

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2012110221/10, 17.08.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

18.08.2009 US 61/234,939;

10.06.2010 US 61/353,374;

21.07.2010 US 61/366,362;

26.07.2010 US 61/367,766

(43) Дата публикации заявки: 27.09.2013 Бюл. № 27

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 19.03.2012

(86) Заявка РСТ:

US 2010/045797 (17.08.2010)

(87) Публикация заявки РСТ:

WO 2011/022427 (24.02.2011)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(71) Заявитель(и):

**БАКСТЕР ИНТЕРНЭШНЛ ИНК. (US),
БАКСТЕР ХЕЛТКЭР С.А. (CN)**

(72) Автор(ы):

**ШАУБ Роберт Г. (US),
МАКГИННЕСС Кэтлин (US),
НЕЛЬСОН Дженифер (US),
ДЖЕНГА Райан (US),
УОТЕРС Эмили (US),
КУРЦ Джеффри К. (US),
ДИНЕР Джон Л. (US)**(54) **АПТАМЕРЫ К ИНГИБИТОРУ ПУТИ ТКАНЕВОГО ФАКТОРА И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В
КАЧЕСТВЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ ПРИ НАРУШЕНИЯХ СВЕРТЫВАЕМОСТИ**

(57) Формула изобретения

1. Аптамер, связывающийся с ингибитором пути тканевого фактора (TFPI) и содержащий первичную нуклеотидную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NOs.: 4, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

2. Аптамер по п.1, отличающийся тем, что TFPI представляет собой TFPI человека.

3. Аптамер по п.1, отличающийся тем, что аптамер обладает константой диссоциации с TFPI человека, равной 100 нМ или менее.

4. Аптамер по п.1, отличающийся тем, что аптамер включает по меньшей мере одну химическую модификацию.

5. Аптамер по п.4, отличающийся тем, что модификация выбрана из группы, состоящей из: химической замены по положению в составе углевода, химической замены в межнуклеотидной связи и химической замены по положению в составе основания.

6. Аптамер по п.4, отличающийся тем, что модификация выбрана из группы, состоящей из: встраивания модифицированного нуклеотида; 3'-кэпа; 5'-кэпа; конъюгирования с высокомолекулярным неиммуногенным соединением; конъюгирования с липофильным соединением; встраивания CpG-мотива; и встраивания

фосфортриата или фосфордитриата в фосфатный каркас.

7. Аптамер по п.6, отличающийся тем, что высокомолекулярное неиммуногенное соединение представляет собой полиэтиленгликоль.

8. Аптамер по п.6, отличающийся тем, что 3'-кэп представляет собой инвертированный дезокситимидиновый кэп.

9. Аптамер по любому из пп.1-8 или его соль, включающий нуклеотидную последовательность, приведенную ниже:

mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA (SEQ ID NO: 1) (ARC26835), где "dN" представляет собой дезоксирибонуклеотид, а "mN" представляет собой 2'-О-Ме-содержащий нуклеотид.

10. Аптамер по любому из пп.1-8 или его соль, отличающийся тем, что включает нуклеотидную последовательность, приведенную ниже:

mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T (SEQ ID NO: 2) (ARC17480), где "3T" представляет собой инвертированный дезокситимидин, "dN" представляет собой дезоксирибонуклеотид, а "mN" представляет собой 2'-О-Ме-содержащий нуклеотид.

11. Аптамер по любому из пп.1-8 или его соль, отличающийся тем, что включает нуклеотидную последовательность, приведенную ниже:

NH₂-mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T (SEQ ID NO: 3) (ARC19498), где "NH₂" принадлежит 5'-гексиламинному фосфорамидитному линкеру, "3T" представляет собой инвертированный дезокситимидин, "dN" представляет собой дезоксирибонуклеотид, а "mN" представляет собой 2'-О-Ме-содержащий нуклеотид.

12. Аптамер по любому из пп.1-8 или его соль, отличающийся тем, что включает нуклеотидную последовательность, приведенную ниже:

PEG40K-NH-mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T (SEQ ID NO: 4) (ARC19499), где "NH" принадлежит 5'-гексиламинному фосфорамидитному линкеру, "PEG" представляет собой полиэтиленгликоль, "3T" представляет собой инвертированный дезокситимидин, "dN" представляет собой дезоксирибонуклеотид, а "mN" представляет собой 2'-О-Ме-содержащий нуклеотид.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество аптамера по любому из пп.1-12 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

14. Способ лечения, предотвращения, задержки развития или облегчения расстройства свертываемости, опосредованного TFPI, включающий введение композиции по п.13 в организм субъекта.

15. Способ по п.14, отличающийся тем, что субъект является млекопитающим.

16. Способ по п.15, отличающийся тем, что млекопитающее является человеком.

17. Способ по п.14, отличающийся тем, что расстройство свертываемости выбирают из группы, состоящей из: профилактики или лечения по требованию недостаточности факторов свертывания, врожденной или приобретенной, легкой/умеренной/тяжелой, включая гемофилию А (недостаточность фактора VIII), гемофилию В (недостаточность фактора IX) и гемофилию С (недостаточность фактора XI); ингибиторных форм гемофилии А или В; недостаточности других факторов (V, VII, X, XIII, протромбина, фибриногена); недостаточности ингибитора α₂-плазмина; недостаточности ингибитора-1 активатора плазминогена; недостаточности нескольких факторов; функциональных аномалий факторов (например, диспротромбинемии); кровоизлияний в полость сустава (гемартроза), включая голеностопный, локтевой и коленные суставы, но не

ограничиваясь ими; спонтанных кровотечений в других органах (мышцах, желудочно-кишечном тракте, ротовой полости и т.д.); геморрагического инсульта; внутримозгового кровоизлияния; разрывов тканей и других кровотечений, связанных с травмой; острой травматической коагулопатии; коагулопатии, связанной с раком (например, острым промиелоцитарным лейкозом); болезни Виллебранда-Юргенса; синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания; заболеваний печени; меноррагии и тромбоцитопении.

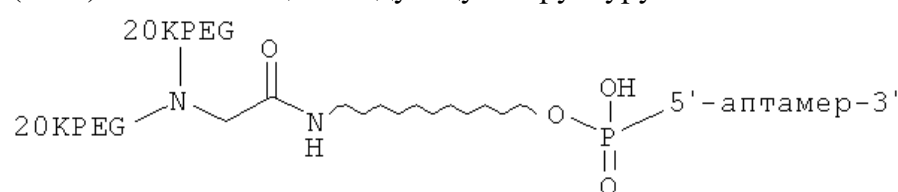
18. Способ по п.14, отличающийся тем, что композицию вводят до, во время и/или после медицинской процедуры.

19. Способ по п.14, отличающийся тем, что композицию вводят в комбинации с еще одним лекарственным агентом.

20. Способ по любому из пп.14-19, отличающийся тем, что композицию вводят в комбинации с еще одним терапевтическим средством.

21. Комплект, включающий аптамер по любому из пп.1-12.

22. Аптамер или его соль, связывающийся с ингибитором пути тканевого фактора (TFPI) и включающий следующую структуру:

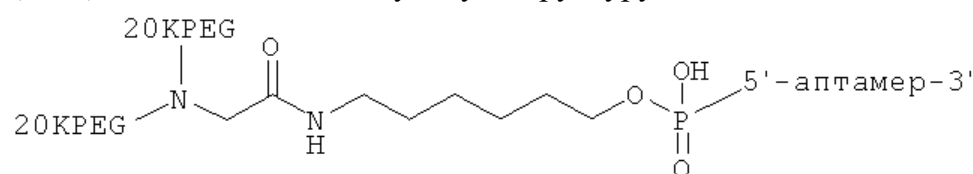


где $\text{HN} \text{---} \text{CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC} \text{PO}_3\text{H}$ принадлежит 5'-аминному фосфорамидитному линкеру, и

где аптамер включает нуклеотидную последовательность mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T (SEQ ID NO: 2), где "3T" представляет собой инвертированный дезокситимидин, "dN" представляет собой дезоксирибонуклеотид, а "mN" представляет собой 2'-О-метилированный нуклеотид, и где 20KPEG представляет собой мПЭГ-группу, обладающую молекулярной массой 20 кДа.

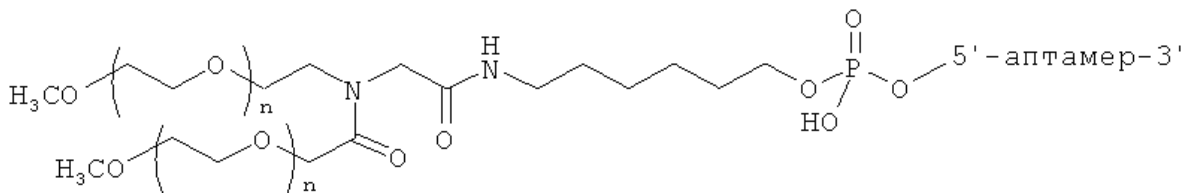
23. Аптамер или его соль по п.22, отличающийся тем, что линкер выбран из группы, состоящей из: 2-18 последовательных CH_2 -групп, 2-12 последовательных CH_2 -групп, 4-8 последовательных CH_2 -групп и 6 последовательных CH_2 -групп.

24. Аптамер или его соль, связывающийся с ингибитором пути тканевого фактора (TFPI) и включающий следующую структуру:



где аптамер включает нуклеотидную последовательность mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T (SEQ ID NO: 2), где "3T" представляет собой инвертированный дезокситимидин, "dN" представляет собой дезоксирибонуклеотид, а "mN" представляет собой 2'-О-метилированный нуклеотид, и где 20KPEG представляет собой мПЭГ-группу, обладающую молекулярной массой 20 кДа.

25. Аптамер или его соль, связывающийся с ингибитором пути тканевого фактора (TFPI) и включающий следующую структуру:



где аптамер включает нуклеотидную последовательность mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T (SEQ ID NO: 2), где "n" приблизительно равно 450, "3T" представляет собой инвертированный дезокситимидин, "dN" представляет собой дезоксирибонуклеотид, а "mN" представляет собой 2'-О-метилованный нуклеотид.

26. Инвертирующий агент, включающий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15 (ARC23085), SEQ ID NO: 16 (ARC23087), SEQ ID NO: 17 (ARC23088) и SEQ ID NO: 18 (ARC23089).

27. Способ получения аптамера, связывающегося с ингибитором пути тканевого фактора (TFPI), включающий этап химического синтеза нуклеиновой кислоты, обладающей нуклеотидной последовательностью согласно нуклеотидной последовательности по любому из пп.1-12 или 22-25.

28. Способ по п.27, отличающийся тем, что дополнительно включает этап составления фармацевтической композиции путем смешивания синтезированной нуклеиновой последовательности или ее соли с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем.

29. Способ получения инвертирующего агента, включающий этап химического синтеза нуклеиновой кислоты, обладающей нуклеотидной последовательностью согласно нуклеотидной последовательности по п.26.

30. Способ по п.28, отличающийся тем, что дополнительно включает этап составления фармацевтической композиции путем смешивания синтезированной нуклеиновой последовательности или ее соли с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем.

31. Аптамер, связывающийся с полипептидом ингибитора пути тканевого фактора (TFPI) человека, обладающим аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11, причем этот аптамер регулирует TFPI-опосредованное ингибирование свертывания крови и конкурирует за связывание с TFPI с эталонным аптамером, содержащим нуклеотидную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 4 (ARC19499), SEQ ID NO: 1 (ARC26835), SEQ ID NO: 2 (ARC17480), SEQ ID NO: 3 (ARC19498), SEQ ID NO: 5 (ARC19500), SEQ ID NO: 6 (ARC19501), SEQ ID NO: 7 (ARC31301), SEQ ID NO: 8 (ARC18546), SEQ ID NO: 9 (ARC19881) и SEQ ID NO: 10 (ARC19882).

32. Аптамер, связывающийся с областью полипептида ингибитора пути тканевого фактора (TFPI) человека, содержащей один или несколько фрагментов SEQ ID NO: 11, где эти один или несколько фрагментов выбирают из группы, состоящей из:

аминокислотных остатков 148-170, аминокислотных остатков 150-170, аминокислотных остатков 155-175, аминокислотных остатков 160-180, аминокислотных остатков 165-185, аминокислотных остатков 170-190, аминокислотных остатков 175-195, аминокислотных остатков 180-200, аминокислотных остатков 185-205, аминокислотных остатков 190-210, аминокислотных остатков 195-215, аминокислотных остатков 200-220, аминокислотных остатков 205-225, аминокислотных остатков 210-230, аминокислотных остатков 215-235, аминокислотных остатков 220-240, аминокислотных остатков 225-245, аминокислотных остатков 230-250, аминокислотных остатков 235-255, аминокислотных остатков 240-260, аминокислотных остатков 245-

265, аминокислотных остатков 250-270, аминокислотных остатков 255-275, аминокислотных остатков 260-276, аминокислотных остатков 148-175, аминокислотных остатков 150-175, аминокислотных остатков 150-180, аминокислотных остатков 150-185, аминокислотных остатков 150-190, аминокислотных остатков 150-195, аминокислотных остатков 150-200, аминокислотных остатков 150-205, аминокислотных остатков 150-210, аминокислотных остатков 150-215, аминокислотных остатков 150-220, аминокислотных остатков 150-225, аминокислотных остатков 150-230, аминокислотных остатков 150-235, аминокислотных остатков 150-240, аминокислотных остатков 150-245, аминокислотных остатков 150-250, аминокислотных остатков 150-255, аминокислотных остатков 150-260, аминокислотных остатков 150-265, аминокислотных остатков 150-270, аминокислотных остатков 150-275, аминокислотных остатков 150-276, аминокислотных остатков 190-240, аминокислотных остатков 190-276, аминокислотных остатков 240-276, аминокислотных остатков 242-276, аминокислотных остатков 161-181, аминокислотных остатков 162-181, аминокислотных остатков 182-240, аминокислотных остатков 182-241 и аминокислотных остатков 182-276.

33. Аптамер, который связывается с ингибитором пути тканевого фактора (TFPI) человека и проявляет одно или несколько из следующих свойств:

- а) конкурирует за связывание с TFPI с любой из SEQ ID NOs: 1-10;
- б) ингибирует TFPI-ингибирование фактора Ха;
- с) усиливает образование тромбина в плазме при гемофилии;
- д) ингибирует TFPI-ингибирование внутреннего теназного комплекса;
- е) восстанавливает нормальный гемостаз согласно показаниям тромбоэластографии (TEG) в цельной крови и плазме;
- ф) восстанавливает нормальное свертывание крови, показателями которого являются сокращенное время свертывания, ускоренное тромбообразование или развитие более стабильного тромба согласно показаниям тромбоэластографии (TEG) или ротационной тромбоэластометрии (ROTEM) в цельной крови и плазме; или

г) сокращает время свертывания согласно показаниям протромбинового времени при разбавлении (рПВ), времени свертывания при активации тканевого фактора (TF-АСТ) или любого другого времени свертывания, чувствительного к TFPI.

34. Аптамер, связывающийся с ингибитором пути тканевого фактора (TFPI) человека, где аптамер конкурирует за связывание с TFPI с эталонным аптамером, выбираемым из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

35. Аптамер, связывающийся с ингибитором пути тканевого фактора (TFPI), причем этот аптамер непосредственно или косвенно конкурирует за связывание с TFPI с эталонным антителом, выбираемым из группы, состоящей из: AD4903.

36. Аптамер, связывающийся с ингибитором пути тканевого фактора (TFPI) человека и содержащий мотив типа "стебель-петля", обладающий нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 4, в котором:

- а) в любой или несколько любых из нуклеотидов 1, 2, 3, 4, 6, 8, 11, 12, 13, 17, 20, 21, 22, 24, 28, 30 и 32 могут быть внесены замены 2'-ОМе на 2'-дезоксидезокси;
- б) в любой или несколько любых из нуклеотидов 5, 7, 15, 19, 23, 27, 29 и 31 могут быть внесены замены 2'-ОМе-урацила на 2'-дезоксидезоксиурацил или 2'-дезокситимин;
- с) нуклеотид 18 может быть заменен на 2'-дезоксидезоксиурацил вместо 2'-ОМе-урацила; и/или
- д) в любой или несколько любых из нуклеотидов 14, 16 и 25 могут быть внесены замены 2'-дезоксидезоксицитозина на 2'-ОМе-цитозин или 2'-фторцитозин.

37. Аптамер, связывающийся с ингибитором пути тканевого фактора (TFPI) и

содержащий первичную нуклеотидную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NOs.: 4, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

R U 2 0 1 2 1 1 0 2 2 1 A

R U 2 0 1 2 1 1 0 2 2 1 A