соответственно. Данные по соединениям показаны в Таблице 23, по группам, получающим соединения для эксперимента *in vivo* на мышах, показаны в Таблице 24, а праймеры были аналогичны показанным в Таблице 11.

Таблица 23. Соединения с модификациями в положениях 9 и 10 AS-цепи

	SEQ ID	SS-цепь	SEQ ID	AS-цепь
--	--------	---------	--------	---------

	NO		NO	
TRD002218	47	CmsAmsGmUmGfUmUf CfUfUmGmCmUmCmU mAmUmAmAm-L96	48	UmsUfsAmUmAmGfAmG mCmAmAmGmAmAfCm AfCmUmGmsUmsUm
TRD007047	49	CmsAmsGmUmGfUmUf CfUfUmGmCmUmCmU mAmUmAmsAms-NAG1	50	UmsUfsAmUfAmGf(-)hm hmpNA(A) GmCfAmAmGfAm AfCmAfCmUfGmsUmsUm
TRD006870	51	CmsAmsGmUmGfUmUf CfUfUmGmCmUmCmU mAmUmAmsAms-NAG1	52	UmsUfsAmUfAmGf(-)hm hmpNA(A) GmCmAfAmGfAm AfCmAfCmUfGmsUmsUm



Структура NAG1 представляет собой

Таблица 24. Группы, получающие соединения для эксперимента *in vivo* на мышах

№ соединения	Доза	Количественное определение мРНК на	Количество животных	Примечание
PBS	-	7-е, 28-е сут	6	3 мыши на одну временную точку
TRD002218	1 мг/кг, п.к.	7-е, 28-е сут	6	3 мыши на одну временную точку
TRD007047	1 мг/кг, п.к.	7-е, 28-е сут	6	3 мыши на одну временную точку
TRD006870	1 мг/кг, п.к.	7-е, 28-е сут	6	3 мыши на одну временную точку

5

Эффективность дцРНК по настоящему изобретению, имеющих модификации 2'-фтор- в разных сайтах, на предмет ингибирования уровня экспрессии мРНК

целевого гена *in vivo* через 28 суток после введения показана в Таблице 25. Через 28 суток после введения образцы дцРНК, имеющие модификации 2'-фтор- в разных сайтах, в большей степени ингибировали экспрессию мРНК TTR, чем референсное соединение TRD002218, применяемое в качестве положительного контроля. Для

5 обоих способов модификации были показаны высокая эффективность ингибирования и незначительные различия в ингибирующих эффектах, и это указывает на то, что оба способа модификации могут опосредовать более высокую эффективность ингибирования.

10 Таблица 25. Результаты тестирования через 7 суток и 28 суток

9/10F	№ соединения	7 суток		28 суток	
		Уровень остаточной экспрессии мРНК	SD	Уровень остаточной экспрессии мРНК	SD
	PBS	100%	11%	100%	9%
PC	TRD002218	31%	7%	49%	5%
mTTR 9F	TRD007047	15%	5%	39%	10%
mTTR 10F	TRD006870	13%	4%	36%	3%

SD означает стандартное отклонение.

PC означает соединение в качестве положительного контроля.

15 Уровень экспрессии мРНК TTR рассчитывали согласно приведенному ниже уравнению.

Уровень экспрессии мРНК TTR = [(уровень экспрессии мРНК TTR в тестируемой группе/уровень экспрессии мРНК GAPDH в тестируемой группе)/(уровень экспрессии мРНК TTR в контрольной группе/уровень экспрессии мРНК GAPDH в контрольной группе)] × 100%.

20

Пример 13. Оценка анти-HBV активности *in vitro* образцов дцРНК с использованием клеток РНН (первичных гепатоцитов человека) (свободное поглощение)

25 Оценку анти-HBV активности *in vitro* проводили для каждого из TRD007970, TJR100259 и AD81890.

В 0-е сутки сначала, используя PBS, готовили серийные разведения для каждого из образцов дцРНК для получения 7 концентраций (100, 25, 6,25, 1,563,

0,391, 0,098 и 0,024 нМ) и их добавляли в лунки 48-луночного планшета. Замороженные РНН размораживали и высевали в лунки 48-луночного планшета; одновременно при посеве тестируемое соединение свободно поглощалось клетками (свободное поглощение).

5 В 1-е сутки среду заменяли на среду без дцРНК, и добавляли HBV, чтобы инфицировать РНН.

Во 2-е, 4-е и 6-е сутки среду заменяли на свежую порцию среды без дцРНК.

На 8-е сутки собирали супернатант и собранный клеточный супернатант тестировали на предмет HBsAg и HBeAg методом ELISA и на предмет уровней ДНК HBV методом количественной ПЦР (колич. ПЦР). Результаты эксперимента показаны в Таблице 26.

Таблица 26. Противовирусная активность образцов дцРНК в РНН

№ соединения	EC ₅₀ (нМ) для HBsAg	EC ₅₀ (нМ) для HBeAg	EC ₅₀ (нМ) для ДНК HBV
TRD007970	0,90	2,02	1,30
TJR100259	1,29	2,78	1,43
AD81890	2,09	4,84	3,34

15 Результаты показывают, что TRD007970 и TJR100259 обладали лучшей противовирусной активностью в РНН, чем контрольное соединение AD81890.

Пример 14. Эксперимент по устойчивости к экзонуклеазам для оценки стабильности образцов дцРНК

20 Для каждой из “голых” последовательностей миРНК TJR100381 и TJR100382 из TRD007970 и TJR100259 (см. Таблицу 27) проводили оценку на предмет устойчивости к экзонуклеазам. Для проведения этого эксперимента готовили соответствующие реакционные смеси согласно реакционной системе эксперимента, показанной в Таблице 28.

25

Таблица 27. "Голые" последовательности TJR100381 и TJR100382

№ двойной цепи	Смысловая цепь 5'-3'	Антисмысловая цепь 5'-3'
TJR100381	GUGUGCACUUCGCUUCACC (SEQ ID NO: 1)	AGUGAAGCGAAGUGCACACGG (SEQ ID NO: 5)
TJR100382	GUGUGCACUUCGCUUCACC (SEQ ID NO: 1)	IGUGAAGCGAAGUGCACACGG (SEQ ID NO: 8)

Таблица 28. Реакционная система для изучения устойчивости к 5'-эксонуклеазе (PDII) (100 мкл)

Реагент	Объем (мкл)
50 мМ раствор ацетата натрия	77
100 мМ раствор MgCl ₂	10
миРНК	5
PDII	8

5

Таблица 29. Реакционная система для изучения устойчивости к 3'-эксонуклеазе (SVPD) (100 мкл)

Реагент	Объем (мкл)
50 мМ раствор Трис-НСl	85
100 мМ раствор MgCl ₂	10
миРНК	5
SVPD	1

Конечная концентрация 5'-эксонуклеазы (PDII, Worthington, кат. № LS003602) составляла 500 ед./мл, а конечная концентрация 3'-эксонуклеазы (SVPD, Worthington, кат. № LS003926) составляла 0,5 ед./мл. После завершения подготовительной работы, в расчете на пять временных точек 0 ч, 1,5 ч, 2 ч, 3 ч и 4 ч, в разные стрипы с 8 пробирками вносили аликвоты (по 16 мкл на одну лунку) реакционной смеси и инкубировали при 37°C. По достижении соответствующих моментов времени реакционную смесь сразу же извлекали и добавляли загрузочный буфер, содержащий 9 М мочевины (по 32 мкл на одну лунку). Смесь помещали в холодильник при -80°C для дальнейшего использования. После этого проводили электрофорез на 20%-ном (7 М мочевины) геле для электрофореза в полиакриламидном геле (PAGE). После завершения электрофореза гель погружали в гелевый краситель, окрашивали в течение 10 мин на шейкере, просматривали с

20

использованием системы визуализации геля (УФ при 312 нм) и фотографировали. Результаты эксперимента показаны на ФИГ. 3 (результаты гель-электрофореза), ФИГ. 4 (результаты количественного определения 5'-эксонуклеазы) и ФИГ. 5 (результаты количественного определения 3'-эксонуклеазы), которые указывают на то, что стабильность TJR100382 оказывалась значительно выше таковой у TJR100381.

Пример 15. Анализ метаболической стабильности в фракции S9 печени

Для каждого соединения TRD007970, TJR100259 и AD81890 проводили анализ на предмет метаболической стабильности дцРНК во фракции S9 печени яванского макака (S9, печень яванского макака, самца, поставщик: Xenotech, № партии 1510192). Методика эксперимента приведена ниже.

1. Готовили восемь 96-луночных планшетов для образцов, обозначенных как T0, T60, T120, T240, T360, T1440, T2880 и “холостой опыт”, соответственно.

2. В лунки каждого планшета добавляли суспензию S9 (или “холостой” буфер) из расчета 190 мкл/лунка, затем инкубировали при 37°C в течение примерно 10 мин.

3. За исключением лунок с субстратом в каждую лунку каждого планшета (T0, T60, T120, T240, T360, T1440 и T2880) добавляли по 10 мкл образца или “холостого” буфера.

4. За исключением момента времени T0 образцы TRD007970, TJR100259 и AD81890 в каждый момент времени (60, 120, 240, 360, 1440 и 2880 мин) инкубировали в водяной бане при 37°C.

5. По окончании каждого промежутка времени добавляли по 200 мкл смеси (100 мМ NH₄Ac при pH 10,0; 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) и внутреннего стандарта в воде в концентрации 750 нг/мл) и смесь встряхивали на вихревом смесителе в течение 60 с.

6. В каждую лунку добавляли по 200 мкл реагента PCI (фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (25:24:1)) и 400 мкл дихлорметана, смесь встряхивали на вихревом смесителе в течение 10 мин и затем центрифугировали (4°C, 3220 g, 20 мин), получая супернатант.

7. Супернатант переносили в новый планшет и хранили при 4°C до LC-MS анализа.

8. Процентную долю оставшихся одиночных цепей у AS- и SS-цепей тестировали по отдельности, чтобы охарактеризовать остаточное содержание TRD007970, TJR100259 и AD81890.

9. Расчет проводили, используя приведенные ниже формулы.

Остаточное содержание в % = (соотношение площадей пиков от аналита и внутреннего стандарта для каждой временной точки/соотношение площадей пиков от аналита и внутреннего стандарта в момент времени T0) × 100%;

5 C_t (концентрация в момент времени t) = C_0 (концентрация в момент времени 0) × $e^{-k_e \times t}$;

$T_{1/2}$ (период полувыведения) = $\ln 2/k_e = 0,693/k_e Cl_{int}$ (S9) = $0,693/in vitro T_{1/2} \times 1/(mg \text{ белка в S9/мл в реакционной системе})$, при этом k_e означает константу скорости выведения, Cl_{int} означает собственный клиренс;

10 Cl_{int} (печень) = Cl_{int} (S9) × (mg S9)/г печени × г печени/(кг массы тела).

Результаты эксперимента показаны в Таблице 30, и они указывают на то, что через 48 ч инкубирования с S9 печени яванского макака в TJR100259 оставалось 93,8% антисмысловой цепи, в AD81890 оставалось 70,2% антисмысловой цепи, а в TRD007970 оставалось 61,0% антисмысловой цепи. Эти данные показывают, что
15 через 48 ч инкубирования с S9 печени яванского макака антисмысловая цепь в TJR100259 оказывалась более стабильной, чем антисмысловая цепь в AD81890 и антисмысловая цепь в TRD007970.

Через 48 ч инкубирования с S9 печени яванского макака в TJR100259 оставалось 21,0% смысловой цепи, в AD81890 оставалось 12,2% смысловой цепи, а
20 в TRD007970 оставалось 8,9% смысловой цепи. Эти данные показывают, что через 48 ч инкубирования с S9 печени яванского макака смысловая цепь в TJR100259 оказывалась более стабильной, чем смысловая цепь в AD81890 и смысловая цепь в TRD007970.

25 Степень сохранения одноцепочечных образцов может отражать стабильность дцПНК; чем выше, тем лучше стабильность. Таким образом, соединение TJR100259 оказывалось более стабильным, чем AD81890 и TRD007970, в условиях эксперимента по метаболической стабильности с использованием S9 печени яванского макака.

Таблица 30. Анализ метаболической стабильности в S9 печени яванского макака

Результаты тестирования	S9 печени яванского макака			
	T _{1/2} (мин)	CL _{int} (S9) (мкл/мин/мг белка)	CL _{int} (печень) (мл/мин/кг)	Остаточное содержание (T = 2880 мин)
Антисмысловая цепь в TJR100259	>8944	<0,015	<0,05	93,8%
Смысловая цепь в TJR100259	1285,8	0,108	0,39	21,0%
Антисмысловая цепь в AD81890	6423,8	0,022	0,08	70,2%
Смысловая цепь в AD81890	952,5	0,146	0,53	12,2%
Антисмысловая цепь в TRD007970	3853,0	0,036	0,13	61,0%
Смысловая цепь в TRD007970	838,4	0,165	0,60	8,9%

Пример 16. Эксперимент по распределению в тканях

5 Для соединений TRD007970, TJR100410 и TJR100259 проводили эксперимент по распределению в тканях. Методика эксперимента приведена ниже.

72 самца мышей C56BL/6J (7-8 недель, Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd., Пекин) проходили акклиматизацию в течение примерно 1 недели и затем их подразделяли на 3 группы по 24 особи. Все соединения 10 TRD007970, TJR100259 и TJR100410 вводили в дозе 10 мг/кг и образцы собирали через 0,5 ч, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 8 ч, 24 ч, 72 ч и 168 ч (n = 3) после введения. После эвтаназии мышей собирали кровь из сердца и отбирали левую почку и как можно большую долю с левой стороны печени. Отобранные органы промывали 15 нормальным физиологическим раствором. Проводили предварительную обработку образцов печени и почек и анализировали на предмет концентраций AS-цепей в

печени и почке, используя масс-спектрометрию высокого разрешения, чтобы охарактеризовать концентрации TRD007970, TJR100259 и TJR100410.

Результаты эксперимента показаны в Таблице 31. Эти результаты показывают, что в эксперименте по распределению в тканях у мышей C56BL/6J, соотношение содержания антисмысловых цепей в печени и почке в случаях TRD007970, TJR100259 и TJR100410 составляло 9,44, 29,38 и 3,49, соответственно. Высокое значение соотношения содержания в печени и почке предполагает более высокую концентрацию в целевом органе (печени) и более низкую концентрацию в нецелевом органе (почке). Таким образом, в одной и той же дозе соединение TJR100259 демонстрировало более высокое соотношение содержания в печени и почке по сравнению с TRD007970, а TRD007970 демонстрировало более высокое соотношение содержания в печени и почке по сравнению с TJR100410, и это позволяет предположить, что риск токсического воздействия на почки в случае TJR100259 ниже, чем риск в случае TRD007970, а риск токсического воздействия на почки в случае TRD007970 ниже, чем риск в случае TJR100410.

Таблица 31. Результаты распределения в тканях

<u>Соотношение содержания</u> антисмысловых цепей	TRD007970, 10 мг/кг	TJR100259, 10 мг/кг	TJR100410, 10 мг/кг
AUC _{печень} /AUC _{почка}	9,44	29,38	3,49

AUC означает площадь под кривой.

20 **Пример 17. Стабильность в гомогенате печени**

Для TJR100410 и TJR100259 проводили анализ по стабильности в гомогенате печени. Методика эксперимента приведена ниже.

1. Гомогенат печени яванского макака (предоставленный исследовательским подразделением WuXi AppTec Co. Ltd.) добавляли в планшет из расчета 190 мкл/лунка, используя систему Apricot, и планшет инкубировали при 37°C в течение примерно 30 мин.

2. За исключением лунок с субстратом в каждую лунку каждого планшета (T0, T1, T2, T4, T6, T24 и T48, Таблица 32) добавляли по 10 мкл раствора дцРНК или буферного раствора в качестве контроля и начинали отсчет времени.

30

Таблица 32. Временные точки

Временная точка	Начальный момент времени	Конечный момент времени
“Холостая проба”	48 ч	0 ч
T48	48 ч	0 ч
T24	24 ч	0 ч
T6	6 ч	0 ч
T4	4 ч	0 ч
T2	2 ч	0 ч
T1	1 ч	0 ч
T0	Сначала добавляли буфер для лизиса Clarify OTX, затем раствор соединения	

2.1. Подготовка образцов

(1) В обозначенные лунки добавляли по 200 мкл раствора дцРНК.

5 (2) Добавляли по 1000 мкл буфера для лизиса Clarify OTX.

(3) Смесь встряхивали при 800 об./мин в течение 5 мин.

2.2. Твердофазная экстракция (SPE)

(1) Условия: смесь промывали 600 мкл MeOH, используя планшет для SPE Clarity OTX от Phenomenex (8e-s103-cga).

10 (2) Уравновешивание: смесь промывали 600 мкл уравновешивающего буфера (50 мМ NH₄Ac, с pH 5,5, содержащего 0,0025% тритона X-100 и цистеин в концентрации 0,01 мг/мл), используя планшет для SPE.

(3) Загрузка: образец, приготовленный в 2.1, промывали, используя планшет для SPE.

15 (4) Промывка 1: образец промывали 600 мкл буфера для промывки 1 (25 мМ NH₄Ac с pH 5,5), используя планшет для твердофазной экстракции, и эту стадию повторяли еще раз.

(5) Промывка 2: образец промывали 600 мкл буфера для промывки 2 (25 мМ NH₄Ac, при pH 5,5, с 50% CAN), используя планшет для твердофазной экстракции, и эту стадию повторяли еще раз.

20 (6) Элюирование: образец элюировали, используя 150 мкл элюирующего буфера (100 мМ NH₄HCO₃, 1 мМ трис(2-карбоксиил)фосфин (TCEP) при pH 9,5; содержащего 40% ацетонитрила (ACN) и 10% THF), и эту стадию повторяли.

25 (7) Образец сушили при 45°C, используя испаритель N₂ (в течение примерно 2 ч).

(8) Образец повторно растворяли, используя 70 мкл подвижной фазы А. 51

(9) Перед проведением анализа с применением жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) образец осторожно встряхивали при 800 об./мин в течение 0,5 ч.

5 (10) Расчет проводили, используя следующие формулы:

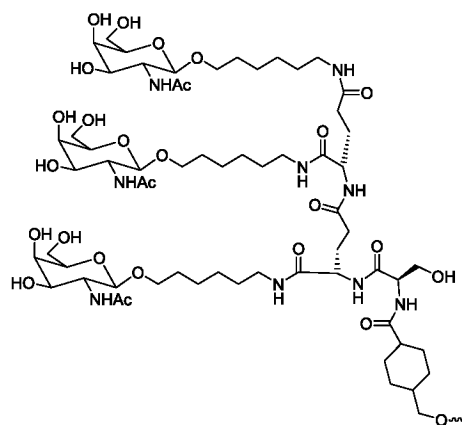
$$C_t = C_0 \times e^{-k_e \times t}; C_t = 1/2C_0; T_{1/2} = \ln 2 / (-k_e) = 0,693 / (-k_e).$$

Соединение TJR100410 представляло собой контрольную дцРНК со смысловой цепью

10 GmsUmsGmUmGmCmAfCfUfUmCmGmCmUmUmCmAmCmCm-NAG1 (SEQ ID NO: 53)

и антисмысловой цепью

AmsGfsUmGfAmAf(-)hmpNA(G)CmGmAfAmGfUmGfCmAfCmAfCmsGmsGm (SEQ ID NO: 54);



структура NAG1 представляет собой:

15 Результаты эксперимента показаны в Таблице 33.

Результаты показывают, что через 48 ч инкубирования с гомогенатом печени яванского макака в TJR100259 оставалось 94,6% антисмысловой цепи, в TJR100410 оставалось 42,7% антисмысловой цепи, в TJR100259 оставалось 18,3% смысловой цепи и в TJR100410 оставалось 4,3% смысловой цепи. Эти данные 20 показывают, что через 48 ч инкубирования с гомогенатом печени яванского макака антисмысловая цепь в TJR100259 оказывалась более стабильной, чем антисмысловая цепь в TJR100410, и смысловая цепь в TJR100259 оказывалась более стабильной, чем смысловая цепь в TJR100410.

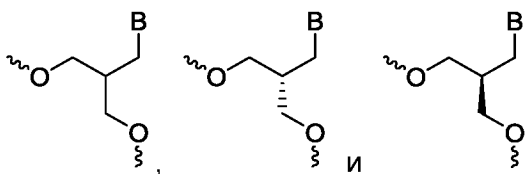
25 Степень сохранения одноцепочечных образцов может отражать стабильность дцРНК; чем выше степень сохранения, тем лучше стабильность. Таким образом, соединение TJR100259 оказывалось более стабильным, чем TJR100410, в условиях эксперимента по стабильности с использованием гамогената печени яванского макака.

Таблица 33. Анализ стабильности в гомогенате печени яванского макака

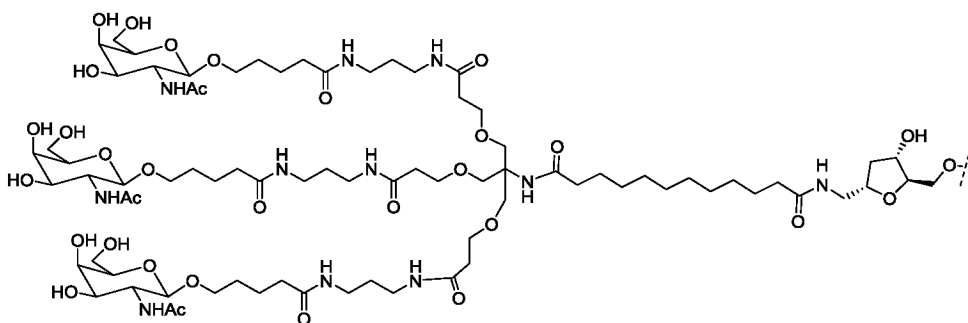
Результаты тестирования	Гомогенат печени яванского макака	
	$T_{1/2}$ (мин)	Остаточное содержание ($T = 48$ ч)
Антисмысловая цепь в TJR100410	35,9	42,7%
Смысловая цепь в TJR100410	11,7	4,3%
Антисмысловая цепь в TJR100259	229,9	94,6%
Смысловая цепь в TJR100259	20,4	18,3%

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Двухцепочечная рибонуклеиновая кислота (дцРНК), содержащая:
 малую интерферирующую РНК (миРНК) и
 5 один или несколько конъюгированных с ней лигандов, при этом
 указанная миРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь;
 указанная антисмысловая цепь содержит химическую модификацию
 формулы (I), ее таутомер или ее фармацевтически приемлемую соль по меньшей
 мере в одном из нуклеотидных положений 2-8 от своего 5'-конца;
 10 химическая модификация формулы (I) выбрана из любой из следующих
 структур:



, где В представляет собой основание;
 лиганд представляет собой такое соединение, которое показано следующей
 структурой, или его фармацевтически приемлемую соль:



15

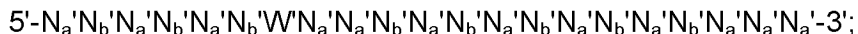
миРНК нацелена на вирус гепатита В.

2. дцРНК по п. 1, отличающаяся тем, что
 смысловая цепь содержит последовательность, отличающуюся не более чем
 на 3 нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1 -
 20 SEQ ID NO: 4, и содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, и/или
 антисмысловая цепь содержит последовательность, отличающуюся не
 более чем на 3 нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID
 NO: 5 - SEQ ID NO: 8, и содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов;
 предпочтительно, смысловая цепь содержит нуклеотидную
 25 последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 4, и/или
 антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность,
 изложенную в любой из SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 8;



где N_a представляет собой 2'-метокси-модифицированный нуклеотид, а N_b представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид.

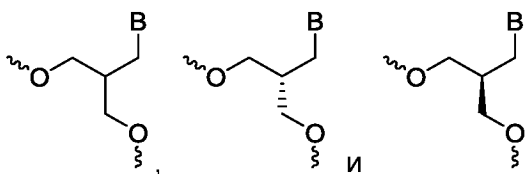
8. дцРНК по любому из п.п. 1-7, отличающаяся тем, что антисмысловая цепь
5 содержит нуклеотидную последовательность представленной ниже формулы:



при этом каждый X' независимо представляет собой N_a' или N_b' , а Y' представляет собой N_a' или N_b' ;

N_a' представляет собой 2'-метокси-модифицированный нуклеотид, а N_b'
10 представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид;

W' представляет собой нуклеотид, содержащий химическую модификацию формулы (I), ее таутомер или ее фармацевтически приемлемую соль, при этом формула (I) выбрана из группы, состоящей из:



15 где B представляет собой такое же основание, как и в том случае, когда нуклеотид в положении 7 от 5'-конца антисмысловой цепи не модифицирован.

9. дцРНК по любому из п.п. 1-8, отличающаяся тем, что

по меньшей мере одна фосфоэфирная группа в смысловой цепи и/или
антисмысловой цепи представляет собой фосфоэфирную группу с
20 модифицирующей группой; предпочтительно, фосфоэфирная группа с модифицирующей группой представляет собой фосфотиоатную дизэфирную группу.

10. дцРНК по п. 9, отличающаяся тем, что

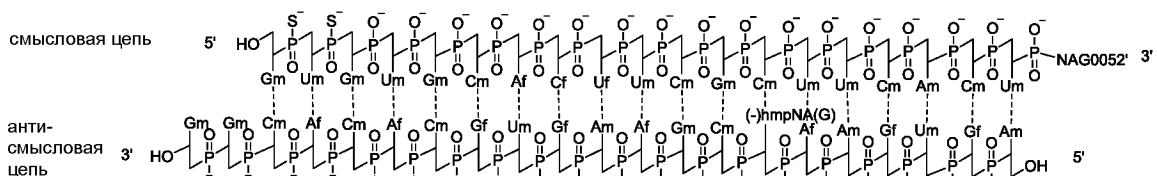
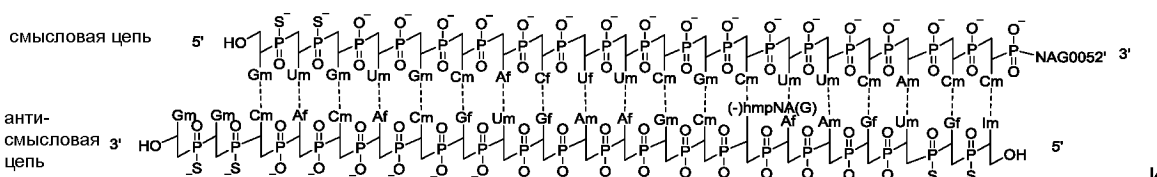
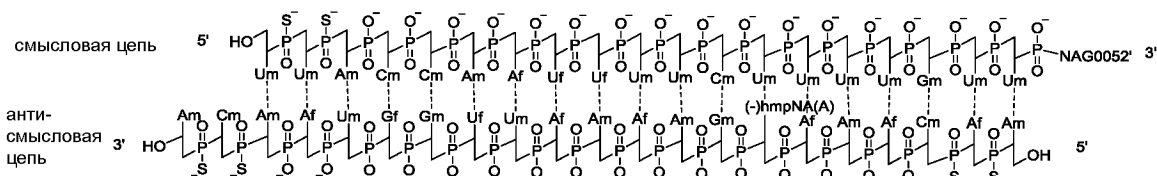
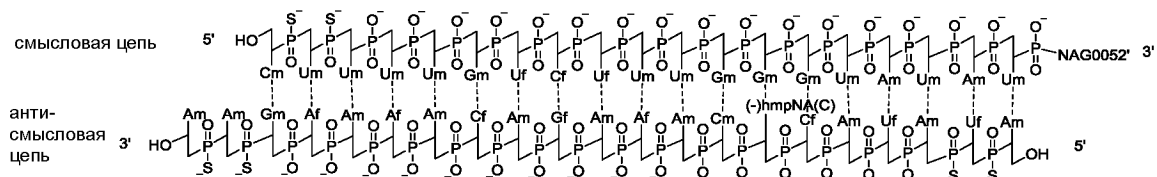
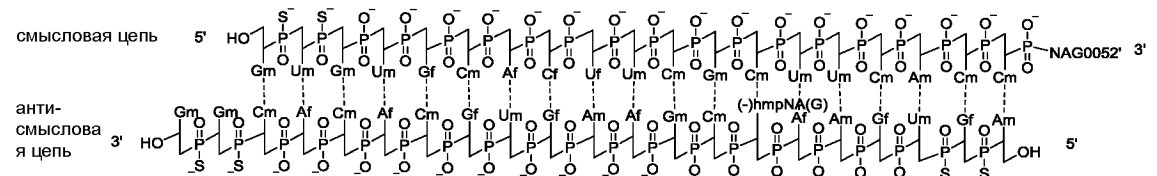
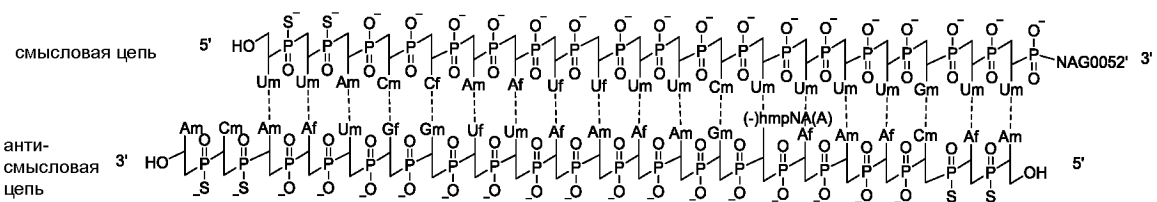
фосфотиоатная дизэфирная группа находится по меньшей мере в одном из
следующих положений:

25 положении между 1-ым и 2-ым нуклеотидами 5'-конца смысловой цепи;
положении между 2-ым и 3-ым нуклеотидами 5'-конца смысловой цепи;
положении между 1-ым и 2-ым нуклеотидами 5'-конца антисмысловой цепи;
положении между 2-ым и 3-ым нуклеотидами 5'-конца антисмысловой цепи;
положении между 1-ым и 2-ым нуклеотидами 3'-конца антисмысловой цепи;

30 и

положении между 2-ым и 3-ым нуклеотидами 3'-конца антисмысловой цепи;
предпочтительно,

смысловая цепь и/или антисмысловая цепь содержат множество



где

Af означает аденин-2'-F-рибонуклеозид; Cf означает цитозин-2'-F-рибонуклеозид; Gf означает гуанин-2'-F-рибонуклеозид; Uf означает урацил-2'-F-рибонуклеозид;

Am означает аденин-2'-ОМе-рибонуклеозид; Cm означает цитозин-2'-ОМе-рибонуклеозид; Gm означает гуанин-2'-ОМе-рибонуклеозид; Um означает урацил-2'-ОМе-рибонуклеозид; Im означает гипоксантин-2'-ОМе-рибонуклеозид;

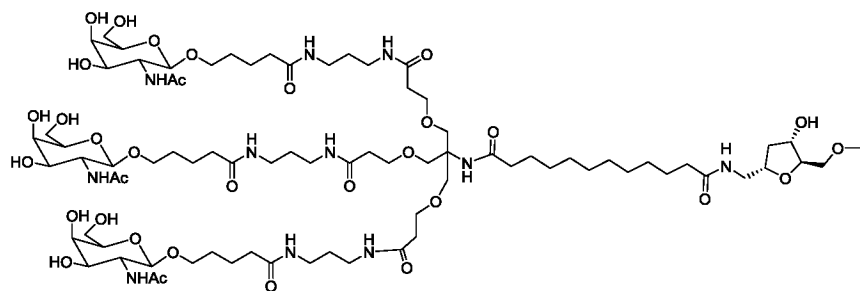
$\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{P} \\ | \\ \text{S}^- \end{matrix}$ представляет собой фосфотиоатную диэфирную группу,

$\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{P} \\ / \\ \text{O} \end{matrix}$ представляет собой фосфодифирную группу,

NAG0052'

представляет

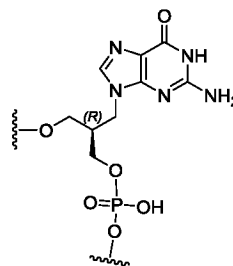
собой



(-)hmpNA(G)

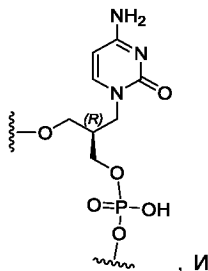
представляет

собой



, (-)hmpNA(C)

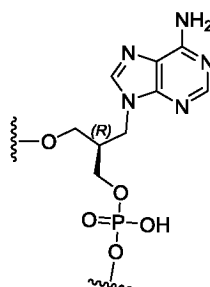
представляет собой



, и

5

(-)hmpNA(A) представляет собой



13. миРНК, содержащая смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечный участок, при этом смысловая цепь и антисмысловая цепь выбраны из любой из следующих цепей:

10 смысловой цепи, содержащей SEQ ID NO: 1, и антисмысловой цепи, содержащей SEQ ID NO: 8; и

смысловой цепи, содержащей SEQ ID NO: 4, и антисмысловой цепи, содержащей SEQ ID NO: 5.

14. дцРНК по любому из п.п. 1-12 или миРНК по п. 13, выбранные из группы, состоящей из таковых синтетического происхождения или полученных *in vitro*.

15

15. Фармацевтическая композиция, содержащая:

дцРНК по любому из п.п. 1-12 и 14 или миРНК по любому из п.п. 13-14; и

возможно один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов.

16. Фармацевтическая композиция по п. 15, дополнительно содержащая дополнительный терапевтический агент.

17. Применение дцРНК по любому из п.п. 1-12 и 14 или фармацевтической композиции по п. 15 или 16 для получения лекарственного средства, при этом

лекарственное средство используют для предупреждения и/или лечения инфекции вирусом гепатита В или заболевания, связанного с вирусом гепатита В;

предпочтительно, заболевание, связанное с вирусом гепатита В, выбрано из группы, состоящей из: хронического гепатита, острого гепатита В, хронического гепатита В, инфекции вирусом гепатита D, гепатита D, фиброза печени, прогрессирующего заболевания печени и гепатоклеточной карциномы;

субъект с инфекцией вирусом гепатита В или субъект с заболеванием, связанным с вирусом гепатита В, дает положительный результат на HBeAg или отрицательный результат на HBeAg.

18. Способ ингибирования экспрессии целевого гена вируса гепатита В (HBV) или его мРНК, включающий:

введение субъекту эффективного количества или эффективной дозы дцРНК по любому из п.п. 1-12 и 14 или фармацевтической композиции по п. 15 или 16.

19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что дцРНК или фармацевтическую композицию вводят в комбинации с одним дополнительным терапевтическим агентом.

20. Способ доставки олигонуклеотида в печень, включающий:

введение субъекту эффективного количества или эффективной дозы дцРНК по любому из п.п. 1-12 и 14 или фармацевтической композиции по п. 15 или 16.

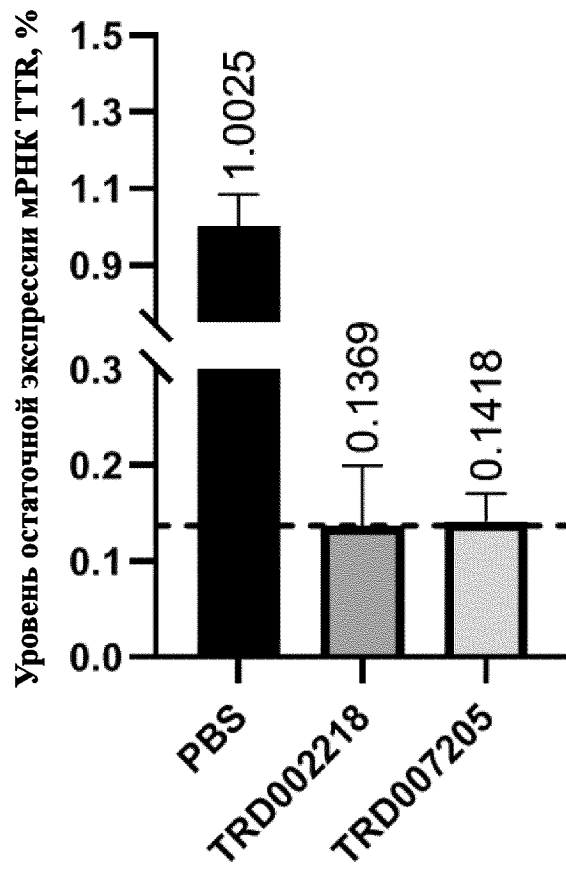
21. Клетка, содержащая миРНК по п. 13.

22. Вектор, содержащий дцРНК по любому из п.п. 1-12 и 14 или миРНК по любому из п.п. 13-14.

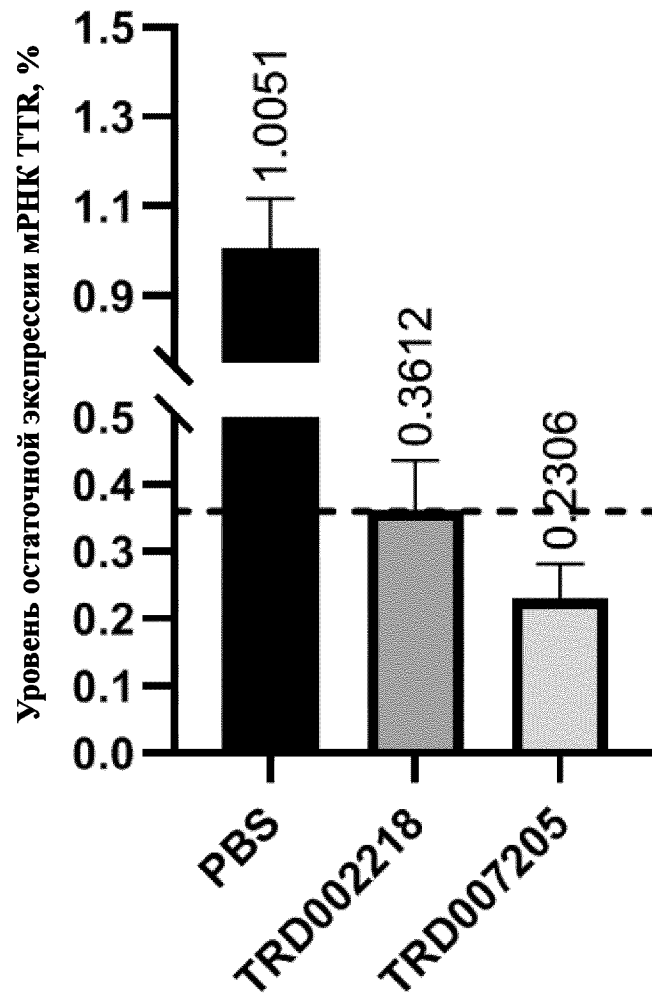
23. Набор или состоящий из частей набор, содержащий один или несколько контейнеров, каждый из которых независимо содержит дцРНК по любому из п.п. 1-12 и 14 или фармацевтическую композицию по любому из п.п. 15 или 16.

24. Способ получения дцРНК, включающий стадию:

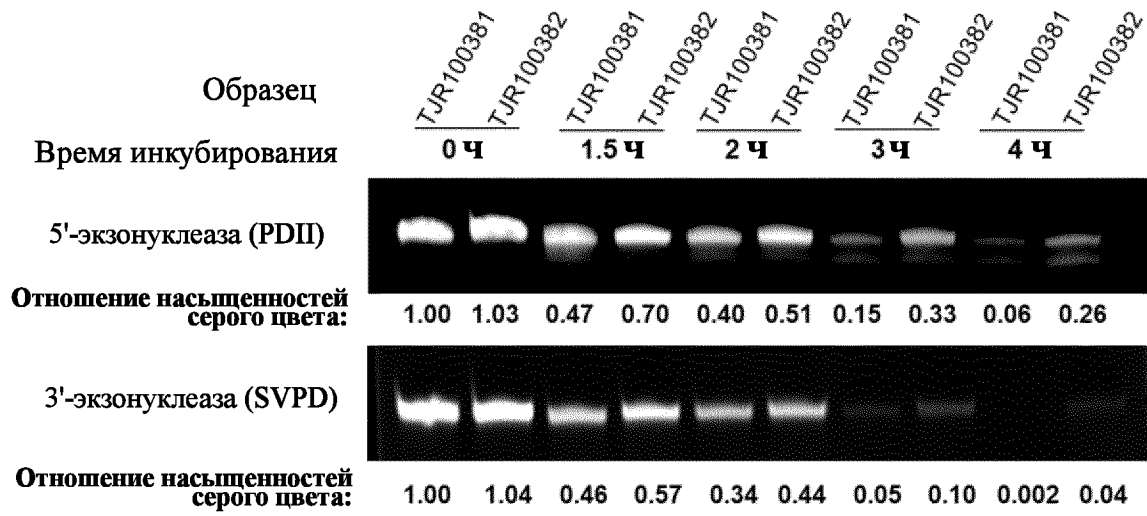
синтеза дцРНК по любому из п.п. 1-12 и 14.



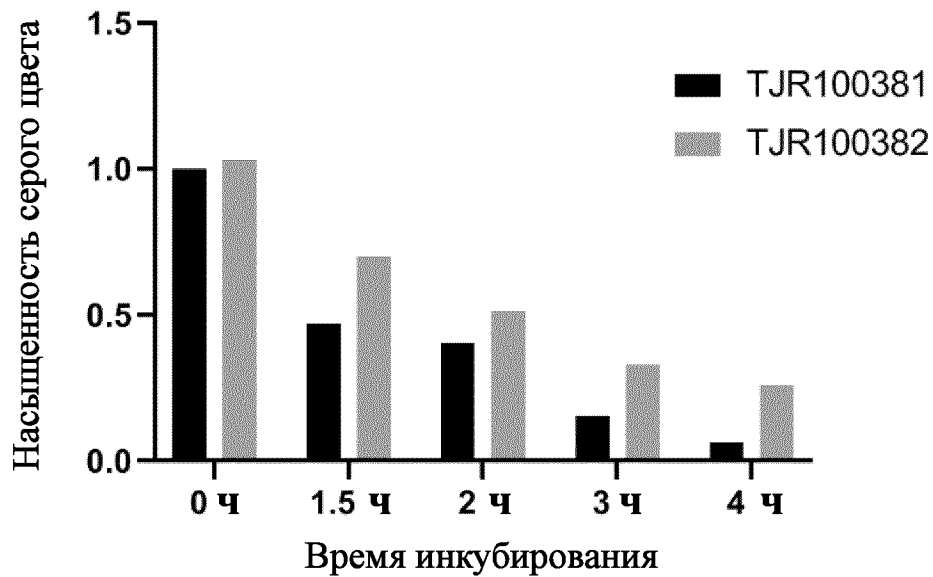
ФИГ. 1



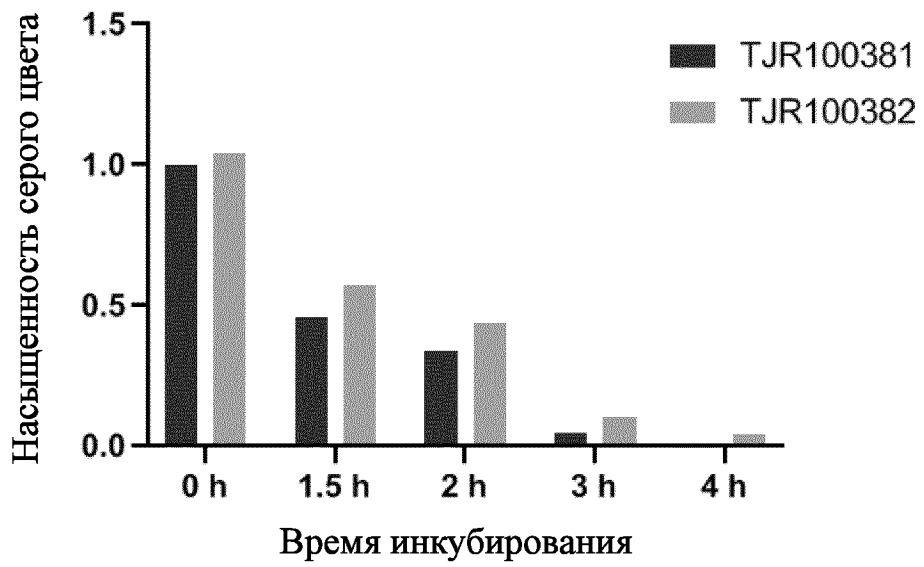
ФИГ. 2



ФИГ. 3



ФИГ. 4

**ФИГ. 5**