



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119643** (13) **C2**
(51) МПК**C12N 15/113** (2010.01)**A61K 31/115** (2006.01)**A61K 31/712** (2006.01)**A61P 3/06** (2006.01)МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки: а 2016 00243	(72) Винахідник(и): Альбек Нанна (DK), Хедтьорн Май (DK), Ліндхольм Марі (SE), Нільсен Нільс Фіскер (DK), Петрі Андреас (DK), Равн Якоб (DK)
(22) Дата подання заявки: 27.06.2014	(73) Власник(и): РОШ ІННОВЕЙШЕН СЕНТЕР КОПЕНГАГЕН А/С, Fremtidsvej 3, DK-2970 Hørsholm, Denmark (DK)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.07.2019	(74) Представник: Новікова Лідія Аркадіївна, реєстр. №36
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 13174092.0, 13192930.9, 13192938.2, 14153253.1, 14168331.8, PCT/EP2013/073858	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2009134487 A2, 05.11.2009 WO 2008043753 A2, 17.04.2008 WO 2009127680 A1, 22.10.2009 WO 2009148605 A2, 10.12.2009 WO 2012083046 A2, 21.06.2012 Biessen E. Targeted delivery of oligodeoxynucleotides to parenchymal liver cells in vivo / E. Biessen, H. Vietsch, K. Fluiter et al. // Biochemical journal. - 1999. - Vol. 340. - No. 3. - P. 783-792 Zheng S. Distribution and anti-HBV effects of antisense oligodeoxynucleotides conjugated to galactosylated poly-L-lysine / S. Zheng, S. Zhong, J. Zhang et al. // World journal of gastroenterology. - 2003. - Vol. 9. - No. 6. - P. 1251-1255 Maier M. Synthesis of antisense oligonucleotides conjugated to a multivalent carbohydrate cluster for cellular targeting / M. Maier, C. Yannopoulos, N. Mohamed et al. // Bioconjugate chemistry. - 2003. - Vol. 14. - No. 1. - P. 18-29 WO 2011009697 A1, 27.01.2011
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 27.06.2013, 14.11.2013, 14.11.2013, 30.01.2014, 14.05.2014, 14.11.2013	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: EP, EP, EP, EP, EP, EP	
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.03.2016, Бюл.№ 5	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.07.2019, Бюл.№ 14	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/EP2014/063757, 27.06.2014	

(54) АНТИСМИСЛОВИЙ ОЛІГОМЕР ТА КОН'ЮГАТ, НАПРАВЛЕНИЙ НА ПРОПРОТЕЇН КОНВЕРТАЗУ СУБТИЛІЗИН/КЕКСИН ТИПУ 9 (PCSK9)**(57) Реферат:**

Винахід стосується кон'югата антисмислового олігонуклеотиду, який містить антисмисловий олігомер з 16-20 нуклеотидів в довжину, який містить безперервну послідовність з 16 нуклеотидів, комплементарну відповідному відрізку довжини, де зазначений антисмисловий олігомер являє собою LNA гепмер і щонайменше одне кон'югатне угруповання, направлене на рецептор асіалоглікопротеїнів, ковалентно приєднане до олігомера. Винахід також стосується фармацевтичної композиції, яка містить вказаний кон'югат, застосуванню кон'югата антисмислового нуклеотиду як лікарського засобу, такого як засіб для лікування гіперхолестеринемії або спорідненого розладу, вибраного з групи, що складається з

UA 119643 C2

атеросклерозу, гіперліпідемії, гіперхолестеринемії, сімейної гіперхолестеринемії, наприклад, придбання функціональних мутацій в PCSK9, дисбалансу холестерину ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ)/ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ), дисліпідемій, наприклад сімейної гіперліпідемії (сімейної комбінованої гіперліпідемії (СКГ)) або сімейної гіперхолестеринемії (СГХС), придбаної гіперліпідемії, статин-резистентної гіперхолестеринемії, коронарної артеріальної хвороби (КАХ) та ішемічної хвороби серця (ІХС); та способу інгібування PCSK9 *in vitro* в клітині, експресуючій PCSK9.

ОБЛАСТЬ ВИНАХОДУ

Даний винахід відноситься до олігомерних сполук та їх кон'югатів, направлених на мРНК пропротеїну конвертази субтилізин/кексин типу 9 (PCSK9) в клітині, що призводить до пониженої експресії PCSK9. Зниження експресії PCSK9 корисно для ряду захворювань, таких як

5 гіперхолестеринемія і споріднені розлади.

ПОПЕРЕДНІЙ РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Пропртеїн конвертаза субтилізин/кексин типу 9 (PCSK9) став відомий як терапевтична мішень для зниження холестерину ліпопротеїнів низької щільності (холестерину ЛПНЩ). PCSK9 збільшує розпад рецептора ЛПНЩ, що призводить в результаті до високого вмісту холестерину

10 ЛПНЩ у індивідів з високою активністю PCSK9.

У статті Lindholm et al., *Molecular Therapy* (2012); 20 2, 376-381 описано два антисмислові нуклеотиди замкненої нуклеїнової кислоти (ЗНК), направлених на PCSK9, які забезпечують пролонговане зниження холестерину ЛПНЩ у нелюдиноподібних приматів після насичуючої дози (20 мг/кг) і чотирьох щотижневих підтримувальних доз (5 мг/кг). Вживані сполуки були 14-мер SPC5001 (SEQ ID NO 1) і 13-мер SPC4061. SPC5001 також розкрито в WO 2011/009697. Ефективність цих інгібіторів PCSK9 пов'язана з їх малою довжиною (Krieg et al., *Molecular Therapy Nucleic Acids* (2012) 1, e6).

15

У WO 2007/146511 описані короткі біциклічні (ЗНК) гепмерні антисмислові олігонуклеотиди, які, очевидно, є ефективнішими і менш токсичнішими, ніж сполуки більшої довжини. Виявилось, що ілюстративні сполуки мають довжину 14 нуклеотидів (нт).

20

Згідно із статтею van Poelgeest et al. (*American Journal of Kidney Disease*, 2013 Oct; 62(4): 796-800) введення антисмислового олігонуклеотиду ЗНК SPC5001 в клінічних випробуваннях на людині може привести в результаті до гострого ушкодження нирок.

Згідно з публікаціями EP 1984381B1, Seth et al., *Nucleic Acids Symposium Series 2008 No. 52* 553-554 і Swayze et al., *Nucleic Acid Research 2007, vol 35, pp. 687-700* олігонуклеотиди ЗНК викликають значну гепатотоксичність у тварин. Згідно WO 2007/146511 токсичності олігонуклеотидів ЗНК можна уникнути шляхом використання гепмерів ЗНК, настільки коротких, як 12-14 нуклеотидів у довжину. У EP 1984381B1 рекомендовано використання 6'-заміщених біциклічних нуклеотидів для зменшення гепатотоксичного потенціалу олігонуклеотидів ЗНК. Згідно із статтею Hagedorn et al., *Nucleic Acid Therapeutics 2013*, гепатотоксичний потенціал антисмислового олігонуклеотиду можна передбачити на основі його послідовності і патерну модифікації.

25

30

Олігонуклеотидні кон'югати широко оцінювали на використання в малих інтерферуючих РНК (міРНК), де їх вважали істотними для одержання достатньої ефективності *in vivo*. Наприклад, WO 2004/044141 відноситься до модифікованих олігомерних сполук, які модулюють генну експресію за допомогою біохімічного шляху РНК-інтерференції. Олігомерні сполуки включають одне або більше кон'югатних угруповань, які можуть модифікувати або посилити фармакокінетичні і фармакодинамічні властивості приєднаної олігомерної сполуки.

35

У WO 2012/083046 описано угруповання, що направляє фармакокінетичний модулятор кластера галактози, для міРНК.

40

Навпаки, одноланцюгові антисмислові олігонуклеотиди зазвичай вводять терапевтично без кон'югації або включення в препарат. Основними тканинами-мішенями для антисмислових олігонуклеотидів є печінка і нирки, хоча широкий ряд інших тканин також доступний для антисмислового методу, включаючи лімфатичний вузол, селезінку і кістковий мозок.

45

WO 2005/086775 відноситься до направленого доставлення терапевтичних засобів в конкретні органи з використанням терапевтичного хімічного угруповання, відщеплюваного лінкера і міченого домена. Відщеплюваний лінкер може бути, наприклад, дисульфідною групою, пептидом або олігонуклеотидним доменом, що розщеплюється ферментом рестрикції.

WO 2011/126937 відноситься до направленого внутрішньоклітинного доставлення олігонуклеотидів за допомогою кон'югації з низькомолекулярними лігандами.

50

WO 2009/025669 відноситься до полімерних (поліетиленгліколевих) лінкерів, що містять піридилдисульфідні угруповання. Див. також Zhao et al., *Bioconjugate Chem.* 2005 16 758-766.

У статті Chaltin et al., *Bioconjugate Chem.* 2005 16 827-836 описані модифіковані холестерином моно-, ди- і тетрамірні олігонуклеотиди, використовувані для включення антисмислових олігонуклеотидів в катіонні ліпосоми з одержанням дендримерної системи доставлення. Холестерин кон'югують з олігонуклеотидами за допомогою лізинового лінкера.

55

Інші нерозщеплювані холестеринові кон'югати використані для направлення міРНК і антагомірів в печінку, див., наприклад, Soutscheck et al., *Nature* 2004 vol. 432 173-178 і Krützfeldt et al., *Nature* 2005 vol 438, 685-689. Виявлено, що для частково фосфоротіолованих міРНК і

антагомірів застосування холестерину як направляючої молекули печінки істотно для активності *in vivo*.

ОБ'ЄКТ ВИНАХОДУ

5 Таким чином, існує необхідність в антисмислових сполуках, направлених на PCSK9, які є такими ж ефективними, як SPC5001, але мають понижений ризик токсичності, зокрема, понижено ниркову токсичність.

10 Згідно із даним винаходом ця мета досягнута шляхом ідентифікації нових послідовностей PCSK9 людини, які частково ефективні для направлення з використанням антисмислового методу (SEQ ID NO 33 і SEQ ID NO 34), а також більш довгих варіантів послідовності SPC5001, які зберігають значну ефективність або мають поліпшену ефективність в порівнянні з SPC5001 без проблем токсичності. Антисмислові нуклеотиди за винаходом можуть бути додатково вдосконалені шляхом застосування кон'югатів, для яких виявлено, що вони значно посилюють терапевтичний індекс антисмислових олігонуклеотидів ЗНК.

15 Сполуки за даним винаходом є сильними і нетоксичними інгібіторами PCSK9, корисними при лікуванні гіперхолестеринемії і споріднених розладів.

СУТЬ ВИНАХОДУ

20 Олігомер за винаходом може містити від 10 до 22, наприклад, від 12 до 18 нуклеотидів в довжину, які являють собою або а) послідовність з 10-16 суміжних нуклеотидів, яка комплементарна відповідній довжині SEQ ID NO 33 або 34 або 45, або б) послідовність з 16 суміжних нуклеотидів, яка комплементарна відповідному відрізку довжини SEQ ID NO 31.

У винаході запропонований кон'югат антисмислового олігонуклеотиду, що містить олігомер, згідно з винаходом і щонайменше одне угруповання, що відрізняється від нуклеотиду або відрізняється від полінуклеотиду, ковалентно приєднане до олігомеру.

25 У винаході також запропоновано кон'югат антисмислового олігонуклеотиду, олігомер (А), що містить, згідно з винаходом і щонайменше одне угруповання, що відрізняється від нуклеотиду або відрізняється від полінуклеотиду, ковалентно приєднане до олігомеру, (С), необов'язково за допомогою лінкерної ділянки (В та/або Y), розташованої між безперервною нуклеотидною послідовністю олігомеру і кон'югатним угрупованням.

30 У деяких втіленнях у винаході також запропоновано кон'югат антисмислового олігонуклеотиду, що містить олігомер з 10-22, наприклад, з 12-18 нуклеотидів в довжину, де олігомер містить а) послідовність з 10-16 суміжних нуклеотидів, яка комплементарна відповідній довжині SEQ ID NO 33 або 34 або 45 або б) послідовність з 16 суміжних нуклеотидів, яка комплементарна відповідному відрізку довжини SEQ ID NO 31.

35 У винаході також запропоновано сполуку, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23 і 24.

У винаході запропонована фармацевтична композиція, яка містить олігомер або кон'югат згідно з винаходом і фармацевтично прийнятний розчинник, носій, сіль або ад'ювант.

40 У винаході запропоновані олігомер або кон'югат або фармацевтична композиція згідно з винаходом, вживані як лікарський засіб, наприклад, для лікування гіперхолестеринемії або спорідненого розладу, такого як розлад, вибраний з групи, що складається з атеросклерозу, гіперліпідемії, гіперхолестеринемії, сімейної гіперхолестеринемії, наприклад, придбання функціональних мутацій в PCSK9, дисбалансу холестерину ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ)/ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ), дисліпідемії, наприклад, сімейної гіперліпідемії (сімейної комбінованої гіперліпідемії (СКГ)) або сімейної гіперхолестеринемії (СГХС), придбаної гіперліпідемії, статин-резистентної гіперхолестеринемії, коронарній артеріальній хворобі (КАХ) та ішемічній хворобі серця (ІХС).

50 У винаході запропоновано застосування олігомеру або кон'югата або фармацевтичної композиції за винаходом для одержання лікарського засобу для лікування гіперхолестеринемії або спорідненого розладу, такого як розлад, вибраний з групи, атеросклерозу, гіперліпідемії, гіперхолестеринемії, сімейної гіперхолестеринемії, наприклад, придбання функціональних мутацій в PCSK9, дисбалансу холестерину ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ)/ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ), дисліпідемії, наприклад, сімейної гіперліпідемії (сімейної комбінованої гіперліпідемії (СКГ)) або сімейної гіперхолестеринемії (СГХС), придбаної гіперліпідемії, статин-резистентної гіперхолестеринемії, коронарної артеріальної хворобі (КАХ) та ішемічній хворобі серця (ІХС).

60 У винаході запропоновано спосіб лікування гіперхолестеринемії або спорідненого розладу, такого як розлад, вибраний з групи, атеросклерозу, гіперліпідемії, гіперхолестеринемії, сімейної гіперхолестеринемії, наприклад, придбання функціональних мутацій в PCSK9, дисбалансу холестерину ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ)/ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ), дисліпідемії, наприклад, сімейної гіперліпідемії (сімейної комбінованої гіперліпідемії (СКГ)) або

сімейної гіперхолестеринемії (СГХС), придбаної гіперліпідемії, статин-резистентної гіперхолестеринемії, коронарній артеріальній хворобі (КАХ) та ішемічній хворобі серця (ІХС).

У винаході запропоновано спосіб інгібування *in vivo* або *in vitro* PCSK9 в клітині, експресуючій PCSK9, де спосіб включає введення олігомеру або кон'югата або фармацевтичної композиції згідно з винаходом в клітину так, щоб інгібувати PCSK9 в клітині.

У винаході також запропоновано олігомер згідно з винаходом, такий як олігомер ЗНК, що містить ділянку з 10-22, наприклад, з 12-18, наприклад, 13, 14, 15, 16 або 17 суміжних нуклеозидів, зв'язаних фосфоротіоатним зв'язком (тобто ділянка А, яка в характерному випадку комплементарна відповідній ділянці послідовності-мішені, такої як SEQ ID NO 46), і що додатково містить від 1 до 6 нуклеозидів ДНК, що примикає до олігомеру ЗНК, де міжнуклеозидні зв'язки між ДНК та/або нуклеозидом (нуклеозидами), що примикає до ДНК, фізіологічно лабільні, як і фосфодієфірні зв'язки. Такий олігомер ЗНК може знаходитися у формі кон'югата, як розкрито в цьому документі, або може бути, наприклад, проміжною сполукою для використання на наступній стадії кон'югації. При кон'югації кон'югат може, наприклад, бути або містити стерин, такий як холестерин або токоферол, або може бути або містити (не нуклеотидний) вуглевод, наприклад, кон'югат GalNAc або інший кон'югат, як розкрито в цьому документі.

У винаході також запропоновано гепмерний олігомер, що містить щонайменше один нуклеотид сЕТ, такий як (S)-сЕТ, з 10-22, наприклад, 12-18, наприклад, 13, 14, 15, 16 або 17 нуклеотидів в довжину, який направлений (тобто має послідовність, комплементарну відповідній ділянці) на PCSK9 людини.

КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

Фіг. 1: Приклади кон'югатів три-GalNAc, які можна застосовувати. Кон'югати 1-4 ілюструють 4 відповідні угруповання кон'югатів GalNAc, а кон'югати 1а-4а відносяться до тих же кон'югатів з додатковим лінкерним угрупованням (Y), яке використовують для зшивання кон'югата з олігомером (ділянкою А або з біо-відщеплюваним лінкером, таким як ділянка В). Хвиляста лінія є ковалентним зв'язком з олігомером.

Фіг. 2: Приклади холестеринового і токоферольного кон'югатних угруповань. Кон'югати 5а і 6а відносяться до тих же кон'югатів з додатковим лінкерним угрупованням (Y), яке використовують для зшивання кон'югата з олігомером (ділянкою А або з біо-відщеплюваним лінкером, таким як ділянка В). Хвиляста лінія є ковалентним зв'язком з олігомером.

Фіг. 3: Конкретні сполуки ЗНК. Бета-D-окси-ЗНК ідентифіковані надрядковим знаком ^L (locked) після букви, підрядковий знак _s є фосфоротіоатним зв'язком, надрядковим знаком ^{Me}, передуючим заголовній букві С, позначає 5-метилцитозин-ЗНК, не-ЗНК нуклеотиди є нуклеотидуми ДНК (без надрядкового знаку L).

Фіг. 4: Приклади холестеринових кон'югатів сполук ЗНК. Бета-D-окси-ЗНК ідентифіковані надрядковим знаком ^L (locked) після букви, підрядковий знак _s є фосфоротіоатним зв'язком, надрядковим знаком ^{Me}, передуючим заголовній букві С, позначає 5-метилцитозин-ЗНК, не-ЗНК нуклеотиди є нуклеотидуми ДНК (без надрядкового знаку L).

Фіг. 5: Приклади кон'югатів GalNAc сполук ЗНК. Кон'югати по суті відповідають Conj2a на фігурі, де хвиляста лінія замінена олігомером ЗНК. Бета-D-окси-ЗНК ідентифіковані надрядковим знаком ^L (locked) після букви, підрядковий знак _s є фосфоротіоатним зв'язком, надрядковим знаком ^{Me}, передуючим заголовній букві С, позначає 5-метилцитозин-ЗНК, не-ЗНК нуклеотиди є нуклеотидуми ДНК (без надрядкового знаку L).

Фіг. 5А: Детальна структура SEQ ID NO 18.

Фіг. 5В: Детальна структура SEQ ID NO 19.

Фіг. 6: Приклад кон'югатної групи FAM.

Фіг. 7: Кон'югати ЗНК-FAM з розщеплюваними фосфодієфірними зв'язками і без них. Бета-D-окси-ЗНК ідентифіковані надрядковим знаком ^L (locked) після букви, підрядковий знак _s є фосфоротіоатним зв'язком, надрядковим знаком ^{Me}, передуючим заголовній букві С, позначає 5-метилцитозин-ЗНК, не-ЗНК нуклеотиди є нуклеотидуми ДНК (без надрядкового знаку L).

Фіг. 8: Гепмери проти PCSK9, ранжовані за активністю *in vitro*.

Фіг. 9: Вибрані гепмери проти PCSK9, ранжовані за активністю *in vitro*.

Фіг. 10: Активність вибраних сполук проти PCSK9 *in vitro* і обчислення IC₅₀.

Фіг. 11: Дані ALT *in vivo* для вибраних кон'югатів проти PCSK9.

Фіг. 12: Необмежуюча ілюстрація сполук за винаходом. Міжнуклеозидний зв'язок L може бути, наприклад, фосфодієфірним, фосфоротіоатним, фосфородитіоатним, боранофосфатним або метилфосфатним, наприклад, фосфодієфірним. PO є фосфодієфірним зв'язком. Сполука а) має ділянку В з однією ДНК (або РНК), де зв'язок між першою і другою ділянкою є PO. Сполука б) має дві ДНК/РНК (таких як ДНК) нуклеозиду, пов'язаних фосфодієфірним зв'язком.

Сполука с) має три ДНК/РНК (таких як ДНК) нуклеозиду, пов'язаних фосфодієфірними зв'язками. У деяких втіленнях винаходу ділянка В може бути додатково подовжена додатковими фосфодієфірними ДНК/РНК (такими як нуклеозиди ДНК). Кон'югатна група (Marked X, інакше в цьому документі ділянка С) проілюстрована на лівій стороні кожної сполуки (наприклад, холестерин, GalNAc, Conj1-4, 1a-4a і 5 або 6) і може бути необов'язково ковалентно приєднана до кінцевого нуклеозиду ділянки В за допомогою фосфорної нуклеозидної зв'язуючої групи, такої як фосфодієфірна, фосфоротіоатна, фосфородитіоатна, боранофосфатна або метилфосфатна, або може бути пов'язана за допомогою альтернативного зв'язку, наприклад, тіазольного зв'язку (див. L в сполуках d), e) і f).

Фіг. 13. Необмежуюча ілюстрація сполук за винаходом, де сполуки містять необов'язковий лінкер (Y) між третьою (кон'югатною) ділянкою (X) і другою ділянкою (ділянкою В). Номенклатура така ж, як на фіг. 12. Відповідні лінкери розкриті в цьому документі і включають, наприклад, алкільні лінкери, наприклад, С6 лінкери. У сполуках a), b) і c) лінкер між X і ділянкою В приєднаний до ділянки В за допомогою фосфорної нуклеозидної зв'язуючої групи, такої як фосфодієфірна, фосфоротіоатна, фосфородитіоатна, боранофосфатна або метилфосфатна, або може бути пов'язана за допомогою альтернативного зв'язку, наприклад, триазольного зв'язку (Li). У цих сполуках Li є міжнуклеозидним зв'язком між першою (A) і другою ділянками (B). Сполуки d), e) і f) додатково містять лінкер (Y) між ділянкою В і кон'югатною групою, і ділянка Y може бути пов'язана з ділянкою В за допомогою, наприклад, фосфорної нуклеозидної зв'язуючої групи, такої як фосфодієфір, фосфоротіоат, фосфородитіоат, боранофосфат або метилфосфат, або в деяких втіленнях триазольного зв'язку. На додаток або альтернативно X може бути активуючою групою або реакційною групою. X може бути ковалентно приєднаний до ділянки В за допомогою фосфорної нуклеозидної зв'язуючої групи, такої як фосфодієфір, фосфоротіоат, фосфородитіоат, боранофосфат або метилфосфат, або може бути пов'язана за допомогою альтернативного зв'язку, наприклад, триазольного зв'язку.

Фіг. 14. Сайленсинг мРНК PCSK9 кон'югатами з холестерином *in vivo*. Мишам ін'єктували одноразову дозу 10 мг/кг некон'югованого антисмислового олігонуклеотиду ЗНК (#40) або еквімолярні кількості антисмислових олігонуклеотидів ЗНК, кон'югованих з холестерином з різними лінкерами, і убивали на добу 1, 3, 7 і 10 після дозування. РНК виділяли з печінки і нирок і піддавали PCSK9-специфічній кількісній полімеразній ланцюговій реакції із зворотною транскрипцією (ЗТ-qПЛР) А. Кількісне визначення мРНК PCSK9 із зразків печінки нормалізовано за BACT і показано у вигляді відсотка середнього значення еквівалентних контролів з фізіологічним розчином В. Кількісне визначення мРНК PCSK9 із зразків нирок нормалізовано за BACT і показано у вигляді відсотка середнього значення еквівалентних контролів з фізіологічним розчином.

Фіг. 15. Експресія Kim-1 з дослідження безпеки на щурах (див. Приклад 5).

Фіг. 16: PCSK9 в сироватці і холестерин ЛПНЩ в зразках від яванських макак, ін'єктованих чотири рази (одна ін'єкція/тиждень) 0,5 або 1,5 мг/кг/тиждень SEQ ID 2 і 18.

Фіг. 17. PCSK9 в сироватці і холестерин ЛПНЩ в зразках від яванських макак, ін'єктованих чотири рази (одна ін'єкція/тиждень) 0,5 або 1,5 мг/кг/тиждень SEQ ID 3 і 19.

ВІДОМОСТІ, ЩО ПІДТВЕРДЖУЮТЬ МОЖЛИВІСТЬ ЗДІЙСНЕННЯ ВИНАХОДУ

Далі розкриті різні елементи винаходу під окремими заголовками. Зрозуміло, що для одержання сполуки за винаходом втілення винаходу з одного елемента можна комбінувати з втіленнями винаходу з інших елементів (наприклад, як проілюстровано на Фіг. 12 і 13).

Олігомер (ділянка А)

Термін "олігомер" або "олігонуклеотид" в контексті даного винаходу відноситься до молекули, утвореної за допомогою ковалентного зв'язку двох або більше нуклеотидів (тобто до олігонуклеотиду). У цьому документі окремий нуклеотид (ланка) може бути також позначений як мономер або ланка. У деяких втіленнях винаходу терміни "нуклеозид", "нуклеотид", "ланка" і "мономер" використовують взаємозамінно. Зрозуміло, що при посиленні послідовність з нуклеотидів або мономерів, на яку посиляються, є послідовність з основ, таких як А, Т, G, С або U.

Олігомер за винаходом може містити від 10 до 22, наприклад, від 12 до 22 нуклеотидів, наприклад, від 12 до 18 нуклеотидів в довжину. Олігомер містить або а) послідовність з 10-16 суміжних нуклеотидів, комплементарну відповідному відрізку довжини SEQ ID NO 33 або 34 або 45, або b) послідовність з 16 суміжних нуклеотидів, комплементарну відповідному відрізку довжини SEQ ID NO 31.

У деяких втіленнях винаходу олігомер за винаходом містить безперервну нуклеотидну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO 26, 27, 28, 29 і 44.

Сполука (наприклад, олігомер або кон'югат) за винаходом направлена на PCSK9 і сама по собі здатна до знижуючої регуляції експресії або до інгібування PCSK9, такого як PCSK9 у людини або в клітині, експресуючій PCSK9.

5 У деяких втіленнях винаходу міжнуклеозидні зв'язки послідовності з 10-16 суміжних нуклеотидів, комплементарній відповідному відрізку довжини SEQ ID NO 33 або 34 або 45, можуть бути фосфоротіоатними зв'язками.

У деяких втіленнях винаходу олігомер за винаходом містить послідовність або складається з безперервної нуклеотидної послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ ID NO 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 і 40. В одному втіленні винаходу олігомер містить послідовність або складається з 10 послідовності, вибраної з а) SEQ ID NO 2 або 3, або б) SEQ ID NO 4, 5 або 6, або в) SEQ ID NO 7 або 8, або г) SEQ ID NO 40.

У деяких втіленнях винаходу олігомер містить 10-16 нуклеозидів, зв'язаних фосфоротіоатним зв'язком.

15 У деяких втіленнях винаходу олігомер за винаходом містить послідовність з щонайменше 10-16 суміжних нуклеотидів, комплементарну відповідному відрізку довжини SEQ ID NO 33 або 34 або 45, або послідовність з 16 суміжних нуклеотидів, комплементарну відповідному відрізку довжини SEQ ID NO 31, де безперервна нуклеотидна послідовність містить аналоги нуклеотидів. Переважно аналоги нуклеотидів являють собою посилюючі спорідненість аналоги нуклеотидів.

20 У деяких втіленнях винаходу аналоги нуклеотидів є нуклеотидами з модифікованим цукром, такими як нуклеотиди з модифікованим цукром, незалежно або залежно вибрані з групи, що складається з: ланок замкненої нуклеїнової кислоти (ЗНК); ланок 2'-О-алкіл-РНК, ланок 2'-ОМе-РНК, ланок 2'-аміно-ДНК і ланок 2'-фтор-ДНК.

У деяких втіленнях винаходу аналоги нуклеотидів містять або являють собою ланки замкненої нуклеїнової кислоти (ЗНК).

У деяких втіленнях винаходу олігомер за винаходом містить або являє собою гепмер, такий як гепмерний олігонуклеотид ЗНК.

У деяких втіленнях винаходу гепмер утримує на кожній стороні (5' і 3') сегмент-крило з аналогів нуклеотидів в кількості від 2 до 4, переважно аналогів ЗНК.

30 У деяких втіленнях винаходу олігомер за винаходом містить послідовність з 13, 14, 15 або 16 суміжних нуклеотидів, комплементарну відповідному відрізку довжини SEQ ID NO 33 або 34 або 45, або послідовність з 16 суміжних нуклеотидів, комплементарну відповідному відрізку довжини SEQ ID NO 31, і може необов'язково містити додаткові 1-6 нуклеотидів, які можуть утворювати або містити біорозщеплювану ділянку з нуклеотидів, таку як нуклеотидфосфатний лінкер. Доцільно ця біорозщеплювана ділянка з нуклеотидів утворена коротким фрагментом (наприклад, 1, 2, 3, 4, 5 або 6) з нуклеотидів, що являється фізіологічно лабільним. Це може бути досягнуто шляхом використання фосфодіефірних зв'язків з ДНК/РНК нуклеозидами, або, якщо його фізіологічна лабільність може зберігатися, можна використовувати інший нуклеозид. Фізіологічну лабільність можна виміряти, використовуючи екстракт печінки, як проілюстровано в 40 прикладі 6.

Олігомер за винаходом може, таким чином, складатися з послідовності з 10-16 суміжних нуклеотидів (нт) в довжину, комплементарної відповідному відрізку довжини SEQ ID NO 33 або 34 або 45, або з послідовності з 16 суміжних нуклеотидів, комплементарною відповідному відрізку довжини SEQ ID NO 31 (перша ділянка або ділянка А). Олігомер за винаходом може 45 містити додаткову ділянку з нуклеотидів. У деяких втіленнях винаходу додаткову ділянку з нуклеотидів містить біорозщеплювану ділянку з нуклеотидів, таку як послідовність нуклеотидфосфатів (друга ділянка, ділянка В), яка може ковалентно зв'язувати ділянку А з нуклеотидним угрупованням, такою як кон'югатна група (третя ділянка або ділянка С). У деяких втіленнях винаходу безперервна нуклеотидна послідовність олігомеру за винаходом (ділянка А) ковалентно пов'язана безпосередньо з ділянкою С. У деяких втіленнях винаходу 50 ділянка С є біорозщеплюваною.

Олігомер складається з послідовності або містить послідовність суміжних нуклеотидів з 12-22, наприклад, з 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 нуклеотидів в довжину, наприклад, з 14-16 нуклеотидів в довжину, наприклад, з 15 або 16 нуклеотидів в довжину. Олігомер може, таким 55 чином, відноситися до об'єднаної довжини ділянки А і ділянки В, наприклад, ділянки А (10-16 нт) і ділянки В (1-6 нт).

У різних втіленнях винаходу сполука за винаходом не містить РНК (ланок). У деяких втіленнях винаходу сполука згідно з винаходом, перша ділянка або перша і друга ділянки разом (наприклад, у вигляді єдиної безперервної нуклеотидної послідовності) є лінійною молекулою 60 або синтезуються у вигляді лінійної молекули. Олігомер може, таким чином, бути

- одноланцюговою молекулою. У деяких втіленнях винаходу олігомер не містить короткі ділянки з, наприклад, щонайменше 3, 4 або 5 суміжних нуклеотидів, які комплементарні еквівалентним ділянкам в межах того ж олігомеру (тобто дуплексів). Олігомер в деяких втіленнях винаходу може бути не (по суті) дволанцюговим. У деяких втіленнях винаходу олігомер по суті є не дволанцюговим, наприклад, являє собою не мПНК.

Послідовності олігомеру

У наведеній нижче таблиці приведені олігомери і кон'югати олігомерів за винаходом і послідовностей-мішеней PCSK9 за винаходом.

Таблиця 1

SEQ ID	Послідовність	PO	Chol-C6	GalNAc	Положення на гені PCSK9 SEQ ID NO 44
1	TGctacaaaacCCA				3643-3656
2	AATgctacaaaaCCCA				3643-3658
3	AATgctacaaaacCCA				3643-3658
4	GctgtgtgagctGG				3251-3265
5	TGctgtgtgagctTGG				3251-3266
6	TGctgtgtgagctTGG				3251-3266
7	TCCtggctgtgtTCC				3373-3388
8	TCCtggctgtgtCC				3373-3388
9	TGctacaaaacCCA	так	так		3643-3656
10	AATgctacaaaaCCCA	так	так		3643-3658
11	AATgctacaaaacCCA	так	так		3643-3658
12	GctgtgtgagctGG	так	так		3251-3265
13	TGctgtgtgagctTGG	так	так		3251-3266
14	TGctgtgtgagctTGG	так	так		3251-3266
15	TCCtggctgtgtTCC	так	так		3373-3388
16	TCCtggctgtgtCC	так	так		3373-3388
17	TGctacaaaacCCA			так	3643-3656
18	AATgctacaaaaCCCA			так	3643-3658
19	AATgctacaaaacCCA			так	3643-3658
20	GctgtgtgagctGG			так	3251-3265
21	TGctgtgtgagctTGG			так	3251-3266
22	TGctgtgtgagctTGG			так	3251-3266
23	TCCtggctgtgtTCC			так	3373-3388
24	TCCtggctgtgtCC			так	3373-3388
40	GTctgtggaaGCG				1005-1017
41	GTctgtggaaGCG		так		1005-1017
42	GTctgtggaaGCG	так	так		1005-1017
43	GTctgtggaaGCG	так	так		1005-1017
25	tgctacaaaaccca				3643-3656
26	aatgctacaaaaccca				3643-3658
27	gctgtgtgagcttgg				3251-3265
28	tgctgtgtgagcttgg				3251-3266
29	tcctggctgtgtcc				3373-3388
44	gtctgtggaagcg				1005-1017
30	UGGGUUUUGUAGCA				3643-3656
31	UGGGUUUUGUAGCAU U				3643-3658
32	CCAAGCUCACACAGC				3251-3265
33	CCAAGCUCACACAGCA				3251-3266
34	GGAACACAGACCAGGA				3373-3388
45	CGCUUCCACAGAC				1005-1017

10

- SEQ ID NO 25-29 і 44 являють собою мотиви послідовностей нуклеотидних основ.
 SEQ ID NO 30-34 і 45 являють собою послідовності-мішені РНК, присутні в мРНК PCSK9 людини.
 SEQ ID NO 1 являють собою SPC5001.

SEQ ID NO 1-24 і 40-43 являють собою олігомери, що містять аналоги нуклеотидів, такі як гепмерні олігомери ЗНК, де рядкові букви є ланками ДНК (нуклеозид/нуклеотид), де прописні букви є ланками ЗНК.

У деяких втіленнях винаходу усі ЗНК С являють собою 5-метилцитозин. У деяких втіленнях винаходу усі ланки ЗНК являють собою бета-D-окси-ЗНК. У деяких втіленнях винаходу усі міжнуклеозидні зв'язки між нуклеозидами SEQ ID NO 1-24 і 40-43 являють собою фосфоротіоатні зв'язки.

SEQ ID NO 9-16 і 41-43 містять олігомер (як вказано SEQ ID), а також холестерин кон'югат, який може бути ковалентно пов'язаний з олігомером на 5' або 3' кінці олігомеру, необов'язково за допомогою біорозщеплюваного лінкера, такого як нуклеозидфосфатний лінкер. У деяких втіленнях винаходу холестериновий кон'югат зв'язаний з 5'-кінцем олігомеру.

SEQ ID NO 17-24 містять олігомер (як вказано SEQ ID), а також кон'югат GalNAc, який може бути ковалентно зв'язаний з олігомером на 5' або 3'-кінці олігомеру, необов'язково за допомогою біорозщеплюваного лінкера, такого як нуклеозидфосфатний лінкер або розщеплюваний пептидний лінкер. У деяких втіленнях винаходу кон'югат GalNAc зв'язаний на 5'-кінці олігомеру.

Конкретні олігомери і кон'югати, використовувані в цьому документі, проілюстровані на Фіг. 3 (олігомери), Фіг. 4 (холестеринові кон'югати), Фіг. 5 (кон'югати GalNAc). Інші приклади кон'югатів, які можна використовувати з олігомером за винаходом, проілюстровані на Фіг. 1 і 2 і описані в розділі Кон'югатні угруповання GalNAc.

У таблиці 2 приведені конкретні комбінації олігомеру і кон'югатів.

Таблиця 2

Комбінації олігомер/кон'югат

SEQ ID	Номер кон'югата (див. Фіг. 1)							
	Conj1	Conj2	Conj3	Conj4	Conj1a	Conj2a	Conj3a	Conj4a
2	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
3	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18
4	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19
5	C30	C31	C32	C33	C34	C35	C36	C37
6	C40	C41	C42	C43	C44	C45	C46	C47
7	C50	C51	C52	C53	C54	C55	C56	C57
8	C60	C61	C62	C63	C64	C65	C66	C67

SEQ ID	Номер кон'югата (див. Фіг. 2)			
	Conj5	Conj6	Conj5a	Conj6a
2	C9	C10	C70	C71
3	C19	C20	C72	C73
4	C20	C21	C74	C75
5	C38	C39	C76	C77
6	C48	C49	C78	C79
7	C58	C59	C80	C81
8	C68	C69	C82	C83

Усі ці комбінації можна візуалізувати шляхом заміщення хвилястої лінії на Фіг. 1 або 2 послідовністю олігомеру. На Фіг. 5 показана комбінація Conj2a з вказаними вище номерами SEQ ID. Фіг. 5A і 5B являють собою два детальні приклади сполук на Фіг. 5. Слід зазначити, що біорозщеплюваний лінкер (B) може бути присутнім або не бути присутнім між кон'югатним угрупованням (C) і олігомером (A). Для Conj1-4 і 1a-4a сам кон'югат GalNAc є біорозщеплюваним, застосування пептидного лінкера в кластері GalNAc і як такий біорозщеплюваний лінкер (B) можна використовувати або не використовувати. Проте, попередні дані вказують на те, що включення біорозщеплюваного лінкера (B), такого як нуклеотидфосфатні лінкери, розкриті в цьому документі, може посилити активність таких олігомерних кон'югатів з кластером GalNAc. На Фіг. 4 показана комбінація Conj5a з вказаними вище номерами SEQ ID з біорозщеплюваним лінкером (B), що складається з двох мономерів ДНК С і А, пов'язаних фосфодієфірним зв'язком. Оскільки при застосуванні з Conj5 і Conj6 використання біорозщеплюваного лінкера значно посилює активність сполуки, рекомендовано включення біорозщеплюваного лінкера (B), такого як нуклеотидфосфатні лінкери, розкриті в цьому документі.

Терміни "відповідний" і "відповідає" відносяться до порівняння між нуклеотидною послідовністю олігомеру (тобто послідовністю нуклеотидних основ або основ) або безперервною нуклеотидною послідовністю (першою ділянкою/ділянкою А) і зворотним комплементом нуклеїнової кислоти-мішені або його піддільницею (наприклад, SEQ ID NO 31, 32, 33, 34 або 45). Аналоги нуклеотидів порівнюють безпосередньо з їх еквівалентом або відповідними нуклеотидами. У переважному втіленні винаходу олігомери (або їх перша ділянка) комплементарні, наприклад, повністю комплементарні ділянці-мішені або її піддільниці (наприклад, SEQ ID NO 31, 32, 33, 34 або 45).

Терміни "зворотний комплемент", "зворотньо комплементарний" і "зворотня комплементарність" при використанні в цьому документі є взаємозамінними з термінами "комплемент", "комплементарний" і "комплементарність".

Термін "комплементарний" означає, що дві послідовності комплементарні у тому випадку, коли послідовність однієї може зв'язуватися з послідовністю іншої в зустрічно-паралельному напрямі, причому 3'-кінець кожної послідовності зв'язується з 5'-кінцем іншої послідовності, а потім кожен А, Т(У), G і С однієї послідовності вирівнюються з Т(У), А, С і G іншої послідовності відповідно. Зазвичай комплементарна послідовність олігонуклеотиду має щонайменше 90%, переважно 95%, прийнятніше 100% комплементарність певної послідовності.

Під терміном "відповідний аналог нуклеотиду" і "відповідний нуклеотид" мають на увазі вказівку на те, що нуклеотид в аналозі нуклеотиду і нуклеотид, що зустрічається в природі, ідентичні. Наприклад, коли 2-дезоксирибозна ланка нуклеотиду зв'язана з аденіном, "відповідний аналог нуклеотиду" містить пентозну ланку (що відрізняється від 2-дезоксирибози) зв'язану з аденіном.

Термін "нуклеотидна основа" відноситься до угруповання нуклеотиду, що є основою, і охоплює як такі, що зустрічаються в природі, варіанти, і такі, що не зустрічаються в природі. Таким чином, "нуклеотидна основа" охоплює не лише відомі пуринові і піримідинові гетероцикли, але також їх гетероциклічні аналоги і таутомери. Зрозуміло, що ДНК- або РНК-нуклеозиди ділянки В можуть мати таку, що зустрічається в природі та/або таку, що не зустрічається в природі нуклеотидну основу (основи).

Приклади нуклеотидних основ включають без обмежень аленін, гуанін, цитозин, тимідин, урацил, ксантин, гіпоксантин, 5-метилцитозин, ізоцитозин, псевдоізоцитозин, 5-бромурацил, 5-пропінілурацил, 6-амінопурин, 2-амінопурин, інозин, діамінопурин і 2-хлор-6-амінопурин. У деяких втіленнях винаходу нуклеотидні основи можуть бути незалежно вибрані з групи, що складається з аденіну, гуаніну, цитозину, тимідину, урацилу, 5-метилцитозину. У деяких втіленнях винаходу нуклеотидні основи можуть бути незалежно вибрані з групи, що складається з аденіну, гуаніну, цитозину, тимідину і 5-метилцитозину.

У деяких втіленнях винаходу щонайменше одна з нуклеотидних основ, присутніх в олігомері, є модифікованою нуклеотидною основою, вибраною з групи, що складається з 5-метилцитозину, ізоцитозину, псевдоізоцитозину, 5-бромурацилу, 5-пропінілурацилу, 6-амінопурину, 2-амінопурину, інозину, діамінопурину і 2-хлор-6-амінопурину.

Мішень

Доцільно олігомер за винаходом здатний до модуляції експресії гена PCSK9. Переважно олігомер здатний до знижуючої регуляції експресії гена PCSK9. В цьому відношенні олігомер за винаходом може впливати на експресію PCSK9, в характерному випадку в клітині свавця, такої як клітина людини, наприклад, клітина печінки. У деяких втіленнях винаходу олігомери за винаходом зв'язуються з нуклеїновою кислотою-мішенню, та їх дією на експресію є її зниження щонайменше на 10% або 20% в порівнянні з нормальним рівнем експресії (наприклад, з рівнем експресії клітини тварини або людини, обробленої фізіологічним розчином), прийнятніше щонайменше 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% або 95% інгібування в порівнянні з нормальним рівнем експресії. У деяких втіленнях винаходу таку модуляцію спостерігають при використанні приблизно від 0,04 до 25 нМ, наприклад, від 0,8 до 20 нМ концентрації сполуки за винаходом. У деяких втіленнях винаходу таку модуляцію спостерігають при використанні від 0,01 до 15 мг/кг, наприклад, від 0,05 до 10 мг/кг, наприклад, від 0,1 до 7,5 мг/кг, наприклад, від 0,25 до 5 мг/кг, наприклад, концентрації 0,5 і 2,5 мг/кг сполуки за винаходом. У тому ж або в іншому втіленні винаходу інгібування експресії складає менше 100%, як, наприклад, менше 98% інгібування, менше 95% інгібування, менше 90% інгібування, менше 80% інгібування, наприклад, менше 70% інгібування. Модуляцію рівня експресії можна визначити шляхом виміру рівнів білку, наприклад, способами, такими як електрофорез в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (ДСН-ПААГ) з наступним Вестерн-блотингом з використанням відповідних антитіл, що індукуються проти білку-мішені. Альтернативно модулювання рівнів експресії можна визначити шляхом виміру рівнів мРНК, наприклад, за допомогою Нозерн-

блотинга або кількісної полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). При виміюванні за допомогою рівнів мРНК рівень знижуючої регуляції при використанні належного дозування, наприклад, концентрації від 0,04 до 25 нМ, наприклад, від 0,8 до 20 нМ, в деяких втіленнях винаходу в характерному випадку складає рівень до 10-20% від нормальних рівнів у відсутність сполуки за винаходом.

Таким чином, у винаході запропоновано спосіб знижуючої регуляції або інгібування експресії білку та/або мРНК PCSK9 в клітині, експресуючій білок та/або мРНК PCSK9, де згаданий спосіб включає введення в клітину олігомеру або кон'югата згідно з винаходом для знижуючої регуляції або інгібування експресії білку та/або мРНК PCSK9 в клітині. Доцільно клітина є клітиною ссавця, такою як клітина людини. Введення в деяких втіленнях винаходу можна здійснювати *in vitro*. Введення в деяких втіленнях винаходу можна здійснювати *in vivo*.

Термін "нуклеїнова кислота-мішень" при використанні в цьому документі відноситься до ДНК або РНК, що кодує поліпептид PCSK9 ссавця, такий як PCSK9 людини, такий як номер доступу Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI; National Center for Biotechnology Information) NM_174936 SEQ ID NO: 46. Нуклеїнові кислоти, кодуєчі PCSK9 або його варіанти, що зустрічаються в природі, і утворені з них РНК-нуклеїнові кислоти, переважно мРНК, таку як пре-мРНК, хоча переважно зрілу мРНК. У деяких втіленнях винаходу, наприклад, при використанні в дослідженні або діагностиці, "нуклеїнова кислота-мішень" може бути кДНК або синтетичним олігонуклеотидом, утвореним з вищезгаданих ДНК- або РНК-нуклеїнових кислот-мішеней. Олігомер згідно з винаходом переважно здатний до гібридизації з нуклеїноюватою кислотою-мішенню. Повинно бути зрозуміло, що SEQ ID NO: 46 являє собою послідовність кДНК, і як така відповідає послідовності зрілої мРНК-мішені, хоча урацил в послідовностях кДНК замінений тимідином.

Термін "його варіант, що зустрічається в природі" відноситься до варіантів поліпептидної або нуклеїново-кислотної послідовності PCSK9, існуючої в природі в межах певної таксономічної групи, такої як ссавець, наприклад, миша, мавпа і переважно людина. У характерному випадку при посиленні на «варіанти, що зустрічаються в природі» поліпептиду термін може також охоплювати будь-який алельний варіант ДНК генома, кодуєчою PCSK9, яка знаходиться на хромосомі 4 в локусі 4 C7, в результаті хромосомної транслокації або дуплікації, і утворену від нього РНК, таку як мРНК. «Варіанти, що зустрічаються в природі», можуть також включати варіанти, утворені в результаті альтернативного сплайсингу мРНК PCSK9. При посиленні на конкретну поліпептидну послідовність, термін, наприклад, також включає форми білку, що зустрічаються в природі, які можуть, таким чином, зазнавати процесинг, наприклад, за допомогою ко- або посттрансляційних модифікацій, таких як відщеплення сигнального пептиду, протеолітичне розщеплювання, глікозилювання і т.д.

У деяких втіленнях винаходу олігомер (або його ділянка з суміжних нуклеотидів) вибраний з однієї з послідовностей або містить одну з послідовностей, вибраних з групи, що складається з SEQ ID NO: 28 або 29 або 44 або її підпослідовності з щонайменше 10 суміжних нуклеотидів, де олігомер (або його ділянка з суміжних нуклеотидів) може необов'язково містити одне, два або три помилкові спарування в порівнянні з послідовністю.

У деяких втіленнях винаходу послідовність-мішень вибрана з послідовностей, або містить послідовності або складається з послідовностей, вибраних з групи, що складається з SEQ ID NO 31, 32, 33, 34 або 45, або підпослідовності з щонайменше 10 суміжних нуклеотидів SEQ ID NO: 33, 34 або 45.

У деяких втіленнях винаходу підпослідовність може складатися з 11, 12, 13, 14, 15 або 16 суміжних нуклеотидів, наприклад, від 12 до 16 нуклеотидів. Доцільно в деяких втіленнях винаходу підпослідовність має таку ж довжину, як безперервна нуклеотидна послідовність олігомеру за винаходом (необов'язково за винятком ділянки В, коли ділянка В не комплементарна мішені).

Проте визнано, що в деяких втіленнях винаходу нуклеотидна послідовність олігомеру може містити додаткові 5' або 3' нуклеотиди, наприклад, незалежно 1, 2, 3, 4, 5 або 6 додаткових нуклеотидів на 5' та/або 3' кінці, які не комплементарні послідовності-мішені, і такі некомплементарні олігонуклеотиди можуть формувати ділянку В. В цьому відношенні олігомер за винаходом в деяких втіленнях винаходу може містити безперервну нуклеотидну послідовність, фланковану на 5' та/або 3' кінці додатковими нуклеотидами. У деяких втіленнях винаходу додаткові 5' або 3' нуклеотиди є нуклеотидами, що зустрічаються в природі, такими як ДНК або РНК. У деяких втіленнях винаходу додаткові 5' або 3' нуклеотиди можуть являти собою ділянку D, на яку посилаються в контексті гепмерних олігомерів в цьому документі.

У деяких втіленнях винаходу олігомер згідно з винаходом складається з нуклеотидної послідовності або містить нуклеотидну послідовність відповідно до SEQ ID NO: 27 або її підпослідовність з щонайменше 10 або 12 нуклеотидних основ.

5 У деяких втіленнях винаходу олігомер згідно з винаходом складається з нуклеотидної послідовності або містить нуклеотидну послідовність відповідно до SEQ ID NO: 28 або її підпослідовність з щонайменше 10 або 12 нуклеотидних основ. У переважному втіленні винаходу олігомер згідно з винаходом складається з нуклеотидної послідовності або містить нуклеотидну послідовність відповідно до SEQ ID NO: 5 або 6. В іншому переважному втіленні винаходу кон'югат олігомеру згідно з винаходом складається з нуклеотидної послідовності або
10 містить нуклеотидну послідовність відповідно до SEQ ID NO: 13 або 14 або 21 або 22.

У деяких втіленнях винаходу олігомер згідно з винаходом складається з нуклеотидної послідовності або містить нуклеотидну послідовність відповідно до SEQ ID NO: 29 або її підпослідовність з щонайменше 10 або 12 нуклеотидних основ. У переважному втіленні олігомер згідно з винаходом складається з нуклеотидної послідовності або містить нуклеотидну послідовність відповідно до SEQ ID NO: 7 або 8. В іншому переважному втіленні винаходу кон'югат олігомеру згідно з винаходом складається з нуклеотидної послідовності або містить нуклеотидну послідовність відповідно до SEQ ID NO: 15 або 16 або 23 або 24.
15

У деяких втіленнях винаходу олігомер згідно з винаходом складається з нуклеотидної послідовності або містить нуклеотидну послідовність відповідно до SEQ ID NO: 44 або її підпослідовність з щонайменше 10 або 12 нуклеотидних основ. У переважному втіленні винаходу олігомер згідно з винаходом складається з нуклеотидної послідовності або містить нуклеотидну послідовність відповідно до SEQ ID NO: 40. В іншому переважному втіленні винаходу кон'югат олігомеру згідно з винаходом складається з нуклеотидної послідовності або містить нуклеотидну послідовність відповідно до SEQ ID NO: 41, 42 або 43.
20

У деяких втіленнях винаходу олігомер згідно з винаходом складається з нуклеотидної послідовності або містить нуклеотидну послідовність відповідно до SEQ ID NO: 26. У переважному втіленні винаходу олігомер згідно з винаходом складається з нуклеотидної послідовності або містить нуклеотидну послідовність відповідно до SEQ ID NO: 2 або 3. В іншому переважному втіленні винаходу кон'югат олігомеру згідно з винаходом складається з нуклеотидної послідовності або містить нуклеотидну послідовність відповідно до SEQ ID NO: 10 або 11 або 18 або 19.
25
30

Довжина

Олігомери можуть містити послідовність або складатися з безперервної нуклеотидної послідовності сумарної довжини 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 або 22 суміжних нуклеотидів. Відрізки довжини можуть включати, наприклад, ділянку А або ділянку А і В.
35

У деяких втіленнях винаходу олігомери містять або складаються з безперервної нуклеотидної послідовності сумарної довжини 10-22, наприклад, 12-18, наприклад, 13-17 або 12-16, наприклад, 13, 14, 15, 16 суміжних нуклеотидів. Переважно олігомер ділянки А містить або складається з безперервної нуклеотидної послідовності з 14 суміжних нуклеотидів в довжину, прийнятніше з 15 суміжних нуклеотидів в довжину і найприйнятніше з 16 суміжних нуклеотидів в довжину.
40

У деяких втіленнях винаходу олігомер згідно з винаходом складається з не більше 22 нуклеотидів, наприклад, не більше 20 нуклеотидів, наприклад, не більше 18 нуклеотидів, наприклад, 15, 16 або 17 нуклеотидів. У деяких втіленнях винаходу олігомер за винаходом містить менше 20 нуклеотидів.
45

Аналоги нуклеотидів

Термін "нуклеотид" при використанні в цьому документі відноситься до глікозиду, що містить цукрове угруповання, угруповання основи і ковалентно зв'язану групу, таку як фосфатна або фосфоротіоатна міжнуклеотидна зв'язуюча група, і охоплює як нуклеотиди, що зустрічаються в природі, такі як ДНК або РНК, нуклеотиди, і такі що не зустрічаються в природі, які містять модифіковані цукрові угруповання та/або угруповання основ, які також називають в цьому документі "аналогами нуклеотидів". У цьому документі окремий нуклеотид (ланка) може також називатися мономером або нуклеїново-кислотою ланкою.
50

В області біохімії термін "нуклеозид" широко використовують як такий, що відноситься до глікозиду, який містить цукрове угруповання і угруповання основи. Ковалентний зв'язок між двома нуклеозидами може називатися міжнуклеозидним зв'язком. Альтернативно термін міжнуклеозидний зв'язок може використовуватися для характеристики зв'язку між нуклеотидами олігомеру.
55

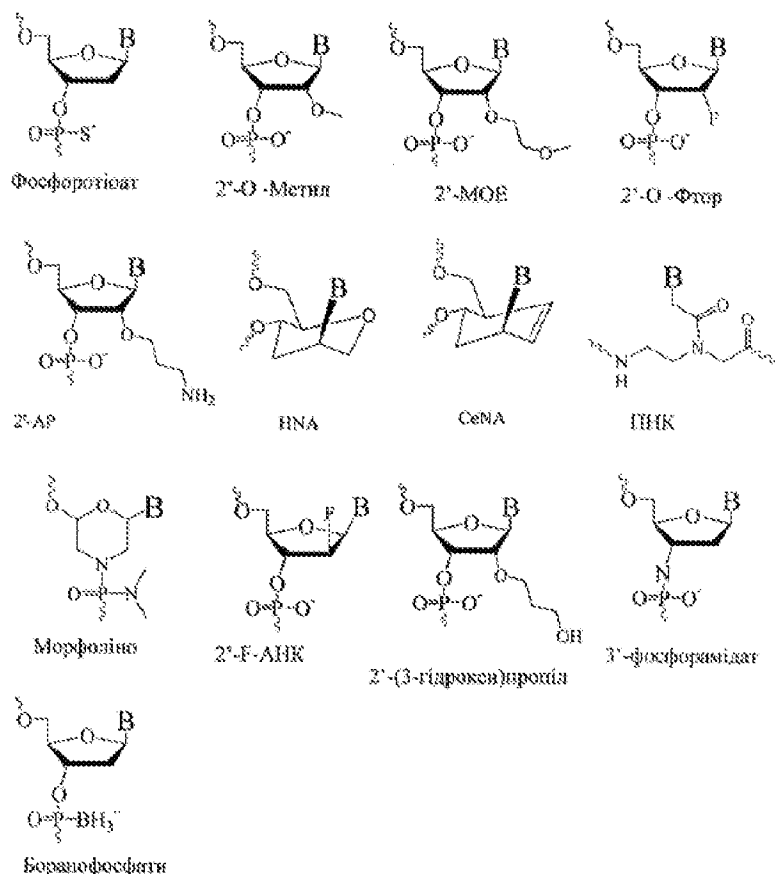
Як має бути зрозуміло звичайному фахівцю в цій області техніки, 5' нуклеотид олігонуклеотиду не містить 5' міжнуклеотидну зв'язуючу групу, хоча може містити або не містити
60

5' кінцеву групу, таку як фосфодієфір або фосфоротіоат, для кон'югації лінкера (B або Y або кон'югатне угруповання).

Нуклеотиди, що не зустрічаються в природі, включають нуклеотиди, що мають модифіковані цукрові угруповання, такі як біциклічні нуклеотиди або 2'-модифіковані нуклеотиди, такі як 2'-заміщені нуклеотиди.

"Аналоги нуклеотидів" є варіантами природних нуклеотидів, таких як ДНК- або РНК-нуклеотиди, в результаті модифікацій в цукрових угрупованнях та/або угрупованнях основ. Аналоги можуть бути такими, що в принципі виключно "мовчать" або "еквівалентними" природним нуклеотидом в контексті олігонуклеотиду, тобто не мають функціональної дії на той шлях, за допомогою якого олігомер інгібує експресію гена-мішені. Такі "еквівалентні" аналоги можуть бути, проте, корисними, якщо, наприклад, вони можуть бути простіше і дешевше одержані або стабільніші в умовах зберігання або одержання, або є кінцевою міткою або літкою. Переважно, проте, щоб аналоги мали функціональну дію на шлях, за допомогою якого олігомер інгібує експресію гена-мішені; наприклад, шляхом одержання підвищеної зв'язуючої спорідненості (посилення спорідненості) до мішені та/або підвищеній стійкості до внутрішньоклітинних нуклеаз та/або підвищеній легкості транспортування в клітину. Конкретні приклади аналогів нуклеозидів описані, наприклад, в статтях Freier & Altmann; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443 і Uhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213, і на схемі 1:

Схема 1



Олігомер може, таким чином, містити просту послідовність або складатися з простої послідовності нуклеотидів, що зустрічаються в природі - переважно 2'-дезоксирибонуклеотидів (як правило, званої в цьому документі "ДНК"), але також, можливо, рибонуклеотидів (як правило, званої в цьому документі "РНК") або комбінації таких нуклеотидів, що зустрічаються в природі, і одного або більше нуклеотидів, що не зустрічаються в природі, тобто аналогів нуклеотидів. Такі аналоги нуклеотидів можуть відповідним чином посилювати спорідненість олігомеру до послідовності-мішені. Приклади відповідних і переважних аналогів нуклеотидів наведені в WO 2007/031091 або приведені в цьому документі за допомогою посилання.

Включення в олігомер аналогів, що посилюють спорідненість, нуклеотидів, таких як ЗНК або 2'-заміщені цукри, може дати можливість зменшення розміру олігомеру, що специфічно

зв'язується, а також може зменшити верхню межу розміру олігомеру, до якого відбувається неспецифічне або аберантне зв'язування.

У деяких втіленнях винаходу олігомер містить щонайменше 2 аналоги нуклеотидів. У деяких втіленнях винаходу олігомер містить 3-8 аналогів нуклеотидів, наприклад, 6 або 7 аналогів нуклеотидів.

Приклади аналогів нуклеотидів включають модифікацію цукрового угруповання з одержанням 2'-заміщеної групи або з одержанням біциклічної структури, яка посилює зв'язуючу спорідненість, а також може забезпечити підвищену стійкість до нуклеаз.

У деяких втіленнях винаходу аналоги нуклеотидів, присутні всередині антисмислового олігомеру за даним винаходом (наприклад, в ділянках X' і Y', згаданих в розділі "Конструкція гепмера"), незалежно вибрані з, наприклад: ланок 2'-О-алкіл-РНК, ланок 2'-ОМе-РНК, ланок 2'-О-алкіл-ДНК, ланок 2'-аміно-ДНК, ланок 2'-фтор-ДНК, ланок ЗНК, ланок арабінонуклеїнової кислоти (АНК), ланок 2'-фтор-АНК, ланок HNA, ланок IHK (інтеркалюючій нуклеїнової кислоти - Christensen, 2002. Nucl. Acids. Res. 2002 30: 4918-4925, включена в цей документ за допомогою посилання) і ланок 2'МОЕ.

У деяких втіленнях винаходу аналоги нуклеотидів являють собою 2'-О-метоксиетил-РНК (2'МОЕ), мономери 2'-фтор-ДНК або аналоги нуклеотидів ЗНК, і антисмисловий олігонуклеотид за даним винаходом може сам по собі містити аналоги нуклеотидів, незалежно вибрані з цих трьох типів аналога, або може містити тільки один тип аналога, вибраний з трьох типів. У деяких втіленнях винаходу щонайменше один з аналогів нуклеотидів являє собою 2'-МОЕ-РНК, наприклад, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 ланок нуклеотидів 2'-МОЕ-РНК. У деяких втіленнях винаходу щонайменше один з аналогів нуклеотидів є 2'-фтор-ДНК, наприклад, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 ланок нуклеотидів 2'-фтор-ДНК.

Переважаючим аналогом нуклеотиду є ЗНК, наприклад, окси-ЗНК (наприклад, бета-D-окси-ЗНК і альфа-L-окси-ЗНК) та/або аміно-ЗНК (наприклад, бета-D-аміно-ЗНК і альфа-L-аміно-ЗНК) та/або тіо-ЗНК (наприклад, бета-D-тіо-ЗНК і альфа-L-тіо-ЗНК) та/або ENA (наприклад, бета-D-ENA і альфа-L-ENA). Найбільш прийнятна бета-D-окси-ЗНК.

У деяких втіленнях винаходу в антисмисловому олігонуклеотиді за даним винаходом або в його безперервній нуклеотидній послідовності присутній тільки один з описаних вище типів аналогів нуклеотидів.

У деяких втіленнях винаходу антисмисловий олігонуклеотид за даним винаходом містить щонайменше одну ланку замкненої нуклеїнової кислоти (ЗНК), наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 або 8 ланок ЗНК, наприклад, від 3 до 7 або від 4 до 8 ланок ЗНК. У безумовно найбільш прийнятних втіленнях винаходу щонайменше один з аналогів нуклеотидів є замкненою нуклеїновою кислотою (ЗНК); наприклад, щонайменше 3, або щонайменше 4, або щонайменше 5, або щонайменше 6, або щонайменше 7 або 8 з аналогів нуклеотидів можуть бути ЗНК. У деяких втіленнях винаходу всі аналоги нуклеотидів можуть бути ЗНК.

У деяких втіленнях винаходу антисмисловий олігонуклеотид за даним винаходом може містити і аналоги нуклеотидів (переважно ЗНК), і ланки ДНК. Переважно сума об'єднаних аналогів нуклеотидів (переважно ЗНК) і ланок ДНК складає 10-25, наприклад, 10-24, переважно 10-20, наприклад, 10-18, навіть прийнятніше 12-16. У деяких втіленнях винаходу нуклеотидна послідовність антисмислового олігонуклеотиду за даним винаходом, наприклад, безперервна нуклеотидна послідовність, складається з щонайменше одного аналога нуклеотиду (переважно ЗНК), а інші нуклеотидні ланки є ланками ДНК. У деяких втіленнях винаходу антисмисловий олігонуклеотид за даним винаходом містить тільки аналоги нуклеотидів ЗНК і нуклеотиди (такі як РНК або ДНК, найприйнятніше нуклеотиди ДНК), що зустрічаються в природі, необов'язково з модифікованими міжнуклеотидними зв'язками, такими як фосфоротіоат.

Зрозуміло, що при посиланні на переважний мотив нуклеотидної послідовності або переважну нуклеотидну послідовність, що складаються тільки з нуклеотидів, олігомери за винаходом, які визначені цією послідовністю, можуть включати відповідний аналог нуклеотиду замість одного або більше нуклеотидів, присутніх в цій послідовності, таких як ланки ЗНК або інші аналоги нуклеотидів, які підвищують стабільність дуплексу/температуру плавлення (T_m) дуплексу олігомер/мішень (тобто аналогів нуклеотидів, що посилюють спорідненість).

Аналіз T_m : Дуплекси олігонуклеотид: олігонуклеотид і РНК-мішень (РО) розводять до 3 мМ в 500 мл води без РНК-аз і змішують з 500 мл 2x T_m -буфера (200 мМ NaCl, 0,2 мМ етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА), 20 мМ фосфат Na, рН 7,0). Розчин нагрівають до 95°C протягом 3 хв, а потім дають можливість відпалу при кімнатній температурі протягом 30 хв. Температури плавлення (T_m) дуплексів вимірюють на спектрофотометрі Lambda 40 UV/VIS, обладнаному пристроєм програмування температури Пельтьє РТР6, з використанням програми PE TempLab (Perkin Elmer). Температуру різко піднімають з 20°C до 95°C, а потім різко знижують

до 25°C, реєструючи поглинання при 260 нм. Для оцінки T_m дуплексу використовують першу похідну і локальні максимуми і плавлення, і відпалу.

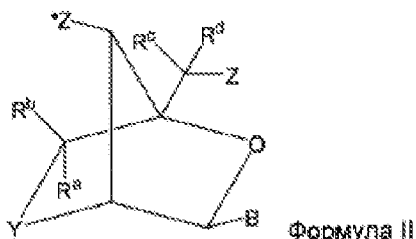
У деяких втіленнях винаходу які-небудь помилкові спаровування між нуклеотидною послідовністю олігомеру і послідовністю-мішенню переважно виявляються в ділянках зовні від аналогів нуклеотидів, що посилюють спорідненість, таких як ділянка Y', на яку посилаються в розділі "Конструкція гепмера", та/або в положенні немодифікованих нуклеотидів, наприклад, ДНК, в олігонуклеотиді та/або в ділянках, що знаходяться в 5' або 3' положенні до безперервної нуклеотидної послідовності.

ЗНК

Термін "ЗНК" відноситься до біциклічного аналога нуклеозиду, який містить місточковий зв'язок між 2' і 4' положенням в рибозному кільці (2'-4' біциклічний аналог нуклеотиду) і відомий як "замкнена нуклеїнова кислота". В літературі на ЗНК іноді посилаються як на місточкову або біциклічну нуклеїнову кислоту (BNA; bridged nucleic acid або bicyclic nucleic acid), і ці два терміни можна використовувати взаємозамінно. Термін ЗНК може відноситися до мономеру ЗНК або при використанні в контексті "олігонуклеотид ЗНК" ЗНК відноситься до олігонуклеотиду, що містить один або більше таких біциклічних аналогів нуклеотидів. У деяких аспектах біциклічні аналоги нуклеозидів є нуклеотидами ЗНК, і ці терміни можна, таким чином, використовувати взаємозамінно, і вони є такими втіленнями винаходу, які характеризуються також присутністю лінкерної групи (такої як місточкова група) між C2' і C4' рибозного цукрового кільця.

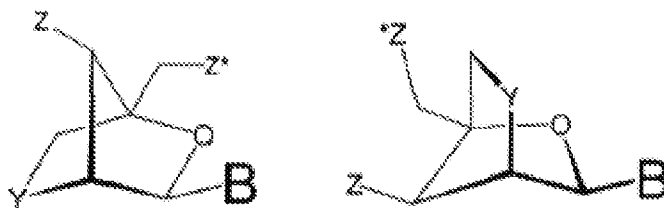
У деяких втіленнях винаходу антисмисловий олігонуклеотид за даним винаходом може містити обидві з бета-D-окси-ЗНК і одної або більше наступних ланок ЗНК: тіо-ЗНК, аміно-ЗНК, окси-ЗНК, 5'-метил-ЗНК та/або ENA або в бета-D, або в альфа-L конфігураціях або їх комбінацій. У деяких втіленнях винаходу усі цитозинові ланки ЗНК є 5'-метил-цитозином. У деяких втіленнях винаходу щонайменше одним аналогом нуклеозиду, присутнім в першій ділянці (X'), є біциклічний аналог нуклеозиду, наприклад, щонайменше 2, щонайменше 3, щонайменше 4, щонайменше 5, щонайменше 6, щонайменше 7, щонайменше 8 (за винятком нуклеозидів ДНК та/або РНК ділянки Y') аналогів нуклеозидів з модифікованим цукром, наприклад, біциклічних аналогів нуклеозидів, таких як ЗНК, наприклад, бета-D-X-ЗНК або альфа-L-X-ЗНК (де X є окси, аміно або тіо) або інші ЗНК, розкриті в цьому документі, включаючи без обмеження сЕТ, сМОЕ або 5'-Me-ЗНК.

У деяких втіленнях винаходу ЗНК, використовувана в олігонуклеотидних сполуках за винаходом, переважно має структуру загальної формули II:



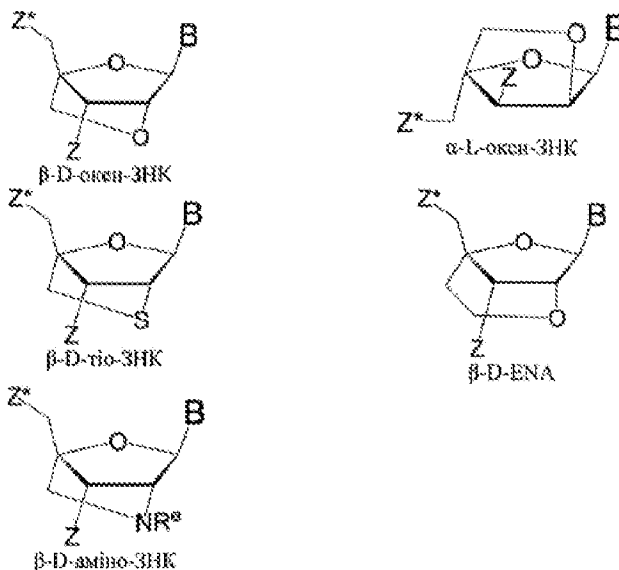
де Y вибраний з групи, що складається з -O-, -CH₂O-, -S-, -NH-, N(R^e) та/або -CH₂-; Z і Z* незалежно вибрані з міжнуклеотидного зв'язку, R^H, кінцевої групи або захисної групи; В становить угруповання природної або синтетичної нуклеотидної основи (нуклеотидну основу), і R^H вибраний з атома водню і C₁₋₄-алкілу; R^a, R^b, R^c, R^d і R^e не обов'язково незалежно вибрані з групи, що складається з атома водню, не обов'язково заміщеного C₁₋₁₂-алкілу, не обов'язково заміщеного C₂₋₁₂-алкенілу, не обов'язково заміщеного C₂₋₁₂-алкінілу, гідрокси, C₁₋₁₂-алкокси, C₂₋₁₂-алкоксиалкілу, C₂₋₁₂-алкенілокси, карбокси, C₁₋₁₂-алкоксикарбонілу, C₁₋₁₂-алкілкарбонілу, формілу, арилу, арилокси-карбонілу, арилокси, арилкарбонілу, гетероарилу, гетероарилокси-карбонілу, гетероарилокси, гетероарилкарбонілу, аміно, моно- і ди(C₁₋₆-алкіл)аміно, карбамоїлу, моно- і ди(C₁₋₆-алкіл)-аміно-карбонілу, аміно-C₁₋₆-алкіл-амінокарбонілу, моно- і ди(C₁₋₆-алкіл)аміно-C₁₋₆-алкіл-амінокарбонілу, C₁₋₆-алкіл-карбоніламіно, карбамідо, C₁₋₆-алканоїлокси, сульфоно, C₁₋₆-алкілсульфонілокси, нітро, азидо, сульфанілу, C₁₋₆-алкілтіо, атома галогену, інтеркаляторів ДНК, фотохімічно активних груп, термохімічно активних груп, хелатуючих груп, груп-репортерів і лігандів, де арил і гетероарил можуть бути не обов'язково заміщеними, і де два приєднаних до одного і того ж атому замісника R^a і R^b разом можуть означати не обов'язково заміщений метилен (=CH₂); і R^H вибраний з атома водню і C₁₋₄-алкілу. В деяких втіленнях винаходу R^a, R^b, R^c, R^d і R^e не обов'язково незалежно вибрані з групи, що складається з атома водню і C₁₋₆ алкілу, такого как метил. Для всіх хіральних центрів асиметричні групи

можуть знаходитися або в R, або в S орієнтації, наприклад, два ілюстративні стереохімічні ізомери включають бета-D і альфа-L ізоформи, які можна проілюструвати таким чином:



5

Конкретні ілюстративні ланки ЗНК показані нижче:



10 Термін "тіо-ЗНК" включає замкнений нуклеотид, в якому Y в приведеній вище загальній формулі вибраний з S або $-\text{CH}_2\text{-S}$. Тіо-ЗНК може знаходитися і в бета-D-, і в альфа-L-конфігурації.

Термін "аміно-ЗНК" включає замкнений нуклеотид, в якому Y в приведеній вище загальній формулі вибраний з $-\text{N}(\text{H})-$, $\text{N}(\text{R})-$, $\text{CH}_2\text{-N}(\text{H})-$ і $-\text{CH}_2\text{-N}(\text{R})-$, де R вибраний з атома водню і C_{1-4} -алкілу. Аміно-ЗНК може знаходитися і в бета-D-, і в альфа-L-конфігурації.

15 Термін "окси-ЗНК" включає замкнений нуклеотид, в якому Y в приведеній вище загальній формулі є -O-. Окси-ЗНК може знаходитися і в бета-D-, і в альфа-L-конфігурації.

Термін "ENA" включає замкнений нуклеотид, в якому Y в приведеній вище загальній формулі є $-\text{CH}_2\text{-O}$ (де атом кисню $-\text{CH}_2\text{-O}$ приєднаний в 2'-положенні відносно основи B). R^e позначає атом водню або метил.

20 У деяких ілюстративних втіленнях винаходу ЗНК вибрана з бета-D-окси-ЗНК, альфа-L-окси-ЗНК, бета-D-аміно-ЗНК і бета-D-тіо-ЗНК, зокрема, бета-D-окси-ЗНК.

При використанні в цьому документі "біциклічні нуклеозиди" відносяться до модифікованих нуклеозидів, що містять біциклічне цукрове угруповання. Приклади біциклічних нуклеозидів включають без обмеження нуклеозиди, що містять місточковий зв'язок між 4' і 2' атомами рибозильного кільця. У деяких втіленнях винаходу сполуки, запропоновані в цьому документі, включають один або більше біциклічних нуклеозидів, де місток містить 4'-2' біциклічні нуклеозиди. Приклади таких 4'-2' біциклічних нуклеозидів включають без обмежень одну з формул: 4'-(CH_2)-O-2' (ЗНК); 4'-(CH_2)-S-2'; 4'-(CH_2)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' і 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' та їх аналоги (див. патент US 7,399,845, опублікований 15 липня 2008 р.); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' та її аналоги (див. опубліковану міжнародну заявку на патент PCT WO 2009/006478, опубліковану 8 січня 2009 р.); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' та її аналоги (див. опубліковану міжнародну заявку на патент PCT WO 2008/150729, опубліковану 11 грудня 2008 р.); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (див. опубліковану заявку на патент US 2004/0171570, опубліковану 2 вересня 2004); 4'-CH₂-N(R)-O-2', де R позначає H, $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ алкіл або захисну групу (див. патент US 7,427,672, опублікований 23 вересня 2008 р.); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (див. Chattopadhyaya, et al, J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134); і 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' та її аналоги (див. опубліковану міжнародну заявку на

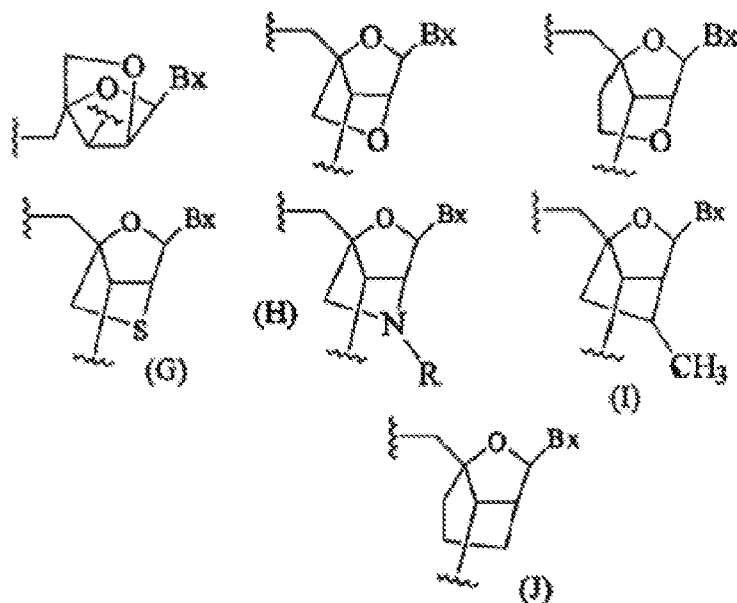
патент PCT WO 2008/154401, опубліковану 8 грудня 2008 р.). Також див., наприклад, статті: Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A., 2000, 97, 5633-5638; Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 129(26) 8362-8379 (Jul. 4, 2007); Elayadi et al., Curr. Opinion Invens. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch et al., Chem. Biol., 2001, 8, 1-7; Oram et al., Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; патенти US №№ 6,670,461, 7,053,207, 6,268,490, 6,770,748, 6,794,499, 7,034,133, 6,525,191, 7,399,845; опубліковані міжнародні заявки PCT WO 2004/106356, WO 94/14226, WO 2005/021570 і WO 2007/134181; публікації патентів US №№ US 2004/0171570, US 2007/0287831 і US 2008/0039618; і патенти US серійні №№ 12/129,154, 60/989,574, 61/026,995, 61/026,998, 61/056,564, 61/086,231, 61/097,787 і 61/099,844; і міжнародні заявки PCT №№ PCT/US2008/064591, PCT/US2008/066154 і PCT/US2008/068922. Кожен з вказаних вище біциклічних нуклеозидів може бути одержаний так, що він має одну або більше стереохімічних конфігурацій цукру, що включають, наприклад, а-L-рибофуранозу і бета-D-рибофуранозу (див. міжнародну заявку PCT DK98/00393, опубліковану 25 березня 1999 як WO 99/14226).

У деяких втіленнях винаходу біциклічні цукрові угруповання нуклеозидів ЗНК включають без обмежень сполуки, що мають щонайменше один містчковий зв'язок між 4' і 2' положенням пентозофуранозильного цукрового угруповання, де такі містчкові зв'язки незалежно містять 1 або від 2 до 4 зв'язаних груп, незалежно вибраних з $-\text{[CiR}_a\text{XR}_b\text{)]-}$, $-\text{C(R}_a\text{)=C(R}_b\text{)-}$, $-\text{C(R}_a\text{)=N-}$, $-\text{C(=NR}_a\text{)-}$, $-\text{C(=O)-}$, $-\text{C(=S)-}$, $-\text{O-}$, $-\text{Si(R}_a\text{)}_2\text{-}$, $-\text{S(=O)}_x\text{-}$ і $-\text{N(R}_a\text{)-}$; де: x дорівнює 0, 1 або 2; n дорівнює 1, 2, 3 або 4; кожний R_a і R_b незалежно позначає H, захисну групу, гідроксил, $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ алкіл, заміщений $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ алкіл, $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ алкеніл, заміщений $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ алкеніл, $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ алкініл, заміщений $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ алкініл, $\text{C}_5\text{-C}_{20}$ арил, заміщений $\text{C}_5\text{-C}_{20}$ арил, гетероциклічний радикал, заміщений гетероциклічний радикал, гетероарил, заміщений гетероарил, $\text{C}_5\text{-C}_7$ аліциклічний радикал, заміщений $\text{C}_5\text{-C}_7$ аліциклічний радикал, атом галогену, OJ_1 , NJ_1J_2 , SJ_1 , N_3 , COOJ_1 , ацил (C(=O)-H), заміщений ацил, CN , сульфоніл ($\text{S(=O)}_2\text{-J}_1$) або сульфоксил (S(=O)-J_1); і кожний J_1 і J_2 незалежно позначає H, $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкіл, заміщений $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ алкіл, $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ алкеніл, заміщений $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ алкеніл, $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ алкініл, заміщений $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ алкініл, $\text{C}_5\text{-C}_{20}$ арил, заміщений $\text{C}_5\text{-C}_{20}$ арил, ацил (C(=O)-H), заміщений ацил, гетероциклічний радикал, заміщений гетероциклічний радикал, $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ аміноалкіл, заміщений $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ аміноалкіл або захисну групу.

У деяких втіленнях винаходу містчковий зв'язок циклічного цукрового угруповання являє собою $-\text{[C(R}_a\text{)(R}_b\text{)]}_n\text{-}$, $-\text{[C(R}_a\text{)(R}_b\text{)]}_n\text{-O-}$, $-\text{C(R}_a\text{R}_b\text{)-N(R)-O-}$ або $-\text{C(R}_a\text{R}_b\text{)-O-N(R)-}$. У деяких втіленнях винаходу містчковий зв'язок являє собою 4'- $\text{CH}_2\text{-2'}$, 4'- $\text{(CH}_2\text{)}_2\text{-2'}$, 4'- $\text{(CH}_2\text{)}_3\text{-2'}$, 4'- $\text{CH}_2\text{-O-2'}$, 4'- $\text{(CH}_2\text{)}_2\text{-O-2'}$, 4'- $\text{CH}_2\text{-O-N(R)-2'}$ і 4'- $\text{CH}_2\text{-N(R)-O-2'}$, де кожний R незалежно позначає H, захисну групу або $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ алкіл.

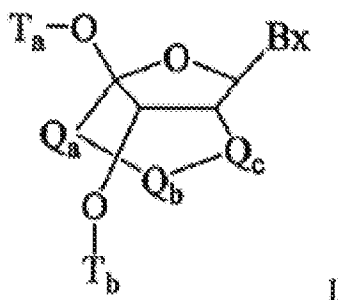
У деяких втіленнях винаходу біциклічні нуклеозиди додатково визначені ізомерною конфігурацією. Наприклад, нуклеозид, що містить містчковий зв'язок 4'-2'-метилен-окси, може знаходитися в а-L конфігурації або в бета-D конфігурації. Раніше а-L-метиленокси (4'- $\text{CH}_2\text{-O-2'}$) BNA включали в антисмислові олігонуклеотиди, які проявляли антисмислову активність (Frieden et al, Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365-6372).

У деяких втіленнях винаходу біциклічні нуклеозиди включають без обмежень (A) а-L-Метиленокси (4'- $\text{CH}_2\text{-O-2'}$) BNA, (B) бета-D-Метиленокси (4'- $\text{CH}_2\text{-O-2'}$) BNA, (C) Етиленокси (4'- $\text{(CH}_2\text{)}_2\text{-O-2'}$) BNA, (D) Аміноокси (4'- $\text{CH}_2\text{-O-N(R)-2'}$) BNA, (E) Оксаміно (4'- $\text{CH}_2\text{-N(R)-O-2'}$) BNA, (F) Метил(метиленокси) (4'- $\text{CH(CH}_3\text{)-O-2'}$) BNA, (G) метилен-тіо (4'- $\text{CH}_2\text{-S-2'}$) BNA, (H) метилен-аміно (4'- $\text{CH}_2\text{-N(R)-2'}$) BNA, (I) метилкарбоциклічну (4'- $\text{CH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)-2'}$) BNA і (J) пропіленкарбоциклічну (4'- $\text{(CH}_2\text{)}_3\text{-2'}$) BNA, як зображено нижче.



де Vx позначає угруповання основи, і R незалежно позначає H, захисну групу або C₁-C₂ алкіл.

5 У деяких втіленнях винаходу біциклічний нуклеозид визначений формулою I:



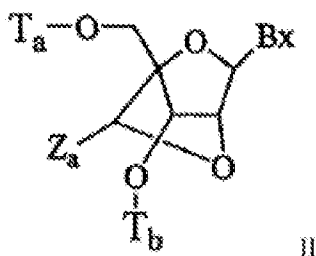
де:

10 Vx позначає гетероциклічне угруповання основи;
 -Q_a-Q_b-Q_c- позначає -CH₂-N(R_c)-CH₂-, -C(=O)-N(R_c)-CH₂-, -CH₂-O-N(R_c)-, -CH₂-N(R_c)-O- або -N(R_c)-O-CH₂;

R_c позначає C₁-C₁₂ алкіл або аміно-захисну групу; і

15 T_a і T_b кожен незалежно позначає H, гідрокси-захисну групу, кон'югатну групу, реакційну фосфорну групу, фосфорне угруповання або ковалентне приєднання до іммобілізуючого носія.

У деяких втіленнях винаходу біциклічний нуклеозид визначений формулою II:



20 де:

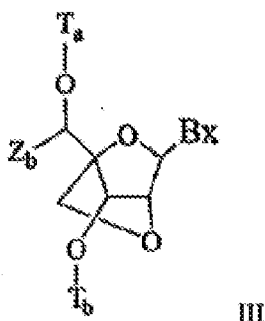
Vx позначає гетероциклічне угруповання основи;

T_a і T_b кожен незалежно позначає H, гідрокси-захисну групу, кон'югатну групу, реакційну фосфорну групу, фосфорне угруповання або ковалентне приєднання до іммобілізуючого носія; Z_a позначає C₁-C₆ алкіл, C₂-C₆ алкеніл, C₂-C₆ алкініл, заміщений C₁-C₆ алкіл, заміщений C₂-C₆

алкеніл, заміщений С₂-С₆ алкініл, ацил, заміщений ацил, заміщений амід, тиол або заміщений тиол.

У деяких втіленнях винаходу кожна із заміщених груп незалежно є моно- або полізаміщеною групами замісників, незалежно вибраними з атома галогену, оксо, гідроксилу OJ_c, NJ_d, SJ_c, N₃, C(=X)J_c і NJ_eC(=X)NJ_cJ_d, де кожен J_c, J_d і J_e незалежно позначає H, С₁-С₆ алкіл або заміщений С₁-С₆ алкіл, і X позначає O або NJ_c.

У деяких втіленнях винаходу біциклічний нуклеозид визначений формулою III:



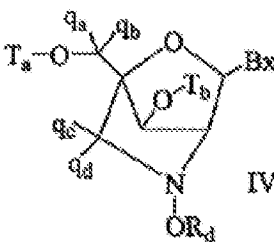
де:

Bx позначає гетероциклічне угруповання основи;

T_a і T_b кожен незалежно позначає H, гідроксил-захисну групу, кон'югатну групу, реакційну фосфорну групу, фосфорне угруповання або ковалентне приєднання до іммобілізуючого носія;

R_d позначає С₁-С₆ алкіл, С₂-С₆ алкеніл, С₂-С₆ алкініл, заміщений С₁-С₆ алкіл, заміщений С₂-С₆ алкеніл, заміщений С₂-С₆ алкініл або заміщений ацил (C(=O)-).

У деяких втіленнях винаходу біциклічний нуклеозид визначений формулою IV:



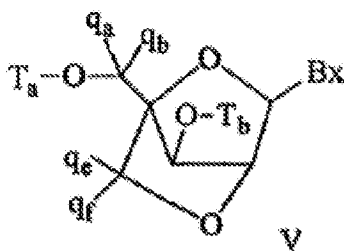
де:

Bx позначає гетероциклічне угруповання основи;

T_a і T_b кожен незалежно позначає H, гідроксил-захисну групу, кон'югатну групу, реакційну фосфорну групу, фосфорне угруповання або ковалентне приєднання до іммобілізуючого носія;

R_d позначає С₁-С₆ алкіл, заміщений С₁-С₆ алкіл, С₂-С₆ алкеніл, заміщений С₂-С₆ алкеніл, С₂-С₆ алкініл, заміщений С₂-С₆ алкініл; кожний q_b, q_c і q_d незалежно позначає H, атом галогену, С₁-С₆ алкіл, заміщений С₁-С₆ алкіл, С₂-С₆ алкеніл, заміщений С₂-С₆ алкеніл, С₂-С₆ алкініл або заміщений С₂-С₆ алкініл, С₁-С₆ алкоксил, заміщений С₂-С₆ алкоксил, ацил, заміщений ацил, С₁-С₆ аміноалкіл або заміщений С₁-С₆ аміноалкіл.

У деяких втіленнях винаходу біциклічний нуклеозид визначений формулою V:



де:

Bx позначає гетероциклічне угруповання основи;

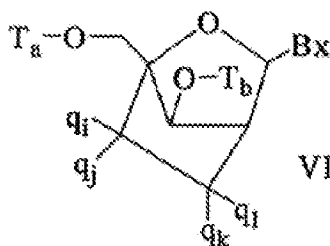
T_a і T_b кожен незалежно позначає H, гідроксил-захисну групу, кон'югатну групу, реакційну фосфорну групу, фосфорне угруповання або ковалентне приєднання до іммобілізуючого носія;

q_a , q_b , q_c і q_f кожний незалежно позначає атом водню, атом галогену, C_1 - C_{12} алкіл, заміщений C_1 - C_{12} алкіл, C_2 - C_{12} алкеніл, заміщений C_2 - C_{12} алкеніл, C_2 - C_{12} алкініл, заміщений C_2 - C_{12} алкініл, C_1 - C_{12} алкокси, заміщений C_1 - C_{12} алкокси, OJ_j , SJ_j , SOJ_j , SO_2J_j , NJ_jJ_k , N_3 , CN , $C(=O)OJ_j$, $C(=O)NJ_jJ_k$, $C(=O)J_j$, $O-C(=O)NJ_jJ_k$, $N(H)C(=NH)NJ_jJ_k$, $N(H)C(=O)NJ_jJ_k$ або $N(H)C(=S)NJ_jJ_k$; або q_e і q_f разом позначають $=C(q_g)(q_h)$; q_g і q_h кожний незалежно позначає H, атом галогену, C_1 - C_{12} алкіл або заміщений C_1 - C_{12} алкіл.

Синтез і одержання мономерів метиленокси (4'- CH_2 -O-2') BNA аденіну, цитозину, гуаніну, 5-метил-цитозину, тиміну і урацилу в поєднанні з їх властивостями олігомеризації і розпізнавання нуклеїнових кислот описані (див., наприклад, статтю Koshkin et al., *Tetrahedron*, 1998, 54, 3607-3630). BNA та їх одержання також описані в документах WO 98/39352 і WO 99/14226.

Аналоги метиленокси (4'- CH_2 -O-2') BNA, метиленокси (4'- CH_2 -O-2') BNA і 2'-тіо-BNA також одержані (див., наприклад, статтю Kumar et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 2219-2222). Одержання замкнених аналогів нуклеозидів, що містять олігодезоксирибонуклеотидні дуплекси, як субстрати для полімераз нуклеїнових кислот також описано (див., наприклад, Wengel et al., WO 99/14226). Крім того, на рівні техніки описаний синтез 2'-аміно-BNA, нового конформаційно-обмеженого аналога олігонуклеотиду з високою спорідненістю (див., наприклад, Singh et al., *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 10035-10039). Крім того, раніше описані 2'-аміно- і 2'-метиламіно-BNA і термостабільність їх дуплексів з комплементарними РНК і ДНК.

У деяких втіленнях винаходу біциклічні нуклеозиди визначені формулою VI:



де:

B_x позначає гетероциклічне угруповання основи;

T_a і T_b кожен незалежно позначає H, гідроксил-захисну групу, кон'югатну групу, реакційну фосфорну групу, фосфорне угруповання або ковалентне приєднання до іммобілізуючого носія; кожен q_i , q_j , q_k і q_l незалежно позначає H, атом галогену, C_1 - C_{12} алкіл, заміщений C_1 - C_{12} алкіл, C_2 - C_{12} алкеніл, заміщений C_2 - C_{12} алкеніл, C_2 - C_{12} алкініл, заміщений C_2 - C_{12} алкініл, C_1 - C_{12} алкоксил, заміщений C_2 - C_{12} алкоксил, OJ_j , SJ_j , SOJ_j , SO_2J_j , NJ_jJ_k , N_3 , CN , $C(=O)OJ_j$, $C(=O)NJ_jJ_k$, $C(=O)J_j$, $O-C(=O)NJ_jJ_k$, $N(H)C(=NH)NJ_jJ_k$, $N(H)C(=O)NJ_jJ_k$ або $(H)C(=S)NJ_jJ_k$; і q_i і q_j або q_i і q_k разом позначають $=C(q_g)(q_h)$, де q_g і q_h кожен незалежно позначає H, атом галогену, C_1 - C_{12} алкіл або заміщений C_1 - C_6 алкіл.

Описані інші карбоциклічні біциклічні нуклеозиди, що мають місточковий зв'язок 4'-(CH_2) $_3$ -2', і алкенільний аналог, місточковий зв'язок 4'- $CH=CH$ - CH_2 -2' (див., наприклад, Freier et al, *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22), 4429-4443 і Albaek et al, *J. Org. Chem.*, 2006, 71, 7731-77 '40). Синтез і одержання карбоциклічних біциклічних нуклеозидів у поєднанні з їх олігомеризацією і біохімічними дослідженнями також описані (див., наприклад, Srivastava et al, *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129(26), 8362-8379).

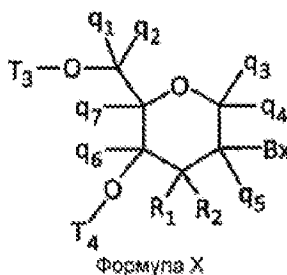
При використанні в цьому документі "4'-2' біциклічний нуклеозид" або "4'-2' біциклічний нуклеозид" відноситься до біциклічних нуклеозидів, що містять кільце фуранози, що містить місток, що сполучає 2' атом вуглецю і 4' атом вуглецю.

При використанні в цьому документі "моноциклічні нуклеозиди" відносяться до нуклеозидів, що містить модифіковані цукрові угруповання, що є не біциклічними цукровими угрупованнями. У деяких втіленнях винаходу цукрове угруповання або аналог цукрового угруповання нуклеозиду може бути модифіковане або заміщене в будь-якому положенні.

При використанні в цьому документі "2'-модифікований цукор" означає фуранозильний цукор, модифікований в 2' положенні. У деяких втіленнях винаходу такі модифікації включають замісники, вибрані з: галогеніду, що включає без обмежень заміщений і незаміщений алкокси, заміщений і незаміщений тіоалкіл, заміщений і незаміщений аміноалкіл, заміщений і незаміщений алкіл, заміщений і незаміщений аліл і заміщений і незаміщений алкініл. У деяких втіленнях винаходу 2' модифікації вибрано із замісників, що включають без обмежень: $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$, $OCH_2C(=O)N(H)CH_3$ і $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$, де n і m дорівнюють від 1 до приблизно 10. Інші 2'-групи замісників

також можуть бути вибрані з: C₁-C₁₂ алкілу; заміщеного алкілу; алкенілу; алкінілу; алкарилу; аралкілу; О-алкарилу або О-аралкілу; SH; SCH₃; OCN; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; SOCH₃; SO₂CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; гетероциклоалкіл; гетероциклоалкаріл; аміноалкіламіно; поліалкіламіно; заміщеного силілу; R; відщеплювану групу; групу-репортер; інтеркалятор; групу для поліпшення фармакокінетичних властивостей і групу для поліпшення фармакодинамічних властивостей антисмислової сполуки, а також інші замісники, що мають подібні властивості. У деяких втіленнях винаходу модифіковані нуклеозиди містять бічний ланцюг 2'-МОЕ (див., наприклад, Baker et al., J. Biol. Chem., 1997, 272, 1 1944-12000). Описано, що таке заміщення 2'-МОЕ має поліпшену зв'язуючу спорідненість в порівнянні з немодифікованими нуклеозидами і з іншими модифікованими нуклеозидами, такими як 2'-О-метил-, О-пропіл- і О-амінопропіл-. Також показано, що олігонуклеотиди, що мають замісник 2'-МОЕ, є антисмисловими інгібіторами експресії генів з перспективними ознаками для застосування *in vivo* (див., наприклад, Martin, P., *He/v. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504; Altmann et al., *Chimia*, 1996, 50, 168-176; Altmann et al., *Biochem. Soc. Trans.*, 1996, 24, 630-637; і Altmann et al., *Nucleosides Nucleotides*, 1997, 16, 917-926).

При використанні в цьому документі "тетрагідропірановий модифікований нуклеозид" або "ТГП модифікований нуклеозид" означає нуклеозид, тетрагідропірановий "цукор", що має, заміщуючий пентафуранозильний залишок в звичайних нуклеозидах (сурогат цукру). Модифіковані ТГП нуклеозиди включають нуклеозиди, на які посилаються в цій області техніки як на гекситолову нуклеїнову кислоту (HNA, hexitol nucleic acid), анитолову нуклеїнову кислоту (ANA, anitol nucleic acid), манитолову нуклеїнову кислоту (див. статтю Leumann, C.J. *Bioorg. and Med. Chem.* (2002) 10:841- 854), фтор-HNA (F-HNA) або сполуки, визначені формулою X:



де незалежно для кожного із згаданих щонайменше одного тетрагідропіранового аналога нуклеозиду формули X:

Bx позначає гетероциклічне угруповання основи;

T₃ і T₄ кожен незалежно позначає міжнуклеозидну зв'язуючу групу, що зв'язує тетрагідропірановий аналог нуклеозиду з антисмисловою сполукою, або один з T₃ і T₄ позначає міжнуклеозидну зв'язуючу групу, що зв'язує тетрагідропірановий аналог нуклеозиду з антисмисловою сполукою, а інший з T₃ і T₄ позначає H, захисну групу гідроксилу, групу, пов'язану з кон'югатом, або 5' або 3'-кінцеву групу; q₁ q₂ q₃ q₄ q₅, q₆ і q₇ кожний незалежно позначає H, C₁-C₆ алкіл, заміщений C₁-C₆ алкіл, C₂-C₆ алкеніл, заміщений C₂-C₆ алкеніл, C₂-C₆ алкініл або заміщений C₂-C₆ алкініл; і один з R₁ і R₂ позначає атом водню, а інший вибраний з атома галогену, заміщеного або незаміщеного алкокси, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, OC(=X)J₁, OC(=X)NJ₁J₂, NJ₃C(=X)NJ₁J₂ і CN, де X позначає O, S або NJ₁, і кожен J₁, J₂ і J₃ незалежно позначає H або C₁-C₆ алкіл.

У деяких втіленнях винаходу запропоновані модифікованні ТГП нуклеозиди формули X, де q_m, q_n, q_p, q_r, q_s, q_t і q_u кожен позначає H. У деяких втіленнях винаходу щонайменше один з q_m, q_n, q_p, q_r, q_s, q_t і q_u відрізняється від H. У деяких втіленнях винаходу щонайменше один з q_m, q_n, q_p, q_r, q_s, q_t і q_u позначає метил. У деяких втіленнях винаходу запропоновані ТГП нуклеозиди формули X, де один з R₁ і R₂ позначає F. У деяких втіленнях винаходу R₁ позначає атом фтору, а R₂ позначає H, R₁ позначає метокси, а R₂ позначає H, і R₁ позначає метоксиетокси, а R₂ позначає H.

При використанні в цьому документі "2'-модифікований" або "2'-заміщений" відноситься до нуклеозиду, що містить цукор, який містить замісник в 2' положенні, що відрізняється від H або OH. 2'-Модифіковані нуклеозиди включають без обмеження нуклеозиди з не місточковими 2'-замісниками, такими як аліл, аміно, азидо, тіо, О-аліл, О-C₁-C₁₀ алкіл, -OCF₃, O-(CH₂)₂-O-CH₃, 2'-O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n) або O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), де кожний R_m і R_n незалежно позначає H, або заміщений або незаміщений C₁-C₁₀ алкіл. 2'-Модифіковані нуклеозиди можуть

додатково містити інші модифікації, наприклад, в інших положеннях цукру та/або в нуклеотидній основі.

При використанні в цьому документі "2'-F" відноситься до цукру, що містить групу фтор в 2'-положенні.

5 При використанні в цьому документі "2'-OMe" або "2'-OCH₃" або "2'-O-метил" кожен відноситься до нуклеозиду, що містить цукор, який містить групу, -OCH₃ в 2'-положенні цукрового кільця.

При використанні в цьому документі "олігонуклеотид" відноситься до сполуки, що містить безліч зв'язаних нуклеозидів.

10 У деяких втіленнях винаходу один або більше з безлічі нуклеозидів модифікований. У деяких втіленнях винаходу олігонуклеотид містить один або більше рибонуклеозидів (РНК) та/або дезоксирибонуклеозидів (ДНК).

У цій області техніки також відомо багато інших біциклічних і трициклічних кільцевих систем сурогатів цукрів, які можна використовувати для модифікації нуклеозидів для включення в антисмислові сполуки (див., наприклад, оглядову статтю Leumann, J.C., Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2002, 10, 841-854). Такі кільцеві системи можуть зазнавати різні додаткові заміщення для посилення активності. Способи одержання модифікованих цукрів також відомі фахівцям в цій області техніки. У нуклеотидів, що мають модифіковані цукрові угруповання, зберігаються угруповання нуклеотидних основ (природні, модифіковані або їх комбінації) для гібридизації з відповідною нуклеїною кислотою-мішенню.

У деяких втіленнях винаходу антисмислові сполуки містять один або більше нуклеотидів, що мають модифіковані цукрові угруповання. У деяких втіленнях винаходу модифіковане цукрове угруповання є 2'-МОЕ. У деяких втіленнях винаходу модифіковані 2'-МОЕ нуклеотиди сконструйовані у вигляді гепмерного мотиву. У деяких втіленнях винаходу модифіковане цукрове угруповання є сEt. У деяких втіленнях винаходу модифіковані сEt нуклеотиди сконструйовані за допомогою сегментів-крил гепмерного мотиву.

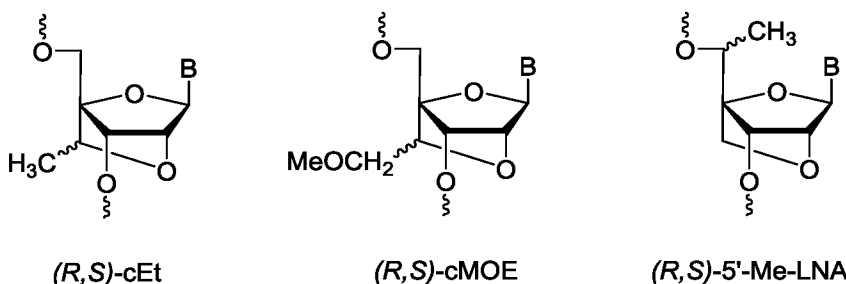
У деяких втіленнях винаходу в ЗНК R^{4'} і R^{2'} разом означають бірадикал -O-CH(CH₂OCH₃)-(2'-O-метоксиетил-біциклічні нуклеїнові кислоти - Seth at al., 2010, J. Org. Chem) або в R-, або в S-конфігурації.

30 У деяких втіленнях винаходу в ЗНК R^{4'} і R^{2'} разом означають бірадикал -O-CH(CH₂CH₃)-(2'-O-етил-біциклічні нуклеїнові кислоти - Seth at al., 2010, J. Org. Chem) або в R-, або в S-конфігурації.

У деяких втіленнях винаходу в ЗНК R^{4'} і R^{2'} разом означають бірадикал -O-CH(CH₃)- або в R-, або в S-конфігурації. У деяких втіленнях винаходу R^{4'} і R^{2'} разом означають бірадикал -O-CH₂-O-CH₂- (Seth at al., 2010, J. Org. Chem).

35 У деяких втіленнях винаходу в ЗНК R^{4'} і R^{2'} разом означають бірадикал -O-NR-CH₃- (Seth at al., 2010, J. Org. Chem).

У деяких втіленнях винаходу ланки ЗНК мають структуру, вибрану з наступної групи:



Включення аналогів нуклеотидів, що посилюють спорідненість, в олігомер, такий як ЗНК або 2'-заміщені цукри, може дати можливість зменшення розміру олігомеру, що специфічно зв'язується, і може також зменшити верхню межу розміру олігомеру, до якого відбувається неспецифічне або аберантне зв'язування.

45 Автори винаходу оцінили нефротоксичність сполуки сЕТ (використовуючи (S)-сЕТ з послідовністю (Сполука ID 6/411847 WO 2009/12495 і порівняльна сполука бета-D-окси-ЗНК (6/392063 WO 2009/12495) і виявили, що сполуки сЕТ викликають несподівано високу нейротоксичність в порівнянні з контролем бета-D-окси-ЗНК. Дослідження було дослідженням однієї дози з умертвінням через 3 доби (методологію див. в прикладі 41 EP1984381, хоча автори винаходу використовували мишей NMRI). Нефротоксичність була підтверджена гістологічним аналізом. Зокрема, ознаки нейротоксичності автори винаходу спостерігали при

нижчих дозах сполуки сЕТ в порівнянні з дозами, при яких була відмічена сироваткова аланінамінотрансфераза (ALT), що вказує на те, що нефротоксичність сполук сЕТ може бути особливою проблемою. Таким чином, застосування кон'югатів за даним винаходом, таких як тривалентні кон'югати GaINAc, у високій мірі корисно при зменшенні нефротоксичності сполук ЗНК, таких як сполуки сЕТ.

У деяких втіленнях винаходу олігомер містить щонайменше 1 аналог нуклеозиду. У деяких втіленнях винаходу олігомер містить щонайменше 2 аналоги нуклеотиду. У деяких втіленнях винаходу олігомер містить 3-8 аналогів нуклеотидів, наприклад, 6 або 7 аналогів нуклеотидів. У безумовно найбільш прийнятних втіленнях винаходу щонайменше один з аналогів нуклеотидів є замкненою нуклеїною кислотою (ЗНК); наприклад, щонайменше 3, або щонайменше 4, або щонайменше 5, або щонайменше 6, або щонайменше 7 або 8 з аналогів нуклеотидів може бути ЗНК. У деяких втіленнях винаходу всі аналоги нуклеотидів можуть бути ЗНК.

Повинно бути зрозуміло, що при посиланні на переважний мотив нуклеотидної послідовності або нуклеотидну послідовність, яка складається тільки з нуклеотидів, олігомери за винаходом, які визначені цією послідовністю, можуть містити відповідний аналог нуклеотиду замість одного або більше нуклеотидів, присутніх в згаданій послідовності, таких як ланки ЗНК або інші аналоги нуклеотидів, які підвищують стабільність дуплексу/ T_m дуплексу олігомер/мішень (тобто аналоги нуклеотидів, що посилюють спорідненість).

Переважний аналог нуклеотиду є ЗНК, такою як окси-ЗНК (такою як бета-D-окси-ЗНК і альфа-L-окси-ЗНК) та/або аміно-ЗНК (такою як бета-D-аміно-ЗНК і альфа-L-аміно-ЗНК) та/або тіо-ЗНК (такою як бета-D-тіо-ЗНК і альфа-L-тіо-ЗНК) та/або ENA (такою як бета-D- ENA і альфа-L-ENA).

У деяких втіленнях винаходу олігомер за винаходом, такий як ділянка А, може містити ланки ЗНК та інші аналоги нуклеотидів. Додаткові аналоги нуклеотидів, присутні в межах олігомеру за винаходом, незалежно вибрані, наприклад, з: ланок 2'-О-алкіл-РНК, ланок 2'- аміно-ДНК, ланок 2'-фтор-ДНК, ланок ЗНК, ланок арабінонуклеїнової кислоти (АНК), ланок 2'- фтор-АНК, ланок HNA, ланок INA (інтеркалюючої нуклеїнової кислоти - стаття Christensen, 2002. Nucl. Acids. Res. 2002 30: 4918-4925, включена в цей документ за допомогою посилання) і ланок 2'МОЕ. У деяких втіленнях винаходу в олігомері за винаходом, наприклад, в першій ділянці, або в безперервній нуклеотидній послідовності присутній тільки один тип аналогів нуклеотидів.

У деяких втіленнях винаходу олігомер згідно з винаходом (ділянка А) може, таким чином, містити щонайменше одну ланку замкненої нуклеїнової кислоти (ЗНК), наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 або 8 ланок ЗНК, наприклад, 3-7 або 4-8 ланок ЗНК або 3, 4, 5, 6 або 7 ланок ЗНК. У деяких втіленнях винаходу всі аналоги нуклеотидів є ЗНК. У деяких втіленнях винаходу олігомери можуть містити обидві з бета-D-окси-ЗНК і одну або більше наступних ланок ЗНК: тіо-ЗНК, аміно-ЗНК, окси-ЗНК та/або ENA або в бета-D, або в альфа-L конфігураціях або їх комбінації. У деяких втіленнях винаходу усі цитозинові ланки ЗНК є 5'-метил-цитозином. У деяких втіленнях винаходу олігомер (такий як перші і необов'язково другі ділянки) може містити обидві ланки ЗНК і ДНК. У деяких втіленнях винаходу сума комбінованих ланок ЗНК і ДНК складає 10-25, наприклад, 10-24, переважно 10-20, наприклад, 10-18, наприклад, 12-16. У деяких втіленнях винаходу за винаходом нуклеотидна послідовність олігомеру, його першої ділянки, така як безперервна нуклеотидна послідовність, складається з щонайменше однієї ланки ЗНК, а інші нуклеотидні ланки є ланками ДНК. У деяких втіленнях винаходу олігомер або його перша ділянка містить тільки ЗНК, аналоги нуклеотидів і нуклеотиди (такі як нуклеотиди РНК або ДНК, найприйнятніше ДНК), що зустрічаються в природі, необов'язково з модифікованими міжнуклеотидними зв'язками, такими як фосфоротіоат.

Рекрутинг РНКаз

Відомо, що олігомерна сполука може функціонувати за допомогою розщеплювання мРНК-мішені, не опосередкованої РНКазою, наприклад, шляхом стеричного утруднення трансляції або іншими способами. У деяких втіленнях винаходу олігомери за винаходом здатні до рекрутингу ендорибонуклеази (РНКаз), такої як РНКаз Н.

Переважно, щоб такі олігомери, такі як ділянка А або безперервна нуклеотидна послідовність, що містять ділянку з щонайменше 4, наприклад, щонайменше 5, наприклад, щонайменше 6, наприклад, щонайменше 7 послідовних нуклеотидних ланок, наприклад, щонайменше 8 або щонайменше 9 послідовних нуклеотидних ланок (залишків), що включають 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 або 16 послідовних нуклеотидів, які при формуванні в дуплексі з комплементарною РНК-мішенню здатні до рекрутингу РНКаз (таких як ланки ДНК). Безперервна послідовність, здатна до рекрутингу РНКаз, може бути ділянкою Y', на якусилаються в контексті гепмера, як розкрито в цьому документі. У деяких втіленнях винаходу

розмір безперервної послідовності, здатної до рекрутингу РНКаз, такий як ділянка Y', може бути більше, наприклад, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 або 20 нуклеотидних ланок.

У EP 1222309 запропоновані способи визначення активності РНКаз *in vitro*, які можна використовувати для визначення здатності до рекрутингу РНКаз. Олігомер вважають здатним до рекрутингу РНКаз, якщо при забезпеченні комплементарної РНК-мішені він має початкову швидкість реакції, вимірної в пікомоль (пмоль)/л/хв, складовій щонайменше 1%, наприклад, щонайменше 5%, наприклад, щонайменше 10% або більше 20% від початкової швидкості реакції, визначеної з використанням тільки ДНК-олігонуклеотиду, що має таку ж послідовність основ, але що містить тільки ДНК-мономери без 2'-заміщень з фосфоротіоатними зв'язуючими групами між усіма мономерами в олігонуклеотиді, використовуючи методологію, запропоновану в прикладах 91-95 EP 1222309.

У деяких втіленнях винаходу олігомер вважають по суті нездібним до рекрутингу РНКаз, якщо при забезпеченні комплементарної РНК-мішені він має початкову швидкість реакції, вимірної в пмоль/л/хв, менше 1%, наприклад, менше 5%, наприклад, менше 10% або менше 20% початкової швидкості реакції, визначеної при використанні тільки ДНК-олігонуклеотиду без 2'-заміщень з фосфоротіоатними зв'язуючими групами між усіма мономерами в олігонуклеотиді, використовуючи методологію, запропоновану в прикладах 91-95 EP 1222309.

В інших втіленнях винаходу олігомер вважають здатним до рекрутингу РНКаз, якщо при забезпеченні комплементарної РНК-мішені і РНКаз початкова швидкість реакції РНКаз, вимірної в пмоль/л/хв, складає щонайменше 20%, наприклад, щонайменше 40%, наприклад, щонайменше 60%, наприклад, щонайменше 80% від початкової швидкості реакції при використанні тільки ДНК-олігонуклеотиду без 2'-заміщень з фосфоротіоатними зв'язуючими групами між усіма мономерами в олігонуклеотиді, використовуючи методологію, запропоновану в прикладах 91-95 EP 1222309.

У характерному випадку ділянка олігомеру, яка формує послідовні нуклеотидні ланки, які при формуванні в дуплекс з комплементарною РНК-мішенню здатні до рекрутингу РНКаз, складається з нуклеотидних ланок, які формують ДНК/РНК-подібний дуплекс з РНК-мішенню. Олігомер за винаходом, такий як перша ділянка, може містити нуклеотидну послідовність, що містить і нуклеотиди, і аналоги нуклеотидів, і можуть набувати форми, наприклад, гепмера.

Конструкція гепмера

У деяких втіленнях винаходу олігомер за винаходом, такий як перша ділянка, містить або являє собою гепмер. Гепмерний олігомер є олігомером, що містить безперервний відрізок з нуклеотидів, здатний до рекрутингу РНКаз, такий як РНКаз, наприклад, ділянка з щонайменше 6 або 7 ДНК-нуклеотидів, на який в цьому документі посилаються як на ділянку Y' (Y'), де ділянка Y' фланкована з 5' і 3' кінців ділянками з аналогів нуклеотидів, що посилюють спорідненість, наприклад, 1-6 аналогів нуклеотидів в 5' і 3' напрямі до безперервного відрізка нуклеотидів, здатних до рекрутингу РНКаз, де на ці ділянки посилаються як на ділянки X' (X') і Z' (Z') відповідно. Ділянки X' і Z' можуть бути також позначені терміном "сегменти-крила" гепмера. Гепмерні ділянки розкриті в документах WO 2004/046160, WO 2008/113832 і WO 2007/146511.

У деяких втіленнях винаходу мономери, здатні до рекрутингу РНКаз, вибрані з групи, що складається з мономерів ДНК, мономерів альфа-L-ЗНК, С4'-алкілованих мономерів ДНК (див. документи РСТ/EP2009/050349 і Vester et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 18 (2008) 2296-2300, включені в цей документ за допомогою посилання) і нуклеотидів незамкненої нуклеїнової кислоти (UNA; unlinked nucleic acid) (див. статтю Fluiter et al., Mol. Biosyst., 2009, 10, 1039, включену в цей документ за допомогою посилання). UNA є незамкненою нуклеїновою кислотою, де, як правило, С-С зв'язок С2-С3 рибози видалений з утворенням незамкнутого залишку "цукру". Переважно гепмер містить (полі)нуклеотидну послідовність формули (5'-3') X'-Y'-Z', де ділянка X (X') (5' ділянка) складається з щонайменше одного або містить щонайменше один аналог нуклеотиду, наприклад, щонайменше одна ланка ЗНК, наприклад, від 1-6 аналогів нуклеотидів, таких як ланки ЗНК, і ділянка Y' (Y') складається з щонайменше чотирьох або містить щонайменше чотири або щонайменше п'ять послідовних нуклеотидів, здатних до рекрутингу РНКаз (при формуванні в дуплекс з комплементарною молекулою РНК, такою як мРНК-мішень), таких як нуклеотиди ДНК, і ділянка Z (Z') (3' ділянка) складається з щонайменше одного або містить щонайменше один аналог нуклеотиду, наприклад, щонайменше одна ланка ЗНК, наприклад, від 1-6 аналогів нуклеотидів, таких як ланки ЗНК.

У деяких втіленнях винаходу ділянка X' складається з 1, 2, 3, 4, 5 або 6 аналогів нуклеотидів, таких як ланки ЗНК, наприклад, від 2-5 аналогів нуклеотидів, таких як 2-5 ланок ЗНК, наприклад, 3 або 4 аналоги нуклеотидів, таких як 3 або 4 ланки ЗНК; та/або ділянка Z складається з 1, 2, 3,

4, 5 або 6 аналогів нуклеотидів, таких як ланки ЗНК, наприклад, від 2-5 аналогів нуклеотидів, таких як 2-5 ланок ЗНК, наприклад, 3 або 4 аналоги нуклеотидів, таких як 3 або 4 ланки ЗНК.

У деяких втіленнях винаходу Y' складається з або містить 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 або 12 послідовних нуклеотидів, здатних до рекрутингу РНКаз, або від 4-12, або від 6-10, або від 7-9, наприклад, 8 послідовних нуклеотидів, здатних до рекрутингу РНКаз. У деяких втіленнях винаходу ділянка Y' складається з щонайменше одної або містить щонайменше одну нуклеотидну ланку ДНК, наприклад, 1-12 ланок ДНК, переважно від 4-12 ланок ДНК, прийнятніше від 6-10 ланок ДНК, наприклад, від 7-10 ланок ДНК, прийнятніше 8, 9 або 10 ланок ДНК.

У деяких втіленнях винаходу ділянка X' складається з 3 або 4 або містить 3 або 4 аналоги нуклеотидів, таких як ЗНК, ділянка X' складається з 7, 8, 9 або 10 ланок ДНК, і ділянка Z' складається з 3 або 4 аналогів нуклеотидів, таких як ЗНК. Такі конструкції включають (X'- Y'- Z') 3-10-3, 3-10-4, 4-10-3, 3-9-3, 3-9-4, 4-9-3, 3-8-3, 3-8-4, 4-8-3, 3-7-3, 3-7-4, 4-7-3. У переважному втіленні винаходу гепмер являє собою гепмер 3-9-4, навіть прийнятніше гепмер являє собою гепмер 3-10-3.

Додаткові гепмерні конструкції розкриті в документі WO 2004/046160, включеному в цей документ за допомогою посилання. WO 2008/113832, яка просить пріоритет відносно попередньої заявки US 60/977,409, включена в цей документ за допомогою посилання, відноситься до 'короткомірних' гепмерних олігомерів. У деяких втіленнях винаходу олігомери, представлені в цьому документі, можуть бути такими короткомірними гепмерами.

У деяких втіленнях винаходу олігомер, наприклад, ділянка X', складається з безперервної нуклеотидної послідовності з сумарно 10, 11, 12, 13 або 14 нуклеотидних ланок, де безперервна нуклеотидна послідовність включає або має формулу (5'- 3') X'- Y'- Z', де: X' складається з 1, 2 або 3 ланок аналогів нуклеотидів, таких як ланки ЗНК; Y' складається з 7, 8 або 9 суміжних нуклеотидних ланок, здатних до рекрутингу РНКаз при формуванні в дуплекс з комплементарною молекулою РНК (такою як мРНК-мішень); і Z' складається з 1, 2 або 3 аналогів нуклеотидів, таких як ланки ЗНК.

У деяких втіленнях винаходу X' складається з 1 ланки ЗНК. У деяких втіленнях винаходу X' складається з 2 ланок ЗНК. У деяких втіленнях винаходу X' складається з 3 ланок ЗНК. У деяких втіленнях винаходу Z' складається з 1 ланки ЗНК. У деяких втіленнях винаходу Z' складається з 2 ланок ЗНК. У деяких втіленнях винаходу Z' складається з 3 ланок ЗНК. У деяких втіленнях винаходу Y' складається з 7 нуклеотидних ланок. У деяких втіленнях винаходу Y' складається з 8 нуклеотидних ланок. У деяких втіленнях винаходу Y' складається з 9 нуклеотидних ланок. У деяких втіленнях винаходу ділянка Y' складається з 10 нуклеозидних мономерів. У деяких втіленнях винаходу Y' складається з 1-10 або містить 1-10 мономерів ДНК. У деяких втіленнях винаходу Y' містить від 1-9 ланок ДНК, наприклад, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 або 9 ланок ДНК. У деяких втіленнях винаходу Y' складається з ланок ДНК. У деяких втіленнях винаходу Y' містить щонайменше одну ланку ЗНК, що знаходиться в альфа-L-конфігурації, наприклад, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 або 9 ланок ЗНК в альфа-L-конфігурації. У деяких втіленнях винаходу Y' містить щонайменше одну ланку альфа-L-окси-ЗНК, або де всі ланки ЗНК в альфа-L-конфігурації є ланками альфа-L-окси-ЗНК. У деяких втіленнях винаходу число нуклеотидів, присутніх в X'- Y'- Z', вибране з групи, що складається з (ланки аналогів нуклеотидів - ділянка Y' - ланки аналогів нуклеотидів): 1-8-1, 1-8-2, 2-8-1, 2-8-2, 3-8-3, 2-8-3, 3-8-2, 4-8-1, 4-8-2, 1-8-4, 2-8-4, або; 1-9-1, 1-9-2, 2-9-1, 2-9-2, 2-9-3, 3-9-2, 1-9-3, 3-9-1, 4-9-1, 1-9-4, або; 1-10-1, 1-10-2, 2-10-1, 2-10-2, 1-10-3, 3-10-1, 2-10-3, 3-10-2. У деяких втіленнях винаходу число нуклеотидів в X'- Y'- Z' вибране з групи, що складається з: 2-7-1, 1-7-2, 2-7-2, 3-7-3, 2-7-3, 3-7-2, 3-7-4 і 4-7-3. У деяких втіленнях винаходу кожна з ділянок X' і Y' складається з трьох мономерів ЗНК, і ділянка Y' складається з 8, або 9, або 10 нуклеозидних мономерів, переважно мономерів ДНК. У деяких втіленнях винаходу обоє з X' і Z' складаються з двох ланок ЗНК кожен, і Y' складається з 8 або 9 нуклеотидних ланок, переважно ДНК ланок. У різних втіленнях винаходу інші гепмерні конструкції включають конструкції, де ділянки X' та/або Z' складаються з 3, 4, 5 або 6 аналогів нуклеозидів, таких як мономери, що містять цукор 2'-О-метоксиетил-рибозу (2'-МОЕ), або мономери, що містять цукор 2'- фтор-дезоксирибозу, і ділянка Y' складається з 8, 9, 10, 11 або 12 нуклеозидів, таких як мономери ДНК, де ділянки X'- Y'- Z' мають 3-9-3, 3-10-3, 5-10-5 або 4-12-4 мономерів. Додаткові гепмерні конструкції розкриті в документі WO 2007/146511A2, включеному в цей документ за допомогою посилання.

Гепмери ЗНК: гепмер ЗНК є гепмерним олігомером (ділянка А), що містить щонайменше один нуклеотид ЗНК. SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 і 40 є гепмерними олігомерами ЗНК. Олігомери з безперервною послідовністю з 10-16 нуклеотидів, яка комплементарна відповідному відрізку довжини SEQ ID NO 33 або 34 або 45, можуть також бути гепмерними олігомерами, такими як гепмери ЗНК.

Міжнуклеотидні зв'язки

Нуклеозидні мономери олігомерів (наприклад, перша і друга ділянки), описані в цьому документі, з'єднують разом за допомогою міжнуклеозидних зв'язуючих груп. Доцільно кожен мономер зв'язують з 3'-примикаючими мономерами за допомогою зв'язуючої групи.

5 Звичайному фахівцеві в цій області техніки повинно бути зрозуміло, що в контексті даного винаходу 5'-мономер на кінці олігомеру не утримує 5'-зв'язуючу групу, хоча він може містити або не містити 5'-кінцеву групу або зв'язуючу групу для кон'югації.

Терміни "зв'язуюча група" або "міжнуклеозидний зв'язок" призначені для позначення групи, здатної до ковалентного зв'язування разом двох нуклеотидів. Конкретні і переважні приклади включають фосфатні групи і фосфоротіоатні групи. Міжнуклеозидний зв'язок можна

використовувати взаємозамінно з міжнуклеотидним зв'язком.

Нуклеотиди олігомеру за винаходом або його безперервну нуклеотидну послідовність сполучають разом за допомогою зв'язуючих груп. Доцільно кожен нуклеотид зв'язують з 3'-примикаючими нуклеотидами за допомогою зв'язуючої групи.

15 Відповідні міжнуклеотидні зв'язки включають зв'язки, перераховані в межах об'єму WO 2007/031091, наприклад, міжнуклеотидні зв'язки, перераховані в першому параграфі сторінки 34 документи WO 2007/031091 (включеного в цей документ за допомогою посилання). У деяких втіленнях винаходу, де вони є зв'язками, що відрізняються від фосфодієфірного зв'язку (зв'язків) ділянки В (де вона присутня), переважно модифікувати міжнуклеотидний зв'язок з її нормального фосфодієфіру з одержанням зв'язку, стійкішого до дії нуклеаз, такого як фосфоротіоат або боранофосфат, де ці два зв'язки здатні розщеплюватися РНКазою Н, що також дає можливість антисмислового інгібування при зниженні експресії гена-мішені.

20 У деяких втіленнях винаходу олігомер за даним винаходом містить один або більше нуклеозидних зв'язків, вибраних з групи, що складається з фосфоротіоатного, фосфородитіоатного і боранофосфатного зв'язків.

Переважними можуть бути міжнуклеотидні зв'язки, які запропоновані в цьому документі, що містять сірку (S), такі як фосфоротіоат або фосфородитіоат. Фосфоротіоатні міжнуклеотидні зв'язки також переважні, зокрема, для першої ділянки, наприклад, в гепмерах, міксмерах, антимирних олігомерах, що перемикають сплайсинг, і тоталмерах.

30 Термін "міксмер" відноситься до олігомерів, що містять як такі, що зустрічаються в природі, нуклеотиди, і такі, що не зустрічаються в природі, де, в протилежність гепмерам, тейлмерам і хедмерам, відсутня безперервна послідовність із понад 5, а в деяких втіленнях винаходу не більше ніж 4 послідовних, наприклад, не більше трьох послідовних нуклеотидів, що зустрічаються в природі, таких як ланки ДНК.

35 Термін "тоталмер" відноситься до одониткового олігомеру, який містить тільки такі, що не зустрічаються в природі нуклеозиди, такі як аналоги нуклеозидів з модифікованим цукром.

Для гепмерів міжнуклеотидні зв'язки в олігомері можуть бути, наприклад, фосфоротіоатним або боранофосфатним, щоб дати можливість розщеплювання РНК-мішені РНКазою Н. Фосфоротіоат переважний для поліпшеної стійкості до нуклеаз і з інших причин, таким як

40 простота одержання.
В одному аспекті, за винятком фосфодієфірного зв'язку між першою і другою ділянкою і необов'язково усередині ділянки В, інші міжнуклеотидні зв'язки олігомеру за винаходом, нуклеотиди та/або аналоги нуклеотидів зв'язані один з одним за допомогою фосфоротіоатних груп. У деяких втіленнях винаходу щонайменше 50%, наприклад, щонайменше 70%, наприклад, щонайменше 80%, наприклад, щонайменше 90%, наприклад, усі міжнуклеотидні зв'язки між нуклеозидами в першій ділянці відрізняються від фосфодієфіру (фосфату), наприклад, вибрані з групи, що складається з фосфоротіоатної, фосфородитіоатної або боранофосфатної. У деяких втіленнях винаходу щонайменше 50%, наприклад, щонайменше 70%, наприклад, щонайменше 80%, наприклад, щонайменше 90%, наприклад, усі міжнуклеотидні зв'язки між

50 нуклеозидами в першій ділянці є фосфоротіоатом.
WO 09124238 відноситься до олігомерних сполук, що мають щонайменше один біциклічний нуклеозид, приєднаний до 3' або 5' кінця за допомогою нейтрального міжнуклеозидного зв'язку. Олігомери за винаходом можуть, таким чином, мати щонайменше один біциклічний нуклеозид, приєднаний до 3' або 5' кінця нейтральним міжнуклеозидним зв'язком, таким як один або більше фосфотриєфір, метилфосфонат, MMI, амід-3, формацеталь або тіоформацеталь. Інші зв'язки можуть бути фосфоротіоатом.

Кон'югати олігомерів (ділянка С)

Наступний аспект винаходу являє собою кон'югат антисмислового олігонуклеотиду, олігомер, що містить, за винаходом і щонайменше одне ненуклеотидне або неполінуклеотидне

60 угруповання (С), ковалентно приєднане до олігомеру (А), необов'язково за допомогою лінкерної

ділянки, розташованої між безперервною послідовністю олігомеру і кон'югатним угрупованням (В та/або Y).

Репрезентативні кон'югатні угруповання, які використані з олігонуклеотидами, можуть включати ліпофільні молекули (ароматичні і неароматичні), включаючи стероїдні молекули; білки (наприклад, антитіла, ферменти, сироваткові білки); пептиди; вітаміни (водорозчинні або жиророзчинні); полімери (водорозчинні або жиророзчинні); малі молекули, що включають лікарські засоби, токсини, молекули-репортери і ліганди рецепторів; вуглеводні комплекси; комплекси, що розщеплюють нуклеїнові кислоти; хелатори металів (наприклад, порфірини, тексафірини, краун-ефіри і т.д.); інтеркалятори, включаючи гібридні фотонуклеази/інтеркалятори; зшиваючі агенти (наприклад, фотоактивні, окисно-відновно-активні) та їх комбінації і похідні. Різні відповідні кон'югатні угруповання, їх одержання і зв'язок з олігомерними сполуками запропоновані, наприклад, в WO 93/07883 і в патенті US № 6,395,492, причому кожен з документів повністю включений в цей документ за допомогою посилання. Кон'югати олігонуклеотидів та їх синтези також описані у вичерпних оглядах Manoharan, Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications, S.T. Crooke, ed., Ch. 16, Marcel Dekker, Inc., 2001, і Manoharan, Antisense and Nucleic Acid Drug Development, 2002, 12, 103, кожен з яких повністю включений в цей документ за допомогою посилання.

У деяких втіленнях винаходу олігомер за винаходом направлений на печінку, тобто після системного введення сполуки накопичується в клітинах печінки (таких як гепатоцити). Напрямок на печінку можна значно посилити шляхом приєднання кон'югатного угруповання (С). Проте з метою одержання максимальної ефективності олігомеру часто бажано, щоб кон'югатне (або напрямне угруповання) було пов'язано з олігомером за допомогою біорозщеплюваного лінкера (В), такого як нуклеотидфосфатний лінкер. Таким чином, бажано використовувати кон'югатне угруповання, що посилює захоплення і активність в гепатоцитах. Посилення активності може бути наслідком посиленого захоплення, або може бути наслідком посиленої ефективності сполуки в гепатоцитах.

У деяких втіленнях винаходу олігомерна сполука є олігомером ЗНК, таким як гепмер, або, наприклад, антисмисловий олігомер ЗНК (на який в цьому документі можуть посилатися як на ділянку А), що містить антисмисловий олігомер, необов'язково біорозщеплюваний лінкер, такий як ділянка В, і вуглеводний кон'югат (на який можуть посилатися як на ділянку С). Антисмисловий олігомер ЗНК може складати 7-30, наприклад, 8-26 нуклеозидів в довжину, і він містить щонайменше одну ланку (нуклеозид) ЗНК.

У деяких втіленнях винаходу кон'югат являє собою або може містити вуглевод, або містить вуглеводну групу. У деяких втіленнях винаходу вуглевод вибраний з групи, що складається з галактози, лактози, н-ацетилгалактозаміну, манози і манозо-6-фосфату. У деяких втіленнях винаходу кон'югатна група являє собою або може містити манозу або манозо-6-фосфат. Вуглеводні кон'югати можна застосовувати для посилення доставлення або активності у ряді тканин, таких як печінка та/або м'язи. Див., наприклад, EP 1495769, WO 99/65925, Yang et al., Bioconjug Chem (2009) 20(2): 213-21, Zatsepin & Oretskaya Chem Biodivers. (2004) 1(10): 1401-17.

У деяких втіленнях винаходу вуглеводне угруповання є нелінійним вуглеводним полімером. У деяких втіленнях винаходу олігомерна сполука є олігомером ЗНК, наприклад, антисмисловим олігомером ЗНК (на який в цьому документі можуть посилатися як на ділянку А), що містить антисмисловий олігомер, ділянку В, як визначено в цьому документі, і кон'югатне угруповання, направлене на рецептор асіалоглікопротеїну, таке як угруповання GalNAc (на яке можуть посилатися як на ділянку С). Вуглеводне угруповання може бути мультивалентним, як, наприклад, 2, 3, 4 або 4 ідентичних або неідентичних вуглеводних угруповання можуть бути ковалентно сполучені з олігомером, необов'язково за допомогою лінкера або лінкерів (таких як ділянка Y).

Кон'югатні угруповання GalNAc

У деяких втіленнях винаходу вуглеводне угруповання є нелінійним вуглеводним полімером. Вуглеводне угруповання може бути, проте, мультивалентним, як, наприклад, 2, 3, 4 або 4 ідентичних або неідентичних вуглеводних угруповання можуть бути ковалентно зв'язані з олігомером, необов'язково за допомогою лінкера або лінкерів. У деяких втіленнях у винаході запропонований кон'югат, олігомер за винаходом, що містить, і вуглеводне кон'югатне угруповання. У деяких втіленнях у винаході запропонований кон'югат, олігомер за винаходом, що містить, і кон'югатне угруповання, направлене на угруповання рецептора асіалоглікопротеїну, таке як угруповання GalNAc, яке може формувати частину додаткової ділянки (на яке посилаються як на ділянку С).

У винаході також запропоновані антисмислові олігонуклеотиди ЗНК, кон'юговані з угрупованням, направленим на рецептор асіалоглікопротеїну. У деяких втіленнях винаходу

кон'югатне угруповання (таке як третя ділянка або ділянка С) містить угруповання, направлене на рецептор асіалоглікопротеїну, таке як галактоза, галактозамін, N-форміл-галактозамін, N-ацетилгалактозамін, N-пропіоніл-галактозамін, N-н-бутаноїл-галактозамін і N-ізобутаноїлгалактозамін. У деяких втіленнях винаходу кон'югат містить галактозний кластер, такий як тример N-ацетилгалактозаміну. У деяких втіленнях винаходу кон'югатне угруповання містить GalNAc (N-ацетилгалактозамін), такий як моновалентний, двовалентний, тривалентний або чотиривалентний GalNAc. Тривалентні кон'югати GalNAc можна застосовувати для направлення сполуки в печінку. Кон'югати GalNAc використані з метилфосфонатом і антисмисловими олігонуклеотидами пептидної нуклеїнової кислоти (ПНК) (наприклад, US 5,994517 і Hangeland et al., *Bioconjug Chem.* 1995 Nov - Dec;6(6):695- 701) і siPНК (наприклад, WO 2009/126933, WO 2012/089352 і WO 2012/083046). Посилання на GalNAc і на конкретні кон'югати, використовувані там, включені в цей документ за допомогою посилання. У WO 2012/083046 розкриті siPНК з кон'югатними угрупованнями GalNAc, що містять розщеплювані фармакокінетичні модулятори, які підходять для застосування в даному винаході, де переважні фармакокінетичні модулятори є С16 гідрофобними групами, такими як пальмітоїл, гексадец-8-еноїл, олеїл, (9E,12E)-октадека-9,12-діеноїл, діоктаноїл і С16-С20 ацил. Розщеплювані фармакокінетичні модулятори '046 можуть також бути холестерином.

Направляючі угруповання (кон'югатні угруповання) можуть бути вибрані з групи, що складається з: галактози, галактозаміну, N-форміл-галактозаміну, N-ацетилгалактозаміну, N-пропіонілгалактозаміну, N-н-бутаноїл-галактозаміну, N-ізобутаноїлгалактозаміну, галактозного кластера і тримера N-ацетилгалактозаміну, і можуть мати фармакокінетичний модулятор, вибраний з групи, що складається з: гідрофобної групи, що має 16 або більше атомів вуглецю, гідрофобної групи, що має 16-20 атомів вуглецю, пальмітоїлу, гексадец-8-еноїлу, олеїлу, (9E,12E)-октадека-9,12-діеноїлу, діоктаноїлу, С16-С20 ацилу і холестерину. Деякі кластери GalNAc, розкриті в '046, включають: (E)-гексадец-8-еноїлу (С16), олеїлу (С18), (9E,12E)-октадека-9,12-діеноїлу (С18), октаноїлу (С8), додеканоїлу (С12), С-20 ацилу, С24 ацилу, діоктаноїлу (2xС8). Направне угруповання – направне угруповання фармакокінетичного модулятора може бути пов'язане з полінуклеотидом за допомогою фізіологічно лабільного зв'язку, або, наприклад, дисульфідного зв'язку, або поліетиленгліколевого (ПЕГ) лінкера. Винахід також відноситься до застосування фосфодієфірних лінкерів між олігомером і кон'югатної групою (у цьому документі на них посилаються як на ділянку В, і доцільно вони розташовані між олігомером ЗНК і вуглеводною кон'югатною групою).

Для направлення на гепатоцити в печінці переважний направляючий ліганд є галактозним кластером.

Галактозний кластер містить молекулу, яка має, наприклад, таку, що містить від двох до чотирьох кінцевих похідних галактози. При використанні в цьому документі термін "похідна галактози" включає і галактозу, і похідні галактози, що мають спорідненість до рецептора асіалоглікопротеїну, рівну або більшу, ніж спорідненість галактози. Кінцева похідна галактози приєднана до молекули за допомогою її С-1 атома вуглецю. Рецептор асіалоглікопротеїну (ASGPr) експресується, в основному, на гепатоцитах і зв'язує розгалужені глікопротеїни з кінцевою галактозою. Переважний галактозний кластер має три кінцевих галактозаміни або похідні галактозаміну, кожна з яких має спорідненість до рецептора асіалоглікопротеїну. Прийнятніший галактозний кластер має три кінцевих N-ацетил-галактозаміну. Інші терміни, загальноприйняті в цій області техніки, включають трьохантенну галактозу, тривалентну галактозу і тример галактози. Відомо, що кластери трьохантенної похідної галактози зв'язуються з ASGPr з більшою спорідненістю, ніж похідна галактози, такою, що має двохантенну і одноантенну структуру (Baenziger and Fiete, 1980, *Cell*, 22, 611-620; Connolly et al., 1982, *Biol. Chem.*, 257, 939-945). Для досягнення нМ спорідненості потрібна мультивалентність. Згідно WO 2012/083046 приєднання одної похідної галактози, що має спорідненість до рецептора асіалоглікопротеїну не забезпечує функціональне доставлення полінуклеотиду РНКі в гепатоцити *in vivo* при спільному введенні з полімером доставлення.

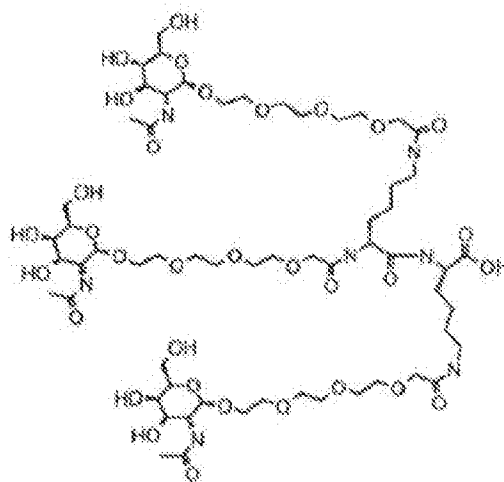
Галактозний кластер може містити дві або переважно три похідні галактози, кожна з яких пов'язана з центральною точкою розгалуження. Похідні галактози приєднані до центральної точки розгалуження за допомогою С-1 атомів вуглецю сахаридів. Похідна галактози переважно пов'язана з точкою розгалуження за допомогою лінкера або спейсера. Переважний спейсер є гнучким гідрофільним спейсером (патент US 5885968; Biessen et al. *J. Med. Chem.* 1995 Vol. 39 p. 1538-1546). Переважний гнучкий гідрофільний спейсер є ПЕГ спейсером. Переважний ПЕГ спейсер є ПЕГ3 спейсером. Точка розгалуження може бути будь-якою малою молекулою, яка дає можливість приєднання трьох похідних галактози і додатково дає можливість приєднання точки розгалуження до олігомеру. Ілюстративною групою точки розгалуження є ди-лізін.

Молекула ди-лізину містить три групи амінів, за допомогою яких можуть бути приєднані три похідних галактози і карбоксильна реакційна група, за допомогою якої ди-лізин може бути приєднаний до олігомеру. Приєднання точки розгалуження до олігомеру може відбуватися за допомогою лінкера або спейсера. Переважний спейсер є гнучким гідрофільним спейсером.

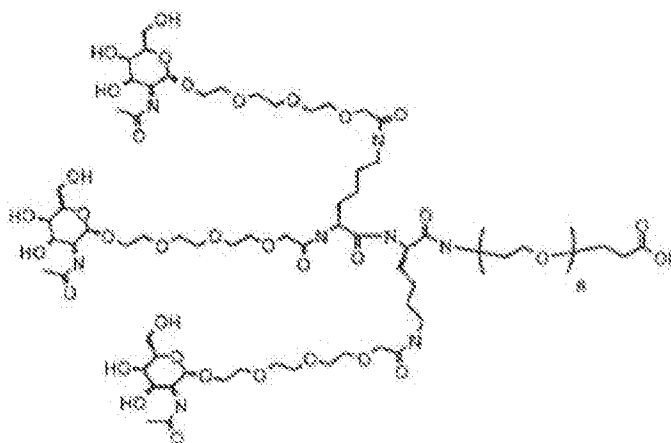
5 Переважний гнучкий гідрофільний спейсер є ПЕГ спейсером. Переважний ПЕГ спейсер є ПЕГ3 спейсером (три етиленові ланки). Галактозний кластер може бути приєднаний до 3' або 5' кінця олігомеру з використанням способів, відомих в цій області техніки.

Переважає похідна галактози є N-ацетил-галактозаміном (GalNAc). Інші сахари, що мають спорідненість до рецептора асіалоглікопротеїну, можуть бути вибрані з переліку, що містить: галактозамін, N-н-бутаноїлгалактозамін і N-ізо-бутаноїлгалактозамін. Значення спорідненості різних похідних галактози до рецептора асіалоглікопротеїну вивчено (див., наприклад: Jobst, S.T. and Drickamer, K.J.B.C. 1996, 271, 6686) або легко визначається з використанням способів, характерних в цій області техніки.

Одне втілення галактозного кластера

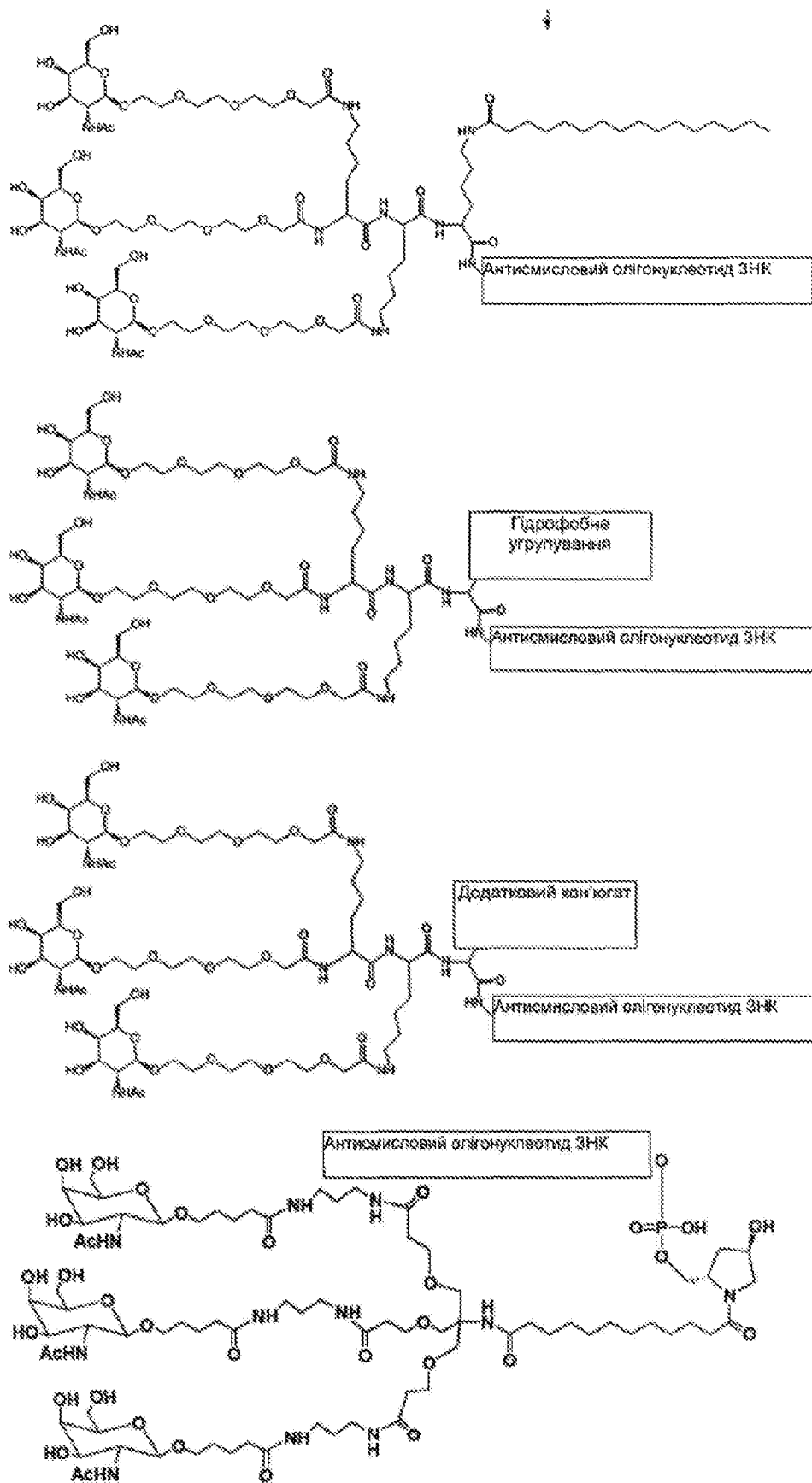


Одне втілення галактозного кластера



Галактозний кластер з ПЕГ спейсером між точкою розгалуження і нуклеїною кислотою
Додаткові приклади кон'югата за винаходом проілюстровані нижче:

20



5 При використанні в описаних вище кон'югатах кластера GaInAc гідрофобне або ліпофільне (або додаткове кон'югатне) угруповання (тобто фармакокінетичні модулятори) є необов'язковим при використанні олігомерів ЗНК, таких як антисмыслові олігонуклеотиди ЗНК.

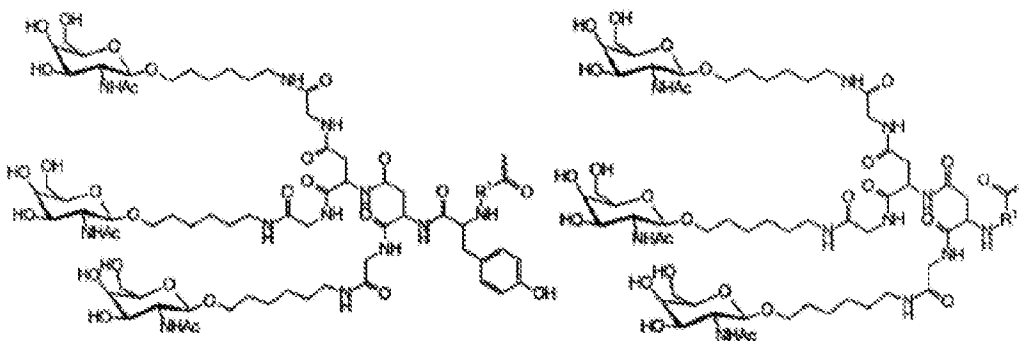
На фігурах показані конкретні кластери GalNAc, використовувані в даному дослідженні, ConJ 1, 2, 3, 4 і ConJ1a, 2a, 3a і 4a (які показані з необов'язковим лінкером С6, що з'єднує кластер GalNAc в олігомері).

У переважному втіленні винаходу кон'югатне угруповання кон'югата антисмислового олігонуклеотиду містить або складається з ConJ 1, 2, 3, 4 і ConJ1a, 2a, 3a і 4a. Найприйнятніше кон'югатне угруповання містить або складається з ConJ 2a.

В іншому переважному втіленні винаходу кон'югат антисмислового олігонуклеотиду вибраний з групи, що складається з SEQ ID NO 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 і 24.

Кожне вуглеводне угруповання кластера GalNAc (наприклад, GalNAc) може бути, таким чином, сполучене з олігомером за допомогою спейсера, такого як (полі)етиленгліколевий (ПЕГ) лінкер, такий як ди-, три-, тетра-, пента-, гексаетиленгліколевий лінкер. Як показано вище, ПЕГ угруповання формує спейсер між галактозним цукровим угрупованням і пептидним (показаний трилізин) лінкером.

У деяких втіленнях винаходу кластер GalNAc містить пептидний лінкер, наприклад, трипептид Тур-Asp(Asp) або дипептид Asp(Asp), який приєднаний до олігомеру (або до ділянки Y або ділянки В) за допомогою бірадикального лінкера, наприклад, кластера GalNAc, який може містити наступні бірадикальні лінкери:



R¹ позначає бірадикал, переважно вибраний з -C₂H₄-, -C₃H₆-, -C₄H₈-, -C₅H₁₀-, -C₆H₁₂-, 1,4-циклогексилу (-C₆H₁₀-), 1,4-фенілу (-C₆H₄-), -C₂H₄OC₂H₄-, -C₂H₄(OC₂H₄)₂- або -C₂H₄(OC₂H₄)₃-, C(O)CH₂-, -C(O)C₂H₄-, -C(O)C₃H₆-, -C(O)C₄H₈-, -C(O)C₅H₁₀-, -C(O)C₆H₁₂-, 1,4-циклогексилу (-C(O)C₆H₁₀-), 1,4-фенілу (-C(O)C₆H₄-), -C(O)C₂H₄OC₂H₄-, -C(O)C₂H₄(OC₂H₄)₂- або -C(O)C₂H₄(OC₂H₄)₃-.

В деяких втіленнях винаходу R¹ позначає бірадикал, переважно вибраний з -C₂H₄-, -C₃H₆-, -C₄H₈-, -C₅H₁₀-, -C₆H₁₂-, 1,4-циклогексилу (-C₆H₁₀-), 1,4-фенілу (-C₆H₄-), -C₂H₄OC₂H₄-, -C₂H₄(OC₂H₄)₂- або -C₂H₄(OC₂H₄)₃-.

Вуглеводний кон'югат (наприклад, GalNAc) або вуглеводне лінкерне угруповання (наприклад, угруповання вуглевод-ПЕГ) можуть бути ковалентно сполучені (зв'язані) з олігомером за допомогою групи точки розгалуження, таким як амінокислота або пептид, який доцільно містить дві або більше аміних груп (наприклад, 3, 4 або 5), таких як лізин, ди-лізин, або три-лізин або тетра-лізин. Молекула три-лізину містить чотири групи амінів, за допомогою яких можуть бути приєднані три вуглеводні кон'югатні групи, такі як похідні галактози (наприклад, GalNAc), і додатковий кон'югат, такий як гідрофобне або ліпофільне угруповання/група, і карбоксильну реакційну групу, за допомогою якої три-лізин може бути приєднаний до олігомеру. Додатковий кон'югат, такий як ліпофільне/гідрофобне угруповання, може бути приєднаний до залишку лізину, приєданого до олігомеру.

Фармакокінетичні модулятори

Сполука за винаходом може додатково містити одне або більше додаткових кон'югатних угруповань, з яких особливий інтерес представляють ліпофільні або гідрофобні угруповання, наприклад, коли кон'югатна група є вуглеводним угрупованням. Такі ліпофільні або гідрофобні угруповання можуть діяти як фармакокінетичні модулятори і можуть бути ковалентно зв'язані або з вуглеводним кон'югатом, або з лінкером, що зв'язує вуглеводний кон'югат з олігомером, або з лінкером, що зв'язує множинні вуглеводні кон'югати (мультивалентні кон'югати), або з олігомером, необов'язково за допомогою лінкера, такого як біорозщеплюваний лінкер.

Таким чином, олігомер або кон'югатне угруповання можуть, таким чином, містити фармакокінетичний модулятор, такий як ліпофільні або гідрофобні угруповання. Такі угруповання розкриті в контексті кон'югатів siRNA в WO 2012/082046. Гідрофобне угруповання може містити C8-C36 жирну кислоту, яка може бути насиченою або ненасиченою. У деяких

втіленнях винаходу можна використовувати C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22, C24, C26, C28, C30, C32 і C34. Гідрофобна група може мати 16 або більше атомів вуглецю. Ілюстративні відповідні гідрофобні групи можуть бути вибрані з групи, що містить: стерин, холестерин, пальмітоїл, гексадек-8-еноїл, олеїл, (9E,12E)-октадека-9,12-діеноїл, діоктаноїл і C16 C20 ацил.

5 Згідно WO'346 гідрофобних груп, що мають менше 16 атомів вуглецю, менш ефективні при посиленні спрямованості полінуклеотиду, але їх можна використовувати в безлічі копій (наприклад, 2x, наприклад, 2x C8 або C10, C12 або C14) для посилення ефективності. Фармакокінетичні модулятори, корисні як угруповання, що направляють полінуклеотид, можуть бути вибрані з групи, що складається з: холестерину, алкільної групи, алкенільної групи, алкінільної групи, арильної групи, аралкільної групи, аралкенільної групи і аралкінільної групи, кожна з яких може бути нормальною, розгалуженою або циклічною. Фармакокінетичні модулятори переважно є вуглеводнями, що містять тільки атоми вуглецю і водню. Проте можуть бути допустимі заміщення або гетероатоми, що зберігають гідрофобність, наприклад, атом фтору.

15 Ліпофільні кон'югати

У деяких втіленнях винаходу кон'югатна група є або може містити ліпофільне угруповання, таке як стерин (наприклад, холестерин, холестерил, холестанол, стигмастерин, холанову кислоту і ергостерин). У деяких втіленнях винаходу кон'югат являє собою або містить токоферол (прикладами є Conj 6 і Conj 6a на Фіг. 2). У деяких втіленнях винаходу кон'югат являє собою або може містити холестерин (прикладами є Conj 5 і Conj 5a на Фіг. 2).

У деяких втіленнях винаходу кон'югат являє собою або може містити ліпід, фосфоліпід або ліпофільний спирт, такий як катіонний ліпід, нейтральний ліпід, сфінголіпід, і жирну кислоту, таку як стеаринова, олеїнова, елаїдинова, лінолева, ліноленелаїдинова, ліноленова і міристинова кислота. У деяких втіленнях винаходу жирна кислота містить C4-C30 насичений або ненасичений алкільний ланцюг. Алкільний ланцюг може бути нормальним або розгалуженим.

Ліпофільні кон'югатні угруповання можна використовувати, наприклад, для вимірювання гідрофільної природи олігомерної сполуки і посилення проникнення в клітину.

Ліпофільні угруповання включають, наприклад, стерини, станоли і стероїди і споріднені сполуки, такі як холестерин (патент US № 4,958,013 і Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553), тіохолестерин (Oberhauser et al, Nucl Acids Res., 1992, 20, 533), ланостерин, копростанол, стигмастерин, ергостерин, кальциферол, холева кислота, дезоксихолева кислота, естрон, естрадіол, естратриол, прогестерон, стильбестрол, тестостерон, андростерон, дезоксикортикостерон, кортизон, 17-гідроксикортикостерон, їх похідні і тому подібне. У деяких втіленнях винаходу кон'югат може бути вибраний з групи, що складається з холестерину, тіохолестерину, ланостерину, копростанолу, сигмастерину, ергостерину, кальциферолу, холевой кислоти, дезоксихолевої кислоти, естрону, естрадіолу, естратриолу, прогестерону, стильбестролу, тестостерону, андростерону, дезоксикортикостерону, кортизону і 17-гідроксикортикостерону. Інші ліпофільні кон'югатні угруповання включають аліфатичні групи, такі як, наприклад, прямоланцюгові, розгалужені і циклічні алкіли, алкенилі і алкінілі. Аліфатичні групи можуть мати, наприклад від 5 до приблизно 50, від 6 до приблизно 50, від 8 до приблизно 50 або від 10 до приблизно 50 атомів вуглецю. Приклади аліфатичних груп включають ундецил, додецил, гексадецил, гептадецил, октадецил, нонадецил, терпени, борніл, адамантил, їх похідні і тому подібне. У деяких втіленнях винаходу один або більше атомів вуглецю в аліфатичній групі можуть бути заміщені гетероатомом, таким як O, S або N (наприклад, геранілоксигексил).

Додаткові відповідні ліпофільні кон'югатні угруповання включають аліфатичні похідні гліцерину, такі як алкілгліцерини, біс(алкіл)гліцерини, трис(алкіл) гліцерини, моногліцериди, дигліцериди і тригліцериди. У деяких втіленнях винаходу ліпофільний кон'югат є ди-гексилдецил-рац-гліцерином або 1,2-ди-О-гексилдецил-рац-гліцерином (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651; Shea, et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777) або їх фосфонатами. Насичені і ненасичені жирні функціональні групи, такі як, наприклад, жирні кислоти, жирні спирти, жирні складні ефіри і жирні аміни, можуть також служити як ліпофільні кон'югатні угруповання. У деяких втіленнях винаходу жирні функціональні групи можуть містити від приблизно 6 атомів вуглецю до приблизно 30 або від приблизно 8 до приблизно 22 атомів вуглецю. Приклади жирних кислот включають капринову, каприлову, лауринову, пальмітинову, міристинову, стеаринову, олеїнову, лінолеву, ліноленову, арахідонову, ейкозенову кислоти і тому подібне.

У додаткових втіленнях винаходу ліпофільні кон'югатні групи можуть бути поліциклічними ароматичними групами, що мають від 6 до приблизно 50, від 10 до приблизно 50 або від 14 до приблизно 40 атомів вуглецю. Ілюстративні поліциклічні ароматичні групи включають пірени, пурини, акридини, ксантини, флуорени, фенантрени, антрацени, хіноліни, ізохіноліни, нафталіни, їх похідні і тому подібне. Інші відповідні ліпофільні кон'югатні угруповання включають

ментоли, тритили (наприклад, диметокситритил (DMT)), феноксазини, ліпоєву кислоту, фосфоліпіди, прості ефіри, тіоефіри (наприклад, гексил-S-триміліол), їх похідні і тому подібне. Одержання ліпофільних кон'югатів олігомерних сполук широко описано в цій області техніки, наприклад, в статтях Saison-Behmoaras et al, *EMBO J.*, 1991, 10, 1111; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259, 327; Svinarchuk et al, *Biochimie*, 1993, 75, 49; Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264, 229 і Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651.

Олігомерні сполуки, що містять кон'югатні угруповання, мають спорідненість до ліпопротеїну низької щільності (ЛПНЩ), можуть сприяти забезпеченню ефективної системи направленої доставки. Високі рівні експресії рецепторів ЛПНЩ на пухлинних клітинах робить ЛПНЩ привабливим носієм для селективного доставлення лікарських засобів в ці клітини (Rump et al., *Bioconjugate Chem.*, 1998, 9, 341; Firestone, *Bioconjugate Chem.*, 1994, 5, 105; Mishra, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264, 229). Угруповання, що мають спорідненість до ЛПНЩ, включають багато ліпофільних груп, таких як стероїди (наприклад, холестерин), жирні кислоти, їх похідні і комбінації. У деяких втіленнях винаходу кон'югатні угруповання, що мають спорідненість до ЛПНЩ, можуть бути діолеїловими ефірами холєвих кислот, таких як хенодезоксихолева кислота і литохолева кислота.

У деяких втіленнях винаходу ліпофільні кон'югати можуть бути або можуть включати біотин. У деяких втіленнях винаходу ліпофільні кон'югати можуть бути або можуть містити гліцерид або складний ефір гліцериду.

Ліпофільні кон'югати, такі як стерини, станоли і станіни, такі як холестерин або такі, як розкрито в цьому документі, можна використовувати для посилення доставлення олігонуклеотиду, наприклад, в печінку (у характерному випадку в гепатоцити).

У переважному втіленні винаходу кон'югатне угруповання кон'югата антисмислового олігонуклеотиду містить або складається з Conj 5, 5a, 6 або 6a. Прийнятніше кон'югатне угруповання містить або складається з Conj 5a.

В іншому переважному втіленні винаходу кон'югат антисмислового олігонуклеотиду вибраний з групи, що складається з SEQ ID NO 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 41, 42 і 43.

Приведені нижче посилання також відносяться до застосування ліпофільних кон'югатів: Kobylanska et al., *Acta Biochim Pol.* (1999); 46(3): 679-91. Felber et al., *Biomaterials* (2012) 33(25): 599-65; Grijalvo et al., *J Org Chem* (2010) 75(20): 6806-13. Koufaki et al., *Curr Med Chem* (2009) 16(35): 4728-42. Godeau et al *J. Med. Chem.* (2008) 51(15): 4374-6.

Лінкери (наприклад, ділянка В або Y)

Зв'язок або лінкер є сполукою між двома атомами, яка зв'язує одну потрібну хімічну групу або сегмент з іншою потрібною хімічною групою, або сегментом за допомогою одного або більше ковалентних зв'язків. Кон'югатні угруповання (або направляючі або блокуючі угруповання) можуть бути приєднані до олігомерної сполуки безпосередньо або за допомогою зв'язуючого угруповання (лінкерного або прив'язуючого), лінкера. Лінкери є біфункціональними угрупованнями, що служать для ковалентного сполучення третьої ділянки, наприклад, кон'югатного угруповання, з олігомерною сполукою (наприклад, з ділянкою А). У деяких втіленнях винаходу лінкер містить ланцюгову структуру олігомеру з ланок, що повторюються, таких як етиленгліколеві або амінокислотні ланки. Лінкер може мати щонайменше дві функціональні групи, одну для приєднання до олігомерної сполуки, а іншу для приєднання до кон'югатного угруповання. Приклади функціональних груп лінкера можуть бути електрофільними для взаємодії з нуклеофільними групами на олігомері або кон'югатного угруповання або нуклеофільними для взаємодії з електрофільними групами. У деяких втіленнях винаходу функціональні групи лінкера включають аміно, гідроксил, карбонову кислоту, тіол, фосфорамідат, фосфоротіоат, фосфат, фосфіт, ненасичені зв'язки (наприклад, подвійні або потрійні зв'язки) і тому подібне. Деякі приклади лінкерів включають 8-аміно-3,6-діоксаоктанову кислоту (ADO), сукцинімідил-4-(N-малеїдометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), 6-аміногексанову кислоту (AHX або АНА), 6-аміногексилокси, 4-аміномасляну кислоту, 4-аміноциклогексилкарбонову кислоту, сукцинімідил-4-(N-малеїдометил)циклогексан-1-карбоксі- (LCSMCC), сукцинімідил-мета-малеїмідо-бензоїлат (MBS), сукцинімідил-N-е-малеїмідо-капроїлат (EMCS), сукцинімідил-6-(бета-малеїмідо-пропіонамідо)гексаноат (SMPH), сукцинімідил-N-(а-малеїмідоацетат) (AMAS), сукцинімідил-4-(пара-малеїмідофеніл)бутират (SMPB), бета-аланін (beta-ALA), фенілгліцин (PHG), 4-аміноциклогексанову кислоту (ACHC), бета-(циклопропіл)аланін (бета-CYPR), амінододеканову кислоту (ADC), алілендіоли, поліетиленгліколи, амінокислоти і тому подібне.

У цій області техніки відома широка різноманітність додаткових лінкерних груп, які можуть бути корисні при приєднанні кон'югатних угруповань до олігомерних сполук. Огляд багатьох з корисних лінкерних груп можна знайти, наприклад, в кн. *Antisense Research and Applications*, S.

T. Crooke and B. Lebleu, Eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1993, p. 303-350. Дисульфідний зв'язок використаний для зв'язування 3'-кінця олігонуклеотиду з пептидом (Corey, et al., Science 1987, 238, 1401; Zuckermann, et al, J Am. Chem. Soc. 1988, 110, 1614; i Corey, et al., J Am. Chem. Soc. 1989, 111, 8524). У статті Nelson, et al., Nucl. Acids Res. 1989, 17, 7187 описаний зв'язуючий
 5 реagent для приєднання біотину до 3'-кінця олігонуклеотиду. Цей реagent N-Fmoc-O-DMT-3-аміно-1,2-пропандіол є у продажу від компанії Clontech Laboratories (Пало Алто, штат Каліфорнія) під назвою 3'-Amine. Він також є у продажу під назвою 3'-Amino-Modifier Reagent від компанії Glen Research Corporation (Стерлінг, штат Вірджинія). Цей реagent також використовували для зв'язування пептиду з олігонуклеотидом, як описано в статті Judy, et al.,
 10 Tetrahedron Letters 1991, 32, 879. Подібний комерційний реagent для зв'язування з 5'-кінцем олігонуклеотиду є 5'-Amino-Modifier C6. Ці реagentи є у продажу від компанії Glen Research Corporation (Стерлінг, штат Вірджинія). Ці або подібні сполуки були використані дослідниками Krieg, et al, Antisense Research and Development 1991, 1, 161, для зв'язування флуоресцеїну з 5'-кінцем олігонуклеотиду. Інші сполуки, такі як акридин, приєднані до 3'-кінцевій фосфатній групі
 15 олігонуклеотиду за допомогою поліметиленового зв'язку (Asseline, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1984, 81, 3297). Будь-які з описаних вище груп можна використовувати у вигляді окремого лінкера або в комбінації з одним або більше додаткових лінкерів.

Лінкери та їх застосування при одержанні кон'югатів олігомерних сполук запропоновано на рівні техніки, наприклад, в документах WO 96/11205 і WO 98/52614 і патентах US №№
 20 4,948,882; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,580,731; 5,486,603; 5,608,046; 4,587,044; 4,667,025; 5,254,469; 5,245,022; 5,112,963; 5,391,723; 5,510,475; 5,512,667; 5,574,142; 5,684,142; 5,770,716; 6,096,875; 6,335,432 і 6, 335,437, WO 2012/083046, кожен з яких повністю включений за допомогою посилання.

При використанні в цьому документі фізіологічно лабільний зв'язок є лабільним зв'язком, який є розщеплюваним в умовах, що зустрічаються в норм, або аналогічних тим, що зустрічаються в організмі ссавця (також званім розщеплюваним лінкером, проілюстрованим як ділянка В на Фіг. 12 і 13). Фізіологічні лабільні зв'язуючі групи вибрані з груп, що зазнають хімічного перетворення (наприклад, розщеплювання) при знаходженні в певних фізіологічних умовах. Внутрішньоклітинні умови ссавців включають хімічні умови, такі як рН, температура,
 25 окислювальні або відновні умови або агенти, і концентрацію солі, що виявляються або аналогічні тим, що зустрічаються в клітинах ссавців. Внутрішньоклітинні умови ссавців також включають наявність ферментативної активності, в нормі присутньої в клітині ссавця, наприклад, активності протеолітичних або гідролітичних ферментів. У деяких втіленнях винаходу розщеплюваний лінкер чутливий до нуклеази (нуклеазам), яка може, наприклад,
 30 експресуватися в клітині-мішені, і як такий, що детально описано в цьому документі, лінкер може бути короткою ділянкою (наприклад, 1-10) нуклеозидів, пов'язаних фосфодіефірними зв'язками, такими як нуклеозиди ДНК.

Хімічне перетворення (розщеплювання лабільного зв'язку) може бути ініційоване шляхом додавання в клітину фармацевтично прийняттого агента або може відбуватися спонтанно, коли
 40 молекула, що містить лабільний зв'язок, досягає відповідного внутрішньо- та/або позаклітинного оточення. Наприклад, рН-лабільний зв'язок може розщеплюватися при проникненні молекули в підкислену ендосому. Таким чином, рН-лабільний зв'язок можна розглядати як ендосомно розщеплюваний зв'язок. Ферментативні розщеплювані зв'язки можуть розщеплюватися під дією ферментів, наприклад, присутніх в ендосомі, або в лізосомі, або в цитоплазмі. Дисульфідний зв'язок може розщеплюватися при проникненні молекули в більшою мірою поновлююче середовище клітинної цитоплазми. Таким чином, дисульфід можна розглядати як цитоплазматично розщеплюваний зв'язок. При використанні в цьому документі рН-лабільний зв'язок є лабільним зв'язком, який селективно розщеплюється в кислих умовах (рН менше 7). Такі зв'язки можуть також називатися ендосомно лабільними зв'язками, оскільки клітинні
 45 ендосоми і лізосоми мають рН менше 7.

Біорозщеплювані кон'югати, пов'язані з олігомером

Олігомерна сполука може необов'язково містити другу ділянку (ділянка В), розташовану між олігомером (на який посилаються як на ділянку А) і кон'югатом (на який посилаються як на ділянку С) (ілюстрації див. на Фіг. 12 і 13). Ділянка В може бути лінкером, таким як
 55 розщеплюваний лінкер (на який також посилаються як на фізіологічно лабільний зв'язок). Чутливі до нуклеаз фізіологічно лабільні зв'язки: В деяких втіленнях винаходу олігомер (на який також посилаються як на олігомерну сполуку) за винаходом (або кон'югат) містить три ділянки:

- i) перша ділянка (ділянка А), що містить 10-18 суміжних нуклеотидів;
- ii) друга ділянка (ділянка В), що містить біорозщеплюваний лінкер;

iii) третя ділянка (C), що містить кон'югатне угруповання, направляюче угруповання, активаційне угруповання, де третя ділянка ковалентно пов'язана з другою ділянкою.

У деяких втіленнях винаходу ділянка В може бути нуклеотидфосфатним лінкером. Наприклад, такі лінкери можна використовувати, коли кон'югат є ліпофільними кон'югатами, такими як ліпід, жирна кислота, стерин, такий як холестерин або токоферол. Нуклеотидфосфатні лінкери можна також використовувати для інших кон'югатів, наприклад, вуглеводних кон'югатів, таких як GalNAc.

Пептидні лінкери

У деяких втіленнях винаходу біорозщеплюваний лінкер (ділянка В) є пептидом, таким як трилізиновий пептидний лінкер, який можна використовувати в поліGalNAc кон'югаті, такому як триGalNAc кон'югаті. Див. також пептидні бірадикали, згадані в цьому документі.

Інші лінкери, відомі в цій області техніки, які можна використовувати, включають дисульфідні лінкери.

Нуклеотидфосфатні лінкери

У деяких втіленнях винаходу ділянка В містить 1-6 нуклеотидів, ковалентно пов'язаних з 5' або 3'- нуклеотидом першої ділянки, наприклад, за допомогою міжнуклеозидної зв'язуючої групи, такої як фосфодієфірний зв'язок, де або

a. міжнуклеозидний зв'язок між першою і другою ділянкою є фосфодієфірним зв'язком, а нуклеозид другої ділянки, (наприклад, безпосередньо) що примикає до першої ділянки, є або ДНК, або РНК; та/або

b. щонайменше 1 нуклеозид другої ділянки є зв'язаним фосфодієфірним зв'язком нуклеозид ДНК або РНК;

У деяких втіленнях винаходу ділянка А і ділянка В формують одну безперервну нуклеотидну послідовність з 12-22 нуклеотидів в довжину.

У деяких аспектах міжнуклеозидний зв'язок між першою і другою ділянками можна розглядати як частину другої ділянки.

У деяких втіленнях винаходу між другою і третьою ділянкою знаходиться зв'язуюча група, що містить фосфор. Фосфорна зв'язуюча група може, наприклад, бути фосфатною (фосфодієфірною), фосфоротіоатною, фосфородитіоатною або боранофосфатною групою. У деяких втіленнях винаходу ця зв'язуюча група, що містить фосфор, розташована між другою ділянкою і лінкерною ділянкою, яка приєднана до третьої ділянки. У деяких втіленнях винаходу фосфатна група є фосфодієфіром.

Таким чином, в деяких аспектах олігомерна сполука містить щонайменше дві фосфодієфірні групи, де щонайменше одна є групою відповідно до приведеного вище викладу суті винаходу, а інша розташована між другою і третьою ділянками, необов'язково між лінкерною групою і другою ділянкою.

У деяких втіленнях винаходу третя ділянка є активаційною групою, такою як активаційна група для застосування при кон'югації. У цьому аспекті у винаході також запропоновані активовані олігомери, що містять ділянку А і В і активаційну групу, наприклад, проміжну сполуку, яка підходить для наступного зв'язування з третьою ділянкою, наприклад, відповідною для кон'югації.

У деяких втіленнях винаходу третя ділянка є реакційною групою, такою як реакційна група для застосування при кон'югації. У цьому аспекті у винаході також запропоновані олігомери, що містять ділянку А і В і реакційну групу, наприклад, проміжну сполуку, яка підходить для наступного зв'язування з третьою ділянкою, наприклад, відповідною для кон'югації. Реакційна група може в деяких втіленнях винаходу містити амін спиртової групи, такий як група аміну.

У деяких втіленнях винаходу ділянка А містить щонайменше один, наприклад, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 або 21 міжнуклеозидний зв'язок, що відрізняється від фосфодієфірного, такого як міжнуклеозидні зв'язки, які (необов'язково незалежно) вибрані з групи, що складається з фосфоротіоатного, фосфородитіоатного і боранофосфатного, і метилфосфатного, такого як фосфоротіоатний. У деяких втіленнях винаходу ділянка А містить щонайменше один фосфоротіоатний зв'язок. У деяких втіленнях винаходу щонайменше 50%, наприклад, щонайменше 75%, наприклад, щонайменше 90% міжнуклеозидних зв'язків, наприклад, усі міжнуклеозидні зв'язки в межах ділянки А відрізняються від фосфодієфірних, наприклад, є фосфоротіоатними зв'язками. У деяких втіленнях винаходу усі міжнуклеозидні зв'язки в ділянці А відрізняються від фосфодієфірних.

У деяких втіленнях винаходу олігомерна сполука є антисмисловим олігонуклеотидом, таким як кон'югат антисмислового олігонуклеотиду. Антисмисловий олігонуклеотид може бути або може містити першу ділянку і необов'язково другу ділянку. У цьому аспекті в деяких втіленнях винаходу ділянка В може формувати частину безперервної послідовності нуклеотидних основ,

комплементарної (нуклеїновокислотної) мішені. В інших втіленнях винаходу в ділянці В може бути відсутнім комплементарність мішені.

Альтернативно в деяких втіленнях у винаході запропоновано олігонуклеотид (наприклад, антисмисловий олігонуклеотид), зв'язаний не фосфодієфірним зв'язком, таким як фосфоротіоатний зв'язок, який має щонайменше один кінцевий (5' та/або 3') нуклеозид ДНК або РНК, пов'язаний з примикаючим нуклеозидом олігонуклеотиду за допомогою фосфодієфірного зв'язку, де кінцевий нуклеозид ДНК або РНК додатково ковалентно пов'язаний з кон'югатним угрупованням, направляючим угрупованням або блокуючим угрупованням, необов'язково за допомогою лінкерного угруповання.

У деяких втіленнях винаходу олігомерна сполука містить антисмисловий олігонуклеотид, такий як кон'югат антисмислового олігонуклеотиду. Антисмисловий олігонуклеотид може бути або може містити першу ділянку і необов'язково другу ділянку. У цьому аспекті в деяких втіленнях винаходу ділянка В може формувати частину безперервної послідовності нуклеотидних основ, комплементарної (нуклеїновокислотної) мішені. У інших втіленнях винаходу в ділянці В може бути відсутнім комплементарність мішені.

У деяких втіленнях винаходу щонайменше два послідовних нуклеозиду другої ділянки є нуклеозидами ДНК (наприклад, щонайменше 3 або 4 або 5 послідовних нуклеотидів ДНК).

У такому втіленні винаходу олігонуклеотид за винаходом може бути описаний згідно з наступною формулою:

5'-A-PO-B (Y)X-3' або 3'-A-PO-B (Y)X-5'

де А є ділянкою А, PO є фосфодієфірним зв'язком, В є ділянкою В, Y є необов'язковою зв'язуючою групою, і Х є кон'югатною, направляючою, блокуючою групою або реакційною або активаційною групою.

У деяких втіленнях винаходу ділянка В містить 3'- 5' або 5'- 3': i) фосфодієфірний зв'язок з 5'- або 3'- нуклеозидом ділянки А, ii) нуклеозид ДНК або РНК, такий як нуклеозид ДНК, і iii) додатковий фосфодієфірний зв'язок

5'-A-PO-B-PO-3' або 3'-A-PO-B-PO-5'

Додатковий фосфодієфірний зв'язок зв'язує нуклеозид ділянки В з одним або більше додаткових нуклеозидів, таких як один або більше нуклеозидів ДНК або РНК, або може зв'язуватися з Х (являє собою кон'югатну, направляючу або блокуючу групу або реакційну або активаційну групу), необов'язково за допомогою зв'язуючої групи (Y).

У деяких втіленнях винаходу ділянка В містить 3'-5' або 5'-3': i) фосфодієфірний зв'язок з 5' або 3'-нуклеозидом ділянки А, ii) 2-10 зв'язаних фосфодієфірним зв'язком нуклеозидів ДНК або РНК, таким як нуклеозид ДНК, і необов'язково iii) додатковий фосфодієфірний зв'язок:

5'-A-[PO-B]_n-[Y]-X 3' або 3'-A-[PO-B]_n-[Y]-X 5'

5'-A-[PO-B]_n-PO-[Y]-X 3' або 3'-A-[PO-B]_n-PO-[Y]-X 5'

де А є ділянкою А, [PO - B]_n є ділянкою В, де n дорівнює 1-10, наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10, PO є необов'язковою фосфодієфірною зв'язуючою групою між ділянкою В і Х (або Y, якщо присутня).

У деяких втіленнях винаходу у винаході запропоновані сполуки відповідно до однієї з (або такі, що містять одну з) наступних формул:

5' [Ділянка А]-PO-[ділянка В] 3' -Y-X

5' [Ділянка А]-PO-[ділянка В]-PO 3' -Y-X

5' [Ділянка А]-PO-[ділянка В] 3' - X

5' [Ділянка А]-PO-[ділянка В]-PO 3' - X

3' [Ділянка А]-PO-[ділянка В] 5' -Y-X

3' [Ділянка А]-PO-[ділянка В]-PO 5' -Y-X

3' [Ділянка А]-PO-[ділянка В] 5' - X

3' [Ділянка А]-PO-[ділянка В]-PO 5' - X

Ділянка В може, наприклад, містити або складатися з:

5' ДНК 3'

3' ДНК 5'

5' ДНК-PO-ДНК 3'

3' ДНК-PO-ДНК 5'

5' ДНК-PO-ДНК-PO-ДНК 3'

3' ДНК-PO-ДНК-PO-ДНК 5'

5' ДНК-PO-ДНК-PO-ДНК-PO-ДНК 3'

3' ДНК-PO-ДНК-PO-ДНК-PO-ДНК 5'

5' ДНК-PO-ДНК-PO-ДНК-PO-ДНК-PO-ДНК 3'

3' ДНК-PO-ДНК-PO-ДНК-PO-ДНК-PO-ДНК 5'

Повинно бути зрозуміло, що в пов'язаних фосфатним зв'язком біорозщеплюваних лінкерах можна використовувати нуклеозиди, що відрізняються від ДНК і РНК. Біорозщеплювані нуклеотидні лінкери можуть бути ідентифіковані з використанням аналізів в прикладі 6.

5 У деяких втіленнях винаходу сполука за винаходом містить біорозщеплюваний лінкер (на який також посилаються як на фізіологічно лабільний лінкер, чутливі до нуклеаз фізіологічно лабільні зв'язки або чутливий до нуклеаз лінкер), наприклад, нуклеотидфосфатний лінкер (такий як ділянка В) або пептидний лінкер, який зв'язує олігомер (або безперервну нуклеотидну послідовність або ділянку А) з кон'югатним угрупованням (або ділянкою С).

10 Чутливість до розщеплювання в аналізах, показаних в прикладі 6, можна використовувати для визначення, чи є лінкер біорозщеплюваним або фізіологічно лабільним.

Біорозщеплювані лінкери згідно із даним винаходом відносяться до лінкерів, чутливих до розщеплювання в тканині-мішені (тобто фізіологічно лабільним), наприклад, в печінці та/або нирці. Переважно, щоб швидкість розщеплювання, спостережувана в тканині-мішені, була вища, ніж виявляється в сироватці крові. Відповідні способи визначення рівня (%) розщеплювання в тканині (наприклад, в печінці або нирці) і в сироватці можна знайти в прикладі 6. У деяких втіленнях винаходу біорозщеплюваний лінкер (на який також посилаються як на фізіологічно лабільний лінкер або чутливий до нуклеаз лінкер), такий як ділянка В, в сполуці за винаходом розщеплюється щонайменше приблизно на 20%, наприклад, розщеплюється щонайменше приблизно на 30%, наприклад, розщеплюється щонайменше приблизно на 40%, наприклад, розщеплюється щонайменше приблизно на 50%, наприклад, розщеплюється щонайменше приблизно на 60%, наприклад, розщеплюється щонайменше приблизно на 70%, наприклад, розщеплюється щонайменше приблизно на 75% в аналізі гомогенату печінки або нирки прикладу 6. У деяких втіленнях винаходу розщеплювання (%) в сироватці, використовуване в аналізі прикладу 6, складає менш ніж приблизно 30%, менш ніж приблизно 20%, менш ніж приблизно 10%, менш ніж приблизно 5%, менш ніж приблизно 1%.

У деяких втіленнях винаходу, які можуть бути однаковими або різними, біорозщеплюваний лінкер (на який також посилаються як на фізіологічно лабільний лінкер або чутливий до нуклеаз лінкер), такий як ділянка В, в сполуці за винаходом чутливий до розщеплювання нуклеазою S1. Чутливість до розщеплювання S1 можна оцінювати, використовуючи S1 нуклеазний аналіз, показаний в прикладі 6. У деяких втіленнях винаходу біорозщеплюваний лінкер (на який також посилаються як на фізіологічно лабільний лінкер або чутливий до нуклеазам лінкер), такий як ділянка В, в сполуці за винаходом розщеплений щонайменше приблизно на 30%, наприклад, розщеплений щонайменше приблизно на 40%, наприклад, розщеплений щонайменше приблизно на 50%, наприклад, розщеплений щонайменше приблизно на 60%, наприклад, розщеплений щонайменше приблизно на 70%, наприклад, розщеплений щонайменше приблизно на 80%, наприклад, розщеплений щонайменше приблизно на 90%, наприклад, розщеплений щонайменше приблизно на 95% після 120 хв інкубації з нуклеазою S1 згідно з аналізом, використовуваним в прикладі 6.

Вибір послідовності в другій ділянці:

40 У деяких втіленнях винаходу ділянка В не формує комплементарну послідовність при вирівнюванні ділянки А і В олігонуклеотиду з комплементарною послідовністю-мішенню.

У деяких втіленнях винаходу ділянка В не формує комплементарну послідовність при вирівнюванні ділянки А і В олігонуклеотиду з комплементарною послідовністю-мішенню. У цьому аспекті ділянка А і В разом можуть формувати одну безперервну послідовність, комплементарну послідовності-мішені.

У деяких втіленнях винаходу послідовність основ в ділянці В вибрана так, щоб забезпечити оптимальний сайт розщеплювання ендонуклеазою на основі переважаючих ферментів ендонуклеазного розщеплювання, присутніх в тканині або клітині-мішені або в субклітинному компартменті. У цьому аспекті шляхом виділення клітинних екстрактів з тканин-мішеней і тканин, що не є мішенями, послідовності для ендонуклеазного розщеплювання для застосування в ділянці В можуть бути вибрані на основі переважної розщеплюючої активності в бажаній клітині-мішені (наприклад, в печінці/гепатоцитах) в порівнянні з клітиною, що не є мішенню (наприклад, в нирці). У цьому аспекті ефективність сполуки для цільової знижуючої регуляції можна оптимізувати для бажаної тканини/клітини.

55 У деяких втіленнях винаходу ділянка В містить динуклеотидні послідовності AA, AT, AC, AG, TA, TT, TC, TG, CA, CT, CC, CG, GA, GT, GC або GG, де С може бути 5-метилцитозином, та/або Т може бути заміщений У. У деяких втіленнях винаходу ділянка В містить тринуклеотидні послідовності AAA, AAT, AAC, AAG, ATA, ATT, ATC, ATG, ACA, ACT, ACC, ACG, AGA, AGT, AGC, AGG, TAA, TAT, TAC, TAG, TTA, TTT, TTC, TAG, TCA, TCT, TCC, TCG, TGA, TGT, TGC, TGG, CAA, CAT, CAC, CAG, CTA, CTG, CTC, CTT, CCA, CCT, CCC, CCG, CGA, CGT, CGC, CGG,

GAA, GAT, GAC, CAG, GTA, GTT, GTC, GTG, GCA, GCT, GCC, GCG, GGA, GGT, GGC і GGG, де С може бути 5-метилцитозином та/або Т може бути замінений У. У деяких втіленнях винаходу ділянка В містить тетра nukлеотидні послідовності AAAX, AATX, AACX, AAGX, ATAX, ATTX, ATCX, ATGX, ACAX, ACTX, ACCX, ACGX, AGAX, AGTX, AGCX, AGGX, TAAH, TATX, TACX, TAGX, TТАХ, TTTX, TTCX, TAGX, TCAH, TCTX, TCCX, TCGX, TGAX, TGTX, TGCX, TGGX, CAAX, CATX, CACX, CAGX, СТАХ, CTGX, CTCX, CTTX, CCAH, CCTX, CCCX, CCGX, CGAX, CGTX, CGCX, CGGX, GAAX, GATX, GACX, CAGX, GTAX, GTTX, GTCX, GTGX, GCAH, GCTX, GCCX, GCGX, GGAX, GGTX, GGX і GGGX, де Х може бути вибраний з групи, що складається з А, Т, У, G, С та їх аналогів, де С може бути 5-метилцитозином та/або Т може бути замінений У. Повинно бути зрозуміло, що при посиланні на (такі, що зустрічаються в природі) нуклеотидні основи А, Т, У, G, С вони можуть бути заміщені аналогами нуклеотидних основ, що функціонують як еквіваленти природних нуклеотидних основ (наприклад, пара основ з комплементарним нуклеозидом). У деяких втіленнях винаходу ділянка В не містить Т або У.

Аміноалкільні проміжні сполуки

У винаході додатково запропоновані проміжні олігомери ЗНК, що містять антисмисловий олігомер ЗНК, що містить (наприклад, кінцевий, 5' або 3') аміноалкільний лінкер, такий як С2-С36 аміноалкільна група, наприклад, С6-С12 аміноалкільна група, що включає, наприклад, С6 і С12 аміноалкільні групи. Аміноалкільну групу можна приєднати до олігомеру ЗНК як частину олігонуклеотидного синтезу, наприклад, використовуючи (наприклад, захищений) аміноалкілфосфорамідит. Зв'язуюча група між аміноалкілом і олігомером ЗНК може бути, наприклад, фосфоротіоат або фосфодієфір, або одну з інших груп нуклеозидного зв'язку, наприклад, на які посилаються в цьому документі. Аміноалкільна група може бути ковалентно зв'язана, наприклад, з 5' або 3'-кінцем олігомеру ЗНК, наприклад, за допомогою групи нуклеозидного зв'язку, такого як фосфоротіоатний або фосфодієфірний зв'язок.

У винаході також запропонований спосіб синтезу олігомеру ЗНК, що включає послідовний синтез олігомеру ЗНК, такий як твердофазний олігонуклеотидний синтез, що включає стадію приєднання аміноалкільної групи до олігомеру, як, наприклад, протягом першого або останнього раунду олігонуклеотидного синтезу. Спосіб синтезу може додатково включати стадію взаємодії кон'югата з аміноалкіл-олігомером ЗНК (стадію кон'югації). Кон'югат може містити відповідні лінкери та/або групи точки розгалуження і необов'язково додаткові кон'югатні групи, такі як гідрофобні або ліпофільні групи, як описано в цьому документі. Стадію кон'югації можна виконувати в той час, коли олігомер пов'язаний з твердим носієм (наприклад, після олігонуклеотидного синтезу, але до елювання олігомеру з твердого носія), або послідовно (тобто після елювання). У винаході запропоновано застосування аміноалкільного лінкера при синтезі олігомеру за винаходом.

Спосіб одержання/синтезу

У винаході запропонований спосіб синтезу (або одержання) олігомерної сполуки, такої як олігомерна сполука за винаходом, де спосіб включає

або:

а) стадію забезпечення носія [твердофазного] олігонуклеотидного синтезу [третьої ділянки], до якої приєднують одне з наступного:

i) лінкерної групи (-Y-),

ii) групи, вибраної з групи, що складається з кон'югата, направляючої групи, блокуючої групи, реакційної групи [наприклад, амінної або спиртової] або активаційної групи (X-),

iii) групи -Y-X,

i

b) стадію [послідовного] олігонуклеотидного синтезу ділянки В з подальшим синтезом ділянки А,

та/або:

с) стадію [послідовного] олігонуклеотидного синтезу першої ділянки (А) і другої ділянки (В), де за стадією синтезу слідує

d) стадія приєднання третьої ділянки [включення фосфорамідиту]

i) лінкерної групи (-Y-),

ii) групи, вибраної з групи, що складається з кон'югата, направляючої групи, блокуючої групи, реакційної групи [наприклад, амінної або спиртової] або активаційної групи (X-),

iii) групи -Y-X

з подальшим

e) відщепленням олігомерної сполуки від [твердофазного] носія, де необов'язково зазначений спосіб додатково включає додаткову стадію, вибрану із стадій:

f) де третя група позначає активаційну групу, стадії активації активаційної групи з одержанням реакційної групи з подальшим приєднанням кон'югата, блокуючої або направляючої групи до реакційної групи, необов'язково за допомогою лінкерної групи (Y);

5 г) де третя ділянка позначає реакційну групу, стадії приєднання кон'югата, блокуючої або направляючої групи до реакційної групи, необов'язково за допомогою лінкерної групи (Y).

h) де третя ділянка позначає лінкерну групу (Y), стадії приєднання кон'югата, блокуючої або направляючої групи до лінкерної групи (Y),

10 де стадії f), g) або h) виконують або до, або після відщеплення олігомерної сполуки від носія олігонуклеотидного синтезу. У деяких втіленнях винаходу спосіб може бути виконаний з використанням стандартної фосфорамідитної хімії, і сама по собі ділянка X та/або ділянка X або ділянка X і Y може бути одержана до включення в олігомер у вигляді фосфорамідиту. Будь ласка, див. Фіг. 5-10, які ілюструють необмежувані аспекти способу за винаходом.

У винаході запропонований спосіб синтезу (або одержання) олігомерної сполуки, такої як олігомерна сполука за винаходом, де спосіб включає:

15 а) стадію послідовного олігонуклеотидного синтезу першої ділянки (A) і другої ділянки (B), де за стадією синтезу йде стадія приєднання третьої ділянки, що містить фосфорамідит ділянки X (на який також посилаються як на ділянку C) або Y, такої як ділянка, що містить групу, вибрану з групи, що складається з кон'югатної групи, направляючої групи, блокуючої групи, функціональної групи, реакційної групи (наприклад, аміною або спиртовою) або активаційної групи (X), або групу -Y-X з наступним відщепленням олігомерної сполуки від [твердофазного] носія.

25 Проте визнано, що ділянка X або X-Y може бути приєднана після відщеплення від твердого носія. Альтернативно спосіб може включати стадії синтезу першої (A) і необов'язково другої ділянки (B) з наступним відщепленням олігомеру від носія і з наступною стадією приєднання третьої ділянки, такої як група X або X-Y в олігомері. Приєднання третьої ділянки може бути досягнуте, наприклад, шляхом приєднання амінофосфорамідитної ланки на кінцевій стадії синтезу олігомеру (на носії), який після відщеплення від носія використовують для сполучення з групою X або X-Y, необов'язково за допомогою активаційної групи на групі X або Y (коли присутня). У втіленнях винаходу, де розщеплюваний лінкер є ненуклеотидною ділянкою, ділянка B може бути ненуклеотидним розщеплюваним лінкером, наприклад, пептидним лінкером, який може формувати частину ділянки X (на який також посилаються як на ділянку C) або бути ділянкою Y (або його частиною).

35 У деяких втіленнях способу ділянка X (така як C) або (X-Y), така як кон'югат (наприклад, кон'югат GalNAc) містить активаційну групу (активовану функціональну групу), і в способі синтезу активованій кон'югат (або ділянку X, або X-Y) приєднують до першої і другої ділянкам, таким як аміно-зв'язаний олігомер. Аміногрупу можна приєднувати до олігомеру за допомогою стандартної фосфорамідитної хімії, наприклад, як кінцеву стадію синтезу олігомеру (що в характерному випадку приведе в результаті до аміногрупи на 5' кінці олігомеру). Наприклад, протягом останньої стадії олігонуклеотидного синтезу використовують аміно-алкілфосфорамідит, наприклад, TFA-аміно-С6-фосфорамідит (6-(трифторацетиламіно)-гексил-(2-ціаноетил)-(N, N-діізопропіл)-фосфорамідит).

40 Ділянку X (або ділянку C, на яку посилаються в цьому документі), таку як кон'югат (наприклад, кон'югат GalNAc), можна активувати складноефірним N-гідроксисукцинімідним (NHS) способом, а потім приєднати аміно-зв'язаний олігомер. Наприклад, N-гідроксисукцинімід (NHS) можна використовувати як активуючу групу для ділянки X (або ділянки C, такої як кон'югат, наприклад, кон'югатне угруповання GalNAc).

У винаході запропоновано олігомер, одержаний способом за винаходом.

45 У деяких втіленнях винаходу ділянка X та/або ділянка X або ділянка X і Y можуть бути ковалентно сполучені (зв'язані) з ділянкою B за допомогою нуклеозидфосфатного зв'язку, такого як описано в цьому документі, включаючи фосфодієфір або фосфоротіоат, або за допомогою альтернативної групи, такої як триазольна група.

У деяких втіленнях винаходу міжнуклеозидний зв'язок між першою і другою ділянкою є фосфодієфір, зв'язаний з першим (або єдиним) нуклеозидом ДНК або РНК другої ділянки, або ділянка B містить щонайменше один нуклеозид ДНК або РНК, зв'язаний фосфодієфірним зв'язком.

55 Друга ділянка в деяких втіленнях винаходу може містити додаткові нуклеозиди ДНК або РНК, які можуть бути зв'язані фосфодієфірним зв'язком. Друга ділянка додатково ковалентно зв'язана з третьою ділянкою, яка може, наприклад, являти собою кон'югат, направляючу групу, реакційну групу та/або блокуючу групу.

У деяких аспектах даний винахід заснований на забезпеченні лабільної ділянки, другої ділянки, зв'язуючої першу ділянку, наприклад, антисмисловий олігонуклеотид, і кон'югат або функціональну групу, наприклад, направляючу або блокуючу групу. Лабільна ділянка містить щонайменше один нуклеозид, зв'язаний фосфодієфірним зв'язком, таким як нуклеозид ДНК або РНК, наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 нуклеозидів, пов'язаних фосфодієфірним зв'язком, таким як ДНК або РНК. У деяких втіленнях винаходу олігомерна сполука містить розщеплюваний (лабільний) лінкер. У цьому аспекті розщеплюваний лінкер переважно присутній в ділянці В (або в деяких втіленнях винаходу між ділянкою А і В).

Альтернативно в деяких втіленнях винаходу у винаході запропоновано олігонуклеотид (наприклад, антисмисловий олігонуклеотид), зв'язаний не фосфодієфірним зв'язком, наприклад, фосфоротіоатним зв'язком, що має щонайменше один кінцевий (5' та/або 3' нуклеозид) ДНК або РНК, зв'язаний з примикаючим нуклеозидом олігонуклеотиду за допомогою фосфодієфірного зв'язку, де кінцевий нуклеозид ДНК або РНК додатково ковалентно зв'язаний з кон'югатним угрупованням, направляючим угрупованням або блокуючим угрупованням, необов'язково за допомогою лінкерного угруповання.

Композиції

Олігомер або кон'югати олігомеру за винаходом можна застосовувати у фармацевтичних препаратах і композиціях. Доцільно такі композиції містять фармацевтично прийнятний розчинник, носій, сіль або ад'ювант. У документі WO 2007/031091, включеному за допомогою посилання, запропоновані відповідні і переважні фармацевтично прийнятні розчинник, носій і ад'юванти. Відповідні дози, препарати, шляхи введення, композиції, дозовані форми, комбінації з іншими терапевтичними засобами, пролікарські препарати також запропоновані в документі WO 2007/031091, також включеному в цей документ за допомогою посилання.

Застосування

Олігомери або кон'югати олігомерів за винаходом можна застосовувати в якості експериментальних реагентів, наприклад, діагностичних, терапевтичних і профілактичних.

При дослідженнях такі олігомери можна застосовувати для специфічного інгібування синтезу білка PCSK9 (у характерному випадку шляхом розпаду або інгібування мРНК і за допомогою цього запобігання формуванню білку) в клітинах і у піддослідних тварин, таким чином, сприяючи функціональному аналізу мішені або оцінці її корисності як мішені для терапевтичного втручання.

У діагностиці такі олігомери можна застосовувати для виявлення і кількісного визначення експресії PCSK9 в клітині і тканинах за допомогою Нозерн-блотинга, гібридизації in-situ або подібних методів.

Для терапевтичних застосувань тварину або людину, підозрювану на наявність захворювання або розладу, який можна лікувати шляхом модуляції експресії PCSK9, лікують шляхом введення олігомерних сполук відповідно до цього винаходу. Додатково запропоновані способи лікування ссавця, наприклад, лікування людини, підозрюваної на наявність захворювання або стану або схильність до нього, пов'язаної з експресією PCSK9, шляхом введення терапевтично або профілактично ефективної кількості одного або більше олігомерів або композицій за винаходом. Олігомер, кон'югат або фармацевтичну композицію згідно з винаходом в характерному випадку вводять в ефективній кількості.

У винаході також запропоновано застосування сполуки або кон'югата згідно з винаходом, як описано в цьому документі, для одержання лікарського засобу для лікування розладу, на яке посилаються в цьому документі, або для способу лікування розладу, на який посилаються в цьому документі.

У винаході також запропоновано спосіб розладу, на який посилаються в цьому документі, що включає введення пацієнтові, що потребує цього, сполуки згідно з винаходом, як описано в цьому документі, та/або кон'югата згідно з винаходом та/або фармацевтичної композиції згідно з винаходом.

Медичні свідчення

Олігомери, кон'югати олігомерів та інші композиції згідно з винаходом можна застосовувати для лікування станів, пов'язаних з надекспресією або з експресією мутованого варіанту PCSK9.

У винаході додатково запропоновано застосування сполуки за винаходом при одержанні лікарського засобу для лікування захворювання, розладу або стану, на який посилаються в цьому документі.

У загальних рисах один аспект винаходу відноситься до способу лікування ссавця, що страждає або підозрюваного на наявність станів, пов'язаних з аномальними рівнями та/або активністю PCSK9, де спосіб включає введення ссавцеві терапевтично ефективної кількості олігомеру або кон'югата олігомеру, направлено на PCSK9, що містить одну або більше ланки

ЗНК. Олігомер, кон'югат або фармацевтичну композицію згідно з винаходом в характерному випадку вводять в ефективній кількості.

Захворювання або розлад, на який посилаються в цьому документі, в деяких втіленнях винаходу може бути пов'язано з мутацією в гені PCSK9 або в гені, білковий продукт якого асоційований або взаємодіє з PCSK9. Таким чином, в деяких втіленнях винаходу мРНК-мішень є мутованою формою послідовності PCSK9.

Аспект потрібного винаходу відноситься до застосування олігомеру (сполуки), як визначено в цьому документі, або кон'югата, як визначено в цьому документі, для одержання лікарського засобу для лікування захворювання, розладу або стану, на який посилаються в цьому документі.

Способи за винаходом переважно застосовують для лікування або профілактики захворювань, викликаних аномальними рівнями та/або активністю PCSK9.

Альтернативно в деяких втіленнях винаходу додатково відноситься до способу лікування аномальних рівнів та/або активності PCSK9, де цей спосіб включає введення олігомеру за винаходом, або кон'югата за винаходом, або фармацевтичної композиції за винаходом пацієнтові, що потребує цього.

Винахід також відноситься до олігомеру, композиції або кон'югата, як визначено в цьому документі, для застосування як лікарського засобу.

Винахід додатково відноситься до застосування сполуки, композиції або кон'югата, як визначено в цьому документі, для одержання лікарського засобу для лікування аномальних рівнів та/або активності PCSK9 або експресії форм мутантів PCSK9 (таких як апельні варіанти, наприклад, пов'язані з одним із захворювань, на які посилаються в цьому документі).

Крім того, винахід відноситься до способу лікування суб'єкта, що страждає на захворювання або стан, таким як ті, на які посилаються в цьому документі.

Пацієнт, що потребує лікування, є пацієнтом, що страждає або ймовірно страждає на захворювання або розлад.

У деяких втіленнях винаходу термін 'лікування' при використанні в цьому документі відноситься як до лікування існуючого захворювання (наприклад, захворювання або розладу, на який посилаються в цьому документі), так і до запобігання захворюванню, тобто профілактики. Таким чином, добре відомо, що лікування, на яке посилаються в цьому документі, в деяких втіленнях винаходу може бути профілактичним.

В одному втіленні винахід відноситься до сполук або композицій, що містять сполуки, для лікування гіперхолестеринемії і споріднених розладів або до способів лікування із застосуванням таких сполук або композицій лікування гіперхолестеринемії і споріднених розладів, де термін "споріднені розлади" при посиланні на гіперхолестеринемію відноситься до одного або більше із станів, вибраних з групи, що складається з атеросклерозу, гіперліпідемії, гіперхолестеринемії, сімейної гіперхолестеринемії, наприклад, накопичення функціональних мутацій в PCSK9, дисбалансу ЛПВЩ/ЛПНЩ холестерину, дисліпідемій, наприклад, сімейної гіперліпідемії (СКГ) або сімейної гіперхолестеринемії (СГХС), придбанної гіперліпідемії, статин-резистентної гіперхолестеринемії, хворобі коронарних артерій (КАХ) та ішемічної хвороби серця (ІХС).

Комбіновані терапії

У деяких втіленнях винаходу сполука за винаходом призначена для застосування при комбінованому лікуванні з іншим терапевтичним засобом. Наприклад, інгібітори HMGCoA-редуктази, такі як, наприклад, статини, широко застосовують при лікуванні метаболічного захворювання (див. WO 2009/043354, включений в цей документ за допомогою посилання як прикладів комбінованого лікування). Види комбінованого лікування можуть бути іншими гіпохолестеринемичними сполуками, такі як сполука, вибрана з групи, що складається із смол-секвестрантів жовчних кислот (наприклад, холестираміну, колестиполу і гідрохлориду колесевеламу), інгібіторів HMGCoA-редуктази (наприклад, ловастатину, церивастатину, правастатину, аторвастатину, симвастатину, розувастатину і флувастатину), нікотинової кислоти, похідних фібринової кислоти (наприклад, клофібрату, гемфіброзилу, фенофібрату, безафібрату і ципрофібрату), пробуколу, неоміцину, декстротироксину, складних ефірів рослинних станолів, інгібіторів абсорбції холестерину (наприклад, езетимібу), імплітапіді, інгібіторів транспортерів жовчної кислоти (апикальних натрійзалежних транспортерів жовчної кислоти), регулювальників печінкового CYP7a, засобів замісної терапії естрогеном (наприклад, тамоксифену) і протизапальних засобів (наприклад, глюкокортикоїдів). Комбінації із статинами можуть бути особливо переважними.

КОНКРЕТНІ ВТІЛЕННЯ ВИНАХОДУ

1. Кон'югат антисмислового олігонуклеотиду, що містить

а. антисмисловий олігомер (А) з 12-22 нуклеотидів в довжину, що містить безперервну послідовність з 10-16 нуклеотидів, комплементарну відповідному відрізьку довжини SEQ ID NO 30 або 31 або 32 або 33 або 34 або 45, і

5 б. щонайменше одне нуклеотидне або неполінуклеотидне кон'югатне угруповання (С), ковалентно приєднане до олігомеру (А).

2. Кон'югат олігонуклеотиду згідно з втіленням 1, де антисмисловий олігомер містить безперервну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO 25, 26, 27, 28, 29 і 44.

3. Кон'югат олігонуклеотиду згідно з будь-яким одним з втілень 1 або 0, де антисмисловий олігомер направлений на PCSK9.

10 4. Кон'югат олігонуклеотиду згідно з будь-яким одним з 1-3, де антисмисловий олігомер містить аналоги нуклеотидів, що посилюють спорідненість.

5. Кон'югат олігонуклеотиду згідно з втіленням 1, де аналоги нуклеотидів є нуклеотидами з модифікованим цукром, такими як нуклеотиди з модифікованим цукром, незалежно або залежно вибрані з групи, що складається з: ланок замкненої нуклеїнової кислоти (ЗНК); ланок 2'-О-алкіл-РНК, ланок 2'-ОМе-РНК, ланок 2'-аміно-ДНК і ланок 2'-фтор-ДНК.

15 6. Кон'югат олігонуклеотиду згідно з втіленням 4 або 5, де аналоги нуклеотидів містять або є ланками замкненої нуклеїнової кислоти (ЗНК).

7. Кон'югат олігонуклеотиду згідно з будь-яким одним з втілень 1-6, де антисмисловий олігомер є гепмером.

20 8. Кон'югат олігонуклеотиду згідно з втіленням 7, де гепмер утримує сегмент-крило на кожній стороні (5' і 3') з аналогів нуклеотидів, переважно аналогів ЗНК, в кількості від 2 до 4.

9. Кон'югат олігонуклеотиду згідно з втіленням 7 або 8, де конструкція гепмера вибрана з групи, що складається з 2-8-2, 3-8-3, 2-8-3, 3-8-2, 4-8-2, 2-8-4, 2-9-2, 2-9-3, 3-9-2, 3-9-3, 3-9-4, 4-9-3, 2-10-2, 2-10-3, 3-10-2, 3-10-3, 3-10-4, 4-10-3, 2-11-2, 2-11-3, 3-11-2, 3-11-3, 3-11-4, 4-11-3 і 4-11-4.

25 10. Кон'югат олігонуклеотиду згідно з будь-яким одним з втілень 7-9, де конструкція гепмера вибрана з групи, що складається з 2-8-3, 3-8-3, 3-9-4, 3-10-3, 2-11-2, 2-11-3 і 3-11-2.

11. Кон'югат олігонуклеотиду згідно з будь-яким одним з втілень 1-10, де олігомер містить безперервну послідовність з 13, 14, 15 або 16 нуклеотидів.

30 12. Кон'югат олігонуклеотиду згідно з будь-яким одним з втілень 1-11, де олігомер містить один або більше нуклеозидних зв'язків, вибраних з групи, що складається з фосфоротіоатної, фосфородитіоатної і боранофосфатної.

13. Кон'югат олігонуклеотиду згідно з будь-яким одним з втілень 1-12, де олігомер містить або складається з фосфоротіоатних нуклеозидних зв'язків.

35 14. Кон'югат олігонуклеотиду згідно з будь-яким одним з втілень 1-13, де олігомер містить безперервну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 і 8.

15. Кон'югат олігонуклеотиду згідно з будь-яким одним з втілень 1-14, де кон'югатне угруповання (С) вибране з групи, що складається з вуглеводу, такого як GalNAc або кластер GalNAc, ліпофільна група, така як ліпід, жирна кислота; стерин, такий як холестерин або токоферол; або статин.

40 16. Кон'югат антисмислового олігонуклеотиду згідно з будь-яким одним з втілень 1-15, де кон'югатне угруповання (С) посилює доставлення та/або захоплення в клітини печінки.

17. Кон'югат антисмислового олігонуклеотиду згідно з будь-яким одним з втілень 1-16, де кон'югатне угруповання (С) містить стерин, такий як токоферол, холестерин, наприклад, кон'югати, показані як Conj 5, Conj 5a, Conj 6 або Conj 6a.

45 18. Кон'югат антисмислового олігонуклеотиду згідно з втіленням 1-17, де кон'югатне угруповання (С) містить вуглевод, наприклад, GalNAc або тривалентних GalNAc, наприклад, кон'югати, показані як Conj 1, 2, 3 або 4, або 1a, 2a, 3a або 4a.

50 19. Кон'югат антисмислового олігонуклеотиду згідно з втіленням 18, де кон'югатне угруповання (С) містить Conj 2a.

20. Кон'югат антисмислового олігонуклеотиду згідно з будь-яким одним з втілень 1-19, вибраний з групи, що складається з SEQ ID NO 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 і 24.

55 21. Кон'югат антисмислового олігонуклеотиду згідно з будь-яким одним з втілень 1-20, де антисмисловий олігомер (А) кон'югований з кон'югатним угрупованням (С) за допомогою лінкерної ділянки, розташованої між безперервною послідовністю олігомеру і кон'югатним угрупованням (В та/або Y).

60 22. Кон'югат антисмислового олігонуклеотиду згідно з втіленням 21, де лінкер вибраний з групи, що складається з аміноалкільних лінкерів, нуклеотидфосфатних лінкерів і пептидних лінкерів.

23. Кон'югат антисмислового олігонуклеотиду згідно з втіленням 21 або 22, де лінкер вибраний з C6-C12 аміноалкільних груп.

24. Кон'югат антисмислового олігонуклеотиду згідно з втіленням 21 або 22, де лінкер є біорозщеплюваним нуклеотидфосфатним лінкером, що містить від 1 до 6 нуклеотидів.

25. Кон'югат антисмислового олігонуклеотиду згідно з будь-яким з втілень 21-24, де лінкер (В) є фосфодієфірним нуклеотидним зв'язком, що містить один або більше суміжних нуклеотидів ДНК, пов'язаних фосфодієфірним зв'язком, наприклад, 1, 2, 3, 4, 5 або 6 суміжних нуклеотидів ДНК, пов'язаних фосфодієфірним зв'язком, які є суміжними з 5' або 3' кінцем безперервної послідовності олігомеру, і які можуть формувати або не формувати спаровування комплементарних основ з послідовністю-мішенню PCSK9.

26. Кон'югат антисмислового олігонуклеотиду згідно з втіленням 24 або 25, де фосфодієфірний нуклеотидний зв'язок (або біорозщеплюваний лінкер) містить 1, 2 або 3 нуклеотиди ДНК, пов'язані фосфодієфірним зв'язком, наприклад, два нуклеотиди ДНК, пов'язані фосфодієфірним зв'язком, наприклад, динуклеотид 5' CA 3'.

27. Олігомер з 12-22 нуклеотидів в довжину, який містить або

a. безперервну послідовність з 16 нуклеотидів, комплементарну відповідному відрізьку довжини SEQ ID NO 31, або

b. безперервну послідовність з 10-16 нуклеотидів, комплементарну відповідному відрізьку довжини SEQ ID NO 33 або 34 або 45.

28. Олігомер згідно з втіленням 27, який містить безперервну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO 26, 27, 28, 29 і 44.

29. Олігомер згідно з будь-яким одним з втілень 27 або 28, де олігомер направлений на PCSK9.

30. Олігомер згідно з будь-яким одним з втілень 27-29, де безперервна послідовність містить аналоги нуклеотидів, що посилюють спорідненість.

31. Олігомер згідно з втіленням 30, де аналоги нуклеотидів є нуклеотидами з модифікованим цукром, такі як нуклеотиди з модифікованим цукром, незалежно або залежно вибрані з групи, що складається з: ланок замкненої нуклеїнової кислоти (ЗНК); ланок 2'-О-алкіл-РНК, ланок 2'-ОМе-РНК, ланок 2'-аміно-ДНК і ланок 2'-фтор-ДНК.

32. Олігомер згідно з втіленням 30 або 31, де аналоги нуклеотидів включають або є ланками замкненої нуклеїнової кислоти (ЗНК).

33. Олігомер згідно з будь-яким одним з втілень 30-32, що являє собою гепмер, такий як гепмерний олігонуклеотид замкненої нуклеїнової кислоти.

34. Кон'югат олігонуклеотиду згідно з втіленням 33, де гепмер утримує сегмент-крило на кожній стороні (5' і 3') з 2-4 аналогів нуклеотидів, переважно аналогів ЗНК.

35. Кон'югат олігонуклеотиду згідно з втіленням 32 або 33, де конструкція гепмера вибрана з групи, що складається з 2-8-2, 3-8-3, 2-8-3, 3-8-2, 4-8-2, 2-8-4, 2-9-2, 2-9-3, 3-9-2, 3-9-3, 3-9-4, 4-9-3, 2-10-2, 2-10-3, 3-10-2, 3-10-3, 3-10-4, 4-10-3, 2-11-2, 2-11-3, 3-11-2, 3-11-3, 3-11-4, 4-11-3 і 4-11-4.

36. Кон'югат олігонуклеотиду згідно з будь-яким одним з втілень 33-35, де конструкція гепмера вибрана з групи, що складається з 2-8-3, 3-8-3, 3-9-4, 3-10-3, 2-11-2, 2-11-3 і 3-11-2.

37. Олігомер згідно з будь-яким одним з втілень 27-36, де олігомер містить безперервну послідовність з 13, 14, 15 або 16 нуклеотидів.

38. Олігомер згідно з будь-яким одним з втілень 27-37, де олігомер містить один або більше нуклеозидних зв'язків, вибраних з групи, що складається з фосфоротіоатного, фосфородитіоатного і боранофосфатного.

39. Олігомер згідно з будь-яким одним з втілень 27-38, де олігомер містить фосфоротіоатні нуклеозидні зв'язки або складається з них.

40. Олігомер згідно з будь-яким одним з втілень 27-39, який містить безперервну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO 2, 3, 4, 5, 6, 7 і 8.

41. Фармацевтична композиція, яка містить кон'югат олігомеру або антисмислового олігонуклеотиду згідно з будь-яким одним з втілень 1-40 і фармацевтично прийнятний розчинник, носій, сіль або ад'ювант.

42. Кон'югат олігомеру або антисмислового олігонуклеотиду або фармацевтична композиція згідно з будь-яким одним з втілень 1-40 для застосування як лікарського засобу, наприклад, гіперхолестеринемії або спорідненого розладу, такого як розлад, вибраний з групи, що складається з атеросклерозу, гіперліпідемії, гіперхолестеринемії, сімейної гіперхолестеринемії, наприклад, накопичення функціональних мутацій в PCSK9, дисбалансу ЛПВЩ/ЛПНЩ холестерину, дисліпідемій, наприклад, сімейної гіперліпідемії (СКГ) або сімейної

гіперхолестеринемії (СГХС), придбаної гіперліпідемії, статин-резистентної гіперхолестеринемії, хворобі коронарних артерій (КАХ) та ішемічної хвороби серця (ІХС).

43. Застосування кон'югата олігомеру або антисмислового олігонуклеотиду або фармацевтичної композиції згідно з будь-яким одним з втілень 1-40 для одержання лікарського засобу для лікування гіперхолестеринемії або спорідненого розладу, такого як розлад, вибраний з групи, що складається з атеросклерозу, гіперліпідемії, гіперхолестеринемії, сімейної гіперхолестеринемії, наприклад, накопичення функціональних мутацій в PCSK9, дисбалансу ЛПВЩ/ЛПНЩ холестерину, дисліпідемій, наприклад, сімейної гіперліпідемії (СКГ) або сімейної гіперхолестеринемії (СГХС), придбаної гіперліпідемії, статин-резистентної гіперхолестеринемії, хворобі коронарних артерій (КАХ) та ішемічної хвороби серця (ІХС).

44. Спосіб лікування гіперхолестеринемії або спорідненого розладу, такого як розлад, вибраний з групи, що складається з атеросклерозу, гіперліпідемії, гіперхолестеринемії, сімейної гіперхолестеринемії, наприклад, накопичення функціональних мутацій в PCSK9, дисбалансу ЛПВЩ/ЛПНЩ холестерину, дисліпідемій, наприклад, сімейної гіперліпідемії (СКГ) або сімейної гіперхолестеринемії (СГХС), придбаної гіперліпідемії, статин-резистентної гіперхолестеринемії, хворобі коронарних артерій (КАХ) та ішемічної хвороби серця (ІХС), де спосіб включає введення ефективної кількості кон'югата олігомеру або антисмислового олігонуклеотиду або фармацевтичної композиції згідно з будь-яким одним з втілень 1-40 пацієнтові, що страждає або ймовірно страждає гіперхолестеринемією або спорідненим розладом.

45. Спосіб інгібування PCSK9 in vivo або in vitro в клітині, експресуючій PCSK9, де спосіб включає введення в клітину кон'югата олігомеру або антисмислового олігонуклеотиду або фармацевтичної композиції згідно з будь-яким одним з втілень 1-40 так, щоб інгібувати PCSK9 в цій клітині.

ПРИКЛАДИ

Олігонуклеотиди синтезували на уридинових універсальних носіях з використанням фосфорамідитного методу на синтезаторі Expedite 8900/MOSS (Multiple Oligonucleotide Synthesis System) або Oligomaker 48 в масштабі синтезу 4 або 1 мкмоль відповідно. У кінці синтезу олігонуклеотиди відщеплювали від твердого носія з використанням водного аміаку протягом 5-16 годин при 60 °С. Олігонуклеотиди очищали за допомогою ВЕРХ з оберненою фазою (ОФ-ВЕРХ) або за допомогою твердофазних екстракцій і характеризували за допомогою недефективної рідинної хроматографії (НВЕРХ), і молекулярну масу додатково підтверджували за допомогою мас-спектрометрії з іонізацією електророзпиленням (ІЕР-МС). Додаткові подробиці див. нижче.

Елонгація олігонуклеотиду

Поєднання β-ціаноетил-фосфорамідитів (ДНК-A(Bz), ДНК-G(ibu), ДНК-C(Bz), ДНК-T, ЗНК-5-метил-С(Bz), ЗНК-A(Bz), ЗНК-G(dmf), ЗНК-T або лінкера С6-S-S-C6) виконують з використанням розчину 0,1 М 5'-О-DMT-захищеного амідиту в ацетонітрилі і DCI (4,5-диціаноімідазолу) в ацетонітрилі (0,25 М) в якості активатора. Для кінцевого циклу використовували наявний в продажі С6-зв'язаний холестерин з фосфорамідитом при 0,1 М в ДХМ. Включення тіолових груп для введення фосфоротіоатних зв'язків виконують шляхом використання гідриду ксантану (0,01 М в суміші ацетонітрил/піридин 9:1). Фосфодієфірні зв'язки вводять з використанням 0,02 М йоду в суміші ТГФ/піридин/вода 7:2:1. Інші реагенти є реагентами, в характерному випадку вживані для олігонуклеотидного синтезу. Для кон'югації потім твердофазного синтезу використовують наявний в продажі С6-амінолінкер-фосфорамідит на останньому циклі твердофазного синтезу, і після видалення захисту і відщеплення від твердого носія виділяють аміно-зв'язаний незахищений олігонуклеотид. Кон'югати вводять за допомогою активації функціональної групи з використанням стандартних способів синтезу.

Очищення за допомогою ОФ-ВЕРХ:

Неочищені сполуки очищали за допомогою препаративної ОФ-ВЕРХ на колонці Phenomenex Jupiter C18 10 мкм, 150x10 мм. Як буфери використовували 0,1 М ацетат амонію рН 8 і ацетонітрил при швидкості струму 5 мл/хв. Зібрані фракції ліофілізували з одержанням очищеної сполуки, в характерному випадку у вигляді білої твердої речовини.

Скорочення:

DCI: 4,5-Диціаноімідазол
 ДХМ: Дихлорметан
 ДМФ: Диметилформамід
 ДМТ: 4,4'- Диметокситритил
 ТГФ: Тетрагідрофуран
 Bz: Бензоіл
 Ibu: Ізобутирил

ОФ-ВЕРХ: Високоєфективна рідинна хроматографія з оберненою фазою
Сполуки синтезували, як показано в таблиці 1, а також проілюстровано на фігурах.

Приклад 1. Відкриття нового мотиву-мішені PCSK9

Був сконструйований і синтезований 521 антисмисловий олігонуклеотид проти PCSK9, де усі
5 вони містили три замкнуті нуклеїнові кислоти, фланкуючі десять ДНК, тобто конструкцію 16-
мірного гепмера ЗНК, де олігонуклеотид специфічний до PCSK9 людини і приматів. Лінію 15PC3
клітин людини інкубували протягом трьох діб або з помилково-модифікованими
олігонуклеотидами, або з олігонуклеотидами, модифікованими замкненою нуклеїною
кислотою, направленими на PCSK9 людини, при концентрації 0,3 мкМ. Кожен олігонуклеотид
10 проти PCSK9 тестували в трьох незалежних експериментах. Рівні мРНК PCSK9 кількісно
визначали з екстрагованої РНК з використанням ПЛР в реальному часі, як описано, і
представляли в нормалізованому вигляді за мРНК β -актином і відносно середніх рівнів в
дванадцяти помилково-оброблених зразках на Фіг. 8, де підгрупа найбільш ефективних молекул
детально розглянута на Фіг. 9.

15 Приклад 2. Нокдаун мРНК *in vitro*

Лінію 15PC3 клітин людини інкубували протягом 3 діб або з помилково-модифікованими
олігонуклеотидами, або з олігонуклеотидами, модифікованими замкненою нуклеїною
кислотою, послідовності SEQ ID 1-8, направленими на PCSK9 людини, при концентраціях
0,0012, 0,06, 0,3 і 1,5 мкМ. Рівні мРНК PCSK9 кількісно визначали з екстрагованої РНК,
20 використовуючи ПЛР в реальному часі, як описано, і представляли відносно середніх рівнів в
чотирьох помилково-оброблених зразках на Фіг. 10. Для кожного олігонуклеотиду ефективність,
визначену як половинну максимальну ефективну концентрацію (EC50), визначали методом
найменших квадратів за відповідністю рівнянню Хілла в двохпараметричній логістичній формі з
фіксованою нижньою межею 0% і фіксованою верхньою межею 100% як EC50 = оцінка \pm
25 стандартне відхилення.

Приклад 3. Рівні ALT *in vivo*

Чотири самиці мишей NMRI у віці чотирьох тижнів (компанія Taconic, Данія), що важать
приблизно 20 г після прибуття, ін'єктували внутрішньовенно один раз або фізіологічним
розчином, або олігонуклеотидами, модифікованими замкненою нуклеїною кислотою,
30 кон'югованими з холестериним, послідовностей SEQ ID 9-16, направленими на PCSK9 людини
при дозах 7,5 і 15 мг/кг. Мишей убивали через 7 діб після введення і визначали сироваткові рівні
аланінамінотрансферази (ALT) з використанням ферментативного аналізу (Horiba ABX
Diagnostics). Для кожної експериментальної групи з п'яти мишей обчислювали середні значення
і стандартні відхилення і представляли на Фіг. 11 відносно середніх рівнів у мишей, оброблених
35 фізіологічним розчином. Підйоми ALT були відмічені при обох концентраціях для деяких, але не
для усіх молекул, кон'югованих з холестерином. Декілька із сполук, таких як SEQ ID NO 9 і 10,
клінічно значущо не збільшували ALT у мишей навіть у разі використання холестерину як
кон'югата для посилення захоплення сполук в печінці.

Приклад 4: Дослідження на нелюдиноподібних приматах

40 Першочергова мета цього дослідження полягала у вивченні вибраних ліпідних маркерів
через 7 тижнів після одноразової болюсної ін'єкції сполук ЗНК проти PCSK9 яванським макакам
і в оцінці потенційної токсичності сполук у мавп. Сполуки, використовувані в цьому дослідженні,
мали послідовності SEQ ID NO 10, 13, 18, 19, 20 і 21, приготовані в стерильному фізіологічному
розчині (0,9%) при початковій концентрації 0,625 і 2,5 мг/мл.

45 Використовували самців мавп у віці щонайменше 24 місяців і надавали їм вільний доступ до
проточної води і розподіляли по 180 г збільшеного раціону MWM(E) SQC SHORT (Dietex France,
SDS, Сен-Грат'єн, Франція) на тварину в добу. Сумарну кількість корму, розподілену в кожну
клітину, обчислюють відповідно до числа тварин в клітині на цю добу. Крім того, кожній тварині
щодоби давали фрукти або овочі. Тварин акліматизували до умов дослідження протягом
50 періоду щонайменше 14 діб до початку експериментального періоду обробки. Протягом цього
періоду проводили попередні дослідження. Тварин дозували внутрішньовенно (*i.v.*) в
одноразовій дозі 0,25, 1,0 або 2,5 мг/кг (SEQ ID NO 10, 13, 18 і 21) або в одноразовій дозі 1,0 або
2,5 мг/кг (SEQ ID NO 19 і 20). Об'єм дози складав 0,4 мл/кг Використовували 2 тварини на групу.

55 Дози препаратів вводили один раз на добу 1. Тварин спостерігали протягом періоду 7 тижнів
після обробки і виводили з дослідження на добу 51. Доба 1 відповідають першій добі періоду
експерименту. Клінічні спостереження, масу тіла і споживання їжі (на групу) реєструють до і під
час дослідження.

Забирання зразків крові і аналізи виконували в наступні моменти часу:

Доба дослідження	Параметри
-8	RCP, L, Apo-B, PCSK9*, OA
-1	L, Apo-B, PCSK9*, PK, OA
1	Дозування
4	LSB, L, Apo-B, PCSK9*, OA
8	LSB, L, Apo-B, PCSK9*, PK, OA
15	RCP, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
22	LSB, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
29	L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
36	LSB, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
43	L, PK, Apo-B, PCSK9* PK, OA
50	RCP, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA

RCP (routine clinical pathology) = стандартна клінічна патологія,
 LSB (liver safety biochemistry) = біохімічні показники безпеки для печінки,
 PK = фармакокінетика,
 OA (other analysis) = інші аналізи,
 L (Lipids) = ліпіди.

У вказаних нижче випадках для усіх тварин, що вижили, визначали наступні параметри:

Повна біохімічна панель (повний перелік нижче) - на добу - 8, 15 і 50,

5 Безпека для печінки (тільки аспартатамінотрансфераза (АСТ), лужна фосфатаза (ЛФ), аланінамінонотрансфераза (АЛТ), загальний білірубін і гамма-глутамілтрансфераза (ГГТ)) - на добу 4, 8, 22 і 36,

Ліпидограма (загальний холестерин, Х-ЛПВЩ, Х-ЛПНЩ і тригліцериди) і тільки Apo-B - на добу - 1, 4, 8, 22, 29, 36 і 43.

10 Кров (приблизно 1,0 мл) брали в пробірки з літієм-гепарином (використовуючи біохімічний аналізатор крові ADVIA 1650): Apo-B, натрій, калій, хлорид, кальцій, неорганічний фосфор, глюкоза, Х-ЛПВЩ, Х-ЛПНЩ, сечовина, креатинін, загальний білірубін, загальний холестерин, тригліцериди, лужна фосфатаза (ЛФ), аланінамінонотренсфераза (АЛТ), аспартатамінотрансфераза (АСТ), креатинінкіназа, гамма-глутамілтрансфераза (ГГТ),

15 лактатдегідрогеназа, загальний білок, альбумін, відношення альбумін/глобулін.
 Аналіз PCSK9 в крові: Зразки крові на аналіз PCSK9 збирали на добу -8, -1, 4, 8, 15, 22, 29, 36, 43 і 50. Венозну кров (приблизно 2 мл) збирали з відповідної вени кожної тварини в пробірку для відділення сироватки (SST; Serum Separating Tube) і давали можливість згорнутися протягом щонайменше 60 ± 30 хвилин при кімнатній температурі. Кров центрифугували при 20 1000 g протягом 10 хвилин в умовах охолодження (встановлено на підтримку +4 °C). Сироватку переносили в 3 індивідуальних пробірки і зберігали при -80 °C до аналізу в компанії CitoxLAB, Франція, використовуючи спосіб твердофазного імуоферментного аналізу (ІФА) (набір для ІФА Circulex Human PCSK9, CY - 8079, підтверджений для зразків від яванського макака).

25 Інші аналізи: В WO 2011009697 запропоновані способи наступного аналізу: аналіз мРНК PCSK9 за допомогою кількісної ПЛР (qПЛР). Інший аналіз включав ІФА білка PCSK9, аналіз Lp(a) сироватки за допомогою ІФА (MercoDia No. 10-1106-01), аналіз олігонуклеотидів в тканині і плазмі (вміст лікарського засобу), екстракція зразків, стандартні зразки і зразки контролю якості, визначення вмісту олігонуклеотидів за допомогою ІФА.

Дані для сполук, направлених на PCSK9, приведені в наступній таблиці:

30

Значення для дози 2,5 мг/кг			Макс. вплив PCSK9 (дані позначають процент від значення перед дозуванням)	Макс. вплив X-ЛПВЩ (дані позначають процент від значення перед дозуванням)
Сполука SEQ ID	Білок PCSK9 доба 4 (процент від значення перед дозуванням)	Білок PCSK9 доба 29 (процент від значення перед дозуванням)		
10	86	71,5	69% (d15)	87% (d29)
13	81	71	71% (d29)	84% (d22)
18	57	42	42% (d29)	71% (d15)
21	80,5	56	55% (d29)	84% (d15)
20	51	53	48% (d4)	94% (D8)
19	55	60	55% (d4)	89% (D4)

Вказівки на гепатотоксичність або нефротоксичність при сполуках, направлених на PCSK9, були відсутні. Слід зазначити, що сполуки PCSK9-GaINAc призводили до швидкої і високоефективної знижуючої регуляції PCSK9, яка підтримувалася протягом тривалого періоду часу (вся тривалість дослідження), ілюструючи, що сполуки, кон'юговані з GaINAc, ефективніші, як відносно швидкого початкового нокдауну, так і відносно тривалого періоду, що вказує на те, що їх можна дозувати порівняно нечасто і в нижчій дозі, як в порівнянні з некон'югованими початковими сполуками, так і в порівнянні із сполуками, одержаними з використанням альтернативної технології кон'югації, такий як кон'югація з холестерином. SEQ ID NO 18 призводила до швидкої і узгодженої знижуючої регуляції PCSK9 і X-ЛПВЩ упродовж усього дослідження (спостережуваною на добу 34 при дозі 2,5 мг/кг при значній знижуючій регуляції PCSK9, спостережуваній через 48 діб після введення одноразової дози 2,5 мг/кг, де рівень білка PCSK9 в плазмі складав 71% від рівня перед дозуванням).

Приклад 5: Оцінка печінкової і ниркової токсичності у щурів

Сполуки за винаходом можна оцінювати на їх профіль токсичності у гризунів, наприклад, у мишей або щурів. Можна використовувати наведений нижче протокол. Використовували самців щурів лінії Wistar Han Crl: WI(Han) у віці приблизно 8 тижнів. У цьому віці самці важили приблизно 250 г. Усі тварини мали вільний доступ до гранульованого збалансованого корму SSNIFF R/M-H (SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Зост, Німеччина) і до проточної води (профільтрованої через фільтр 0,22 мкм), що міститься в пляшках. Використовували рівень дози 10 і 40 мг/кг/доза (підшкірне введення) і дозували на добу 1 і 8. Тварин піддавали евтаназії на добу 15. Зразки сечі і крові збирали на добу 7 і 14. Обстеження на клінічну патологію проводили на добу 14. Масу тіла визначають перед дослідженням, на першу добу введення і за 1 тиждень до аутопсії. Споживання їжі на групу визначали щодоби. Зразки крові брали з хвостової вени після 6 годин голодування. Проводили наступний аналіз зразків крові: кількість еритроцитів, середній об'єм еритроцитів, об'єм обложених еритроцитів, гемоглобін, середня концентрація гемоглобіну в клітині, кількість тромбоцитів, кількість лейкоцитів, диференціальна кількість лейкоцитів з морфологією клітини, кількість ретикулоцитів, натрій, калій, хлорид, кальцій, неорганічний фосфор, глюкоза, сечовина, креатинін, загальний білірубін, загальний холестерин, тригліцериди, лужна фосфатаза, аланінамінотрансфераза, аспаратамінотрансфераза, загальний білок, альбумін, відношення альбумін/глобулін. Проводили аналіз сечі: α -глутатіон-S трансфераза (GST), β -2 мікроглобулін, кальбіндин, кластерин, цистатин С, KIM-1, остеопонтин, тканинний інгібітор металлопротеїназ (TIMP; Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1), фактор росту ендотелію судів (VEGF; vascular endothelial growth factor) і нейтрофільний желатиназо-асоційований ліпокалін (NGAL; neutrophil gelatinase-associated lipocalin). Сім аналітів (кальбіндин, кластерин, GST- α , KIM-1, остеопонтин, TIMP- 1, VEGF) кількісно визначали на панелі 1 (панель 1 ниркової токсичності у щурів на магнітних мікроносіях MILLIPLEX® MAP, RKTX1MAG-37K). Три аналіти (β -2 мікроглобулін, цистатин С, ліпокалін-2/NGAL) кількісно визначали на панелі 2 (панель 2 ниркової токсичності у щурів на магнітних мікроносіях MILLIPLEX® MAP, RKTX1MAG-37K). Аналіз на визначення концентрації цих біомаркерів в сечі щурів була заснована на технології Luminex xMAP®. Мікроносії, покриті антитілами проти α -GST/ β -2 мікроглобуліну/кальбіндину/кластерину/цистатину С/KIM-1/остеопонтину/TIMP-1/VEGF/NGAL, кодували за кольором двома різними флуоресцентними

барвниками. Визначали такі параметри (сеча з використанням ADVIA +1650): Білок в сечі, креатинін в сечі. Кількісні параметри: об'єм, рН (з використанням тестерних смужок 10-Multistix SG/аналізатора сечі Clinitek 500), питома щільність (з використанням рефрактометра). Напівкількісні параметри (з використанням тестових смужок 10 - Multistix SG/аналізатора сечі Clinitek 500): білки, глюкоза, кетон, білірубін, нітрил, кров, уробіліноген, цитологія осаду (за допомогою мікроскопічного дослідження). Якісні параметри: зовнішній вигляд, колір. Після умертвіння визначають масу тіла і масу нирок, печінки і селезінки і обчислюють відношення маси тіла до маси органів. Зразки нирок і печінки брали і або заморожували, або зберігали у формаліні. Проводили мікроскопічний аналіз. Дані для експресії Kim-1 показані на Фіг. 15, де продемонстровано, що всі молекули за винятком SEQ ID NO 4 мають нижчий сигнал kim - 1 в сечі, ніж SEQ ID NO 1, що демонструє нижчу ниркову недостатність в порівнянні з оригінальною і раніше охарактеризованою некон'югованою молекулою.

Приклад 6. Аналіз розщеплюваних лінкерів

Антисмислові олігомери (АСО), мічені FAM, з різними лінкерами ДНК/РО піддавали розщеплюванню *in vitro*, або в нуклеазному екстракті S1 (таблиця нижче), або в гомогенатах печінки або нирок, або в сироватці.

№	Seq (5'-3')	Розщеплюваний лінкер (B)	Кон'югат (C)
35	GCattggtatTCA	3РО-ДНК (5'tca3')	FAM
36	GCattggtatTCA	2РО-ДНК (5'ca3')	FAM
37	GCattggtatTCA	1РО-ДНК (5'a3')	FAM
38	GCattggtatTCA	3РО-ДНК (5'gac3')	FAM
39	GCattggtatTCA	Немає	FAM

Заголовні букви є нуклеозидами ЗНК (такими як бета-D-окси ЗНК), рядкові букви є нуклеозидами ДНК. Нижній індекс s є фосфоротіоатними міжнуклеозидними зв'язками. Цитозини ЗНК необов'язково є 5-метил цитозином. Кон'югатне угруповання FAM показане на Фіг. 6, і молекули показані на Фіг. 7.

Мічені FAM АСО 100 мкМ з різними лінкерами ДНК/РО піддавали розщеплюванню *in vitro* нуклеазою S1 в нуклеазному буфері (60 од. на 100 мкл) протягом 20 і 120 хвилин (А). Ферментативну активність зупиняли додаванням етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА) в буферному розчині. Потім розчини піддавали аналізу за допомогою ВЕРХ АІЕ на приладі Dionex Ultimate 3000, використовуючи колонку Dionex DNArac p-100 і градієнт в діапазоні від 10 мМ до 1 М перхлорату натрію при рН 7,5. Вміст розщеплених і нерозщеплених олігонуклеотидів визначали проти стандарту, використовуючи обидва детектори, детектор флуоресценції при 615 нм і детектор УФ при 260 нм.

SEQ ID NO	Лінкерна послідовність	% розщеплення після 20 хв з S1	% розщеплення після 120 хв з S1
39	--	2	5
37	a	29,1	100
36	ca	40,8	100
35	tca	74,2	100
38	gac	22,9	НО

Висновок: Результатом включення лінкерів РО (або ділянки В, на яку посилаються в цьому документі) є відщеплення кон'югата (або групи С), і обидва параметри з довжини та/або послідовності композиції лінкера можна використовувати для модуляції чутливості до нуклеолітичного розщеплювання ділянки В. Послідовність лінкерів ДНК/РО може модулювати швидкість розщеплювання, що спостерігають після 20 хв в нуклеазному екстракті S1. Вибір послідовності для ділянки В (наприклад, для лінкера ДНК/РО) можна, таким чином, також використовувати для модуляції рівня розщеплювання в сироватці і в клітинах тканин-мішеней.

До гомогенатів печінки і нирок додавали точну кількість сполуки SEQ ID NO 35 до концентрацій 200 мкг/г тканини. Зразки печінки і нирок, зібрані від мишей NMRI, гомогенізували в буфері гомогенізації (0,5% Igepal CA - 630, 25 мМ Трис рН 8,0, 100 мМ NaCl, рН 8,0 (доведений 1 н. NaOH). Гомогенати інкубували протягом 24 годин при 37 °С, а потім гомогенати екстрагували фенолом - хлороформом. Вміст розщеплених і нерозщеплених олігонуклеотидів в екстракті з печінки і нирок і з сироватки визначали проти стандарту, використовуючи описаний вище спосіб ВЕРХ :

Seq ID	Лінкерна послідовність	% розщеплення після 24 г з гомогенатом печінки	% розщеплення після 24 г з гомогенатом нирки	% розщеплення після 24 г в сироватці
35	tca	83	95	0

Висновок: Результатом включення лінкерів PO (або ділянки B, на яку посилаються в цьому документі) є відщеплення кон'югата (або групи C) в гомогенаті печінці або нирок, але не в сироватці. Чутливість до розщеплювання в аналізах, показаних в прикладі 6, можна використовувати для визначення, чи є лінкер біорозщеплюваним або фізіологічно лабільним. Слід зазначити, що розщеплювання в описаних вище аналізах відноситься до розщеплювання розщеплюваного лінкера, при цьому олігомер або ділянка A повинні залишатися функціонально інтактним.

Приклад 7: Нокдаун мРНК PCSK9 кон'югатами холестерину in vivo
PCSK9 - Сполуки, специфічні для миші

№	Seq (5'-3') (A)	Розщеплюваний лінкер (B)	Кон'югат (C)
40	GTctgtggaagCG	немає	немає
41	GTctgtggaagCG	немає	Холестерин
42	GTctgtggaagCG	2PO-ДНК (5'ca3')	Холестерин
43	GTctgtggaagCG	2PO-ДНК (5'ct3')	Холестерин

Мишам NMRI ін'єктували одноразову дозу фізіологічного розчину, або 10 мг/кг некон'югованого антисмислового олігонуклеотиду ЗНК (SEQ ID 40), або еквівалентні кількості антисмислових олігонуклеотидів ЗНК, кон'югованих з холестерином з різними лінкерами і убивали на добу 1-10 відповідно до таблиці 5.

РНК виділяли з печінки і нирок і піддавали qПЛР з праймерами, специфічними до PCSK9, і зондом для аналізу нокдауну мРНК PCSK9. Результати показані на Фіг. 14.

Висновки: Холестерин, кон'югований з антисмисловим олігонуклеотидом ЗНК до PCSK9 з лінкером, що складається з 2 ДНК з фосфодієфірним каркасом (SEQ ID NO 42 і SEQ ID NO 43), показав підвищений нокдаун PCSK9 в печінці (Фіг. 14) в порівнянні з некон'югованою сполукою (SEQ ID NO 40), а також в порівнянні з кон'югатами холестерину із стабільним лінкером (SEQ ID NO 41).

Матеріали і методи:
Схема експерименту:

Час-типа	Група №	Тварина №	Кількість тварин	Види/стать/ харчування тварини	Рівень дози сполуки на добу	Конц. при об'ємі дози 10 мл/кг	Шлях введення	Доба дозування	Маса тіла, доба	Доба умертвіння
A	1	1-3	3	NMRI/♀/Сухий корм	Фізіологічний розчин	-	iv	0	0,1	1
	2	4-6	3	NMRI/♀/Сухий корм	SEQ ID NO 40 10 мг/кг	1 мг/мл	iv	0	0,1	1
	3	7-9	3	NMRI/♀/Сухий корм	SEQ ID NO 41 еквівалентно 11,3 мг/кг	1,13 мг/мл	iv	0	0,1	1
	4	13-15	3	NMRI/♀/Сухий корм	SEQ ID NO 42 еквівалентно 12,7 мг/кг	1,27 мг/мл	iv	0	0,1	1

Час- тина	Група №	Тварина №	Кількість тварин	Діяльність/ харчування тварини	Рівень доз сполуки на добу	Конц. при об'ємі дози 10 мл/кг	Шлях введення	Доба дозування	Маса тіла, доба	Доба умертвіння
B	6	16-18	3	NMRI/Сухий корм	SEQ ID NO 43 еквімолярно 12,7 мг/кг	1,27 мг/мл	iv	0	0,1	1
	7	19-21	3	NMRI/Сухий корм	фізіологічний розчин	-	iv	0	0,3	3
	8	22-24	3	NMRI/Сухий корм	SEQ ID NO 40 10 мг/кг	1 мг/мл	iv	0	0,3	3
	9	25-27	3	NMRI/Сухий корм	SEQ ID NO 41 еквімолярно 11,3 мг/кг	1,13 мг/мл	iv	0	0,5	3
	11	31-33	3	NMRI/Сухий корм	SEQ ID NO 42 еквімолярно 12,7 мг/кг	1,27 мг/мл	iv	0	0,3	3
	12	34-36	3	NMRI/Сухий корм	SEQ ID NO 43 еквімолярно 12,7 мг/кг	1,27 мг/мл	iv	0	0,3	3
C	13	37-39	3	NMRI/Сухий корм	фізіологічний розчин	-	iv	0	0,7	7
	14	40-42	3	NMRI/Сухий корм	SEQ ID NO 40 10 мг/кг	1 мг/мл	iv	0	0,7	7
	15	43-45	3	NMRI/Сухий корм	SEQ ID NO 41 еквімолярно 11,3 мг/кг	1,13 мг/мл	iv	0	0,7	7
	17	49-51	3	NMRI/Сухий корм	SEQ ID NO 42 еквімолярно 12,7 мг/кг	1,27 мг/мл	iv	0	0,7	7
	18	52-54	3	NMRI/Сухий корм	SEQ ID NO 43 еквімолярно 12,7 мг/кг	1,27 мг/мл	iv	0	0,7	7
	19	55-57	3	NMRI/Сухий корм	фізіологічний розчин	-	iv	0	0,7, 10	10
D	20	58-60	3	NMRI/Сухий корм	SEQ ID NO 40 10 мг/кг	1 мг/мл	iv	0	0,7, 10	10
	21	61-63	3	NMRI/Сухий корм	SEQ ID NO 41 еквімолярно 11,3 мг/кг	1,13 мг/мл	iv	0	0,7, 10	10
	24	70-72	3	NMRI/Сухий корм	SEQ ID NO 42 еквімолярно 12,7 мг/кг	1,27 мг/мл	iv	0	0,7, 10	10
	A	25	73-75	3	NMRI/Сухий корм	фізіологічний розчин	-	iv	0	0,1

Введення дози. Самицям тварин NMRI, приблизно 20 г після прибуття, дозували 10 мл на кг маси тіла (BW) (відповідно до маси тіла (bodyweight) на добу 0) внутрішньовенно (i.v.) сполуки, включеної у фізіологічний розчин, або одного фізіологічного розчину відповідно до наведеної вище таблиці.

Забирання зразків тканини печінки і нирок. Тварин анестезували 70% CO₂-30% O₂ і убивали цервикальною дислокацією відповідно до таблиці 4. Половину великої частки печінки і одну нирку подрібнювали і занурювали в розчин для стабілізації РНК RNAlater.

Сумарну РНК екстрагували з максимум 10 мг тканини, гомогенізованої за допомогою шарового млина у присутності буфера для виділення РНК з тканин MagNA Pure LC (Roche, № за каталогом 03 604 721 001), з використанням набору для виділення клітинної РНК великого об'єму MagNa Pure 96 (Roche, № за каталогом 5467535001) згідно з інструкціями виробника. Синтез першої нитки виконували, використовуючи реагенти для зворотної транскриптази від компанії Ambion згідно з інструкціями виробника.

Для кожного зразка 0,5 мкм сумарної РНК доводили до (10,8 мкл) H₂O, що не містить РНКаз, і змішували з 2 мкл випадкових декамерів (50 мкм) і 4 мкл суміші dNTP (2,5 мМ кожного dNTP) і нагрівали до 70 °C протягом 3 хв, після чого зразки швидко охолоджували на льоді. До кожного зразка додавали 2 мкл 10х буфера зворотної транскрипції (3Т), 1 мкл зворотної траскриптази MMLV (100 од./мкл) і 0,25 мкл інгібітору РНКаз (10 од./мкл) з наступною інкубацією при 42 °C протягом 60 хв, термічною інактивацією ферменту при 95 °C протягом 10 хв, а потім зразок охолоджували до 4 °C. Зразки кДНК розводили 1:5 і піддавали 3Т-қПЛР, використовуючи

основну універсальну суміш для швидкої ПЛР Taqman 2x (компанія Applied Biosystems № за каталогом 4364103) і аналіз експресії генів Taqman (mPCSK9, Mn00463738_m1 і mActin #4352341E), слідуючи протоколу виготівників, і проводили реакції в приладі компанії Applied Biosystems RT- qPCR (7500/7900 або ViiA7) в швидкому режимі.

5 Приклад 8: Дослідження на нелюдиноподібних приматах; багатократні підшкірні (s.c.) ін'єкції
 Мета цього дослідження на нелюдиноподібних приматах полягала в оцінці ефективності і безпеки сполук, направлених проти PCSK9, в умовах багатократного введення при введенні сполук шляхом підшкірної ін'єкції (s.c.). Сполуки, використовувані в цьому дослідженні, мали послідовності SEQ ID NO 2, 3, 18 і 19, приготовані в стерильному фізіологічному розчині (0,9%)
 10 при початковій концентрації 0,625 і 2,5 мг/мл.

Використовували самиць яванського макака у віці щонайменше 24 місяці і надавали їм вільний доступ до проточної води і розподіляли по 180 г збільшеного раціону MWM(E) SQC SHORT (Dietex France, SDS, Сен-Гратьєн, Франція) на тварину в добу. Крім того, кожній тварині щодоби давали фрукти або овочі. Тварин акліматизували до умов дослідження протягом
 15 періоду щонайменше 14 діб до початку експериментального періоду обробки. Протягом цього періоду проводили попередні дослідження. Тварин дозували s.c. один раз на тиждень протягом чотирьох тижнів в дозі 0,5 мг/кг (SEQ ID NO 2, 3, 18 і 19) або 1,5 мг/кг/ін'єкція (SEQ ID NO 18 і 19), сумарно чотири ін'єкції за період чотири тижні. Об'єм дози складав 0,4 мл/кг/ін'єкція. Використовували шість тварин на групу. Після четвертої і останньої дози тварин спостерігали
 20 протягом тижня, після чого половину тварин убивали з метою вивчення регуляції транскрипту ароВ в печінці, параметрів ліпідів, гістологічного дослідження печінки і нирок і тканинного розподілу в печінці і нирках. Доба 1 відповідає першій добі експериментального періоду. Клінічні спостереження, масу тіла і споживання їжі (на групу) реєстрували до і під час дослідження.

Зразки крові і тканин відбирали і аналізували в наступні моменти часу:

25

Доба дослідження	Параметри
-10	L, Аро-В, ОА
-5	LSB, L, Аро-В, ОА
-1	RCP, L, Аро-В, РК, ОА
1	Дозування
8 перед дозуванням	LSB, L, Аро-В, РК, ОА
8	Дозування
15 перед дозуванням	LSB, L, Аро-В, РК, ОА
15	Дозування
22 перед дозуванням	LSB, L, Аро-В, РК, ОА
22	Дозування
29	RCP, РК, ОА + основна аутопсія
36 (тварини, що видужали)	LSB, L, Аро-В, РК, ОА
43 (тварини, що видужали)	RCP, РК, Аро-В, РК, ОА
50 (тварини, що видужали)	LSB, L, Аро-В, РК, ОА
57 (тварини, що видужали)	LSB, L, Аро-В, РК, ОА
64 (тварини, що видужали)	LSB, L, Аро-В, РК, ОА
71 (тварини, що видужали)	LSB, L, Аро-В, РК, ОА
78 (тварини, що видужали)	RCP, L, Аро-В, РК, ОА + реабілітаційна аутопсія

RCP: стандартна клінічна патологія, LSB: біохімічні показники безпеки для печінки, РК: фармакокінетика, ОА: інші аналізи, L: ліпіди

30 Кров (приблизно 1,0 мл) брали в пробірки з літієм-гепарином (використовуючи біохімічний аналізатор крові ADVIA 1650): Аро-В, натрій, калій, хлорид, кальцій, неорганічний фосфор,

глюкоза, Х-ЛПВЩ, Х-ЛПНЩ, сечовина, креатинін, загальний білірубін, загальний холестерин, тригліцериди, лужна фосфатаза (ЛФ), аланінамінотрансфераза (АЛТ), аспартатамінотрансфераза (АСТ), креатинінкіназа, гамма-глутамілтрансфераза (ГГТ), лактатдегідрогеназа, загальний білок, альбумін, відношення альбумін/глобулін.

5 Аналіз крові: Зразки крові для аналізу АроВ брали тільки у тварин груп 1-16 (тобто тварин, оброблених сполуками, направленими проти АроВ) на добу -8, -1, 4, 8, 15, 22, 29, 36, 43 і 50. Венозну кров (приблизно 2 мл) збирали з відповідної вени у кожній тварини в пробірку для відділення сироватки (SST) і давали можливість згорнутися протягом щонайменше 60 ± 30 хвилин при кімнатній температурі. Кров центрифугували при 1000 g протягом 10 хвилин в умовах охолодження (встановлених на підтримку +4 °C). Сироватку переносили в 3 індивідуальних пробірці і зберігали при -80 °C до аналізу білка АроВ за допомогою ІФА.

10 Інший аналіз: В WO 2010142805 запропоновані способи наступного аналізу: qPLP, аналіз мРНК АроВ. Інші аналізи включають аналіз сироваткового Lp(a) за допомогою ІФА (Mergodia No. 10-1106-01), аналіз олігонуклеотиду в тканині і сироватці (вміст лікарського засобу), екстракцію зразків, стандартні зразки і зразки контролю якості, визначення вмісту олігонуклеотиду за допомогою ІФА.

15 Призначеною фармакологічною дією для олігонуклеотиду, направленою проти PCSK9, являється зниження холестерину ЛПНЩ шляхом зменшення вмісту PCSK9 в кровообігу ("PCSK 9 в сироватці"). Кон'юговані молекули GalNAc продемонстрували посилену ефективність в порівнянні з некон'югованими молекулами при дослідженні обох з PCSK9 в сироватці і холестерину ЛПНЩ (Фіг. 16 і Фіг. 17). На Фіг. 16 проілюстровано, що чотири щотижневі ін'єкції 0,5 мг/кг/ін'єкція некон'югованої SEQ ID NO 2 має лише незначні дії на PCSK9 в сироватці і холестерин ЛПНЩ, тоді як кон'югати з GalNAc того ж гепмера ЗНК (SEQ ID 18) мали сильну знижуючу дію на обидва з PCSK9 в сироватці і холестерину ЛПНЩ. Таке ж співвідношення було відмічене при порівнянні даних для багатократних ін'єкцій SEQ ID NO 3 і SEQ ID NO 19 (Фіг. 17): лише незначні дії некон'югованої молекули і сильна знижуюча регуляція PCSK9 і холестерину ЛПНЩ в сироватці відповідним кон'югатом GalNAc (SEQ ID NO 19). Слід зазначити, що дія SEQ ID 18 і 19 на PCSK9 в сироватці і холестерину ЛПНЩ була дозозалежною при великій тривалості дії, при цьому рівні PCSK9 в сироватці і холестерину ЛПНЩ були нижче за середні базові рівні протягом щонайменше семи тижнів після останньої ін'єкції (остання ін'єкція на добу 22, дані проілюстровані для відновного періоду аж до доби 71).

20 Вміст олігонуклеотидів в печінці і нирках аналізували через один тиждень після останньої ін'єкції, тобто на добу 29 досліджень. Вміст олігонуклеотидів аналізували, використовуючи ІФА з гібридизацією (по суті, як описано в статті Lindholm et al, Mol Ther. 2012 Feb; 20(2): 376-81), використовуючи SEQ ID NO 2 для одержання стандартної кривої для зразків від тварин, оброблених SEQ ID NO 2 і SEQ ID NO 18, після контролю, що зміни в результатах не відбувається, якщо для одержання стандартної кривої використовують (кон'юговану) SEQ ID NO 18. Таким же шляхом використовували SEQ ID NO 3 для одержання стандартної кривої для SEQ ID NO 3 і SEQ ID NO 19 після контролю відсутності відмінності результатів при використанні SEQ ID NO 19 для одержання стандартної кривої для аналізу ІФА цих зразків.

Вміст олігонуклеотидів в тканинах через один тиждень після останньої ін'єкції					
	Печінка		Нирка		Відношення печінка/нирка
	(мг олігонуклеотиду/г свіжої тканини)		(мг олігонуклеотиду/г свіжої тканини)		
	Середнє	SD	Середнє	SD	
SEQ ID NO 2, 4x0,5 мг/кг	0,260	0,14	30,3	4,8	0,008
SEQ ID NO 18, 4x0,5 мг/кг	3,57	0,61	11,5	2,5	0,310
SEQ ID NO 18, 4x1,5 мг/кг	18,8	1,7	26,8	6,6	0,701
SEQ ID NO 3, 4x0,5 мг/кг	0,149	0,059	38,2	0,72	0,004
SEQ ID NO 19, 4x0,5 мг/кг	2,72	0,69	16,3	1,5	0,167
SEQ ID NO 19, 4x1,5 мг/кг	12,2	3,44	41,2	6,5	0,296

45 Як проілюстровано в таблиці вище, кон'югація SEQ ID NO 2 і SEQ ID NO 3 призводила в результаті до більш високих відношень печінка/нирка для кон'югованих молекул (SEQ ID NO 18 і

SEQ ID 19), ніж для відповідних некон'югованих молекул через один тиждень після останньої ін'єкції, коли тварин ін'єктували s.c. один раз на тиждень протягом чотирьох тижнів. З урахуванням того, що ознаки тубулотоксичності продемонстровані з іншими некон'югованими молекулами, направленими проти PCSK9 (такими як SEQ ID NO 1, як проілюстровано на Фіг. 5 15), і з урахуванням того, що печінка є органом-мішенню для лікування, направлено проти PCSK9, чекають, що зрушення до більш високого відношення печінка/нирки приведе в результаті до підвищеної безпеки кон'югованих SEQ ID NO 18 і 19 в порівнянні з некон'югованими SEQ ID NO 2 і 3.

10 Як проілюстровано на Фіг. 16 і Фіг. 18, SEQ ID NO 18 і 19 дозували при фармакологічно релевантних рівнях. Профілі клінічної хімії одних і тих же тварин протягом експериментального періоду і фази одужання продемонстрували відсутність релевантного підвищення параметрів безпеки в печінці або нирках.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Santaris Pharma A/S
 <120> АНТИСМИСЛОВІ ОЛІГОМЕРИ ТА ЇХ КОН'ЮГАТИ, НАПРАВЛЕНІ НА ПРОПРОТЕЇН КОНВЕРТАЗУ СУБТИЛІЗИН/КЕКСИН ТИПУ 9 (PSCSK9)
 <130> 1141WO
 <160> 46
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 14
 <212> ДНК
 <213> ШТУЧНА
 <220>
 <223> LNA антисмисловий гелмерний олігонуклеотид
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(14)
 <223> фосфоротіатні міжнуклеозидні зв'язки
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> LNA нуклеозиди, LNA C позначають 5-метил C
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(14)
 <223> LNA нуклеозиди, LNA C позначають 5-метил C
 <400> 1
 tgctacaavaa ccca 14
 <210> 2
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> ШТУЧНА
 <220>
 <223> LNA антисмисловий гелмерний олігонуклеотид
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> фосфоротіатні міжнуклеозидні зв'язки
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> LNA нуклеозиди
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(16)
 <223> LNA нуклеозиди, LNA C позначають 5-метил C
 <400> 2
 aatgctaca aaccca 16
 <210> 3
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> ШТУЧНА
 <220>
 <223> LNA антисмисловий гелмерний олігонуклеотид
 <220>

```

<221> misc_feature
<222> (3)..(16)
<223> фосфоротіатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> LNA нуклеозиди

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(16)
<223> LNA нуклеозиди, LNA C позначають 5-метил C

<400> 3
aatgctacaa aaccsa                                     16

<210> 4
<211> 15
<212> ДНК
<213> ШТУЧНА

<220>
<223> LNA антисмисловий гелмерний олігонуклеотид

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(15)
<223> фосфоротіатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> LNA нуклеозиди, LNA C позначають 5-метил C

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> LNA нуклеозиди

<400> 4
gctgtgtgag cttgg                                     15

<210> 5
<211> 16
<212> ДНК
<213> ШТУЧНА

<220>
<223> LNA антисмисловий гелмерний олігонуклеотид

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> LNA нуклеозиди

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(16)
<223> фосфоротіатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(16)
<223> LNA нуклеозиди
<400> 5
tgctgtgtga ccttgg                                     16

<210> 6
<211> 16
<212> ДНК
<213> ШТУЧНА

<220>
<223> LNA антисмисловий гелмерний олігонуклеотид

```

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> фосфоротіоатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> LNA нуклеозиди, LNA C позначають 5-метил C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> LNA нуклеозиди
 <400> 6
 tgctgtgtga gcttgg 16

<210> 7
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> ШТУЧНА
 <220>
 <223> LNA антисмисловий гепмерний олігонуклеотид

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> фосфоротіоатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> LNA нуклеозиди, LNA C позначають 5-метил C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> LNA нуклеозиди, LNA C позначають 5-метил C
 <400> 7
 tcctggtctg tgttcc 16

<210> 8
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> ШТУЧНА
 <220>
 <223> LNA антисмисловий гепмерний олігонуклеотид

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> фосфоротіоатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> LNA нуклеозиди, LNA C позначають 5-метил C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(16)
 <223> LNA нуклеозиди, LNA C позначають 5-метил C
 <400> 8
 tcctggtctg tgttcc 16

<210> 9
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> ШТУЧНА
 <220>
 <223> кон'югат LNA антисмислового гепмерного олігонуклеотиду

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> холестерин-С6

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> фосфодієфірні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(16)
 <223> фосфоротіоатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

<400> 9
 catgctacaа аассса 16

<210> 10
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> ШТУЧНА

<220>
 <223> кон'югат LNA антисмислового гепмерного олігонуклеотиду

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> холестерин-С6

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> фосфодієфірні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(18)
 <223> фосфоротіоатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> LNA нуклеозиди

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(18)
 <223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

<400> 10
 caaatgctac ааассса 18

<210> 11
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> ШТУЧНА

<220>
 <223> кон'югат LNA антисмислового гепмерного олігонуклеотиду

<220>

<221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> холестерин-С6

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> фосфодієфірні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(18)
 <223> фосфоротікатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> LNA нуклеозиди

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(18)
 <223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

<400> 11
 caaatgctac aaaaccca 18

<210> 12
 <211> 17
 <212> ДНК
 <213> ШТУЧНА

<220>
 <223> кон'югат LNA антисмислового гевмерного олігонуклеотиду

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> холестерин-С6

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> фосфодієфірні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(17)
 <223> фосфоротікатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(4)
 <223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> LNA нуклеозиди

<400> 12
 cagctgtgtg agcttgg 17

<210> 13
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> ШТУЧНА

<220>
 <223> кон'югат LNA антисмислового гевмерного олігонуклеотиду

<220>
 <221> misc_feature

```

<222> (1)..(1)
<223> холестерин-С6

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> фосфодієфірні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(4)
<223> LNA нуклеозиди

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(18)
<223> фосфоротіоатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(18)
<223> LNA нуклеозиди
<400> 13
catgctgtgt gagcttgg

```

18

```

<210> 14
<211> 18
<212> ДНК
<213> ШТУЧНА

<220>
<223> кон'югат LNA антисмислового гелмерного олігонуклеотиду

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> холестерин-С6

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> фосфодієфірні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(18)
<223> фосфоротіоатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(5)
<223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(18)
<223> LNA нуклеозиди
<400> 14
catgctgtgt gagcttgg

```

18

```

<210> 15
<211> 18
<212> ДНК
<213> ШТУЧНА

<220>
<223> кон'югат LNA антисмислового гелмерного олігонуклеотиду

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> холестерин-С6

<220>
<221> misc_feature

```

<222> (1)..(2)
 <223> фосфодієфірні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(18)
 <223> фосфоротіоатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(18)
 <223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

<400> 15
 catcctggtc tgtgttcc 18

<210> 16
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> ШТУЧНА

<220>
 <223> кон'югат LNA антисмислового гепмерного олігонуклеотиду

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> холестерин-C6

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> фосфодієфірні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(18)
 <223> фосфоротіоатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

<400> 16
 catcctggtc tgtgttcc 18

<210> 17
 <211> 14
 <212> ДНК
 <213> ШТУЧНА

<220>
 <223> кон'югат LNA антисмислового гепмерного олігонуклеотиду

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> GalNAc Conj2a

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(14)
 <223> фосфоротіоатні міжнуклеозидні зв'язки
 <220>

<221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(14)
 <223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

 <400> 17
 tgctacaааа ccca 14

 <210> 18
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> ШТУЧНА

 <220>
 <223> кон'югат LNA антисмислового гепмерного олігонуклеотиду

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> GalNAc Conj2a

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> фосфоротіатні міжнуклеозидні зв'язки

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> LNA нуклеозиди

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(16)
 <223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

 <400> 18
 aatgctacaа аaccса 16

 <210> 19
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> ШТУЧНА
 <220>
 <223> кон'югат LNA антисмислового гепмерного олігонуклеотиду

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> GalNAc Conj2a

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> фосфоротіатні міжнуклеозидні зв'язки

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> LNA нуклеозиди

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

 <400> 19
 aatgctacaа аaccса 16

<210> 20
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> ШТУЧНА

<220>
 <223> кон'югат LNA антисмислового гепмерного олігонуклеотиду

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> GalNAc Conj2a

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(15)
 <223> фосфоротіатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> LNA нуклеозиди

<400> 20
 gctgtgtgag cttgg

15

<210> 21
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> ШТУЧНА

<220>
 <223> кон'югат LNA антисмислового гепмерного олігонуклеотиду

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> GalNAc Conj2a

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> LNA нуклеозиди

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> фосфоротіатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> LNA нуклеозиди

<400> 21
 tgctgtgtga gcttgg

16

<210> 22
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> ШТУЧНА

<220>
 <223> кон'югат LNA антисмислового гепмерного олігонуклеотиду

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> GalNAc Conj2a

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(16)
<223> фосфоротіоатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(16)
<223> LNA нуклеозиди

<400> 22
tgctgtgtga gcttgg 16

<210> 29
<211> 16
<212> ДНК
<213> ШТУЧНА

<220>
<223> кон'югат LNA антисмислового гепмерного олігонуклеотиду

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> GalNAc Conj2a

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(16)
<223> фосфоротіоатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(16)
<223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

<400> 23
tcctggctctg tgttcc 16

<210> 24
<211> 16
<212> ДНК
<213> ШТУЧНА

<220>
<223> кон'югат LNA антисмислового гепмерного олігонуклеотиду

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> GalNAc Conj2a

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(16)
<223> фосфоротіоатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

<220>
<221> misc_feature

```

<222> (15)..(16)
 <223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C
 <400> 24
 tcctggtctg tgttcc 16
 <210> 25
 <211> 14
 <212> ДНК
 <213> штучна последовательность
 <220>
 <223> мотив нуклеїнової основи
 <400> 25
 tgctacaааа ссса 14
 <210> 26
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> штучна
 <220>
 <223> мотив нуклеїнової основи
 <400> 26
 aatgctacaа ассса 16
 <210> 27
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> штучна
 <220>
 <223> мотив нуклеїнової основи
 <400> 27
 gctgtgtgag cttgg 15
 <210> 28
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> штучна
 <220>
 <223> мотив нуклеїнової основи
 <400> 28
 tgctgtgtga gcttgg 16
 <210> 29
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> штучна
 <220>
 <223> мотив нуклеїнової основи
 <400> 29
 tcctggtctg tgttcc 16
 <210> 30
 <211> 14
 <212> РНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 30
 ugggiiiiuu agca 14
 <210> 31
 <211> 16
 <212> РНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 31
 ugggiiiiuu agcauu 16

<210> 32
 <211> 15
 <212> РНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 32
 ccaagcscac acagc 15

 <210> 33
 <211> 16
 <212> РНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 33
 ccaagcscac acagca 16

 <210> 34
 <211> 16
 <212> РНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 34
 ggaacacaga ccagga 16

 <210> 35
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> ШТУЧНА

 <220>
 <223> кон'югат LNA антисмыслового гелмерного олігонуклеотиду

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> фосфоротіатні міжнуклеозидні зв'язки

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> FAM кон'югат

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(16)
 <223> фосфоротіатні міжнуклеозидні зв'язки

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(5)
 <223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

 <400> 35
 tcagcatgg tattca 16

 <210> 36
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> ШТУЧНА

 <220>
 <223> кон'югат LNA антисмыслового гелмерного олігонуклеотиду

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> фосфодієфірні міжнуклеозидні зв'язки

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> FAM кон'югат

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(15)
<223> фосфоротіоатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(4)
<223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(15)
<223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

<400> 36
cagcattggg attca
15

<210> 37
<211> 14
<212> ДНК
<213> ШТУЧНА

<220>
<223> кон'югат LNA антисмыслового гепмерного олігонуклеотиду

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> фосфодіефірні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> FAM кон'югат

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(14)
<223> фосфоротіоатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(14)
<223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

<400> 37
agcattggta ttca
14

<210> 38
<211> 16
<212> ДНК
<213> ШТУЧНА

<220>
<223> кон'югат LNA антисмыслового гепмерного олігонуклеотиду

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> фосфодіефірні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
<221> misc_feature

```

```

<222> (1)..(1)
<223> FAM кон'югат

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(16)
<223> фосфоротіоатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(5)
<223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(16)
<223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

<400> 38
gacgcattgg tattca 16

<210> 39
<211> 13
<212> ДНК
<213> ШТУЧНА

<220>
<223> кон'югат LNA антисмислового гепмерного олігонуклеотиду

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(13)
<223> фосфоротіоатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> FAM кон'югат

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(13)
<223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

<400> 39
gcattggtat tca 13

<210> 40
<211> 13
<212> ДНК
<213> ШТУЧНА

<220>
<223> LNA антисмисловий гепмерний олігонуклеотид

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(13)
<223> фосфоротіоатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> LNA нуклеозиди

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(13)
<223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

```

<400> 40
gtctgtggaа gсg 13

<210> 41
<211> 13
<212> ДНК
<213> ШТУЧНА

<220>
<223> кон'югат LNA антисмыслового гепмерного олігонуклеотиду

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> холестерин-С6

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(13)
<223> фосфоротіоатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> LNA нуклеозиди

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(13)
<223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

<400> 41
gtctgtggaа gсg 13

<210> 42
<211> 15
<212> ДНК
<213> ШТУЧНА

<220>
<223> кон'югат LNA антисмыслового гепмерного олігонуклеотиду

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> холестерин-С6

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> фосфодіефірні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(4)
<223> LNA нуклеозиди

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(15)
<223> фосфоротіоатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(15)
<223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

<400> 42
cagtctgtgg aagcg 15

<210> 43
<211> 15
<212> ДНК
<213> ШТУЧНА
<220>

<223> кон'югат LNA антисмислового генерного олігонуклеотиду

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> холестерин-сб

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> фосфодієфірні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(4)
 <223> LNA нуклеозиди

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(15)
 <223> фосфоротіоатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(15)
 <223> LNA нуклеозиди, LNA C позначає 5-метил C

<400> 43
 ctgtctgtgg aagcg 15

<210> 44
 <211> 13
 <212> ДНК
 <213> ШТУЧНА

<220>
 <223> мотив нуклеїнової основи

<400> 44
 gtctgtggaa gcg 13

<210> 45
 <211> 13
 <212> РНК
 <213> Homo sapiens

<400> 45
 cgcuuccaca gac 13

<210> 46
 <211> 3731
 <212> ДНК
 <213> homo sapiens

<400> 46

gtccgatggg gctctgggtgg cgtgatctgc ggcgccccagg cgtcaagcac ccacacccta 60

gaaggrttcc gcagcgacgt cgaggegetc atggttgcag gcggggcgccg ccgttcagtt 120

cagggtctga gectggagga gtgagccagg cagtgagact ggctcgggcy ggccgggacg 180

cgtcgttgca gcagcggctc ccagctccca gccaggatc cgcgcgccc ttcaecgccc 240

ctgctctga acttcagctc ctgcacagtc ctcccaccg caaggetcaa ggcgcggccc 300

gcgtggaccg cgcacggcct etaggtctcc tcgccaggac agcaacctct cccctggccc 360

tcatgggcac cgtcagctcc aggcggctct ggtggccgct gccactgctg ctgctgctgc 420

tgctgctctt gggctcccgcg ggcgcggctg cgcaggagga cgaggacggc gactacgagg 480

agctgggtgct agccttgcgt tccgaggagg acgycctggc cgaagcacc c gagcacggaa 540
 ccacagccac ctccaccgc tgcgcccaagg atccgtggag gttgccctggc acctacgtgg 600
 tgggtgctgaa gtaggagacc cacctcttgc agtcagagcg cactgcccgc cgctgcagg 660
 cccaggctgc ccgccgggga tacctcacca agatcctgca tgccttccat ggcttcttc 720
 ctggcttccct ggtgaagatg agtggcgacc tgcctggagct ggcttgaag ttgccccatg 780
 tcgactacat cgaggaggac tcctctgtct ttgcccagag catcccgtgg aacctggagc 840
 ggattacccc tccacggatc cgggcggatg aataccagcc ccccgcgga ggcagcctgg 900
 tggagggtgta tctcctagac accagcatac agagtgaeca cgggaaatc gagggcaggg 960
 tcatggtaac cgacttcgag aatgtgcccg aggaggacgg gacctcttc cacagacagg 1020
 ccagcaagtg tgacagtcac ggcacccacc tggcaggggt ggtcagcggc cgggatgccg 1080
 gcgtggccaa gggtgccagc atgcccagcc tgcgctgct caactgccaa gggaaaggca 1140
 cggttagcgg caccctcata ggcctggagt ttattcggaa aagccagctg gtcagcctg 1200
 tggggccact ggtggtgctg ctgccctgg cgggtgggta cagccgcgtc ctcaacgccg 1260
 cctgccagcg cctggcgagg gctggggctg tgcctggcac cgtgcctggc aacttccggg 1320
 acgatgcctg cctctactcc ccagcctcag ctcccagggt cctcacagtt ggggccacca 1380
 atgcccaga ccagccggtg accctgggga ctttggggac caactttggc cgtgtgtgg 1440
 acctctttgc cccaggggag gacatcattg gtgcctccag cgactgcagc acctgctttg 1500
 tgtcacagag tgggacatca caggctgctg cccacgtggc tggcattgca gccatgatgc 1560
 tgcttctga gccggagctc accctggccg agttgaggca gagactgatc cacttctctg 1620
 ccaaagatgt catcaatgag gcttggctcc ctgaggacca gccgggtactg acccccaccc 1680
 tgggtggccgc cctgcccccc agcaeccatg gggcaggttg gcagctgttt tgcaggactg 1740
 tatggtcagc acactcgggg cctacacgga tggccacagc cgtgcctcgc tgcgccccag 1800
 atgaggagct gctgagctgc tccagtttct ccaggagtgg gaagcggcgg ggcgagcgca 1860
 tggaggccca agggggcaag ctgggtctgcc gggcccacaa cgcttttggg ggtgagggtg 1920
 tctacgccat tgcagggtgc tgcctgctac cccaggccaa ctgcagcgtc cacacagctc 1980
 caccagctga ggcagcatg gggaccctg tccactgcca ccaacagggc cactctctca 2040
 caggctgcag ctcccactgg gagggtggagg accttggcac ccacaagccg cctgtgctga 2100
 ggccacgagg tcagcccaac cagtgcgtgg gccacagggg ggcagcctc cacttctct 2160
 gctgccatgc cccaggtctg gaatgcaaag tcaaggagca tggaaatccc gccctcagg 2220
 agcaggtgac cgtggcctgc gaggagggtt ggacctgac tggctgcagt gccctcctg 2280
 ggacctcca cgtcctgggg gcctacgccg tagacaacac gtgtgtagtc aggagccggg 2340
 acgtcagcac tacaggcagc accagcgaag gggcctgac agccgttgc atctgctgcc 2400
 ggagccggca cctggcgag gcctccagg agctccagt acagcccat cccaggatgg 2460
 gtgtctgggg aggtcaagg gctgggctg agcttataaa tggttccgac ttgtccctct 2520
 ctccagcctc catggcctgg cacgagggga tggggatgct tccgccttc cggggctgct 2580
 ggctggccc ttgagtgggg cagcctcctt gcctggaact cactcactct ggggtcctcc 2640
 tccccagggt gaggtgccag gaagctccct ccttcactgt ggggcatttc accattcaaa 2700

```

caggctcagat tgtgctcggg tgetgccagc tgctcccaat gtgccgatgt ccgtgggcag 2760
aargactttt attgagctct tgttccgtgc caggcattca atcctcaggt ctccaccaag 2820
gaggcaggat tcttcccatg gataggggag ggggcggtag gggctgcagg gacaaacatc 2880
gttggggggg gaggtgaaa ggtgctgatg gccttcctct ccagctaact gtggagaagc 2940
ccctgggggc tccctgatta atggaggctt agctttcttg atggcatcta gccagagget 3000
ggagacaggt gcgcccctgg tggtcacagc ctgtgccttg gtttccctgag ccacctttac 3060
tctgctctat gccaggctgt gctagcaaca cccaagggtg gcctgcgggg agccatcacc 3120
taggactgac tcggcagtgt gcagtggtgc atgcactgtc tcagccaacc cgtcccacta 3180
cccggcaggg tacacattcg caccctact tcacagagga agaaacctgg aaccagaggg 3240
ggctgtcctg ccaagctcac acagcaggaa ctgagccaga aacgcagatt gggctggctc 3300
tgaagccaag cctcttctta cttcaccggg ctgggtcctt ctttttaccy ggtaacagtg 3360
aggctgggaa ggggaacaca gaccaggaag ctcggtgagt gatggcagaa cgtatgcctgc 3420
aggcatgaa cttttccgt tatcaccag gcctgattca ctggcctggc ggagatgctt 3480
ctaaggcatg gtcgggggag agggccaaca actgtccctc cttgagcacc agccccacc 3540
aagcaagcag acatttatct tttgggtctg tctctctgt tgcttttta cagccaactt 3600
ttctagacct gttttgcttt tgaacttga agatattat tctgggtttt gtagcatitt 3660
tattaatatg gtgactttt aaaataaaaa caaacaaacg ttgtcctaac aaaaaaaaaa 3720
aaaaaaaaa a 3731

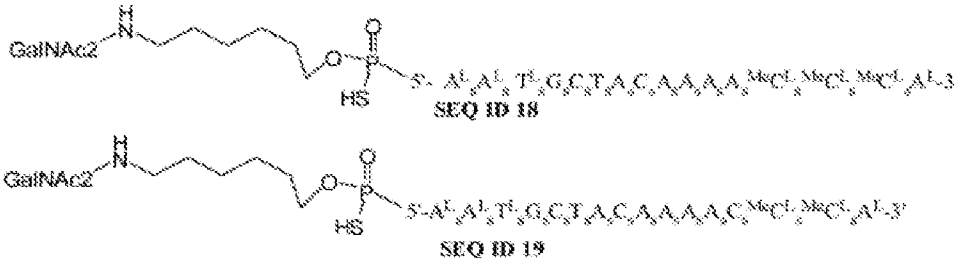
```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Кон'югат антисмислового олігонуклеотиду, який містить:
 - a) антисмисловий олігомер (A) з 16-20 нуклеотидів в довжину, який містить безперервну послідовність з 16 нуклеотидів, комплементарну відповідному відрізу довжини SEQ ID NO: 31, і де зазначений антисмисловий олігомер являє собою LNA гепмер, і
 - b) щонайменше одне кон'югатне угруповання (C), направлене на рецептор асіалоглікопротеїнів, ковалентно приєднане до олігомера (A).
- 10 2. Кон'югат олігонуклеотиду за п. 1, де послідовність антисмислового олігомера (A) містить безперервну послідовність SEQ ID NO: 26.
3. Кон'югат олігонуклеотиду за будь-яким з пп. 1 або 2, де послідовність антисмислового олігомера (A) містить безперервну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 15 2 і 3.
4. Кон'югат олігонуклеотиду за будь-яким з пп. 1-3, де кон'югатне угруповання (C) включає N-ацетилгалактозамін (GalNAc) угруповання.
5. Кон'югат антисмислового олігонуклеотиду за будь-яким з п.п. 1-4, де кон'югатне угруповання (C) містить тривалентне GalNAc угруповання.
- 20 6. Кон'югат антисмислового олігонуклеотиду за п. 5, де три групи GalNAc угруповань приєднані до точки розгалуження, що являє собою ділізин, за допомогою поліетиленгліколевих (ПЕГ) спейсерів.
7. Кон'югат антисмислового олігонуклеотиду за будь-яким з пп. 1-6, вибраний з групи, що складається з SEQ ID NO: 18 і 19.
- 25 8. Кон'югат антисмислового олігонуклеотиду за будь-яким з пп. 1-7, де антисмисловий олігомер (A) кон'югований з кон'югатним угрупованням (C) за допомогою лінкерної ділянки, розташованої між безперервною послідовністю олігомера і кон'югатним угрупованням.
9. Кон'югат антисмислового олігонуклеотиду за п. 8, де лінкер вибраний з C₆-C₁₂аміноалкільних груп або біорозщеплюваного нуклеотидфосфатного лінкера, що містить від 1 до 6 нуклеотидів.
- 30 10. Кон'югат антисмислового олігонуклеотиду за будь-яким з пп. 1-9, де безперервна послідовність містить аналоги нуклеотидів, що посилюють спорідненість.
11. Кон'югат антисмислового олігонуклеотиду за п. 10, де зазначені аналоги нуклеотидів є нуклеотидами з модифікованим цукром, незалежно або залежно вибрані з групи, що складається з ланок замкненої нуклеїнової кислоти (ЗНК); ланок 2'-О-алкіл-РНК, ланок 2'-ОМе-РНК, ланок 2'-аміно-ДНК і ланок 2'-фтор-ДНК.
- 35

12. Кон'югат антисмислового олігонуклеотиду за будь-яким з пп. 1-11, де олігомер містить один або більше нуклеозидних зв'язків, вибраних з групи, що складається з фосфоротіоатного, фосфородитіоатного і боранофосфатного.

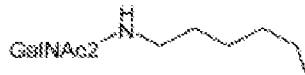
13. Кон'югат антисмислового олігонуклеотиду за п. 1, де кон'югат олігонуклеотиду складається з SEQ ID NO: 18 або SEQ ID NO: 19



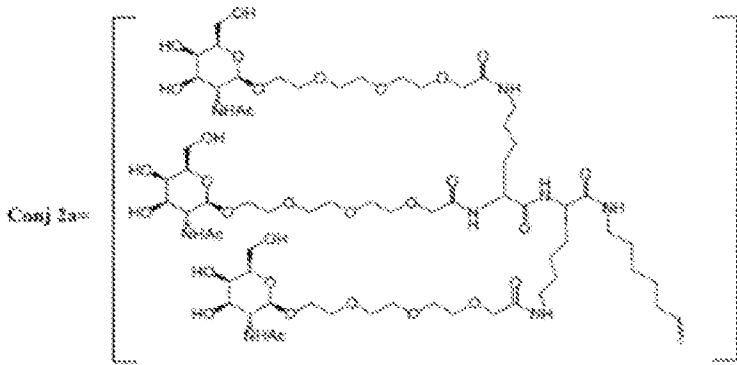
де
індекс ^L визначає бета-D-окси ЗНК ланку,

MeC визначає 5-метилцитозин,

індекс _s визначає фосфоротіоатний міжнуклеозидний зв'язок,
і де



являє собою Conj 2a, направлене на кон'югатне угруповання рецептора асіалоглікопротеїну



14. Олігомер з 16-20 нуклеотидів в довжину, що містить безперервну послідовність з 16 нуклеотидів, комплементарну відповідному відрізку довжини SEQ ID NO: 31, де зазначений олігомер являє собою LNA гепмер.

15. Олігомер за п. 14, де безперервна послідовність містить аналоги нуклеотидів, що посилюють спорідненість, незалежно або залежно вибрані з групи, що складається з ланок замкненої нуклеїнової кислоти (ЗНК), ланок 2'-О-алкіл-РНК, ланок 2'-ОМе-РНК, ланок 2'-аміно-ДНК і ланок 2'-фтор-ДНК.

16. Олігомер за п. 14, який містить послідовність з 16 нуклеотидів, відповідну SEQ ID NO: 26.

17. Олігомер за будь-яким з пп. 14-16, де олігомер містить один або більше нуклеозидних зв'язків, вибраних з групи, що складається з фосфоротіоатного, фосфородитіоатного і боранофосфатного зв'язків.

18. Олігомер за будь-яким з пп. 14-17, який містить безперервну послідовність SEQ ID NO: 2 або 3.

19. Фармацевтична композиція, яка містить олігомер з 16-20 нуклеотидів в довжину, який містить безперервну послідовність з 16 нуклеотидів, комплементарну відповідному відрізку довжини SEQ ID NO: 31, де зазначений антисмисловий олігомер являє собою LNA гепмер і фармацевтично прийнятний розчинник, носій, сіль або ад'ювант.

20. Фармацевтична композиція, яка містить кон'югат антисмислового олігонуклеотиду, що містить:

а) антисмисловий олігомер (A) з 16-20 нуклеотидів в довжину, який містить безперервну послідовність з 16 нуклеотидів, комплементарну відповідному відрізку довжини SEQ ID NO: 31, і де зазначений антисмисловий олігомер являє собою LNA гепмер і

б) щонайменше одне кон'югатне угруповання (C), направлене на рецептор асіалоглікопротеїнів, ковалентно приєднане до олігомера (A), і

с) фармацевтично прийнятний розчинник, носій, сіль або ад'ювант.

21. Застосування олігомера з 16-20 нуклеотидів в довжину, який містить безперервну послідовність з 16 нуклеотидів, комплементарну відповідному відрізку довжини SEQ ID NO: 31, де зазначений антисмисловий олігомер являє собою LNA гепмер, як лікарського засобу, такого як засіб для лікування гіперхолестеринемії або спорідненого розладу, такого як розлад, вибраний з групи, що складається з атеросклерозу, гіперліпідемії, гіперхолестеринемії, сімейної гіперхолестеринемії, наприклад, набуття функціональних мутацій в PCSK9, дисбалансу холестерину ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ)/ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ), дисліпідемій, наприклад сімейної гіперліпідемії (сімейної комбінованої гіперліпідемії (СКГ)) або сімейної гіперхолестеринемії (СГХС), набутої гіперліпідемії, статин-резистентної гіперхолестеринемії, коронарної артеріальної хвороби (КАХ) та ішемічної хвороби серця (ІХС).

22. Застосування кон'югата антисмислового олігонуклеотиду, який містить:

а) антисмисловий олігомер (А) з 16-20 нуклеотидів в довжину, який містить безперервну послідовність з 16 нуклеотидів, комплементарну відповідному відрізку довжини SEQ ID NO: 31, і де зазначений антисмисловий олігомер являє собою LNA гепмер і

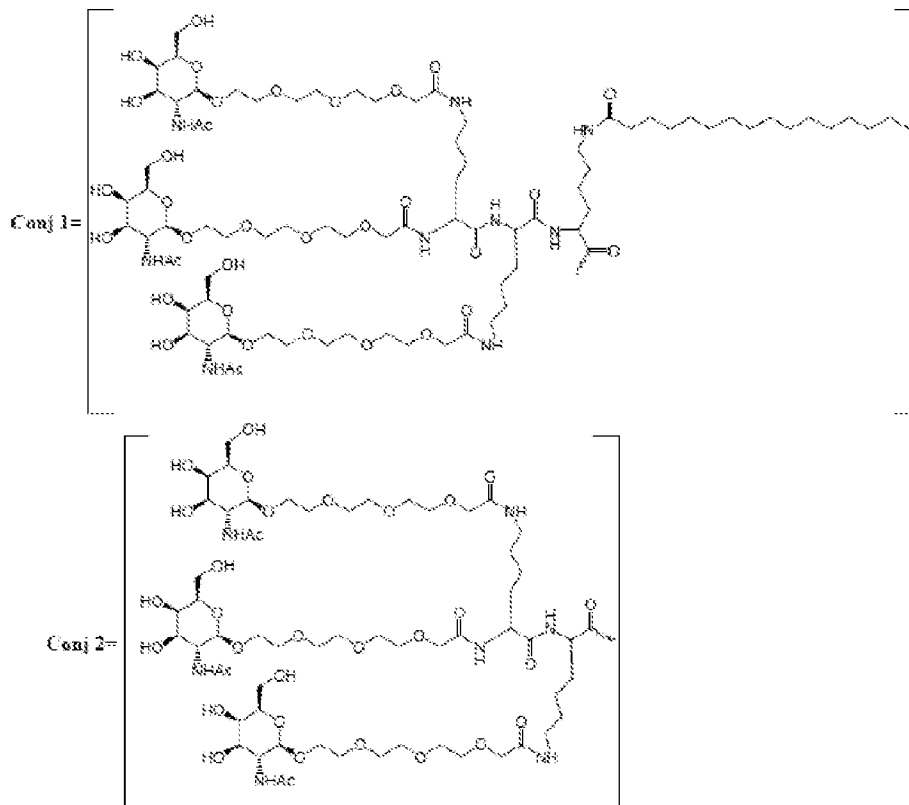
б) щонайменше одне кон'югатне угруповання (С), направлене на рецептор асіалоглікопротеїнів, ковалентно приєднане до олігомера (А)

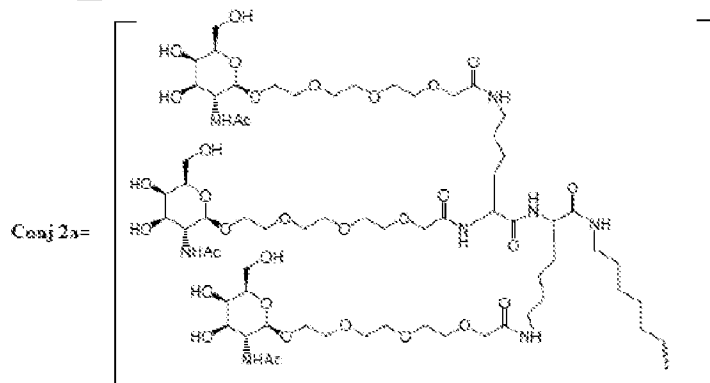
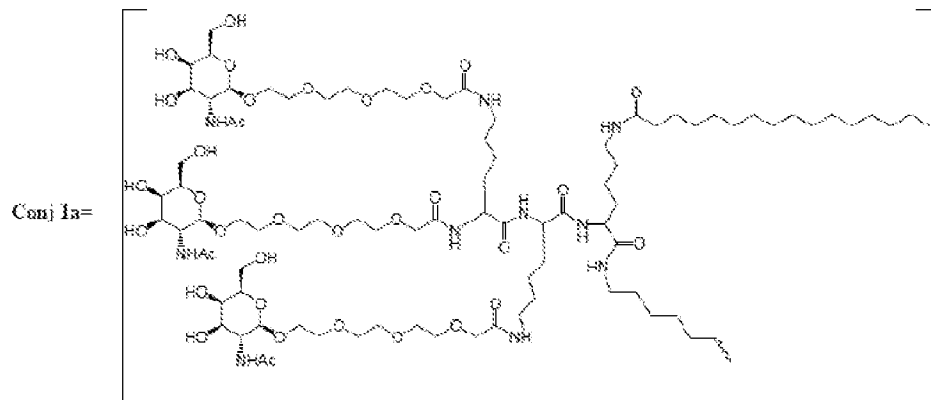
як лікарського засобу, такого як засіб для лікування гіперхолестеринемії або спорідненого розладу, такого як розлад, вибраний з групи, що складається з атеросклерозу, гіперліпідемії, гіперхолестеринемії, сімейної гіперхолестеринемії, наприклад, придбання функціональних мутацій в PCSK9, дисбалансу холестерину ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ)/ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ), дисліпідемій, наприклад, сімейної гіперліпідемії (сімейної комбінованої гіперліпідемії (СКГ)) або сімейної гіперхолестеринемії (СГХС), придбаної гіперліпідемії, статин-резистентної гіперхолестеринемії, коронарної артеріальної хвороби (КАХ) та ішемічної хвороби серця (ІХС).

23. Спосіб інгібування PCSK9 *in vitro* в клітині, експресуючій PCSK9, який включає введення в клітину олігомера або кон'югата антисмислового олігонуклеотиду або фармацевтичної композиції за будь-яким з пп. 1-20.

24. Кон'югат олігонуклеотиду за п. 4, де N-ацетилгалактозамін (GalNAc) угруповання являє собою моновалентне, двовалентне, тривалентне або чотиривалентне GalNAc угруповання.

25. Кон'югат олігонуклеотиду за п. 6, де поліетиленгліколеві (ПЕГ) спейсери показані як Conj 1, 2, 1a або 2a.





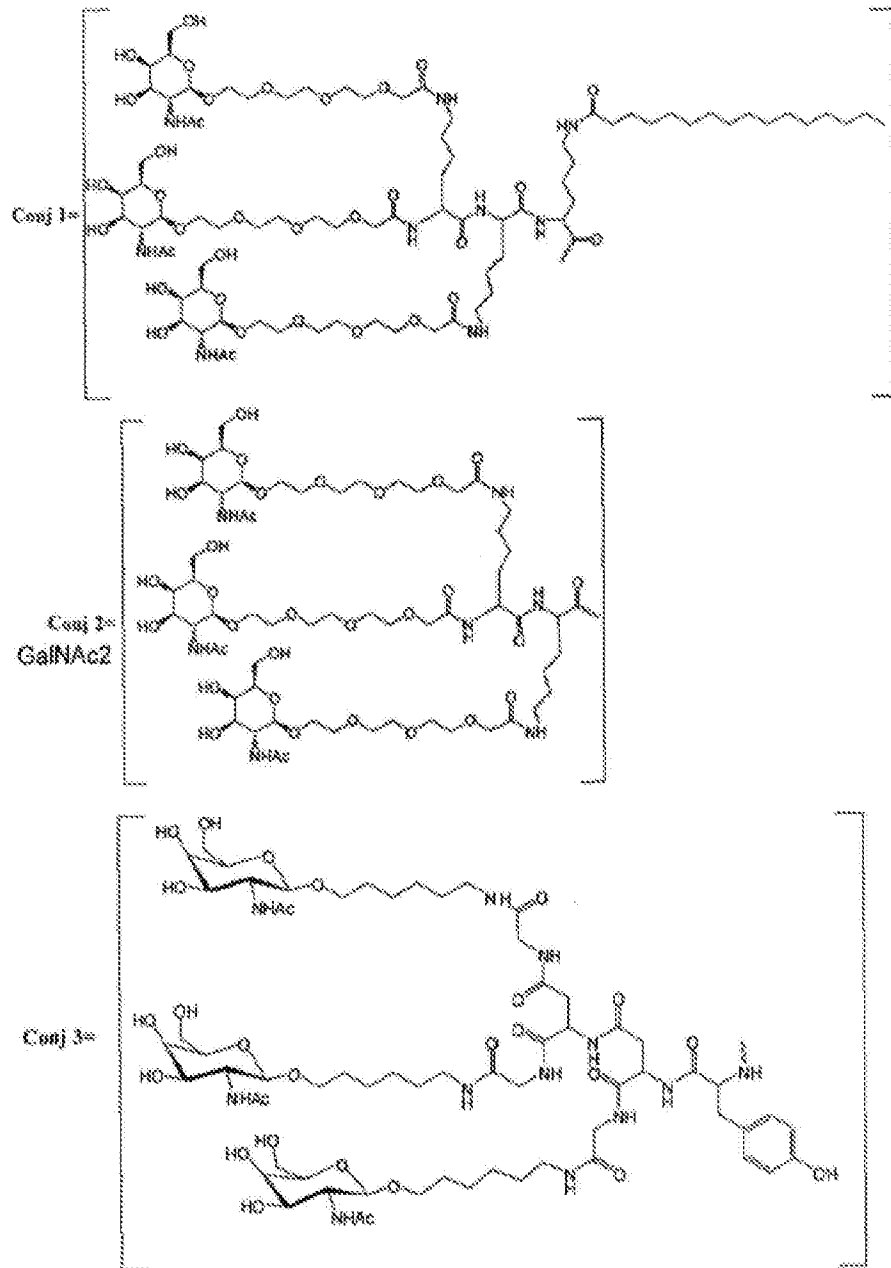
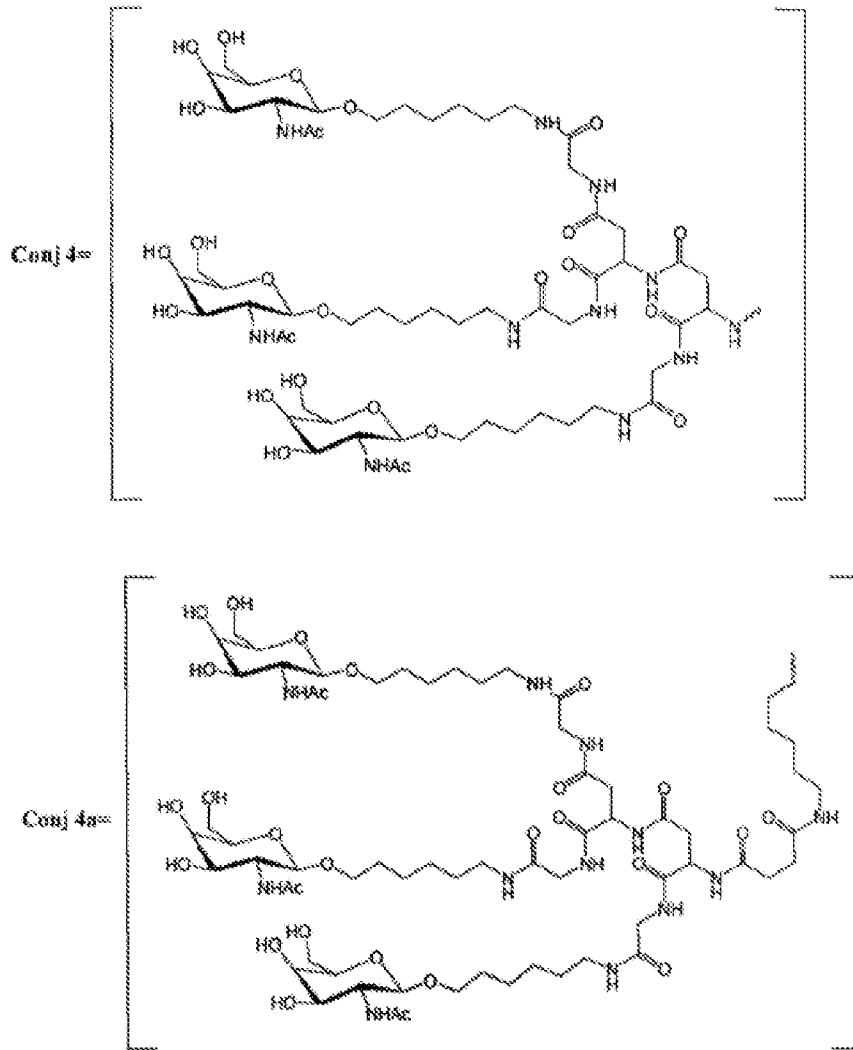
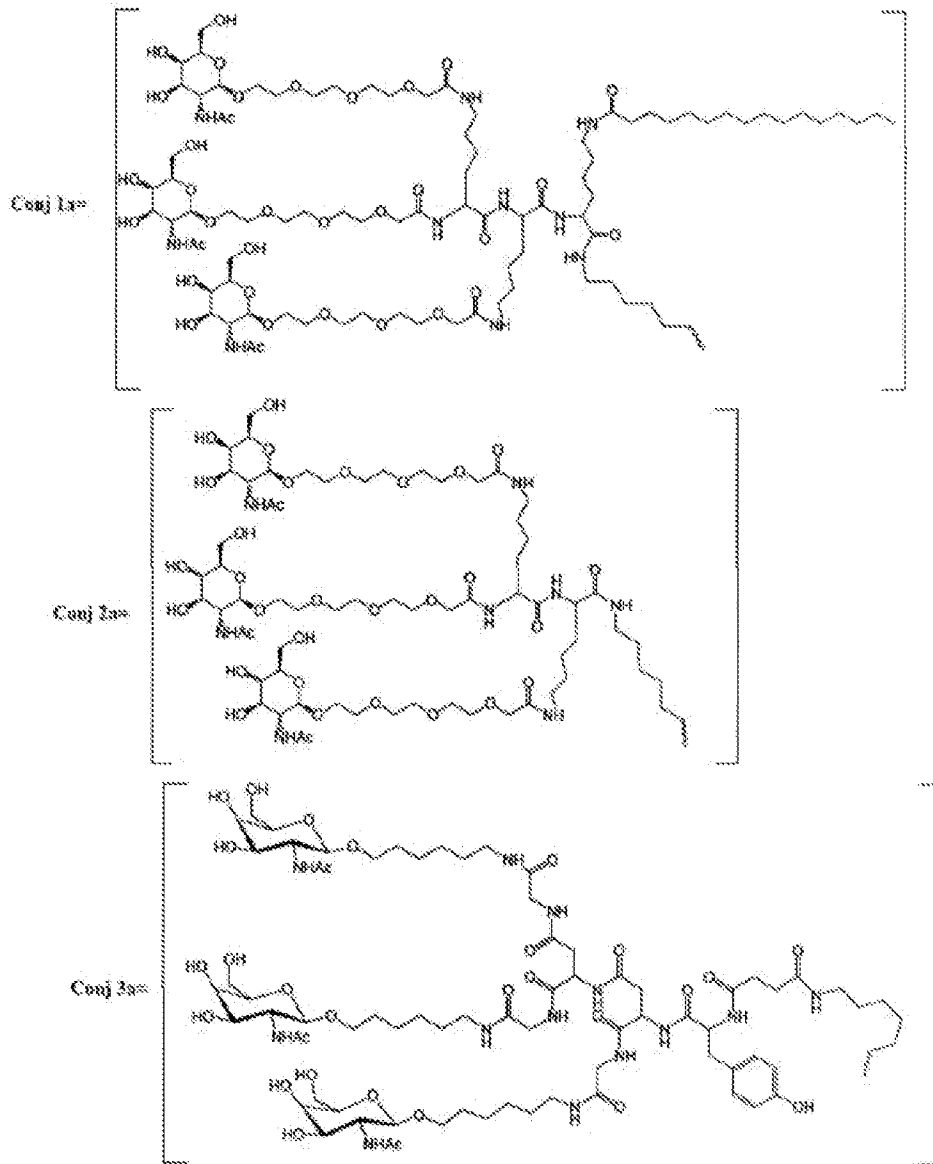


Fig. 1



Фіг. 1 (продовження)



Фиг. 1 (продовження)

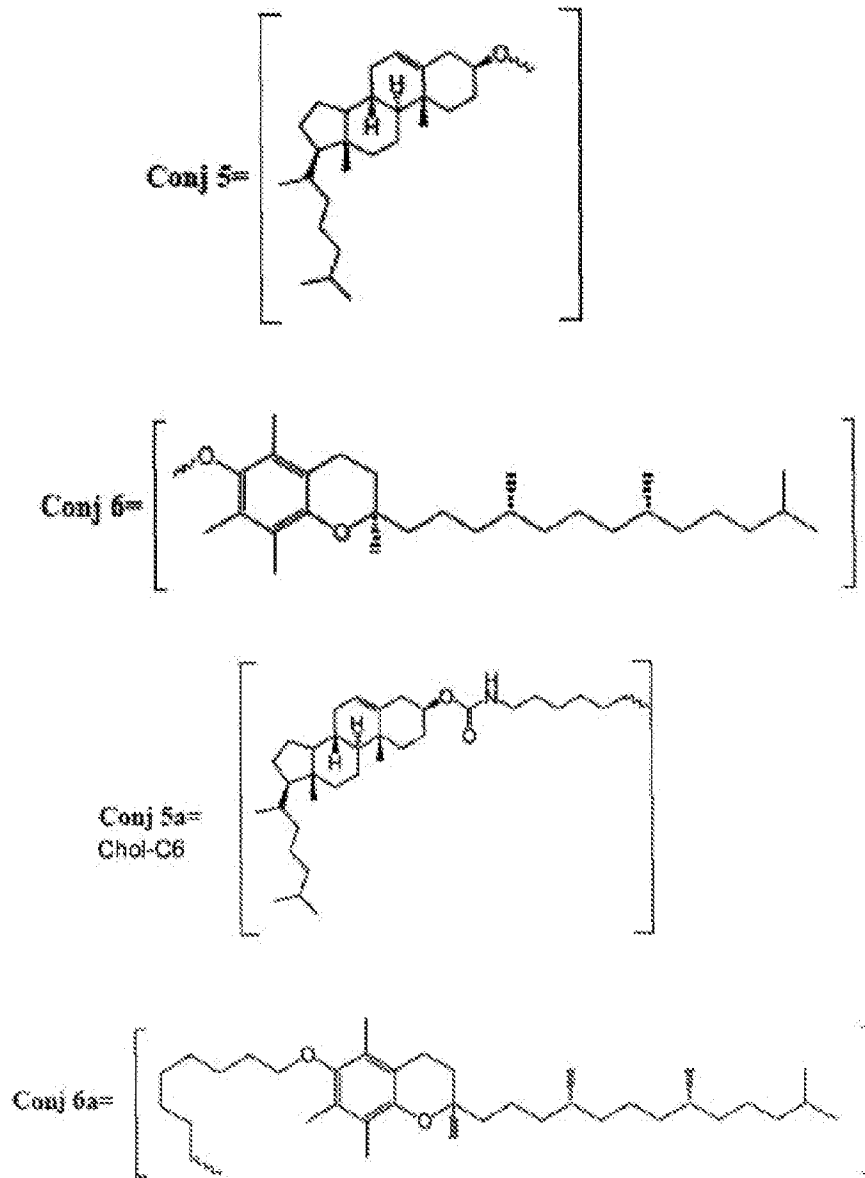


Fig. 2

5'-T₅^LG₅^LMeC₅^LT₅A₅C₅A₅A₅A₅C₅^{MeC₅^LMeC₅^LA₅^L-3'}
SEQ ID 1

5'-A₅^LA₅^LT₅G₅C₅T₅A₅C₅A₅A₅A₅MeC₅^LMeC₅^LMeC₅^LA₅^L-3'
SEQ ID 2

5'-A₅^LA₅^LT₅G₅C₅T₅A₅C₅A₅A₅A₅C₅^{MeC₅^LMeC₅^LA₅^L-3'}
SEQ ID 3

5'-G₅^LMeC₅^LT₅G₅T₅G₅T₅G₅A₅G₅C₅T₅T₅G₅^LG₅^L-3'
SEQ ID 4

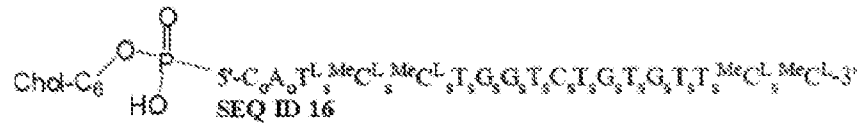
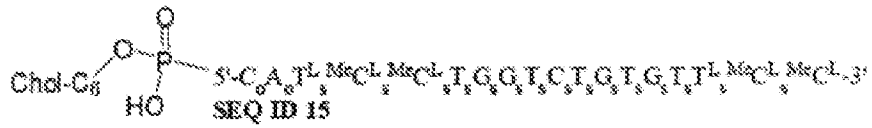
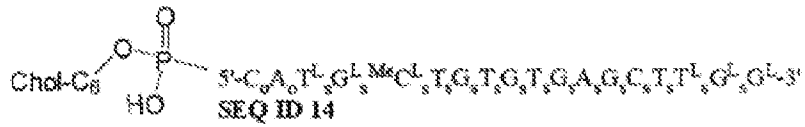
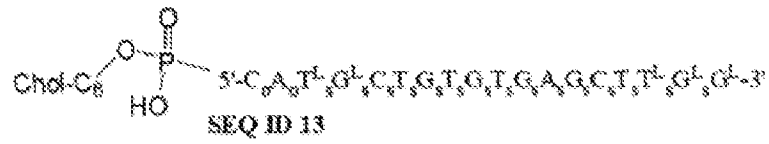
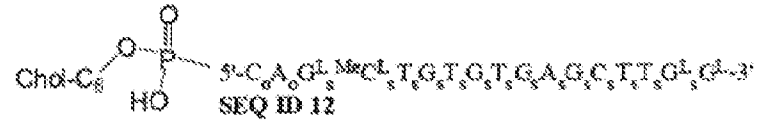
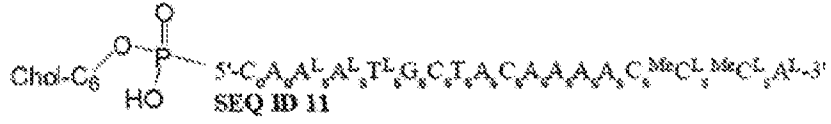
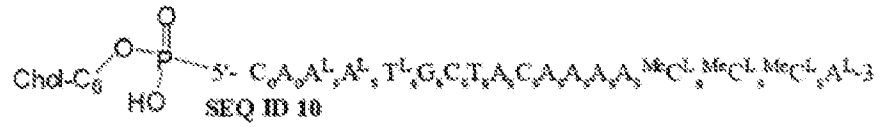
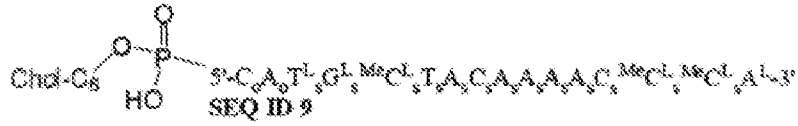
5'-T₅^LG₅^LC₅T₅G₅T₅G₅T₅G₅A₅G₅C₅T₅T₅G₅^LG₅^L-3'
SEQ ID 5

5'-T₅^LG₅^LMeC₅^LT₅G₅T₅G₅T₅G₅A₅G₅C₅T₅T₅G₅^LG₅^L-3'
SEQ ID 6

5'-T₅^LMeC₅^LMeC₅^LT₅G₅G₅T₅C₅T₅G₅T₅G₅T₅T₅MeC₅^LMeC₅^L-3'
SEQ ID 7

5'-T₅^LMeC₅^LMeC₅^LT₅G₅G₅T₅C₅T₅G₅T₅G₅T₅T₅MeC₅^LMeC₅^L-3'
SEQ ID 8

φir. 3



Фір. 4

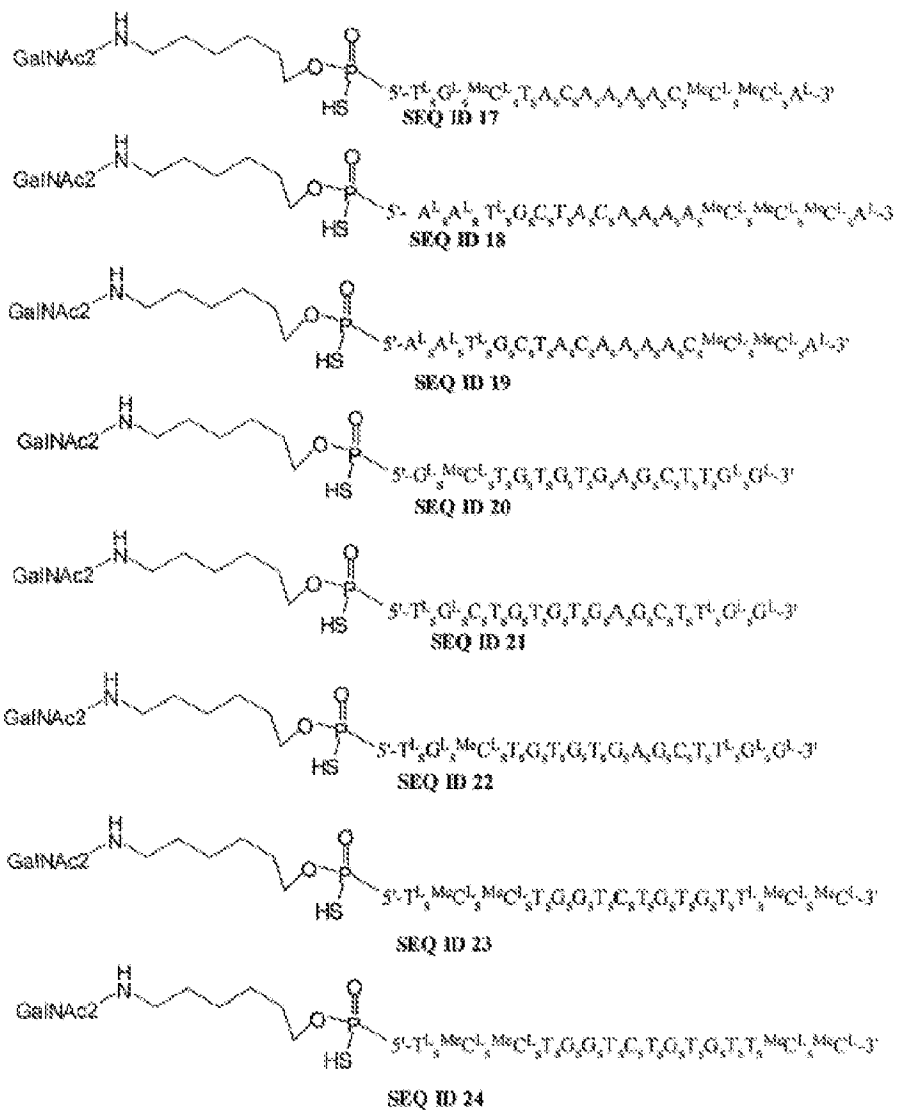


Fig. 5

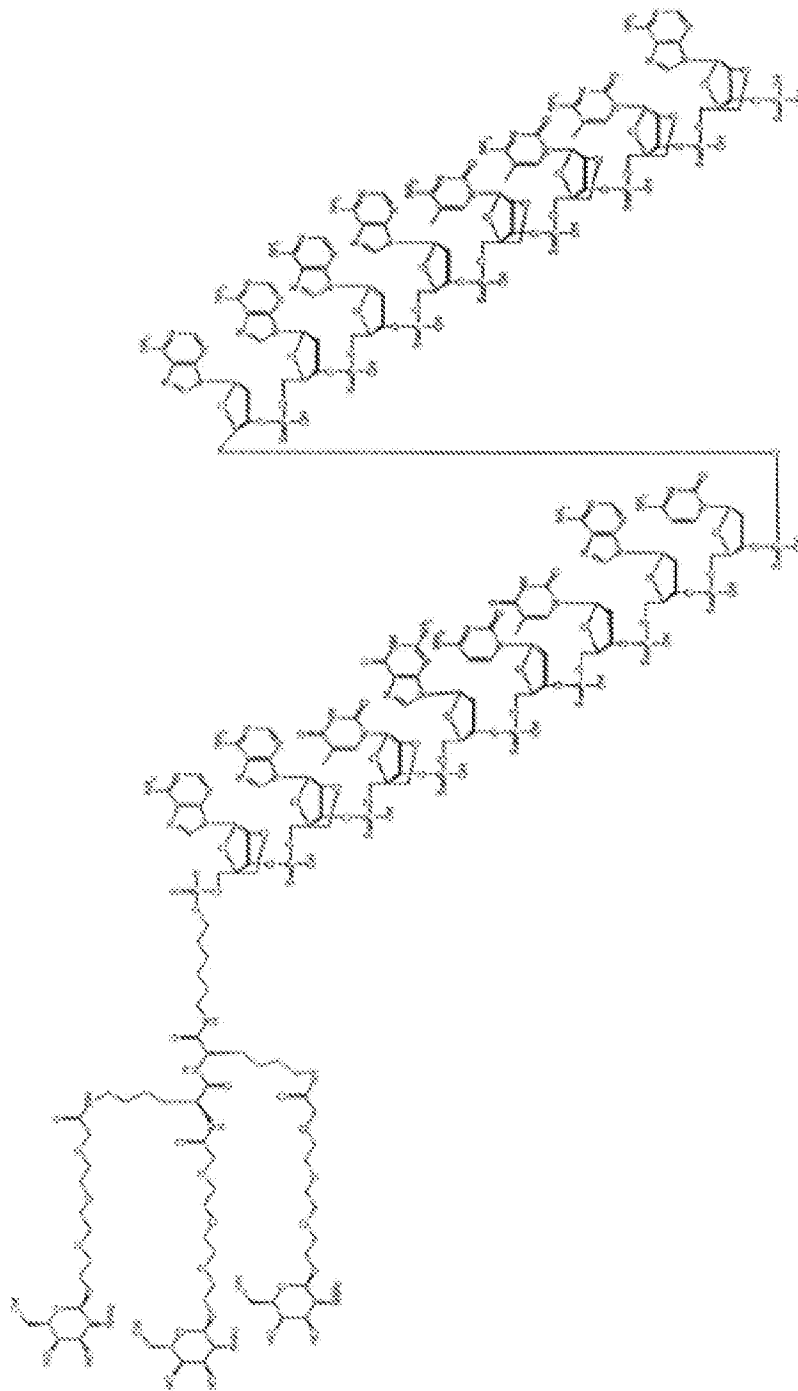


Fig. 5A

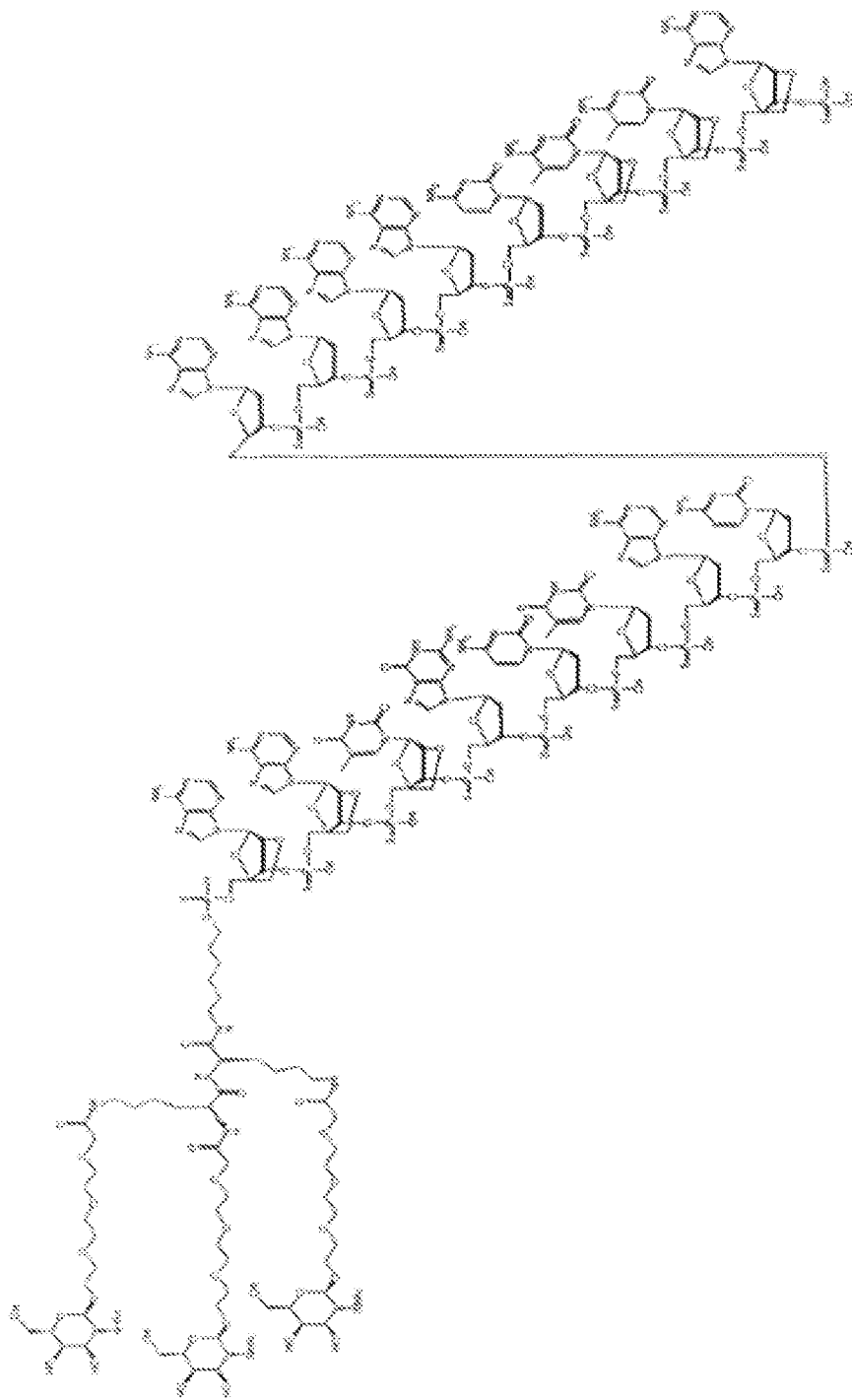


Fig. 5B

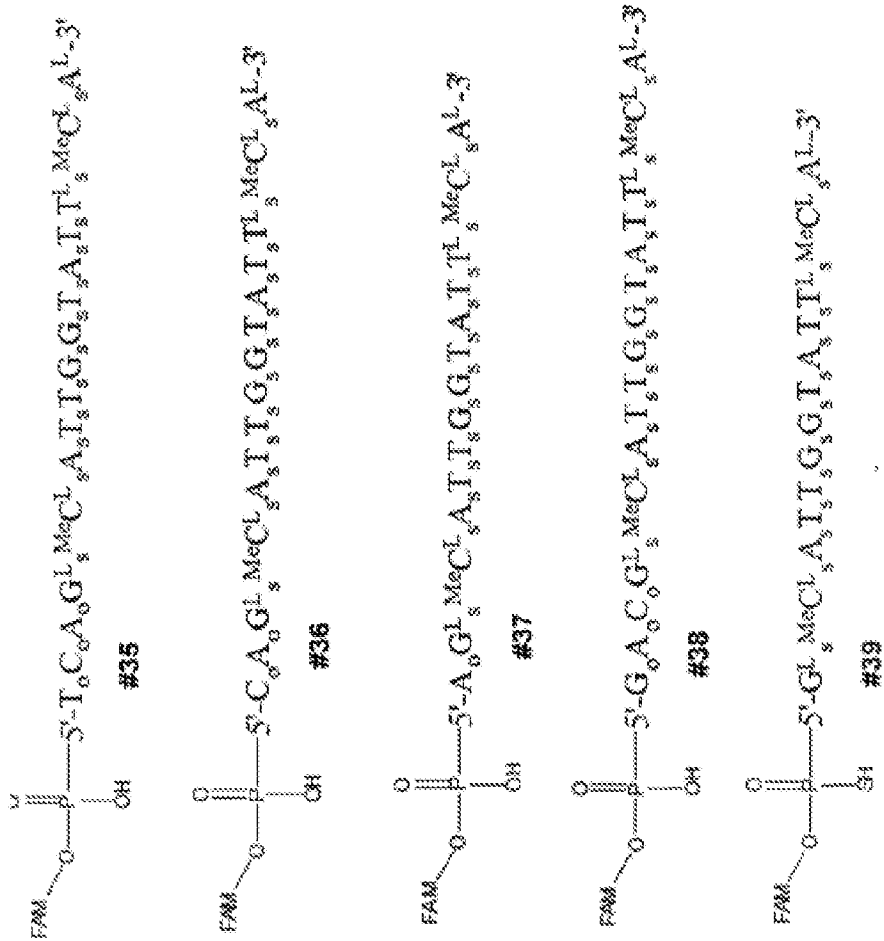


Fig. 7

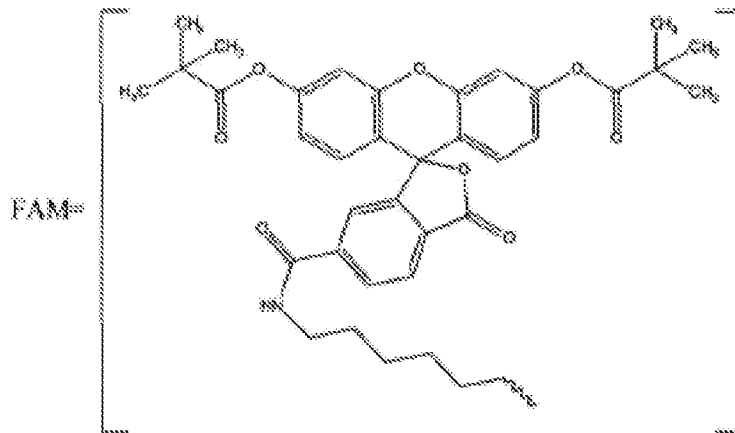
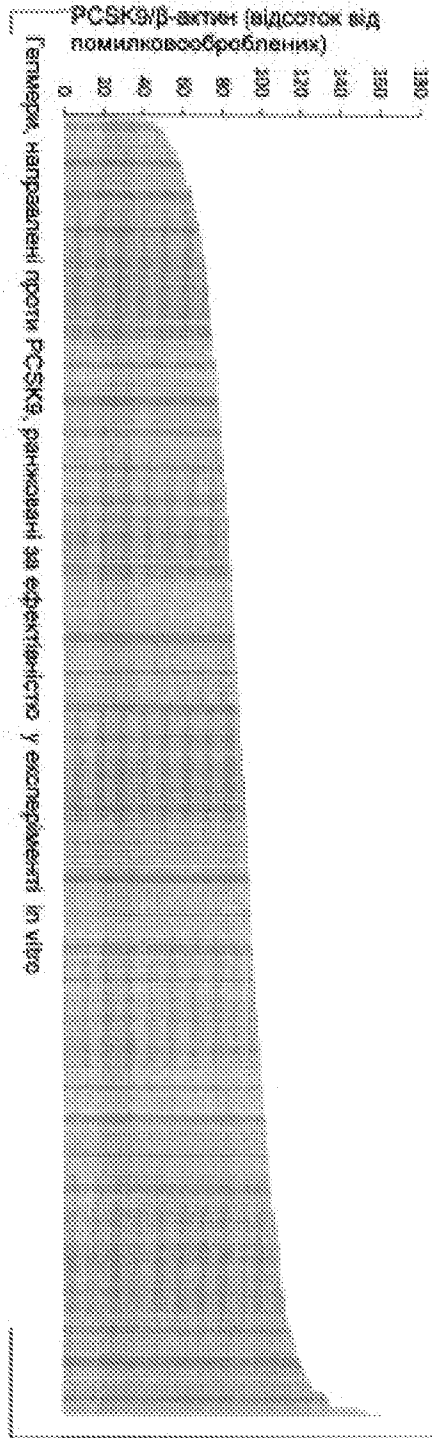
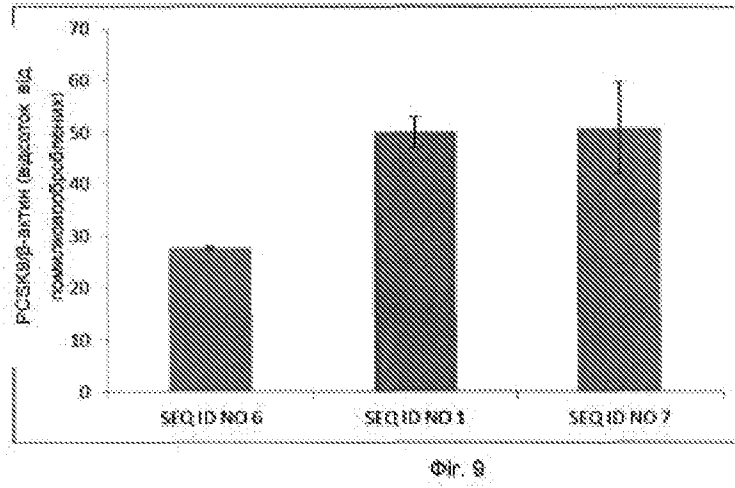
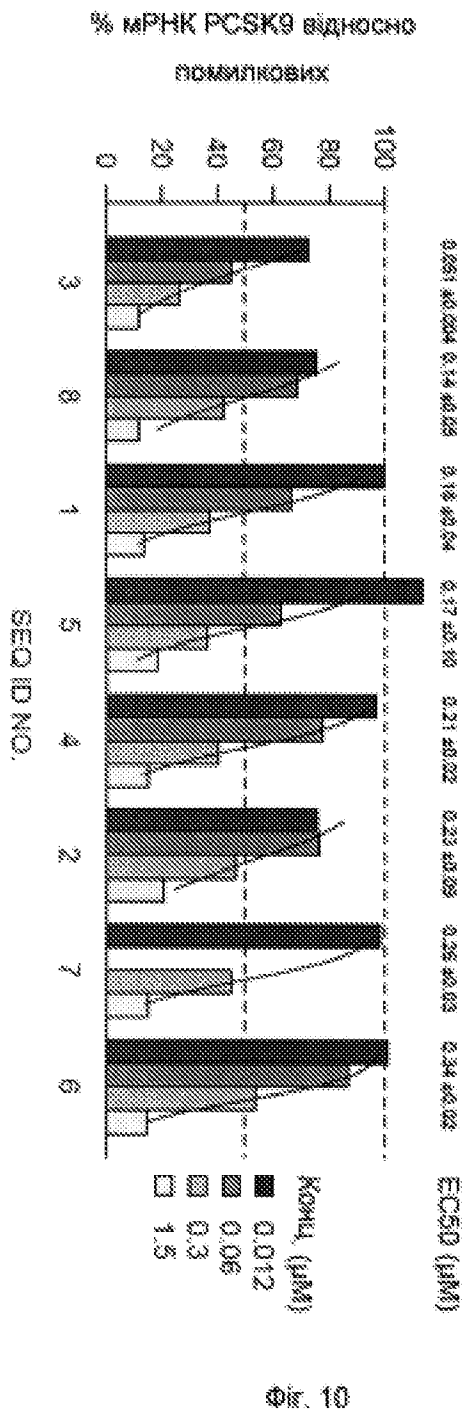


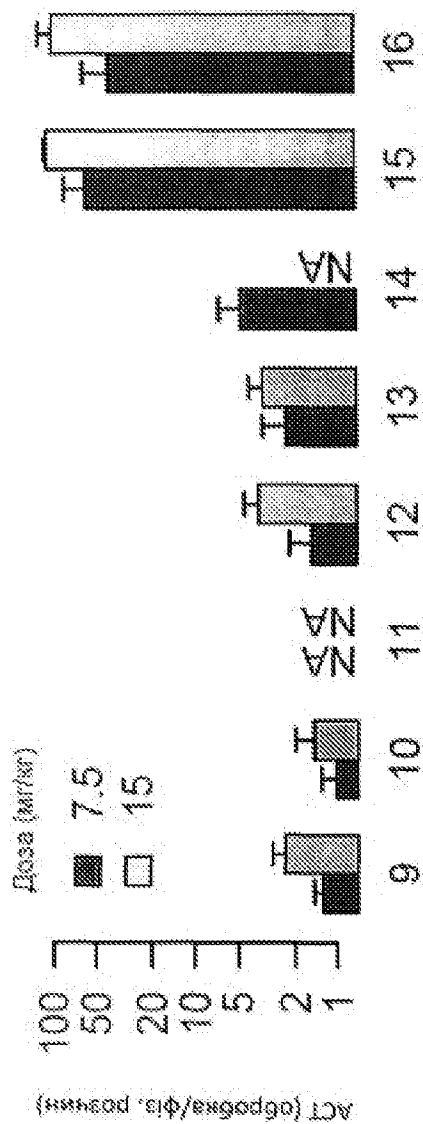
Fig. 8



Фиг. 8

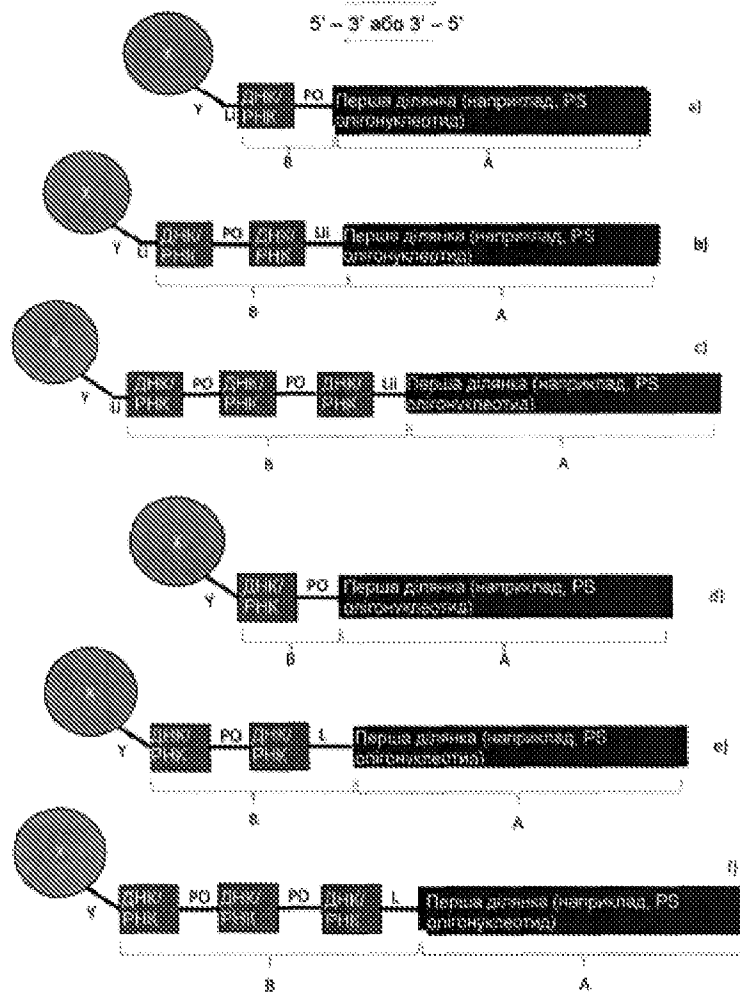






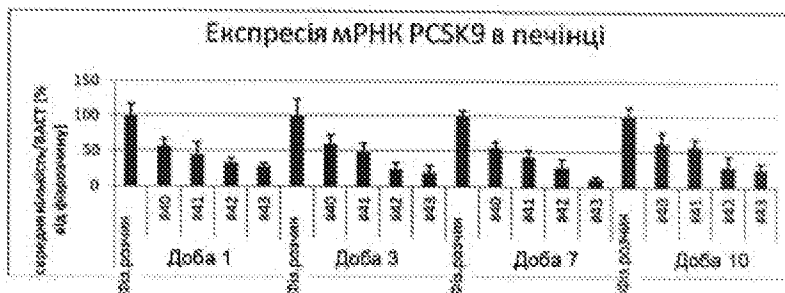
SEQ ID NO.

11.10

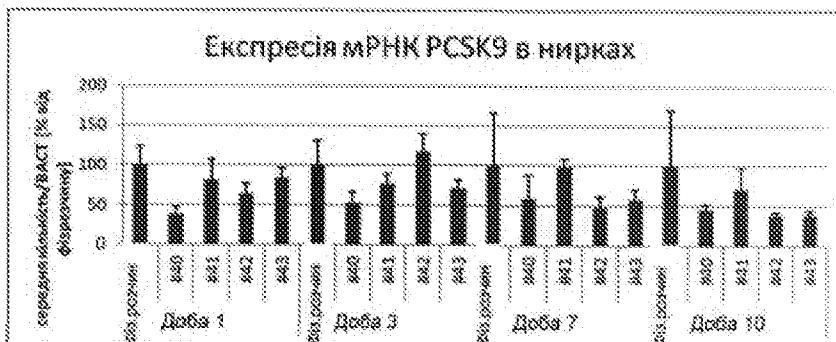


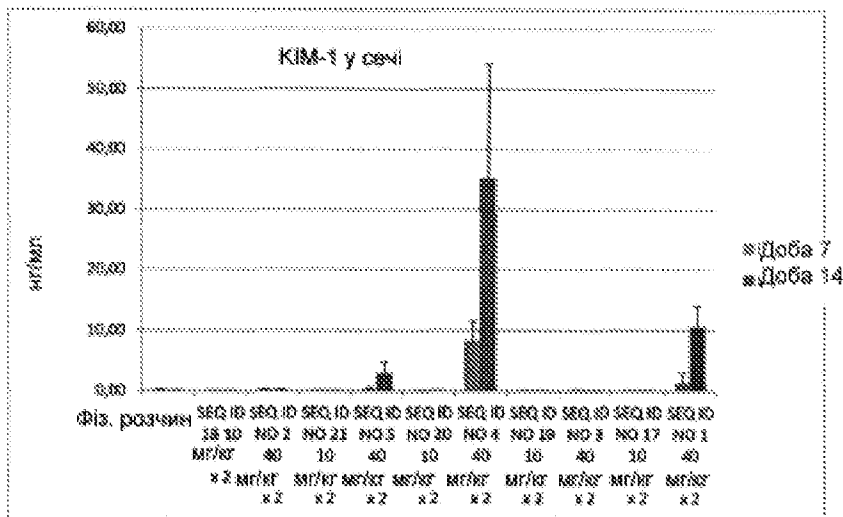
Фіг. 13

A

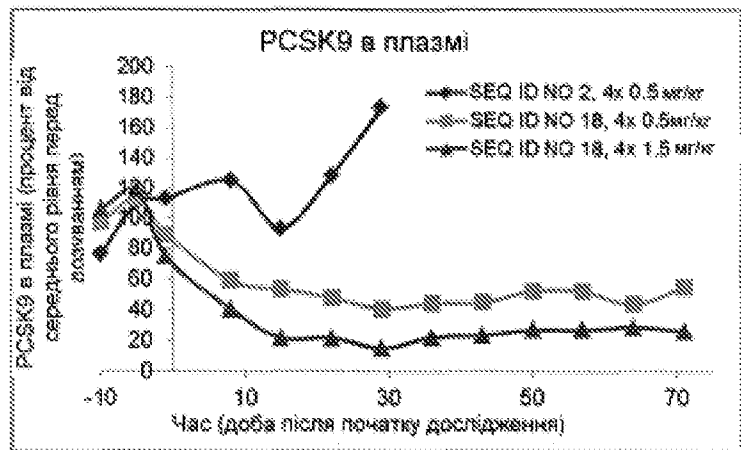


B

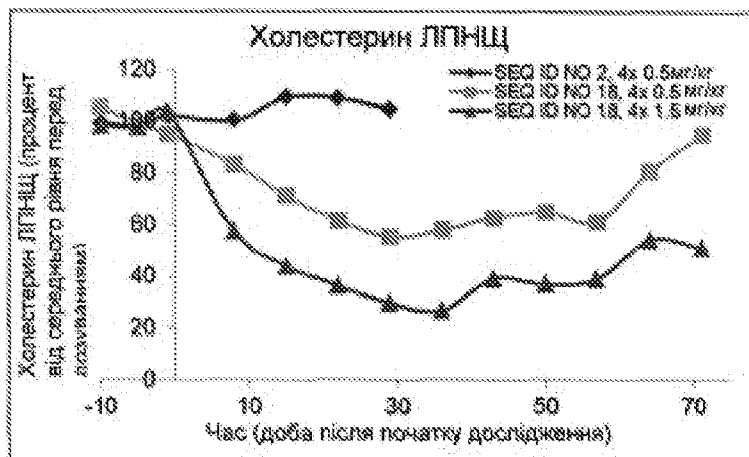




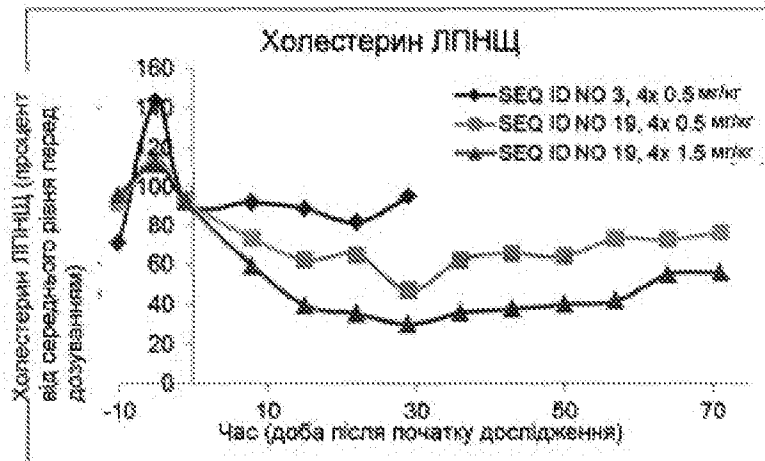
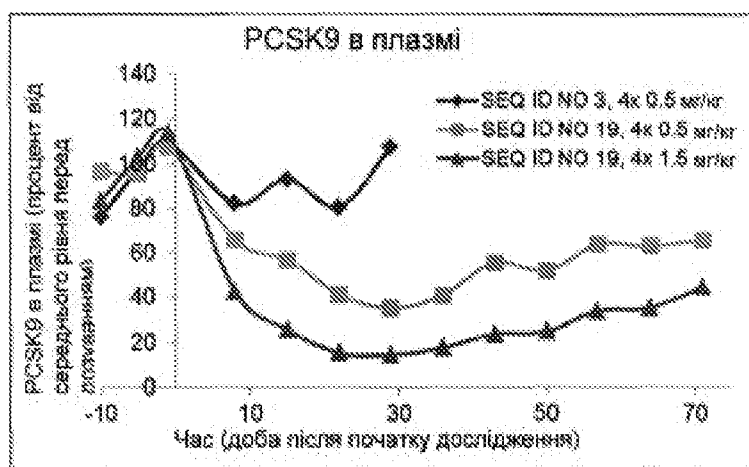
Фіг. 15



Фіг. 16



Фіг. 16 (продовження)



Фіг. 17

Комп'ютерна верстка С. Чулій

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601