

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034799**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

- | | |
|--|--|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.03.23</p> <p>(21) Номер заявки
201401276</p> <p>(22) Дата подачи заявки
2013.05.17</p> | <p>(51) Int. Cl. <i>A61K 31/7088</i> (2006.01)
<i>A61K 31/7125</i> (2006.01)
<i>A61P 21/00</i> (2006.01)
<i>A61P 25/28</i> (2006.01)
<i>A61P 31/12</i> (2006.01)
<i>A61P 31/14</i> (2006.01)
<i>A61P 31/16</i> (2006.01)
<i>A61K 31/7115</i> (2006.01)
<i>A61K 31/712</i> (2006.01)
<i>A61K 31/713</i> (2006.01)
<i>A61P 3/06</i> (2006.01)</p> |
|--|--|

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ НВУ-ИНФЕКЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХЕЛАТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

- | | |
|--|---|
| <p>(31) 61/648,694</p> <p>(32) 2012.05.18</p> <p>(33) US</p> <p>(43) 2015.04.30</p> <p>(86) PCT/CA2013/050378</p> <p>(87) WO 2013/170385 2013.11.21</p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
РЕПЛИКОР ИНК. (СА)</p> <p>(72) Изобретатель:
Базине Мишель, Вайан Эндрю (СА)</p> <p>(74) Представитель:
Саломатина И.С., Фелицына С.Б.
(RU)</p> | <p>(56) WO-A1-2012021985
WO-A1-2006042418
WO-A1-2009109665</p> |
|--|---|

(57) Изобретение предусматривает способ лечения НВУ-инфекции, заключающийся во введении олигонуклеотида пациенту в виде хелатного комплекса, где указанный хелатный комплекс состоит из двух или более указанных олигонуклеотидов, связанных межмолекулярно по меньшей мере одним двухвалентным катионом, где указанные олигонуклеотиды включают олигонуклеотиды поли-(АС) типа с фосфоротиоатными связями и/или их О-метирированные производные, причем указанный двухвалентный катион представляет собой кальций и/или магний.

B1

034799

034799

B1

Родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет по отношению к предварительной заявке на патент США № 61/648694, представленной 18 мая 2012 г., содержание которой целиком включается в настоящий документ путем отсылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Данное изобретение относится к способам лечения заболеваний, включающим введение больному или применение хелатных комплексов олигонуклеотидов. Эти заболевания могут включать вирусные инфекции, гиперхолестеринемию, гипертриглицеридемию, болезнь Альцгеймера, прионные заболевания или мышечную дистрофию Дюшенна.

Уровень техники

Хелатные комплексы олигонуклеотидов представляют собой комплексы, образованные двумя или более олигонуклеотидами, молекулы которых соединены друг с другом двух- или более валентными катионами металлов. Хелатирующая способность олигонуклеотидов, которой обусловлены побочные эффекты, связанные с введением этих веществ пациентам, в хелатных комплексах олигонуклеотидов нейтрализована. Введение хелатных комплексов олигонуклеотидов - это новый подход к лечению с помощью олигонуклеотидов нуждающихся в том индивидов, позволяющий ослабить побочные эффекты, связанные с введением не хелатных олигонуклеотидов (с лечебной целью олигонуклеотиды обычно вводят в виде натриевых солей). В число этих побочных эффектов входят дрожь, лихорадка и озноб при внутривенной инфузии или уплотнение, воспаление и боль в месте инъекции при подкожном введении. Кроме того, когда олигонуклеотиды вводятся в виде хелатных комплексов, возможно улучшение фармакокинетических показателей, что при той же дозировке повышает терапевтическую эффективность по сравнению с не хелатными олигонуклеотидами, как описано в публикации международной патентной заявки WO 2012/021985 и в публикации заявки на патент США № 2012/0046348, которые полностью включаются в настоящий документ путем отсылки.

Таким образом, желательно располагать хелатными комплексами олигонуклеотидов, действующими по механизму, зависимому от последовательности или не зависимому от нее, которые должны обладать терапевтическим эффектом в отношении многих патологических состояний, включая вирусные инфекции, гиперхолестеринемию, гипертриглицеридемию, болезнь Альцгеймера или прионные заболевания, и которые приводят к ослаблению или исчезновению побочных эффектов, часто связанных с введением олигонуклеотидов.

Соответственно, в данной области техники существует настоятельная потребность в способе лечения указанных выше патологических состояний, который бы включал введение нуждающемуся в том индивиду фармацевтической композиции, содержащей хелатный комплекс олигонуклеотидов.

Раскрытие изобретения

Настоящее изобретение предусматривает способ лечения HBV-инфекции, заключающийся во введении олигонуклеотида пациенту в виде хелатного комплекса, где указанный хелатный комплекс, состоит из двух или более указанных олигонуклеотидов, связанных межмолекулярно по меньшей мере одним двухвалентным катионом, где указанные олигонуклеотиды включают олигонуклеотиды поли-(AC) типа с фосфоротиоатными связями и/или их O-метилированные производные, причем указанный двухвалентный катион представляет собой кальций и/или магний.

Согласно изобретению указанный хелатный комплекс олигонуклеотидов содержит по меньшей мере один олигонуклеотид с одним остатком рибозы, модифицированным по положению 2'.

Согласно изобретению указанный хелатный комплекс олигонуклеотидов содержит по меньшей мере один олигонуклеотид, в котором каждый остаток рибозы O-метилирован по положению 2'.

Согласно изобретению указанный хелатный комплекс олигонуклеотидов содержит по меньшей мере один олигонуклеотид, в котором имеется по меньшей мере один 5'-метилцитозин.

Согласно изобретению указанный хелатный комплекс олигонуклеотидов содержит по меньшей мере один олигонуклеотид, где все цитозины являются 5'-метилцитозинами.

Согласно изобретению указанный хелатный комплекс олигонуклеотидов содержит по меньшей мере один олигонуклеотид, где все рибозы являются 2' O-метилированными, а все цитозины являются 5'-метилцитозинами.

Согласно изобретению указанный хелатный комплекс содержит по меньшей мере один олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 2.

Согласно изобретению указанный хелатный комплекс содержит по меньшей мере один олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 11.

Согласно изобретению указанный хелатный комплекс содержит по меньшей мере один олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 18.

Краткое описание чертежей

В дальнейшем тексте имеются ссылки на прилагаемые фигуры.

Фиг. 1 иллюстрирует общие физико-химические свойства олигонуклеотидов. А) Разделение REP 2006 и 21-мерного тиофосфатного олигонуклеотида с определенной нуклеотидной последовательностью путем жидкостной хроматографии высокого разрешения. В) Идентификация вариантов 21-мерного оли-

гонуклеотида путем масс-спектрологии. С) Идентификация вариантов REP 2006 путем масс-спектрологии.

Фиг. 2А иллюстрирует общие химические свойства олигонуклеотидов, не зависящие от нуклеотидной последовательности. Олигонуклеотид с любой последовательностью является полимером, обладающим как гидрофобностью, так и гидрофильностью. Если связи в олигонуклеотиде тиофосфатные (на этом рисунке отобразено в химической структуре), это увеличивает его гидрофобность, но не влияет на гидрофильность. На фиг. 2В изображено, как в принципе выглядит хелатированность олигонуклеотидов с катионами двухвалентными и трехвалентными металлов. Катионы металлов (представлены закрашенными кружочками) связывают собой гидрофильные поверхностные области олигонуклеотидов, образуя межмолекулярные ионные мостики (представлены овалами) между двумя или, соответственно, тремя атомами кислорода или серы в фосфодиэфирных связях.

Фиг. 3 иллюстрирует модель поведения олигонуклеотидов в растворе в присутствии катионов двух- или поливалентных металлов при различных концентрациях олигонуклеотида и катионов двухвалентного металла. А) При низких концентрациях катионов двухвалентного/трехвалентного металла и олигонуклеотида образуются димеры - хелатные комплексы низкого порядка. В) При возрастании концентрации катионов двухвалентного/трехвалентного металла больше олигонуклеотидов участвуют в образовании хелатных комплексов в растворе. С) При увеличении концентрации олигонуклеотида в присутствии катионов двухвалентного/трехвалентного металла в возрастающей концентрации образуются хелатные комплексы более высоких порядков. Все хелатные комплексы, соответствующие фиг. А-С, растворимы в водных растворах благодаря наличию гидрофильных поверхностей, экспонированных в водную среду. D) При достаточно высокой концентрации олигонуклеотида и металла все гидрофильные поверхности олигонуклеотидных молекул оказываются внутри хелатных комплексов, а в водную среду обращены только гидрофобные поверхности. В результате хелатные комплексы выпадают в осадок.

Фиг. 4 иллюстрирует, как сказывается поведение хелатных комплексов олигонуклеотидов, несущих флуоресцентную метку, на поляризации флуоресценции. С увеличением концентрации металла размеры (и масса) образующихся хелатных комплексов олигонуклеотидов возрастают (см. фиг. 3), так что их перемещение в растворе замедляется. Более медленное перемещение этих комплексов в растворе ведет к усилению поляризации флуоресценции и увеличению величины mP.

Осуществление изобретения

Как описано в публикации международной патентной заявки WO 2012/021985 и в заявке на патент США № 2012/0046348, основные положения которых полностью включены в настоящий документ путем отсылки, в водных растворах, содержащих любые простые катионы двухвалентных металлов (примерами которых могут служить, не ограничиваясь перечисленным здесь, Ca^{2+} , Mg^{2+} и Fe^{2+}) олигонуклеотиды существуют не в виде солей, а в виде хелатных комплексов. Эти комплексы содержат димеры олигонуклеотидов или молекулярные структуры более высокого порядка, в которых фосфодиэфирные скелеты олигонуклеотидов связаны через ионные мостики - катионы двухвалентных металлов (см. фиг. 2В). При определенных концентрациях олигонуклеотидов и ионов металлов эти хелатные комплексы стабильны в водном растворе и эффективно захватывают в комплекс любые двухвалентные катионы, изолируя их от взаимодействий в растворе. Образование хелатных комплексов вероятно также с простыми катионами металлов, несущими заряд $3+$ или более (см. фиг. 2В). Таким образом, олигонуклеотиды действуют как хелатирующие агенты, способные захватывать катионы поливалентных металлов, и не образуют соли с катионами поливалентных металлов.

Хелатные комплексы олигонуклеотидов могут содержать катионы различных поливалентных металлов, включая кальций, магний, кобальт, марганец, барий, никель, медь, цинк, кадмий, ртуть и свинец. Показано, что хелатирование катионов этих поливалентных металлов приводит к образованию хелатных комплексов, содержащих два или более олигонуклеотидов, связанных друг с другом через катионы металла, причем хелатирование происходит с олигонуклеотидами длиной более шести нуклеотидов, в которых есть фосфодиэфирные или тиофосфатные связи. При необходимости каждая связь в олигонуклеотиде тиофосфатная. Хелатирование также происходит с олигонуклеотидами, модифицированными по положению 2' рибозы (например, 2'-О-метилированные) или содержащие модифицированные основания, например 5'-метилцитозин или 4-урацил. Модифицированными могут быть 2'-положения всех остатков рибозы и одно или более оснований или все основания (например, все цитозины представлены 5'-метилцитозином). Кроме того, хелатные комплексы олигонуклеотидов могут содержать олигонуклеотиды с множественными модификациями, например каждая связь является тиофосфатной, каждый остаток рибозы модифицирован в положении 2' и каждое основание модифицировано. Ниже описываются модификации олигонуклеотидов, совместимые с образованием хелатных комплексов. Также хелатирование катионов металлов не зависит от последовательности нуклеотидов, но определяется физико-химическими свойствами, общими для всех олигонуклеотидов (см. фиг. 2А).

Хотя образование хелатных комплексов олигонуклеотидов возможно с катионами любого металла, хелатные комплексы олигонуклеотидов, предназначенные для использования в качестве лекарственных средств, должны предпочтительно содержать только кальций и/или магний, но могут включать в следовых количествах железо, марганец, медь или цинк; они не должны содержать кобальт, барий, никель

кадмий, ртуть, свинец или любой другой двухвалентный металл (не упомянутый здесь).

Важно, что образование хелатных комплексов олигонуклеотидов не происходит с катионами одновалентных металлов, например натрия и калия, а также с ионом аммония (NH_4^+); с любым одновалентным металлом образование хелатных комплексов олигонуклеотидов очень маловероятно. Таким образом термин "соли олигонуклеотидов" правильнее ограничить только солями олигонуклеотидов с одновалентными катионами или с катионами, с которыми не образуется хелатных комплексов олигонуклеотидов.

По меньшей мере часть известных временных взаимодействий олигонуклеотидов с белковыми компонентами крови, по всей вероятности, опосредуется взаимодействием олигонуклеотидов с белками, связывающими металлы, например альбумином, и белками зависящего от кальция каскада свертывания крови. Поэтому, когда олигонуклеотиды вводятся в виде хелатных комплексов (что исключает или значительно ослабляет их склонность взаимодействовать с белками, связывающими двухвалентные металлы), эти взаимодействия с белками крови сокращаются и в результате уменьшаются побочные эффекты, связанные с введением олигонуклеотидов (например, временное противосвертывающее действие) и благодаря этому может увеличиться доля введенных олигонуклеотидов, которая достигает органов-мишеней (например, печени, легких или селезенки) по сравнению с не хелатированными олигонуклеотидами. До настоящей работы роль такого ослабления взаимодействия с белками в терапевтическом воздействии не была известна и не описывалась.

Для исследования межмолекулярных взаимодействий часто применяется метод поляризации флуоресценции. Этот метод включает мечение изучаемого вещества (то есть какого-либо олигонуклеотида) флуоресцентным агентом, например флуоресцеинизотиоцианатом (FITC). В растворе меченое вещество свободно перемещается в силу броуновского движения, в результате чего при возбуждении световым излучением соответствующей длины волны возникает слабо поляризованная флуоресценция. При наличии лиганда с достаточной молекулярной массой (по меньшей мере, такой же величины, как у изучаемого вещества) взаимодействие изучаемого вещества с лигандом приводит к существенному подавлению свободного перемещения комплекса в растворе. В результате ограничения свободного перемещения в растворе испускание флуоресценции становится в значительной степени поляризованным. Таким образом можно оценить взаимодействия в растворе без физических ограничений связывающихся веществ. При этом определяют безразмерную величину mP (степень поляризации), прямо пропорциональную той части молекул изучаемого вещества, которая связалась в реакции. Например, если с определенным лигандом связалась очень малая часть молекул изучаемого вещества, то будет наблюдаться очень небольшая степень поляризации флуоресценции, то есть низкие значения mP . Если же с определенным лигандом (или при более высокой концентрации лиганда) связалась значительная часть молекул изучаемого вещества, то будет наблюдаться существенная степень поляризации флуоресценции и, соответственно, большие значения mP . Таким образом, варьируя концентрацию лиганда в присутствии фиксированного количества изучаемого вещества, несущего флуоресцентную метку, можно получить изотермы связывания для определенных взаимодействий этого вещества с лигандом.

В данной работе для изучения образования олигонуклеотидных комплексов в присутствии катионов поливалентных металлов использовались различные флуоресцентно меченные олигонуклеотиды. Для отслеживания комплексообразования по поляризации флуоресценции требуется пометить олигонуклеотиды флуоресцентным агентом; эта метка присоединяется к олигонуклеотиду на его 3'-конце так, что она не затрагивает азотистое основание или фосфодиэфирный скелет этого олигонуклеотида. Кроме того флуоресцентная метка отстоит от молекулы олигонуклеотида за счет жесткости связи при 3'-углеродном атоме, что исключает какие бы то ни было влияния на нормальное поведение данного олигонуклеотида в растворе. Таким образом, сделанные в данной работе наблюдения относительно образования олигонуклеотидных комплексов по данным о поляризации флуоресценции меченых олигонуклеотидов адекватно представляют поведение немеченых олигонуклеотидов - в составе комплексов или нет - в растворе.

В данной области техники общепринятой практикой введения олигонуклеотидов нуждающимся в том индивидам является использование натриевых солей олигонуклеотидов. Примерами использовавшихся в клинических испытаниях многочисленных препаратов, в которых олигонуклеотиды представлены в виде солей натрия, являются фомивирсен (ISIS 2922), миромерсен (ISIS 301012), трековирсен (GEM 91), кустирсен (OGX-011/ISIS 112989), генасенс (G3139), апринокарсем (ISIS 3531/LY 900003), PRO-51 (GSK 2402968) и ALN-RSV01 (Geary et al., 2002, Clin. Pharmacokinetics, 41: 255-260; Yu et al., 2009, Clin. Pharmacokinetics, 48: 39-50; Sereni et al., 1999, J. Clin. Pharmacol., 39: 47-54; Chi et al., 2005, J. Nat. Cane. Inst., 97: 1287-1296; Marshall et al., 2004, Ann. Oncol., 15: 1274-1283; Grossman et al., 2004, Neuro-Oncol, 6: 32-40; Goemans et al., 2011 NEJM 364: 1513-1522). На сегодняшний день нет опубликованных данных от каком бы то ни было парентеральном введении препаратов олигонуклеотидов с кальцием или магнием, или любыми другими двухвалентными металлами.

Многие побочные эффекты, связанные с введением натриевых солей олигонуклеотидов, можно объяснить их хелатирующим действием. Противосвертывающий эффект олигонуклеотидов в крови по меньшей мере частично обусловлен хелатированием кальция сыворотки олигонуклеотидами, из-за чего нарушается зависимый от кальция каскад свертывания крови. Хелатирование сывороточного кальция и

проистекающая из этого гипокальциемия также согласуется с побочными эффектами, наблюдающимися при внутривенном введении олигонуклеотидов и включающие лихорадку, дрожь, слабость и понижение артериального давления крови (последнее имеет место при быстрой внутривенной инфузии или при инъекции). При введении олигонуклеотидов путем подкожной инъекции в месте укола отмечаются уплотнение, воспаление, болезненность при прикосновении и боль, что, по меньшей мере, отчасти обусловлено тем, что олигонуклеотид хелатирует кальций и, возможно, другие двухвалентные катионы, например магния, или поливалентные катионы в месте инъекции. При введении олигонуклеотидов в виде хелатных комплексов многие из описанных выше побочных эффектов уменьшаются (см. публикацию WO 2012/021985).

Термин "олигонуклеотид" относится к олигомерам или полимерам рибонуклеиновой кислоты (РНК) и/или дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Этот термин включает олигонуклеотиды, в состав которых входят модифицированные основания (в том числе 5-метилцитозин и 4'-тиоурацил), сахара и ковалентные связи между нуклеотидами (скелет), равно как и олигонуклеотиды, в которых имеются не встречающиеся в природе компоненты, функционирующие сходно с таковыми. Такие модифицированные или замещенные олигонуклеотиды могут быть предпочтительнее природных форм, поскольку желаемые свойства, например пониженная иммунореактивность, усиленное поглощение клетками, повышенное сродство к нуклеиновым кислотам-мишеням и повышенная стабильность в присутствии нуклеаз. Также олигонуклеотиды также могут быть двухцепочечными.

Олигонуклеотиды могут включать различные модификации, например стабилизирующие модификации; в молекуле олигонуклеотида может быть по меньшей мере одна модификация в фосфодиэфирной связи и/или в остатке сахара, и/или в азотистом основании. Например, олигонуклеотид может включать (перечисленное далее не имеет ограничительного характера) одну или более модификаций или может быть полностью модифицированным, так что во всех связях, или во всех остатках сахара, или во всех азотистых основаниях имеются упомянутые выше модификации. В число модифицированных связей входят тиофосфатные связи, дитиофосфатные связи и/или метилфосфонатные связи. При том, что модифицированные связи полезны, в олигонуклеотидах могут быть и фосфодиэфирные связи. К полезным модификациям относятся также (перечисленное далее не имеет ограничительного характера) модификации по положению 2' остатка сахара, в том числе 2'-О-алкильные модификации, например 2'-О-метильная, 2'-О-метоксиэтильная (2'-МОЕ), 2'-амино, 2'-галоген (например, 2'-фтор); и/или нециклические аналоги нуклеотидов. В данной области техники известны и другие 2'-модификации, например замкнутые нуклеиновые кислоты (LNA); они тоже могут использоваться. В частности, на протяжении молекулы олигонуклеотида могут быть модифицированные связи или же модифицирована каждая связь, например связь тиофосфатная; олигонуклеотид может быть 3'- или 5'-кэпирован; в олигонуклеотиде может быть концевая связь 3'-5'; олигонуклеотид может содержать конкатемер или представлять собой конкатемер, состоящий из двух или более олигонуклеотидных последовательностей, соединенных линкером (линкерами). Модификации азотистых оснований могут включать 5'-метилирование цитозина (5'-метилцитозин как основание, 5'-метилцитидин как нуклеотид) и/или включение тиогруппы в положение 4' урацила (4'-тиоурацил как основание, 4'-тиоуридин как нуклеотид). Если условия синтеза позволяют, могут быть объединены различные химически совместимые модифицированные связи, например в олигонуклеотиды могут быть тиофосфатные связи, 2'-модификация рибозы (например, 2'-О-метилирование) и модифицированное азотистое основание (например, 5'-метилцитозин). Олигонуклеотид может быть полностью модифицированным указанными способами (например, каждая связь тиофосфатная, каждый остаток рибозы модифицирован по положению 2' и каждое азотистое основание тоже модифицировано).

В настоящем описании термин "противовирусный олигонуклеотид" относится к любому олигонуклеотиду, который в силу своей специфической биохимической активности (зависящей от нуклеотидной последовательности или не зависящей от нее) обладает способностью напрямую либо опосредованно подавлять какой-либо аспект репликации вируса или напрямую либо опосредованно усиливать способность организма-хозяина избавляться от инфекции с помощью иммунологических или иных механизмов.

В настоящем описании термин "противовирусный хелатный комплекс олигонуклеотидов" относится к комплексу двух или более противовирусных олигонуклеотидов, молекулы которых в растворе связаны катионом поливалентного металла. Противовирусный хелатный комплекс олигонуклеотидов может содержать два или более олигонуклеотидов с различными нуклеотидными последовательностями.

В настоящем описании термин "олигонуклеотид, снижающий уровень холестерина [в крови]" относится к любому олигонуклеотиду, который в силу своей специфической биохимической активности (зависящей от нуклеотидной последовательности или не зависящей от нее) обладает способностью напрямую либо опосредованно снижать аномально повышенный суммарный уровень холестерина и/или уровень липопротеинов низкой/очень низкой плотности в сыворотке крови индивида.

В настоящем описании термин "хелатный комплекс олигонуклеотидов, снижающий уровень холестерина в крови" относится к комплексу двух или более олигонуклеотидов, снижающих уровень холестерина в крови, молекулы которых связаны катионом поливалентного металла. Хелатный комплекс олигонуклеотидов, снижающих уровень холестерина в крови, может содержать два или более олигонуклеотидов с различными нуклеотидными последовательностями.

В настоящем описании термин "олигонуклеотид, снижающий уровень триглицеридов [в крови]" относится к любому олигонуклеотиду, который в силу своей специфической биохимической активности (зависящей от нуклеотидной последовательности или не зависящей от нее) обладает способностью напрямую либо опосредованно снижать аномально повышенный уровень триглицеридов в сыворотке крови индивида.

В настоящем описании термин "хелатный комплекс олигонуклеотидов, снижающий уровень триглицеридов в крови" относится к комплексу двух или более олигонуклеотидов, снижающих уровень триглицеридов в крови, молекулы которых связаны катионом поливалентного металла. Хелатный комплекс олигонуклеотидов, снижающих уровень триглицеридов в крови, может содержать два или более олигонуклеотидов с различными нуклеотидными последовательностями.

В настоящем описании термин "олигонуклеотид, противодействующий болезни Альцгеймера" относится к любому олигонуклеотиду, который в силу своей специфической биохимической активности (зависящей от нуклеотидной последовательности или не зависящей от нее) обладает способностью:

А) напрямую либо опосредованно прекращать, замедлять или обращать накопление или экспрессию β -амилоида в головном мозгу;

В) напрямую либо опосредованно прекращать, замедлять или обращать образование или рост характерных для болезни Альцгеймера бляшек в головном мозгу; и/или

С) напрямую либо опосредованно прекращать, замедлять или обращать нарушение неврологических функций, связанное с прогрессированием болезни Альцгеймера.

В настоящем описании термин "хелатный комплекс олигонуклеотидов, противодействующий болезни Альцгеймера" относится к комплексу двух или более олигонуклеотидов, противодействующий болезни Альцгеймера, молекулы которых связаны катионом поливалентного металла.

В настоящем описании термин "противопрionenный олигонуклеотид" относится к любому олигонуклеотиду, который в силу своей специфической биохимической активности (зависящей от нуклеотидной последовательности или не зависящей от нее) обладает способностью:

А) напрямую либо опосредованно прекращать, замедлять или обращать образование прионных белков в периферических областях организма или в головном мозгу; и/или

В) напрямую либо опосредованно прекращать, замедлять или обращать нарушение неврологических функций, связанное с прионным заболеванием.

В настоящем описании термин "противопрionenный хелатный комплекс олигонуклеотидов" относится к комплексу двух или более противопрionenных олигонуклеотидов, молекулы которых в растворе связаны катионом поливалентного металла. Противопрionenный хелатный комплекс олигонуклеотидов может содержать два или более олигонуклеотидов с различными нуклеотидными последовательностями.

В настоящей заявке термин "вырожденный олигонуклеотид" означает одноцепочечный олигонуклеотид, каждое положение нуклеотидной последовательности которого неоднозначно (N), например NNNNNNNNNN. Каждое основание синтезируется так, что данный олигонуклеотид фактически представлен смесью различных случайным образом составившихся нуклеотидных последовательностей одной и той же длины и с одинаковыми физико-химическими свойствами. Например, в случае вырожденного олигонуклеотида длиной 40 оснований на долю любой конкретной последовательности в такой популяции теоретически приходится лишь $1/4^{40}$ или $8,3 \times 10^{-25}$ от всего количества. Поскольку 1 моль = $6,022 \times 10^{23}$ молекул и поскольку 1 моль 40-мерного олигонуклеотида должен весить приблизительно 12-14 кг (в зависимости от нуклеотидной последовательности и от имеющихся модификаций), то в любом препарате любой олигонуклеотид с какой-то конкретной последовательностью встречается не более одного раза. Таким образом, как бы то ни было хелатирование или биологическая активность, наблюдаемые в данном препарате, должны быть обусловлены не зависящими от нуклеотидной последовательности физико-химическими свойствами олигонуклеотидов, поскольку вряд ли можно ожидать, что какой-либо конкретный олигонуклеотид с определенной нуклеотидной последовательностью, будучи единственной молекулой в своем роде в составе препарата, проявится какой-то активностью, обусловленной его нуклеотидной последовательностью.

В качестве дальнейшей иллюстрации этих соображений в примере 1 сравниваются свойства олигонуклеотида REP 2006 (40-мерный олигонуклеотид с вырожденной полностью тиофосфатной нуклеотидной последовательностью) и 21-мерный олигонуклеотид с определенной нуклеотидной последовательностью (тоже полностью тиофосфатной) путем жидкостной хроматографии высокого давления и масс-спектрометрии; это сравнение ясно показывает, что любой олигонуклеотид сходного размера и с такими же химическими модификациями (то есть тиофосфатный) будет обладать очень похожими или точно такими же физико-химическими свойствами, на которые не влияет нуклеотидная последовательность (см. фиг. 1A-C).

В настоящей заявке термин "полимерная нуклеиновая кислота" (NAP) обозначает любой одноцепочечный олигонуклеотид, не обладающий никакими функциональными свойствами, специфичными для его нуклеотидной последовательности. Биохимическая активность NAP не зависит от распознавания олигонуклеотидов Toll-подобными рецепторами (TLR), аптамерного взаимодействия, для которого тре-

буется специфическая пространственная структура олигонуклеотида, проистекающая из его нуклеотидной последовательности. NAP могут включать модификации оснований и/или связей и/или остатков сахара, описанные выше.

Олигонуклеотиды могут оказывать свое действие путем различных механизмов которые могут зависеть от нуклеотидной последовательности или же не зависеть от нее. Зависимые от нуклеотидной последовательности механизмы - это те, для активности которых требуется специфическая нуклеотидная последовательность и активность которых снижается при одном или более изменениях этой последовательности. Специфическая нуклеотидная последовательность, требующаяся для активности данного механизма, может охватывать весь олигонуклеотид или только какую-то его часть (мотив). Примеры олигонуклеотидов, действие которых зависит от их нуклеотидной последовательности, включают:

1. Антисмысловые олигонуклеотиды, одноцепочечные или двухцепочечные; например, малые интерферирующие РНК (siRNA) или короткие РНК, образующие шпильки (shRNA)), комплементарны определенному участку вирусной или хозяйской матричной РНК (мРНК), ассоциированной с патологическим состоянием (вирусной инфекцией или нарушением регуляции холестерина) и, оказавшись в клетке, они служат маркером для деградации этих мРНК-мишеней рибонуклеазой H или РНК-индуцируемым комплексом выключения гена (RISC).

2. Олигонуклеотиды, создающие стерическое препятствие, - это одноцепочечные антисмысловые олигонуклеотиды, комплементарные определенному участку мРНК, но не активирующие рибонуклеазу H, а в результате гибридизации с мРНК-мишенью образующие двухцепочечную структуру, которая стерически не дает белкам нормально действовать на этой мРНК. Такие олигонуклеотиды можно использовать для того, чтобы блокировать трансляцию определенных мРНК или чтобы помешать посттранскрипционному сплайсингу и созреванию определенных мРНК. Такие олигонуклеотиды можно сконструировать таким образом, чтобы они блокировали активацию рибонуклеазы H (поскольку она не участвует в механизме действия этих олигонуклеотидов) за счет модификации отдельных или всех остатков рибозы по положению 2' (например, 2'-О-метиляции) в этих олигонуклеотидах.

3. Аптамеры - это олигонуклеотиды, которые, принимая специфическую пространственную конформацию, способны к взаимодействию с определенными белками (вирусными или хозяйскими), но не взаимодействуют существенно с ДНК или РНК организма-хозяина. К аптамерам также относятся шпигельмеры, которые содержат "зеркальные" (L) нуклеотиды, которые придают устойчивость к нуклеазному расщеплению.

4. Иммуностимулирующие олигонуклеотиды, содержащие специфический мотив из шести нуклеотидов (XXCGXX), который обуславливает их способность стимулировать иммунный ответ у млекопитающих. Оптимальный мотив варьирует у разных видов в значительной, но строго зависит от последовательности, связывающейся с XXCGXX.

5. МикроРНК связываются с природными микроРНК, ассоциированными с патологическим состоянием (вирусной инфекцией или нарушением регуляции холестерина), и блокируют их функционирование.

Антисмысловые олигонуклеотиды можно использовать при различных патологических состояниях, например прицельно подавлять активность вируса путем ускорения деградации вирусных мРНК (например, ALN-RSV01; Zamora et al., 2011, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 183: 531-538) или прицельно подавлять образование липопротеинов низкой плотности (LDL) и очень низкой плотности (VLDL) путем ускорения деградации мРНК аполипопротеина B100 (например, миромерсен [Кунамро™]; Raal et al., 2010, Lancet 375: 998-1006). Антисенсовые олигонуклеотиды можно также использовать для коррекции неправильного сплайсинга транскриптов генов, который может приводить к образованию аномальных белков, например для коррекции неправильного сплайсинга транскрипта гена, кодирующего дистрофии, происходящего при мышечной дистрофии Дюшенна (например, PRO-051, Goemans et al., 2011, NEJM 364: 1513-1522).

МикроРНК можно использовать при различных патологических состояниях, например для гибридизации с природными микроРНК в клетке, например с miR122, которая участвует в регуляции образования LDL и VLDL, а также при гепатите С (например, миравирсен: Janssen et al., Mar 27 2013 NEJM, опубликовано в электронном виде до выхода в печать).

Сообщалось только об одном примере олигонуклеотидов, действие которых не зависит от их нуклеотидной последовательности, - это тиофосфатные NAP, избирательно взаимодействующие с амфипатическими белковыми структурами зависимым от размера (длины) образом в силу своих физико-химических свойств как амфипатических полимеров (см., например, патент США № 8008269).

Любой олигонуклеотид - безотносительно к тому, как осуществляется его биологическое действие в физиологических условиях, - попав в кровоток, где имеется некоторое количество свободных двухвалентных или трехвалентных катионов должен вступать во взаимодействия, опосредованные двухвалентными катионами. Но большая часть двухвалентных металлов сыворотки связана с белками (например, кальций связан с белками, связывающими кальций, - альбумином, тромбином и фибриногеном), поэтому в условиях *in vivo* значительная часть опосредуемых двухвалентными металлами взаимодействий, в которых участвуют олигонуклеотиды, - это, вероятнее всего, взаимодействия с белками, а не с другими

олигонуклеотидами (в хелатных комплексах). Показано, что многие олигонуклеотиды, оказавшись *in vivo*, действуют предсказуемым на основании их конструкции (одноцепочечные антисмысловые, малые интерферирующие, короткие образующие шпильки или микроРНК) образом. Поэтому опосредуемые кальцием взаимодействия олигонуклеотидов с белками, хотя и влияют на переносимость олигонуклеотидов (как описано в публикации международной патентной заявки WO 2012/021985 и в публикации заявки на патент США № 2012/0046348), но, по-видимому, являются обратимыми, так что они не препятствуют накоплению олигонуклеотидов в органах, внутриклеточному транспорту олигонуклеотидов и взаимодействию олигонуклеотидов с нуклеиновыми кислотами-мишенями *in vivo*.

Обратимость указанных взаимодействий, как резонно полагают, зависит от опосредуемых двухвалентными металлами взаимодействий олигонуклеотидов с белками. Поскольку введение хелатных комплексов олигонуклеотидов будет, скорее всего, мешать этим белковым взаимодействиям (как описано в публикации заявки на патент США № 2012/0046348), специалист в данной области техники может ожидать, что введение хелатных комплексов олигонуклеотидов изменит фармакокинетические показатели (и накопление в органах) олигонуклеотидов, особенно тиофосфатных олигонуклеотидов (PS-ONs), которые, как известно, накапливаются в почках, печени, легких и селезенке и которые, как считается, зависят от взаимодействий олигонуклеотидов с белками.

Получение хелатных комплексов олигонуклеотидов, описанное в публикации заявки на патент США № 2012/0046348 включает взаимодействие олигонуклеотидов в отсутствие каких бы то ни было белков и в присутствии катионов двухвалентных металлов в концентрациях, превышающих нормальное их содержание в кровотоке; в свете того, что известно на этот счет в данной области техники (см. указанную выше заявку), резонно предполагать, что в составе образовавшихся хелатных комплексов олигонуклеотиды теряют свою способность нормально взаимодействовать с белками в крови (все олигонуклеотиды проходят через кровоток независимо от их дальнейшей судьбы *in vivo*). Хотя введение хелатных комплексов должно предотвращать или ослаблять хелатирующее действие олигонуклеотидов *in vivo* и таким образом уменьшать побочные эффекты, возникающие вследствие хелатирующего действия олигонуклеотидов, до настоящей работы не было предсказуемым или очевидным, что олигонуклеотиды, взятые для получения препаратов, содержащих хелатные комплексы олигонуклеотидов (которые образовались *ex vivo* и в не физиологической среде), попав в организм в составе хелатных комплексов, сохранят способность накапливаться в определенных органах и оказывать свое специфическое действие (по сравнению с активностью олигонуклеотидов, вводимых в виде солей натрия). Поскольку хелатные комплексы олигонуклеотидов образуются не *in vivo*, они могут и не быть способными диссоциировать или транспортироваться внутри клетки или связываться с "правильным" белком и/или вступать в другие биохимические взаимодействия *in vivo*, чтобы осуществить свои функции, например гибридоваться с комплиментарным участком ДНК или РНК, или взаимодействовать с амфипатическим спиральным участком в белке или взаимодействовать как аптамер (специфично в отношении нуклеотидной последовательности) с определенным белком. Также олигонуклеотиды, вводимые индивиду в виде преобразованных хелатных комплексов, могут меньше накапливаться в нужном месте организма (по сравнению с такими же олигонуклеотидами, вводимыми в виде солей). Таким образом, до настоящей работы не было ясно, что в физиологической среде или введенные индивиду хелатные комплексы олигонуклеотидов обладают теми же биохимическими функциями, что и соли не хелатированных олигонуклеотидов.

Любому олигонуклеотиду присущи хелатирующие свойства и способность в растворе образовывать хелатные комплексы с двухвалентными металлами, поэтому, если для какого-нибудь конкретного олигонуклеотида продемонстрировать сохранение его биологической активности при введении в организм в виде хелатного комплекса, то это будет явным свидетельством и подтверждением того, что любой олигонуклеотид может сохранить свою биологическую активность *in vivo* в составе хелатного комплекса, независимо от специфического механизма действия или мишени (то есть заболевания, подлежащего лечению).

В последнее время разработан ряд противовирусных лекарственных средств на основе олигонуклеотидов для лечения вирусных инфекций, которые содержат NAP, а именно REP 9AC (REP 2055 или SEQ ID NO: 2), REP 9AC' (REP 2139 или SEQ ID NO: 18) и REP 9AC-m (REP 2148 или SEQ ID NO: 11) для лечения гепатита В (инфекции HBV), митаверсен для лечения гепатита С (инфекции HCV) и ALN-RSV01 для лечения инфекций, вызываемых респираторно-синцитиальными вирусами (RSV). У каждого из этих олигонуклеотидов свой механизм действия: полимеры на основе нуклеиновых кислот блокируют проникновение HBV в организм, а также предотвращают высвобождение поверхностного антигенного белка HBV (HBsAg) в кровь (этот белок подавляет иммунные функции), митаверсен (микроРНК) блокирует действие микроРНК miR-122, о которой известно, что она играет роль в репликации HCV, а ALN-RSV01 (малая интерферирующая РНК) блокирует синтез белка капсида RSV, предотвращая формирование вирионов RSV. Все эти олигонуклеотидные препараты весьма эффективно вызывают нужные эффекты у пациентов: под действием REP 9AC/REP 9AC' из крови исчезает HBsAg, митаверсен эффективно подавляет функцию miR-122, а ALN-RSV-01 не дает синтезироваться капсидному белку. Но во всех этих трех случаях олигонуклеотидный препарат вводится индивиду парентерально и с этим связаны такие побочные эффекты, как лихорадка, озноб, дрожь при внутривенной инфузии или боль, воспаление и уплотне-

ние в месте укола при подкожных инъекциях.

Некоторые олигонуклеотидные препараты проявили эффективность при гиперхолестеринемии и гипертриглицеридемии у людей. К ним относятся миромерсен (Kynamro™), который является препаратом второго поколения на основе антисмыслового олигонуклеотида, подавляющего синтез аполипопротеина В100, PCS-GalNAc, представляющий собой конъюгат углеводного компонента и малой интерферирующей РНК, мишенью которого являются PCSK9 и NAP (см. пример V).

Показано также, что NAP способны предотвращать развитие прионных заболеваний *in vitro* и *in vivo* у животных (Kocisko et al., 2006, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50: 1034-1044).

Применение олигонуклеотидов для коррекции неправильного сплайсинга РНК, с которым связаны некоторые патологические состояния, тоже стало принятым терапевтическим вмешательством (Du and Gatti, 2009, *Curr. Op. Mol. Ther.*, 11: 116-123). В случае мышечной дистрофии Дюшенна разработан олигонуклеотидный препарат PRO-051, который связывает РНК дистрофина в ходе ее созревания и вызывает пропуск экзона 51 в зрелой мРНК, в результате чего восстанавливается нормальное образование дистрофина в пораженных мышечных волокнах (Goemans et al., 2011, *NEJM* 364: 1513-1522). Однако введение PRO-051, как оно делалось до сих пор, сопровождается локальной реакцией в месте инъекции, обусловленной по меньшей мере отчасти связанными с хелатированием свойствами олигонуклеотидов, как описано в публикации заявки на патент США № 2012/0046348.

Желательно было бы любой препарат на основе олигонуклеотидов получать в виде хелатов, чтобы свести к минимуму связанные с введением олигонуклеотидов побочные эффекты, при условии, что олигонуклеотиды в виде хелатных комплексов сохраняют свою биохимическую функциональность. В настоящей работе продемонстрировано, что возможно получить олигонуклеотиды в виде хелатных комплексов так, что они сохраняют свою биохимическую функциональность. Хелатные комплексы олигонуклеотидов в составе лекарственных препаратов могут происходить от любых олигонуклеотидов с противовирусной активностью, примеры которых представлены в таблице 1.

Таблица 1. Примеры олигонуклеотидов, получаемых в виде хелатных комплексов.

Тип олигонуклеотида	Тип нуклеиновой кислоты	Нуклеотидная последовательность (5' – 3')	Модификации
NAP	ДНК	(AC) ₂₀ (SEQ ID NO:2)	Все связи тиофосфатные
NAP	ДНК	(CA) ₂₀ (SEQ ID NO:10)	Все связи тиофосфатные
NAP	ДНК	(A-5 ³ MeC) ₂₀ (SEQ ID NO:11)	Все связи тиофосфатные

NAP	ДНК	(5'MeC-A) ₂₀ (SEQ ID NO:12)	Все связи тиофосфатные
NAP	РНК	(2'OMeA-2'OMeC) ₂₀ (SEQ ID NO: 13)	Все связи тиофосфатные
NAP	РНК	(2'OMeC-2'OMeA) ₂₀ (SEQ ID NO:14)	Все связи тиофосфатные
NAP	ДНК	(AG) ₂₀ (SEQ ID NO:3)	Все связи тиофосфатные
NAP	ДНК	(GA) ₂₀ (SEQ ID NO:15)	Все связи тиофосфатные
NAP	ДНК	C ₄₀ (SEQ ID NO:1)	Все связи тиофосфатные
NAP	ДНК	(TC) ₂₀ (SEQ ID NO: 5)	Все связи тиофосфатные
NAP	ДНК	(CT) ₂₀ (SEQ ID NO: 16)	Все связи тиофосфатные
NAP	ДНК	(TG) ₂₀ (SEQ ID NO: 6)	Все связи тиофосфатные
NAP	ДНК	(GT) ₂₀ (SEQ ID NO: 17)	Все связи тиофосфатные
NAP	РНК	(2'OMe, 5'MeC-2'OMeA) ₂₀ (SEQ ID NO:4)	Все связи тиофосфатные
NAP	РНК	(2'OMeA-2'OMe, 5'MeC) ₂₀ (SEQ ID NO:18)	Все связи тиофосфатные
МикроРНК	LNA / ДНК	CCATTGTCACA ^m CTC ^m CA (SEQ ID NO:7)	Все связи тиофосфатные LNA (жирным шрифтом) (^m C = 5'MeC)
Микро РНК	ДНК/ РНК	Нуклеотидная последовательность,	Все связи тиофосфатные, может содержать LNA или

		соответствующая микроРНК хозяина	РНК с модификацией по положению 2' рибозы
Анти-смысловый	ДНК / РНК	Нуклеотидная последовательность, соответствующая мРНК вируса или хозяина или транскрипту гена	Все связи тиофосфатные, может содержать часть или всю РНК с модификацией по положению 2' рибозы
siРНК/shРНК	Двухцепочечная РНК / ДНК	Нуклеотидная последовательность, соответствующая белку X НВV	Может содержать РНК с модификацией по положению 2' рибозы, тиофосфатную связь
siРНК	Двухцепочечная РНК / ДНК	GGCUCCUAGCAAAGUCAAG _d T _d T (SEQ ID NO:8) + CUUGACUUUGCUAAGAGCC _d T _d T (SEQ ID NO:9) Нуклеотидная последовательность, соответствующая мРНК белка N RSV	Вся РНК кроме дезокситимидина (_d T) может содержать тиофосфатные связи
siРНК/shРНК	Двухцепочечная РНК / ДНК	Нуклеотидная последовательность, соответствующая вирусной мРНК	Может содержать РНК с модификацией по положению 2' рибозы, тиофосфатные связи
Анти-смысловый	РНК / ДНК	GCCTCAGTCTG ^m CTT ^m CGCAC _C (SEQ ID NO:20)	Все связи тиофосфатные 2'МОЕ РНК (жирным шрифтом) (^m C = 5'МеС)
Анти-смысловый	РНК или ДНК	мишень - PKCS9	Все связи тиофосфатные, может содержать 5'МеС
siРНК	Двухцепочечная РНК / ДНК	мишень - PKCS9	Может содержать РНК с модификациями по положению 2' рибозы, тиофосфатные связи, конъюгаты GalNAc
Анти-смысловый	РНК	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU (SEQ ID NO:19)	Все связи тиофосфатные, все остатки рибозы 2'-О- метилированы

LNA = замкнутая нуклеиновая кислота, 2'OMe = 2'-О-метил, 2'МОЕ = 2'-метоксиэтил, 5'МеС = 5'-метилцитозин; si - малая интерферирующая; sh - короткая образующая шпильки.

Приведенные выше композиции могут включать физиологически и/или фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные или связующие вещества и/или другие эксципиенты. Свойства носителя могут зависеть от пути введения препарата. Термин "фармацевтически приемлемый" в отношении носителя, вспомогательного или связующего вещества и/или иного эксципиента относится к таким указанным ингредиентам, которые можно вводить индивидуально, включать в описанные в настоящем документе композиции и которые не вредят их фармакологической активности. Фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные вещества или основы и/или другие эксципиенты, которые можно использовать в фармацевтических композициях, описанных в настоящем документе, включают (но не ограничиваются перечисленным здесь) следующие вещества: ионообменные вещества, окись алюминия, стеарат алюми-

ния, лецитин, самоэмульгирующиеся системы доставки лекарственных средств (SEDDS), поверхностно-активные вещества, используемые в лекарственных формах (например, Tween или другие сходные полимерные матриксы), сывороточные белки (например, человеческий сывороточный альбумин), забуферивающие вещества (например, фосфаты), глицин, сорбиновая кислота, сорбат калия, смеси частичных глицеридов насыщенных жирных кислот растительного происхождения, вода, соли или электролиты (например, протаминсульфат, двузамещенный фосфат натрия, однозамещенный фосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилипирролидон, производные целлюлозы, полиэтиленгликоль, карбоксиметилцеллюлоза натрия, полиакрилаты, воска, блок-сополимеры полиэтилена-полиоксипропилена, полиэтиленгликоль, ланолин, каприлат натрия или тетрадецилмальтозид (TDM), производные TDM или другие алкилированные сахараиды. Для лучшей доставки в организме композиций, описанных в настоящем документе, можно использовать также α -, β - и γ -циклодекстрин или химически модифицированные производные, например гидроксиалкилциклодекстрины, включая 2- и 3-гидроксипропил- β -циклодекстрины или иные солюбилизирующие производные.

Композиции, описанные в настоящем документе, могут содержать другие терапевтические агенты, описанные ниже, и при их получении могут использоваться обычно применяемые твердые или жидкие основы или разбавители, а также фармацевтические вспомогательные вещества, подходящие в желаемому способу введения (например, связующие вещества, консерванты, стабилизирующие агенты, ароматизаторы и другие эксципиенты); применение указанных ингредиентов осуществляется известными в области получения фармацевтических композиций методами.

Композиции, описанные в настоящем документе, можно вводить индивиду любыми подходящими способами, например перорально (например, в форме жидкой суспензии, таблеток, капсул, гранул или порошка); подязычно; буккально; парентерально, например путем подкожных, внутривенных, внутримышечных, интратекальных инъекций или путем инфузии (например, в виде стерильных водных или неводных растворов или суспензий, пригодных для инъекций); интраназально (например, путем вдыхания аэрозольных форм); местно (например, в форме крема или мази); ректально (например, в форме суппозитория или клизмы); в составе единиц дозирования, содержащих нетоксичные фармацевтически приемлемые основы или разбавители. Композиции по данному изобретению можно вводить, например, в форме, пригодной для немедленного высвобождения или для продолжительного высвобождения. Немедленное или продолжительное высвобождение достигается применением подходящих фармацевтических композиций или, в частности в случае продолжительного высвобождения, применением тех или иных приспособлений, например подкожных имплантатов или осмотических систем. Таким образом, приведенные выше композиции можно приспособить для введения любым из следующих путей: интраокулярным; пероральным; энтеральным; вдыханием; подкожной, внутримышечной, внутривенной, интратекальной инъекцией или инфузией; интратрахеальной, внутривенной инъекцией или инфузией; местно.

Примеры композиций для перорального введения включают суспензии, которые могут содержать, например, микрокристаллическую целлюлозу для придания объема, альгиновую кислоту или альгинат натрия в качестве суспендирующего агента, метилцеллюлозу в качестве усилителя вязкости, подсластители или ароматизирующие агенты из числа известных в данной области техники; таблетки с немедленным высвобождением активного начала, которые могут содержать, например, микрокристаллическую целлюлозу, фосфат кальция, крахмал, стеарат магния и/или лактозу и/или иные известные в данной области техники эксципиенты, связующие вещества, наполнители, дезинтегрирующие агенты, разбавители и вещества, способствующие скольжению. Композиции по данному изобретению могут вводиться в организм через ротовую полость подязычно и/или буккально. Можно использовать, например, такие лекарственные формы, как формованные таблетки, прессованные таблетки или лиофилизированные таблетки. Например, композиции по данному изобретению можно объединять с быстро растворяющимися разбавителями, например маннитом, лактозой, сахарозой и/или циклодекстринами. В таких составах могут содержаться также высокомолекулярные эксципиенты, например целлюлоза (авицел) или полиэтиленгликоли (PEG). Такие композиции могут также включать эксципиенты, способствующие адгезии к слизистой, например гидроксипропилцеллюлозу (HPC), гидроксипропилметилцеллюлозу (HPMC), карбоксиметилцеллюлозу натрия (SCMC), сополимеры малеинового ангидрида (например, Gantrez) и агенты, влияющие на высвобождение, например сополимеры акриловой кислоты (например, Carbopol 934). Для облегчения изготовления и применения препарата могут использоваться также вещества, способствующие скольжению, смазывающие и стабилизирующие агенты, ароматизаторы и красители.

Эффективные количества описанных в настоящем документе соединений специалист в данной области техники может определить по примерной дозировке для взрослых, составляющей от около 0,1 до 50 мг активного вещества/кг массы тела; такое количество можно вводить в один или несколько приемов, определяя дробность и величину разовой дозы в индивидуальном порядке, например 1-5 раз в сутки или многократно на протяжении недели, выбранной для введения препарата. Следует учесть, что конкретная дозировка и частота введения могут индивидуально варьировать и зависеть от различных факторов, включая активность используемых компонентов, их метаболическую стабильность и продолжительность действия, видовую принадлежность, возраст, массу тела, общее состояние, пол и рацион индивида,

способ и время введения, скорость выведения из организма и клиренс, сочетание принимаемых индивидом лекарственных препаратов и степень тяжести патологического состояния индивида. Предпочтительные индивиды, подлежащие лечению по данному изобретению, включают животных, наиболее предпочтительно млекопитающих, например человека и домашних животных (собак, кошек и проч.).

Настоящее описание поясняется приведенными ниже примерами.

Пример I. Образование хелатных комплексов олигонуклеотидов

На фиг. 1А изображены результаты разделения путем высокоэффективной жидкостной хроматографии двух олигонуклеотидных препаратов, одновременно нанесенных на гидрофобную колонку. Первый из этих препаратов - внутренний стандарт, представляющий собой 21-мерный тиофосфатный олигонуклеотид с определенной нуклеотидной последовательностью, а второй - это REP 2006 (40-мерный выроджденный тиофосфатный олигонуклеотид). Оба этих препарата выходят с колонку отдельным пиком, что определяется только их физико-химическими свойствами (а именно молекулярными размерами и гидрофобностью); их нуклеотидные последовательности существенно не влияют на физико-химические свойства и, соответственно, на разделение указанных веществ. Внутренний стандарт сходит с колонки компактным пиком с несколько меньшим временем удерживания, чем REP 2006, только из-за разницы в молекулярных размерах этих двух олигонуклеотидов. Отметим, что "плечи" по обеим сторонам пика, соответствующего REP 2006, обусловлены присутствием укороченных последовательностей, наличие которых обычно при получении более длинных олигонуклеотидов. Несмотря на гетерогенность (по последовательности) REP 2006, при хроматографическом разделении он дает столь же хорошо выраженный пик, что и 21-мерная определенная нуклеотидная последовательность, и это иллюстрирует тот факт, что все варианты олигонуклеотидов в препарате REP 2006 обладают одинаковыми физико-химическими свойствами, хотя в нем присутствует очень большое число различных последовательностей. После хроматографического разделения пиков REP 2006 и 21-мерного олигонуклеотида проводят масс-спектрометрический анализ (MS), чтобы идентифицировать варианты, присутствующие в пределах этих выраженных пиков (фиг. 1В и 1С).

На фиг. 1В видно, что в 21-мерном олигонуклеотиде выявляется единственный вариант с мол. массой 7402,6 Да, что согласуется с ожидаемым для тиофосфатного олигонуклеотида с определенной нуклеотидной последовательностью. А вот при MS-анализе REP 2006 (фиг. 1С) выявляется очень большое число вариантов, молекулярные массы которых демонстрируют почти совершенное нормальное распределение, что согласуется с полной вырожденностью анализируемого олигонуклеотида. Эти молекулярные массы варьируют от C_{40} (наименьший вариант) до A_{40} (самый крупный вариант), которых очень мало, а число вариантов возрастает (интенсивность пика) по мере приближения величины массы к середине диапазона. Это объясняется тем, что число различных последовательностей с близкими значениями молекулярной массы увеличивается. Тот факт, что все различные варианты олигонуклеотидов, присутствующие в REP 2006, характеризуются одним и тем же временем удерживания на гидрофобной колонке в ходе хроматографического разделения, ясно показывает, что все олигонуклеотиды одного размера и с одинаковыми химическими модификациями (тиофосфатные связи) должны иметь очень близкие, если не одинаковые, физико-химические свойства, и в этом аспекте могут считаться функционально сходными в любом применении или свойстве, не зависящем от нуклеотидной последовательности конкретной молекулы олигонуклеотида. Таким образом, образование любого хелатного комплекса олионуклеотидов, наблюдаемое с каким-либо конкретным вырожденным олигонуклеотидом (например, REP 2003, REP 2004, см. табл. 2), не может зависеть от нуклеотидных последовательностей присутствующих олигонуклеотидных молекул, а должно зависеть от неизменных физико-химических свойств, присущих любому из этих вариантов.

Изучалось взаимодействие аммониевых солей олигонуклеотидов с катионами различных двухвалентных металлов методом поляризации флуоресценции, как описано выше. В ходе синтеза олигонуклеотидов к каждому олигонуклеотиду на 3'-конце посредством "жесткого" трехуглеродного линкера присоединяли флуоресцеинизотиоцианат (FITC); при этом использовались известные общепринятые реагенты и протоколы синтеза. Эти олигонуклеотиды оставались в виде солей аммония. Используя в данном примере олигонуклеотиды представлены в табл. 2.

Таблица 2. Одноцепочечные олигонуклеотиды, использовавшиеся в примере 1

Олигонуклеотид	Последовательность (5' – 3')	Модификации
REP 2032-FL	N ₆	PS (ДНК)
REP 2003-FL	N ₁₀	PS (ДНК)
REP 2004-FL	N ₂₀	PS (ДНК)
REP 2006-FL	N ₄₀	PS (ДНК)
REP 2107-FL	N ₄₀	PS + 2' O Me (PHK)
REP 2086-FL	N ₄₀	2' O Me (PHK)
REP 2031-FL	C ₄₀ (SEQ ID NO:1)	PS (ДНК)
REP 2055-FL	(AC) ₂₀ (SEQ ID NO:2)	PS (ДНК)
REP 2057-FL	(AG) ₂₀ (SEQ ID NO:3)	PS (ДНК)
REP 2139-FL	(2'OMeA-2'OMe, 5'MeC) ₂₀ (SEQ ID NO:18)	PS + 2'OMe (PHK)

N = вырожденная последовательность (случайное включение A, G, C или T);

PS = каждая связь тиофосфатная;

2'-O-Me = каждый остаток рибозы 2'-O-метилирован.

Использовались следующие олигонуклеотиды, меченные на 3'-конце FITC: REP 2032-FL (6-мерный тиофосфатный вырожденный олигодезоксинуклеотид), REP 2003-FL (10-мерный тиофосфатный вырожденный ДНК-олигонуклеотид), REP 2004-FL (20-мерный тиофосфатный вырожденный олигодезоксинуклеотид), REP 2006-FL (40-мерный тиофосфатный вырожденный ДНК-олигонуклеотид), REP 2031-FL (40-мерный полицитидин тиофосфатный ДНК-олигонуклеотид; SEQ ID NO:1), REP 2107-FL (40-мерный тиофосфатный вырожденный РНК-олигонуклеотид, в котором каждый остаток рибозы 2'-O-метилирован), REP 2086-FL (40-мерный вырожденный фосфодиэфирный РНК-олигонуклеотид, в котором каждый остаток рибозы 2'-O-метилирован), REP 2055-FL (тиофосфатный ДНК-олигонуклеотид с последовательностью [AC]₂₀; SEQ ID NO:2), REP 2057 (тиофосфатный ДНК-олигонуклеотид с последовательностью [AG]₂₀; SEQ ID NO:3) и REP 2139-FL (тиофосфатный РНК-олигонуклеотид с последовательностью [2'OMeA-2'OMe, 5'MeC]₂₀, в котором каждый остаток рибозы 2'-O-метилирован и каждый цитозин 5-метилирован; SEQ ID NO:18). Для каждого из этих нуклеотидов готовили исходный 0,5 мМ раствор на трис-буферном растворе (Tris 1 мМ; pH 7,2). Из этих исходных растворов готовили растворы флуоресцентно меченных олигонуклеотидов концентрацией 3 нМ на FP-буферном растворе (трис 10мМ, NaCl 80 мМ, EDTA 1 мМ, β-меркаптоэтанол 10 мМ и Tween®-20 0,1%). EDTA включали в раствор для удаления каких-либо двухвалентных металлов, присутствующих в растворе до измерения поляризации флуоресценции (FP). Каждый из этих буферных растворов также содержал 80 мМ NaCl, чтобы образование олигонуклеотидных комплексов произошло в присутствии молярного избытка одновалентных катионов. К каждому флуоресцентно меченному олигонуклеотиду в растворе прибавляли различные количества солей, а именно хлоридов, степень чистоты которых соответствовала стандарту Американского химического общества (ACS), двухвалентных (2+) металлов (см. табл. 3). За образованием димеров олигонуклеотидов или хелатных комплексов более высокого порядка следили по увеличению поляризации флуоресценции (в количественном выражении безразмерной единицей mP). Усиление образования хелатных комплексов олигонуклеотидов приводило к более значительным изменениям массы (см. фиг. 3). В результате замедлялось перемещение этих хелатных комплексов олигонуклеотидов в растворе и возрастала поляризация испускаемой флуоресценции (см. фиг. 4). Результаты этих экспериментов представлены в табл. 3.

Таблица 3. Образование хелатов различных олигонуклеотидов с двухвалентными металлами

Олигонуклеотид	Поляризация флуоресценции (mP)											
	Кальций (CaCl ₂)				Магний (MgCl ₂)				Железо (FeCl ₂)			
	Нет		Есть		Нет		Есть		Нет		Есть	
	Среднее	Ст. откл.	Среднее	Ст. откл.	Среднее	Ст. откл.	Среднее	Ст. откл.	Среднее	Ст. откл.	Среднее	Ст. откл.
REP 2032-FL	88,0	4,2	102,5	3,5	86*	НО*	103,5	3,5	92,0	7,1	184,5	31,8
REP 2003-FL	68,0	4,2	100,0	9,9	66,5	9,2	92,0	2,8	60,5	10,6	117,5	16,3
REP 2004-FL	74,5	0,7	123,0	0,0	72,5	2,1	112,5	3,5	60,5	3,5	144,0	19,8
REP 2006-FL	92,0	4,2	182,5	4,9	97,0	2,8	175,5	0,7	81,5	12,0	123,0	7,1
REP 2107-FL	73,0	15,6	95,5	0,7	67,5	3,5	87,5	3,5	61,5	3,5	117,5	13,4
REP 2031-FL	58,5	23,3	114,5	2,1	52,5	3,5	89,5	2,1	51,0	7,1	102,0	2,8
REP 2086-FL	77,0	28,3	119,5	2,1	70,0	12,7	114,0	2,8	59,5	4,9	87,0	7,1
REP 2055-FL	48	5,7	172	15,6	60,0	2,8	151,0	7,8	НО	НО	НО	НО
REP 2057-FL	59,5	1,4	152,5	6,36	61	4,24	136,5	2,83	НО	НО	НО	НО
REP 2139-FL	48	7,1	138,5	10,6	46	0,4	142,5	7,8	НО	НО	НО	НО

НО - не определено;

Ст. откл. - стандартное отклонение (средние значения и стандартное отклонение - на основании двух повторных измерений);

*n=1

Со всеми олигонуклеотидами в каждом случае в присутствии двухвалентных катионов наблюдалась значительное усиление поляризации флуоресценции, что указывало на образование хелатных комплексов олигонуклеотидов с катионами двухвалентных металлов. Эти результаты демонстрируют следующее:

В присутствии кальция и магния олигонуклеотиды образуют димеры и комплексы более высокого порядка. Можно ожидать, что такие комплексы образуются с катионами всех других двухвалентных металлов. При образовании этих комплексов олигонуклеотиды взаимодействуют с катионами двухвалентных металлов.

Образование олигонуклеотидных комплексов не может быть обусловлено гибридизацией, то есть спариванием азотистых оснований за счет типичных уотсон-криковских взаимодействий в силу вырожденности изученных олигонуклеотидов. Кроме того, в условиях эксперимента самогибридизация REP 2031 (SEQ ID NO: 1), REP 2055 (SEQ ID NO: 2), REP 2057 (SEQ ID NO: 3) или REP 2139 (SEQ ID NO: 18) происходить не могла.

Образующиеся олигонуклеотидные комплексы стабильны и растворимы в водных растворах; поскольку эти комплексы включают указанные двухвалентные металлы, олигонуклеотидные комплексы оказывают хелатирующий эффект, забирая указанные двухвалентные металлы из раствора, в котором происходило образование комплексов.

Хелатирование двухвалентных металлов и образование хелатных комплексов олигонуклеотидов не зависит от нуклеотидной последовательности олигонуклеотида, о чем свидетельствует наблюдаемое хелатирование в случае вырожденных олигонуклеотидов, а также тот факт, что хелатирование происходит и при наличии модифицированных нуклеотидов, включая модификацию фосфодиэфирной связи или остатка рибозы по положению 2' или модификации азотистых оснований (например, наличие 5'-метилцитозина).

Хелатирование указанных металлов происходит в случае использовавшихся в данном примере олигонуклеотидов длиной 6-40 нуклеотидов; это указывает на то, что хелаты могут образовывать олигонуклеотиды любой длины или длиной более 40 нуклеотидов.

Пример II. Образование хелатных комплексов двухцепочечных олигонуклеотидов

Двухцепочечные олигонуклеотиды получали, как описано в публикации WO 2012/021985, из двух одноцепочечных комплементарных олигонуклеотидов, которые в водном растворе гибридизуются в результате уотсон-криковского спаривания азотистых оснований. Поскольку у двухцепочечных олигонуклеотидов остается фосфодиэфирный скелет, доступный с внешней стороны образовавшейся двойной спирали ДНК, они должны быть способными образовывать хелатные комплексы в присутствии двухвалентных катионов. Чтобы это проверить, были получены два различных двухцепочечных ДНК-олигонуклеотида путем гибридизации REP 2055-FL (40-мерный поли[AC]; SEQ ID NO: 2) с REP 2033-FL (40-мерный поли[TG]; SEQ ID NO: 6) и REP 2057-FL (40-мерный поли[AG]; SEQ ID NO: 3) с REP 2056-FL (40-мерный поли[TC]; SEQ ID NO: 5). Поскольку в результате гибридизации олигонуклеотидов образуется двойная спираль, получающееся увеличение молекулярной массы можно определить по усилению поляризации флуоресценции по сравнению с одноцепочечными олигонуклеотидами, которые использовались для получения двухцепочечной молекулы. Одноцепочечные олигонуклеотиды (REP 2055-FL (SEQ ID NO: 2), REP 2033-FL (SEQ ID NO: 6), REP 2057-FL (SEQ ID NO: 3) и REP 2056-FL (SEQ ID NO: 5)) разбавляли до концентрации 20 нМ FP-буферным раствором (1X). Гибридизацию указанных выше комплементарных пар олигонуклеотидов (10 нМ каждого олигонуклеотида) осуществляли также в FP-

буферном растворе (1X) и проверяли по изменению поляризации флуоресценции. Затем двухцепочечные олигонуклеотиды инкубировали с CaCl_2 (100 мМ) или с MgCl_2 (100 мМ). За образованием хелатных комплексов следили по дальнейшему возрастанию поляризации флуоресценции (см. табл. 4). Результаты этого эксперимента подтверждают успешную гибридизацию олигонуклеотидов обеих комплементарных пар с образованием двухцепочечных олигонуклеотидов, о чем свидетельствовало увеличение поляризации флуоресценции. Прибавление CaCl_2 или MgCl_2 к этим двухцепочечным олигонуклеотидам приводило к дальнейшему возрастанию поляризации флуоресценции, что свидетельствовало о способности двухцепочечных олигонуклеотидов образовывать хелатные комплексы в присутствии катионов двухвалентных металлов. Полученные результаты позволяют с уверенностью полагать, что двухцепочечные олигонуклеотиды могут образовывать хелатные комплексы с любыми двухвалентными катионами, и, как можно ожидать, должны обладать эффектом захвата двухвалентных катионов из раствора.

Таблица 4. Образование хелатных комплексов двухцепочечных олигонуклеотидов

Поляризация флуоресценции (mP)																			
Без металлов								Магний (MgCl_2)				Кальций (CaCl_2)							
REP 2055-FL одна цепь		REP 2033-FL одна цепь		REP 2057-FL одна цепь		REP 2056-FL одна цепь		REP 2055-FL+ REP 2033- FL дуплекс		REP 2056- FL дуплекс		REP 2055-FL дуплекс		REP 2056-FL дуплекс		REP 2055-FL дуплекс		REP 2056-FL дуплекс	
Ср.	Ст. откл.	Ср.	Ст. откл.	Ср.	Ст. откл.	Ср.	Ст. откл.	Ср.	Ст. откл.	Ср.	Ст. откл.	Ср.	Ст. откл.	Ср.	Ст. откл.	Ср.	Ст. откл.	Ср.	Ст. откл.
65,0	7,0	65,7	5,2	78,3	5,2	74,3	7,4	119,7	8,6	124,7	4,5	179,0	15,0	178,0	5,4	167,0	10,4	189,0	5,9

Ср. - среднее значение;

ст. откл. - стандартное отклонение.

Пример III. Противовирусная активность хелатных комплексов олигонуклеотидов в отношении различных вирусов с оболочкой *in vitro*

Были проведены эксперименты с целью проверить противовирусную активность хелатных комплексов олигонуклеотидов применительно к трем различным вирусам, имеющим оболочку, из трех различных семейств: штамм MS вируса простого герпеса 2 (HSV-2) из семейства Herpesviridae, штамм Hong Kong вируса гриппа А (INFA) из семейства Orthomyxoviridae и штамм Long респираторно-синцициального вируса (RSV) из семейства Paramyxoviridae. Для каждого вируса эффективность олигонуклеотида с известной противовирусной активностью сравнивалась с таковой его хелатного комплекса с кальцием путем измерения подавления цитопатического действия вируса на клетки-хозяева *in vitro*. В случае HSV-2 и RSV использовались клетки линии Vero, в случае INFA брали клетки линии MDCK. Для оценки активности против HSV-2 определяли бляшкообразование, для оценки активности против INFA и RSV определяли цитопатический эффект.

Для анализа бляшкообразования клетки линии Vero высевали на 24-луночный планшет (75 000 клеток на лунку), используя культуральную среду для клеток Vero. Планшеты инкубировали, оставляя на ночь при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO_2 . На следующий день отсасывали культуральную среду и прибавляли приблизительно 100 бляшкообразующих единиц (БОЕ) HSV в 200 мкл среды для анализа (культуральная среда для клеток Vero, содержащая 2% FBS). Давали вирусу адсорбироваться на клетках в течение 1 ч при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO_2 . Вещества для испытания разводили средой для анализа, содержащей 0,5% метилцеллюлозы. После указанной инкубации по 1 мл каждого разведения испытуемых препаратов вносили в лунки планшета в трех повторах (вирусный инокулят не отсасывали). Планшеты инкубировали двое суток, чтобы образовались бляшки. Затем из лунок отсасывали среду и клетки фиксировали и окрашивали с помощью 20%-ного метилового спирта, содержащего краситель кристаллический фиолетовый (Crystal Violet). Подсчитывали бляшки под микроскопом и полученные данные изображали графически, выражая воздействие вируса в процентах.

Для анализа цитопатического эффекта смешивали вирус и клетки в присутствии испытываемых веществ и инкубировали требуемое для данного метода время (5 суток в случае HSV-2 и 7 суток в случае INFA и RSV). Каждый из этих вирусов предварительно титровали так, чтобы в контрольных ячейках репликация вируса приводила к 85-95%-ной потере жизнеспособности клеток. Противовирусный эффект или защита клеток наблюдались тогда, когда испытываемое вещество подавляло репликацию вируса. Для определения значений IC_{50} противовирусную активность образцов оценивали по результатам измерений в трех повторах с 12 концентрациями, полученными путем серийного разведения; для определения цитотоксичности (если она была детектируемой) измерения повторяли дважды. В данном эксперименте концентрация FBS во всех определениях составляла 0,5%. В конце анализа содержимое планшетов окрашивали растворимым красителем на основе тетразолия 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфопенил)-2Н-тетразолием (MTS) для определения жизнеспособ-

ности клеток. В метаболически активных клетках MTS превращается митохондриальными ферментами в растворимый формазан (цветной продукт), что позволяет быстро количественно определять жизнеспособность клеток и цитотоксичность испытываемых веществ. Этот реагент представляет собой стабильный раствор, который нет нужды готовить непосредственно перед использованием. В конце анализа в каждую лунку прибавляли 10-25 мкл реагента MTS (конечная концентрация 10%, по объему) и микропланшеты затем инкубировали 4-6 ч при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO₂ для определения жизнеспособности клеток. Планшеты заклеивали адгезивной пленкой (а не закрывали крышкой) и переворачивали несколько раз, чтобы перемешать растворимый формазановый продукт; планшеты считывали спектрофотометрически при длине волны 490/650 нм с помощью планшетного ридера Vmax или SpectraMax Plus (Molecular Devices). На противовирусную активность проверяли хелат кальция-REP 2055 и хелат кальция-REP 2139 (см. табл. 5). REP 2055 (40-мерный тиофосфатный ДНК-олигонуклеотид с последовательностью [AC]₂₀; SEQ ID NO:2) и REP 2139 (40-мерный тиофосфатный РНК-олигонуклеотид с последовательностью [2'OMeA-2'OMe,5'MeC]₂₀; SEQ ID NO:18) являются NAP с широким спектром противовирусной активности в отношении вирусов с оболочкой (Bernstein et al., 2008 Antimicrobial Agents Chemother., 52: 2727-2733; Cardin et al., 2009, Virology J. 6: 214; Vaillant et al., 2006, Antimicrobial Agents Chemother., 50: 1393-1401; Guzman et al., 2007, Antiviral Therapy, 12: 1147-1156; Lee et al., Virology, 372: 107-117; Matsumura et al., 2009, Gastroenterology, 137: 673-681 и патенты США №№ 8008269, 8008270 и 8067385). Для противовирусной активности NAP необходима только одна модификация, а именно чтобы все связи в олигонуклеотиде были тиофосфатными. Дополнительные модификации, включая модификацию остатков рибозы по положению 2' (например, 2'-О-метилирование) и модификацию азотистых оснований (например, 5'-метилцитозин и/или 4'-тиоурацил) пренебрежимо мало влияли на противовирусную активность NAP, но их можно использовать для оптимизации переносимости пациентами (людьми). Для получения кальциевых хелатов REP 2055 и REP 2139 брали 30 мг CaCl₂ на 100 мг олигонуклеотида согласно публикации Международной патентной заявки WO 2012/021985 и публикации заявки на патент США № 2012/0046348.

Таблица 5. Противовирусная активность хелатных комплексов олигонуклеотидов *in vitro*

Вирус//штамм//клетки//анализ	Испытываемое вещество	IC ₅₀ (мкМ)
HSV-2//MS// Vero//образование бляшек	Кальциевый хелат REP 2055	1,91
	Кальциевый хелат REP 2139	0,445
RSV//Long Vero//цитопатическая эффективность	Кальциевый хелат REP 2055	2,97
	Кальциевый хелат REP 2139	2,05
Вирус гриппа A//Hong Kong MCDK//цитопатическая эффективность	Кальциевый хелат REP 2055	7,53

Противовирусная активность кальциевых хелатов REP 2055 и REP 2139 в отношении всех трех взятых для этого исследования вирусов подтвердилась. Это показывает, что олигонуклеотиды NAP с широким спектром противовирусной активности в отношении HSV-2, RSV и INFA можно получать в виде хелатных комплексов без потери противовирусной активности в отношении этих вирусов. Кроме того, поскольку противовирусная активность указанных олигонуклеотидов сохранялась при введении их в виде хелатов, вполне вероятно, что и при введении других классов олигонуклеотидов (антисмысловых, малых интерферирующих РНК, микроРНК и др.) в виде хелатов их биологическая активность существенно не изменится. Возможно, дело здесь в том, что специфические взаимодействия с белками (в случае NAP или аптамеров, или олигонуклеотидов CpG) или нуклеиновыми кислотами (в случае антисмысло-

вых олигонуклеотидов, малых интерферирующих РНК или микроРНК) характеризуются гораздо большей аффинностью, чем взаимодействие олигонуклеотидов с катионами поливалентных металлов, происходящее при образовании хелатных комплексов олигонуклеотидов. В сочетании с тем, что хелаты олигонуклеотидов обладают лучшими токсикологическими свойствами по сравнению с солями не хелатированных олигонуклеотидов, результаты описанных в данном примере экспериментов позволяют полагать, что хелатированные противовирусные олигонуклеотиды могут быть более желательными противовирусными лекарственными средствами, чем не хелатированные. Также можно ожидать, что хелаты олигонуклеотидов, полученные из полимеров на основе нуклеиновых кислот, обладают более широким спектром противовирусной активности в отношении вирусов с оболочкой, как описано в патентах США №№ 8,008,269, 8,008,270 и 8,067,385.

Пример IV. Хелаты олигонуклеотидов - эффективные противовирусные агенты в отношении хронической инфекции вирусом гепатита В у людей

Пациентам с хронической инфекцией вирусом гепатита В (HBV) один раз в неделю вводили в сравнимых по молярному количеству дозах REP 2055, полученный в виде раствора натриевой соли согласно принятому в данной области техники стандарту, описанному выше, и REP 2139, полученный в виде хелатного комплекса с кальцием (брали 30 мг CaCl₂ на 100 мг REP 2139 согласно публикации Международной патентной заявки WO 2012/021985 и публикации заявки на патент США № 2012/0046348). Противовирусный эффект введения в сравнимом режиме дозирования сравнимых по молярному количеству доз натриевой соли NAP (REP 2055) и кальциевого хелата NAP (REP 2139-Ca) оценивали по уменьшению уровня антигенного белка поверхности HBV (HBsAg) в крови (измерения проводили с помощью диагностической платформы Abbott Architect™). Результаты определения противовирусного эффекта REP 2055 и REP 2139-Ca представлены в табл. 6.

Таблица 6. Изменения уровня HBsAg в сыворотке крови у индивидов с хронической инфекцией вирусом гепатита В под действием REP 2055 и REP 2139-Ca

NAP	Пациент	Сывороточный уровень	Сывороточный уровень
		HBsAg до лечения (мМЕ/мл*)	HBsAg после лечения (мМЕ/мл*)
REP 2055	1	934	0,25
	2	1885,4	0,38
	3	384,1	0
	4	126645,07	0,03
	5	158180	0
	6	36996,00	7
	7	4762,5	43,7
REP 2139-Ca	1	70050	0,19
	2	13400	0
	3	3654,3	0,34
	4	47689,7	180,44
	5	107659,6	32,15
	6	58937,87	9,91
	7	17988,99	29,21
	8	125000	0,01
	9	1288,56	0,02

*измеряли с помощью количественной тест-системы Abbott Architect™ для HbsAg

REP 2055 и REP 2139-Ca в сравнимых молярных дозах в равной степени блокируют высвобождение субвирусных частиц (SVP) из клеток, зараженных вирусом гепатита В - в этом и состоит терапевтически значимый механизм действия всех NAP против инфекции HBV в целом. Для проявления этой активности NAP требуется, чтобы они транспортировались внутрь гепатоцитов, где оказывают свое действие. У индивидов, зараженных вирусом гепатита В, REP 2055 и REP 2139-Ca, применяемые в сравнимом режиме монотерапии, вызывают сравнимое снижение уровня HBsAg или его исчезновение из крови, что свидетельствует о сравнимой противовирусной активности этих двух различных NAP и о том, что использование REP 2139 в составе хелатного комплекса с кальцием существенно не влияет на его накопление в органах, внутриклеточный транспорт или биохимическую активность.

Описанные выше результаты показывают, что хелатные комплексы олигонуклеотидов, обладая способностью улучшать переносимость олигонуклеотидов, вероятно, путем блокирования некоторых

белковых взаимодействий, также способны распадаться таким образом, что не изменяются накопление олигонуклеотидов в органах (в приведенном выше примере - в печени) или их внутриклеточный транспорт 9 в приведенном выше примере - внутрь гепатоцитов, что имеет значение для биохимической активности NAP, в частности, и многих олигонуклеотидов в целом. Способность хелатных комплексов олигонуклеотидов предотвращать белковые взаимодействия, участвующие в некоторых аспектах переносимости олигонуклеотидов (как утверждает в публикации заявки на патент США № 2012/0046348), в то время как остаются практически неизменными накопление олигонуклеотидов в органах, их внутриклеточный транспорт и биохимическая активность, для специалиста в данной области техники не следует из сказанного в заявке на патент США № 2012/0046348.

Эти результаты ясно демонстрируют эффективность хелатных комплексов олигонуклеотидов для лечения хронической инфекции HBV. Можно с уверенностью ожидать, что и другие олигонуклеотиды, обладающие противовирусной активностью в отношении вируса гепатита В, или эффективные против других вирусных инфекций *in vivo* или в организме человека, можно получить в виде кальциевых хелатных комплексов с теми преимуществами, о которых говорится в настоящем документе, и что при этом их терапевтическая эффективность сохранится, а в то же время переносимость такого лекарственного препарата при введении в организм или в процессе всего курса лечения улучшится. Описанное в настоящем документе открытие того факта, что образование хелатных комплексов олигонуклеотидов не влияет на эффект этих олигонуклеотидов в организме человека, для терапевтического воздействия которых требуется накопление в определенных органах, внутриклеточная компартментализация и специфические биохимические взаимодействия, позволяет утверждать, что любые олигонуклеотиды, которые можно включить в состав хелатных комплексов, можно использовать для достижения ожидаемого от этих олигонуклеотидов терапевтического эффекта независимо от механизма их действия - будь то антисмысловые олигонуклеотиды, малые интерферирующие РНК, микроРНК, короткие РНК, образующие шпильки, или NAP - с тем преимуществом, что уменьшаются побочные эффекты, связанные с введением олигонуклеотидов в организм, о чем говорится в публикации заявки на патент США № 2012/0046348.

Кроме того, поскольку показано, что противовирусное действие NAP в отношении HBV обусловлено блокированием высвобождения поверхностного антигена этого вируса, то они должны быть также активны против вируса гепатита D (дельта), образование которого зависит от HBV (хотя они и не родственны), поскольку HDV использует белок HBsAg для своей оболочки. Можно ожидать поэтому, что хелатные комплексы NAP будут активны против инфекции HDV.

Важно, что хелатные комплексы олигонуклеотидов, которые вводили пациентам в приведенном выше примере, вызывали меньшие побочные эффекты, связанные с введением в организм олигонуклеотидов: внутривенную инфузию REP 2139 можно было проделать за 2 ч и она лишь изредка сопровождалась умеренной дрожью или ознобом. В противоположность этому, в случае REP 2055, который вводили пациентам (людям) в виде натриевой соли в дозах, сравнимых по молярному количеству с дозировкой REP 2139-Са, для внутривенной инфузии требовалось более 10 ч, и она почти всегда сопровождалась лихорадкой средней тяжести, ознобом и дрожью. Также кальциевый хелат REP 2139 можно было вводить пациентам (людям) путем ежедневных подкожных инъекций на протяжении 5 недель и при этом не наблюдалось локальных реакций в месте укола, а уровень HBsAg в сыворотке крови снижался. Подкожное введение олигонуклеотидов в виде натриевой соли не обходится без местных реакций вследствие инъекций.

Эти наблюдения показывают, что хелатные комплексы являются полезным средством введения противовирусных олигонуклеотидов нуждающимся в том индивидам, причем в такой форме олигонуклеотидов их противовирусная активность не снижается, а связанные с введением олигонуклеотидов побочные эффекты значительно слабеют.

Эти наблюдения также показывают, что любой NAP или антисмысловый олигонуклеотид (в том числе малые интерферирующие РНК, микроРНК или короткие РНК, образующие шпильки) можно включить в состав хелатных комплексов без ущерба для ожидаемого биологического эффекта и без нарушения специфического распределения олигонуклеотидов в организме или их внутриклеточного транспорта.

Пример V. Снижение уровней триглицеридов и холестерина в сыворотке крови под действием NAP *in vivo*

Для изучения возможности предотвращения гиперхолестеринемии и гипертриглицеридемии при помощи NAP хомякам, получавшим рацион с высоким содержанием фруктозы, на протяжении 4 недель 3 раза в неделю вводили путем внутривенной инъекции REP 2031 - 40-мерную полностью тиофосфатную олигодезоксицитидиловую кислоту (SEQ ID NO: 1). У подопытных животных отслеживали ряд показателей, связанных с гиперхолестеринемией и ожирением (см. табл. 9).

Таблица 9. Эффект REP 2031 у хомяков, получавших рацион, обогащенный фруктозой

Показатель	Нормальная пища	Рацион с высоким содержанием фруктозы	
	Физиологический раствор	Физиологический раствор	REP 2031 (10 мг/кг)
Холестерин (ммМ)	3,54±0,304	4,432±0,341	3,82±0,215
Триглицериды (мЭкв/л)	2,295±0,045	2,379±0,050	2,286±0,032

Эти результаты показывают, что введение REP 2031 приводит к подавлению возрастания уровней триглицеридов и холестерина, связанному с питанием, обогащенным фруктозой. Следовательно, олигонуклеотиды могут обладать терапевтической активностью - предотвращать гиперхолестеринемию.

Пациентам (людям) с установившейся гиперхолестеринемией и/или гипертриглицеридемией один раз в неделю вводили REP 2055 в виде кальциевого хелатного комплекса. Влияние введения REP 2055 на суммарный уровень холестерина, уровни липопротеинов низкой плотности (LDL) и триглицеридов в сыворотке крови отслеживали с помощью общепринятых лабораторных анализов, протоколов процедур и тест-систем. Влияние REP 2055 на динамику уровня холестерина в сыворотке крови иллюстрируется табл. 10.

Таблица 10. Результаты лечения гиперлипидемии у людей с помощью REP 2055

Пациент	Суммарный холестерин (мг/дл)		Холестерин в LDL (мг/дл)		Триглицериды (мг/дл)	
	До	После	До	После	До	После
1	200	160	95	69	155	83
2	261	135	190	76	130	69
3	243	171	163	107	185	117
4	122	110	40	55	215	104
5	120	118	61	71	93	40

LDL - липопротеины низкой плотности;

До - уровень до введения REP 2055;

После - наименьший уровень при лечении REP 2055

У индивидов с повышенными уровнями холестерина и триглицеридов в крови (пациенты 1-3), лечение REP 2055 привело к снижению суммарного уровня холестерина и холестерина в составе LDL, а также триглицеридов в сыворотке крови. У индивидов с нормальным уровнем холестерина, но умеренно повышенным уровнем триглицеридов (пациенты 4 и 5), лечение REP 2055 существенно не повлияло на суммарный уровень холестерина и уровень холестерина в составе LDL, однако снизило уровень триглицеридов в сыворотке крови. Эти данные свидетельствуют, что NAP REP 2055 способен снижать или нормализовать суммарный уровень холестерина, уровень холестерина в составе LDL и уровень триглицеридов.

В приведенном выше примере два различных NAP (REP 2031 [SEQ ID NO: 1] и REP 2055 [SEQ ID NO: 2]), различающихся по последовательности, но обладающих одинаковыми физико-химическими свойствами, могут оказывать сходное действие *in vivo*, а именно снижать уровни холестерина и триглицеридов в сыворотке крови. Эти результаты ясно демонстрируют не зависимость от нуклеотидной последовательности активность NAP, состоящую в снижении уровней холестерина и триглицеридов в сыворотке крови, и показывают, что любой из описанных в настоящем документе NAP обладает, как можно ожидать, действием, сходным с таковым REP 2013 и REP 2055, проиллюстрированным настоящим документом.

Поскольку активность NAP: противовирусное и антипролиферативное действие, снижение уровней триглицеридов и холестерина в крови - обусловлены не зависящими от нуклеотидной последовательности свойствами тиофосфатных олигонуклеотидов, открытие того факта, что в составе хелатных комплексов NAP сохраняют свою противовирусную активность, проявляющуюся в подавлении вирусной инфекции, убедительно свидетельствует, что введении в организм в виде хелатных комплексов олигонуклеотидов NAP сохраняют также антипролиферативную активность и способность снижать уровни холестерина и триглицеридов в крови.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения HBV-инфекции, заключающийся во введении олигонуклеотида пациенту в виде хелатного комплекса, где указанный хелатный комплекс состоит из двух или более указанных олигонук-

леотидов, связанных межмолекулярно по меньшей мере одним двухвалентным катионом, где указанные олигонуклеотиды включают олигонуклеотиды поли-(AC) типа с фосфоротиоатными связями и/или их O-метилированные производные, причем указанный двухвалентный катион представляет собой кальций и/или магний.

2. Способ по п.1, где указанный хелатный комплекс олигонуклеотидов содержит по меньшей мере один олигонуклеотид с одним остатком рибозы, модифицированным по положению 2'.

3. Способ по любому из пп.1 или 2, где указанный хелатный комплекс олигонуклеотидов содержит по меньшей мере один олигонуклеотид, в котором каждый остаток рибозы O-метилирован по положению 2'.

4. Способ по любому из пп.1-3, где указанный хелатный комплекс олигонуклеотидов содержит по меньшей мере один олигонуклеотид, в котором имеется по меньшей мере один 5'-метилцитозин.

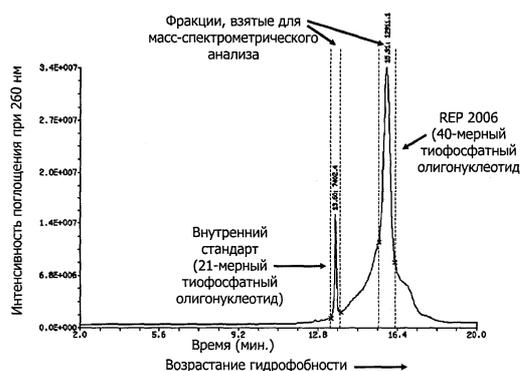
5. Способ по любому из пп.1-4, где указанный хелатный комплекс олигонуклеотидов содержит по меньшей мере один олигонуклеотид, где все цитозины являются 5'-метилцитозинами.

6. Способ по любому из пп.1-5, где указанный хелатный комплекс олигонуклеотидов содержит по меньшей мере один олигонуклеотид, где все рибозы являются 2' O-метилированными, а все цитозины являются 5'-метилцитозинами.

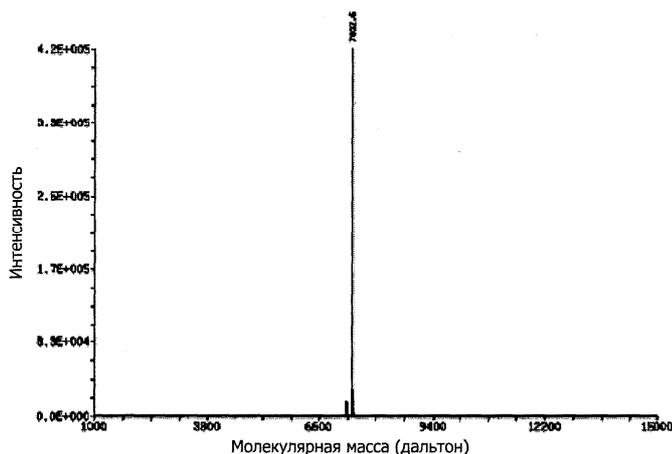
7. Способ по п.1, где указанный хелатный комплекс содержит по меньшей мере один олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 2.

8. Способ по п.1, где указанный хелатный комплекс содержит по меньшей мере один олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 11.

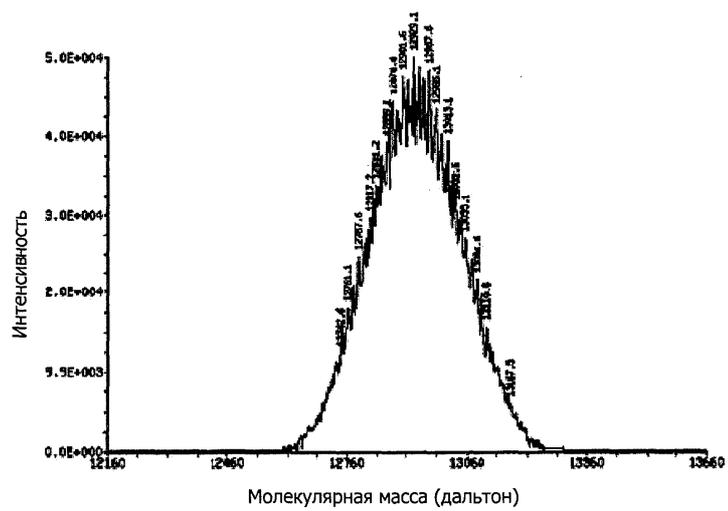
9. Способ по п.1, где указанный хелатный комплекс содержит по меньшей мере один олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 18.



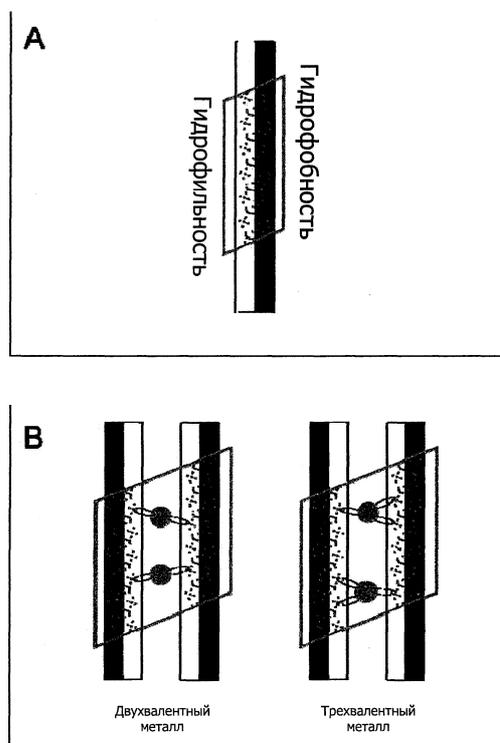
Фиг. 1А



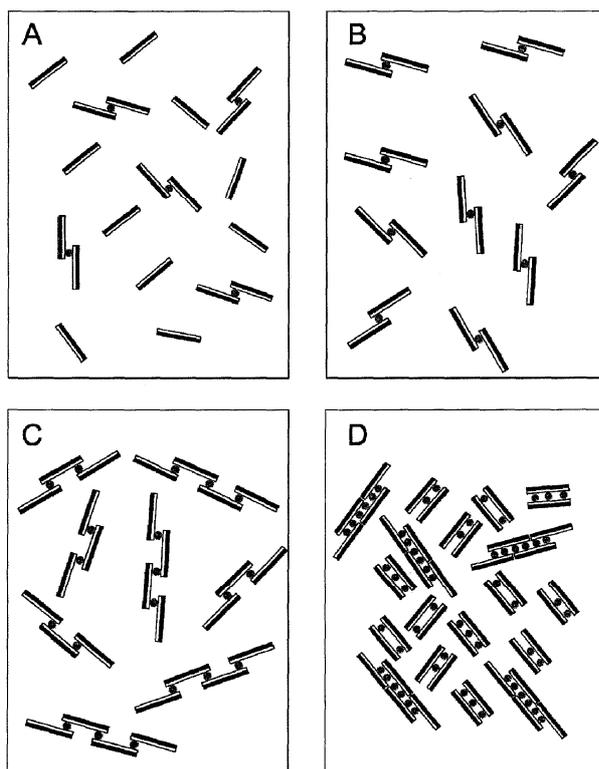
Фиг. 1В



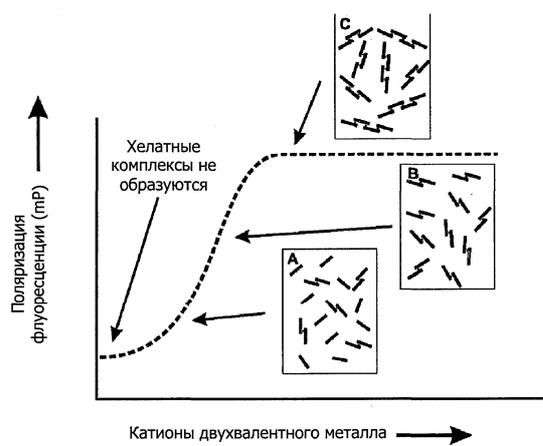
Фиг. 1С



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4