

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 031110

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2018.11.30

(51) Int. Cl. C12P 19/34 (2006.01)

(21) Номер заявки  
201491726

(22) Дата подачи заявки  
2013.03.07

---

(54) КОНЬЮГАТЫ БОРОНОВЫХ КИСЛОТ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ АНАЛОГОВ

---

(31) 61/613,385

(56) WO-A2-20110150408  
US-A1-20080160225

(32) 2012.03.20

(33) US

(43) 2015.03.31

(86) PCT/US2013/029684

(87) WO 2013/142087 2013.09.26

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
САРЕПТА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.  
(US)

(72) Изобретатель:  
Хансон Гуннар Дж. (US)

(74) Представитель:  
Медведев В.Н. (RU)

---

(57) Обеспечены олигонуклеотидные аналоги, содержащие фрагменты бороновой кислоты и/или эфира бороновой кислоты. Эти описанные соединения применимы для лечения заболеваний, где ингибирование экспрессии белка или коррекция aberrантных продуктов сплайсинга мРНК производят благоприятные терапевтические эффекты.

---

031110

B1

031110

B1

### **Заявление, касающееся списка последовательностей**

Список последовательностей, относящийся к этой заявке, обеспечен в текстовом формате, вместо бумажной копии, и тем самым включен посредством ссылки в это описание. Название текстового файла, содержащего список последовательностей, 120178\_497WO\_SEQUENCE\_LISTING.txt. Этот текстовый файл, равный 8 КБ, был создан 7 марта 2013 года и представлен в электронном виде через EFS-Web.

### **Уровень техники**

#### **Область техники**

Изобретение относится в целом к олигонуклеотидным аналогам (олигомерам), применимым в качестве антисмысловых соединений и, более конкретно, к конъюгатам бороновых кислот олигонуклеотидных аналогов и использованию таких олигонуклеотидных аналогов в антисмысловых применениях.

#### **Описание области, к которой относится это изобретение**

Антисмысловые олигомеры обычно конструируют для связывания ДНК или РНК, вызывающих заболевание белков, для предотвращения продуцирования таких белков. Требования для успешного внедрения антисмысловых терапевтических средств включают в себя (a) стабильность *in vivo*, (b) достаточную проникаемость мембраны и клеточное поглощение и (c) хороший баланс аффинности связывания и специфичности последовательности. Были разработаны многие олигонуклеотидные аналоги, в которых фосфодиэфирные связи нативной ДНК заменены другими связями, которые являются устойчивыми к деградации нуклеазами (см., например, Barawkar D.A. et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 95(19): 11047-52 (1998); Linkletter B.A. et al., Nucleic. Acids. Res. 29(11):2370-6 (2001); Micklefield J., Curr. Med. Chem., 5(10): 1157-79 (2001)). Были получены также антисмысловые олигонуклеотиды, имеющие другие различные модификации основной цепи (см., например, (Crooke S.T., Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications, New York, Marcel Dekker (2001); Micklefield J., Curr. Med. Chem. 8(10): 1157-79 (2001); Crooke S.T., Antisense Drug Technology, Boca Raton, CRC Press (2008)). Кроме того, олигонуклеотиды могут быть модифицированы конъюгацией пептида для усиления клеточного поглощения (Moulton H.M. et al., Bioconjug. Chem. 15(2):290-9 (2004); Nelson M.H. et al., Bioconjug. Chem. 16(4):959-66 (2005); Moulton H.M. et al., Biochim Biophys Acta (2010)).

Производительность таких аналогов нуклеиновых кислот в качестве антисмысловых или антигенных лекарственных средств затруднялась некоторыми характеристиками этих различных аналогов. Например, аналоги с отрицательно заряженными связями, включающие в себя фосфоротиоат-связанные аналоги, страдают от значительного электростатического отталкивания между отрицательными зарядами этого олигомера и ДНК- или РНК-мишени. Фосфоротиоаты также проявляют неспецифическое связывание с другими клеточными компонентами, такими как белки. Эти свойства ограничивают терапевтическую эффективность антисмысловых олигомеров, состоящих из нативной РНК, нативной ДНК и отрицательно заряженных аналогов (Crooke S.T., Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications, New York, Marcel Dekker (2001); Crooke S.T., Antisense Drug Technology, Boca Raton, CRC Press (2008)). Неионогенные метилфосфонат-связанные олигонуклеотидные аналоги могут транспортироваться в клетки пассивной диффузией и/или жидкофазным эндоцитозом, но их использование затрудняется стереоизомерной сложностью и слабой растворимостью. (Crooke S.T., Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications, New York, Marcel Dekker (2001); Micklefield J., Curr. Med. Chem. 8(10): 1157-79 (2001)).

Несколько групп сообщали о синтезе положительно заряженных олигонуклеотидов (Bailey C.P. et al., Nucleic. Acids. Res. 26(21):4860-7 (1998); Micklefield J., Curr. Med. Chem. 8(10): 1157-79 (2001); Egli M. et al., Biochemistry 44 (25):9045-57 (2005)). Например, сообщался класс гуанидиний-связанных нуклеозидов (названных DNG), образуемых заменой фосфатных связей в ДНК и РНК аксиальными гуанидино-группами (Dempsy R.O. et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 91 (17):7864-8 (1994); Dempsy R.O. et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 93(9):4326-30 (1996); Barawkar D.A. et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 95 (19):11047-52 (1998); Linkletter B.A. et al., Nucleic. Acids. Res. 29(11):2370-6 (2001)). Сообщались также олигомеры, связанные с положительно заряженными связями метилированной тиомочевины (Arya D.P. et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 96(8) 4384-9 (1999)). Сообщалось, что замена некоторых из этих связей со связями нейтральной мочевины уменьшает тенденцию таких положительно заряженных олигомеров к неспецифическому относительно последовательности связыванию (Linkletter B.A. et al., Bioorg. Med. Chem. 8 (8):1893-901 (2000)). Ранее были описаны морфолино-олигомеры, содержащие (1-пиперазино)фосфонилиденокси- и (1-(4-( $\omega$ -гуанидиноалканойл)пиперазино)фосфинилиденокси-связи (см., например, WO 2008036127).

Хотя был достигнут значительный прогресс, в данной области остается потребность в олигонуклеотидных аналогах с улучшенной антисмысловой или антигенной продуктивностью. Такая улучшенная антисмысловая или антигенная продуктивность включает в себя: более высокую аффинность в отношении ДНК и РНК без ухудшения селективности последовательности; улучшенную фармакокинетику и распределение в ткани; улучшенную доставку и контролируемое *in vivo* распределение.

#### **Краткая сущность изобретения**

В общем, данное изобретение обеспечивает олигонуклеотидные аналоги, которые обеспечивают улучшения в сравнении с существующими антисмысловыми молекулами в данной области. В этом отношении авторы данного изобретения нашли, что конъюгация фрагмента бороновой кислоты или эфира

бороновой кислоты с одним или несколькими межсубъединичными связями и/или 5'- и/или 3'-концом олигонуклеотидного аналога, например морфолино-олигонуклеотида, приводит к антисмысловому олигомеру, имеющему превосходные свойства. Например, в некоторых вариантах осуществления раскрываемые олигомеры имеют улучшенную доставку в клетки, эффективность и/или распределение в ткани в сравнении с другими олигонуклеотидными аналогами и/или могут эффективно доставляться к органам-мишеням. Эти лучшие свойства приводят к благоприятным терапевтическим показателям, уменьшенному клиническому дозированию и более низкой стоимости продуктов.

В одном варианте данное раскрытие сущности изобретения обеспечивает олигонуклеотидный аналог, содержащий основную цепь, 3'-конец и 5'-конец, основную цепь, содержащую последовательность морфолино-кольцевых структур, соединенных межсубъединичными связями, причем эти межсубъединичные связи соединяют 3'-конец одной морфолино-кольцевой структуры с 5'-концом соседней морфолино-кольцевой структуры, где каждая морфолино-кольцевая структура связана с фрагментом пар оснований, так что этот олигонуклеотидный аналог может связываться последовательность-специфическим образом с нуклеиновой кислотой-мишенью, где по меньшей мере одна из межсубъединичных связей, 3'-конец или 5'-конец содержит фрагмент бороновой кислоты или эфира бороновой кислоты, ковалентно связанный с ними.

В другом варианте данное изобретение относится к способу ингибирования продукции белка, причем этот способ предусматривает подвергание нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, действию олигомера данного изобретения.

В другом варианте данное раскрытие сущности изобретения относится к способу лечения заболевания у субъекта, предусматривающему введение терапевтически эффективного количества олигомера, описанного здесь. Описаны также способы приготовления этих олигомеров и способы их применения.

Эти и другие аспекты этого изобретения будут очевидными после ссылки на следующее подробное описание. Для этой цели здесь представлены различные ссылки, которые описывают более детально определенный уровень информации, процедуры, соединения и/или композиции, и каждая из них включена здесь посредством ссылки в ее полном виде.

#### Краткое описание фигур

Фиг. 1 показывает короткие последовательности примерных конъюгатов бороновая кислота-нуклеотид;

фиг. 2 - короткие последовательности примерных конъюгатов бороновая кислота-нуклеотид.

#### Подробное описание

##### I. Определения.

В следующем описании заданы определенные конкретные детали для обеспечения основательного понимания различных вариантов. Однако квалифицированному в данной области специалисту будет понятно, что это изобретение может практиковаться без этих деталей. В других случаях хорошо известные структуры не были показаны или описаны подробно во избежание необязательных непонятных описаний этих вариантов. Если контекст не требует иного, на протяжении этого описания и формулы изобретения, которые следуют далее, слово "содержат" и его вариации, такие как, "содержит" и "содержащий" должно трактоваться в открытом, включающем смысле, т.е. как "включающие, но не ограничивающиеся ими". Далее, заголовки, обеспеченные здесь, даны только для удобства, и не интерпретируют объем или значение заявленного изобретения.

Ссылка на протяжении этого описания на "один вариант" или "один вариант осуществления" означает, что конкретный признак, структура или характеристика, описываемые в связи этим вариантом, включены по меньшей мере в один вариант. Таким образом, появления фраз "в одном варианте" или "в одном варианте осуществления" в разных местах на протяжении этого описания необязательно относятся к тому же варианту. Кроме того, конкретные признаки, структуры или характеристики могут быть объединены любым подходящим способом в одном или нескольких вариантах. Кроме того, используемые в этом описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают в себя формы множественного числа, если содержание не диктует явно другое. Следует также отметить, что термин "или" обычно применяется в смысле, включающем в себя "и/или", если содержание не диктует явно другое.

Термины ниже, используемые здесь, имеют следующие значения, если нет другого указания.

"Амино" означает радикал  $-NH_2$ .

"Циано" или "нитрил" относится к радикалу  $-CN$ .

"Гало" означает радикал фтор, хлор, бром или йод.

"Гидроксил" или "гидроксил" означает радикал  $-OH$ .

"Нитро" означает радикал  $-NO_2$ .

"Оксо" означает заместитель  $=O$ .

"Бороновая кислота" является фрагментом, содержащим радикал  $-B(OH)_2$ .

"Бороновый эфир" является фрагментом, содержащим радикал  $-(OR_a)_2$ , где  $R_a$  означает, в каждом случае, независимо Н или алкильный радикал, как определено здесь.

"Алкил" означает радикал прямой или разветвленной цепи, который является насыщенным или не-

насыщенным (т.е. содержит одну или несколько двойных или тройных связей), имеющий от одного до тридцати атомов углерода. Включены алкилы, содержащие любое количество атомов углерода от 1 до 30. Алкил, содержащий до 30 атомов углерода, называют  $C_1$ - $C_{30}$ -алкилом, подобным образом, например, алкил, содержащий до 12 атомов углерода, является  $C_1$ - $C_{12}$ -алкилом. Алкилы (и другие фрагменты молекул, определенные здесь), содержащие другие количества атомов углерода, изображают сходным образом. Алкильные группы включают в себя, но не ограничиваются ими,  $C_1$ - $C_{30}$ -алкил,  $C_1$ - $C_{20}$ -алкил,  $C_1$ - $C_{15}$ -алкил,  $C_1$ - $C_{10}$ -алкил,  $C_1$ - $C_8$ -алкил,  $C_1$ - $C_6$ -алкил,  $C_1$ - $C_4$ -алкил,  $C_1$ - $C_3$ -алкил,  $C_1$ - $C_2$ -алкил,  $C_2$ - $C_8$ -алкил,  $C_3$ - $C_8$ -алкил и  $C_4$ - $C_8$ -алкил. Репрезентативные алкильные группы включают в себя, но не ограничиваются ими, метил, этил, н-пропил, 1-метилэтил (изопропил), н-бутил, изо-бутил, втор-бутил, н-пентил, 1,1-диметилэтил (т-бутил), 3-метилгексил, 2-метилгексил, этенил, проп-1-енил, бут-1-енил, пент-1-енил, пента-1,4-диенил, этинил, пропирил, бут-2-инил, бут-3-инил, пентинил, гексенил и т.п. Алкилы включают в себя насыщенные, ненасыщенные и циклические (циклоалкил) алкилы. Если не указано особо в этом описании, алкильная группа может быть необязательно замещенной, как описано ниже.

"Алкилен" или "алкиленовая цепь" относится к прямой или разветвленной дивалентной углеводородной цепи, связывающей остаток молекулы с группой радикала. Алкилены могут быть насыщенными или ненасыщенными (т.е. содержат одну или несколько двойных и/или тройных связей).

Репрезентативные алкилены включают в себя, но не ограничиваются ими,  $C_1$ - $C_{12}$ -алкилен,  $C_1$ - $C_8$ -алкилен,  $C_1$ - $C_6$ -алкилен,  $C_1$ - $C_4$ -алкилен,  $C_1$ - $C_3$ -алкилен,  $C_1$ - $C_2$ -алкилен,  $C_1$ -алкилен.

Репрезентативные группы алкиленов включают в себя, но не ограничиваются ими, метилен, этилен, пропилен, н-бутилен, этенилен, пропенилен, н-бутенилен, пропирилен, н-бутирилен и т.п. Алкиленовая цепь присоединяется к остатку молекулы через простую или двойную связь и к группе радикала через простую или двойную связь. Точки присоединения алкиленовой цепи к остатку этой молекулы и к группе радикала могут быть присоединением через один углерод или любые два углерода в этой цепи. Если не указано особо в этом описании, алкиленовая цепь может быть необязательно замещенной, как описано ниже.

"Алкокси" относится к радикалу формулы  $-OR_a$ , где  $R_a$  означает алкильный радикал, как определено. Если не указано особо в этом описании, алкоксигруппа может быть необязательно замещенной, как описано ниже.

"Алкоксиалкил" относится к радикалу формулы  $-R_bOR_a$ , где  $R_a$  означает алкильный радикал, как определено, и где  $R_b$  означает алкиленовый радикал, как определено. Если не указано особо в этом описании, алкоксиалкильная группа может быть необязательно замещенной, как описано ниже.

"Алкилкарбонил" относится к радикалу формулы  $-C(=O)R_a$ , где  $R_a$  означает алкильный радикал, определенный выше. Если не указано особо в этом описании, алкилкарбонильная группа может быть необязательно замещенной, как описано ниже.

"Алкоксикарбонил" относится к радикалу формулы  $-C(=O)OR_a$ , где  $R_a$  означает определенный алкильный радикал. Если не указано особо в этом описании, алкоксикарбонильная группа может быть необязательно замещенной, как описано ниже.

"Алкилоксикарбониламинил" относится к радикалу формулы  $-NR_aC(=O)OR_b$ , где  $R_a$  означает водород или алкильный радикал, определенный выше, и  $R_b$  означает алкильный радикал, как определено. Если не указано особо в этом описании, алкилоксикарбонильная группа может быть необязательно замещенной, как описано ниже.

"Алкилоксиимино" относится к радикалу формулы  $-C(=NH)O-R_a$ , где  $R_a$  означает алкильный радикал, как определено выше. Если не указано особо в этом описании, алкилоксииминогруппа может быть необязательно замещенной, как описано ниже.

"Алкиламино" относится к радикалу формулы  $-NHR_a$  или  $-NR_aR_a$ , где  $R_a$  означает независимо алкильный радикал, как определено выше. Если не указано особо в этом описании, алкиламиногруппа может быть необязательно замещенной, как описано ниже.

"Амидил" относится к радикалу формулы  $-N(R_a)C(=O)R_b$ , где  $R_a$  означает водород или алкильный или арильный радикал и  $R_b$  означает алкильный или арильный радикал, как определено в настоящем описании. Если не указано особо в этом описании, амидильная группа может быть необязательно замещенной, как описано ниже.

"Аминоалкил" относится к радикалу формулы  $-R_b-NR_aR_a$ , где  $R_b$  означает алкиленовый радикал, как определено выше, и каждый  $R_a$  означает независимо водород или алкильный радикал.

"Аминокарбонил" относится к радикалу формулы  $-C(=O)NH_2$ .

"Алкиламинокарбонил" относится к радикалу формулы  $C(=O)NR_aR_a$ , где каждый  $R_a$  означает независимо алкильный радикал, как определено здесь. Если не указано особо в этом описании, алкиламинокарбонильная группа может быть необязательно замещенной, как описано ниже.

"Арил" относится к радикалу, произведенному из углеводородной циклической системы, содержащей водород, 6-30 атомов углерода и по меньшей мере одно ароматическое кольцо. Этот арильный радикал может быть моноциклической, бициклической, трициклической или тетрациклической кольцевой системой, которая может включать в себя конденсированные или мостиковые циклические системы. Арильные радикалы включают в себя, но не ограничиваются ими, арильные радикалы, произведенные из

углеводородных циклических систем ацеантрилена, аценафтилена, ацефенантрилена, антрацена, азулена, бензола, хризена, флуорантена, флуорена, аs-индацена, s-индацена, индана, индена, нафталина, феналена, фенантрена, плейадена, пирена и трифенилена. Если не указано особо в этом описании, термин "арил" или приставка "ар-" (например, в "аралкиле") предназначена для включения арильных радикалов, которые необязательно являются замещенными.

"Аралкил" относится к радикалу формулы  $-R_b-R_c$ , где  $R_b$  означает алкиленовую цепь, определенную выше, и  $R_c$  означает один или несколько арильных радикалов, определенных выше, например, бензил, дифенилметил, тритил и т.п. Если не указано особо в этом описании, аралкильная группа может быть необязательно замещенной.

"Ариламино" относится к радикалу формулы  $-NHR_a$  или  $-NR_aR_a$ , где каждый  $R_a$  означает независимо арильный радикал, описанный выше. Если не указано особо в этом описании, ариламиногруппа может быть необязательно замещенной, как описано ниже.

"Ариламинокарбонил" относится к радикалу формулы  $C(=O)NR_aR_b$ , где  $R_a$  означает арильный радикал, определенный здесь, и  $R_b$  означает водород или любой алкильный радикал. Если не указано особо в этом описании, ариламинокарбонильная группа может быть необязательно замещенной, как описано ниже.

"Аралкиламино" относится к радикалу формулы  $-NR_bR_a$ , где каждый  $R_a$  означает арильный радикал и  $R_b$  означает алкиленовую цепь, как определено выше. Если не указано особо в этом описании, ариламиногруппа может быть необязательно замещенной, как описано ниже.

"Аралкиламинокарбонил" относится к радикалу формулы  $C(=O)NR_bR_a$ , где каждый  $R_a$  означает арильный радикал и  $R_b$  означает алкиленовую цепь, как определено выше. Если не указано особо в этом описании, ариламиногруппа может быть необязательно замещенной, как описано ниже.

"Арилкарбонил" относится к радикалу формулы  $-C(=O)R_c$ , где  $R_c$  означает один или несколько арильных радикалов, определенных выше, например, фенил. Если не указано особо в этом описании, арилкарбонильная группа может быть необязательно замещенной.

"Арилоксикарбонил" относится к радикалу формулы  $-C(=O)OR_c$ , где  $R_c$  означает один или несколько арильных радикалов, определенных выше, например, фенил. Если не указано особо в этом описании, арилоксикарбонильная группа может быть необязательно замещенной.

"Арилоксикарбониламинил" относится к радикалу формулы  $NR_aC(=O)OR_c$ , где  $R_a$  означает водород или алкильный радикал и  $R_c$  означает арильный радикал, как определено выше, например фенил. Если не указано особо в этом описании, арилоксикарбонильная группа может быть необязательно замещенной.

"Аралкилкарбонил" относится к радикалу формулы  $-C(=O)R_b-R_c$ , где  $R_b$  означает алкиленовую цепь, определенную выше, и  $R_c$  означает один или несколько арильных радикалов, определенных выше, например, фенил. Если не указано особо в этом описании, аралкилкарбонильная группа может быть необязательно замещенной.

"Аралкилоксикарбонил" относится к радикалу формулы  $C(=O)OR_b-R_c$ , где  $R_b$  означает алкиленовую цепь, определенную выше, и  $R_c$  означает один или несколько арильных радикалов, определенных выше, например, фенил. Если не указано особо в этом описании, аралкилоксикарбонильная группа может быть необязательно замещенной.

"Аралкилоксикарбониламинил" относится к радикалу формулы  $-NR_aC(=O)OR_b-R_c$ , где  $R_a$  означает водород или алкильный радикал,  $R_b$  означает алкиленовую цепь, определенную выше, и  $R_c$  означает один или несколько арильных радикалов, определенных выше, например, фенил. Если не указано особо в этом описании, аралкилоксикарбонильная группа может быть необязательно замещенной.

"Арилокси" относится к радикалу формулы  $-OR_c$ , где  $R_c$  означает один или несколько арильных радикалов, определенных выше, например, фенил. Если не указано особо в этом описании, арилкарбонильная группа может быть необязательно замещенной.

"Циклоалкил" относится к стабильному, неароматическому, моноциклическому или полициклическому карбоциклическому кольцу, которое может включать в себя конденсированные или соединенные мостиковой связью циклические системы, которое является насыщенным или ненасыщенным, и присоединенным к остатку этой молекулы простой связью. Репрезентативные циклоалкилы включают в себя, но не ограничиваются ими, циклоалкилы, имеющие от трех до пятнадцати атомов углерода и от трех до восьми атомов углерода. Моноциклические циклоалкильные радикалы включают в себя, например, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил и циклооктил. Полициклические радикалы включают в себя, например, адамантил, норборнил, декалинил и 7,7-диметилбицикло[2.2.1]гептанил. Если не указано особо в этом описании, циклоалкильная группа может быть необязательно замещенной.

"Карбоциклические" включает в себя циклоалкилы и арилы, определенные выше.

"Конденсированная" относится к любой кольцевой структуре, описанной здесь, которая конденсирована с существующей циклической структурой. Когда конденсированным кольцом является гетероциклическое кольцо или гетероарильное кольцо, любой атом углерода на существующей циклической структуре, которая становится частью этого конденсированного гетероциклического кольца, или это конденсированное гетероарильное кольцо может быть заменено атомом азота.

"Гетероцикл", "гетероцикл" или "гетероциклическое кольцо" относится к стабильному 3-24-членному неароматическому циклическому радикалу, содержащему 2-23 атомов углерода и от одного до 8 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из азота, кислорода, фосфора и серы. Если не указано особо в этом описании, гетероциклический радикал может быть моноциклической, бициклической, трициклической или тетрациклической кольцевой системой, которая может включать в себя конденсированные или соединенные мостиковой связью циклические системы; и атомы азота, углерода или серы в этом гетероциклическом радикале могут быть необязательно окисленными; этот атом азота может быть необязательно кватернизованным; и этот гетероциклический радикал может быть частично или полностью насыщенным. Примеры таких гетероциклических радикалов включают в себя, но не ограничиваются ими, диоксоланил, тиенил[1,3]дитианил, декагидроизохинолил, имидазолинил, имидазолидинил, изотиазолидинил, изоксазолидинил, морфолинил, октагидроиндолил, октагидроизоиндолил, 2-оксопиперазинил, 2-оксопиперидинил, 2-оксопирролидинил, оксазолидинил, пиперидинил, пиперазинил, 4-пиперидонил, пирролидинил, пиразолидинил, хинуклидинил, тиазолидинил, тетрагидрофурил, тритианил, тетрагидропиридил, тиоморфолинил, тиаморфолинил, 1-оксо-тиоморфолинил, 1,1-диоксо-тиоморфолинил, 12-краун-4, 15-краун-5, 18-краун-6, 21-краун-7, аза-18-краун-6, диаза-18-краун-6, аза-21-краун-7 и диаза-21-краун-7. Если не указано особо в этом описании, гетероциклическая группа может быть необязательно замещенной.

"Гетероарил" является типом гетероцикла и относится к радикалу 5-14-членной циклической системы, содержащему атом водорода, один-тринадцать атомов углерода, один-шесть гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из азота, кислорода, фосфора и серы, и по меньшей мере одного ароматического кольца. Для целей этого изобретения этот гетероарильный радикал может быть моноциклической, бициклической, трициклической или тетрациклической кольцевой системой, которая может включать в себя конденсированные или соединенные мостиковой связью циклические системы; и атомы азота, углерода или серы в этом гетероарильном радикале могут быть необязательно окисленными; атом азота может быть необязательно кватернизованным. Примеры включают в себя, но не ограничиваются ими, азепинил, акридинил, бензимидазолил, бензотиазолил, бензиндолил, бензодиоксолил, бензофуранил, бензооксазолил, бензотиазолил, бензотиадиазолил, бензо[b][1,4]диоксепинил, 1,4-бензодиоксанил, бензонафтофуранил, бензоксазолил, бензодиоксолил, бензодиоксинил, бензопиранил, бензопиранонил, бензофуранил, бензофуранонил, бензотиенил (бензотиофенил), бензотриазолил, бензо[4,6]имидазо[1,2-a]пиридинил, карбазолил, циннолинил, дибензофуранил, дибензотиофинил, фуранил, фуранонил, изотиазолил, имидазолил, индазолил, индолил, индазолил, изоиндолил, индолинил, изоиндолинил, изохинолил, индолизинил, изоксазолил, нафтиридинил, оксадиазолил, 2-оксаазепинил, оксазолил, оксиранил, 1-оксидопиридинил, 1-оксидопиримидинил, 1-оксидопиразинил, 1-оксидопиридазинил, 1-фенил-1Н-пирролил, феназинил, фенотиазинил, феноксазинил, фталазинил, птеридинил, пуринил, пирролил, пиразолил, пиридинил, пиразинил, пиримидинил, пиридазинил, хиназолинил, хиноксалинил, хинолинил, хинуклидинил, изохинолинил, тетрагидрохинолинил, тиазолил, тиадиазолил, триазолил, тетразолил, триазинил и тиофенил (т.е. тиенил). Если не указано особо в этом описании, гетероциклическая группа может быть необязательно замещенной.

"Гидроксикал" относится к радикалу формулы  $-R_b-OH$ , где  $R_b$  означает алкиленовый радикал, как определено выше.

Гидроксикалы включают в себя первичные, вторичные и третичные алкиловые спирты.

Все вышеупомянутые группы могут быть замещенными или незамещенными. Термин "замещенный" означает в данном контексте любую из вышеупомянутых групп (т.е. алкил, алкилен, алкокси, алкоксиалкил, алкилкарбонил, алкоксикарбонил, алкоксикарбониламинил, алкилоксиимино, алкиламино, амидил, аминокалкил, аминокарбонил, алкиламиникарбонил, арил, аралкил, ариламино, ариламиникарбонил, аралкиламино, аралкиламиникарбонил, арилкарбонил, арилоксикарбонил, аралкилкарбонил, аралкилоксикарбонил, аралкилоксикарбониламинил, арилокси, циклоалкил, гетероцикл, гетероарил и/или гидроксикал), может быть дополнительно функционализирован, где по меньшей мере один атом водорода заменен связью с заместителем, не являющимся атомом водорода. Если не указано особо в этом описании, замещенная группа может включать в себя один или несколько заместителей, выбранных из: оксо(=O),  $-CO_2H$ , нитрила, нитро,  $-CONH_2$ , гидроксила, галогена, тиоокси (=S), алкила, алкилена, алкокси, алкоксиалкила, алкилкарбонила, алкилоксикарбонила, арила, аралкила, арилкарбонила, арилоксикарбонила, аралкилкарбонила, аралкилоксикарбонила, арилокси, циклоалкила, циклоалкилалкила, циклоалкилкарбонила, циклоалкилалкилкарбонила, циклоалкилоксикарбонила, гетероцикла, гетероарила, диалкиламинов, ариламинов, алкилариламинов, диариламинов, N-оксидов, имидов и енаминов; атома кремния в таких группах, как триалкилсилильные группы, диалкиларилсилильные группы, алкилдиарилсилильные группы, триарилсилильные группы, перфторалкил или перфторалкокси, например, трифторметил или трифторметокси. "Замещенные" также означает любые из вышеупомянутых групп, в которых один или несколько атомов водорода заменены связью более высокого порядка (например, двойной или тройной связью) с гетероатомом, таким как кислород в оксо, карбонильной, карбоксильной и сложноэфирной группах; и азот в группах, таких как имины, оксимы, гидразоны и нитрилы. Например, термин "замещенные" включает в себя любые из вышеупомянутых групп, в которых один или несколько атомов

водорода заменены  $-NR_gC(=O)NR_gR_h$ ,  $-NR_gC(=O)OR_h$ ,  $-NR_gSO_2R_h$ ,  $-OC(=O)NR_gR_h$ ,  $-OR_g$ ,  $-SR_g$ ,  $-SOR_g$ ,  $-SO_2R_g$ ,  $-OSO_2R_g$ ,  $-SO_2OR_g$ ,  $=NSO_2R_g$  и  $-SO_2NR_gR_h$ . "Замещенные" также означает любые из вышеупомянутых групп, в которых один или несколько атомов водорода заменены  $-C(=O)R_g$ ,  $-C(=O)OR_g$ ,  $-CH_2SO_2R_g$ ,  $-CH_2SO_2NR_gR_h$ ,  $-SH$ ,  $-SR_g$  или  $-SSR_g$ . В предыдущем описании  $R_g$  и  $R_h$  являются одними и теми же или различными и независимо представляют собой водород, алкил, алкокси, алкиламино, тиоалкил, арил, аралкил, циклоалкил, циклоалкилалкил, галогеналкил, гетероцикл, N-гетероцикл, гетероциклиалкил, гетероарил, N-гетероарил и/или гетероарилалкил. Кроме того, каждый из предыдущих заместителей может быть необязательно замещен одним или несколькими из вышеуказанных заместителей. Кроме того, любая из вышеупомянутых групп может быть замещенной для включения одного или нескольких внутренних атомов кислорода или серы. Например, алкильная группа может быть замещена одним или несколькими внутренними атомами кислорода для образования эфирной или полиэфирной группы. Аналогично, алкильная группа может быть замещена одним или несколькими внутренними атомами серы для образования простого тиоэфира, дисульфида и т.д.

Термины "антисмысловой олигомер" или "антисмысловое соединение" используются здесь взаимозаменяемо и относятся к последовательности субъединиц, каждая из которых имеет основание, несомое на субъединице основной цепи молекулы, состоящей из рибозы или другого пентозного сахара или морфолино-группы, и где эти группы основной цепи связаны межсубъединичными связями, которые позволяют основаниям в этом соединении гибридизоваться с последовательностью-мишенью в нуклеиновой кислоте (обычно РНК) спариванием оснований Уотсона-Крика для образования гетеродуплекса нуклеиновой кислоты: олигомер в последовательности-мишени. Этот олигомер может иметь точную комплементарность последовательности относительно этой последовательности-мишени или близкую комплементарность. Такие антисмысловые олигомеры конструируют для блокирования или ингибирования трансляции мРНК, содержащей последовательность-мишень, и, можно сказать, "направлены" на последовательность, с которой она гибридизуется.

"Морфолино-олигомером", или "РМО", называют полимерную молекулу, имеющую основную цепь молекулы, которая поддерживает основания, способные к образованию водородной связи с типичными полинуклеотидами, где этот полимер лишен фрагмента основной цепи пентозного сахара и, более конкретно, основной цепи рибозы, связанной фосфодиэфирными связями, которая является обычно нуклеотидами и нуклеозидами, но вместо этого содержит азот кольца со связыванием через этот азот кольца. Один примерный "морфолино"-олигомер содержит структуры субъединиц морфолино, связанные вместе (тио)фосфорамидатными или (тио)фосфородиамидатными связями, соединяющими азот морфолино одной субъединицы с 5'-экзоциклическим углеродом соседней субъединицы, причем каждая субъединица содержит фрагмент спаривания пуриновых или пиримидиновых оснований, эффективный для связывания, посредством образования специфических в отношении оснований водородных связей, с основанием в полинуклеотиде. Морфолино-олигомеры (в том числе антисмысловые олигомеры) описаны подробно, например, в патентах США с номерами 5698685; 5217866; 5142047; 5034506; 5166315; 5185444; 5521063 и 5506337, публикации заявки на патент США с номерами 2009/0131632; 2009/0131624 и 2012/0065169 и публикации РСТ с номером WO 2009/064471, все из которых включены здесь посредством ссылки в полном виде для всех целей. Репрезентативные РМО включают в себя РМО, в которых межсубъединичные связи содержат диметиламино-фрагмент.

"Фосфорамидатная группа" содержит фосфор, имеющий три присоединенных атома кислорода и один присоединенный атом азота, тогда как "фосфородиамидатная" группа (см., например, фигуры 1D-E) содержит фосфор, имеющий два присоединенных атома кислорода и два присоединенных атома азота. В незаряженных или модифицированных межсубъединичных связях олигомеров, описанных здесь и рассматриваемых совместно в заявках на патент США с номерами 61/349783 и 11/801885, один атом азота является выступающим по отношению к основной цепи. Второй атом азота, в фосфородиамидатной связи, является обычно атомом азота кольца в морфолино-кольцевой структуре.

"Межсубъединичная связь" относится к связи, соединяющей две субъединицы морфолино, например, структуре (I).

Олигонуклеотид или антисмысловой олигомер "специфически гибридизуется" с полинуклеотидом-мишенью, если этот олигомер гибридизуется с мишенью при физиологических условиях, с  $T_m$ , большей чем  $37^\circ\text{C}$ , большей чем  $45^\circ\text{C}$ , предпочтительно по меньшей мере  $50^\circ\text{C}$  и обычно  $60-80^\circ\text{C}$  или более высокой. " $T_m$ " олигомера является температурой, при которой 50% гибридизуются с комплементарным полинуклеотидом.  $T_m$  определяют при стандартных условиях в физиологическом солевом растворе, как описано, например, в Miyada et al, Methods Enzymol. 154:94-107 (1987). Такая гибридизация может осуществляться с "близкой" или "значительной" комплементарностью антисмыслового олигомера относительно последовательности-мишени, а также с точной комплементарностью.

Полинуклеотиды описываются как "комплементарные" друг другу, когда гибридизация осуществляется в антипараллельной конфигурации между двумя одноцепочечными полинуклеотидами. Комплементарность (степень, когда один полинуклеотид является комплементарным с другим) может оцениваться количественно в виде доли (пропорции) оснований в противолежащих цепях, которые, как ожидается, образуют водородные связи друг с другом, в соответствии с обычно принятыми правилами спари-

вания оснований.

Первая последовательность является "антисмысловой последовательностью" в отношении второй последовательности, если полинуклеотид, последовательность которого является первой последовательностью, специфически связывается или специфически гибридизуется со второй полинуклеотидной последовательностью при физиологических условиях.

Термин "нацеливающая последовательность" является последовательностью в олигонуклеотидном аналоге, которая является комплементарной (кроме того, существенно комплементарной) последовательности-мишени в геноме РНК. Эта вся последовательность, или только часть этого соединения-аналога может быть комплементарной последовательности-мишени. Например, в аналоге, имеющем 20 оснований, только 12-14 могут быть нацеливающими последовательностями. Обычно, эта нацеливающая последовательность образована смежными основаниями в аналоге, но может быть альтернативно образована несмежными последовательностями, которые при помещении вместе, например, от противоположных концов этого аналога, составляют последовательность, которая охватывает последовательность-мишень.

Последовательность-мишень и нацеливающая последовательность описываются как "комплементарные" друг другу, когда гибридизация осуществляется в антипараллельной конфигурации. Нацеливающая последовательность может иметь "близкую" или "существенную" комплементарность с последовательностью-мишенью и все еще функционировать для цели описанных теперь способов, т.е. быть все еще "комплементарной". Предпочтительно, эти соединения олигонуклеотидных аналогов, применяемые в описанных теперь способах, имеют самое большее одно ошибочное спаривание с последовательностью-мишенью из 10 нуклеотидов, и предпочтительно самое большее одно ошибочное спаривание из 20. Альтернативно, антисмысловые олигомеры, используемые здесь, имеют по меньшей мере 90%-ную гомологию последовательности и предпочтительно по меньшей мере 95%-ную гомологию последовательности с примерными нацеливающими последовательностями, сконструированными здесь. Для целей комплементарного связывания с РНК-мишенью, и как обсуждается ниже, основание гуанин может быть комплементарным либо основанию цитозину, либо основанию урацилу РНК.

"Гетеродуплекс" относится к дуплексу между олигонуклеотидным аналогом и комплементарной частью РНК-мишени. "Устойчивый к нуклеазам гетеродуплекс" относится к гетеродуплексу, образованному связыванием антисмыслового олигомера с его комплементарной мишенью, так что этот гетеродуплекс является по существу устойчивым к деградации *in vivo* внутриклеточными и внеклеточными нуклеазами, такими как РНКаза Н, которая способна разрезать двухцепочечные комплексы РНК/РНК или РНК/ДНК.

Агент является "активно поглощаемым клетками млекопитающих", когда этот агент может входить в эту клетку посредством механизма, другого, чем пассивная диффузия через клеточную мембрану. Этот агент может быть транспортируемым, например "активным транспортом", относящимся к транспорту агентов через клеточную мембрану млекопитающих, например, посредством АТФ-зависимого механизма транспорта, или посредством "облегченного транспорта", относящегося к транспорту антисмысловых агентов через мембрану посредством механизма транспорта, который требует связывания этого агента с транспортным белком, которое затем облегчает прохождение связанного агента через эту мембрану.

Термины "модулирование экспрессии" и/или "антисмысловая активность" относятся к способности антисмыслового олигомера, либо к увеличению, либо, более часто, к уменьшению экспрессии конкретного белка, интерференцией с экспрессией или трансляцией РНК. В случае уменьшенной экспрессии белка, этот антисмысловый олигомер может непосредственно блокировать экспрессию конкретного гена или способствовать ускоренному распаду РНК, транскрибируемой из этого гена. Считается, что морфолино-олигомеры, описанные здесь, действуют через первый механизм (стерическое блокирование). Предпочтительные антисмысловые мишени для стерического блокирования олигомеров включают в себя район стартового кодона АТГ, сайты сплайсинга, районы, близко примыкающие к сайтам сплайсинга, и 5'-нетранслируемый район мРНК, хотя другие районы были успешно таргетированы с использованием морфолино-олигомеров.

"Эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" относится к количеству антисмыслового олигомера, вводимого субъекту-млекопитающему либо в виде единственной дозы, либо в виде части ряда доз, которая является эффективной для получения желаемого терапевтического действия, обычно ингибированием трансляции выбранной последовательности-мишени нуклеиновой кислоты.

"Лечение" индивидуума (например, млекопитающего, такого как человек) или клетки является любым типом вмешательства, используемого в попытке изменения течения (болезни) этого индивидуума или клетки. Лечение включает в себя, но не ограничивается ими, введение фармацевтической композиции и может выполняться либо профилактически, либо после начала патологического события или контакта с этиологическим агентом.

## II. Антисмысловые олигомеры.

### A. Олигомеры, содержащие фрагменты бороновой кислоты или эфира бороновой кислоты.

Как отмечалось выше, один вариант данного раскрытия изобретения направлен на олигонуклеотидные аналоги (называемые здесь "олигомерами"), содержащие фрагменты бороновой кислоты или эфира



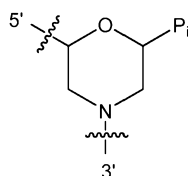
бороновой кислоты. Известно, что бороновые кислоты имеют особую аффинность в отношении углеводов: они связываются ковалентным, бидентатным образом с единицей 1,2-диола или 1,3-диола, присутствующих в сахарах. Бороновые кислоты могут, следовательно, рассматриваться как синтетические лектины. Поверхность эукариотической клетки или прокариотической клетки содержит много углеводных структур, доступных для реакции с бороновыми кислотами. Соединения данного изобретения являются антисмысловыми фосфородиамидатными олигомерами (РМО), содержащими бороновые кислоты (или эфиры бороновых кислот *in vivo*, которые, как ожидается, расщепляются до бороновых кислот *in vivo*), которые предназначены для связывания ковалентно с углеводами клеточной поверхности, фосфатными головными группами и сульфатированными полисахаридами; после связывания, соединения этого изобретения подвергаются поглощению и интернализации во внутреннее пространство клетки с последующей транслокацией в цитоплазму и ядро, где имеет место биологическое действие. Ожидается, что присутствие фрагмента бороновой кислоты (бороновых кислот) решает очень важную, давнишнюю техническую проблему: клеточную доставку. Соединения данного изобретения способны: (1) эффективно проникать через клеточные мембраны и перемещаться в цитоплазму и ядро; и 2) приобретать длительные периоды времени пребывания в плазме, избегая таким образом экскреции (выделения) почкой и накопления в почке. Структурные признаки и свойства различных типов связей и олигомеров описаны более подробно в последующем обсуждении.

Фиг. 1 и 2 обеспечивают примеры олигомеров этого изобретения. С целью простоты изображенные олигомеры являются более короткими, чем обычные. Обычно эти олигомеры содержат от приблизительно 10 до приблизительно 30 субъединиц (т.е. оснований). В некоторых вариантах осуществления эти олигомеры содержат от приблизительно 18 до приблизительно 25 субъединиц. Дополнительно, примеры, обеспеченные в фиг. 1 и 2, изображают конъюгаты бороновой кислоты как в концевой области, так и в межсубъединичных связях. В действительной практике этого изобретения фрагмент бороновой кислоты (или эфира) может находиться либо в 5'-концевой области, 3'-концевой области, или в межсубъединичной связи, либо в любой их комбинации. Действительное количество конъюгатов бороновой кислоты или эфира бороновой кислоты в олигомере не является критическим, при условии, что этот олигомер содержит по меньшей мере один из этих конъюгатов. Структурные признаки и свойства различных типов связей и олигомеров описаны более подробно в последующем обсуждении.

В некоторых вариантах осуществления данное изобретение направлено на олигонуклеотидный аналог ("олигомер"), содержащий основную цепь, 3'-конец и 5'-конец, причем эта основная цепь содержит последовательность морфолино-кольцевых структур, соединенных посредством межсубъединичных связей, причем эти межсубъединичные связи соединяют 3'-конец одной морфолино-кольцевой структуры с 5'-концом смежной морфолино-кольцевой структуры, где каждая морфолино-кольцевая структура связана с фрагментом пар оснований таким образом, что этот олигонуклеотидный аналог может связываться последовательность-специфическим образом с нуклеиновой кислотой-мишенью, где по меньшей мере одна из межсубъединичных связей, 3'-конца или 5'-конца содержит фрагмент бороновой кислоты или эфира бороновой кислоты, ковалентно связанный с ними.

В некоторых примерах этот олигомер содержит по меньшей мере одну связь, содержащую фрагмент бороновой кислоты или эфира бороновой кислоты, ковалентно связанный с ней (борсодержащую связь). В нескольких других вариантах этот олигомер включает в себя по меньшей мере две последовательные борсодержащие связи. В дополнительных вариантах, по меньшей мере 5% этих связей в олигомере являются борсодержащими связями; например, в некоторых вариантах осуществления 5-95%, 10-90%, 10-50% или 10-35% связей могут быть борсодержащими связями.

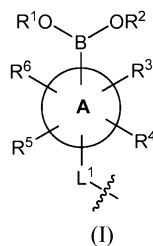
В других вариантах осуществления по меньшей мере одна из морфолино-кольцевых структур имеет следующую структуру (i):



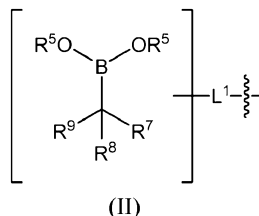
(i)

где  $P_i$  означает, в каждом случае, независимо фрагмент пар оснований.

В других вариантах вышеупомянутого олигонуклеотидного аналога фрагмент бороновой кислоты или эфира бороновой кислоты имеет, в каждом случае, независимо одну из следующих структур (I) или (II):



ИЛИ



или их фармацевтически приемлемую соль, стереоизомер или таутомер, где

$R^1$  представляет собой, в каждом случае, независимо  $N$  или алкил;

$R^2$  представляет собой H или алкил, где  $R^2$  может соединяться с одним из  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  или  $R^6$  с образованием кольца;

$R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  и  $R^6$  в каждом случае независимо отсутствуют, представляют собой H, алкил, гидроксил, гидроксипалкил, аминокпалкил, алкокси, арилкокси, галоген, нитро, цианоамидил, амин, алкиламин, ариламиноп, аралкиламин, аралкилоксикарбониламинил, алкилоксикарбониламинил, арилкоксикарбониламинил,  $-CO_2H$ , алкилкарбонил, арилкарбонил, аралкилкарбонил, аминокарбонил, алкиламиникарбонил, ариламиникарбонил, аралкиламиникарбонил, алкилоксикарбонил, алкилоксиимино или гетероарил, где один из  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  или  $R^6$  может соединяться с другим из  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  или  $R^6$  с образованием карбоциклического или гетероциклического кольца и где один из  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  или  $R^6$  может соединяться с  $R^2$  с образованием гетероциклического кольца;

$R^7$ ,  $R^8$  и  $R^9$  представляют собой, в каждом случае, независимо алкил или алкиламино;

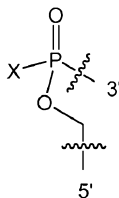
А представляет собой, в каждом случае, независимо 6-членное арильное или гетероарильное кольцо; и

L<sup>1</sup> представляет собой, в каждом случае, независимо необязательный линкер с длиной 18 атомов, содержащий фрагменты, выбранные из алкила, арила, гидроксила, алкокси, простого эфира, амина, гетероарила, фосфора, алкиламина, гуанидина, амидина, амида, сложного эфира, карбонила, сульфида, дисульфида, карбонила, карбамата, фосфородиамидата, фосфоамида, фосфоротиоата, пиперазина, фосфодиэфира и гетероцикла, где



представляет собой точку ковалентного присоединения L<sup>1</sup> к одной из межузбединичных связей, 3'-концу или 5'-концу.

В любом из вариантов этого олигонуклеотидного аналога межсубъединичные связи имеют следующую структуру (III):



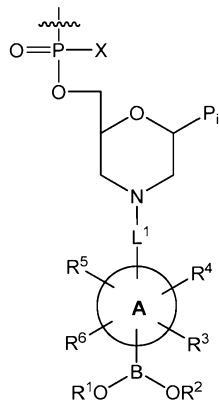
(III)

или ее фармацевтически приемлемую соль, стереоизомер или таутомер, где

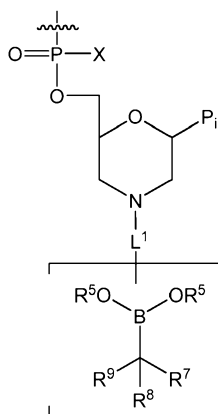
X представляет собой, в каждом случае, независимо структуру (I), структуру (II) или  $\text{-NR}^{10}\text{R}^{11}$ ; и  $\text{R}^{10}$  и  $\text{R}^{11}$  представляют собой, в каждом случае, независимо водород или  $\text{C}_1\text{-C}_6$  алкил.

В некоторых вариантах по меньшей мере один X представляет собой структуру (I) или (II). Когда X представляет собой структуру (I) или (II),  $L^1$  служит в качестве связи для ковалентного присоединения атома Р в структуре (III) к остатку структур (I) или (II). В некоторых других вариантах по меньшей мере один X представляет собой  $-N(CH_3)_2$ . В некоторых более специфических вариантах X представляет собой либо структуру (I), либо (II), либо  $-N(CH_3)_2$ , т.е. каждый X, который не имеет структуры (I) или (II), представляет собой  $-N(CH_3)_2$ . В других вариантах этот олигонуклеотидный аналог содержит от 1 до 5 межсубъединичных связей, которые содержат структуру (I) или (II), например в некоторых вариантах X в 1-5 межсубъединичных связях является структурой (I) или (II).

В некоторых вариантах 3'-конец ковалентно связан со структурой (I) или структурой (II) (через линкер  $L^1$ ) и имеет одну из следующих структур (IV) или (V):

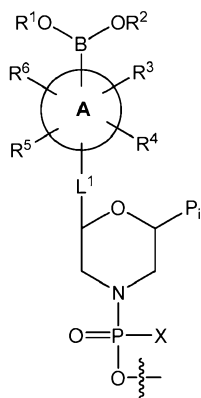


или

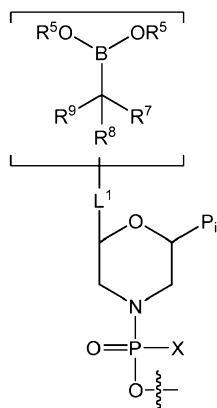


где  $P_i$  представляет собой фрагмент пар оснований.

В других вариантах 5'-конец ковалентно связан со структурой (I) или (II) (через линкер  $L^1$ ) и имеет одну из следующих структур (VI) или (VII):

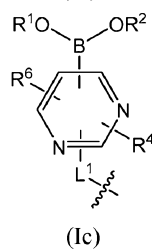
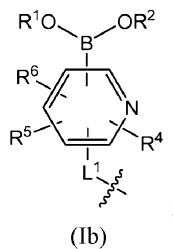
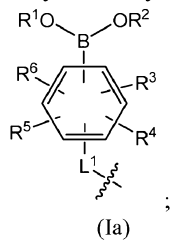


или

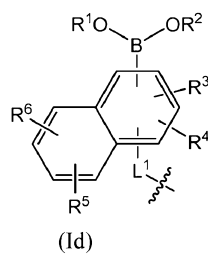


где  $P_i$  представляет собой фрагмент пар оснований.

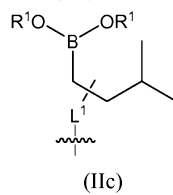
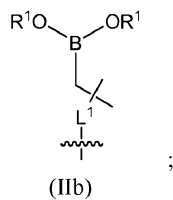
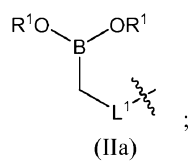
В других вариантах структура (I) имеет одну из следующих структур (Ia), (Ib), (Ic) или (Id):



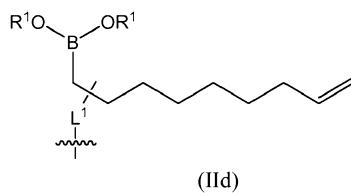
или



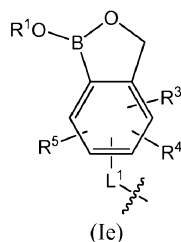
Другие варианты включают в себя примеры, где структура (II) имеет одну из следующих структур (IIa), (IIb), (IIc) или (IId):



или



В любом из вышеупомянутых вариантов структуры (I)  $R^2$  соединяется с одним из  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  или  $R^6$  с образованием гетероциклического кольца. Например, в некоторых вариантах структура (I) имеет следующую структуру (Ie):



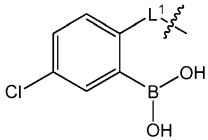
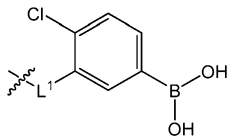
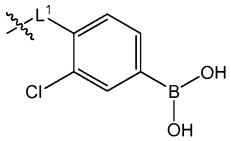
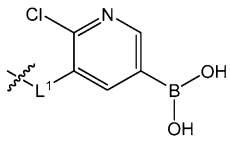
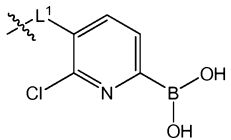
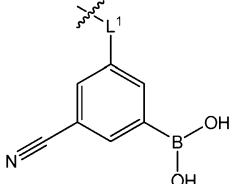
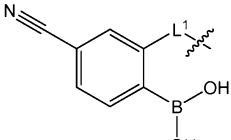
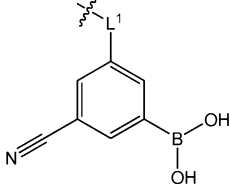
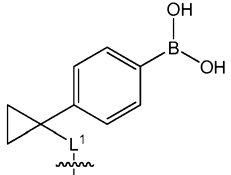
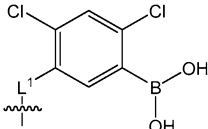
В некоторых вариантах любого из предшествующих вариантов структур (I) или (II) по меньшей мере один  $R^1$  представляет собой H или  $R^2$  представляет собой H. Например, в некоторых вариантах каждый  $R^1$  и  $R^2$  представляет собой H.

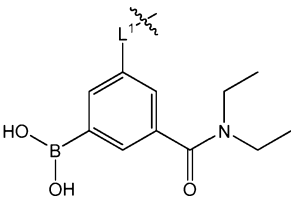
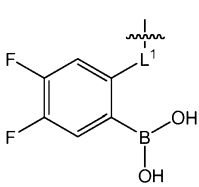
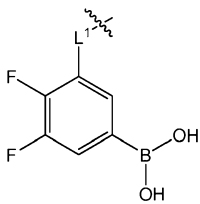
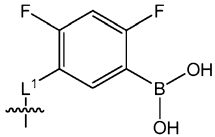
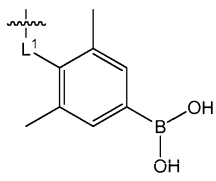
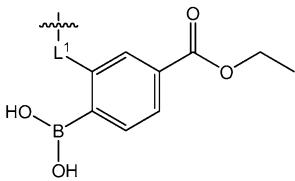
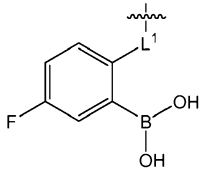
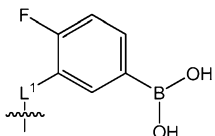
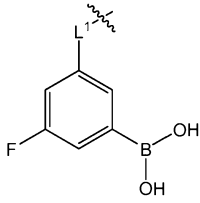
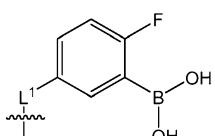
В других вариантах вышеуказанных формул каждый из  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  и  $R^6$  независимо отсутствует, представляет собой H, гидроксил, алкил, гидроксильный алкил, аминоалкил, алкокси, арилокси, галоген, нитро, цианоамидил, амина, алкиламина, арилоксикарбониламинил,  $-CO_2H$ , алкилоксикарбонил, алкилокси-мино или гетероарил.

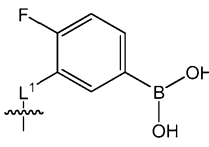
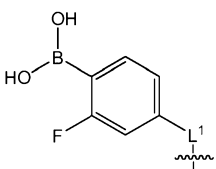
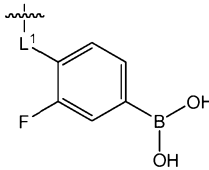
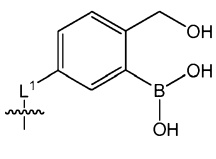
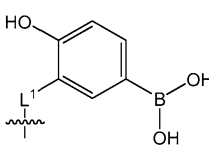
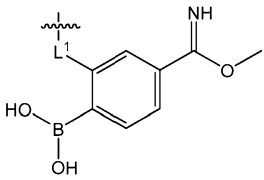
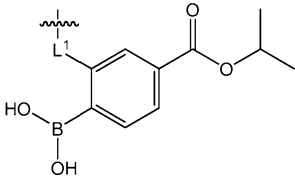
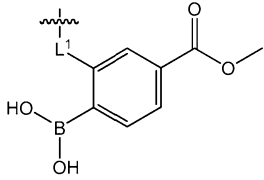
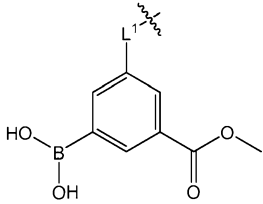
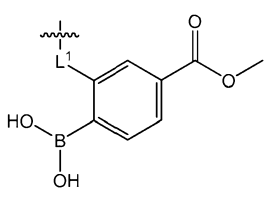
В более конкретных вариантах вышеупомянутых структур структура (I) имеет структуру, выбранную из любых структур, изображенных в табл. 1 ниже.

Таблица 1. Репрезентативные боросодержащие фрагменты

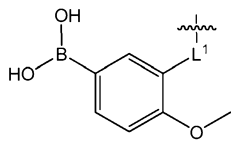
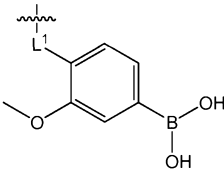
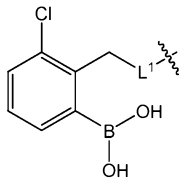
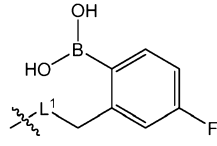
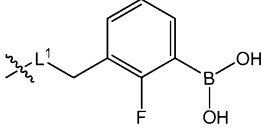
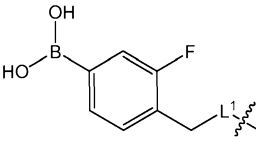
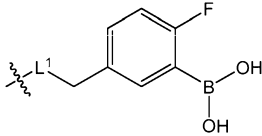
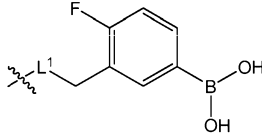
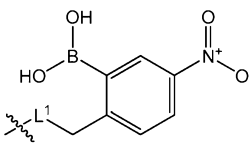
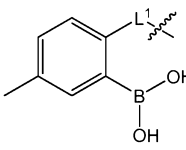
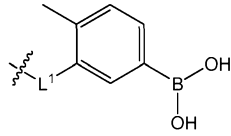
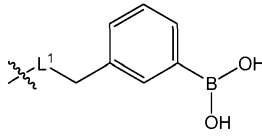
№	Структура	№	Структура
1		2	
3		4	
5		6	
7		8	

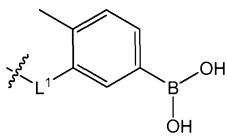
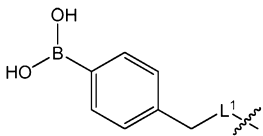
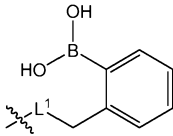
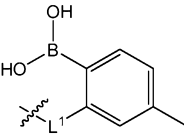
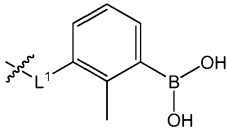
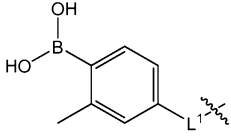
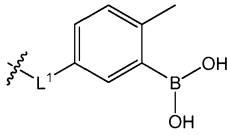
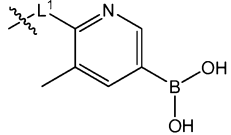
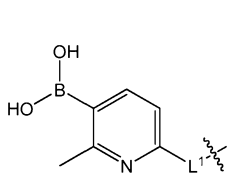
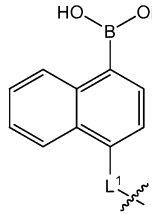
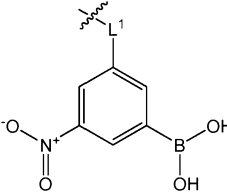
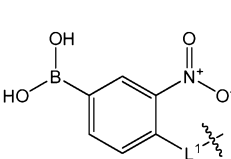
№	Структура	№	Структура
9		10	
11		12	
13		14	
15		16	
17		18	

№	Структура	№	Структура
19		20	
21		22	
23		24	
25		26	
27		28	

№	Структура	№	Структура
29		30	
31		32	
33		34	
35		36	
37		38	

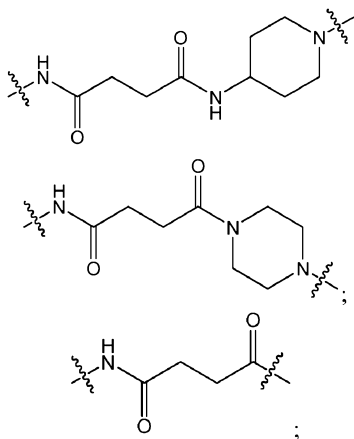


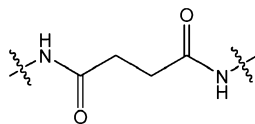
№	Структура	№	Структура
39		40	
41		42	
43		44	
45		46	
47		48	
49		50	

№	Структура	№	Структура
51		52	
53		54	
55		56	
57		58	
59		60	
61		62	

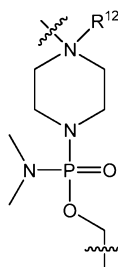
№	Структура	№	Структура
63		64	
65		66	
67		68	
69		70	
71		72	
73			

Как отмечалось выше, линкер  $L^1$  является необязательным и служит в качестве точки ковалентного присоединения между остатком структуры (I) или (II) и межсубъединичной связью, 3'-концом или 5'-концом олигонуклеотидного аналога. Фактическая структура и длина этого линкера не является критической, пока она обеспечивает ковалентную точку присоединения и не мешает связыванию этого олигонуклеотидного аналога с его последовательностью-мишенью. Амидная связь обеспечивает легкий способ для ковалентного присоединения (I) или (II) к олигонуклеотидному аналогу, и в некоторых вариантах  $L^1$  содержит амидные связи. В других более специфических вариантах  $L^1$  имеет одну из следующих структур:



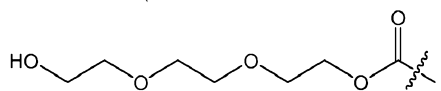


или

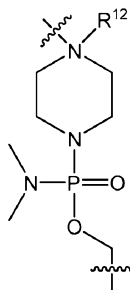


где  $R^{12}$  отсутствует, является H или  $C_1$ - $C_6$ -алкилом.

В некоторых вариантах вышеупомянутых олигомеров 3'- или 5'-конец может быть модифицирован таким образом, что он содержит фрагмент, улучшающий растворимость. Такие фрагменты включают в себя триэтиленгликоль, который может быть связан с этим олигонуклеотидом через линкер  $L^1$ . Таким образом, некоторые варианты включают в себя олигонуклеотидные аналоги, имеющие следующий фрагмент, ковалентно связанный на 3'- или 5'-конце



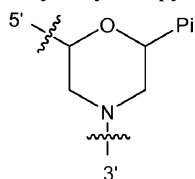
В конкретных вариантах, вышеуказанный фрагмент триэтиленгликоля ковалентно присоединен на 5'-конце через следующий линкер  $L^1$ :



Рассматриваются также композиции, содержащие этот олигонуклеотидный аналог любого из вышеуказанных вариантов и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции описаны более подробно ниже.

#### В. Свойства олигомеров.

Как отмечалось выше, данное раскрытие изобретения направлено на олигомер, содержащий фрагменты бороновой кислоты или эфира бороновой кислоты, которые придают желаемые свойства (например, лучшее проникновение в клетки, время пребывания и т.д.) олигомерам. В некоторых вариантах этот олигомер содержит основную цепь, содержащую последовательность морфолино-кольцевых структур, соединенных межсубъединичными связями, причем эти межсубъединичные связи соединяют 3'-конец одной морфолино-кольцевой структуры с 5'-концом соседней морфолино-кольцевой структуры, где каждая морфолино-кольцевая структура связана с фрагментом пар оснований, так что этот олигомер может связываться последовательность-специфическим образом с нуклеиновой кислотой-мишенью. Эти морфолино-кольцевые структуры могут иметь следующую структуру (i):



(i)

где  $P_i$  представляет собой, в каждом случае, независимо фрагмент пар оснований.

Каждая морфолино-кольцевая структура несет фрагмент пар оснований ( $P_i$ ) для образования последовательности фрагментов пар оснований, которая сконструирована для гибридизации с выбранной антимисловый мишенью в клетке или в субъекте, получающем лечение. Этот фрагмент пар оснований может быть пурином или пиримидином, обнаруженным в нативных ДНК или РНК (A, G, C, T или U), или аналогом, таким как гипоксантин (компонент основания нуклеозида инозина) или 5-метилцитозин.

Основания-аналоги, которые придают улучшенную аффинность связывания с этим олигомером, могут быть также использованы. Примерные аналоги в этом отношении включают в себя C<sub>5</sub>-пропинил-модифицированные пиримидины, 9-(аминоэтокси)феноксазин (G-clamp) и т.п.

Как отмечалось выше, этот олигомер может быть модифицирован в соответствии с одним аспектом этого изобретения для включения одной или нескольких связей, содержащих структуру (I) или (II), например, до приблизительно 1 на каждые 2-5 связей, обычно 3-5 на каждые 10 связей. Некоторые варианты включают в себя также одну или несколько связей, содержащих структуру (I) или (II).

В одном варианте осуществления связи, содержащие структуру (I) или (II), разбросаны вдоль основной цепи. В некоторых вариантах осуществления этот олигомер не имеет строго чередующуюся картину связей, содержащую связи структуры (I) или (II), вдоль его полной длины. Эти олигомеры могут необязательно содержать структуру (I) или (II), ковалентно связанные с 5'-и/или 3'-концом.

Олигомеры для использования в антисмысловых применениях обычно ранжируются по длине от приблизительно 10 до приблизительно 40 субъединиц, более предпочтительно от приблизительно 15 до 25 субъединиц. Например, один олигомер этого изобретения, имеющий 19-20 субъединиц, подходящую длину для антисмыслового олигомера, может в идеале иметь две-семь, например четыре-шесть или три-пять связей, содержащих структуру (I) или (II). Олигомер, имеющий 14-15 субъединиц, может в идеале иметь две-пять, например, 3 или 4, связей, содержащих структуру (I) или (II).

В некоторых вариантах для антисмысловых применений этот олигомер может иметь 100%-ную комплементарность с последовательностью нуклеиновой кислоты-мишени, или он может включать в себя ошибочные спаривания, например, для аккомодации вариантов, пока гетеродуплекс, образуемый между этим олигомером и нуклеиновой кислотой-мишенью является достаточно стабильным для противостояния действию клеточных нуклеаз и других способов дегградации, которые могут встречаться *in vivo*. Ошибочные спаривания, если они присутствуют, являются менее дестабилизирующими в отношении концевых районов этого гибридного дуплекса, чем в середине. Количество позволяемых ошибочных спариваний будет зависеть от длины олигомера, процента пар оснований G:C в этом дуплексе и положения ошибочных оснований, в соответствии с хорошо понимаемыми принципами стабильности дуплекса. Хотя такой антисмысловый олигомер необязательно имеет 100%-ную комплементарность относительно последовательности нуклеиновой кислоты-мишени, он является эффективным для стабилизации и специфического связывания с последовательностью-мишенью, так что биологическая активность нуклеиновой кислоты-мишени, например, экспрессия кодируемого белка (кодируемых белков) модулируется.

Стабильность дуплекса, образованного между олигомером и последовательностью-мишенью, является функцией T<sub>m</sub> и чувствительности этого дуплекса к клеточному ферментативному расщеплению. T<sub>m</sub> антисмыслового соединения относительно комплементарной последовательности РНК может быть измерена общепринятыми способами, такими как способы, описанные Hames et al., *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, 1985, p. 107-108, или описанные в Miyada C.G. and Wallace R.B., 1987, *Oligonucleotide hybridization techniques*, *Methods Enzymol.* Vol. 154, p. 94-107.

В некоторых вариантах осуществления каждый антисмысловый олигомер имеет T<sub>m</sub> связывания в отношении комплементарной последовательности РНК, большую, чем температура тела, или, в других вариантах, большую чем 50°C. В других вариантах T<sub>m</sub> находятся в диапазоне 60-80°C или более. В соответствии с хорошо известными принципами T<sub>m</sub> олигомерного соединения относительно РНК-гибрида с комплементарными основаниями может быть увеличена увеличением отношения оснований C:G в этом дуплексе, и/или увеличением длины (в парах оснований) этого гетеродуплекса. В то же самое время для целей оптимизации клеточного поглощения может быть выгодным ограничение размера этого олигомера. По этой причине соединения, которые обнаруживают высокую T<sub>m</sub> (50°C или более) при длине 20 оснований или менее, являются обычно предпочтительными в сравнении с соединениями, требующими более, чем 20 оснований для высоких величин T<sub>m</sub>. Для некоторых применений, более длинные олигомеры, например, более длинные, чем 20 оснований, могут иметь определенные преимущества. Например, в некоторых вариантах осуществления более длинные олигомеры могут найти конкретное применение для использования в пропуске экзона или сплайсинговой модуляции.

Основания нацеливающей последовательности могут быть нормальными основаниями ДНК или их аналогами, например урацилом и инозином, которые способны к спариванию оснований по Уотсону-Крику с основаниями РНК-последовательности-мишени.

Эти олигомеры могут также включать в себя гуаниновые основания вместо аденина, когда нуклеотид-мишень является остатком урацила. Выгодно, когда последовательность-мишень варьируется в различных вирусных видах, и это варьирование в любом конкретном нуклеотидном остатке является либо цитозином, либо урацилом. С использованием гуанина в нацеливающем олигомере в положении вариативности, может быть использована хорошо известная способность гуанина спариваться с урацилом (называемая спариванием оснований C/U:G). Посредством включения гуанина в этих положениях, один единственный олигомер может эффективно нацеливаться на более широкий диапазон вариативности РНК.

Эти олигомеры могут существовать в различных изомерных формах, например структурных изомерах (например, таутомерах). В отношении стереоизомеров эти соединения могут иметь хиральные цен-

тры и могут встречаться в виде рацематов, энантимерно обогащенных смесей, индивидуальных энантимеров, смесей диастереомеров или индивидуальных диастереомеров. Все такие изомерные формы включены в данное изобретение, в том числе их смеси. Эти соединения могут также иметь аксиальную хиральность, которая может приводить к атропоизомерам. Кроме того, некоторые кристаллические формы этих соединений могут существовать в виде полиморфов, которые включены в данное изобретение. Кроме того, некоторые из этих соединений могут также образовывать сольваты с водой или другими органическими растворителями. Такие сольваты также включены в объем этого изобретения.

Олигомеры, описанные здесь, могут быть использованы в способах ингибирования продуцирования белка или репликации вируса. Таким образом, в одном варианте осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую такой белок, подвергали действию олигомера, описанного здесь. В дополнительных вариантах упомянутого выше, этот антисмысловой олигомер содержит фрагменты В пар оснований, которые образуют последовательность, эффективную для гибридизации с частью нуклеиновой кислоты-мишени в местоположении, эффективном для ингибирования продуцирования этого белка. В одном варианте осуществления, этим местоположением является район стартового кодона АТГ мРНК, сайт сплайсинга пре-мРНК или последовательность-мишень вируса, как описано ниже.

В одном варианте осуществления этот олигомер имеет  $T_m$  в отношении связывания с последовательностью-мишенью, большую, чем приблизительно  $50^{\circ}\text{C}$ , и он поглощается клетками млекопитающих или бактериальными клетками. Приготовление и свойства морфолино-олигомеров описаны более подробно ниже и в патенте США № 5185444 и WO 2009/064471, каждый из которых включен здесь посредством ссылки в его полном виде.

#### С. Приготовление и введение олигомеров.

Данное описание изобретения обеспечивает также приготовление и доставку описанного олигомера. Соответственно, в одном варианте данное изобретение направлено на композицию, содержащую олигомер, описанный здесь, и фармацевтически приемлемый носитель.

Эффективная доставка антисмыслового олигомера к нуклеиновой кислоте-мишени является важным аспектом лечения. Пути доставки антисмыслового олигомера включают в себя, но не ограничиваются ими, различные системные пути, включающие в себя пероральный и парентеральный пути, например, внутривенную, подкожную, внутрибрюшинную и внутримышечную доставку, а также доставку ингаляцией, чрескожную и локальную доставку. Подходящий путь может быть определен квалифицированным в данной области специалистом в соответствии с состоянием субъекта, получающего лечение. Например, подходящим путем для доставки антисмыслового олигомера в лечении вирусной инфекции кожи является локальная доставка, тогда как доставка антисмыслового олигомера для лечения вирусной респираторной инфекции является ингаляцией. Этот олигомер может также доставляться непосредственно в участок вирусной инфекции или в кровоток.

Этот антисмысловой олигомер может быть введен в любом подходящем носителе, который является физиологически и/или фармацевтически приемлемым. Такая композиция может включать в себя любую из различных стандартных фармацевтически приемлемых носителей, используемых специалистами с обычной квалификацией в данной области. Примеры включают в себя, но не ограничиваются ими, солевой раствор, забуференный фосфатом солевой раствор (ЗФР), воду, водный спирт, эмульсии, такие как эмульсии типа масло в воде или триглицеридные эмульсии, таблетки и капсулы. Выбор подходящего физиологически приемлемого носителя будет варьироваться в зависимости от выбранного способа введения.

Соединения (например, олигомеры) данного изобретения могут обычно использоваться в виде свободной кислоты или свободного основания. Альтернативно, соединения этого изобретения могут быть использованы в форме кислотно-аддитивных или основно-аддитивных солей. Кисотно-аддитивные соли соединений со свободными аминогруппами данного изобретения могут быть получены способами, хорошо известными в данной области, и могут быть образованы из органических и неорганических кислот. Подходящие органические кислоты включают в себя малеиновую, фумаровую, бензойную, аскорбиновую, янтарную, метансульфоновую, уксусную, трифторуксусную, щавелевую, пропионовую, винную, салициловую, лимонную, глюконовую, молочную, миндальную, коричную, аспарагиновую, стеариновую, пальмитиновую, гликолевую, глутаминовую и бензолсульфоновую кислоты. Подходящие неорганические кислоты включают в себя хлористоводородную, бромистоводородную, серную, фосфорную и азотную кислоты. Основно-аддитивные соли включают в себя соли, которые образуются с карбоксилатным анионом и включают в себя соли, образованные с органическими и неорганическими катионами, такими как катионы, выбранные из щелочных и щелочно-земельных металлов (например, лития, натрия, калия, магния, бария и кальция), а также иона аммония и его замещенных производных (например, дибензиламмония, бензиламмония, 2-гидроксиэтиламмония и т.п.). Таким образом, подразумевается, что термин "фармацевтически приемлемая соль" структуры (I) включает в себя любые и все приемлемые формы солей.

Кроме того, пролекарства также включены в контексте этого изобретения. Пролекарства являются любыми ковалентно связанными носителями, которые выделяют соединение структуры (I) *in vivo*, когда такое пролекарство вводят пациенту. Пролекарства готовят в основном модификацией функциональных

групп таким образом, что эта модификация расщепляется, или рутинной манипуляцией или *in vivo*, образуя исходное соединение. Пролекарства включают в себя, например, соединения этого изобретения, где гидроксильная, аминная или сульфгидрильная группы связаны с любой группой, которая при введении пациенту расщепляется с образованием гидроксильной, аминной или сульфгидрильной групп. Таким образом, репрезентативные примеры пролекарств включают в себя (но не ограничиваются ими) ацетат (и эфиры, обычно, например, эфиры бороновой кислоты), формиатные и бензоатные производные спирта и аминокислотных групп соединений структуры (I). Далее, в случае карбоновой кислоты ( $-\text{COOH}$ ), могут использоваться эфиры, такие как метиловые эфиры, этиловые эфиры и т.п.

В некоторых случаях, для облегчения поглощения антисмысловых олигонуклеотидов в клетки могут использоваться липосомы. (См., например, Williams S.A., *Leukemia* 10(12): 1980-1989, 1996; Lapalainen et al., *Antiviral Res.* 23: 119, 1994; Uhlmann et al., *antisense oligonucleotides: a new therapeutic principle*, Chemical Reviews, Volume 90, No. 4, pages 544-584, 1990; Gregoriadis G., Chapter 14, *Liposomes, Drug Carriers in Biology and Medicine*, pp. 287-341, Academic Press, 1979). Гидрогели могут быть также использованы в качестве носителей для введения антисмыслового олигомера, например, как описано в WO 93/01286. Альтернативно, эти олигонуклеотиды могут быть введены в микросферах или микрокапсулах. (См., например, Wu G.Y. and Wu C.H., *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432, 1987). Альтернативно, использование наполненных газом микропузырьков в комплексе с антисмысловыми олигомерами могут усиливать доставку к тканям-мишеням, как описано в патенте США № 6245747. Могут быть также использованы композиции медленного высвобождения. Они могут включать в себя полупроницаемые полимерные матрицы в виде сформированных изделий, таких как пленки или микрокапсулы.

В одном варианте осуществления антисмысловое ингибирование является эффективным в лечении инфекции животного-хозяина вирусом, контактированием клетки, инфицированной этим вирусом с антисмысловым агентом, эффективным для ингибирования репликации этого специфического вируса. Антисмысловый агент вводят субъекту-млекопитающему, например человеку или домашнему животному, инфицированному конкретным вирусом, в подходящем фармацевтическом носителе. Предполагается, что этот антисмысловый олигонуклеотид задерживает рост РНК-вируса в этом хозяине. Этот РНК-вирус может быть уменьшен в количестве или элиминирован с малым вредным действием или без вредного действия на нормальный рост или развитие хозяина.

В одном аспекте этого способа этим субъектом является субъект-человек, например пациент, диагностированный как имеющий локализованную или системную вирусную инфекцию. Состояние пациента может также диктовать профилактическое введение антисмыслового олигомера этого изобретения, например, в случае пациента, который (1) имеет ослабленный иммунитет; (2) является пострадавшим от ожога (3) имеет постоянный катетер или (4) готовится к подверганию хирургии или недавно подвергся хирургии. В одном предпочтительном варианте этот олигомер является фосфородиамидатным морфолино-олигомером, содержащимся в фармацевтически приемлемом носителе, и доставляется перорально. В другом предпочтительном варианте этот олигомер является фосфородиамидатным морфолино-олигомером, содержащимся в фармацевтически приемлемом носителе, и доставляется внутривенно (*i.v.*).

В другом применении этого способа субъектом является сельскохозяйственное животное, например курица, индейка, свинья, корова или коза и т.д., и лечение является либо профилактическим, либо терапевтическим. Это изобретение включает в себя также кормовую композицию для скота и птицы, содержащую хлебное продовольственное зерно, дополненное субтерапевтическим количеством антивирусного антисмыслового соединения типа, описанного выше. Также предполагается, в способе кормления скота и птицы хлебным продовольственным зерном, дополненным субтерапевтическими уровнями антивирусного агента, улучшение, в котором хлебное продовольственное зерно добавляют с субтерапевтическим количеством антивирусной олигонуклеотидной композиции, описанной выше.

В одном варианте осуществления это антисмысловое соединение вводят в количестве и способом, эффективными для получения максимальной концентрации в крови по меньшей мере 200-400 нМ антисмыслового олигомера. Обычно вводят одну или несколько доз антисмыслового олигомера, в основном при регулярных интервалах, в течение периода приблизительно от одной недели до двух недель. Предпочтительными дозами для перорального введения являются дозы приблизительно 1-1000 мг олигомера на 70 кг. В некоторых случаях, могут быть необходимыми дозы, большие, чем 1000 мг олигомера на пациента. Для *i.v.* введения предпочтительные дозы равны от приблизительно 0,5 до 1000 мг олигомера на 70 кг. Этот антисмысловый олигомер может вводиться при регулярных интервалах в течение короткого периода времени, например, один раз в день в течение двух недель или менее. Однако в некоторых случаях этот олигомер вводят периодически на протяжении большего периода времени. Введение может сопровождаться введением или быть совместным с введением антибиотика или другим терапевтическим лечением. Схема лечения может корректироваться (доза, частота введения, способ и т.д.), как указано, на основании результатов иммуноанализов, других биохимических тестов и физиологического испытания субъекта, подвергающегося лечению.

Эффективная схема лечения *in vivo*, использующая антисмысловые олигонуклеотиды этого изобретения, может варьироваться в соответствии с продолжительностью, дозой, частотой и способом введения, а также состоянием субъекта во время лечения (т.е. профилактического введения в сравнении с вве-

дением в ответ на локализованную или системную инфекцию). Таким образом, такая терапия *in vivo* будет часто требовать мониторинга посредством тестов, подходящих для конкретного типа вирусной инфекции, подвергаемой лечению, и соответствующих корректировок в дозе или схеме лечения, для достижения оптимального терапевтического исхода. Лечение может быть подвергнуто мониторингу, например, посредством основных индикаторов заболевания и/или инфекции, таких как полный клинический анализ крови (CBC), способы детектирования нуклеиновых кислот, иммунодиагностические тесты, вирусная культура или детектирование гетеродуплекса.

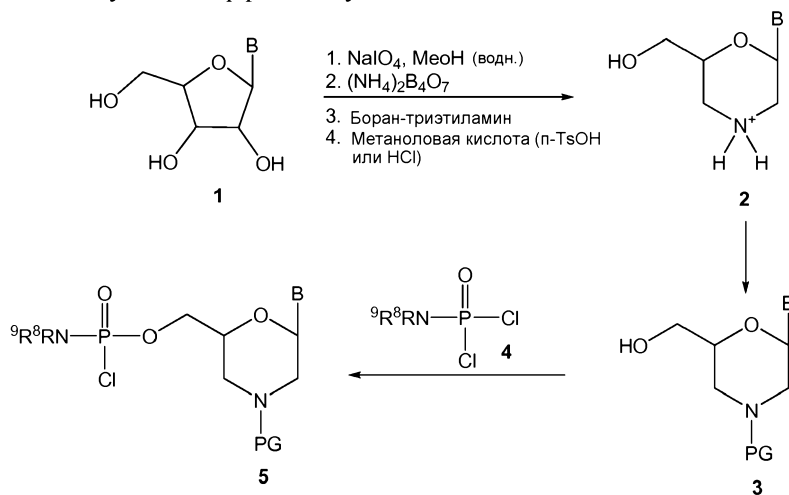
Эффективность вводимого *in vivo* антивирусного антисмыслового олигомера этого изобретения в ингибировании или элиминации роста одного или нескольких типов РНК-вируса может быть определена из биологических проб (ткани, крови, мочи и т.д.), взятых из субъекта до, во время и после введения антисмыслового олигомера. Анализ таких проб включает в себя (1) мониторинг присутствия или отсутствия образования гетеродуплекса с последовательностью мишени и не-мишени, с использованием процедур, известных квалифицированным в данной области специалистам, например, анализа подвижности в электрофоретическом геле; (2) мониторинга количества продукции вирусного белка, определяемого стандартными способами, такими как ELISA или Вестерн-блоттинг, или (3) измерение действия на вирусный титр, например способом Spearman-Kärber. (См., например, Pari G.S. et al., *Antimicrob. Agents and Chemotherapy* 39(5): 1157-1161, 1995; Anderson K.P. et al., *Antimicrob. Agents and Chemotherapy* 40(9):2004-2011, 1996, Cottral G.E. (ed) in: *Manual of Standard Methods for Veterinary Microbiology*, pp. 60-93, 1978).

В некоторых вариантах осуществления этот олигомер активно поглощается клетками млекопитающих. В дополнительных вариантах этот олигомер может быть конъюгирован с транспортным фрагментом (например, транспортным пептидом) как описано здесь, для облегчения такого поглощения.

#### D. Получение олигомеров.

Морфолино-субъединицы, модифицированные межсубъединичные связи и олигомеры, содержащие их, могут быть получены, как описано в примерах и в патентах США с номерами 5185444 и 7943762, которые включены здесь посредством ссылки в их полном виде. Эти морфолино-субъединицы могут быть получены в соответствии со следующей основной схемой реакции 1.

#### Схема реакции 1. Получение морфолино-субъединиц



Со ссылкой на схему реакции 1, где В представляет собой фрагмент пар оснований и PG представляет собой защитную группу, морфолино-субъединицы могут быть получены из соответствующего рибонуклеозида (1), как показано. Эта морфолино-субъединица (2) может быть необязательно защищена реакцией с предшественником подходящей защитной группы, например тритилхлоридом. Эта 3'-защитная группа обычно удаляется во время синтеза олигомера в твердом состоянии, как описано более подробно ниже. Фрагмент пар оснований может быть подходящим образом защищен для синтеза твердофазного олигомера. Подходящие защитные группы включают в себя бензоил для аденина и цитозина, фенилацетил для гуанина и пивалоилоксиметил для гипоксантина (I). Эта пивалоилоксиметильная группа может быть введена на положение N1 гетероциклического основания гипоксантина. Хотя может быть использована незащищенная субъединица гипоксантина, выходы в реакциях с активацией являются высокопревосходящими, когда это основание является защищенным. Другие подходящие защитные группы включают в себя группы, описанные в рассматриваемой совместно заявке на патент США № 12/271040, которая включена здесь посредством ссылки в полном виде.

Реакция 3 с активированным фосфорным соединением 4 приводит к морфолино-субъединицам, имеющим фрагмент желаемой связи (5). Соединения структуры 4 могут быть получены с использованием любого количества способов, известных квалифицированным в данной области специалистам. Например, такие соединения могут быть получены реакцией соответствующего амина и оксихлорида фос-



фора. В этом отношении может быть получено аминное исходное вещество с использованием любого способа, известного в данной области, например, способов, описанных в примерах и в патенте США № 7943762. Хотя приведенная выше схема изображает получение связей типа (B) (например, X означает  $-NR^8R^9$ ), связи типа (A) (например, X означает диметиламин) могут быть получены аналогичным образом.

Соединения структуры 5 могут быть использованы в твердофазном автоматизированном синтезе олигомера для получения олигомеров, содержащих межсубъединичные связи. Такие способы хорошо известны в данной области. Вкратце, соединение структуры 5 может быть модифицировано на 5'-конце, чтобы содержать линкер с твердым носителем. Например, соединение 5 может быть связано с твердым носителем линкером, содержащим  $L^1$ . Таким образом, этот олиго может содержать 5'-концевую модификацию после завершения синтеза олигомера и этот олигомер отщепляют от твердого носителя. После нанесения на подложку, защитную группу 5 (например, тритил) удаляют и свободный амин реагирует с активированным фосфором фрагментом второго соединения структуры 5. Эту последовательность реакций повторяют, пока не будет получен олиго желаемой длины. Защитная группа в 5'-конце может быть либо удалена, либо оставлена, если желательна 5'-модификация. Этот олиго может быть удален из твердого носителя с использованием любого количества способов или, например, обработкой основанием для отщепления связи с твердым носителем.

Получение морфолино-олигомеров, содержащих фрагменты бороновой кислоты или эфира бороновой кислоты, описано более подробно в примерах. Обычно фрагмент бороновой кислоты (или эфира) получают в соответствии со способами, известными в данной области. Подходящую связь, например содержащий карбоновую кислоту фрагмент, ковалентно присоединяют к фрагментам бороновой кислоты. Затем конъюгацию фрагмента бороновой кислоты завершают активацией бороновой кислоты подходящим активирующим агентом (например, EDC и т.п.) в присутствии олигомера, содержащего свободный амин.

Е. Способы лечения заболеваний олигомерами.

В других вариантах осуществления данное изобретение относится к способу лечения заболевания у субъекта-млекопитающего, предусматривающему введение терапевтически эффективного количества олигонуклеотидного аналога по любому из пунктов предыдущей формулы изобретения, субъекту, нуждающемуся в этом.

Данное раскрытие изобретения обеспечивает также способ ингибирования продукции белка, предусматривающий подвергание нуклеиновой кислоты, кодирующей этот белок, действию олигомера, как описано здесь. Таким образом, в одном варианте нуклеиновую кислоту, кодирующую такой белок, подвергают действию антисмыслового олигомера, содержащего по меньшей мере один фрагмент бороновой кислоты или эфира бороновой кислоты, как описано здесь, где фрагменты пар оснований  $P_i$  образуют последовательность, эффективную в гибридизации части этой нуклеиновой кислоты в местоположении, эффективном для ингибирования продукции этого белка. Этот олигомер может таргетировать (нацеливать на), например, район стартового кодона ATG мРНК, сайт сплайсинга пре-мРНК или вирусную последовательность-мишень, как описано ниже.

В другом варианте это раскрытие изобретения обеспечивает способ усиления антисмысловой активности олигомера, имеющего последовательность морфолино-субъединиц, соединенных межсубъединичными связями, поддерживающих фрагменты пар оснований, предусматривающий модификацию олигомера, описанного здесь, по меньшей мере одним фрагментом бороновой кислоты или эфира бороновой кислоты.

В некоторых вариантах усиление антисмысловой активности может доказываться:

(i) уменьшением экспрессии кодируемого белка, относительно экспрессии, обеспечиваемой соответствующим немодифицированным олигомером, когда связывание антисмыслового олигомера с его последовательностью-мишенью является эффективным для блокирования стартового кодона трансляции для этого кодируемого белка; или

(ii) увеличением экспрессии кодируемого белка, относительно экспрессии, обеспечиваемой соответствующим немодифицированным олигомером, когда связывание антисмыслового олигомера с его последовательностью-мишенью является эффективным для блокирования аберрантного сайта сплайсинга в пре-мРНК, которая кодирует указанный белок, при правильном сплайсинге. Анализы, подходящие для измерения этих эффектов, описаны дополнительно ниже. В одном варианте модификация обеспечивает эту активность в бесклеточном анализе трансляции, анализе трансляции с коррекцией сплайсинга в клеточной культуре или увеличении функции коррекции сплайсинга в модельной системе животных, как описано здесь. В одном варианте активность увеличивается по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в пять раз или по меньшей мере в десять раз.

Ниже описываются различные примерные применения олигомеров этого изобретения. Это описание никоим образом не предназначено для ограничения этого изобретения и служит для демонстрации диапазона состояний заболевания человека и животного, которые могут получить пользу с использованием олигомеров, содержащих модифицированные межсубъединичные связи, описанные здесь.

1. Нервно-мышечные заболевания.

В некоторых вариантах осуществления это заболевание является нервно-мышечным заболеванием, например мышечной дистрофией Дюшенна. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотидный аналог для лечения нервно-мышечного заболевания может быть выбран из группы, состоящей из:

(а) антисмыслового олигомера, нацеленного против миостатина человека, имеющего последовательность оснований, комплементарную по меньшей мере 12 смежным основаниям в районе-мишени мРНК миостатина человека, идентифицированного посредством SEQ ID NO: 1, для лечения состояния мышечного истощения (гипотрофии), описанного ранее (См., например, патент США № 12/493140, который включен здесь посредством ссылки, и публикацию PCT WO 2006/086667). Примерные мышечные нацеливающие последовательности перечислены как SEQ ID NO: 2-4.

(b) антисмыслового олигомера, способного продуцировать пропускание экзона в белке DMD (дистрофине), таком как РМО, имеющий последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 5-18 и 39, для восстановления частичной активности белка дистрофина, для лечения DMD, как описано ранее (см., например, публикацию PCT с номерами WO 2010/048586 и WO 2006/000057 или публикацию патента США с номером US 09/061960, все из которых включены здесь посредством ссылки).

Несколько других нервно-мышечных заболеваний могут лечиться с использованием олигомеров данного изобретения. Примерные соединения для лечения атрофии поясничных мышц (SMA) и миотонической дистрофии (DM) обсуждаются ниже.

SMA является аутосомальным рецессивным заболеванием, вызываемым хронической потерей альфа-мотонейронов в спинном мозге и может влиять как на детей, так и на взрослых. Уменьшенная экспрессия мотонейрона выживания (SMN) является ответственной за это заболевание (Hua, Sahashi et al. 2010). Мутации, которые вызывают SMA, локализованы в гене SMN1, но паралогический ген, SMN2, может позволить жизнеспособность компенсацией потери SMN1, если он экспрессируется из альтернативного экзона 7 (delta7 SMN2) с дефектом формы сплайсинга. Было показано, что антисмысловые соединения, нацеленные на интрон 6, экзон 7 и интрон 7, все, индуцируют включение экзона 7 до варьирующей степени. Антисмысловые соединения, нацеленные на интрон 7, используют в некоторых вариантах (см., например, публикации PCT с номерами WO 2010/148249, WO 2010/120820, WO 2007/002390 и патент США с номером 7838657). Примерные антисмысловые последовательности, которые нацелены на SMN2 пре-мРНК и индуцируют улучшенное включение экзона 7, перечислены ниже как SEQ ID NO: 19-21. Предполагается, что отобранные модификации этих олигомерных последовательностей, использующих фрагменты бороновой кислоты или эфира бороновой кислоты, могли бы иметь улучшенные свойства в сравнении со свойствами, известными в данной области. Кроме того, предполагается, что любой олигомер, нацеленный на интрон 7 гена SMN2 и объединяющий признаки данного изобретения, имеет потенциал индуцирования включения экзона 7 и обеспечения терапевтической пользы SMA-пациентам. Миотоническая дистрофия типа 1 (DM1) и типа 2 (DM2) являются доминантно наследуемыми нарушениями, вызываемыми экспрессией токсичных РНК, приводящих к нервно-мышечной дегенерации. DM1 и DM2 ассоциированы с длинными повторами polyCUG и polyCCUG в районах 3'-UTR и интрона 1 транскрипта *dystrophia myotonica* протеинкиназы (DMPK) и белка 9 "цинковые пальцы" 9(ZNF9), соответственно (см., например, WO 2008/036406). В то время как здоровые индивидуумы имеют 30 повторов CTG, пациенты с DM1 несут большие количества повторов, в диапазоне от 50 до тысяч. Тяжесть заболевания и возраст появления коррелируют с количеством повторов. Пациенты с появлением заболевания во взрослом возрасте обнаруживают мягкие симптомы и имеют менее 100 повторов, пациенты с появлением DM1 в юношеском возрасте несут 500 повторов, и врожденные случаи имеют около тысячи повторов CTG. Распространившиеся транскрипты, содержащие повторы CUG, образуют вторичную структуру, накапливаются в ядре в форме ядерных очагов и изолируют РНК-связывающие белки (RNA-BP). Несколько RNA-BP подозревались в причастности к этому заболеванию, в том числе muscleblind-подобные белки (MBNL) и CUG-связывающий белок (CUGBP). Белки MBNL являются гомологичными белками muscleblind (MBL) *Drosophila*, необходимыми для фоторецептора и мышечной дифференцировки. MBNL и CUGBP были идентифицированы как антагонистические регуляторы сплайсинга транскриптов, поражаемых в DM1, таких как сердечный тропонин (cTNT), рецептор инсулина (IR) и мышечно-специфический хлоридный канал (ClC-1).

В данной области известно, что антисмысловые олигонуклеотиды, нацеленные на расширяющиеся повторы гена DMPK, могут вытеснять изолирование RNA-BP и обращать симптомы миотонии в модели DM1 животного (WO 2008/036406). Предполагается, что олигомеры, объединяющие признаки данного изобретения, могли бы обеспечивать улучшенную активность и терапевтический потенциал для пациентов DM1 и DM2. Примерные последовательности, нацеленные на повторы polyCUG и polyCCUG, описанные выше, перечислены ниже как SEQ ID NO: 22-38 и дополнительно описаны в заявке США № 13/101942, которая включена здесь в ее полном виде.

Дополнительные варианты данного изобретения для лечения нервно-мышечных нарушений предусматривают и включают в себя олигомеры, сконструированные для лечения других генетических нарушений с нестабильностью повторов ДНК. Эти заболевания включают в себя болезнь Гентингтона, спинномозжечковую атаксию, X-связанную спинальную и бульбарную мышечную атаксию и спинальную атаксию типа 10 (SCA10), как описано в WO 2008/018795.

Таблица 2. Примерные олигонуклеотидные последовательности

Название	Последовательность (5'-3')	SEQ ID NO
huMSTN мишень	GAAAAAGATTATATTGATTTTAAAAATCATGCAAAACTGC AACTCTGTGTT	1
muMSTN25-104	CATACATTTGCAGTTTTTGCATCAT	2
muMSTN25-183	TCATTTTAAAAATCAGCACAACTCT	3
muMSTN25-194	CAGTTTTTGCATCATTTTTTAAAAATC	4
Экзон44-А	GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAA	5
Экзон44-В	AAACTGTTCAGCTTCTGTTAGCCAC	6
Экзон44-С	TTGTGTCTTTCTGAGAACTGTTCA	7
Экзон45-А	CTGACAACAGTTTGCCGCTGCCCAA	8
Экзон45-В	CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA	9
Экзон45-С	CATTCAATGTTCTGACAACAGTTTGCCGCT	10
Экзон50-А	CTTACAGGCTCCAATAGTGGTCAGT	11
Экзон50-В	CCACTCAGAGCTCAGATCTTCTAACTTCC	12
Экзон50-С	GGGATCCAGTATACTTACAGGCTCC	13
Экзон51-А	ACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAGTTTGG	14
Экзон51-В	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG	15
Экзон51-С	GAGCAGGTACCTCCAACATCAAGGAA	16
Экзон53-А	CTGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCC	17
Экзон53-В	TGTTCTTGTACTTCATCCCACTGATTCTGA	18
SMN2-А	CTTTCATAATGCTGGCAG	19
SMN2-В	CATAATGCTGGCAG	20
SMN2-С	GCTGGCAG	21
CAG 9мер	CAG CAG CAG	22
CAG 12мер	CAG CAG CAG CAG	23
CAG 15мер	CAG CAG CAG CAG CAG	24
CAG 18мер	CAG CAG CAG CAG CAG CAG	25
AGC 9мер	AGC AGC AGC	26
AGC 12мер	AGC AGC AGC AGC	27
AGC 15мер	AGC AGC AGC AGC AGC	28
AGC 18мер	AGC AGC AGC AGC AGC AGC	29
GCA 9мер	GCA GCA GCA	30
GCA 12мер	GCA GCA GCA GCA	31
GCA 15мер	GCA GCA GCA GCA GCA	32
GCA 18мер	GCA GCA GCA GCA GCA GCA	33
AGC 25мер	AGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC A	34
CAG 25мер	CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG C	35
CAGG 9мер	CAG GCA GGC	36
CAGG 12мер	CAG GCA GGC AGG	37
CAGG 24мер	CAG GCA GGC AGG CAG GCA GGC AGG	38
M23D	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	39

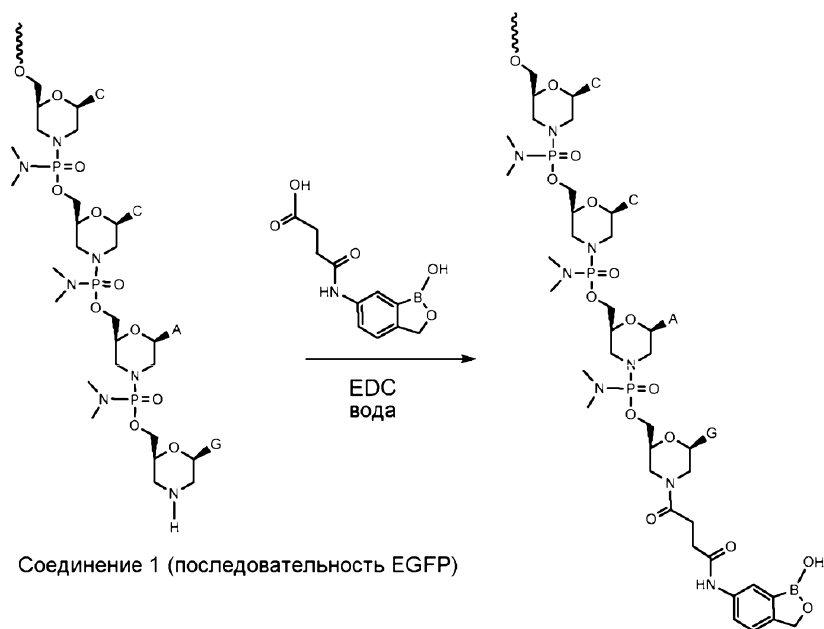
## Примеры

Если не указано особо, все химикалии получали из Sigma-Aldrich-Fluka. Бензоиладенозин, бензоилцитидин и фенилацетилгуанозин получали из Carbosynth Limited, UK.

Синтез РМО и РМО, содержащего дополнительные модификации связей, описанные здесь, выполняли с использованием способов, известных в данной области и описанных в патентах США с номерами 5698685; 5217866; 5142047; 5034506; 5166315; 5185444; 5521063 и 550 6337, публикациях заявок на патенты США с номерами 2009/0131632; 2009/0131624 и 2012/0065169 и публикации PCT с номером WO

2009/064471, которые были объединены ранее посредством ссылки в их полном виде для всех целей.

Пример 1. Конъюгация бороновой кислоты с 5'-концом



Соединение 1 (последовательность EGFP)

Соединение 2

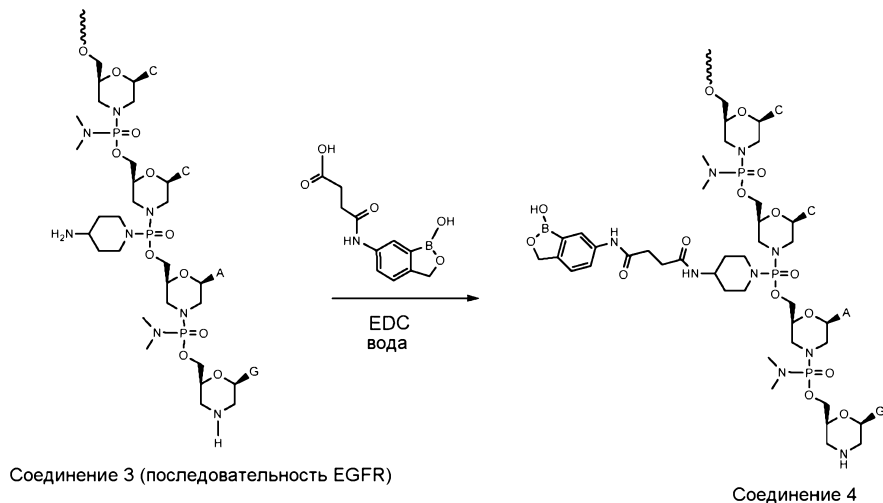
Последовательность EGFR: 5'-EG3: GCT ATT ACC TTA ACC CAG  
(SEQ ID NO: 40)

Соединение 1, 5'-EG3-PMO (EG3 = триэтиленгликоль) с последовательностью EGFP (3'-свободное основание, 30 мг, 4,8 ммоль) растворяют в воде (500 мл) при комнатной температуре. К раствору добавляют EDC (4 мг, 24 ммоль) и N-сукцинил-5-аминоборонофталид (6 мг, 24 ммоль), полученный по способу: W.J. Lennarz and H.R. Snyder, Journal of the American Chemical Society (1960), 82, 2172. Этой реакционной смеси дают перемешиваться при комнатной температуре в течение 18 ч. Прогрессирование реакции подвергают мониторингу с использованием LC-MS (ESI).

После завершения добавляют воду (1,5 мл) к этой реакционной смеси и этот раствор загружают на колонку SPE (2 см). Эту колонку промывают водой (3 × 2 мл). Продукт, соединение 2, элюируют 45% ацетонитрилом в воде (6 мл). Фракции, содержащие соединение РМО-ВА, идентифицировали измерением УФ-оптической плотности. Этот продукт выделяют лиофилизацией. Чистоту и идентичность определяют MALDI-MS, LC-MS (ESI) и ВЭЖХ (C-18 и/или SAX).

Конъюгацию фрагментов бороновой кислоты или эфира бороновой кислоты с 5'-концом выполняли аналогичным образом.

Пример 2. Получение РМО, содержащего межсубъединичную связь бороновой кислоты



Соединение 3 (последовательность EGFR)

Соединение 4

Последовательность EGFR: 5'-EG3: GCT ATT ACC TTA ACC CAG  
(SEQ ID NO: 40)

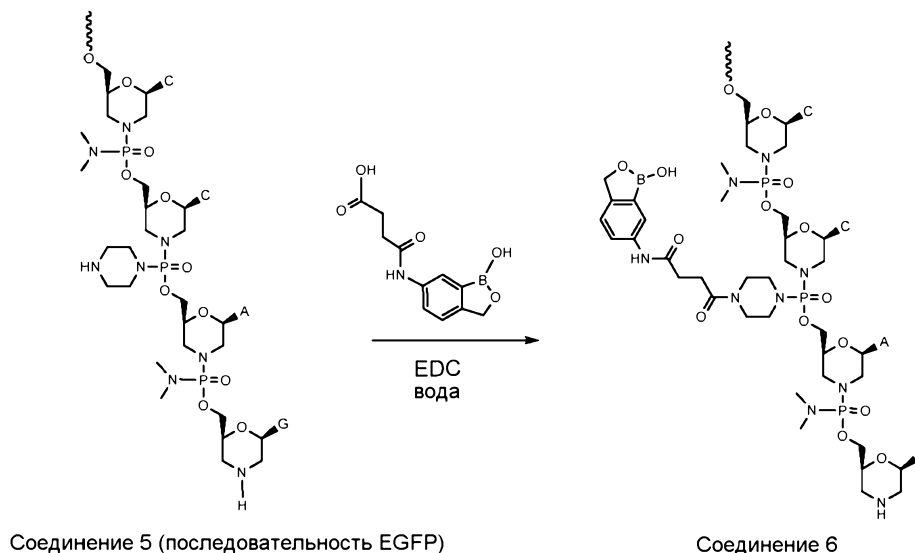
Соединение 3 (3'-свободное основание, 30 мг, 4,8 ммоль) получают, как описано в публикации

США № 2012/0065169, и растворяют в воде (500 мл) при комнатной температуре. К раствору добавляют EDC (4 мг, 24 ммоль) и N-сукцинил-5-аминоборонофталид (6 мг, 24 ммоль), полученный по способу: W.J. Lennarz and H.R. Snyder, Journal of the American Chemical Society (1960), 82, 2172. Этой реакционной смеси дают перемешиваться при комнатной температуре в течение 18 ч. Прогрессирование реакции подвергают мониторингу с использованием LC-MS (ESI).

После завершения добавляют воду (1,5 мл) к этой реакционной смеси и этот раствор загружают на колонку SPE (2 см). Эту колонку промывают водой (3 × 2 мл). Продукт, соединение 4, элюируют 45% ацетонитрилом в воде (6 мл). Фракции, содержащие соединение РМО-ВА, идентифицируют измерением УФ-оптической плотности. Этот продукт выделяют лиофилизацией. Чистоту и идентичность определяют MALDI-MS, LC-MS (ESI) и ВЭЖХ (C-18 и/или SAX).

Этот 3'-морфолино может быть защищен (например, тритилом) во избежание связывания фрагмента бороновой кислоты с 3'-концом.

Пример 3. Получение РМО, содержащего межузельную связь бороновой кислоты



Последовательность EGFP: 5'-EG3: GCT ATT ACC TTA ACC CAG

(SEQ ID NO: 40)

Соединение 5 (3'-свободное основание, 30 мг, 4,8 ммоль) получают, как описано в патенте США № 7493762, и растворяют в воде (500 мл) при комнатной температуре. К раствору добавляют EDC (4 мг, 24 ммоль) и N-сукцинил-5-аминоборонофталид (6 мг, 24 ммоль), полученный по способу: W.J. Lennarz and H.R. Snyder, Journal of the American Chemical Society (1960), 82, 2172. Этой реакционной смеси дают перемешиваться при комнатной температуре в течение 18 ч. Прогрессирование реакции подвергают мониторингу с использованием LC-MS (ESI).

После завершения добавляют воду (1,5 мл) к этой реакционной смеси и этот раствор загружают на колонку SPE (2 см). Эту колонку промывают водой (3 × 2 мл). Продукт, соединение 6, элюируют 45% ацетонитрилом в воде (6 мл). Фракции, содержащие соединение РМО-ВА, идентифицируют измерением УФ-оптической плотности. Этот продукт выделяют лиофилизацией. Чистоту и идентичность определяют MALDI-MS, LC-MS (ESI) и ВЭЖХ (C-18 и/или SAX).

Этот 3'-морфолино может быть защищен (например, тритилом) во избежание связывания фрагмента бороновой кислоты с 3'-концом.

Раскрытие заявки на патент США с порядковым номером 61/613385, поданной 20 марта 2012 года, включено здесь в его полном виде.

Различные варианты, описанные выше, могут комбинироваться для обеспечения дополнительных вариантов. Все из патентов США, публикаций заявок на патент США, иностранных патентов, иностранных заявок на патент и непатентных публикаций, на которые даются ссылки в этом описании изобретения, и/или перечисленные в Application Data Sheet, включены здесь посредством ссылки в их полном виде. Аспекты этих вариантов могут быть модифицированы, если необходимо использовать концепции различных патентов, заявок и публикаций для обеспечения дополнительных вариантов. Эти и другие изменения могут быть произведены в отношении этих вариантов осуществления в свете вышеуказанного подробного описания. Вообще, в следующей далее формуле изобретения используемые термины не должны пониматься как ограничивающие эту формулу конкретными вариантами, описанными в этом описании изобретения и в формуле изобретения, но должны толковаться как включающие в себя все

возможные варианты с полным объемом эквивалентов, на которые имеет право эта формула изобретения. Таким образом, эта формула изобретения не ограничивается этим описанием изобретения.

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Sarepta Therapeutics, Inc.

<120> КОНЬЮГАТЫ БОРОНОВЫХ КИСЛОТ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ АНАЛОГОВ

<130> 120178.497WO

<150> US 61/613,385

<151> 2012-03-20

<160> 40

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 52

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Морфолино-олигонуклеотид

<400> 1  
 gaaaaaagat tatattgatt ttaaaatcat gcaaaaactg caactctgtg tt 52

<210> 2

<211> 25

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Морфолино-олигонуклеотид

<400> 2  
 catacatttg cagttttttgc atcat 25

<210> 3

<211> 26

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Морфолино-олигонуклеотид

<400> 3  
 tcattttttaa aaatcagcac aatctt 26

<210> 4

<211> 26

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Морфолино-олигонуклеотид

<400> 4

cagttttttgc atcatttttta aaaatc	26
<210> 5	
<211> 25	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Морфолино-олигонуклеотид	
<400> 5	
gatctgtcaa atcgсctgса ggtaa	25
<210> 6	
<211> 25	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Последовательность морфолино	
<400> 6	
aaactgttса gcttctgtta gccac	25
<210> 7	
<211> 25	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Морфолино-олигонуклеотид	
<400> 7	
ttgtgtcttt ctgagaaact gttca	25
<210> 8	
<211> 25	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Морфолино-олигонуклеотид	
<400> 8	
ctgacaacag tttgccgctg cccaа	25
<210> 9	
<211> 26	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Морфолино-олигонуклеотид	
<400> 9	
ccaatgccat cctggagttc ctgtaa	26

<210> 10  
 <211> 30  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Морфолино-олигонуклеотид  
  
 <400> 10  
 cattcaatgt tctgacaaca gtttgccgct 30

<210> 11  
 <211> 25  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Морфолино-олигонуклеотид  
  
 <400> 11  
 cttacaggct ccaatagtgg tcagt 25

<210> 12  
 <211> 29  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Морфолино-олигонуклеотид  
  
 <400> 12  
 ccactcagag ctcatcttt ctaacttcc 29

<210> 13  
 <211> 25  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Морфолино-олигонуклеотид  
  
 <400> 13  
 gggatccagt atacttacag gctcc 25

<210> 14  
 <211> 30  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Морфолино-олигонуклеотид  
  
 <400> 14  
 acatcaagga agatggcatt tctagtttgg 30

<210> 15  
 <211> 30  
 <212> ДНК



<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Морфолино-олигонуклеотид	
<400>	15	
	ctccaacatc aaggaagatg gcatttctag	30
<210>	16	
<211>	26	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Морфолино-олигонуклеотид	
<400>	16	
	gagcaggtac ctccaacatc aagga	26
<210>	17	
<211>	25	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Морфолино-олигонуклеотид	
<400>	17	
	ctgaaggtgt tcttgactt catcc	25
<210>	18	
<211>	30	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Морфолино-олигонуклеотид	
<400>	18	
	tgttcttgta cttcatccca ctgattctga	30
<210>	19	
<211>	18	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Морфолино-олигонуклеотид	
<400>	19	
	ctttcataat gctggcag	18
<210>	20	
<211>	14	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		

<223> Морфолино-олигонуклеотид

<400> 20  
cataatgctg gcag

14

<210> 21

<211> 8

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Морфолино-олигонуклеотид

<400> 21

gctgggcag

8

<210> 22

<211> 9

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Морфолино-олигонуклеотид

<400> 22

cagcagcag

9

<210> 23

<211> 12

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Морфолино-олигонуклеотид

<400> 23

cagcagcagc ag

12

<210> 24

<211> 15

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Морфолино-олигонуклеотид

<400> 24

cagcagcagc agcag

15

<210> 25

<211> 18

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Морфолино-олигонуклеотид

<400> 25

cagcagcagc agcagcag	18
<210> 26	
<211> 9	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Морфолино-олигонуклеотид	
<400> 26	
agcagcagc	9
<210> 27	
<211> 12	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Морфолино-олигонуклеотид	
<400> 27	
agcagcagca gc	12
<210> 28	
<211> 15	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Морфолино-олигонуклеотид	
<400> 28	
agcagcagca gcagc	15
<210> 29	
<211> 18	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Морфолино-олигонуклеотид	
<400> 29	
agcagcagca gcagcagc	18
<210> 30	
<211> 9	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Морфолино-олигонуклеотид	
<400> 30	
gcagcagca	9

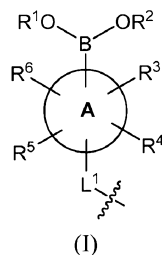
<210>	31	
<211>	12	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Морфолино-олигонуклеотид	
<400>	31	
	гсacгacгac са	12
<210>	32	
<211>	15	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Морфолино-олигонуклеотид	
<400>	32	
	гсacгacгac сагса	15
<210>	33	
<211>	18	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Морфолино-олигонуклеотид	
<400>	33	
	гсacгacгac сагсагса	18
<210>	34	
<211>	25	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Морфолино-олигонуклеотид	
<400>	34	
	агсагсагса гсacгacгac сагса	25
<210>	35	
<211>	25	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Морфолино-олигонуклеотид	
<400>	35	
	сагсагсагс агсагсагса гсacгс	25
<210>	36	
<211>	9	
<212>	ДНК	

<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Морфолино-олигонуклеотид	
<400>	36	
	сaggсaggс	9
<210>	37	
<211>	12	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Морфолино-олигонуклеотид	
<400>	37	
	сaggсaggсa gg	12
<210>	38	
<211>	24	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Морфолино-олигонуклеотид	
<400>	38	
	сaggсaggсa ggсaggсagg сagg	24
<210>	39	
<211>	25	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Морфолино-олигонуклеотид	
<400>	39	
	ggссaaасct сggcttacct gaaat	25
<210>	40	
<211>	18	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Морфолино-олигонуклеотид	
<400>	40	
	gctattacct таaccсag	18

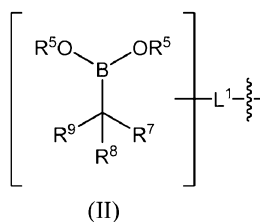
#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Олигонуклеотидный аналог, содержащий основную цепь, 3'-конец и 5'-конец, при этом основная цепь содержит последовательность морфолино-кольцевых структур, соединенных межсубъединичными связями, причем эти межсубъединичные связи соединяют 3'-конец одной морфолино-кольцевой структу-

ры с 5'-концом соседней морфолино-кольцевой структуры, где каждая морфолино-кольцевая структура связана с остатком спаривающегося основания таким образом, что этот олигонуклеотидный аналог может связываться последовательность-специфическим образом с нуклеиновой кислотой-мишенью, где по меньшей мере одна из межузьединичных связей, 3'-конец или 5'-конец содержит фрагмент бороновой кислоты или эфира бороновой кислоты, ковалентно связанный с ними, где фрагмент бороновой кислоты или эфира бороновой кислоты имеет, в каждом случае, независимо одну из следующих структур (I) или (II):



или



или его фармацевтически приемлемая соль, его стереоизомер или таутомер, где

R¹ представляет собой, в каждом случае, независимо H или C₁-C₃₀-алкил;

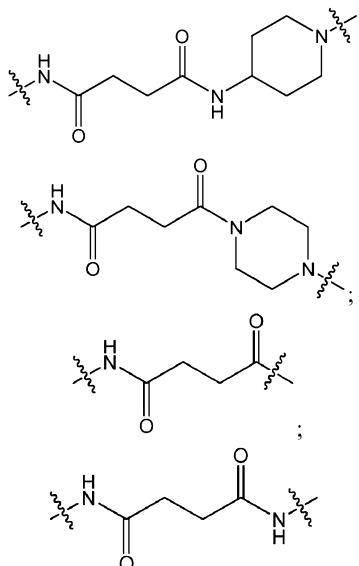
R² представляет собой H или C₁-C₃₀-алкил, где R² может соединяться с одним из R³, R⁴, R⁵ или R⁶ с образованием кольца;

R³, R⁴, R⁵ и R⁶, в каждом случае, независимо отсутствуют, представляют собой H, C₁-C₃₀-алкил, C₆-C₃₀-арил, гидрокси, гидроксиC₁-C₃₀-алкил, аминоC₁-C₃₀-алкил, алкокси, алкоксиC₁-C₃₀-алкил, C₆-C₃₀-арилокси, галоген, нитро, циано, амидил, amino, C₁-C₃₀-алкиламино, аминоC₁-C₃₀-алкил, C₆-C₃₀-ариламино, C₆-C₃₀-аралкил, C₆-C₃₀-аралкиламино, C₆-C₃₀-аралкилоксикарбониламинил, алкилоксикарбониламинил, C₆-C₃₀-арилоксикарбониламинил, -CO₂H, C₁-C₃₀-алкилкарбонил, C₆-C₃₀-арилкарбонил, C₆-C₃₀-аралкилкарбонил, аминокарбонил, C₁-C₃₀-алкиламинокарбонил, C₆-C₃₀-ариламинокарбонил, C₆-C₃₀-аралкиламинокарбонил, алкилоксикарбонил, арилоксикарбонил, алкилоксиимино или гетероарил, где один из R³, R⁴, R⁵ или R⁶ может соединяться с другим из R³, R⁴, R⁵ или R⁶ с образованием карбоциклического или C₂-C₂₃-гетероциклического кольца, и где один из R³, R⁴, R⁵ или R⁶ может соединяться с R² с образованием C₂-C₂₃-гетероциклического кольца;

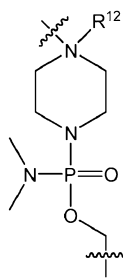
R⁷, R⁸ и R⁹ представляют собой, в каждом случае, независимо C₁-C₃₀-алкил или C₁-C₃₀-алкиламино;

A представляет собой, в каждом случае, независимо 6-членное арильное или C₁-C₁₃-гетероарильное кольцо; и

L¹ представляет собой, в каждом случае, одну из следующих структур:

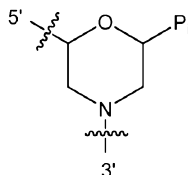


или



где  $R^{12}$  отсутствует, представляет собой H или  $C_1$ - $C_6$ -алкил.

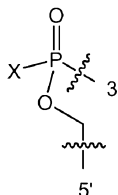
2. Олигонуклеотидный аналог по п.1, где по меньшей мере одна из морфолино-кольцевых структур имеет следующую структуру (i):



(i)

где  $P_i$  является, в каждом случае, независимо остатком спаривающегося основания.

3. Олигонуклеотидный аналог по любому из предшествующих пунктов, где межсубъединичные связи имеют следующую структуру (III):



(III)

или его фармацевтически приемлемую соль, стереоизомер или таутомер, где

X представляет собой, в каждом случае, независимо структуру (I), структуру (II) или  $-NR^{10}R^{11}$ ; и  $R^{10}$  и  $R^{11}$  представляют собой, в каждом случае, независимо водород или  $C_1$ - $C_6$ -алкил.

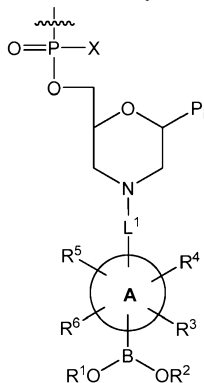
4. Олигонуклеотидный аналог по п.3, где по меньшей мере один X представляет собой структуру (I) или (II).

5. Олигонуклеотидный аналог по п.3, где по меньшей мере один X представляет собой  $-N(CH_3)_2$ .

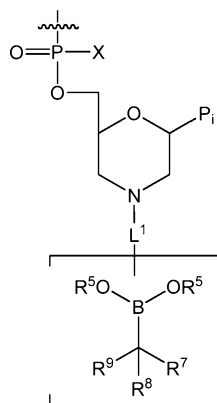
6. Олигонуклеотидный аналог по п.3, где каждый X, который не является структурой (I) или (II), представляет собой  $-N(CH_3)_2$ .

7. Олигонуклеотидный аналог по п.3, где X в 1-5 межсубъединичных связях представляет собой структуру (I) или (II).

8. Олигонуклеотидный аналог по любому из предшествующих пунктов, где 3'-конец ковалентно связан со структурой (I) или структурой (II) и имеет одну из следующих структур (IV) или (V):

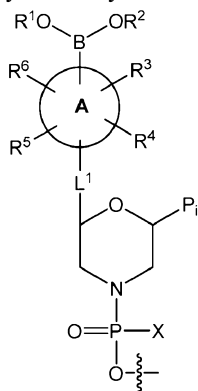


или

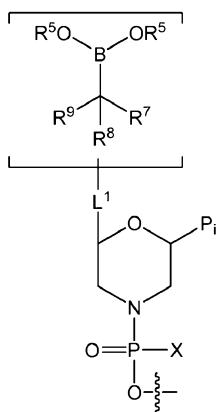


где  $P_i$  представляет собой остаток спаривающегося основания.

9. Олигонуклеотидный аналог по любому из предшествующих пунктов, где 5'-конец ковалентно связан со структурой (I) или (II) и имеет одну из следующих структур (VI) или (VII):

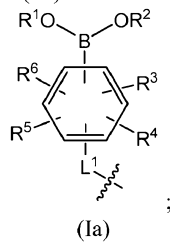


или

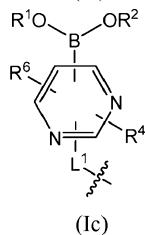
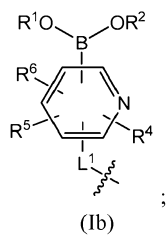


где  $P_i$  представляет собой остаток спаривающегося основания.

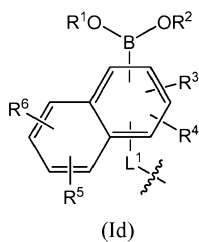
10. Олигонуклеотидный аналог по любому из предшествующих пунктов, где структура (I) имеет одну из следующих структур (Ia), (Ib), (Ic) или (Id):



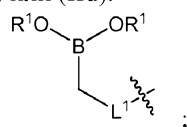




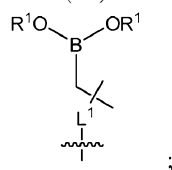
или



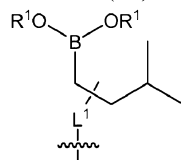
11. Олигонуклеотидный аналог по любому из предшествующих пунктов, где структура (II) имеет одну из следующих структур (IIa), (IIb), (IIc) или (IId):



(IIa)

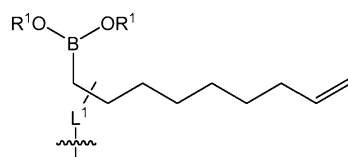


(IIb)



(IIc)

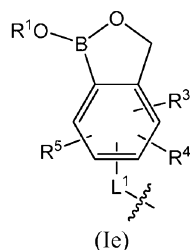
или



(IId)

12. Олигонуклеотидный аналог по любому из пп. 1-10, где R² соединяется с одним из R³, R⁴, R⁵ или R⁶ с образованием формы C₂-C₂₃-гетероциклического кольца.

13. Олигонуклеотидный аналог по п. 12, где структура (I) имеет следующую структуру (Ie):

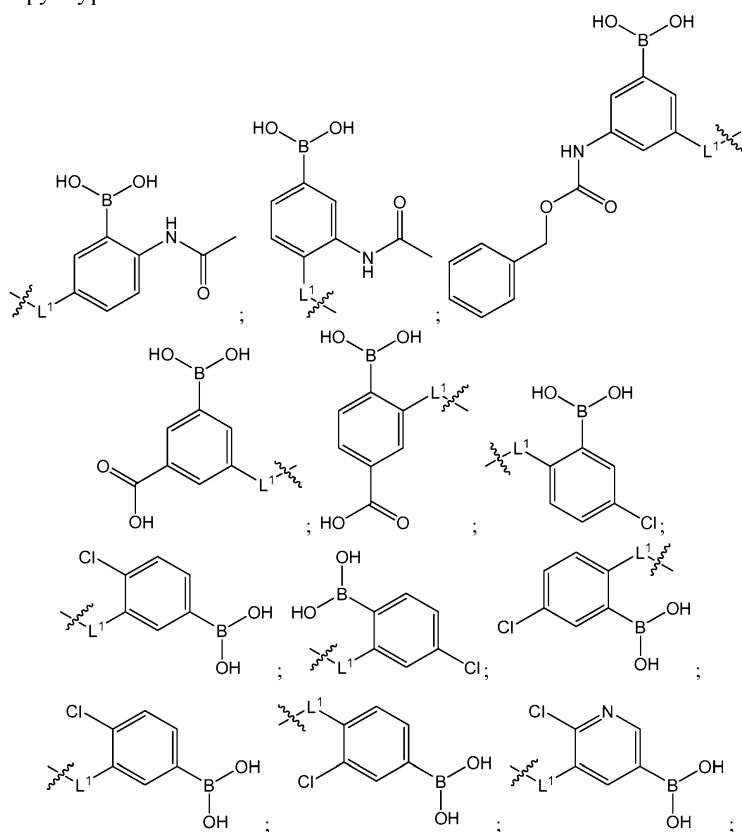


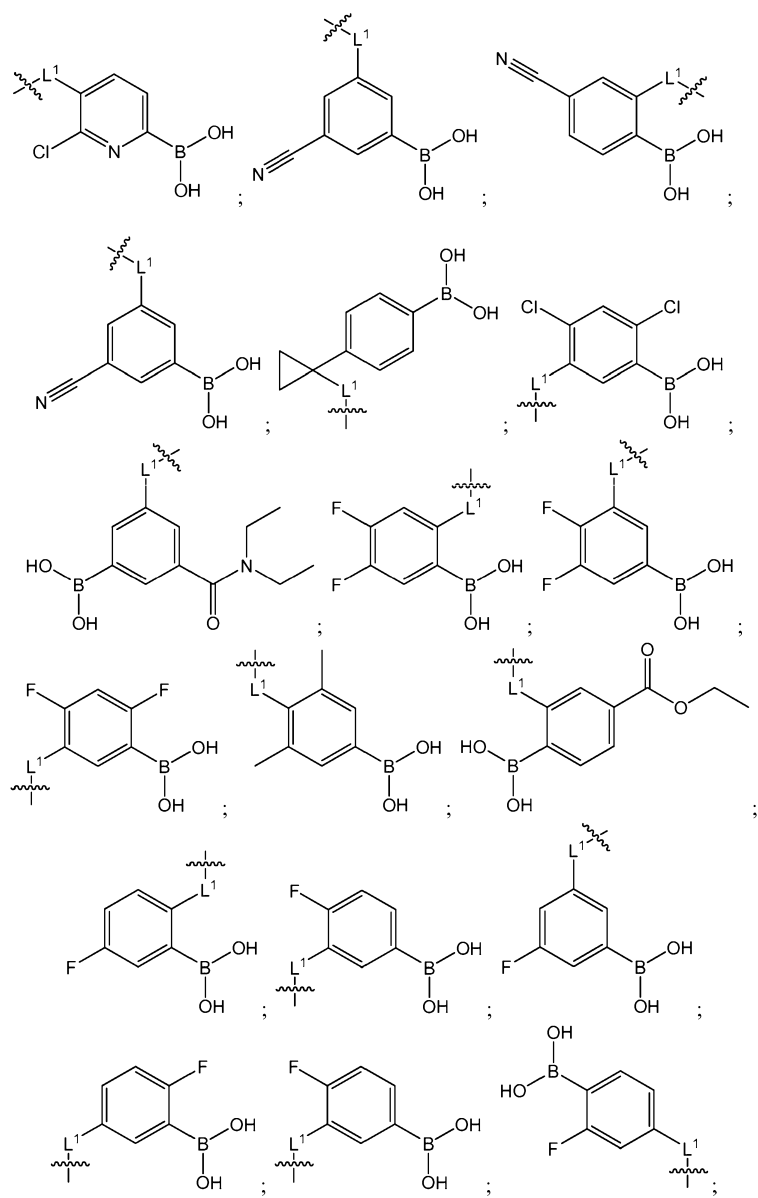
14. Олигонуклеотидный аналог по любому из предшествующих пунктов, где по меньшей мере один  $R^1$  представляет собой H или  $R^2$  представляет собой H.

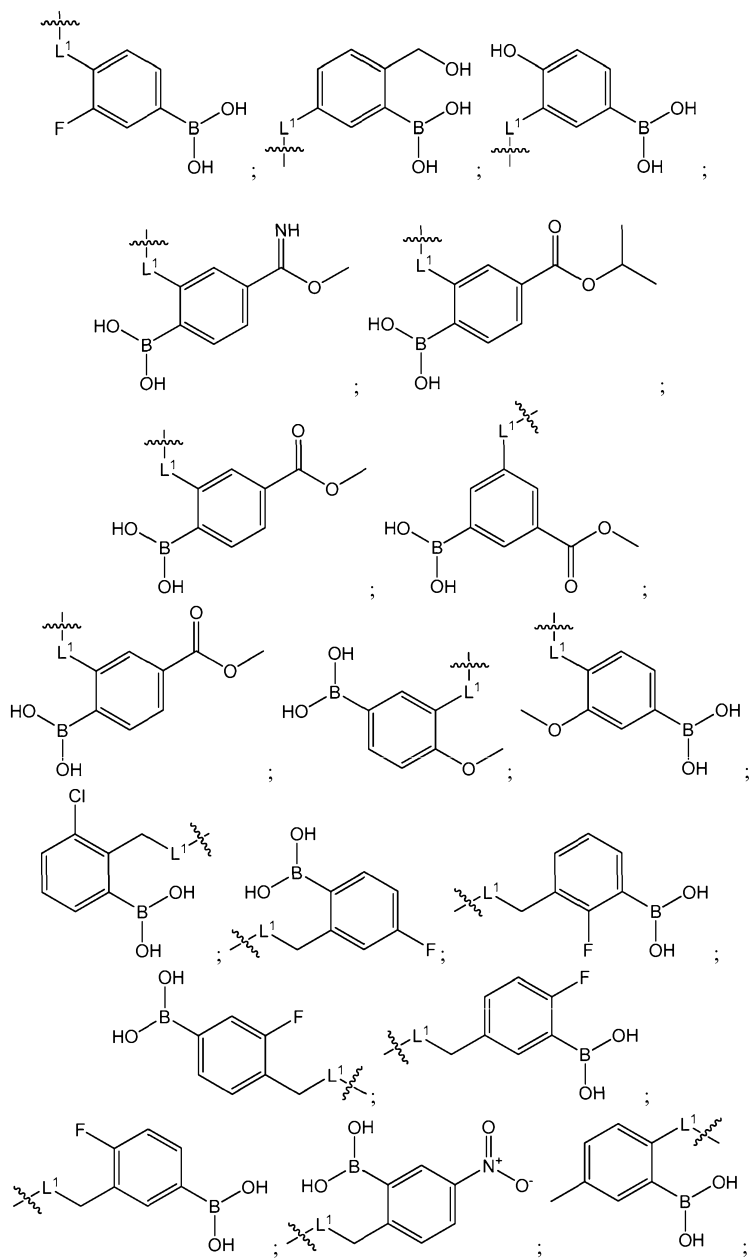
15. Олигонуклеотидный аналог по любому из предшествующих пунктов, где каждый  $R^1$  и  $R^2$  представляет собой H.

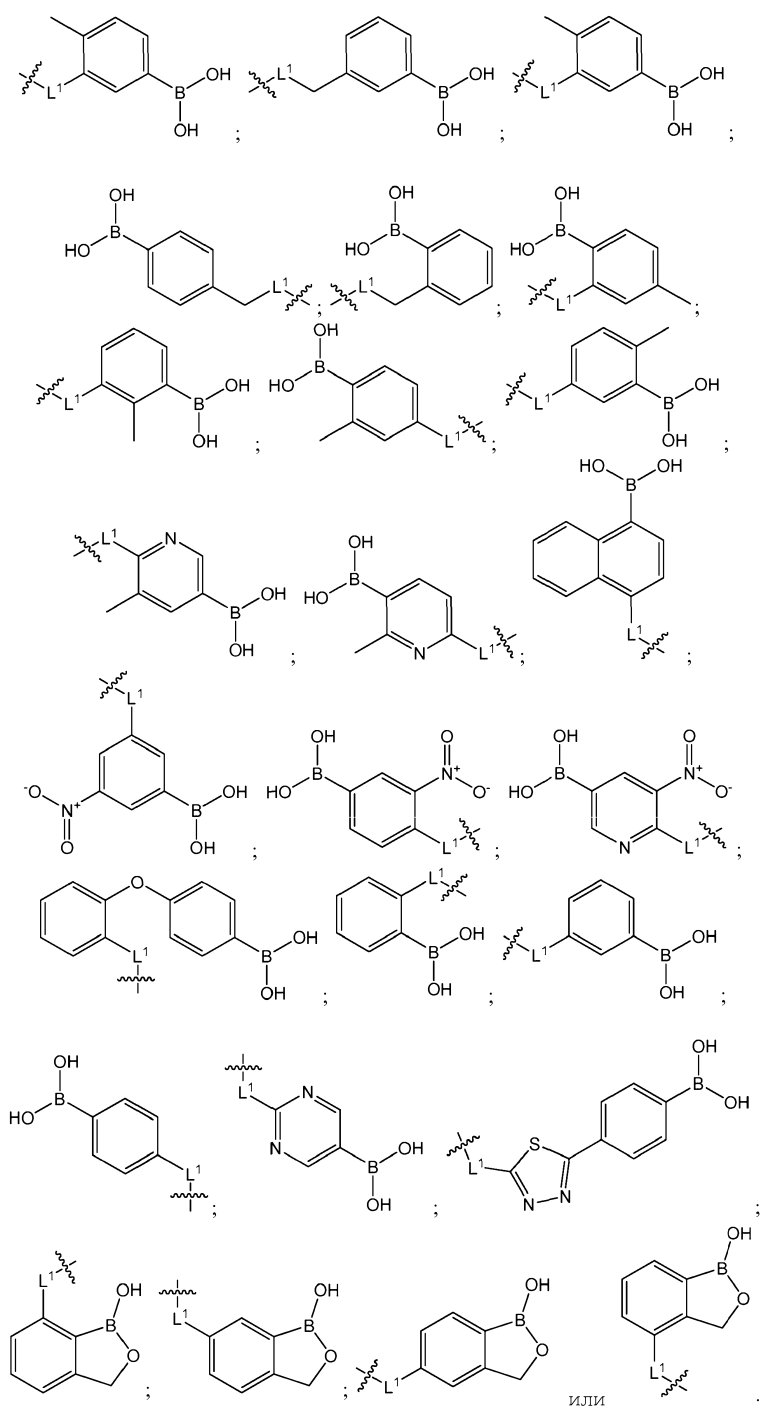
16. Олигонуклеотидный аналог по любому из предшествующих пунктов, где каждый из  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  и  $R^6$  независимо отсутствует, представляет собой H, гидроксил,  $C_1$ - $C_{30}$ -алкил, гидроксид  $C_1$ - $C_{30}$ -алкил, амин  $C_1$ - $C_{30}$ -алкил, алкокси,  $C_6$ - $C_{30}$ -арилокси, галоген, нитро, циано, амидил, амина,  $C_1$ - $C_{30}$ -алкиламина, арилоксикарбониламинил,  $-CO_2H$ , алкилоксикарбонил, алкилоксиимино или  $C_1$ - $C_{13}$ -гетероарил.

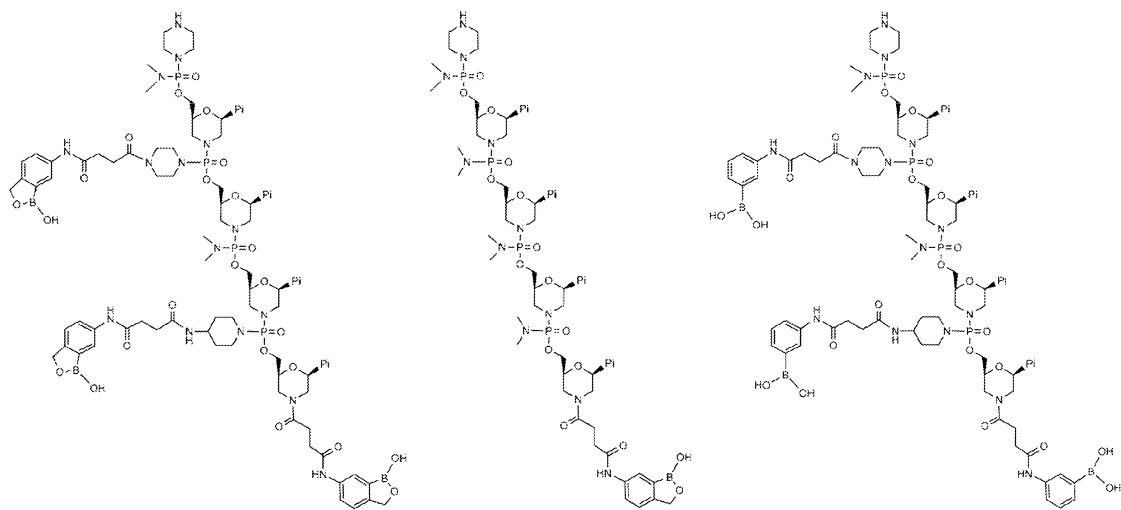
17. Олигонуклеотидный аналог по любому из предшествующих пунктов, где структура (I) имеет одну из следующих структур:



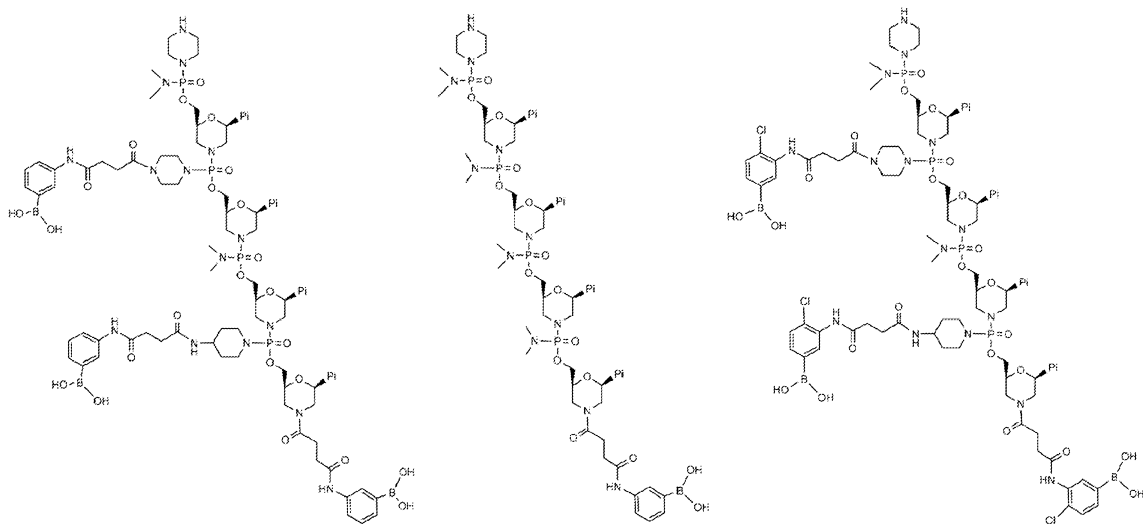








Фиг. 1



Фиг. 2



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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