

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035967**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.09.07

(21) Номер заявки
201401278

(22) Дата подачи заявки
2013.05.17

(51) Int. Cl. *A61K 47/48* (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 31/7115 (2006.01)
A61K 31/712 (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

**(54) КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЕПАТИТА В, СОДЕРЖАЩИЕ
ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ ХЕЛАТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ**

(31) 61/648,711; 61/695,035

(32) 2012.05.18; 2012.08.30

(33) US

(43) 2015.04.30

(86) PCT/CA2013/050379

(87) WO 2013/170386 2013.11.21

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
РЕПЛИКОР ИНК. (CA)

(72) Изобретатель:
Базине Мишель, Вайан Эндрю (CA)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) WO-A1-2012021985

WO-A2-2007022642

WO-A1-2007036016

WO-A1-2006042418

WO-A2-2004076474

WO-A2-03037272

MUIR, A.J. et al. Phase 1b study of pegylated interferon lambda 1 with or without ribavirin in patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus infection Hepatology issue of September 2010, Vol 52, No 3, pages 822-832, ISSN 1527-3350, cited in the description, the entire document

WO-A2-2009076679

WO-A1-2009109665

(57) Изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим олигонуклеотидный хелатный комплекс и по меньшей мере один полипептид или пегилированный полипептид. Указанная композиция может быть использована для лечения гепатита В.

035967 B1

035967 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Для данной заявки испрашивается приоритет по предварительной заявке США №61/695035, поданной 30 августа 2012 г., и по предварительной заявке США №61/648 711, поданной 18 мая 2012 г., содержание которых во всей их полноте включено в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим олигонуклеотидный хелатный комплекс (ОН) и один или более полипептидов или пегилированных полипептидов, к способам получения композиций, содержащих олигонуклеотидный хелатный комплекс и один или более полипептидов или пегилированных полипептидов, и к лечению гепатита В указанными композициями.

Уровень техники

Олигонуклеотидные хелатные комплексы (ОН) представляют собой два или более олигонуклеотидов, связанных внутримолекулярно с помощью двухвалентного катиона металла или поливалентного катиона металла иной валентности. Олигонуклеотидные хелатные комплексы (ОН) нейтрализуют при-сущие ОН хелатообразующие свойства, которые могут способствовать связанным с введением этих соединений побочным эффектам. Введение олигонуклеотидных хелатных комплексов является новым способом введения ОН субъекту, при котором побочные эффекты, связанные с введением нехелатных ОН, оказываются смягченными. Эти побочные эффекты могут включать тремор, лихорадку, озноб при внутривенной инфузии или индукцию, воспаление и боль в месте инъекции при подкожном введении. Кроме этого, посредством получения ОН в виде хелатных комплексов их фармакокинетические свойства могут быть улучшены с обеспечением улучшенных лечебных характеристик по сравнению с нехелатируемыми ОН в аналогичной дозировке. Определение характеристик и свойства хелатных комплексов ОН были описаны ранее в международной заявке с номером публикации WO 2012/021985 и заявке США с номером публикации 2012/0046348, которые являются включенными в настоящий документ во всей своей полноте посредством ссылок.

Хелатные ОН комплексы обеспечивают улучшенный способ введения ОН со сниженными побочными эффектами без влияния на биохимическую активность ОН при введении в виде простой натриевой соли.

Хелатные ОН комплексы, содержащие олигонуклеотид, который действует через зависимый от последовательности или независимый от последовательности механизм, могут оказывать терапевтический эффект в случае болезненных состояний, при которых не обеспечивается оптимального результата лечения заболевшего субъекта, получающего терапию хелатным комплексом ОН.

Соответственно в данной области имеется необходимость обеспечения новой композиции, которая содержит хелатный ОН комплекс, такой как в комбинированной рецептуре.

Противовирусные хелатные ОН комплексы, содержащие противовирусный олигонуклеотид, действующий через зависимый от последовательности и независимый от последовательности механизм, могут обладать противовирусным эффектом в отношении различных вирусных инфекций. Эти противовирусные эффекты могут не обеспечивать оптимального терапевтического результата у субъекта с имеющейся вирусной инфекцией, проходящего лечение с использованием хелатного ОН. Дальнейшее улучшение терапевтического результата может быть достигнуто посредством одновременного применения противовирусного хелатного комплекса ОН и иммунотерапии полипептидами с известной противовирусной активностью.

Соответственно в данной области существует потребность в обеспечении новой композиции, которая содержит противовирусный хелатный ОН комплекс в комбинации с противовирусным полипептидом или пегилированным полипептидом. В идеальном случае этот противовирусный полипептид также будет обладать активностью против рассматриваемой вирусной инфекции, либо воздействуя на такую же мишень/биохимический путь, как и рассматриваемый противовирусный хелатный ОН, или же влияя на мишень/биохимический путь, отличные от тех, на которые воздействует данный противовирусный хелатный ОН комплекс.

Краткое изложение существа изобретения

Согласно настоящему описанию далее обеспечивается фармацевтическая композиция, содержащая хелатный ОН комплекс и один или большее количество различных полипептидов.

Согласно настоящему описанию обеспечивается противовирусная фармацевтическая композиция, содержащая противовирусный хелатный ОН комплекс и один или большее количество противовирусных полипептидов или пегилированных полипептидов.

Описывается лечение гепатита В, включающее введение нуждающемуся в лечении субъекту фармацевтической композиции, содержащей хелатный ОН комплекс и полипептид, в частности антивирусный полипептид.

Соответственно описывается применение фармацевтической композиции, содержащей противовирусный хелатный ОН и противовирусный полипептид, для лечения гепатита В.

Обеспечивается фармацевтическая композиция, содержащая олигонуклеотидный (ОН) хелатный комплекс, состоящий из двух или более ОН, связанных внутримолекулярно посредством двухвалентного катиона, и по меньшей мере один полипептид, в частности противовирусный полипептид.

В одном воплощении противовирусный полипептид дополнительно пегилируется.

В другом воплощении двухвалентный катион является щелочноземельным металлом с зарядом 2+.

В еще одном воплощении двухвалентный катион металла является кальцием.

В еще одном воплощении двухвалентный катион металла является магнием.

В еще одном воплощении двухвалентный катион состоит из двух или более различных двухвалентных катионов металла.

В еще одном воплощении двухвалентный катион состоит из кальция и магния.

В еще одном воплощении хелатный ON комплекс содержит по меньшей мере один двухцепочечный олигонуклеотид.

В еще одном воплощении хелатный ON комплекс содержит по меньшей мере один полностью тиофосфорилированный олигонуклеотид.

В еще одном воплощении хелатный ON комплекс содержит по меньшей мере один ON с одной 2'-модифицированной рибозой.

В еще одном воплощении хелатный ON комплекс содержит по меньшей мере один ON со всеми 2'-О-метилованными рибозами.

В еще одном воплощении хелатный ON комплекс содержит по меньшей мере один ON, содержащий по меньшей мере один 5'-метилцитозин.

В еще одном воплощении хелатный ON комплекс содержит по меньшей мере один ON, в котором каждый цитозин является дополнительно метилированным 5'-метилцитозином.

В еще одном воплощении хелатный ON комплекс содержит один олигонуклеотид, выбранный из SEQ ID NO: 2, 4, 10-14, 18.

В еще одном воплощении полипептид является по меньшей мере одним из тимозина $\alpha 1$;

любого α -интерферона или его пегилированных производных;

любого β -интерферона или его пегилированных производных;

любого γ -интерферона или его пегилированных производных;

любого λ -интерферона или его пегилированных производных;

интерферона α -2a, или α -2b, или α -N3;

интерферона β -1a или β -1b;

интерферона γ -1b;

интерферона $\lambda 1$, или $\lambda 2$, или $\lambda 3$;

пегилированного интерферона α -2a, или α -2b, или $\lambda 1$, или $\lambda 2$, или $\lambda 3$;

мирклудекса B;

любого противовирусного цитокина или его пегилированных производных;

тимусного белка A;

любого полипептида, демонстрирующего наличие противовирусной активности или иммуностимулирующего действия.

В еще одном воплощении рецептура этой фармацевтической композиции разработана для подкожного введения.

В другом воплощении эта фармацевтическая композиция разработана для внутривенной инфузии.

В еще одном воплощении эта фармацевтическая композиция разработана по меньшей мере для одного из следующих путей введения: аэрозольная ингаляция, внутриглазное введение, пероральный прием, энтеральное введение, внутримышечная инъекция, интраперитонеальная инъекция, субарахноидальная инъекция, субарахноидальная инфузия, эндотрахеальная, внутривенная инъекция и местное нанесение.

В еще одном воплощении хелатный ON комплекс содержит по меньшей мере один ON, состоящий из SEQ ID NO: 2.

В еще одном воплощении хелатный ON комплекс содержит по меньшей мере один ON, состоящий из SEQ ID NO: 11.

В еще одном воплощении хелатный ON комплекс содержит по меньшей мере один ON, состоящий из SEQ ID NO: 18.

В еще одном воплощении фармацевтическая композиция включает, кроме того, одно или несколько из следующего: энтекавир, тенофовира дизопроксил фумарат, телбувидин, адефовир дипивоксил, ламивудин, рибавирин, теллапревир, боцепривир, GS-7977, теобувир, занамивир, осельтамивир, ганцикловир, фоскарнет, ацикловир, зидовудин, абакавир, лопинавир, ритонавир или эфавиренц.

В еще одном воплощении фармацевтическая композиция содержит, кроме этого, носитель.

Обеспечивается фармацевтическая композиция, содержащая хелатный ON комплекс, содержащий олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 2, и пегилированный интерферон α -2a.

Обеспечивается фармацевтическая композиция, содержащая хелатный ON комплекс, содержащий олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 18, и пегилированный интерферон α -2a.

Обеспечивается фармацевтическая композиция, содержащая хелатный ON комплекс, содержащий олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 11, и пегилированный интерферон α -2a.

Обеспечивается фармацевтическая композиция, содержащая хелатный ON комплекс, содержащий

олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 2 и тимозин $\alpha 1$.

Обеспечивается фармацевтическая композиция, содержащая хелатный ON комплекс, содержащий олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 18 и тимозин $\alpha 1$.

Обеспечивается фармацевтическая композиция, содержащая хелатный ON комплекс, содержащий олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 11, и тимозин $\alpha 1$.

Обеспечивается фармацевтическая композиция, содержащая хелатный ON комплекс, содержащий олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 2, и интерферон α -2b.

Обеспечивается фармацевтическая композиция, содержащая хелатный ON комплекс, содержащий олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 18, и интерферон α -2b.

Обеспечивается фармацевтическая композиция, содержащая хелатный ON комплекс, содержащий олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 11, и интерферон α -2b.

Обеспечивается фармацевтическая композиция, содержащая хелатный ON комплекс, содержащий олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 2, и пегилированный тимозин $\alpha 1$.

Имеется фармацевтическая композиция, содержащая хелатный ON комплекс, содержащий олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 18, и пегилированный тимозин $\alpha 1$.

Обеспечивается фармацевтическая композиция, содержащая хелатный ON комплекс, содержащий олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 11, и пегилированный тимозин $\alpha 1$.

Обеспечивается фармацевтическая композиция, содержащая хелатный ON комплекс, содержащий олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 2, и пегилированный интерферон α -2b.

Имеется фармацевтическая композиция, содержащая хелатный ON комплекс, содержащий олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 18, и пегилированный интерферон α -2b.

Имеется фармацевтическая композиция, содержащая хелатный ON комплекс, содержащий олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 11, и пегилированный интерферон α -2b.

Обеспечивается фармацевтическая композиция, содержащая хелатный ON комплекс, содержащий олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 2, и интерферон $\lambda 1$.

Имеется фармацевтическая композиция, содержащая хелатный ON комплекс, содержащий олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 18, и интерферон $\lambda 1$.

Обеспечивается фармацевтическая композиция, содержащая хелатный ON комплекс, содержащий олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 11, и интерферон $\lambda 1$.

Имеется фармацевтическая композиция, содержащая хелатный ON комплекс, содержащий олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 2, и пегилированный интерферон $\lambda 1$.

Обеспечивается фармацевтическая композиция, содержащая хелатный ON комплекс, содержащий олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 18, и пегилированный интерферон $\lambda 1$.

Обеспечивается фармацевтическая композиция, содержащая хелатный ON комплекс, содержащий олигонуклеотид, состоящий из SEQ ID NO: 11, и пегилированный интерферон $\lambda 1$.

Описанная здесь фармацевтическая композиция может быть получена способом, который содержит растворение по меньшей мере одной натриевой соли олигонуклеотида (ON) в фармацевтически приемлемом водном инертном наполнителе;

постепенное добавление раствора фармацевтически приемлемой соли двухвалентного металла в растворенный ON таким образом, чтобы хелатный ON комплекс оставался растворимым;

растворение одного или нескольких противовирусных полипептидов в совместимом, фармацевтически приемлемом водном инертном наполнителе;

постепенное смешивание раствора противовирусного полипептида с раствором хелатного комплекса ON таким образом, чтобы сохранялась растворимость упомянутого хелатного комплекса ON и противовирусного полипептида.

Также описанная здесь фармацевтическая композиция может быть получена способом, который содержит

растворение по меньшей мере одной натриевой соли олигонуклеотида (ON) в фармацевтически приемлемом водном инертном наполнителе;

постепенное добавление раствора по меньшей мере одной фармацевтически приемлемой соли кальция и/или магния в растворенный ON таким образом, чтобы хелатный ON комплекс оставался растворимым;

растворение одного или нескольких противовирусных полипептидов в совместимом фармацевтически приемлемом водном инертном наполнителе;

постепенное смешивание раствора противовирусного полипептида с раствором хелатного комплекса ON таким образом, чтобы сохранялась растворимость упомянутого хелатного комплекса ON и противовирусного полипептида.

В одном воплощении раствор хелатного комплекса ON и раствор полипептида объединяются непосредственно перед введением фармацевтической композиции.

В другом воплощении пропорция соли двухвалентного металла, добавляемой к растворенному ON,

составляет от 0,1 до 50 мг на 100 мг олигонуклеотида.

В еще одном воплощении конечная концентрация ON составляет от 0,1 до 200 мг/мл.

В другом воплощении соль двухвалентного металла является по меньшей мере одной из хлоридной соли, глюконатной соли, цитратной соли, лактатной соли, малатной соли, аспартатной соли, фумаратной соли, аскорбатной соли, бензоатной соли, эриторбатной соли, пропионатной соли, сульфатной соли или бикарбонатной соли.

В еще одном воплощении раствор соли двухвалентного металла содержит по меньшей мере одно из следующих: кальций, магний; и может содержать в следовых количествах железо (2+), марганец, медь или цинк.

В одном воплощении хелатный ON комплекс и по меньшей мере один полипептид готовятся отдельно.

В другом воплощении хелатный ON комплекс и по меньшей мере один полипептид готовятся для совместного введения с использованием одного или различных путей введения.

Краткое описание чертежей

Далее делается обращение к сопутствующим чертежам.

Фиг. 1 представляет общие физико-химические свойства олигонуклеотидов. А) Совместное выделение REP 2006 и 21-звенного тиофосфорилированного ON с определенной последовательностью методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В) Идентификация компонентов в 21-звенном олигонуклеотиде (ON) посредством масс-спектрологии. В) Идентификация форм в REP 2006 ON посредством масс-спектрологии.

Фиг. 2А представляет общие химические характеристики ON, которые не зависят от олигонуклеотидной последовательности. Независимо от последовательности любой ON существует в виде полимера, который обладает как гидрофобной, так и гидрофильной активностью. Тиофосфорилирование (отображенное в химической структуре на этой фигуре) служит для увеличения гидрофобности ON полимера, но не влияет на гидрофильность.

Фиг. 2В концептуально описывает сущность ON-хелатирования катионов двухвалентного и трехвалентного металлов. Катионы металлов (представлены сплошными кругами серого цвета) связывают гидрофильные поверхности ON полимеров через мостики из ионов металла (представлены в виде эллипсов) между двумя или тремя немостиковыми атомами кислорода или серы в фосфодиэфирных связях.

Фиг. 3 представляет модель поведения раствора олигонуклеотидов в присутствии катионов двухвалентного или поливалентного металлов в условиях варьирования концентраций ON и катионов двухвалентного металла. А) Низкая концентрация катионов двухвалентного/трехвалентного металла, низкая концентрация ON приводят к образованию димеров или хелатных комплексов ON низшего порядка. В) Увеличение концентраций катионов двухвалентного/трехвалентного металла приводит к образованию в растворе более полных хелатных комплексов ON. С) Дальнейшее увеличение концентраций ON в присутствии двухвалентных и трехвалентных металлов обеспечивает возможность получения хелатных комплексов ON высшего порядка с увеличением концентраций металлов. Все хелатные комплексы в (А)-(С) являются растворимыми в водном растворе благодаря наличию гидрофильных поверхностей, подверженных взаимодействию с водной средой и, таким образом, поддерживающих растворимость. D) При достаточной концентрации ON и металла все гидрофильные поверхности находятся в пределах хелатных комплексов ON, оставляя возможность воздействия водной среды только на гидрофобные поверхности. Это приводит к осаждению хелатного комплекса ON.

Фиг. 4 представляет эффект поведения в растворе флуоресцентно меченных олигонуклеотидных хелатных комплексов на флуоресцентную поляризацию. С увеличением концентрации металла размер (и масса) образующихся хелатных комплексов ON также увеличивается (фиг. 3), и вследствие этого их движение в растворе замедляется. Это замедленное перемещение комплекса в растворе приводит к усилению флуоресцентной поляризации и увеличению значения mP (миллиединица поляризации).

Фиг. 5 представляет ВЭЖХ-разделение композиции REP 2055 хелат кальция/интерферон α -2b с применением способа для олигонуклеотидов (олиго-способ), описываемого в примере IV. На хроматограмме полноразмерному пику ON (большая стрелка) предшествуют незначительные пики продуктов неполного синтеза (маленькие стрелки), которые, как правило, являются олигонуклеотидами, в последовательностях которых отсутствует один или больше нуклеотидов по сравнению с полноразмерной последовательностью ON. Этот профиль ВЭЖХ является типичным для всех используемых неочищенных ON (REP 2055, REP 2057 и REP 2148).

Фиг. 6 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания олигонуклеотидов в композиции REP 2055 хелат кальция/интерферон α -2b (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 16,70 мин на фиг. 5). Наблюдаемая масса основной формы составляет 12612,2 Да, с идентификацией ее как REP 2055 (ожидаемая молекулярная масса =12612,5).

Фиг. 7 представляет ВЭЖХ-разделение композиции REP 2055 хелат кальция/интерферон α -2b с применением способа 1 для белков (см. пример IV).

Фиг. 8 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением

содержания пептидов в композиции REP 2055 хелат кальция/интерферон α -2b (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 11,03 мин на фиг. 7). Наблюдаемый пик с массой 19263 Да соответствует интерферону α -2b (ожидаемая молекулярная масса = 19271 Да), а пик с массой 66560 Да соответствует альбумину человека.

Фиг. 9 представляет ВЭЖХ-разделение композиции REP 2057 хелат кальция/интерферон α -2b с применением описываемого здесь олиго-способа (см. пример IV). Как и на фиг. 5, основному пику полноразмерной последовательности REP 2057 предшествуют незначительные пики продуктов незавершенного синтеза.

Фиг. 10 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания олигонуклеотидов в композиции REP 2057 хелат кальция/интерферон α -2b (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 15,46 мин на фиг. 9). Наблюдаемая масса основной формы составляет 13413,5 Да с идентификацией ее как REP 2057 (ожидаемая молекулярная масса = 13413,3).

Фиг. 11 представляет ВЭЖХ-разделение композиции REP 2057 хелат кальция/интерферон α -2b с применением описанного здесь способа 1 для белков (см. пример IV).

Фиг. 12 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания пептидов в композиции REP 2057 хелат кальция/интерферон α -2b (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 11,43 мин на фиг. 11). Наблюдаемый пик с массой 19264 Да соответствует интерферону α -2b (ожидаемая молекулярная масса = 19271 Да), а пик с массой 66618 Да соответствует альбумину человека.

Фиг. 13 представляет ВЭЖХ-разделение композиции REP 2139 хелат кальция/интерферон α -2b с применением описываемого здесь олиго-способа (см. пример IV). Пики продуктов незавершенного синтеза не наблюдаются.

Фиг. 14 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания олигонуклеотидов в композиции REP 2139 хелат кальция/интерферон α -2b (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 19,11 мин на фиг. 13). Наблюдаемая масса основной формы составляет 14095,3 Да с идентификацией ее как REP 2139 (ожидаемая молекулярная масса = 14094,6).

Фиг. 15 представляет ВЭЖХ-разделение композиции REP 2139 хелат кальция/интерферон α -2b с применением описанного здесь способа 1 для белков (см. пример IV).

Фиг. 16 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания пептидов в композиции REP 2139 хелат кальция/интерферон α -2b (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 11,12 мин на фиг. 15). Наблюдаемый пик с массой 19264 Да соответствует интерферону α -2b (ожидаемая молекулярная масса = 19271 Да), а пик с массой 66674 Да соответствует альбумину человека.

Фиг. 17 представляет ВЭЖХ-разделение композиции REP 2148 хелат кальция/интерферон α -2b с применением описываемого здесь олиго-способа (см. пример IV). Пики незначительных продуктов незавершенного синтеза предшествуют основному пику полноразмерной последовательности REP 2148.

Фиг. 18 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания олигонуклеотидов в композиции REP 2148 хелат кальция/интерферон α -2b (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 15,34 мин на фиг. 17). Наблюдаемая масса основной формы составляет 12891,6 Да с идентификацией ее как REP 2148 (ожидаемая молекулярная масса = 12893,6).

Фиг. 19 представляет ВЭЖХ-разделение композиции REP 2148 хелат кальция/интерферон α -2b с применением описанного здесь способа 1 для белков (см. пример IV).

Фиг. 20 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания пептидов в композиции REP 2148 хелат кальция/интерферон α -2b (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 8,44 мин на фиг. 19). Наблюдаемый пик с массой 19265 Да соответствует интерферону α -2b.

Фиг. 21 представляет ВЭЖХ-разделение композиции REP 2006 хелат кальция/тимозин α 1 с применением описываемого здесь олиго-способа (см. пример IV). Пик, элюируемый на 6,31 мин, соответствует тимозину α 1 (стрелка белого цвета), а пик, элюируемый на 15,15 мин, соответствует полноразмерному REP 2006 (стрелка черного цвета).

Фиг. 22 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания олигонуклеотидов в композиции REP 2006 хелат кальция/тимозин α 1 (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 15,15 мин на фиг. 21). Наблюдаемая масса составляет приблизительно 12650-13150 Да, идентифицируя пик как REP 2006 (ожидаемая молекулярная масса = 12612-13092 Да).

Фиг. 23 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания пептидов в композиции REP 2006 хелат кальция/тимозин α 1 (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 6,31 мин на фиг. 21). Наблюдаемая масса основной формы составляет 3108 Да с идентификацией ее как тимозина α 1 (ожидаемая молекулярная масса = 3108 Да).

Фиг. 24 представляет ВЭЖХ-разделение композиции REP 2055 хелат кальция/тимозин α 1 с применением описываемого здесь олиго-способа (см. пример IV). Пик, элюируемый на 6,12 мин, соответствует тимозину α 1 (стрелка белого цвета), а пик, элюируемый на 16,70 мин, соответствует полноразмерному REP 2055 (стрелка черного цвета).

Фиг. 25 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания олигонуклеотидов в композиции REP 2055 хелат кальция/тимозин α 1 (пик на хромато-

грамме ВЭЖХ при 16,70 мин на фиг. 24). Наблюдаемая масса основной формы составляет 12612,1 Да с идентификацией ее как REP 2055 (ожидаемая молекулярная масса =12612,5).

Фиг. 26 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания пептидов в композиции REP 2055 хелат кальция/тимозин $\alpha 1$ (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 6,12 мин на фиг. 24). Наблюдаемая масса основной формы составляет 3107,6 Да с идентификацией ее как тимозина $\alpha 1$ (ожидаемая молекулярная масса =3108 Да).

Фиг. 27 представляет ВЭЖХ-разделение композиции REP 2057 хелат кальция/тимозин $\alpha 1$ с применением описываемого здесь олиго-способа (см. пример IV). Пик, элюируемый на 6,18 мин, соответствует тимозину $\alpha 1$ (стрелка белого цвета), а пик, элюируемый на 15,47 мин, соответствует полноразмерному REP 2057 (стрелка черного цвета).

Фиг. 28 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания олигонуклеотидов в композиции REP 2057 хелат кальция/тимозин $\alpha 1$ (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 15,47 мин на фиг. 27). Наблюдаемая масса основной формы составляет 13413,5 Да с идентификацией ее как REP 2057 (ожидаемая молекулярная масса =13413,3 Да).

Фиг. 29 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания пептидов в композиции REP 2057 хелат кальция/тимозин $\alpha 1$ (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 6,18 мин на фиг. 27). Наблюдаемая масса основной формы составляет 3107,6 Да с идентификацией ее как тимозина $\alpha 1$ (ожидаемая молекулярная масса =3108 Да).

Фиг. 30 представляет ВЭЖХ-разделение композиции REP 2139 хелат кальция/тимозин $\alpha 1$ с применением описываемого здесь олиго-способа (см. пример IV). Пик, элюируемый на 6,13 мин, соответствует тимозину $\alpha 1$ (стрелка белого цвета), а пик, элюируемый на 19,01 мин, соответствует полноразмерному REP 2139 (стрелка черного цвета).

Фиг. 31 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания олигонуклеотидов в композиции REP 2139 хелат кальция/тимозин $\alpha 1$ (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 19,01 мин на фиг. 30). Наблюдаемая масса основной формы составляет 14094,5 Да с идентификацией ее как REP 2139 (ожидаемая молекулярная масса =14094,6).

Фиг. 32 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания пептидов в композиции REP 2139 хелат кальция/тимозин $\alpha 1$ (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 6,13 мин на фиг. 30). Наблюдаемая масса основной формы составляет 3107,6 Да с идентификацией ее как тимозина $\alpha 1$ (ожидаемая молекулярная масса =3108 Да).

Фиг. 33 представляет ВЭЖХ-разделение композиции REP 2148 хелат кальция/тимозин $\alpha 1$ с применением описываемого здесь олиго-способа (см. пример IV). Пик, элюируемый на 6,28 мин, соответствует тимозину $\alpha 1$ (стрелка белого цвета), а пик, элюируемый на 15,19 мин, соответствует полноразмерному REP 2148 (стрелка черного цвета).

Фиг. 34 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания олигонуклеотидов в композиции REP 2148 хелат кальция/тимозин $\alpha 1$ (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 15,19 мин на фиг. 33). Наблюдаемая масса основной формы составляет 12892 Да с идентификацией ее как REP 2148 (ожидаемая молекулярная масса =12893 Да).

Фиг. 35 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания пептидов в композиции REP 2148 хелат кальция/тимозин $\alpha 1$ (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 6,28 мин на фиг. 33). Наблюдаемая масса основной формы составляет 3107,6 Да с идентификацией ее как тимозина $\alpha 1$ (ожидаемая молекулярная масса =3107,3 Да).

Фиг. 36 представляет ВЭЖХ-разделение композиции REP 2006 хелат кальция/пегилированный интерферон α -2а с применением описываемого здесь олиго-способа (см. пример IV).

Фиг. 37 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания олигонуклеотидов в композиции REP 2006 хелат кальция/пегилированный интерферон α -2а (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 14,59 мин на фиг. 36). Наблюдаемая масса основной формы составляет приблизительно 12600-13200 Да с идентификацией ее как REP 2006 (ожидаемая молекулярная масса =12612-13092 Да).

Фиг. 38 представляет ВЭЖХ-разделение композиции REP 2006 хелат кальция/пегилированный интерферон α -2а с применением описываемого здесь способа 2 для белков (см. пример IV).

Фиг. 39 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания пептидов в композиции REP 2006 хелат кальция/интерферон α -2а (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 13,21 мин на фиг. 38).

Фиг. 40 представляет ВЭЖХ-разделение композиции REP 2055 хелат кальция/пегилированный интерферон α -2а с применением описываемого здесь олиго-способа (см. пример IV).

Фиг. 41 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания олигонуклеотидов в композиции REP 2055 хелат кальция/пегилированный интерферон α -2а (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 16,71 мин на фиг. 40). Наблюдаемая масса основной формы составляет 12612,4 Да с идентификацией ее как REP 2055 (ожидаемая молекулярная масса =12612,5 Да).

ВЭЖХ при 10,53 мин на фиг. 62). Основной пик наблюдается с 20139 Да, что приблизительно соответствует молекулярной массе интерферона $\lambda 1$.

Фиг. 64 представляет ВЭЖХ-разделение композиции REP 2148 хелат кальция/интерферон $\lambda 1$ с применением описываемого здесь олиго-способа (см. пример IV).

Фиг. 65 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания олигонуклеотидов в композиции REP 2148 хелат кальция/интерферон $\lambda 1$ (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 15,47 мин на фиг. 64). Наблюдаемая масса основной формы составляет 12891,8 Да с идентификацией ее как REP 2148 (ожидаемая молекулярная масса = 12893 Да).

Фиг. 66 представляет ВЭЖХ-разделение композиции REP 2148 хелат кальция/интерферон $\lambda 1$ с применением описываемого здесь способа 2 для белков (см. пример IV).

Фиг. 67 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания белков в композиции REP 2148 хелат кальция/интерферон $\lambda 1$ (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 10,51 мин на фиг. 66). Основной пик наблюдается с 20139 Да, что приблизительно соответствует молекулярной массе интерферона $\lambda 1$.

Фиг. 68 представляет ВЭЖХ-разделение композиции REP 2055 хелат магния/тимозин $\alpha 1$ с применением описываемого здесь олиго-способа (см. пример IV). Пик, элюируемый на 5,86 мин, соответствует тимозину $\alpha 1$ (стрелка белого цвета), а пик, элюируемый на 14,62 мин, соответствует полноразмерному REP 2055 (стрелка черного цвета).

Фиг. 69 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания олигонуклеотидов в композиции REP 2055 хелат магния/тимозин $\alpha 1$ (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 14,62 мин на фиг. 68). Наблюдаемая масса основной формы составляет 12610,1 Да с идентификацией ее как REP 2055 (ожидаемая молекулярная масса = 12612,5 Да).

Фиг. 70 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания пептидов в композиции REP 2055 хелат магния/тимозин $\alpha 1$ (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 5,82 мин на фиг. 68). Наблюдаемая масса основной формы составляет 3107,6 Да с идентификацией ее как тимозина $\alpha 1$ (ожидаемая молекулярная масса = 3107,1 Да).

Фиг. 71 представляет ВЭЖХ-разделение смешанной композиции REP 2055 хелат кальция-магния/тимозин $\alpha 1$ с применением описываемого здесь олиго-способа (см. пример IV). Пик, элюируемый на 6,02 мин, соответствует тимозину $\alpha 1$ (стрелка белого цвета), а пик, элюируемый на 14,85 мин, соответствует полноразмерному REP 2055 (стрелка черного цвета).

Фиг. 72 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания олигонуклеотидов в смешанной композиции REP 2055 хелат кальция-магния/тимозин $\alpha 1$ (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 14,85 мин на фиг. 71). Наблюдаемая масса основной формы составляет 12609,7 Да с идентификацией ее как REP 2055 (ожидаемая молекулярная масса = 12612,5 Да).

Фиг. 73 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания пептидов в смешанной композиции REP 2055 хелат кальция-магния/тимозин $\alpha 1$ (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 6,02 мин на фиг. 71). Наблюдаемая масса основной формы составляет 3107,1 Да с идентификацией ее как тимозина $\alpha 1$ (ожидаемая молекулярная масса = 3108 Да).

Фиг. 74 представляет ВЭЖХ-разделение композиции REP 2055 хелат магния/пегилированный интерферон α -2а с применением описываемого здесь олиго-способа (см. пример IV).

Фиг. 75 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания олигонуклеотидов в композиции REP 2055 хелат магния/пегилированный интерферон α -2а (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 14,83 мин на фиг. 74). Наблюдаемая масса основной формы составляет 12610,2 Да с идентификацией ее как REP 2055 (ожидаемая молекулярная масса = 12612,5 Да).

Фиг. 76 представляет ВЭЖХ-разделение композиции REP 2055 хелат магния/пегилированный интерферон α -2а с применением описываемого здесь способа 2 для белков (см. пример IV).

Фиг. 77 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания пептидов в композиции REP 2055 хелат магния/интерферон α -2а (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 13,44 мин на фиг. 76).

Фиг. 78 представляет ВЭЖХ-разделение смешанной композиции REP 2055 хелат кальция-магния/пегилированный интерферон α -2а с применением описываемого здесь олиго-способа (см. пример IV).

Фиг. 79 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания олигонуклеотидов в смешанной композиции REP 2055 хелат кальция-магния/пегилированный интерферон α -2а (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 14,83 мин на фиг. 78). Наблюдаемая масса основной формы составляет 12609,8 Да с идентификацией ее как REP 2055 (ожидаемая молекулярная масса = 12612,5 Да).

Фиг. 80 представляет ВЭЖХ-разделение смешанной композиции REP 2055 хелат кальция-магния/пегилированный интерферон α -2а с применением описываемого здесь способа 2 для белков (см. пример IV).

Фиг. 81 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания пептидов в смешанной композиции REP 2055 хелат кальция-магния/интерферон α -2a (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 13,44 мин на фиг. 80).

Фиг. 82 представляет ВЭЖХ-разделение композиции REP 2139 хелат магния/тимозин α 1 с применением описываемого здесь олиго-способа (см. пример IV). Пик, элюируемый на 5,84 мин, соответствует тимозину α 1 (стрелка белого цвета), а пик, элюируемый на 16,86 мин, соответствует полноразмерному REP 2139 (стрелка черного цвета).

Фиг. 83 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания олигонуклеотидов в композиции REP 2139 хелат магния/тимозин α 1 (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 16,86 мин на фиг. 82). Наблюдаемая масса основной формы составляет 14091,3 Да с идентификацией ее как REP 2139 (ожидаемая молекулярная масса =14094,6 Да).

Фиг. 84 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания пептидов в композиции REP 2139 хелат магния/тимозин α 1 (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 5,84 мин на фиг. 82). Наблюдаемая масса основной формы составляет 3107,1 Да с идентификацией ее как тимозина α 1 (ожидаемая молекулярная масса =3108 Да).

Фиг. 85 представляет ВЭЖХ-разделение смешанной композиции REP 2139 хелат кальция-магния/тимозин α 1 с применением описываемого здесь олиго-способа (см. пример IV). Пик, элюируемый на 5,84 мин, соответствует тимозину α 1 (стрелка белого цвета), а пик, элюируемый на 16,61 мин, соответствует полноразмерному REP 2139 (стрелка черного цвета).

Фиг. 86 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания олигонуклеотидов в смешанной композиции REP 2139 хелат кальция-магния/тимозин α 1 (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 16,61 мин на фиг. 85). Наблюдаемая масса основной формы составляет 14091,1 Да с идентификацией ее как REP 2139 (ожидаемая молекулярная масса =14094,6 Да).

Фиг. 87 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания пептидов в смешанной композиции REP 2139 хелат кальция-магния/тимозин α 1 (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 5,84 мин на фиг. 85). Наблюдаемая масса основной формы составляет 3107,1 Да с идентификацией ее как тимозина α 1 (ожидаемая молекулярная масса =3108 Да).

Фиг. 88 представляет ВЭЖХ-разделение композиции REP 2139 хелат магния/пегилированный интерферон α -2a с применением описываемого здесь олиго-способа (см. пример IV).

Фиг. 89 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания олигонуклеотидов в композиции REP 2139 хелат магния/пегилированный интерферон α -2a (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 17,19 мин на фиг. 88). Наблюдаемая масса основной формы составляет 14091,5 Да с идентификацией ее как REP 2139 (ожидаемая молекулярная масса =14094,6 Да).

Фиг. 90 представляет ВЭЖХ-разделение композиции REP 2139 хелат магния/пегилированный интерферон α -2a с применением описываемого здесь способа 2 для белков (см. пример IV).

Фиг. 91 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания пептидов в композиции REP 2139 хелат магния/интерферон α -2a (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 13,38 мин на фиг. 90).

Фиг. 92 представляет ВЭЖХ-разделение смешанной композиции REP 2139 хелат кальция-магния/пегилированный интерферон α -2a с применением описываемого здесь олиго-способа (см. пример IV).

Фиг. 93 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания олигонуклеотидов в смешанной композиции REP 2139 хелат кальция-магния/пегилированный интерферон α -2a (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 16,95 мин на фиг. 92). Наблюдаемая масса основной формы составляет 14091,4 Да с идентификацией ее как REP 2139 (ожидаемая молекулярная масса =14094,6 Да).

Фиг. 94 представляет ВЭЖХ-разделение смешанной композиции REP 2139 хелат кальция-магния/пегилированный интерферон α -2a с применением описываемого здесь способа 2 для белков (см. пример IV).

Фиг. 95 иллюстрирует анализ с применением масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содержания пептидов в смешанной композиции REP 2139 хелат кальция-магния/интерферон α -2a (пик на хроматограмме ВЭЖХ при 13,46 мин на фиг. 94).

Подробное описание изобретения

Как описано в международной заявке с номером публикации WO 2012/021995 и заявке США с номером публикации 2012/0046348, содержание которых во всей своей полноте включено в настоящий документ посредством ссылки, олигонуклеотиды в водных растворах, содержащих любой простой катион двухвалентного металла (такого как, например, но не ограничиваясь, Ca^{2+} , Mg^{2+} и Fe^{2+}), не существуют в форме солей, а скорее в виде олигонуклеотидных хелатных комплексов. Эти комплексы состоят из димеров ОН или молекулярных структур высшего порядка, в которых ОН образуют межмолекулярные связи по своим фосфодизфирным или тиофосфатным цепям через мостики из ионов двухвалентного металла

(см. фиг. 2B). При определенных концентрациях ON и катионов металлов эти хелатные комплексы являются стабильными, растворимыми в водных растворах и эффективно образуют хелатные связи с двухвалентными катионами в хелатных комплексах ON в процессе взаимодействия в растворе. Вероятно, формирование таких хелатных комплексов также происходит и с простыми катионами металла с зарядом $3+$ или выше (как отображено на фиг. 2B). Таким образом, ON выступают в качестве хелатирующих агентов для поливалентных катионов металлов и соли с поливалентными катионами металлов не образуют.

Хелатные ON комплексы могут содержать катионы различных поливалентных металлов, включая кальций, магний, кобальт, железо, марганец, барий, никель, медь, цинк, кадмий, ртуть и свинец. Также демонстрируется, что хелатирование этих катионов поливалентных металлов приводит к образованию олигонуклеотидных хелатных комплексов, состоящих из двух или более олигонуклеотидов, связанных через катионы металлов; с длиной комплексов более 6 нуклеотидов в цепочке; в присутствии ON либо с фосфодиэфирными, либо с тиофосфатными связями. Необязательно все связи олигонуклеотидов могут быть тиофосфорилированными. Хелатирование также происходит с ON, содержащими 2'-модификации (такие как 2'-О-метил в рибозе) или содержащими модифицированные основания, такие как 5'-метилцитозин или 4-тиоурацил. Эти 2'-модификации могут присутствовать в одной, нескольких или во всех рибозах, а модифицированные основания могут быть представлены одним, несколькими основаниями или могут повсеместно представляться каждым из оснований (т.е. все цитозины присутствуют в виде 5'-метилцитозинов). Кроме этого, хелатные ON комплексы могут содержать ON, включающие множественные модифицирования, такие как все тиофосфорилированные связи, все 2'-модифицированные рибозы и все модифицированные основания. Модификации олигонуклеотидов, совместимые с образованием олигонуклеотидных хелатных комплексов, дополнительно определяются ниже. Кроме этого, хелатирование катионов металлов не зависит от последовательности имеющихся нуклеотидов, а обуславливается физико-химическими свойствами, общими для всех олигонуклеотидов (см. фиг. 2A).

Притом, что образование хелатных ON комплексов может быть достигнуто с катионом любого двухвалентного металла, хелатные ON комплексы, предназначенные для применения в качестве лекарственных средств, предпочтительно должны содержать только кальций и/или магний, но также могут содержать железо, марганец, медь или цинк в следовых количествах и не должны включать кобальт, барий, никель, кадмий, ртуть, свинец или любые другие двухвалентные металлы, не перечисленные здесь.

Важным является то, что образование хелатных комплексов ON не происходит с одновалентными катионами, такими как Na^+ , K^+ или NH_4^+ , и, таким образом, их образование с любыми одновалентными катионами является маловероятным. Таким образом, термин "соль ON" более корректно ограничивается только солями ON с одновалентными катионами или с катионами, которые не образуют хелатных комплексов с ON.

По меньшей мере часть известных переходных взаимодействий олигонуклеотидов с белковыми компонентами в крови, вероятно, опосредуются взаимодействием олигонуклеотидов со связывающими кальций белками, такими как альбумин и белки кальций-зависимого коагуляционного каскада. Таким образом, введение ON в форме хелатных комплексов (что значительно снижает или исключает их склонность к взаимодействию с кальций-связывающими белками) ослабит взаимодействие этих белков в крови и приведет к меньшему количеству побочных эффектов, связанных с введением ON (таких как транзитное антикоагуляционное действие), и также может увеличить долю дозы ON, достигающую целевых органов (например, печени, легких или селезенки), в сравнении с нехелатированными ON.

Флуоресцентная поляризация является методикой, широко применяемой для исследования межмолекулярных взаимодействий. В этой методике "приманка" (т.е. любой ON) маркируется флуоресцентной меткой (т.е. FITC). В растворе молекула-приманка свободно движется вследствие броуновского движения, что приводит к слабо поляризованному флуоресцентному излучению при возбуждении приманки под действием света с соответствующей длиной волны. В случае наличия лиганда с достаточной молекулярной массой (по меньшей мере, такой же, как и у приманки) взаимодействие между приманкой и лигандом вызывает значительное ингибирование беспорядочного движения комплексов в растворе. В результате такого ингибирования движения в растворе флуоресценция после возбуждения становится в значительной степени поляризованной. Таким образом, с помощью этой методики могут быть оценены взаимодействия в растворе без каких-либо физических ограничений обоих связываемых компонентов. Флуоресцентная поляризация регистрируется как безразмерная величина mP, которая является прямо пропорциональной доле связанных молекул приманки в реакции. Например, если очень небольшая доля молекул приманки была связана конкретным лигандом, возможна лишь очень небольшая флуоресцентная поляризация и соответственно малые значения mP. Напротив, если большая доля молекул приманки оказывается связанной конкретным лигандом (или лигандом с более высокой концентрацией), возникает значительная флуоресцентная поляризация и соответственно большие значения mP. Таким способом, посредством варьирования концентраций лиганда в присутствии фиксированного количества меченой флуоресцентным маркером приманки могут генерироваться изотермы связывания для конкретных взаимодействий приманка-лиганд.

При этом используются меченные различными флуоресцентными метками ON для исследования образования их комплексов в присутствии катионов поливалентных металлов. Хотя отслеживание обра-

зования комплексов по флуоресцентной поляризации требует мечения этих олигонуклеотидов флуоресцентными маркерами, такой маркер прикрепляется к ON на 3'-конце, чтобы не затрагивать азотистое основание или фосфодиэфирную цепь рассматриваемого ON. Кроме этого, данный флуоресцентный маркер отводится в сторону от ON посредством жесткого трехуглеродного линкера в качестве дополнительной меры предупреждения любых нарушений нормального поведения ON в растворе. Таким образом, любое образование комплексов ON, наблюдаемое здесь при посредстве флуоресцентной поляризации флуоресцентно меченого ON, является точным представлением поведения в растворе немеченых ON (как в составе комплексов, так и отдельно).

Стандарт в данной области ясно указывает порядок практического введения олигонуклеотидов нуждающимся в лечении натриевыми солями олигонуклеотидов субъектам. Это иллюстрируется введением многочисленных ON в клинических исследованиях в виде солей натрия, которые включают фомивирсен (ISIS 2922), мипомерсен (ISIS 301012), трековирсен (GEM 91), кустирсен (OGX-011/ISIS 112989), генасенс (G3139), апринокарсен (ISIS 3531/LY 900003), PRO-51 (GSK 2402968) и ALN-RSV01 (Geary и др., 2002, *Clin. Pharmacokinetics*, 41: 255-260; Yu и др., 2009, *Clin. Pharmacokinetics*, 48: 39-50; Sereni и др., 1999, *J. Clin. Pharmacol.*, 39: 47-54; Chi и др., 2005, *J. Nat. Canc. Inst.*, 97: 1287-1296; Marshall и др., 2004, *Ann. Oncol.*, 15: 1274-1283; Grossman и др., 2004, *Neuro-Oncol.*, 6: 32-40; Goemans и др., 2011 *NEJM* 364: 1513-1522). В настоящее время в публикациях отсутствуют сведения, указывающие на образование олигонуклеотидов для парентерального введения с использованием кальция, магния или других двухвалентных металлов.

Многие из побочных эффектов, ассоциируемых с введением олигонуклеотидов в форме натриевой соли, могут быть отнесены на счет хелатирующих эффектов. Угнетение коагуляции крови со стороны олигонуклеотидов вызвано, по меньшей мере частично, хелатированием олигонуклеотидами сывороточного кальция и ухудшением, таким образом, кальций-зависимого коагуляционного каскада. Это хелатирование сывороточного кальция и вызываемая им гипокальциемия в сыворотке крови также согласуется с побочными эффектами, наблюдаемыми при внутривенном (в/в) введении ON, которые включают лихорадку, озноб, слабость и снижение артериального давления (последний побочный эффект наблюдается при быстрой в/в инфузии или инъекции). Реакции в месте инъекции, наблюдаемые при выполнении подкожных инъекций ON (индурация, воспаление, болезненная чувствительность и боль), вызываются, по меньшей мере частично, местным хелатированием олигонуклеотидами катионов кальция и, возможно, других двухвалентных или поливалентных металлов, таких как магний, в месте выполнения инъекции. Введение олигонуклеотидов в виде хелатных комплексов продемонстрировало способность ослаблять многих из этих побочных эффектов.

Кроме этого, поскольку хелатные ON комплексы образуются с двухвалентными металлами в растворе с любыми ON, идея образования и совместимости различных полипептидов и пегилированных полипептидов в растворе с любыми хелатными комплексами ON адекватным образом демонстрируется специалистам в данной области посредством использования выроджденного ON REP 2006 и примера последовательности олигонуклеотидов (в примерах ниже (AG)₂₀ и (AC)₂₀) с разными модификациями ON. Стабильное образование композиций, содержащих описанные выше формы ON, в виде хелатов с различными полипептидами и пегилированными полипептидами, демонстрирует, что любой хелатный ON комплекс (несмотря на его специфическую функциональность) образует устойчивые растворы с различными полипептидами и пегилированными полипептидами, которые актуальны в данной области для целей лечения определенных заболеваний (например, пегилированные интерфероны для лечения гепатита В или гепатита С или мирклудекс В для лечения гепатита В).

Термин "олигонуклеотид" (ON) относится к олигомеру или полимеру рибонуклеиновой кислоты (РНК) и/или дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Этот термин включает ON, которые состоят из модифицированных нуклеиновых оснований (включая 5'-метилцитозин или 4'-тиоурацил), сахаров и ковалентных межнуклеозидных связей основных цепей, а также ON, имеющие участки неприродного происхождения, которые функционируют аналогично. Такие модифицированные или замещенные ON могут быть предпочтительнее нативных форм вследствие их полезных свойств, таких как, например, сниженная иммунореактивность, увеличенное клеточное поглощение, увеличенная аффинность к целевой нуклеиновой кислоте и более высокая стабильность в присутствии нуклеаз. Олигонуклеотиды также могут быть двухцепочечными.

ON в этом раскрытии могут включать различные модификации, например стабилизирующие модификации, и, таким образом, могут включать по меньшей мере одну модификацию в фосфодиэфирной связи, и/или на сахаре, и/или основании. Например, ON может включать без ограничений одну или более модификаций или же быть полностью модифицированным таким образом, чтобы содержать все связи или сахара или основания с упомянутыми модификациями. Модифицированные связи могут включать тиофосфатные связи, фосфодитионатные связи и/или метилфосфонатные связи. В случае целесообразности таких модифицированных связей ON могут включать фосфодиэфирные связи. Дополнительные полезные модификации включают без ограничений модификации в 2'-позиции сахара, включая 2'-О-алкилмодификации, такие как 2'-О-метилмодификации, 2'-О-метоксиэтил (2'-МОЕ), 2'-амино-модификации, 2'-галоген-модификации, такие как 2'-фтор; ациклические нуклеотидные аналоги. В данной области так-

же известны и могут использоваться в качестве закрытых нуклеиновых кислот и другие 2'-модификации. В частности, такие, при которых ON имеет все модифицированные связи или каждая его связь является модифицированной, например тиофосфат; имеет 3'- и/или 5'-кэп; включает концевую 3'-5' связь; ON сам является или включает конкатемер, состоящий из двух или более олигонуклеотидных последовательностей, соединенных сшивающими агентами. Модификации оснований могут включать 5'-метилирование цитозинового основания (5'-метилцитозин или в контексте нуклеотида - 5'-метилцитидин) и/или 4'-тиолирование урацилового основания (4'-тиоурацил или в контексте нуклеотида - 4'-тиоуридин). Различные химически совместимые модифицированные связи могут объединяться в случаях, когда условия синтеза являются химически совместимыми, например при наличии олигонуклеотида с тиофосфатными связями, 2'-модификации рибозы (такой как 2'-О-метилирование) и модифицированного основания (такое как 5'-метилцитозин). ON может быть далее полностью модифицирован с использованием всех этих различных модификаций (например, каждая связь станет тиофосфатной, каждая рибоза 2'-О-метилмодифицированной, а каждое цитозинового основание будет иметь дополнительно 5'-метилмодификацию (5'-метилцитозин)).

В настоящем изобретении термин "противовирусный ON" относится к любому ON, который благодаря его специфической биохимической активности (зависящей от последовательности или независимой от нее) обладает способностью прямо или косвенно ингибировать некоторые аспекты вирусной репликации или прямо или косвенно усиливать способность организма-хозяина избавляться от инфекции посредством иммунологического или других механизмов.

В настоящем раскрытии термин "хелатный ON комплекс" относится к комплексу в растворе из двух или более ON, связанных внутримолекулярно посредством катиона поливалентного металла.

В настоящем раскрытии термин "противовирусный хелатный ON комплекс" относится к комплексу в растворе из двух или более противовирусных ON, связанных внутримолекулярно посредством катиона поливалентного металла. Этот противовирусный олигонуклеотидный хелатный комплекс может состоять из отдельных форм противовирусного ON или двух или более различных форм противовирусного ON, которые могут иметь одинаковый или различные механизмы действия (например, два или более антисмысловых олигонуклеотидов, по меньшей мере один антисмысловый олигонуклеотид и по меньшей мере один аптамер, по меньшей мере один антисмысловый олигонуклеотид и по меньшей мере одна малая интерферирующая РНК).

В настоящем изобретении термин "противовирусный полипептид" относится к полипептиду, который благодаря его специфической биохимической активности (зависимой от последовательности или независимой от нее) обладает способностью прямо или косвенно ингибировать некоторые аспекты вирусной репликации или прямо или косвенно усиливать способность организма-хозяина избавляться от инфекций посредством иммунологического или других механизмов. Такой полипептид может иметь натуральное происхождение или быть рекомбинантным. Этот полипептид может быть получен рекомбинантным способом из части полипептида натурального происхождения. Полипептид может быть пегилированным или неpegилированным.

В настоящем раскрытии, термин "вырожденный ON" предназначается для обозначения одноцепочечного ON, имеющего неоднозначность (N) в каждой позиции (т.е. позиция является нестрогой), такую как NNNNNNNNNN. Каждое основание синтезируется как неоднозначное (от wobble - "качающееся", нестрогое, неоднозначное) таким образом, что этот ON в действительности существует как популяция различных, генерированных в случайном порядке последовательностей одинаковой длины и с одинаковыми физико-химическими свойствами. Например, в вырожденном олигонуклеотиде с длиной последовательности в 40 оснований доля каждой конкретной последовательности в популяции будет теоретически составлять только $1/4^{40}$ или $8,3 \times 10^{-25}$ от общей доли. При условии, что 1 моль = $6,022 \times 10^{23}$ молекул, и с учетом того, что 1 моль 40-звенного олигонуклеотида имел бы массу приблизительно 12-14 кг (в зависимости от последовательности и наличия модификаций), на практике любой ON с конкретной последовательностью не может существовать в любом препарате более чем в единственном числе. Таким образом, любое образование хелатов или биологическая активность, наблюдаемые в таком препарате, должны обуславливаться независимыми от последовательностей физико-химическими свойствами олигонуклеотидов, поскольку нельзя ожидать, чтобы какой-либо конкретный олигонуклеотид с определенной последовательностью, являясь в препарате единственным, вносил бы значительный вклад в активность именно благодаря определенной последовательности его нуклеотидов.

Для дальнейшего иллюстрирования этой концепции в примере I сравниваются характеристики REP 2006 (40-звенный ON с вырожденной, полностью тиофосфорилированной последовательностью) и 21-звенного ON с определенной последовательностью (также полностью тиофосфорилированной) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии, что четко продемонстрировало, что любые ON со сходными размерами и химической модификацией (т.е. тиофосфорилированием) будут иметь очень похожие (если не идентичные) физико-химические свойства, на которые не влияет последовательность присутствующих нуклеотидов (см. фиг. 1A-C).

В настоящей заявке термин "полимер нуклеиновой кислоты" или NAP предназначается для идентификации любого одноцепочечного ON, который не имеет зависимой от последовательности функцио-

нальности. Биохимическая активность NAR не зависит от распознавания олигонуклеотидов толл-подобными рецепторами, гибридизации с целевой нуклеиновой кислотой или аптамерного взаимодействия, требующего специфической вторичной/третичной структуры олигонуклеотидов, следующей из специфического порядка присутствующих нуклеотидов. NAR могут включать основание, и/или связь, и/или модификации сахара, как описано выше.

ON могут проявлять свое лечебное действие через многочисленные механизмы, которые либо зависят от последовательности, либо не зависят от последовательности. Зависимые от последовательности механизмы являются такими, которые для проявления своей активности требуют специфической последовательности нуклеиновых кислот и активность которых снижается при одном или нескольких изменениях в последовательности присутствующих нуклеотидов. Эта специфическая последовательность может охватывать всю длину ON или только его часть (мотив последовательности). Примеры зависимых от последовательности ON включают следующее.

1. Антисмысловые ON (как одноцепочечные, так и двухцепочечные (например, малые (короткие) интерферирующие РНК (миРНК) или малые (короткие) шпилечные РНК (кшРНК)) являются комплементарными специфической части исследуемой информационной РНК (мРНК), и при их введении в клетку они управляют расщеплением специфических информационных РНК рибонуклеазой H или индуцируемым РНК комплексом сайленсинга (RISC).

2. Стерически блокирующие олигонуклеотиды представляют собой одноцепочечные антисмысловые олигонуклеотиды, которые являются комплементарными специфической части мРНК, но которые создаются не для активации рибонуклеазы H. Гибридизация этих ON с их целевой мРНК приводит к образованию двухцепочечного участка, что создает стерические затруднения для белков, действующих на мРНК в обычных условиях. Такие олигонуклеотиды могут использоваться для блокирования трансляции конкретной мРНК или препятствования посттранскрипционному сплайсингу или созреванию конкретной мРНК. Такие ON могут быть созданы для блокирования активации рибонуклеазы H (поскольку она не является составной частью механизма действия этих ON) посредством 2'-модификаций рибозы (например, 2'-O-метилированием).

3. Аптамеры являются олигонуклеотидами, которые принимают некую специфическую трехмерную конформацию, способную к взаимодействию со специфичными белками, и которые не способны к легкому взаимодействию с хозяйской ДНК или РНК. Аптамеры также могут включать шпигельмеры, в которых используются L-нуклеотиды вместо D-нуклеотидов для придания олигонуклеотиду высокой ферментативной стабильности.

4. Иммуностимулирующие олигонуклеотиды используют мотив специфической 6-звенной нуклеиновой кислоты (XXCGXX) для стимулирования иммунного ответа у млекопитающих. Оптимальный мотив отличается от формы к форме, но строго зависит от специфической последовательности, соответствующей мотиву XXCGXX.

5. МикроРНК связываются и блокируют функцию имеющих естественное происхождение молекул микроРНК, которые участвуют в регулировании различных биохимических путей.

Единственным представленным в литературе примером независимых от последовательности ON являются тиофосфорилированные NAR, которые селективно взаимодействуют с амфипатическими белковыми структурами зависимым от их размера (длины) образом в силу их физико-химических свойств как амфипатических полимеров.

Несколько противовирусных лекарственных препаратов на основе полипептидов в настоящее время одобрены для лечения вирусных инфекций и включают пегилированный интерферон α -2a (для лечения гепатита В (HBV) и гепатита С (HCV)), интерферон α -2b (для лечения HBV), тимозин α 1 (для лечения HBV) и энфуртид (для лечения ВИЧ-1). Также разрабатываются другие лекарственные препараты на основе полипептидов, включая миристоилированный фрагмент pre-s1 белка поверхностного антигена вируса гепатита В (мирклюдекс В, Petersen и др., 2008, Nature Biotech. 26: 335-341) для лечения гепатита В (HBV) и пегилированный интерферон λ 1 (Muir и др., 2010 Hepatology 52: 822-832). Кроме этого, известно, что также противовирусной активностью обладают интерфероны λ 1, λ 2 и λ 3 (Friborg и др., 2013, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 57: 1312-1322). В случае пегилированных и непегилированных интерферонов, а также других иммуномодуляторов (например, тимозина α 1) эти полипептиды активно стимулируют соответствующие биохимические пути, что приводит к активации у субъектов иммунного ответа на вирусную инфекцию. При том, что как эти полипептиды могут успешно стимулировать иммунный ответ, только небольшой части пациентов с инфекциями гепатита В или гепатита С удается достичь полного контроля над инфекциями с помощью лекарственных препаратов на основе полипептидов. Мирклюдекс В блокирует проникновение вируса гепатита В в гепатоциты, однако его терапевтическая польза должна быть подтверждена на людях.

В дополнение к этим полипептидам имеются другие классы полипептидов с известной противовирусной активностью, которые могут быть пригодны для лечения вирусных инфекций при их комбинированном применении с хелатными комплексами ON. Такие полипептиды включают цитокины, например TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 и интерферон γ , но не ограничиваются только ими.

Способы пегилирования терапевтически активных полипептидов и совместимость пегилирования с биохимической активностью этих полипептидов являются хорошо известными в данной области и состоят из образования связей между цепочками полиэтиленгликоля (ПЭГ) с соответствующим полипептидом на определенных аминокислотных остатках. Основной функцией пегилирования является увеличение продолжительности жизненного цикла полипептида, а также снижение его иммуногенности. Эти характеристики улучшают переносимость рассматриваемого полипептида и снижают частоту введения доз, требующуюся для обеспечения оптимального терапевтического эффекта. Также в данной области известно, что присоединение остатков ПЭГ к полипептиду может быть достигнуто без воздействия на специфическую биохимическую активность рассматриваемого полипептида. Помимо этого, известно, что пегилирование увеличивает растворимость рассматриваемого полипептида в воде, что упрощает процесс получения лекарственного препарата на основе этого полипептида. Многочисленные примеры пегилированных полипептидов известны в данной области и включают: мирцера™ - пегилированную форму эритропоэтина; нейласта™ - пегилированную форму гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека; пегасис™ - пегилированную форму интерферона α -2a человека; пегинтрон™ - пегилированную форму интерферона α -2b человека; и пегилированный интерферон λ 1 (который в настоящее время находится в клинической разработке). Следовательно, раскрытие совместимости одного пегилированного полипептида (т.е. пегилированного интерферона α -2a) в композиции с хелатным комплексом ON обеспечивает свидетельство общей совместимости любого пегилированного полипептида с хелатным комплексом ON в целом, и особенно в случаях пегилированных вариантов конкретных непегилированных полипептидов, представленных в данном раскрытии, в отношении их совместимости с хелатным комплексом ON (т.е. тимозина α 1, интерферона α -2b и интерферона λ 1).

В настоящее время на базе олигонуклеотидов разрабатываются несколько противовирусных лекарственных препаратов, предназначенных для лечения вирусных инфекций, которые включают тиофосфорилированные NAP REP 9AC (REP 2055), REP 9AC' (REP 2139) и REP 9AC^m (REP 2148) для лечения гепатита В (HBV); миравирсен для лечения гепатита С (HCV) (Janssen и др., 2013, NEJM, March 27); и ALN-RSV01 для лечения заболеваний, возбудителем которых является респираторно-синцитиальный вирус (RSV) (Zamora и др., 2011, Am. J. Resp. Crit. Care Med., 183: 531-538). Каждый из них обладает своим отличным от других механизмом действия. NAP препятствуют высвобождению белка поверхностного антигена вируса гепатита В в кровь (белок, который ингибирует иммунную функцию), что описано в примере V, миравирсен (микроРНК) блокирует действие микроРНК miR-122, которая, как известно, участвует в репликации вируса гепатита С, а ALN-RSV01 (миРНК) блокирует синтез нуклеокапсидного белка N вируса RSV, предотвращая продукцию вирионов RSV. Все эти лекарственные препараты на основе ON являются очень эффективными в проявлении у субъектов их планируемых эффектов. REP 9AC/REP 9AC'/REP 9AC^m блокируют внутриклеточный транзит и секрецию субвирусных частиц (SVP) вируса гепатита В, что приводит к очистке крови от поверхностного антигена вируса гепатита В, что, в свою очередь, вызывает ослабление вируса гепатита В в крови; миравирсен хорошо работает, ингибируя функцию miR-122, которая участвует в репликации HCV; а ALN-RSV-01 хорошо блокирует продукцию капсидного белка RSV. Однако во всех случаях парентерального введения этих соединений на базе ON они ассоциировались со связанными с введением препаратов побочными эффектами, такими как жар, озноб, тремор при их введении с применением внутривенных инфузий или болью, воспалением или уплотнением ткани в месте инъекции при введении препаратов с помощью подкожной инъекции. Что еще более важно, в то время как эти все лекарственные препараты на базе ON проявляли свои желаемые эффекты у людей, общий результат лечения является далеким от желаемого. Только у части пациентов, получивших лечение этими лекарственными препаратами, достигнут значимый противовирусный ответ или полный контроль их инфекции во время лечения или после прекращения лечения.

Следовательно, является желательным получение любого из этих противовирусных лекарственных препаратов на базе ON в виде хелатных комплексов ON (для того, чтобы минимизировать связанные с их введением побочные эффекты и потенциально улучшить их фармакокинетические свойства) и объединение их с одним или более противовирусными полипептидами (такими как пегилированный интерферон α -2a, интерферон α -2b, или тимозин α 1, или пегилированный интерферон λ 1) в одной рецептуре. Специфические противовирусные эффекты составов на базе ON (таких как хелаты) вместе с иммуностимулирующими противовирусными эффектами полипептидов могут обладать более благоприятным полезным воздействием в отношении достижения потенциально более полного противовирусного ответа у субъектов и способны обеспечить более значительную долю субъектов, достигающих полного контроля над инфекцией, по сравнению с терапией каждым из лекарственных препаратов по отдельности.

Может быть полезным лечение конкретной вирусной инфекции с помощью фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один противовирусный хелатный ON комплекс и по меньшей мере один противовирусный полипептид или пегилированный полипептид для достижения лучшего противовирусного ответа у субъекта.

Может быть полезным лечение конкретной вирусной инфекции с применением по меньшей мере одного противовирусного хелатного комплекса ON и противовирусного полипептида, где каждое из этих

соединений вводится раздельно в различных фармацевтических композициях, используя один и тот же путь введения или используя различные маршруты введения.

Для того, чтобы обеспечить наилучший возможный противовирусный ответ у субъекта, может быть необходимым добавление к комбинированной терапии с применением хелатного олигонуклеотида и противовирусного полипептида, вводимых в одной фармацевтической композиции или в различных фармацевтических композициях, третьего лекарственного препарата, который не содержит олигонуклеотидов и полипептидов. Этими лекарственными препаратами могут быть (но эти препараты не ограничиваются только перечисленными ниже) энтекавир, тенофовира дизопроксил фумарат, телбувидин, адефовир дипивоксил, ламивудин, рибавирин, теллапревир, боцепривир, GS-7977, теобувир, занамивир, осельтамивир, ганцикловир, фоскарнет, ацикловир, зидовудин, абакавир, лопинавир, ритонавир и/или эфавиренц. Такие противовирусные лекарственные препараты могут препятствовать репликации вирусного генома и/или вирусной мРНК во многих вирусах, таких как вирус гепатита С, вирус гепатита В, ВИЧ, грипп, вирус саркомы Рауса и цитомегаловирус.

Возможно, что комбинация специфических противовирусных эффектов противовирусного хелатного комплекса ON совместно с иммуностимулирующими эффектами противовирусных полипептидов или пегилированных полипептидов и блокированием репликации вирусной ДНК/РНК перечисленными выше лекарственными препаратами, не содержащими олигонуклеотидов и полипептидов, может обеспечить наилучший и наиболее мощный терапевтический ответ у субъекта с вирусной инфекцией и еще больше увеличить шансы достижения субъектом исследования долговременного контроля вируса, который будет поддерживаться после прекращения лечения.

Хелатный ON комплекс в рецептуре может быть получен из любых ON с противовирусной активностью, примеры которых представлены в табл. 1.

Таблица 1. Примеры ON, которые могут быть получены в виде хелатных комплексов

Класс ON	Тип нуклеиновой кислоты	Последовательность (5' – 3')	Модификации
NAP	ДНК	(AC) ₂₀ (SEQ ID NO: 2)	Все связи PS
NAP	ДНК	(CA) ₂₀ (SEQ ID NO: 10)	Все связи PS
NAP	ДНК	(A-5' MeC) ₂₀ (SEQ ID NO: 11)	Все связи PS
NAP	ДНК	(5' MeC-A) ₂₀ (SEQ ID NO: 12)	Все связи PS
NAP	РНК	(2'-OMeA-2'-OMeC) ₂₀ (SEQ ID NO: 13)	Все связи PS
NAP	РНК	(2'-OMeC-2'-OMeA) ₂₀ (SEQ ID NO: 14)	Все связи PS
NAP	ДНК	(AG) ₂₀ (SEQ ID NO: 3)	Все связи PS
NAP	ДНК	(GA) ₂₀ (SEQ ID NO: 15)	Все связи PS
NAP	ДНК	C ₄₀ (SEQ ID NO: 1)	Все связи PS
NAP	ДНК	(TC) ₂₀ (SEQ ID NO: 5)	Все связи PS
NAP	ДНК	(CT) ₂₀	Все связи PS

Класс ON	Тип нуклеиновой кислоты	Последовательность (5' – 3')	Модификации
		(SEQ ID NO: 16)	
NAP	ДНК	(TG) ₂₀ (SEQ ID NO: 6)	Все связи PS
NAP	ДНК	(GT) ₂₀ (SEQ ID NO: 17)	Все связи PS
NAP	РНК	(2'-OMe, 5'MeC-2'-OMeA) ₂₀ (SEQ ID NO: 4)	Все связи PS
NAP	РНК	(2'-OMeA-2'-OMe, 5'MeC) ₂₀ (SEQ ID NO: 18)	Все связи PS
микроРНК	LNA /ДНК	CCATTGTCACA ^m CTC ^m CA (SEQ ID NO: 7)	Все связи PS Закрытая нуклеиновая кислота (LNA) жирным шрифтом (^m C = 5'MeC)
микроРНК	ДНК / РНК	Последовательность, соответствующая микроРНК хозяина	Все связи PS могут содержать LNA или РНК с 2'-модификацией рибозы
Анти-смысловой	ДНК / РНК	Последовательность, соответствующая вирусной мРНК или мРНК хозяина	Все связи PS могут содержать часть РНК с 2'-модификацией рибозы или LNA
миРНК / кшРНК	Двухцепочечная РНК / ДНК	Последовательность, соответствующая белку X вируса гепатита В	Может содержать РНК с 2'-модификацией рибозы, может содержать PS
миРНК	Двухцепочечная РНК / ДНК	GGCUCCUUAGCAAAGUCAAG _d T _d T (SEQ ID NO: 8) + CUUGACUUUGCUAAGAGCC _d T _d T (SEQ ID NO: 9) Последовательность, соответствующая мРНК для мРНК белка N RSV	Все РНК за исключением дезокситимидина (dT), может содержать PS
миРНК / кшРНК	Двухцепочечная РНК / ДНК	Последовательность, соответствующая вирусной мРНК	Может содержать РНК с 2'-модификацией рибозы, может содержать PS

LNA = закрытая нуклеиновая кислота, PS = тиофосфат,
2'-OMe = 2'-O-метил, 5'MeC = 5'-метилцитозин

Полипептид в рецептуре может оказывать прямое противовирусное действие или обладать способностью стимулировать противовирусную активность организма хозяина и может быть следующим соединением:

тимозин α1;

любой α-интерферон или его пегилированные производные;

любой β-интерферон или его пегилированные производные;

любой γ-интерферон или его пегилированные производные;

любой λ-интерферон или его пегилированные производные;

интерферон α-2a, или α-2b, или α-N3;

интерферон β-1a или β-1b;

интерферон γ-1b;

интерферон λ1, или λ2, или λ3;

пегилированный интерферон α-2a, или α-2b, или λ1, или λ2, или λ3;

мирклудекс В;

любой противовирусный цитокин или его пегилированные производные;

белок тимуса А

и/или любой полипептид или пегилированный полипептид с подтвержденной противовирусной активностью или иммуностимулирующим действием.

Здесь обеспечивается демонстрация того, что многочисленные различные хелатные ON комплексы могут быть объединены с различными лекарственными препаратами на основе полипептидов или пегилированных полипептидов в одной фармацевтической композиции, которая не влияет на структуру либо ON, либо полипептида.

Эти композиции могут использоваться для введения как хелатных комплексов ON, так и полипептидных лекарственных препаратов нуждающимся в такой терапии субъектам в одно и то же время и с

применением одного режима введения, как показано в примере VI ниже).

Кроме этого, упомянутые выше композиции могут включать физиологически и/или фармацевтически приемлемые носители, адъюванты, наполнители и/или вспомогательные вещества. Характеристики такого носителя могут зависеть от пути введения. Термин "фармацевтически приемлемый носитель, адъювант, наполнитель и/или вспомогательное вещество" относится к включаемым в композицию настоящего изобретения носителю, адъюванту, наполнителю и/или вспомогательному веществу, которые могут быть введены субъекту и которые не ухудшают фармакологического действия этой композиции. Фармацевтически приемлемые носители, адъюванты, наполнители и/или вспомогательные вещества, которые могут использоваться в описанных здесь фармацевтических композициях, включают, не ограничиваясь только перечисленным, следующее: ионообменные материалы, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, самоэмульгирующиеся системы доставки лекарственных средств ("SEDDS"), поверхностно-активные вещества, используемые в таких лекарственных формах как "Tween" (полисорбатные эфиры) или других похожих полимерных матрицах доставки лекарственных средств, сывороточные протеины, такие как сывороточный альбумин человека, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбат калия, сорбиновая кислота, смеси неполных глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, вода, соли или электролиты, такие как протаминсульфат, двузамещенный фосфат натрия, двузамещенный фосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный оксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, материалы на основе целлюлозных волокон, полиэтиленгликоль, натрий-карбоксиметилцеллюлоза, полиакрилаты, воск, полиэтилен-полиоксипропиленовые блок-полимеры, полиэтиленгликоль, ланолин, каприлат натрия, тетрадецилмальтозид (TDM) или другие TDM-производные алкилированных сахаридов. Циклодекстрины, такие как α -, β - и γ -циклодекстрин, или химически модифицированные производные, такие как гидроксилалкилциклодекстрины, включая 2- и 3-гидроксипропил- β -циклодекстрины, или другие растворенные производные также могут использоваться для улучшения доставки композиций согласно настоящему изобретению.

Описанные здесь композиции могут содержать другие терапевтические средства, такие как описанные ниже, и могут состояться, например, с применением обычных твердых или жидких наполнителей или растворителей, а также фармацевтических добавок типа, соответствующего режиму желательного введения (например, вспомогательные вещества, связующие вещества, консерванты, стабилизаторы, ароматизаторы и т.д.), в соответствии с методиками, которые хорошо известны в области фармацевтических рецептур.

Описанные здесь композиции могут вводиться с использованием любых подходящих способов, например перорально, например в форме таблеток, капсул, гранул или порошков; сублингвально, буккально, парентерально, например подкожными, внутримышечными, внутривенными, субарахноидальными инъекциями или инфузиями (например, в форме стерильных инъекционных водных или неводных растворов или суспензий); посредством ингаляций; местным нанесением, например в форме кремов или мазей; или ректально, например в форме суппозитория или с помощью клизмы; в дозированных лекарственных формах, содержащих нетоксичные, фармацевтически приемлемые наполнители или растворители. Настоящие композиции могут вводиться, например, в форме, пригодной для немедленного высвобождения или продленного высвобождения. Немедленное высвобождение или продленное высвобождение могут обеспечиваться посредством использования подходящих фармацевтических композиций или, в частности в случае продленного высвобождения, с помощью таких медицинских средств как подкожные имплантаты или осмотические насосы. Таким образом, упомянутые выше композиции могут быть приспособлены для введения с использованием одного из следующих путей: внутриглазное введение, пероральный прием, сублингвальное введение, энтеральное введение, ингаляция, подкожная инъекция, внутримышечная инъекция, интраперитонеальная инъекция, субарахноидальная инъекция, субарахноидальная инфузия, эндотрахеальная, внутривенная инъекция, или инфузия, или местное нанесение.

Композиции примеров для перорального введения включают суспензии, которые могут содержать, например, микрокристаллическую целлюлозу в качестве наполнителя, альгиновую кислоту или альгинат натрия в качестве суспендирующего вещества, метилцеллюлозу в качестве усилителя вязкости и подсластители или ароматизирующие вещества, известные в данной области; и таблетки с немедленным высвобождением активной субстанции, которые могут включать, например, микрокристаллическую целлюлозу, крахмал, стеарат магния, и/или лактозу, и/или другие вспомогательные вещества, связующие вещества, экстендеры, дезинтегрирующие агенты, растворители и смазывающие вещества, известные в данной области и не нарушающие стабильность хелатного олигонуклеотидного комплекса. Настоящие композиции также могут вводиться через ротовую полость сублингвальным и/или буккальным способом введения. Примеры пригодных для применения форм представлены формованными таблетками, прессованными таблетками или таблетками, полученными методом сублимационной сушки. Примеры композиций включают композиции, составляющие настоящие композиции с быстрорастворимыми разбавителями, такими как маннит, лактоза, сахароза и/или циклодекстрины. Также в такие рецептуры могут быть включены высокомолекулярные вспомогательные вещества, такие как целлюлозы (авицел) или полиэтиленгликоли (ПЭГ). Такие рецептуры могут также включать вспомогательное вещество, способствующее за-

креплению на слизистой оболочке, такое как гидроксипропилцеллюлоза (НРС), гидроксипропилметилцеллюлоза (НРМС), натрийкарбоксиметилцеллюлоза (SCMC), сополимер малеинового ангидрида (например, Gantrez), и вещества для контроля высвобождения, такие как полиакриловый сополимер (например, Carbopol 934). Лубриканты, вещества, способствующие скольжению (глиданты), окрашивающие вещества и стабилизирующие вещества также могут добавляться в целях упрощения получения и применения.

Эффективное количество описанного здесь соединения может быть определено средним специалистом в данной области и включает примеры размеров дозировок для взрослых пациентов в диапазоне от 0,1 до 50 мг активного соединения на 1 кг массы тела в сутки, при этом активное соединение может вводиться в форме однократной дозы или в форме индивидуальных дробных доз, например (но не ограничиваясь), от 1 до 5 раз в сутки или от 1 до 7 доз в неделю. Следует понимать, что специфический уровень дозы и частота дозирования могут различаться для каждого конкретного субъекта и будут зависеть от множества факторов, включая активность конкретного используемого соединения, метаболической стабильности и длительности действия данного соединения, вида, возраста, массы тела, общего состояния здоровья, пола и рациона питания субъекта, режима и времени введения, скорости экскреции и клиренса, комбинации лекарственных средств и тяжести конкретного состояния. Предпочтительно субъекты лечения включают животных, наиболее предпочтительно различные виды млекопитающих, таких как люди, и домашних животных, таких как собаки, кошки и другие подобные.

Также здесь обеспечивается пример благоприятного противовирусного действия противовирусного хелатного олигонуклеотидного комплекса и противовирусного полипептида при их комбинированном использовании в целях лечения больных людей с вирусной инфекцией.

Настоящее раскрытие будет более понятным при обращении к следующим далее примерам.

Пример I.

Определение характеристик вырожденных олигонуклеотидов.

Фиг. 1А подробно описывает ВЭЖХ-разделение (используя гидрофобную колонку) двух олигонуклеотидных препаратов, которые вместе вводятся в колонку в одно и то же время. Первый из них именуется внутренним стандартом и является 21-звенным тиофосфорилированным ON со специфической определенной последовательностью, а второй является REP 2006 (40-звенным вырожденным тиофосфорилированным ON). Оба этих вещества разделяются четко различаемыми пиками на основе только их физико-химических свойств (т.е. размер и гидрофобность); последовательность нуклеотидов, представленная в каждом из этих ON, не оказывает значимого влияния на их физико-химические свойства и, следовательно, не оказывает влияния на их разделение. Как таковой внутренний стандарт вымывается из колонки как хорошо определяемый пик с меньшим временем удерживания по сравнению с REP 2006 только благодаря разнице в размерах этих двух олигонуклеотидных полимеров. Следует заметить, что "плечи" по обе стороны пика REP 2006 обеспечиваются неудачно синтезированными последовательностями, что является типичным явлением при получении более длинных олигонуклеотидов. Несмотря на гетерогенную природу последовательности REP 2006, это соединение разрешается как аналогично четко выраженный пик ВЭЖХ в виде 21-звенной специфической последовательности, что иллюстрирует общие физико-химические свойства всех компонентов в препарате REP 2006, даже несмотря на присутствие очень большого количества различных последовательностей. Следом за разделением с применением ВЭЖХ пиков REP 2006 и 21-звенной последовательности они могут быть исследованы способом масс-спектропии (MS) для идентификации компонентов, присутствующих в этих трех определенных пиках (фиг. 1В и С).

На фиг. 1В, 21-мер разделяется на отдельные формы с молекулярной массой 7402,6 Да, что соответствует PS-ON, имеющему определенную последовательность. Однако анализ REP 2006 (фиг. 1С) способом масс-спектропии продемонстрировал исключительно большое количество присутствующих форм, диапазон масс которых имеет практически идеальное нормальное распределение, соответствующее полностью вырожденной природе. Этот диапазон масс простирается от С40 (наименьшая форма) до А40 (наибольшая форма), и показатель преобладания этих форм с увеличением количества форм (интенсивность пика) по мере приближения их масс к центру диапазона масс является крайне небольшим. Это происходит вследствие того, что все большее количество различных последовательностей имеет сходную массу. Тот факт, что все эти различные формы олигонуклеотидов, присутствующие в REP 2006, имеют одно и то же время удерживания на гидрофобной колонке во время разделения способом ВЭЖХ, ясно демонстрирует, что ON одинакового размера и с одинаковыми химическими модификациями (т.е. тиофосфорилированием) будут, вероятно, иметь очень похожие (если не идентичные) физико-химические свойства и, по существу, могут рассматриваться в качестве функционально подобных в отношении любого применения или свойства, которые не зависят от последовательности нуклеотидов, присутствующих в конкретной молекуле олигонуклеотида. Таким образом, образование олигонуклеотидного хелатного комплекса, наблюдаемое с некоторым конкретным вырожденным ON (например, REP 2006), не может зависеть от последовательности присутствующих ON и должно зависеть от сохранных физико-химических свойств каждого ON.

Пример II.

Образование противовирусных олигонуклеотидных хелатных комплексов.

REP 2031, REP 2055, REP 2057 и REP 2139 являются полимерами нуклеиновых кислот (NAP) с широким спектром антивирусной активности против вирусов ВИЧ, вируса простого герпеса (HSV), цитомегаловируса, вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), вируса гепатита С (HCV) и других имеющих оболочечных вирусов (Bernstein и др., 2008, Antimicrobial Agents Chemother. 52: 2727-2733; Cardin и др., 2009, Virology J. 6: 214; Vaillant и др., 2006, Antimicrobial Agents Chemother., 50: 1393-1401; Guzman и др., 2007, Antiviral Therapy, 12: 1147-1156; Lee и др., Virology, 372: 107-117; Matsumura и др., 2009, Gastroenterology 137: 673-681). Все эти соединения являются 40-звенными полностью тиофосфорилированными олигонуклеотидами с 5'-3'-последовательностями C₄₀ в случае REP 2031 (SEQ ID NO: 1), (AC)₂₀ в случае REP 2055 (SEQ ID NO: 2), (AG)₂₀ в случае REP 2057 (SEQ ID NO: 3) и (2'-OMeA - 2'-OMe, 5'MeC)₂₀ в случае REP 2139 (SEQ ID NO: 18). В то время как REP 2031, REP 2055 и REP 2057 являются олигонуклеотидами ДНК, REP 2139 является олигонуклеотидом РНК, в котором все рибозы являются 2'-О-метил-модифицированными, а все цитозины являются 5'-метилированными.

Образование хелатных комплексов с противовирусными олигонуклеотидами исследовалось способом флуоресцентной поляризации с применением меченых 3'-FITC производных этих соединений. В ходе синтеза ON каждый ON был конъюгирован с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) по 3'-концу жестким 3-углеродным линкером с использованием широко применяемых реагентов и методов синтеза. Эти олигонуклеотиды были расщеплены во время синтеза и оставлены в виде аммониевых солей. Каждый из этих олигонуклеотидов был получен в виде 0,5 мМ стокового раствора в 1 мМ TRIS (pH 7,2). Эти исходные растворы использовались для приготовления 3 нМ флуоресцентных растворов ON в FP-буфере (10 мМ TRIS, 80 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ β-меркаптоэтанол и 0,1% Tween®-20). ЭДТА присутствовал с целью удаления всех двухвалентных металлов, имевшихся в растворе до выполнения измерений с применением флуоресцентной поляризации (FP). Каждый из этих буферных растворов также содержал 80 мМ NaCl для оценки образования олигонуклеотидного комплекса в условиях мольного избытка одновалентных катионов. К каждому флуоресцентному ON в растворе добавлялись хлоридные соли (степень чистоты соответствовала стандарту ACS /Американское химическое общество/) двухвалентных (2+) металлов (как описано в табл. 2). Мониторинг образования димеров или хелатных комплексов ON высшего порядка выполнялся посредством увеличения интенсивности флуоресцентной поляризации (количественное определение с помощью безразмерных единиц " mP") таким образом, чтобы усиление образования олигонуклеотидных хелатных комплексов приводило к увеличению изменений в массе (см. фиг. 3). Обеспечиваемое вследствие этого замедление перемещения олигонуклеотидных хелатных комплексов в растворе приводит к усилению поляризации флуоресцентного излучения (см. фиг. 4). Результаты этих экспериментов представлены в табл. 2.

Таблица 2. Образование олигонуклеотидных хелатных комплексов с NAP различных двухвалентных металлов

Олигонуклеотид	Флуоресцентная поляризация (mP)							
	Кальций (в форме CaCl ₂)				Магний (в форме MgCl ₂)			
	отсутствует		присутствует		отсутствует		присутствует	
	средн.	станд. откл.	средн.	станд. откл.	средн.	станд. откл.	средн.	станд. откл.
REP 2006-FL	92	4,24	183	4,94	97	2,82	187	1,41
REP 2031-FL	58,5	23,3	114,5	2,1	52,5	3,5	89,5	2,1
REP 2055-FL	48	5,7	172	15,6	60,0	2,8	151,0	7,8
REP 2057-FL	59,5	1,4	152,5	6,36	61	4,24	136,5	2,83
REP 2139-FL	48	7,1	138,5	10,6	46	,4	142,5	7,8

Среднее значение и стандартное отклонение базируются на измерениях в двух повторностях.

В каждом случае наблюдалось значимое увеличение флуоресцентной поляризации всех меченых флуоресцентными метками олигонуклеотидов в присутствии кальция и магния, что указывало на образование олигонуклеотидных хелатных комплексов с катионами двухвалентных металлов. Эти результаты демонстрируют следующее.

REP 2006, REP 2031, REP 2055, REP 2057 и REP 2139 образуют димеры и комплексы высшего порядка в присутствии катионов магния и кальция. Можно ожидать образования таких комплексов с катионами других поливалентных металлов и с любыми ON (как это продемонстрировано с вырожденным NAP REP 2006). Образование этих комплексов олигонуклеотидов включает взаимодействие таких олигонуклеотидов с катионами этих двухвалентных металлов.

Образование комплексов ON не может обуславливаться гибридизацией между азотистыми основаниями через обычные взаимодействия Уотсона-Крика, поскольку REP 2031, REP 2055, REP 2057 и REP 2139 не могут самогибридизироваться в применяемых экспериментальных условиях.

Образование этих олигонуклеотидных комплексов происходит стабильно, и они являются растворимыми в водном растворе, и поскольку оказалось, что эти комплексы включают рассматриваемый двухвалентный металл в качестве составной части образовавшегося комплекса, эти олигонуклеотидные

комплексы оказывают хелатирующий эффект на рассматриваемый двухвалентный металл, находящийся в растворе, в котором был образован данный олигонуклеотидный комплекс.

Пример III.

Получение композиций, содержащих хелатные ON комплексы и полипептиды.

Получение композиций, содержащих хелатные ON комплексы и полипептиды, осуществлялось с применением пяти различных противовирусных ON и четырех противовирусных полипептидов. Используемыми олигонуклеотидами были NAPS, которые ранее продемонстрировали широкий спектр антивирусной активности против оболочечных вирусов, включая вирус гепатита С, вирус гепатита В, вирус гриппа, респираторно-синцитиальный вирус (RSV), вирус эбола, вирусы простого герпеса HSV-1 и HSV-2. Этими олигонуклеотидами являются REP 2006 (40-звенный вырожденный тиофосфорилированный NAP), REP 2055 (SEQ ID NO: 2), REP 2057 (SEQ ID NO: 3), REP 2139 (SEQ ID NO: 18) и REP 2148 (SEQ ID NO: 11). Эти NAP были получены в условиях стандартного синтеза на твердой фазе в проточном реакторе и дополнительно были подвергнуты солевому обмену для замены противоионов аммония на противоионы натрия во время очистки. Значения молекулярной массы этих олигонуклеотидов в расчете на свободные кислоты составляют (12612-13092), 12612, 13413 и 14094 и 12893 Да соответственно. Применявшимися противовирусными полипептидами были интерферон α -2b, тимозин α 1, пегилированный интерферон α -2a и интерферон λ 1 (IL-29), у всех из которых была отмечена противовирусная активность (Yang и др., 2008, *Antiviral Res.*, 77: 136-141; Fried и др., 2002, *N. Engl. J. Med.*, 347: 975-982; Friberg и др., 2013, *Antimicrob. Agents Chemother.* 57: 1312-1322). Все олигонуклеотиды были синтезированы в соответствии с требованиями стандартов в данной области для твердофазного синтеза олигонуклеотидов и были получены в форме солей натрия, пригодных для введения *in vivo*, с помощью общепринятых способов, и перед помещением на хранение высушены способом сублимационной сушки до содержания воды <10%. REP 2006, REP 2055, REP 2057 и REP 2148 представляли собой неочищенные препараты, содержащие незначительные количества продуктов незавершенного синтеза, которые обычно образуются во время твердофазного синтеза. REP 2139 был приготовлен как препарат с более высокой степенью очистки, в котором отсутствовало большинство продуктов незавершенного синтеза. REP 2006, REP 2057 и REP 2139 были заранее приготовлены в форме растворов в физиологическом растворе и корректировались до 25 мг/мл во время образования хелатных комплексов. REP 2055 также был приготовлен заранее в форме раствора в обычном физрастворе, но его концентрация во время образования хелатных комплексов корректировалась до 12,5 мг/мл. Тимозин α 1 является синтетическим аминоконцевым ацилированным пептидом из 28 аминокислот с молекулярной массой 3108 Да и был получен в форме коммерческого препарата (задаксинTM), который был приготовлен в форме 1,6 мг/мл водного раствора для инъекций. Интерферон α -2b был получен в *E. coli* с применением технологий рекомбинантных ДНК и имел молекулярную массу 19271 Да. Интерферон α -2b был получен в форме коммерческого препарата (интрон АTM) и приготовлен в виде 1×10^7 МЕ/мл водного раствора для инъекций, который также содержал 1 мг/мл сывороточного альбумина человека (имеющего молекулярную массу около 66500 Да). Пегилированный интерферон α -2a является ковалентным конъюгатом интерферона α -2a и одноцепочечного бисмонометоксиполиэтиленгликоля с общей приблизительной молекулярной массой 60000 Да. Пегилированный интерферон α -2a был получен в форме коммерческого препарата (пегасисTM), предварительно разведенного в воде для инъекций и содержащего следовые количества бензилового спирта с концентрацией 360 мкг/мл. Очищенный рекомбинантный интерферон λ 1 (IL-29) был получен как не содержащий носителя раствор с концентрацией 0,5 мг/мл в забуференном фосфатом физиологическом растворе от компании Ebiosciences (Сан-Диего, США) и по данным гель-электрофореза имел молекулярную массу приблизительно 20 кДа.

Хлорид кальция был получен в виде соответствующего требованиям фармакопеи США препарата $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ с концентрацией в воде для инъекций 100 мг/мл (LifeshieldTM от компании Hospira). Сульфат магния был получен в виде соответствующего требованиям фармакопеи США препарата с концентрацией 500 мг/мл $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в воде для инъекций (Baxter) и разведен до концентрации 100 мг/мл в физиологическом растворе. Для получения хелатных комплексов ON, содержащих кальций, магний или кальций и магний одновременно, растворы этих солей металлов постепенно добавлялись по каплям к раствору олигонуклеотида при постоянном перемешивании до достижения желаемого соотношения соли металла и олигонуклеотида. Для хелатных комплексов кальция было получено соотношение в растворе 30 мг хлорида кальция на 100 мг олигонуклеотида за исключением хелатного комплекса кальция REP 2148, который содержал 20 мг хлорида кальция на 100 мг ON. Для хелатных комплексов магния в растворе было получено соотношение 30 мг сульфата магния на 100 мг ON. Для смешанных хелатных комплексов магния и кальция в растворе было получено соотношение 15 мг сульфата магния и 15 мг кальция хлорида на 100 мг ON. Была показана пригодность этой методики для получения рецептур хелатных комплексов ON (описано в публикации патентной заявки США №2012/0046348). По завершении данной процедуры олигонуклеотидный хелатный комплекс представлял собой чистый однородный раствор очень бледного желтого цвета.

Композиции хелатного комплекса ON с полипептидом или пегилированным полипептидом были

получены с помощью легкого перемешивания раствора хелатного комплекса ON с раствором полипептида или раствором пегилированного полипептида, взятых в соотношении 1:1, с получением конечного объема в 1 мл.

Пример IV.

Определение характеристик композиций, содержащих хелатные ON комплексы и полипептиды.

Для подтверждения идентичности олигонуклеотидов и полипептидов или пегилированных полипептидов, содержащихся в композициях, полученных в примере III, был проведен их анализ с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с последующим анализом с помощью масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ESI-MS). Вследствие значительных отличий в массе и химическом составе форм ON и полипептидов или пегилированных полипептидов, имеющих в этих композициях, для анализа использовались три различные методики ВЭЖХ.

Олиго-способ:	Твердая фаза:	2 x 50 мм ACE™ C18 (3 мкм)
Олиго-способ:	Подвижная фаза:	A = 1/0,1% HFIPA/DIEA B = 65/0,075/0,0375% ACN/HFIPA/DIEA
	Градиентное элюирование:	5-25% B в течение 20 мин
	Скорость потока:	70% B в течение 2 мин при температуре 60°C 0,4 мл/мин
Способ 1 для белков:	Твердая фаза:	2 x 50 мм PLRP-s (Agilent™) 4000A (8 мкм)
	Подвижная фаза:	A = 0,05% TFA в ACN B = 0,05% TFA в ACN C = 0,1% NH ₄ OH в H ₂ O D = 0,1% NH ₄ OH в 40/40/20 ACN/MeOH/H ₂ O
	Градиентное элюирование:	Промывание 80/20% C/D в течение 1 мин с последующим сливом подвижной фазы (при необходимости промывание 20% D в течение 1 мин с последующим сливом подвижной фазы) промывание 20% - 100% D в течение 15 мин, промывание 100% B в течение 2 мин (при необходимости промывание 20-70% B в течение 16 мин)
	Скорость потока:	0,5 мл/мин для промывания
Способ 2 для белков:	Твердая фаза:	2 x 50 мм PLRP-s (Agilent™) 4000A (8 мкм)
	Подвижная фаза:	A = 0,05% TFA в ACN B = 0,05% TFA в ACN C = 0,1% NH ₄ OH в H ₂ O D = 0,1% NH ₄ OH в 40/40/20 ACN/MeOH/H ₂ O
	Градиентное элюирование:	промывание 80/20% C/D в течение 1 мин без добавления в колонку 80/20% A/B – 100% B в течение 15 мин 100% B в течение 2 мин
	Скорость потока:	0,5 мл/мин для промывания 0,3 мл/мин для градиентного элюирования

В качестве измерительного инструмента использовался масс-спектрометр LTQ Orbitrap Discovery, функционировавший в режиме сканирования LTQ с отрицательными ионами для олиго-способа и в режиме сканирования Orbitrap с положительными ионами с высокой массой и разрешением 7500 в случае обоих способов для белков. Условные обозначения: ACN = ацетонитрил, TFA = трифторуксусная кислота, HFIPA = гексафторизопропанол, DIEA = N,N-диизопропилэтиламин.

Результаты этих анализов представлены на фиг. 5-95. Все ВЭЖХ-хроматограммы построены на основе данных для полного ионного тока (TIC), где значениям времени удерживания пиков сопутствуют данные идентификации по массе, полученные в ходе последующего анализа с применением методики ESI-MS (за исключением фиг. 39, 43, 47, 51, 55, 77, 81, 91 и 95, где этому помешало наличие в пегилированном интерфероне α -2a конъюгата полиэтиленгликоля).

Для случаев композиций, содержащих олигонуклеотидные хелатные комплексы и тимозин α 1, этот олиго-способ был достаточен для одновременного анализа обоих соединений.

Для других композиций, содержащих белки с большой молекулярной массой, анализ олигонуклеотидов и анализ полипептидов выполнялся с использованием одного и того же образца, но с применением различных методик ВЭЖХ (как показано на фиг. 5-95).

Анализ содержания олигонуклеотидов во всех композициях посредством жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (LC-MS) продемонстрировал, что присутствующие в этих композициях олигонуклеотиды имеют ожидаемую чистоту: незначительные количества продуктов незавершенного синтеза

олигонуклеотидов наблюдалось в ВЭЖХ-анализах с применением олиго-способа для REP 2055 (фиг. 5, 24, 40, 56, 68, 71, 74 и 78), REP 2057 (фиг. 9, 27 и 44) и REP 2148 (фиг. 17, 33, 52 и 64), но отсутствовали в случае REP 2139 (фиг. 13, 30, 48, 60, 82, 85, 88 и 92). Во всех случаях результаты ESI-MS анализа основных пиков ON практически идеально коррелировали с ожидаемыми значениями молекулярной массы REP 2055, REP 2057, REP 2139 и REP 2148. Для REP 2006 анализ ESI-MS основного пика продемонстрировал широкий пик в диапазоне 12612-13092 Да, соответствующий его вырожденной сути (фиг. 22 и 37).

Для анализа композиций, содержащих интерферон α -2b, ВЭЖХ-хроматография с использованием способа 1 для белков продемонстрировала крупные, плохо разрешенные пики, что указывало на присутствие в этих композициях более одного полипептида (фиг. 7, 11, 15 и 19), но основной пик разрешался на две четко различающихся по массе формы, практически точно коррелирующих с ожидаемыми значениями молекулярной массы интерферона α -2b и альбумина человека (фиг. 8, 12, 16 и 20).

Что касается композиций, содержащих тимозин α 1, на хроматограммах ВЭЖХ, полученных с применением олиго-способа 1, виден второй заметный пик для того же разделения со значительно меньшим временем удерживания, чем у (основного) пика олигонуклеотида (фиг. 21, 24, 27, 30, 33, 68, 71, 82 и 85), вследствие относительно малой молекулярной массы этого полипептида. Во всех случаях данные ESI-MS этого вторичного пика практически точно коррелировали с ожидаемой молекулярной массой тимозина α 1 (фиг. 23, 26, 29, 32, 35, 70, 73, 84 и 87).

Для композиций, содержащих пегилированный интерферон α -2a, анализ с использованием LC-MS в значительной степени затруднен из-за присутствия пегилированного конъюгата, который генерирует ионы многочисленных типов, что делает очень сложной корректную деконволюцию масс-спектра пегилированного полипептида. Однако все данные ВЭЖХ по содержащим пегилированный интерферон α -2a композициям, полученные с помощью способа 2 для белков, продемонстрировали сходные значимые пики, соответствующие величинам времени удерживания, ожидавшимся для пегилированного полипептида (фиг. 38, 42, 46, 50, 54, 76, 80, 90 и 94). Анализ ESI-MS этих пиков во всех случаях продемонстрировал сходную группу сигналов, похожих на сигналы пегилированных форм, со значениями m/z 600-100- и 1500-3600, согласующимися с присутствием пегилированного белка (фиг. 39, 43, 47, 51, 55, 77, 81, 91 и 95).

Часть композиций олигонуклеотидного хелат и полипептида, полученных в примере III, были использованы для определения кальция или магния с применением оптической эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (ICP-OES). Результаты определения кальция и магния для каждой проанализированной композиции представлены в табл. 3.

Таблица 3. Определение металлов в композициях хелатный ON комплекс - полипептид
 Присутствующий ON
 (в форме хелата)

	Присутствующий полипептид	Содержание металла (% общей массы по данным определения ICP-OES)	
		Кальций	Магний
REP 2006	тимозин α1;	0,107%	отсутствует
REP 2006	пегилированный интерферон α-2a	0,0991%	отсутствует
REP 2055	интерферон α-2b	0,0242%	отсутствует
REP 2055	тимозин α1;	0,0393%	отсутствует
REP 2055	пегилированный интерферон α-2a	0,0448%	отсутствует
REP 2055	интерферон λ1	0,0515%	отсутствует
REP 2057	интерферон α-2b	0,0987%	отсутствует
REP 2057	тимозин α1;	0,101%	отсутствует
REP 2057	пегилированный интерферон α-2a	0,114%	отсутствует
REP 2139	интерферон α-2b	0,0953%	отсутствует
REP 2139	тимозин α1;	0,0922%	отсутствует
REP 2139	пегилированный интерферон α-2a	0,104%	отсутствует
REP 2139	интерферон λ1	0,0959%	отсутствует
REP 2148	интерферон α-2b	0,0615%	отсутствует
REP 2148	тимозин α1;	0,061%	отсутствует
REP 2148	пегилированный интерферон α-2a	0,0641%	отсутствует
REP 2148	интерферон λ1	0,065%	отсутствует
REP 2055	тимозин α1;	отсутствует	0,0199%
REP 2055	тимозин α1;	0,0248%	0,00959%
REP 2055	пегилированный интерферон α-2a	отсутствует	0,0181%
REP 2055	пегилированный интерферон α-2a	0,0244%	0,00938%
REP 2139	тимозин α1;	отсутствует	0,0361%
REP 2139	тимозин α1;	0,0453%	0,0175%
REP 2139	пегилированный интерферон α-2a	отсутствует	0,0340%
REP 2139	пегилированный интерферон α-2a	0,0482%	0,0184%

Полученные в примерах III и IV результаты демонстрируют следующее.

1. Композиции, содержащие хелатные комплексы ON с кальцием, магнием или смесью кальция и магния, и полипептиды или пегилированные полипептиды, могут быть получены в форме, подходящей для парентерального введения.

2. Ни олигонуклеотид, ни полипептид или пегилированный полипептид в этих исследуемых композициях не подвергаются обнаруживаемым химическим изменениям, что видно по практически идеальной корреляции между наблюдаемыми и расчетными значениями молекулярной массы для REP 2055, REP 2057, REP 2139, REP 2148, интерферона α-2b, тимозина α1 и интерферона λ1.

3. В случае композиций, содержащих пегилированный интерферон α-2a, олигонуклеотиды не изменяются, и полипептидные изменения (если они существовали) не могли быть обнаружены.

Из этих результатов можно заключить следующее.

1. REP 2006 является полностью вырожденным олигонуклеотидом и как таковой является моделью-прототипом для физико-химических свойств, общих для всех олигонуклеотидов. Поэтому любой ON, который может быть получен в форме хелатного комплекса, может быть совместимым с этими полипептидами или пегилированными полипептидами в растворе.

2. REP 2006, REP 2055, REP 2057 и REP 2148 являются ДНК, в то время как REP 2139 является РНК. Следовательно, любые РНК, или ДНК, или гибридные РНК/ДНК олигонуклеотиды могут использоваться при получении композиций, содержащих олигонуклеотидные хелатные комплексы и полипептиды.

3. REP 2006, REP 2055 и REP 2057 имеют немодифицированные рибозы, в то время как у REP 2139 каждая рибоза является 2'-О-метилованной. Таким образом, все 2'-модификации рибозы будут совместимы с препаратами композиций, содержащих хелатные ON комплексы и полипептиды.

4. Каждый из REP 2139 и REP 2148 содержит цитозин, в дальнейшем модифицируемый в виде 5'-

метилцитозина. Таким образом, олигонуклеотиды, содержащие модифицированные основания, могут использоваться в получении композиций, содержащих хелатные ON комплексы и полипептиды или пегелированные полипептиды.

5. Композиции, содержащие хелатный ON комплекс и полипептид или пегелированный полипептид, будут совместимы с катионом любого фармацевтически приемлемого двухвалентного металла, такого как кальций и/или магний.

6. Структуры четырех полипептидов, используемых в получении композиций, сильно различаются: тимозин $\alpha 1$ является небольшим синтетическим полипептидом, интерферон α -2b и интерферон $\lambda 1$ являются крупными рекомбинантными полипептидами, а пегелированный интерферон α -2a является крупным рекомбинантным полипептидом с большим, сложным пегелированным конъюгатом. Следовательно, композиции, которые содержат хелатные ON комплексы и полипептиды, могут успешно производиться с использованием широкого диапазона полипептидов, начиная от небольших синтетических полипептидов и заканчивая крупными рекомбинантными полипептидами со сложными конъюгатами, такими как полиэтиленгликоль. Возможно, единственным ограничением является то, что рассматриваемый полипептид должен быть растворимым в водных растворах. Кроме этого, использование BSA в качестве белка-носителя в препарате интрон А (применявшегося в качестве источника интерферона α -2b) не препятствует стабильности композиций, полученных с применением этой полипептидной рецептуры.

7. Как описано выше, пегелирование является хорошо известным в данной области процессом, используемым для улучшения переносимости и фармакокинетических свойств полипептидов, и многочисленными пегелированными полипептидами применяются в настоящее время в качестве утвержденных лекарственных средств (см. выше). Следовательно, демонстрация хорошей переносимости присутствия пегелированного полипептида описанными здесь композициями и применимости комбинации хелатного комплекса олигонуклеотида и пегелированного полипептида в целях улучшения противовирусного ответа у больных людей (см. пример VI ниже) снабжает специалистов в данной области ясными сведениями о том, что любой из полипептидов, рассматриваемых здесь в качестве составной части описанных композиций, также может присутствовать в качестве пегелированного полипептида. Например, тимозин $\alpha 1$ может пегелироваться, интерферон α -2b может пегелироваться (пегелированный вариант интерферона α -2b, пегинтрон™ в настоящее время одобрен в качестве лекарственного средства) и интерферон $\lambda 1$ также может пегелироваться (пегелированный вариант интерферона $\lambda 1$ в настоящее время находится в процессе клинической разработки в качестве противовирусного соединения).

Пример V.

NAP ингибируют транспорт поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) из клетки.

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) продемонстрировал способность блокировать множество аспектов иммунного ответа на инфекцию HBV (Cheng и др., J. Hepatology 43: 465-471; Moucari и др., Hepatology 49: 1151-1157; Vanlandschoot и др., J. Gen. Virol. 83: 1281-1289; Woltman и др., PLoS One 6: e15324; Wu и др., Hepatology 49: 1132-1140 и Xu и др., Mol. Immunology 46: 2640-2646). Следовательно, прекращение циркуляции HBsAg может стать критическим фактором восстановления иммунологической компетентности организма пациентов с хроническим инфицированием гепатитом В. Эффективный способ прекращения циркуляции HBsAg заключается в предотвращении образования или высвобождения субвирусных частиц (SVP) из инфицированных клеток (SVP являются главными носителями HBsAg в крови). Морфогенез и внутриклеточный транзит субвирусных частиц может быть смоделирован *in vitro* в клетках ВНК-21 посредством экспрессии малой формы белка HBsAg (sHBsAg), которая является формой, специфически обогащенной субвирусными частицами. Эта модельная система рассматривается в качестве суррогатной модели морфогенеза и транзита субвирусных частиц вируса гепатита В у больных людей (Patient и др., J. Virology 81: 3842-3851). Благодаря критической роли сывороточного поверхностного антигена вируса гепатита В в хронизации инфекции вируса гепатита В, способность соединений блокировать образование SVP или их внутриклеточный транзит в данной модели демонстрирует их активность против вируса HBV.

Были протестированы различные соединения NAP в экспрессирующих sHBsAg клетках ВНК-21, включая полностью вырожденные тиофосфорилированные NAP REP 2006 и REP 2107 (у 2107 также все рибозы являются 2'-О-метил-модифицированными), нетиофосфорилированный, полностью 2'-О-метилованный вырожденный NAP (REP 2086), а также NAP, состоящие из поли(AC)-последовательности: REP 2055 (SEQ ID NO: 2) и REP 2148 (SEQ ID NO: 11). Эти NAP были введены в клетки ВНК-21 способом электропорации одновременно с экспрессией шаблона РНК для sHBsAg. Активность в модельной системе ВНК оценивалась посредством визуализации локализации белка HBsAg внутри клеток ВНК-21 с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии. Соединения рассматривались в качестве активных, если HBsAg был ограничен в перинуклеарном пространстве и предотвращался его транспорт на периферию клетки (секреция). Активность различных NAP-соединений подытоживается в табл. 4 ниже.

Таблица 4. Действие различных NAP на транзит HBsAg в клетках ВНК-21

NAP	HBsAg оставался в перинуклеарном пространстве	HBsAg переход на периферию клетки
контроль (NAP отсутствуют)	-	++++
REP 2006	++++	-
REP 2107	+++	+
REP 2086	-	++++
REP 2055 (SEQ ID NO: 2)	++++	-
REP 2148 (SEQ ID NO: 11)	++++	-

- = действие (эффект) не наблюдается;

от + до ++++ = наблюдался эффект от ограниченного до полного

Результаты лечения экспрессирующими sHBsAg клетками ВНК-21 с применением REP 2006 и REP 2107 демонстрируют способность NAP блокировать транзит sHBsAg независимо от последовательности нуклеотидов. Недостаточная активность REP 2086 показывает, что эта активность напрямую зависит от наличия тиофосфорилирования. Кроме того, эта способность сохранялась в присутствии 2'-модификации рибозы (в REP 2107) и модификации основания (5'-метилцитозин в случае REP 2148). Кроме этого, известно, что REP 2107, REP 2055 и REP 2139 совершенно лишены какого-либо иммуностимулирующего действия, но были сравнительно действенны в сравнении с REP 2006. Также определенная последовательность поли-АС (REP 2055 и REP 2148) была активной на сопоставимом с вырожденной последовательностью (REP 2006 и REP 2107) уровне.

Эти результаты показывают, что в контексте вырожденной последовательности и последовательностей, содержащих повторы АС (и поэтому также СА), и других последовательностей, которые также содержат повторы чередующихся пуриновых/пиримидиновых нуклеотидов (таких как TG и GT или UG и GU) и имеющих 2'-модификации рибозы, или модификации оснований, или имеющих и 2'-модификации рибозы, и модификации оснований (см. REP 2139 в примере VI), ожидается, что тиофосфорилированные NAP будут способны блокировать образование, внутриклеточный транзит и секрецию SVP из инфицированных клеток при длине олигонуклеотидов от 20-120 нуклеотидов, как описывается в патентах США 8008269, 8008270 и 8067385.

Пример VI.

Комбинированная терапия для лечения хронического гепатита В у пациентов-людей.

REP 2055 является простой натриевой солью тиофосфорилированного ON (SEQ ID NO: 2). REP 2139-Са является кальциевым хелатным комплексом тиофосфорилированного олигонуклеотида REP 2139 (SEQ ID NO: 18), полученным в физиологическом растворе с использованием соотношения 30 мг CaCl₂ на каждые 100 мг присутствующего олигонуклеотида. REP 2055 и REP 2139 являются NAP, и это семейство соединений представляет собой противовирусные соединения широкого спектра действия, эффективные против оболочечных вирусов (Bernstein и др., 2008, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 52: 2727-2733; Cardin и др., 2009, Virology Journal, 6: 214; Guzman и др., 2007, Antiviral Therapy, 12: 1147-1156; Lee и др., 2008, Virology, 372: 107-117; Matsumura и др., 2009, Gastroenterology, 137: 673-681; Vailant и др., 2006, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50: 1393-1401 и патенты США 8008269 В, 8008270 и 8067385). Хелатные комплексы не влияют на биологическую активность NAP или других форм ON, и, таким образом, образование REP 2139 в виде хелатного комплекса кальция не влияет на его противовирусную активность. Единственной необходимой для обеспечения противовирусной активности модификацией NAP является тиофосфорилирование каждой связи в ON. Дополнительные модификации, включающие 2'-модификации рибозы (такие как 2'-О-метилирование) и модификации оснований (такие как 5'-метилцитозин и 4'-тиоурацил), оказывают пренебрежимо малый эффект на противовирусную активность NAP, но могут использоваться для оптимизации переносимости у пациентов-людей.

Пегилированный интерферон α -2а предлагается в продаже компанией Roche Inc. (Базель, Швейцария) под торговым наименованием пегасис™ и одобрен для лечения хронической инфекции вируса гепатита В (HBV). Тимозин α 1 продается под торговым наименованием задаксин™ компанией SciClone Pharmaceuticals (Фостер Сити, штат Калифорния, США) и также одобрен для лечения хронической инфекции HBV во многих странах Азии.

Для исследования возможности улучшения противовирусного ответа у пациентов с хронической инфекцией HBV благодаря противовирусному действию терапии NAP в комбинации с иммунотерапией (стимулирование адаптивного и врожденного иммунного ответов) пациенты подвергались монотерапии REP 2055 и комбинированной терапии REP 2139-Са либо с тимозином α 1 (задаксин™, вводившийся в форме подкожной инъекции 1,6 мг дважды в неделю), либо пегилированным интерфероном α -2а (пегасис™, вводившийся в форме подкожной инъекции 180 мг один раз в неделю) согласно их текущему режиму приема NAP.

Оба соединения, REP 2055 и REP 2139-Са, при их использовании в ходе монотерапии одинаково активны в блокировании высвобождения HBsAg, что и является общим терапевтическим механизмом

действия всех NAR против инфекции HBV. REP 2055 и REP 2139-Са при их приеме в режимах сравнительной монотерапии вызывали клиренс HBsAg в сыворотке инфицированных вирусом HBV пациентов у 7 из 8 и 9 из 12 пациентов соответственно, и показатели клиренса сывороточного HBsAg были сравнимы для обоих лекарств (см. табл. 5), что означает сравнимую противовирусную активность этих NAR при их приеме в виде натриевых солей или хелатных комплексов.

Таблица 5. REP 2055 и REP 2139-Са эффективно и сопоставимо устраняют сывороточный HBsAg у пациентов с хронической инфекцией HBV

NAR	Пациент, ответивший на лечение	Сывороточный HBsAg до лечения (мМЕ/мл*)	Сывороточный HBsAg на фоне 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	50,6
REP 2139-Са	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

* по результатам количественного теста Abbott Architect™ на HbsAg

Терапия на основе интерферона, как правило, приводит к достижению контроля инфекции HBV после прекращения лечения у 25% пациентов (ДНК вируса гепатита В в сыворотке <500 копий/мл; Moucari и др., 2009, Hepatology 49: 1151-1157), а лечение тимозином $\alpha 1$ в целом рассматривается как имеющее сравнимый эффект (Yang и др., 2008 Antiviral Research 77: 136-141).

Монотерапия REP 2055 приводит к достижению контроля инфекции HBV (ДНК вируса гепатита В в сыворотке <500 копий/мл) после прекращения лечения у 3 из 7 пациентов (43%). Лечение REP 2139-Са, который в режиме монотерапии оказывает идентичный REP 2055 эффект в отношении клиренса сывороточного HBsAg, при объединении либо с тимозином $\alpha 1$, либо пегилированным интерфероном α -2а приводит к установлению вирусологического контроля у 8 пациентов из 9 (89%) с инфекцией HBV (см. табл. 6).

Таблица 6. Достижение устойчивого вирусологического ответа (SVR) при монотерапии NAR или комбинированной терапии NAR/иммунотерапии

NAR	Пациент, ответивший на лечение	Иммунотерапия	SVR на 12-й неделе после лечения
NAR	Пациент, ответивший на лечение	Иммунотерапия	SVR на 12-й неделе после лечения
REP 2055	1	Нет	Да
	2		Нет
	3		Да
	4		Нет
	5		Да
	6		Нет
	7		Нет
REP 2139-Са	1	Задаксин™	Да
	2	Задаксин™	Да
	3	Задаксин™	Да
	4	Задаксин™ / Пегасис™	Да
	5	Задаксин™ / Пегасис™	Да
	6	Пегасис™	Да
	7	Пегасис™	Нет
	8	Пегасис™	Да
	9	Пегасис™	Да

* ДНК вируса гепатита В в сыворотке <500 копий/мл

Эти результаты демонстрируют, что комбинированный эффект противовирусного хелатного комплекса ON (в данном примере REP 2139-Са) и противовирусного полипептида (в этом примере пегилированный интерферон α -2a или тимозин α 1) может улучшить контроль инфекции HBV после прекращения лечения у больных людей и, кроме того, показывают полезность комбинированной терапии хелатным комплексом ON и полипептидом или пегилированным полипептидом для пациентов с вирусной инфекцией.

Были бы желательными композиции, состоящие из противовирусного хелатного комплекса ON и противовирусного полипептида, поскольку они улучшают общий противовирусный ответ у пациентов с вирусной инфекцией (включая инфекцию HBV) благодаря одновременному введению обоих веществ (полезность которых раскрывается в текущем примере).

Противовирусный хелатный ON в описанной выше композиции может включать, как описано выше, любой противовирусный ON, и в случае HBV мог бы включать, например, REP 2055 (SEQ ID NO: 3, REP 2139 (SEQ ID NO: 18), REP 2148 (SEQ ID NO: 11) или любое другое соединение NAP, которое блокирует транзит HBsAg, как описано выше.

Полипептид в описанной выше композиции может включать любой противовирусный полипептид или пегилированный противовирусный полипептид, и в случае с HBV может, например, включать интерферон α -2b, пегилированный интерферон α -2b, пегилированный интерферон α -2a, тимозин α 1, интерферон λ 1 или пегилированный интерферон λ 1.

Сходный благоприятный эффект описанной выше комбинированной терапии может быть также реализован не только в отношении инфекции вируса гепатита В, но также и для других вирусных инфекций, таких как гепатит С, грипп, RSV и другие вирусы, при лечении которых может быть получен ответ на действие противовирусного олигонуклеотида, или противовирусного полипептида, или противовирусного пегилированного полипептида. Хотя в настоящем примере используются NAP, такие улучшения результатов противовирусной терапии у больных людей могут быть получены с применением других олигонуклеотидов, действующих через зависимые от последовательности механизмы, рецептуры которых представляются в виде хелатных комплексов и применяемых в комбинации с противовирусными полипептидами или пегилированными полипептидами. Эти эффекты также могут быть более значительными при лечении других вирусных инфекций при условии применения правильной комбинации противовирусного олигонуклеотидного хелатного комплекса и противовирусного полипептида. Например, NAP обладают широким спектром действия против многих других вирусов, имеющих оболочку, например, вирусов гепатита С, гриппа, респираторно-синцитиального вируса и цитомегаловируса и, следовательно, хелатные комплексы NAP в комбинации с соответствующим противовирусным полипептидом (который может быть тимозином α 1 или пегилированным интерфероном α -2a, но также может быть и другим противовирусным полипептидом, более подходящим для конкретной вирусной инфекции) вызовут, как ожидается, значительно более эффективный противовирусный ответ у инфицированного субъекта, чем в случае применения любого из этих соединений в режиме монотерапии. В другом примере хелатный комплекс миравирсен (SEQ ID NO: 7) может использоваться в комбинации с интерфероном (пегилированным или же нет) в целях улучшения противовирусного ответа у пациентов с инфекцией гепатита С.

Также ожидается, что благоприятные эффекты, продемонстрированные с хелатными комплексами NAP и тимозина α 1 или пегилированного интерферона α -2a, будут наблюдаться и в случае хелатных комплексов ON других классов олигонуклеотидов, таких как антисмысловые, или олигонуклеотиды мРНК, или микроРНК, или аптамерные олигонуклеотиды, разработанные против конкретных вирусных инфекций, или иммуностимулирующие олигонуклеотиды. Поэтому можно ожидать, что способ объединения хелатного комплекса ON, полученного с применением олигонуклеотидов такого класса, с соответствующим противовирусным полипептидом найдет применение в лечении широкого диапазона вирусных инфекций, продемонстрировавших отклик при монотерапии таким противовирусным олигонуклеотидом (в форме натриевой соли либо в форме хелатного комплекса), или противовирусным полипептидом, или пегилированным противовирусным полипептидом.

С учетом приведенных выше примеров теперь можно предусмотреть возможность того, что два или более противовирусных хелатных комплексов ON (например, содержащих NAP и антисмысловой ON или содержащих NAP и противовирусную мРНК) могут быть объединены с одним или большим количеством противовирусных полипептидов или пегилированных полипептидов (например, пегилированным интерфероном α -2a и тимозином α 1 или тимозином α 1 и пегилированным интерфероном λ 1), как в одной рецептуре, так и в различных рецептурах, вводимых с применением одного и того же пути введения или различных путей.

В приведенном выше примере REP 2139-Са вводился способом внутривенной инфузии, а пегилированный интерферон α -2a или тимозин α 1 вводились подкожно. На основе указаний приведенного выше примера специалисты в данной области смогут легко определить, что хелатный ON комплекс и полипептид могут вводиться одновременно в одной рецептуре (например, в таких рецептурах, которые были описаны выше в примерах 3 и 4, способом подкожной инъекции или внутривенной инфузии, и предположить для них такой же благоприятный эффект, который достигается при их раздельном введении (с

использованием одного и того же пути введения или различных путей введения).

Благоприятные эффекты описанной здесь комбинированной терапии хелатным комплексом ON и противовирусным полипептидом или пегилированным полипептидом описанных здесь вирусных инфекций ясно предполагают сходные благоприятные эффекты комбинированной терапии олигонуклеотидными хелатами и полипептидами или пегилированными полипептидами в отношении терапевтического воздействия в случаях, когда оба этих вещества обладают некоторой активностью при монотерапии. Например, антисмысловой ON, мишенью которого является онкоген (т.е. обладающий поэтому противоопухолевой активностью), может разрабатываться, как здесь описано, в виде хелатного комплекса ON и далее объединяться с иммунотерапевтическим средством, известным в качестве обладающего некоторой противоопухолевой активностью при его обычном использовании в монотерапии. Такие терапевтические планы могут включать такие заболевания как рак, рассеянный склероз и болезнь Альцгеймера.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция для лечения гепатита В, содержащая хелатный олигонуклеотидный (ON) комплекс, состоящий из двух или более ON, связанных межмолекулярно через двухвалентный катион, и по меньшей мере один полипептид, где указанный хелатный комплекс ON содержит ON, выбранный из SEQ ID NO: 2, 4, 10-14, 18 с тиофосфатными связями, где указанный по меньшей мере один полипептид выбран из тимозина $\alpha 1$, пегилированного интерферона α -2a, пегилированного интерферона α -2b, пегилированного интерферона $\lambda 1$, пегилированного интерферона $\lambda 2$ и пегилированного интерферона $\lambda 3$, где указанный двухвалентный катион является двухвалентным катионом кальция и/или магния.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, которая дополнительно содержит железо (2+), марганец, медь или цинк в следовых количествах.

3. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-2, в которой указанный хелатный ON комплекс содержит по меньшей мере один ON с одной 2'-модифицированной рибозой, по меньшей мере один ON со всеми 2'-О-метилованными рибозами или по меньшей мере один ON, содержащий по меньшей мере один 5'-метилцитозин, по меньшей мере один ON, в котором каждый цитозин является дополнительно метилированным 5'-метилцитозином.

4. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-3, в которой указанный хелатный ON комплекс содержит по меньшей мере один ON, в котором каждая рибоза является 2'-О-метилованной и в котором каждый цитозин является 5'-метилцитозином.

5. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-4, предназначенная для подкожного введения.

6. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-4, предназначенная для внутривенного введения.

7. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-6, в которой указанный хелатный ON комплекс содержит по меньшей мере один ON, состоящий из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 18.

8. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-7, дополнительно содержащая одно или более из соединений: энтекавир, тенофовира дизопроксил фумарат, телбувидин, адефовир дипивоксил, ламивудин, рибавирин, теллапревир, боцепривир, GS-7977, теобувир, занамивир, осельтамивир, ганцикловир, фоскарнет, ацикловир, зидовудин, абакавир, лопинавир, ритонавир или эфавиренц.

9. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-8, дополнительно содержащая носитель.

10. Противовирусная композиция для лечения гепатита В, содержащая хелатный комплекс ON, состоящий из двух или более ON с последовательностью SEQ ID NO: 2, связанных межмолекулярно через двухвалентный катион кальция и/или магния, и пегилированный интерферон α -2a;

хелатный комплекс ON, состоящий из двух или более ON с последовательностью SEQ ID NO: 18, связанных межмолекулярно через двухвалентный катион кальция и/или магния, и пегилированный интерферон α -2a;

хелатный комплекс ON, состоящий из двух или более ON с последовательностью SEQ ID NO: 11, связанных межмолекулярно через двухвалентный катион кальция и/или магния, и пегилированный интерферон α -2a;

хелатный комплекс ON, состоящий из двух или более ON с последовательностью SEQ ID NO: 2, связанных межмолекулярно через двухвалентный катион кальция и/или магния, и интерферон α -2b;

хелатный комплекс ON, состоящий из двух или более ON с последовательностью SEQ ID NO: 18, связанных межмолекулярно через двухвалентный катион кальция и/или магния, и интерферон α -2b;

хелатный комплекс ON, состоящий из двух или более ON с последовательностью SEQ ID NO: 11, связанных межмолекулярно через двухвалентный катион кальция и/или магния, и интерферон α -2b;

хелатный комплекс ON, состоящий из двух или более ON с последовательностью SEQ ID NO: 2, связанных межмолекулярно через двухвалентный катион кальция и/или магния, и пегилированный интерферон α -2b;

хелатный комплекс ON, состоящий из двух или более ON с последовательностью SEQ ID NO: 18, связанных межмолекулярно через двухвалентный катион кальция и/или магния, и пегилированный ин-

терферон α -2b;

хелатный комплекс ON, состоящий из двух или более ON с последовательностью SEQ ID NO: 11, связанных межмолекулярно через двухвалентный катион кальция и/или магния, и пэгилированный интерферон α -2b;

хелатный комплекс ON, состоящий из двух или более ON с последовательностью SEQ ID NO: 2, связанных межмолекулярно через двухвалентный катион кальция и/или магния, и интерферон λ 1;

хелатный комплекс ON, состоящий из двух или более ON с последовательностью SEQ ID NO: 18, связанных межмолекулярно через двухвалентный катион кальция и/или магния, и интерферон λ 1;

хелатный комплекс ON, состоящий из двух или более ON с последовательностью SEQ ID NO: 11, связанных межмолекулярно через двухвалентный катион кальция и/или магния, и интерферон λ 1;

хелатный комплекс ON, состоящий из двух или более ON с последовательностью SEQ ID NO: 2, связанных межмолекулярно через двухвалентный катион кальция и/или магния, и пэгилированный интерферон λ 1;

хелатный комплекс ON, состоящий из двух или более ON с последовательностью SEQ ID NO: 18, связанных межмолекулярно через двухвалентный катион кальция и/или магния, и пэгилированный интерферон λ 1;

хелатный комплекс ON, состоящий из двух или более ON с последовательностью SEQ ID NO: 11, связанных межмолекулярно через двухвалентный катион кальция и/или магния, и пэгилированный интерферон λ 1;

хелатный комплекс ON, состоящий из двух или более ON с последовательностью SEQ ID NO: 2, связанных межмолекулярно через двухвалентный катион кальция и/или магния, и тимозин α 1;

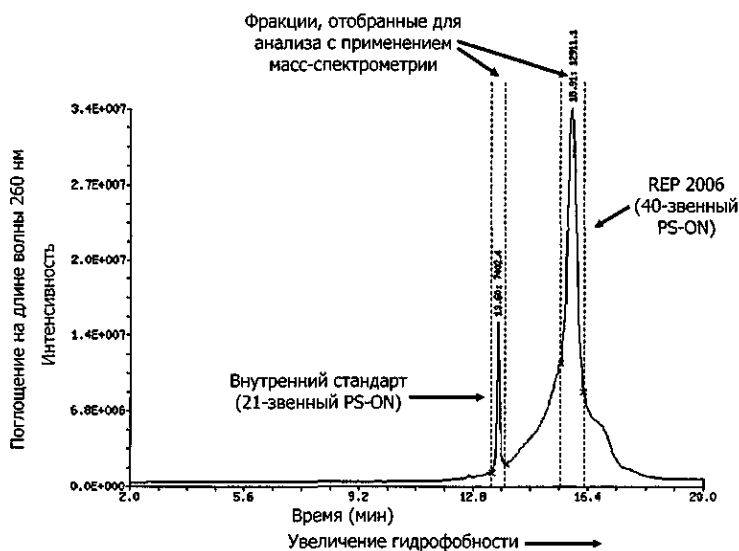
хелатный комплекс ON, состоящий из двух или более ON с последовательностью SEQ ID NO: 18, связанных межмолекулярно через двухвалентный катион кальция и/или магния, и тимозин α 1;

хелатный комплекс ON, состоящий из двух или более ON с последовательностью SEQ ID NO: 11, связанных межмолекулярно через двухвалентный катион кальция и/или магния, и тимозин α 1;

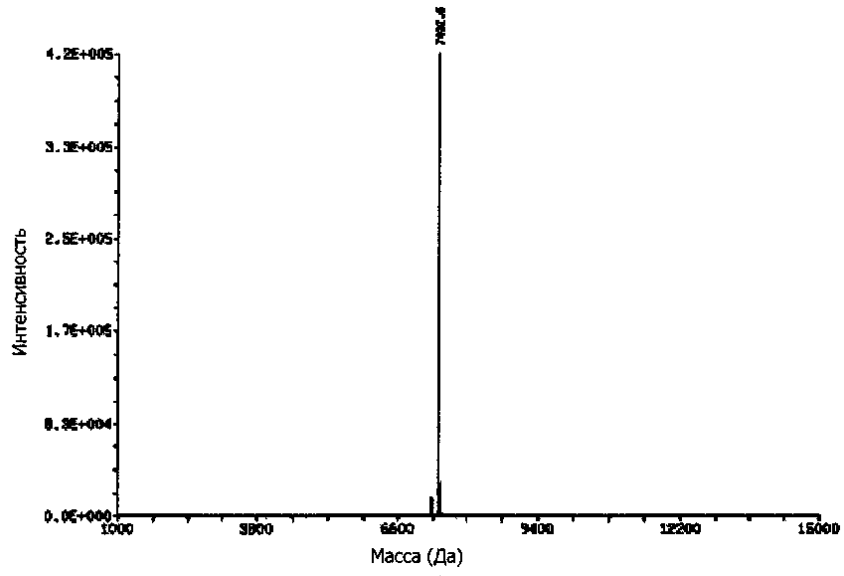
хелатный комплекс ON, состоящий из двух или более ON с последовательностью SEQ ID NO: 2, связанных межмолекулярно через двухвалентный катион кальция и/или магния, и пэгилированный тимозин α 1;

хелатный комплекс ON, состоящий из двух или более ON с последовательностью SEQ ID NO: 18, связанных межмолекулярно через двухвалентный катион кальция и/или магния, и пэгилированный тимозин α 1; или

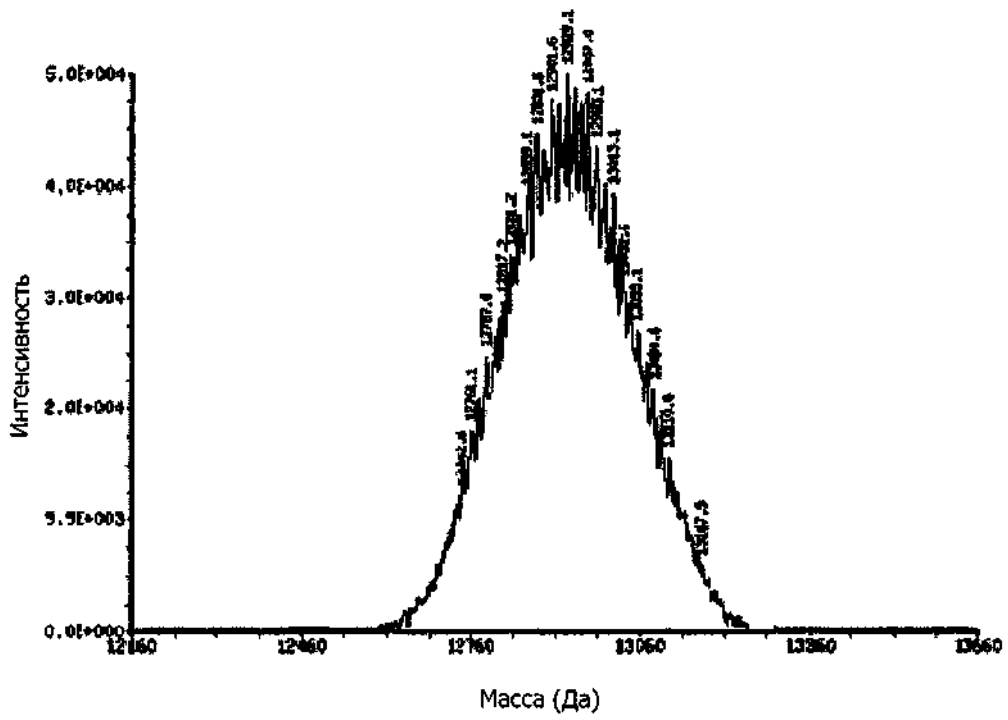
хелатный комплекс ON, состоящий из двух или более ON с последовательностью SEQ ID NO: 11, связанных межмолекулярно через двухвалентный катион кальция и/или магния, и пэгилированный тимозин α 1.



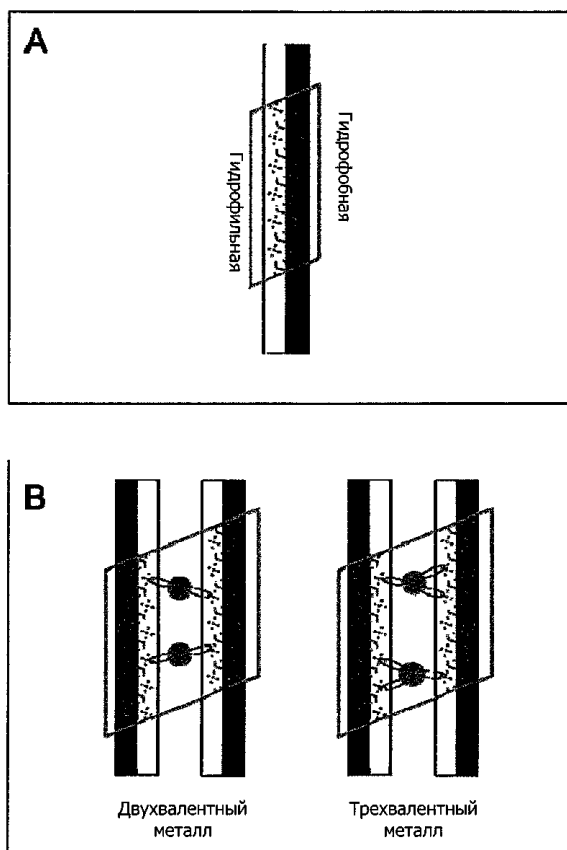
Фиг. 1А



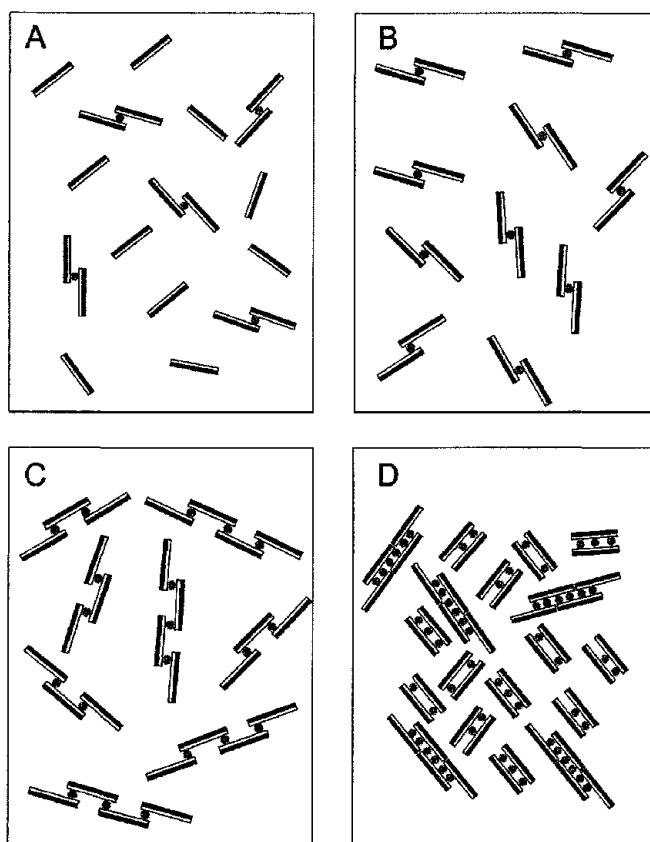
Фиг. 1В



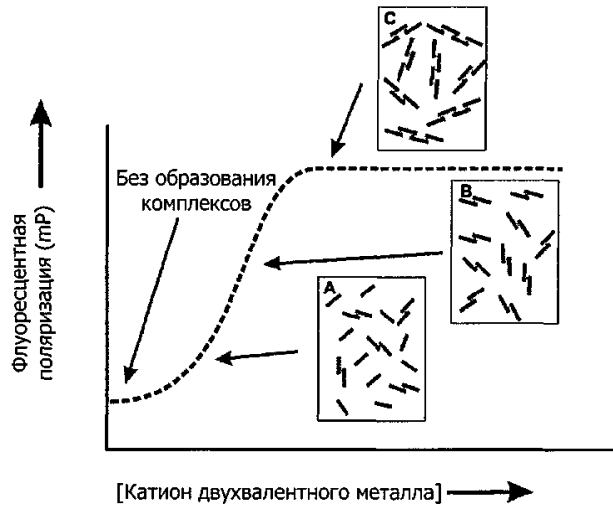
Фиг. 1С



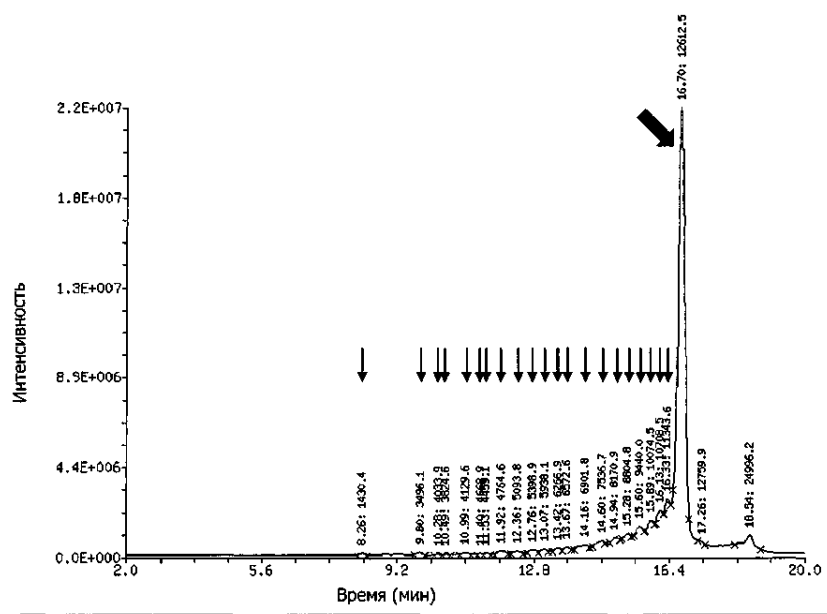
Фиг. 2



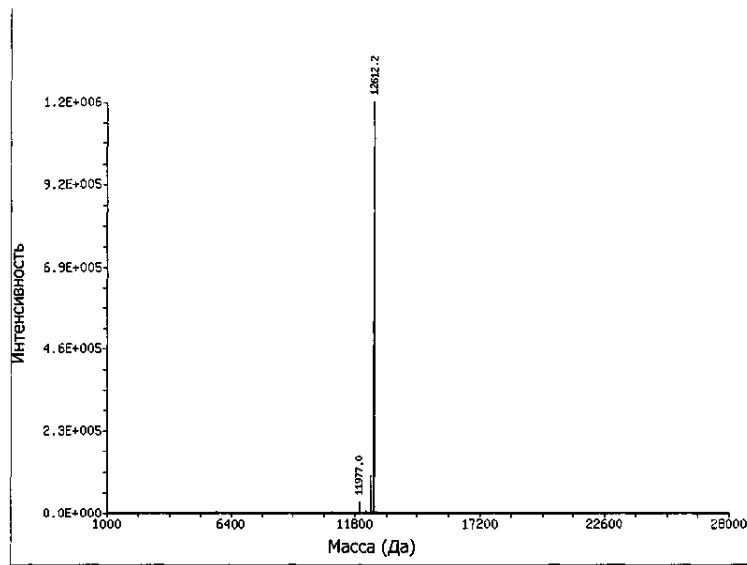
Фиг. 3



Фиг. 4

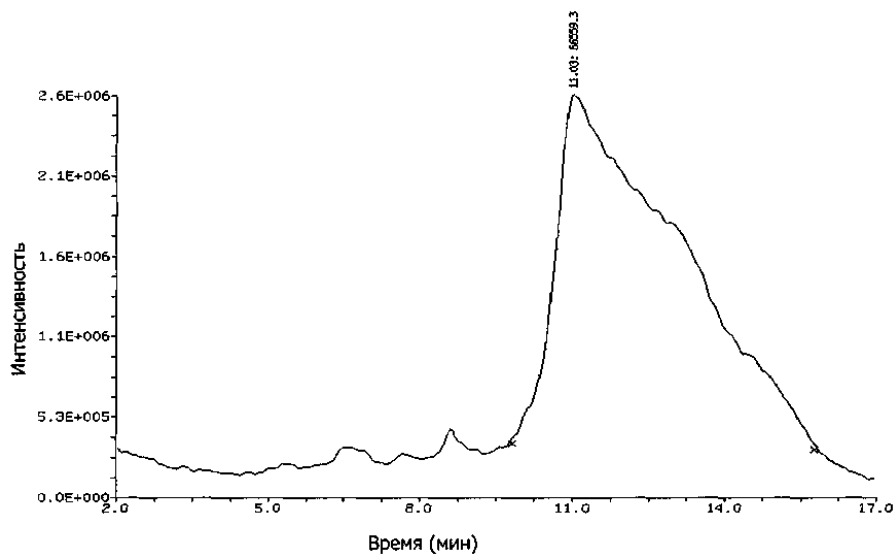


Фиг. 5

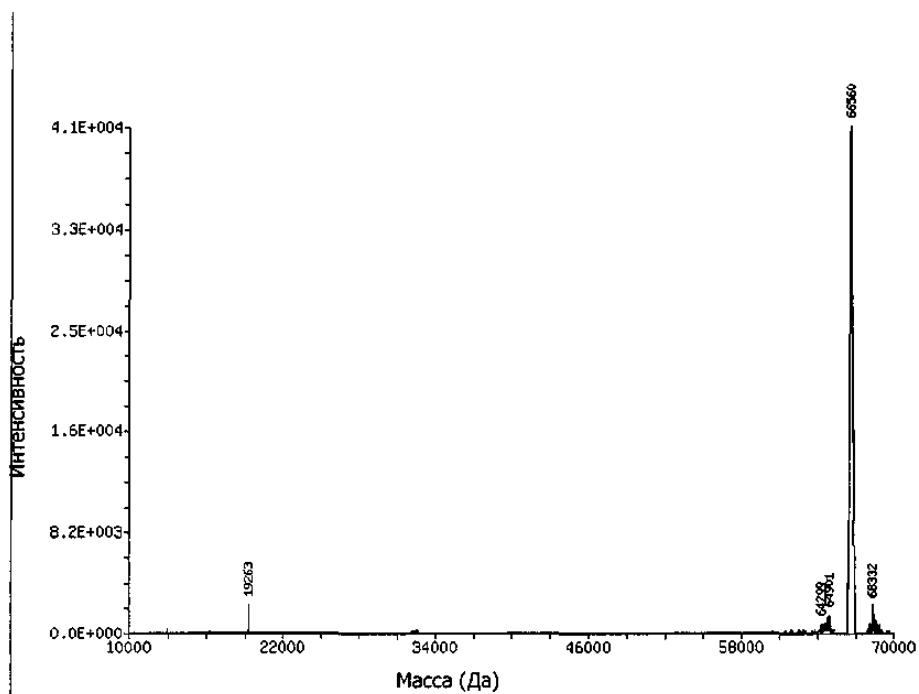


Фиг. 6

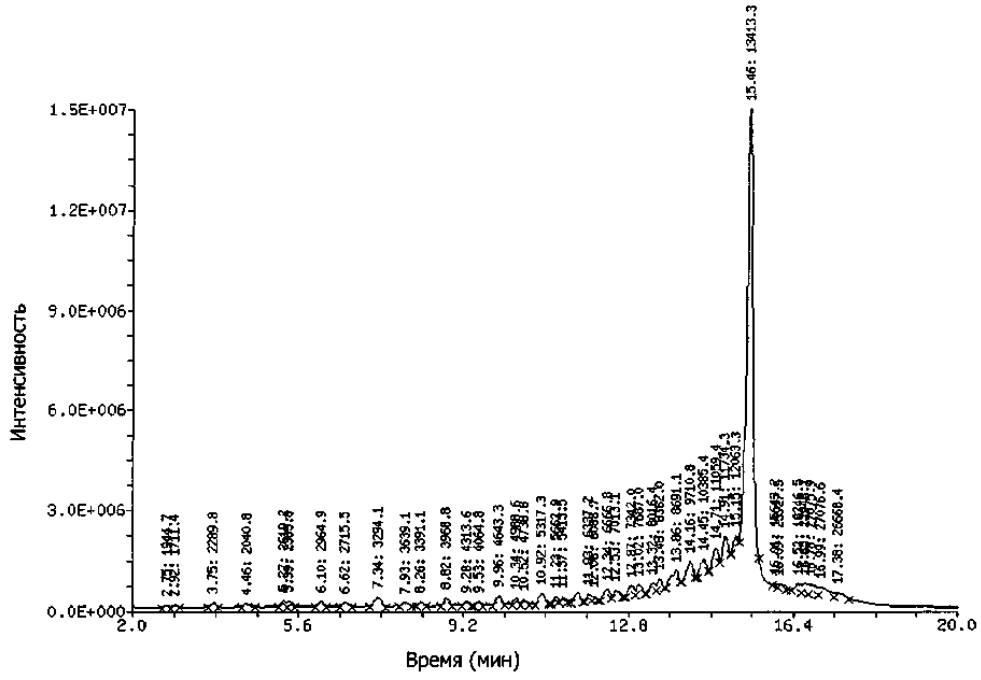
035967



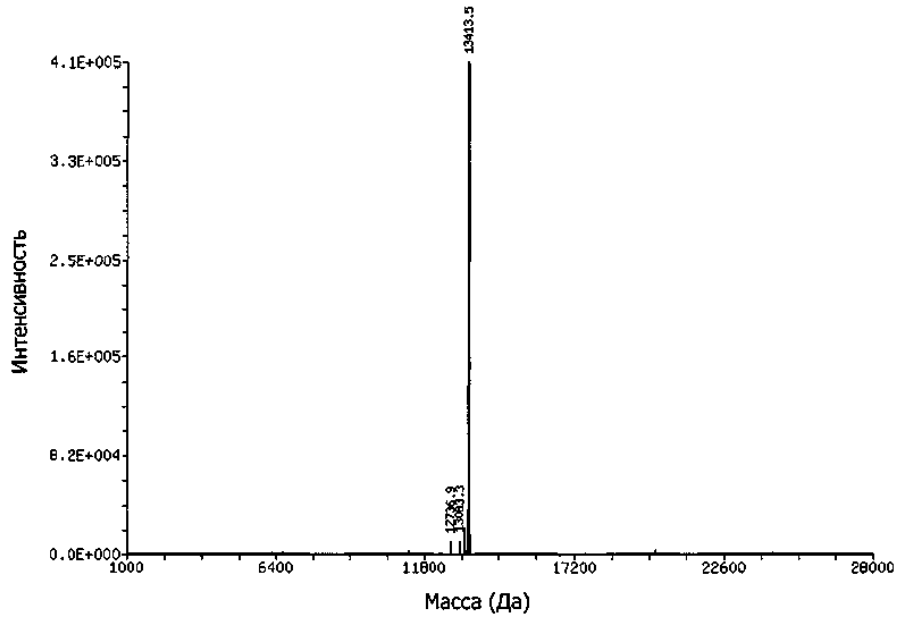
Фиг. 7



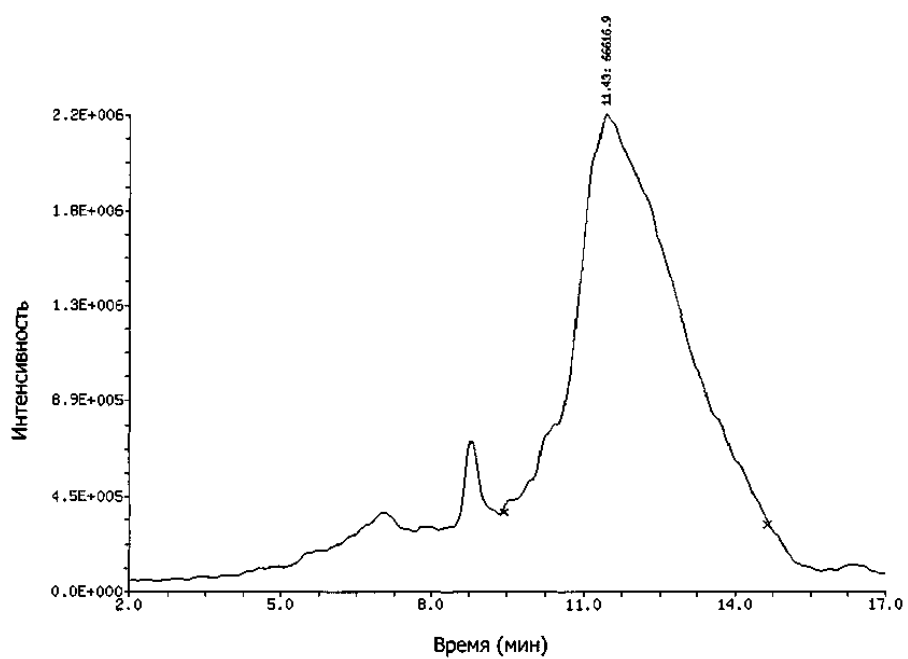
Фиг. 8



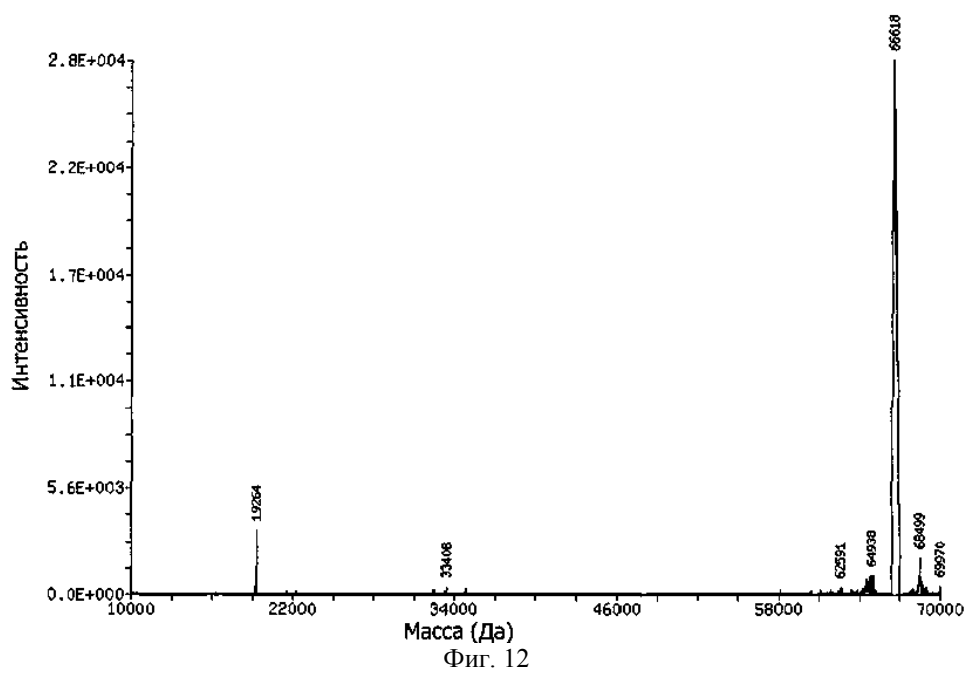
Фиг. 9



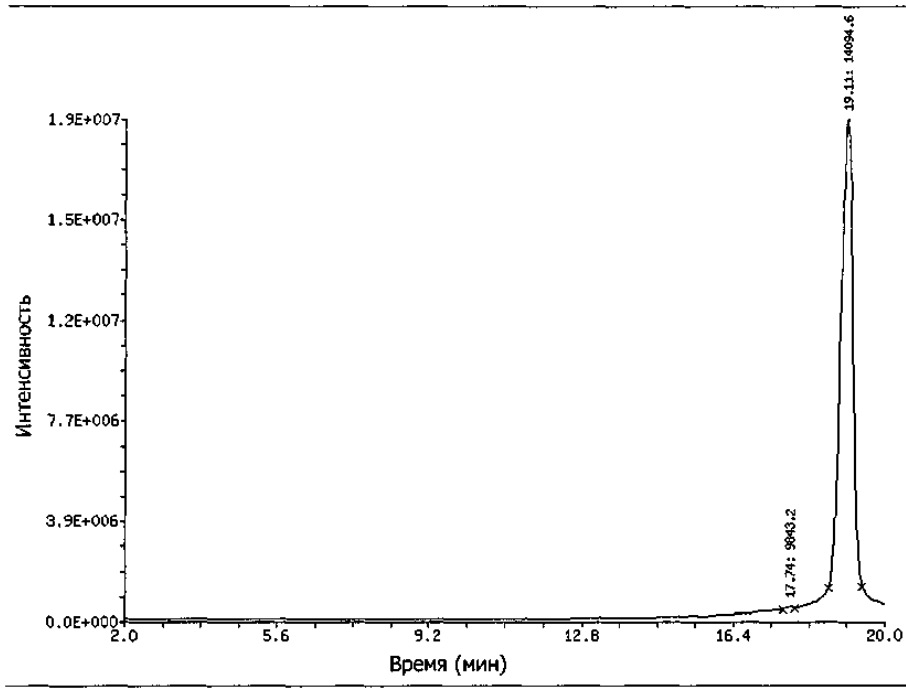
Фиг. 10



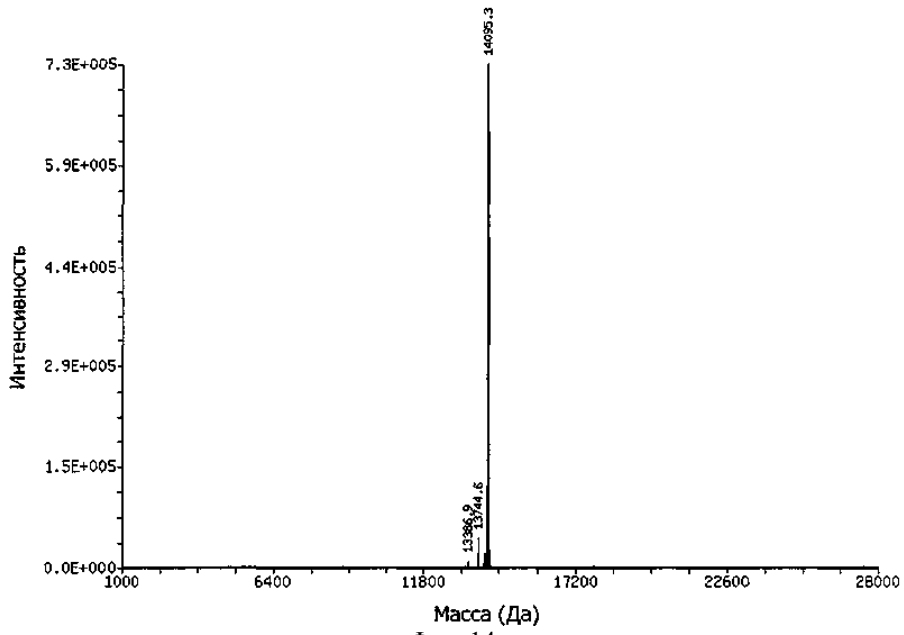
Фиг. 11



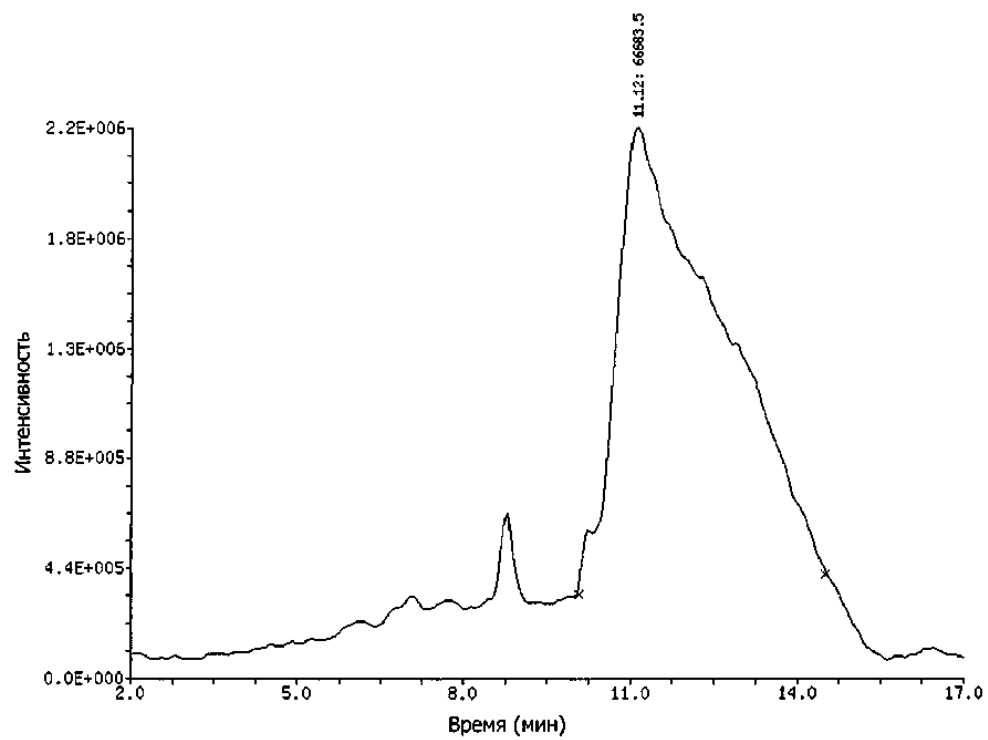
Фиг. 12



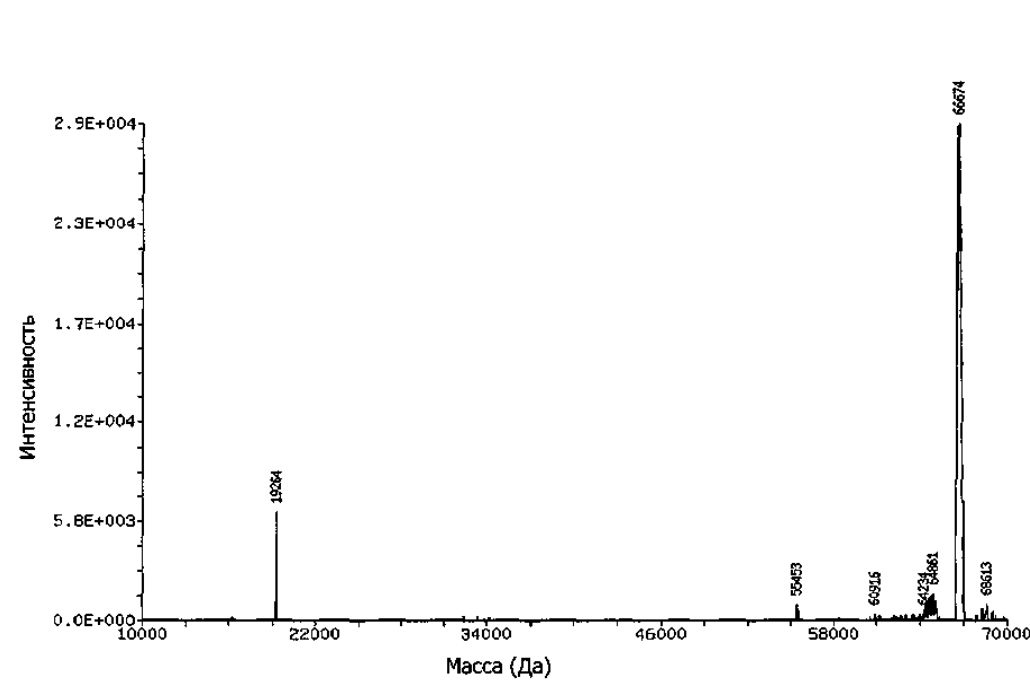
Фиг. 13



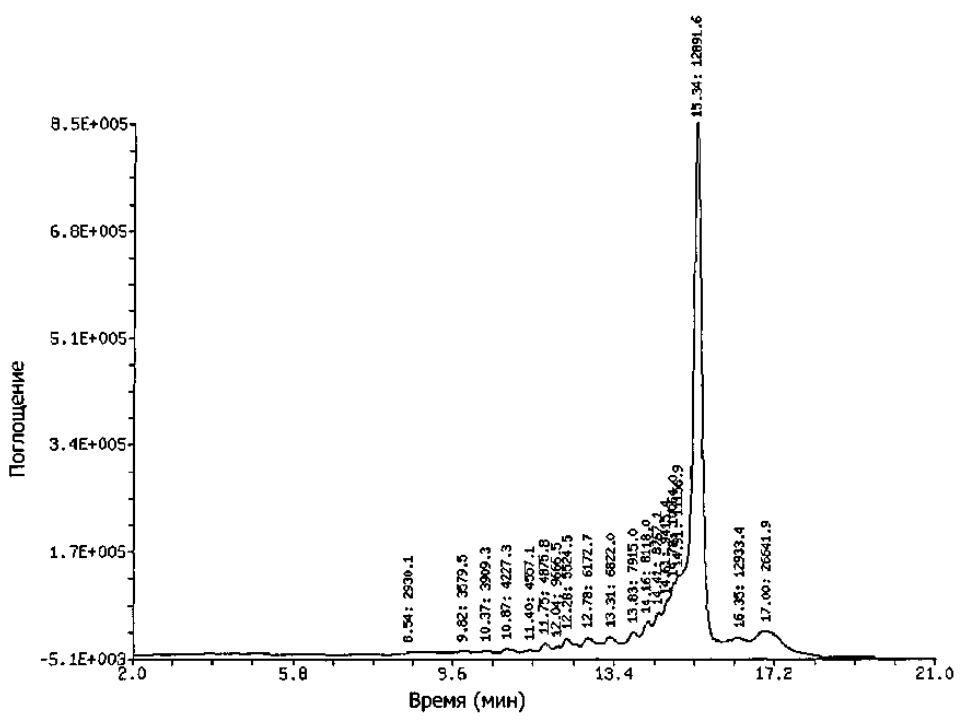
Фиг. 14



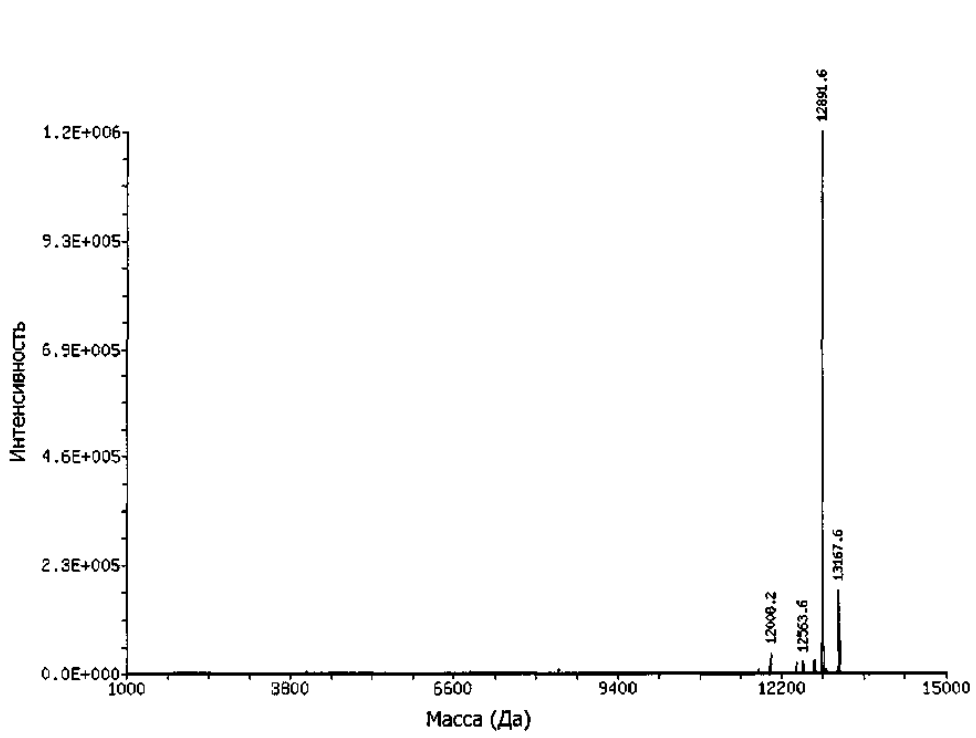
Фиг. 15



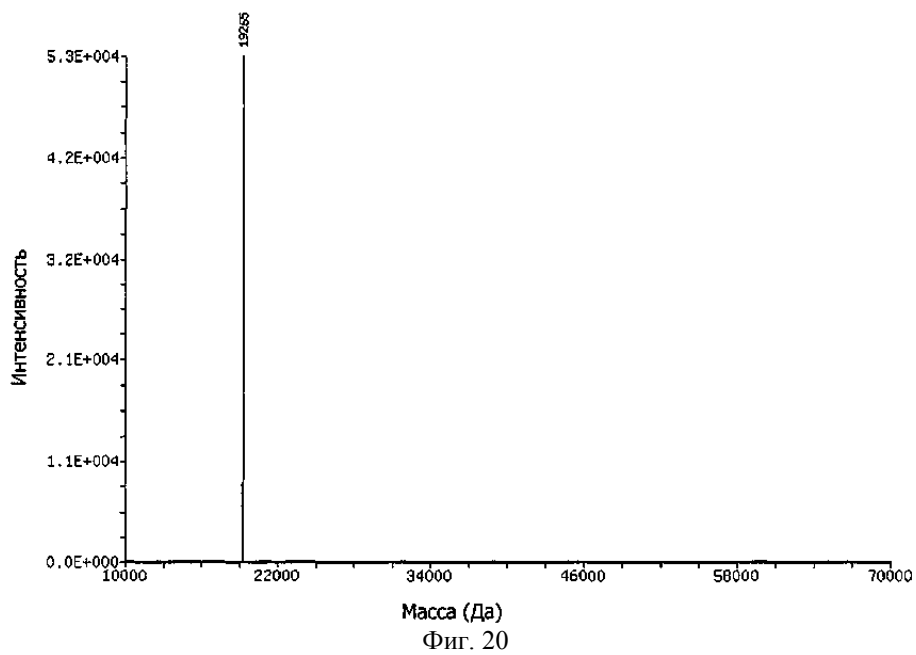
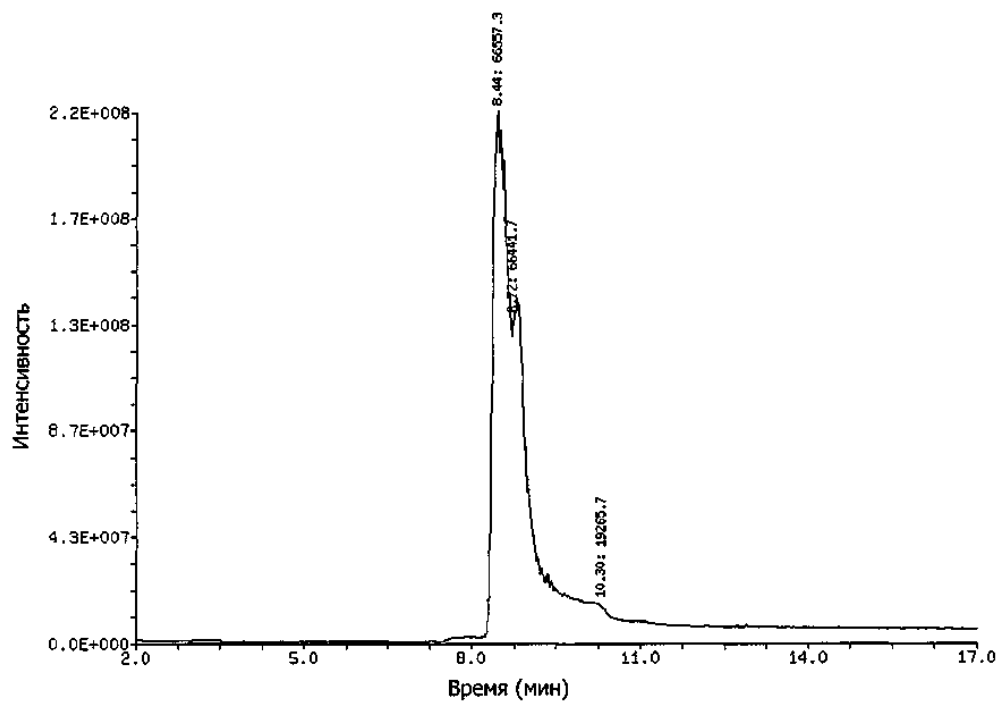
Фиг. 16

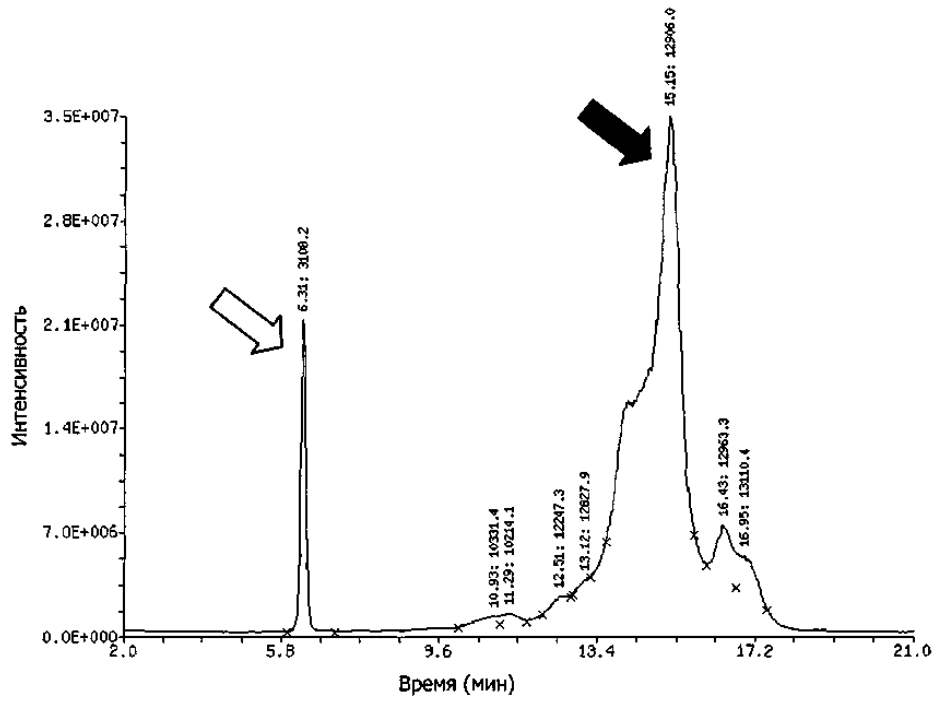


Фиг. 17

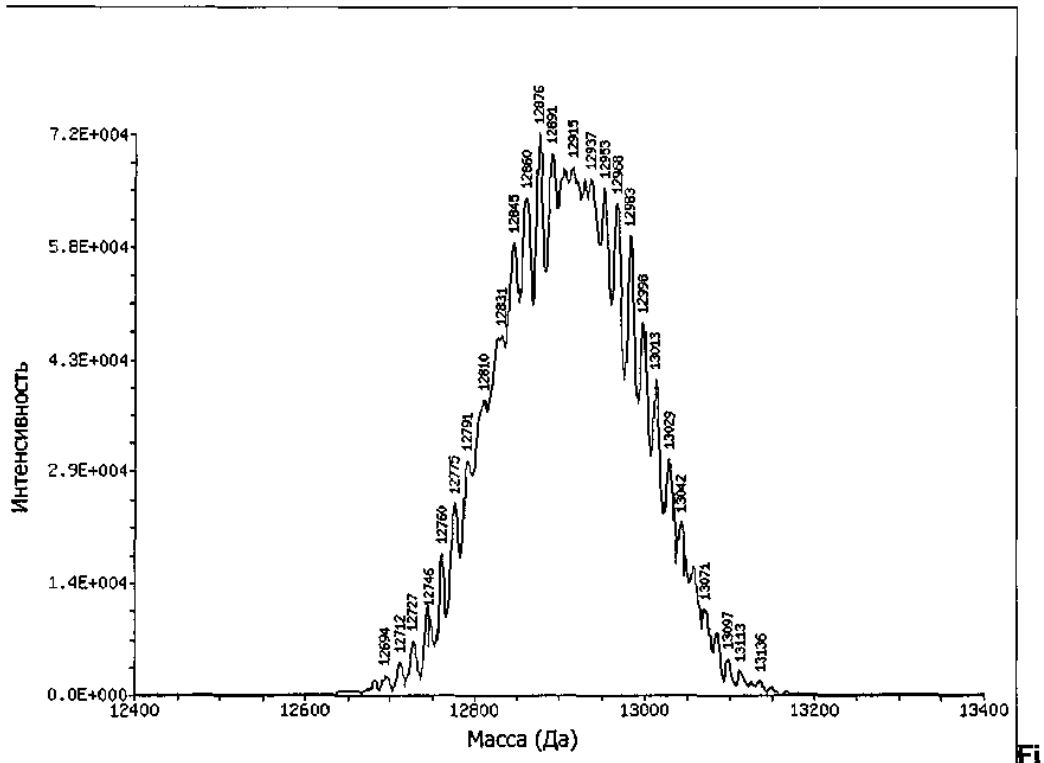


Фиг. 18

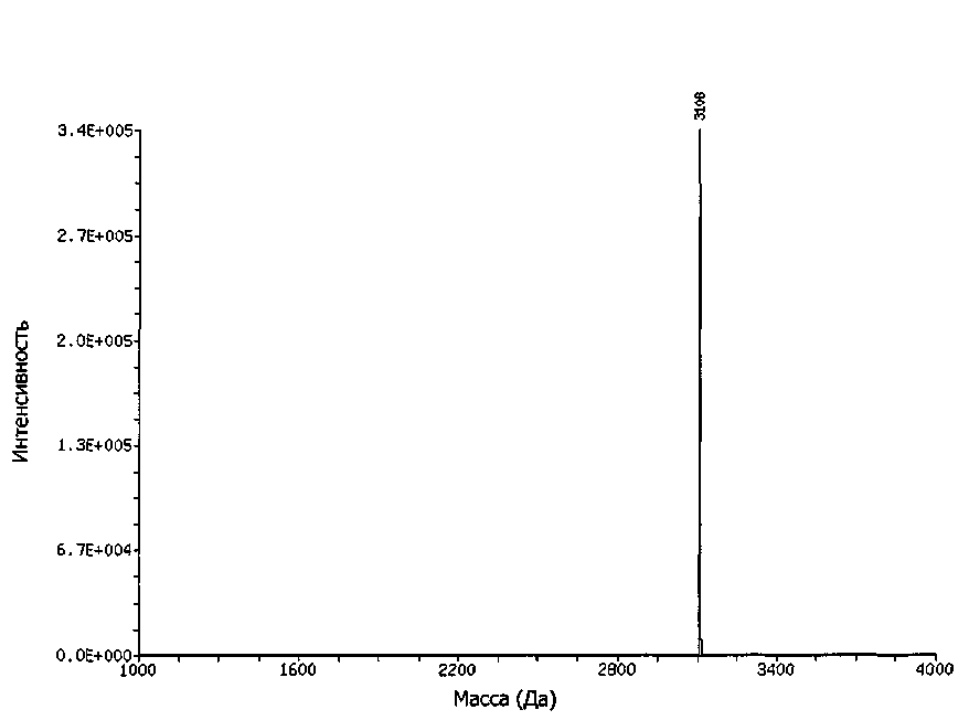




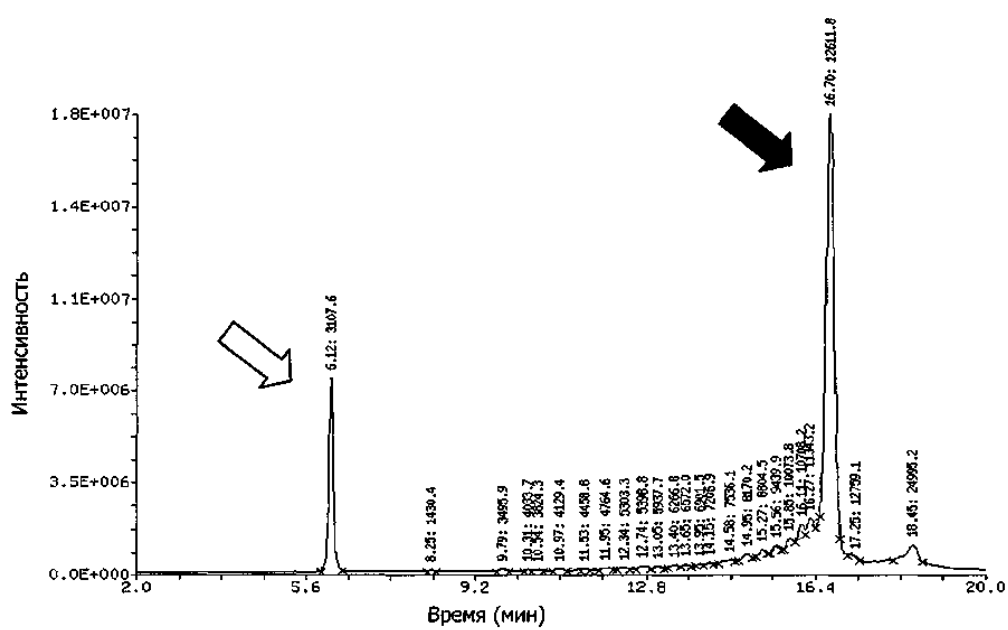
Фиг. 21



Фиг. 22

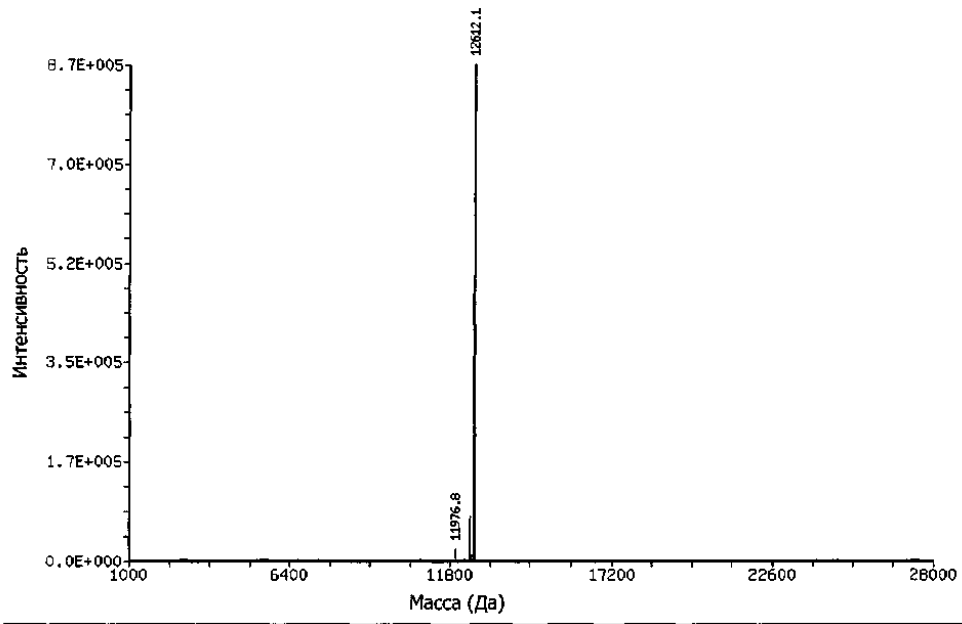


Фиг. 23

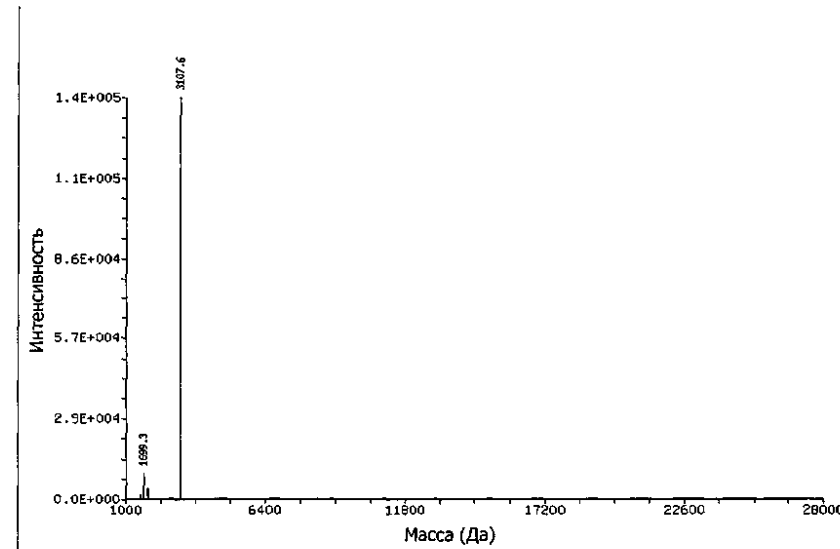


Фиг. 24

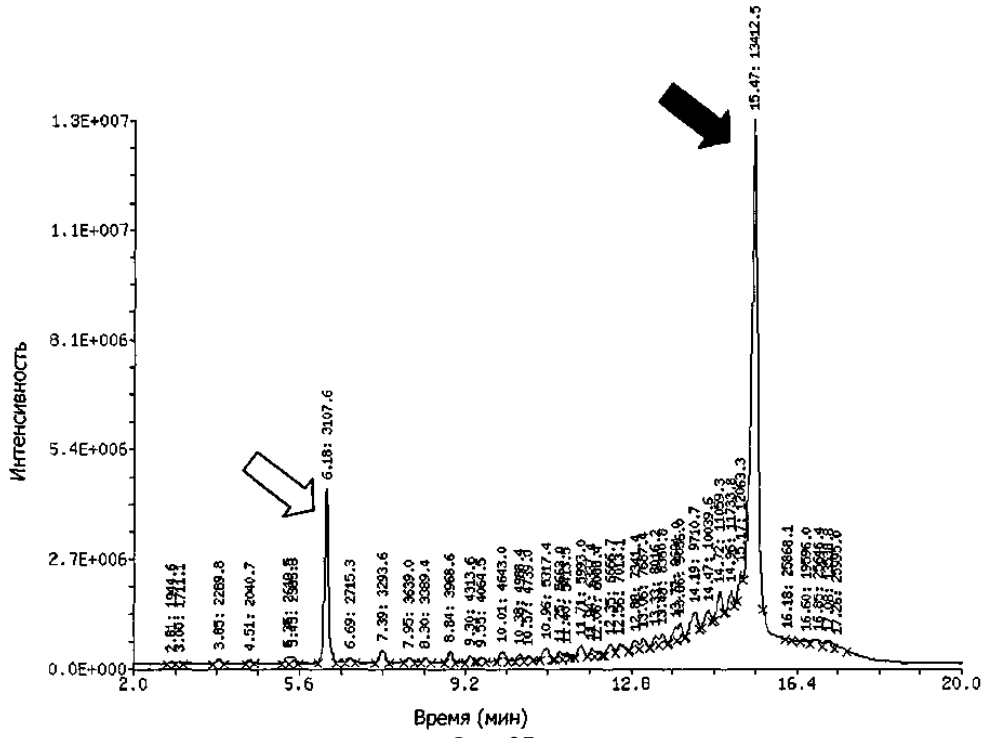
035967



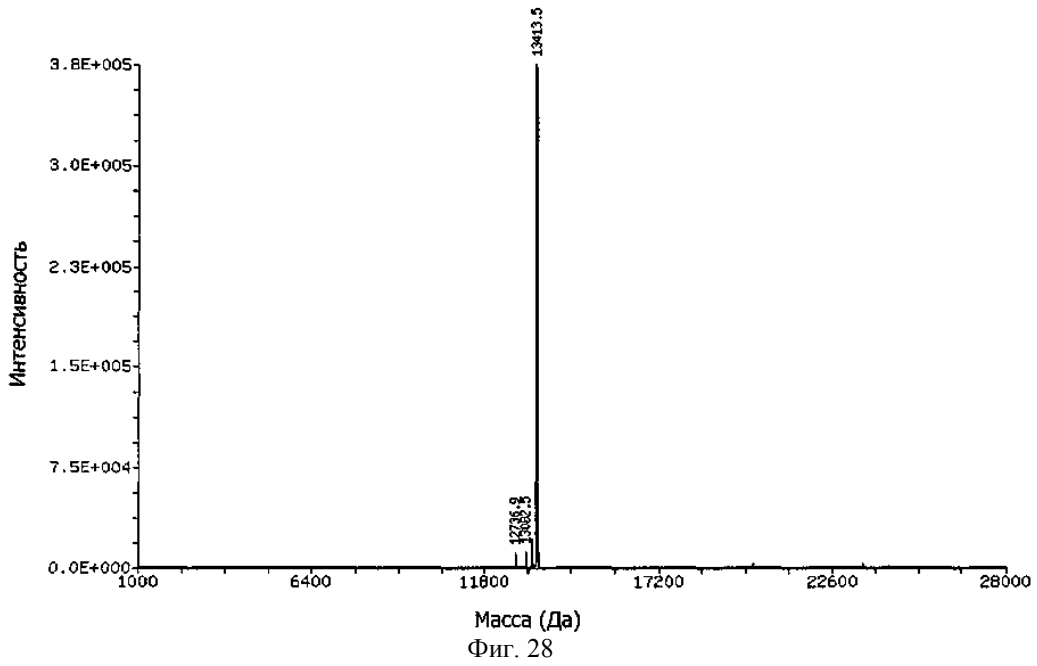
Фиг. 25



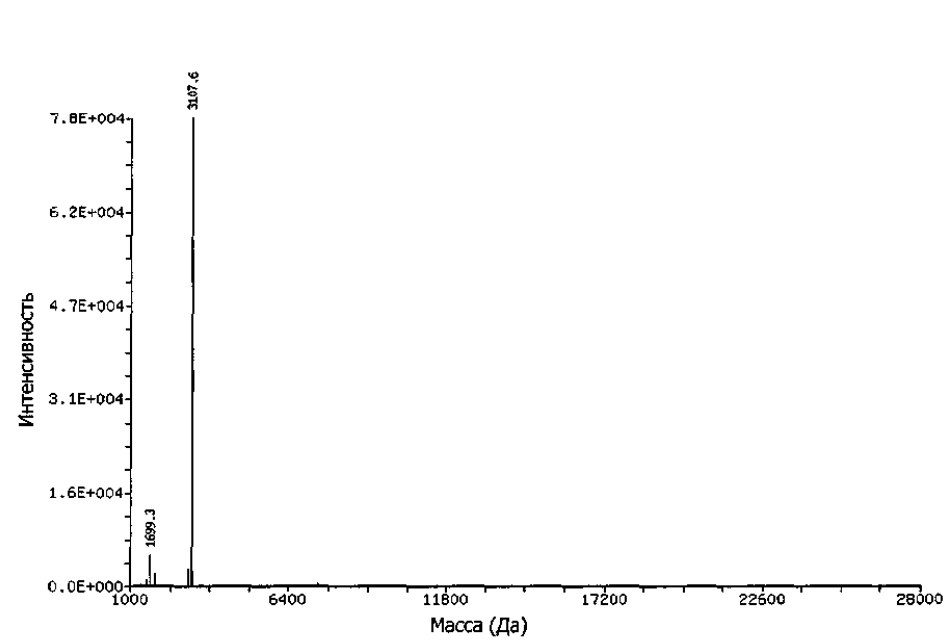
Фиг. 26



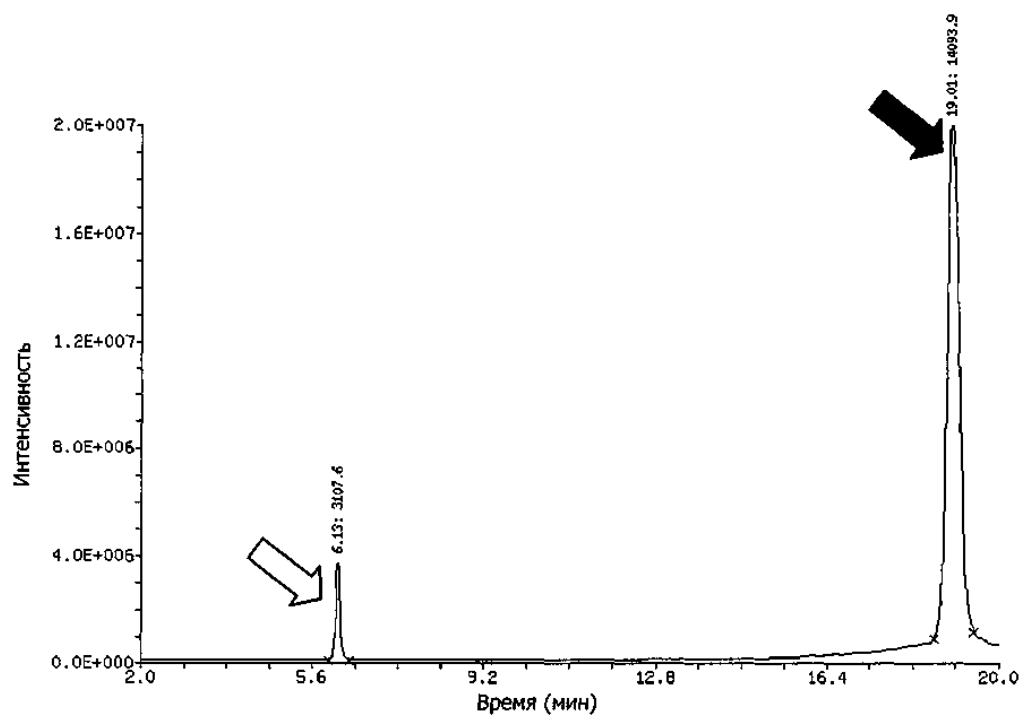
Фиг. 27



Фиг. 28

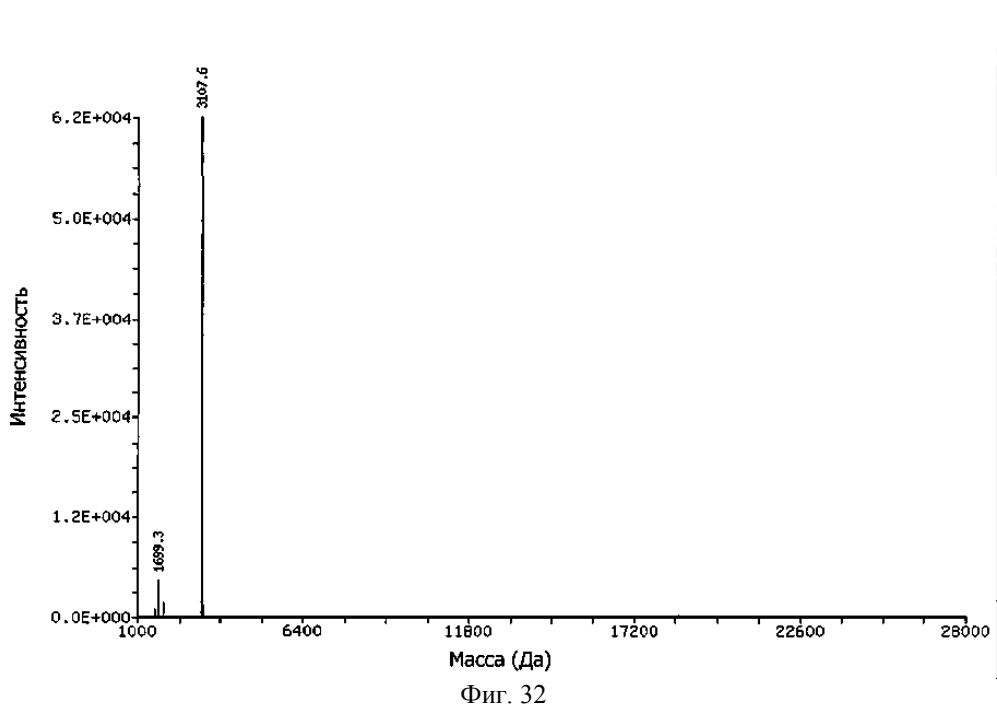
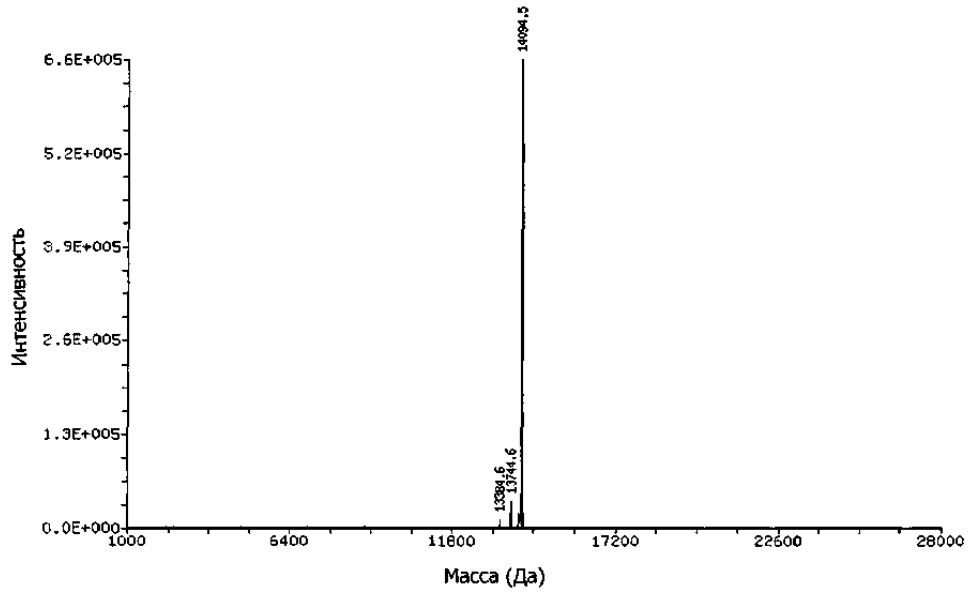


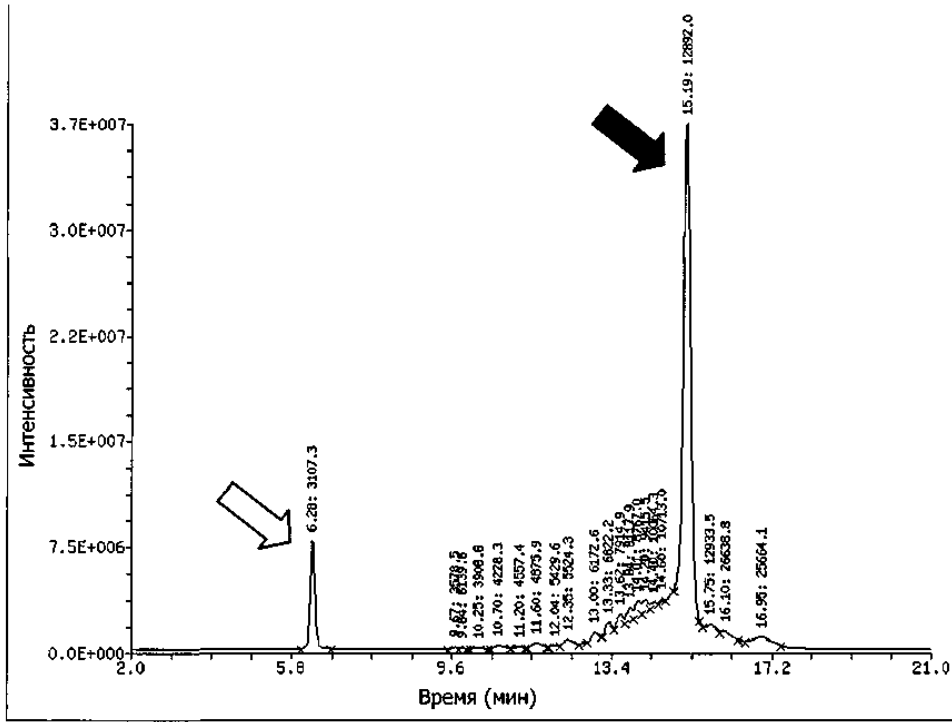
Фиг. 29



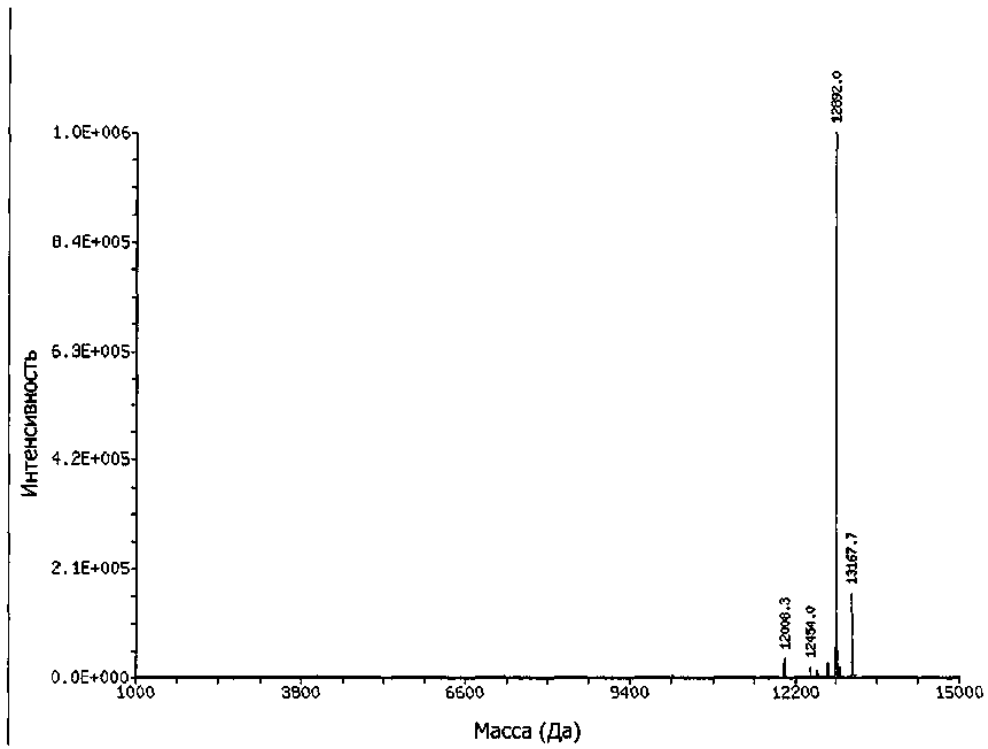
Фиг. 30

035967

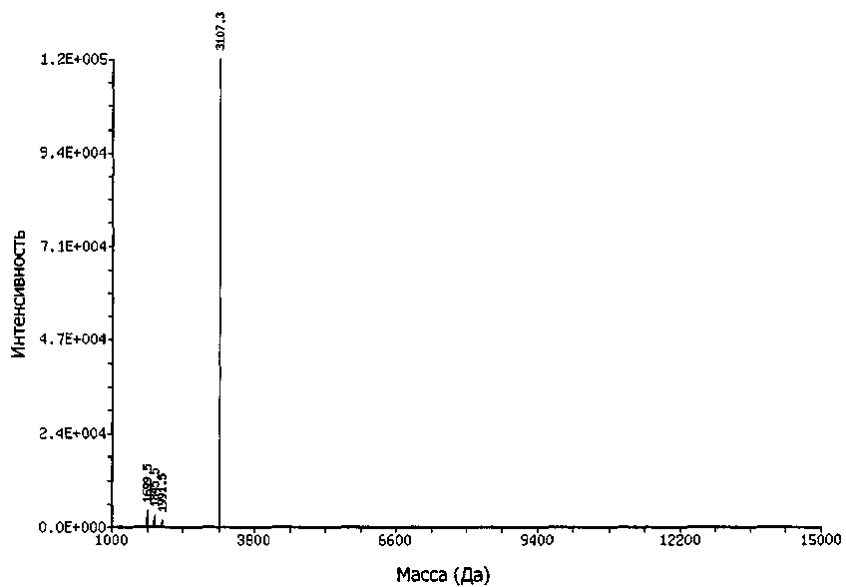




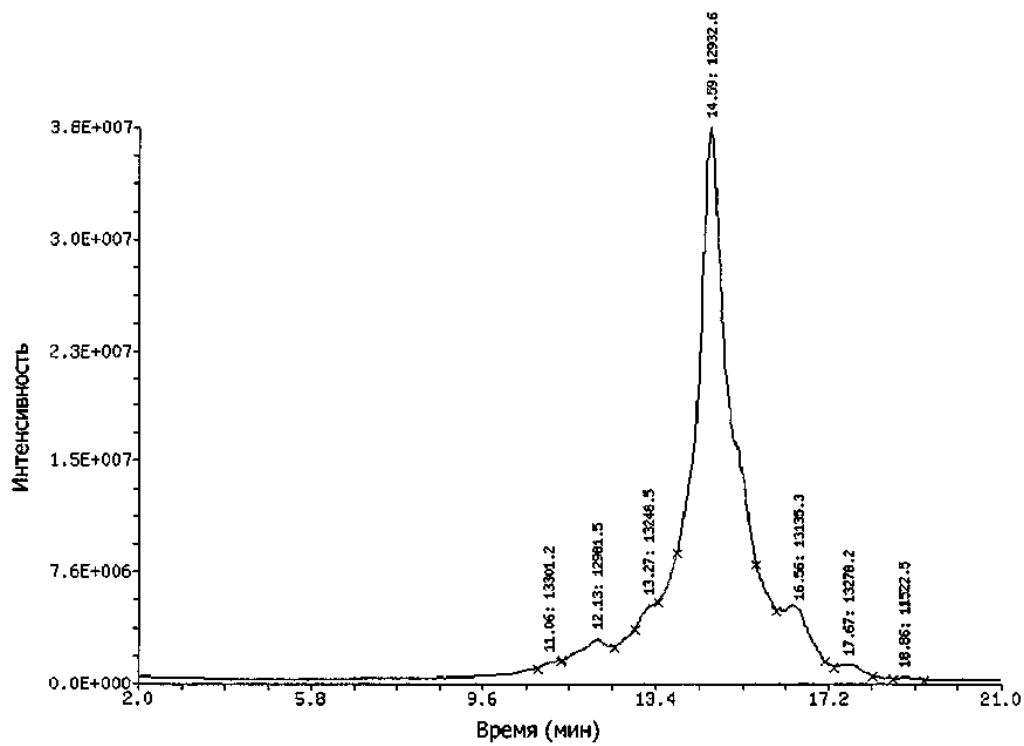
Фиг. 33



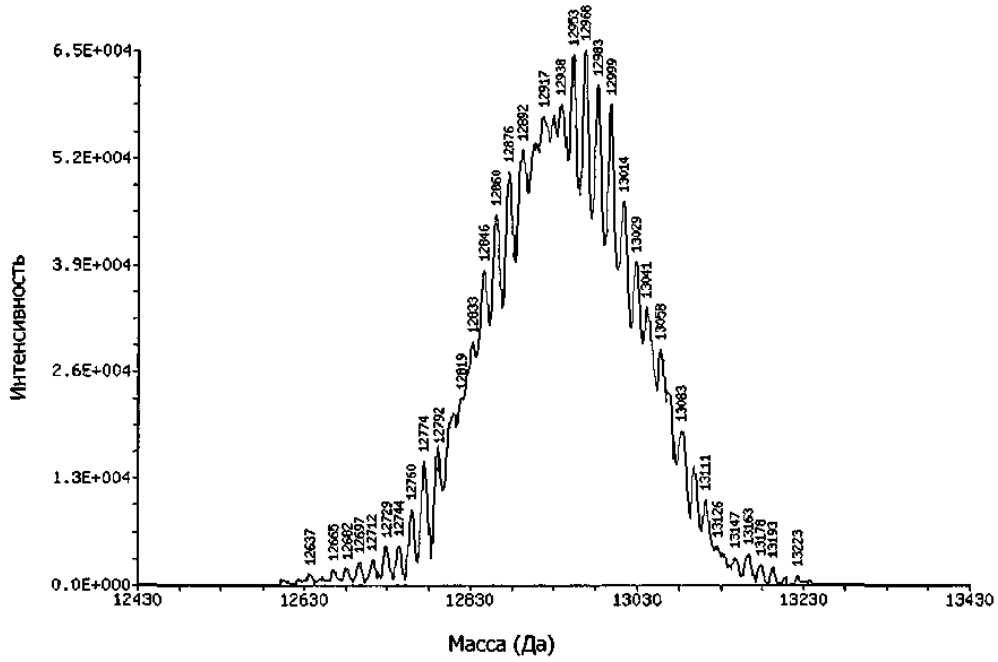
Фиг. 34



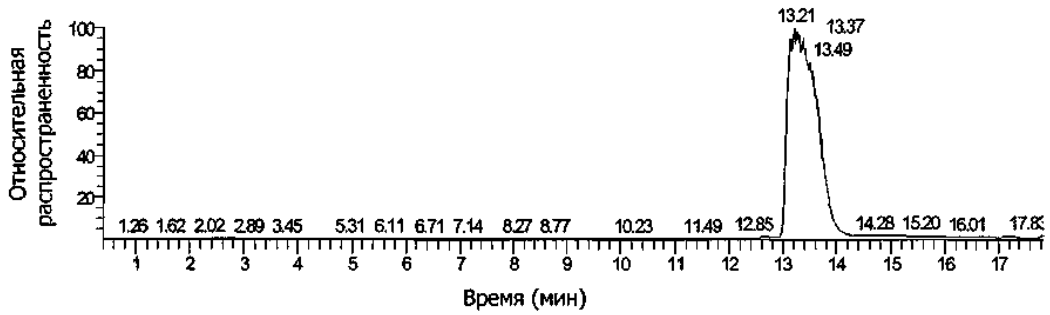
Фиг. 35



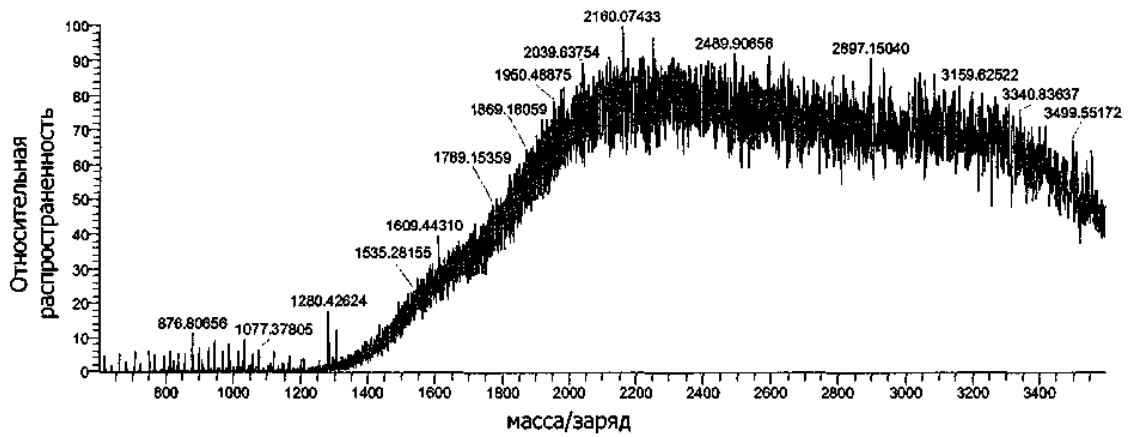
Фиг. 36



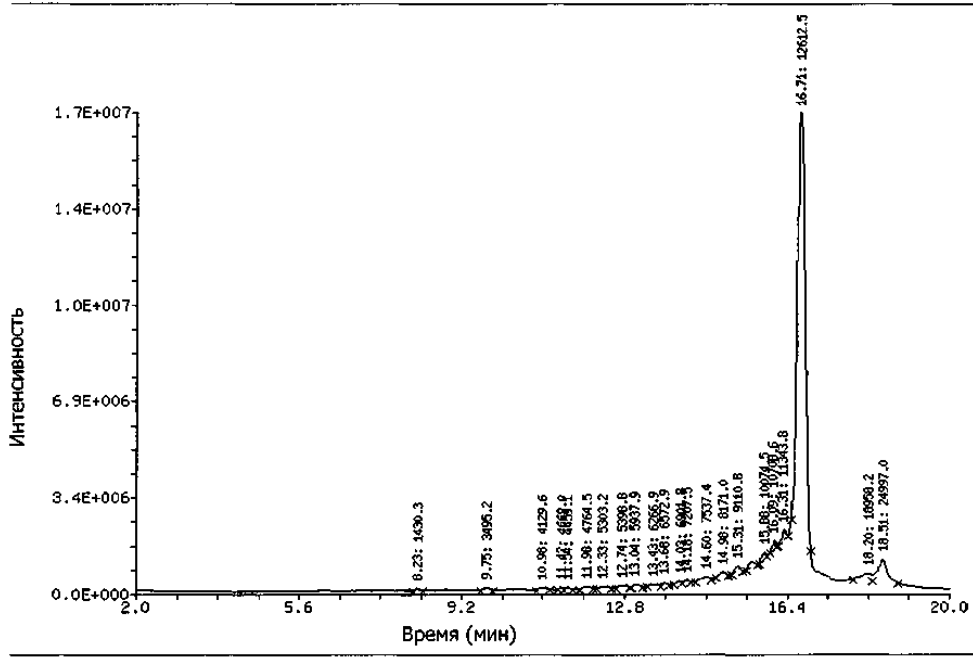
Фиг. 37



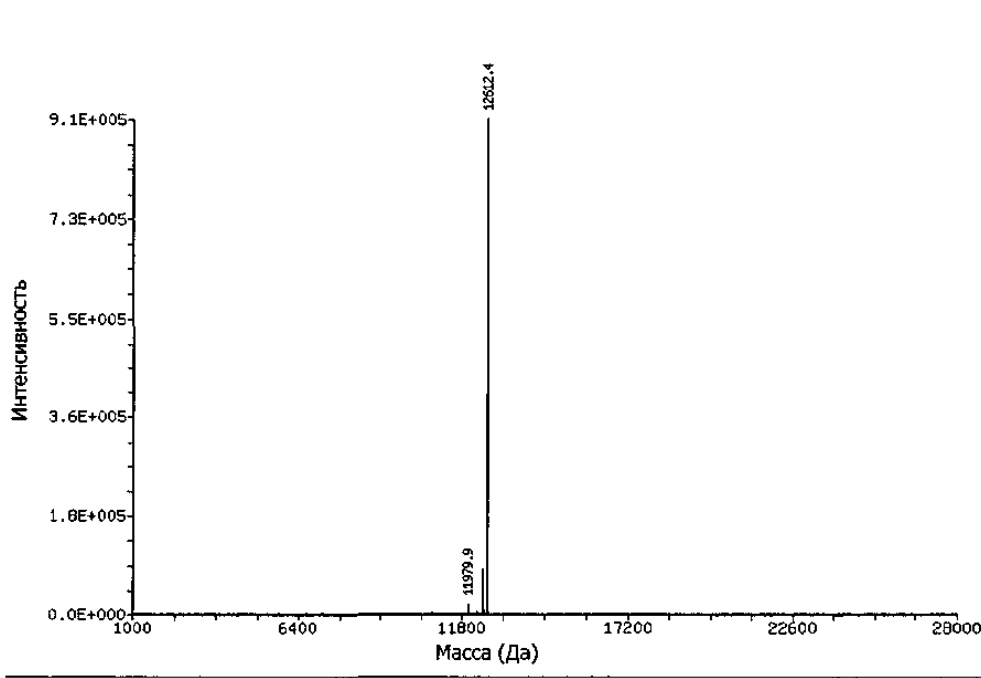
Фиг. 38



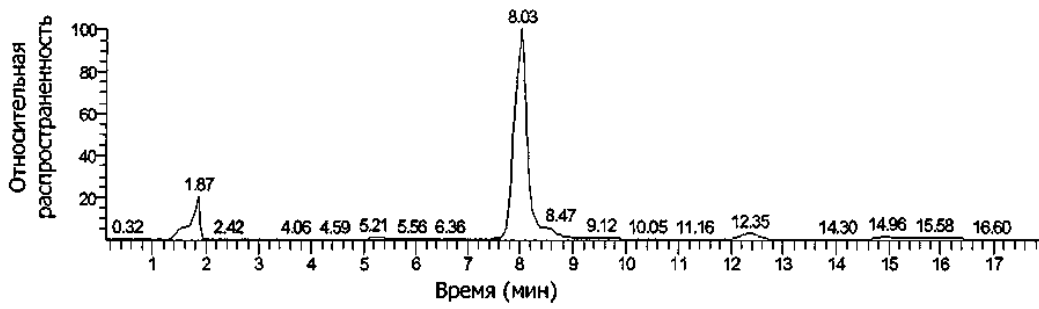
Фиг. 39



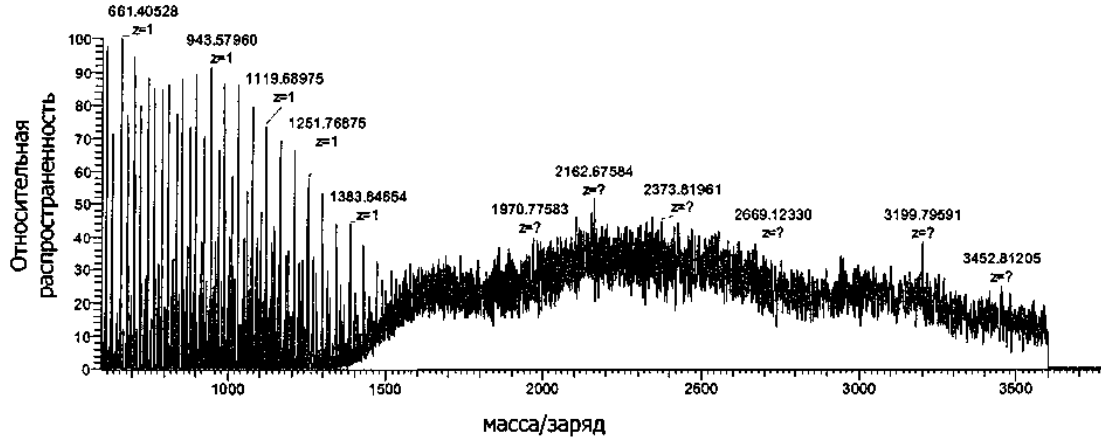
Фиг. 40



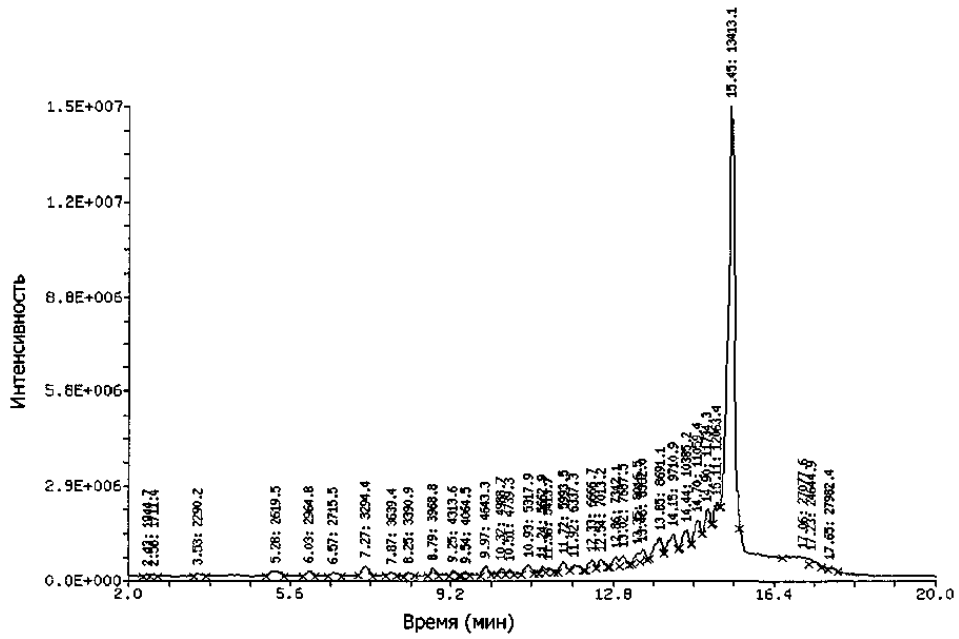
Фиг. 41



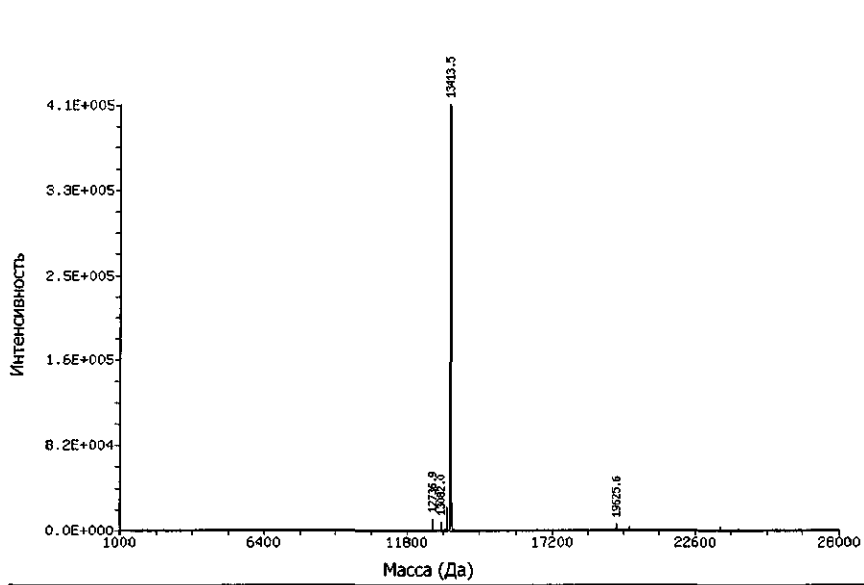
Фиг. 42



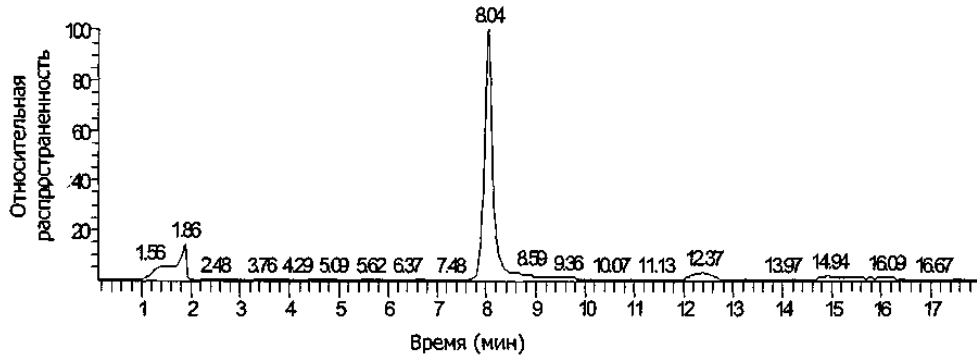
Фиг. 43



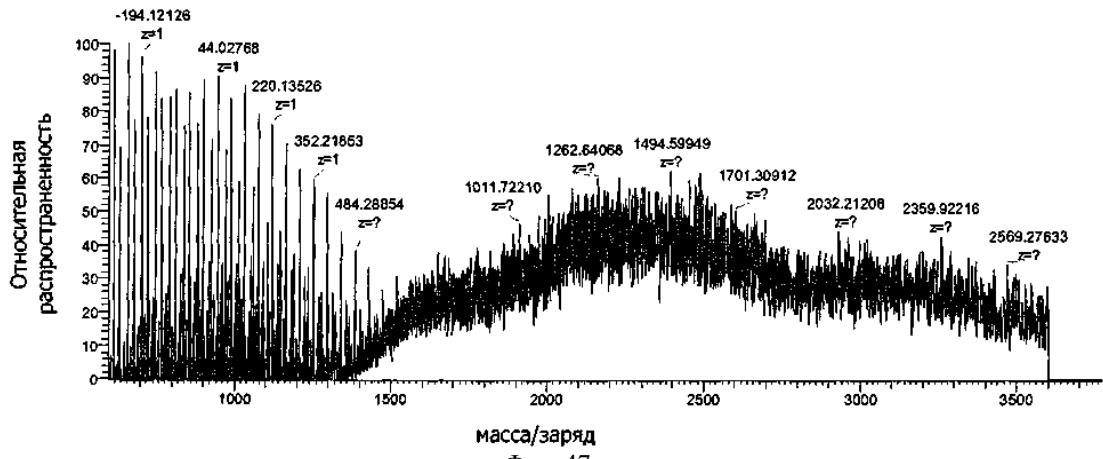
Фиг. 44



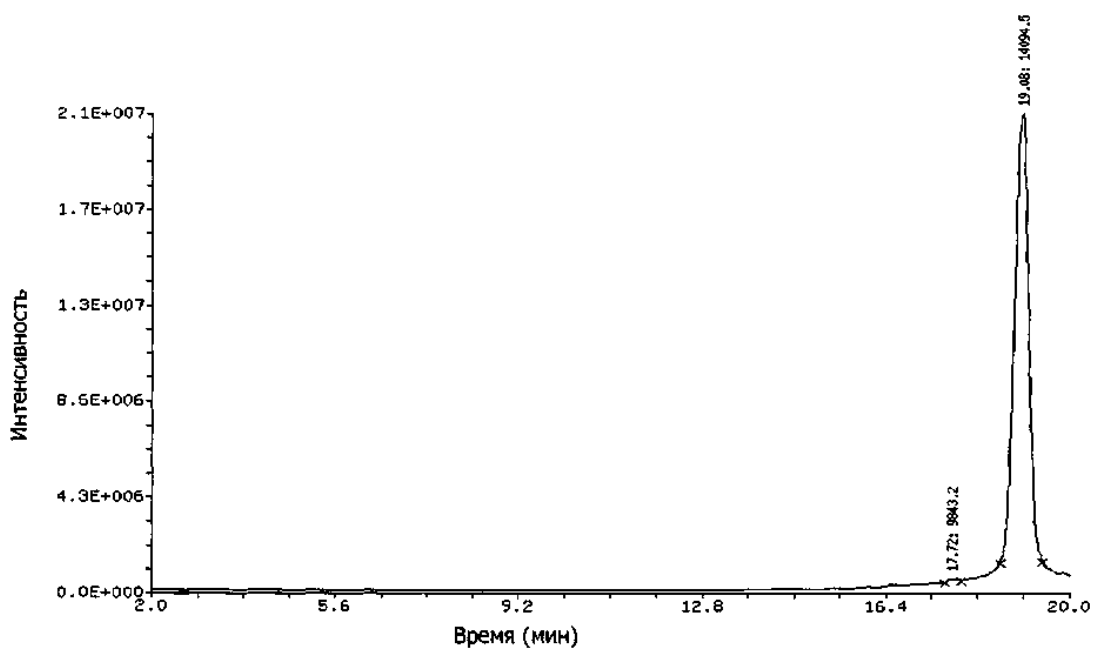
Фиг. 45



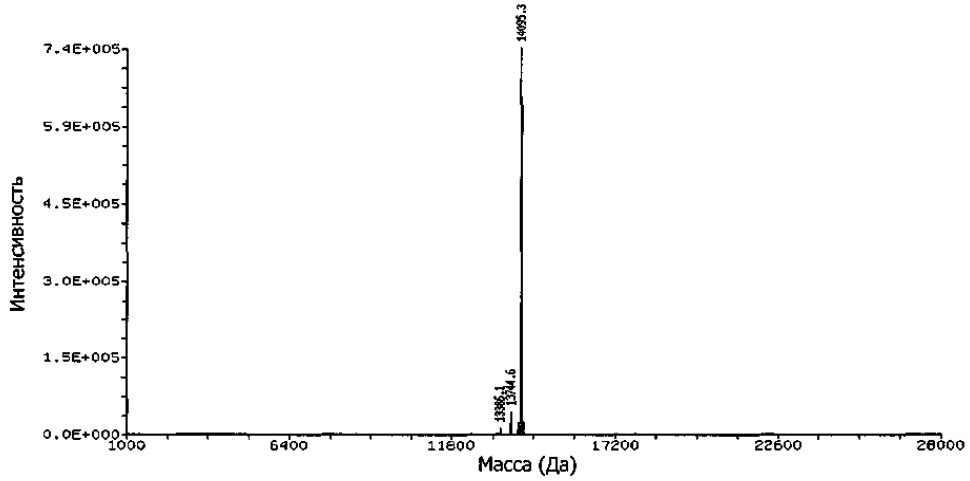
Фиг. 46



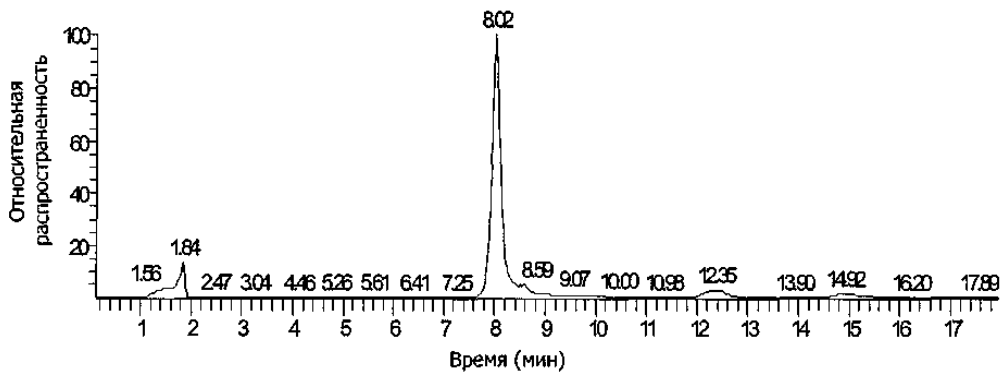
Фиг. 47



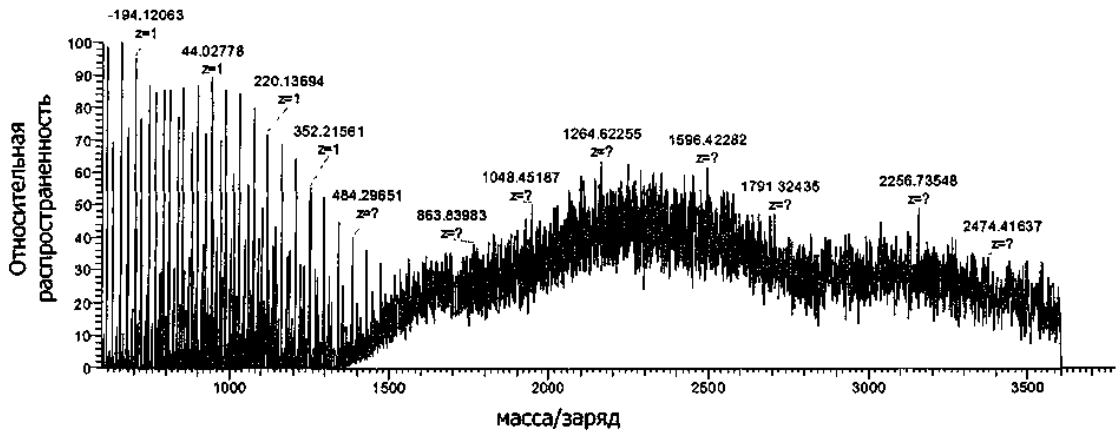
Фиг. 48



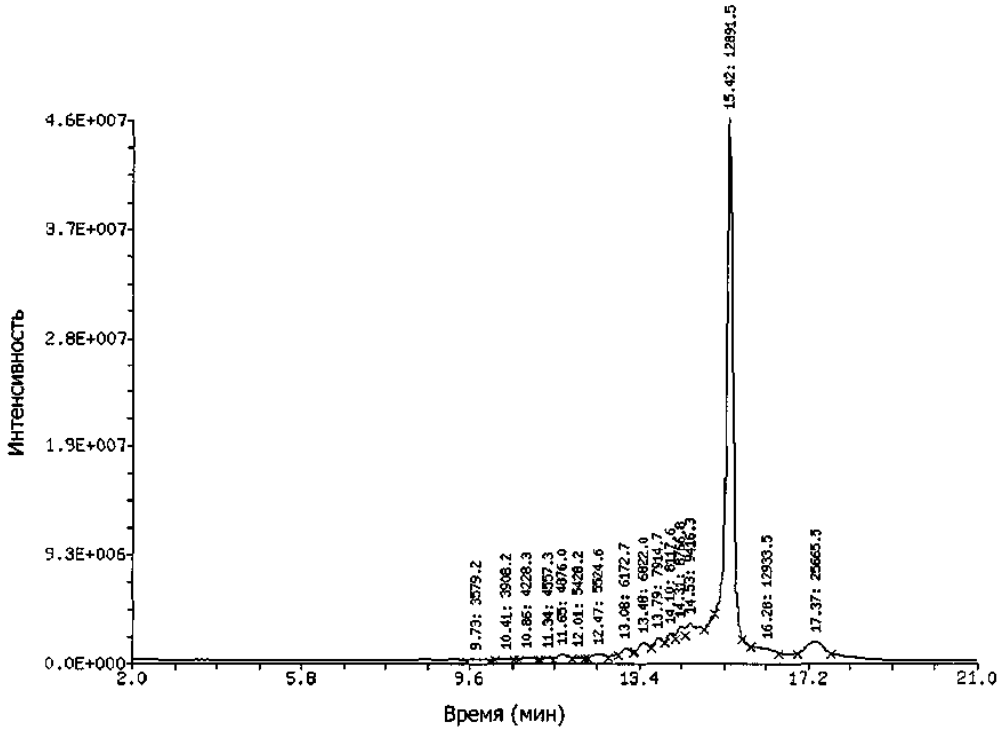
Фиг. 49



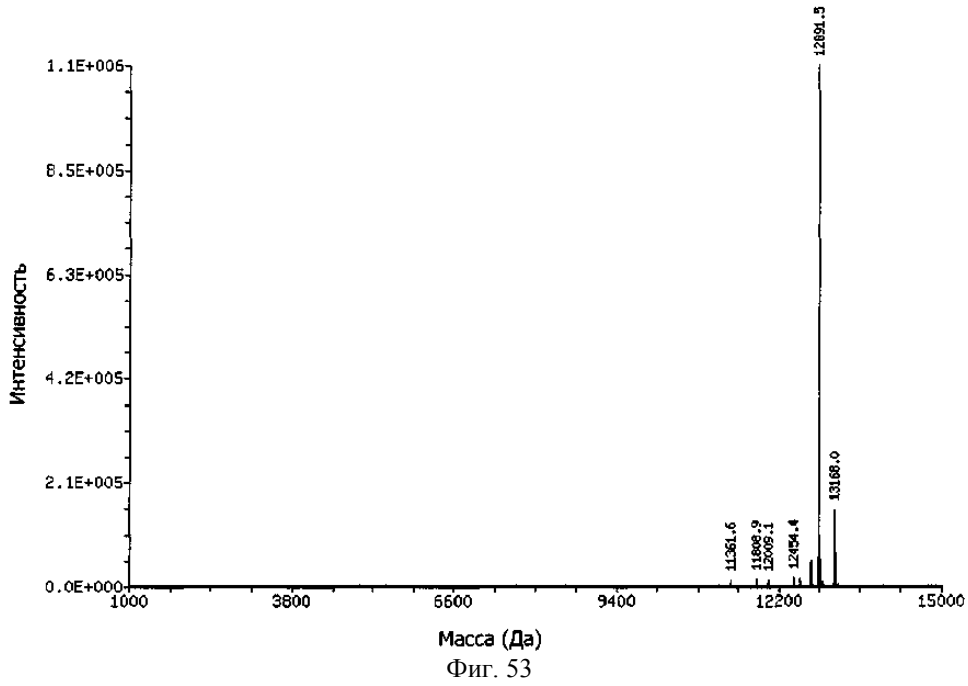
Фиг. 50



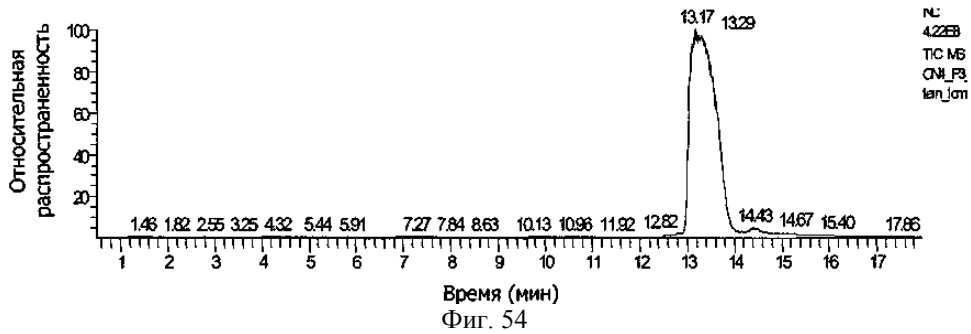
Фиг. 51



Фиг. 52

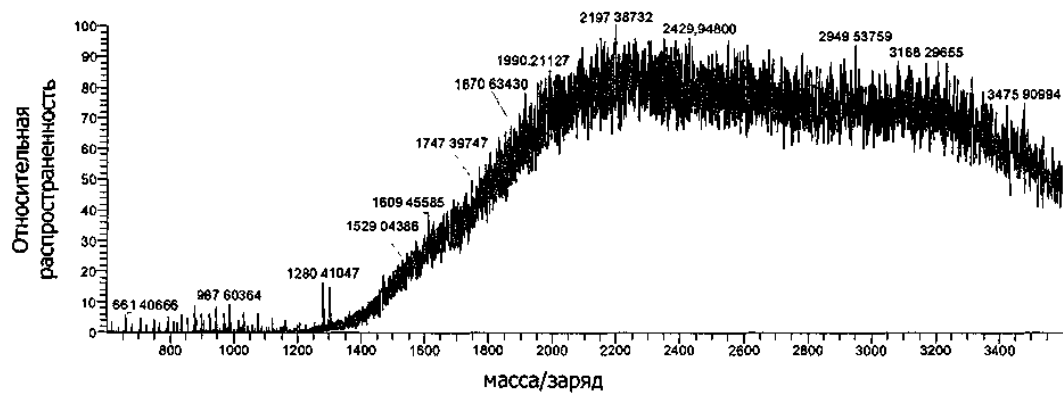


Фиг. 53

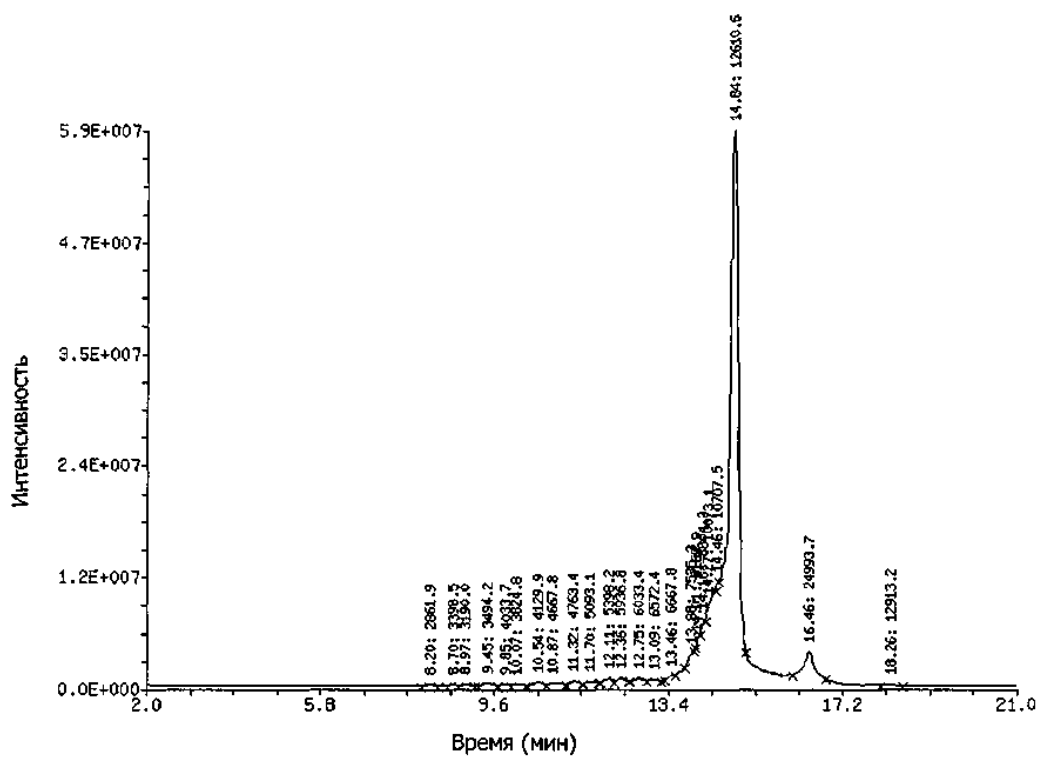


NL:
422E8
TIC.M8
ONI.P8
lan_jm

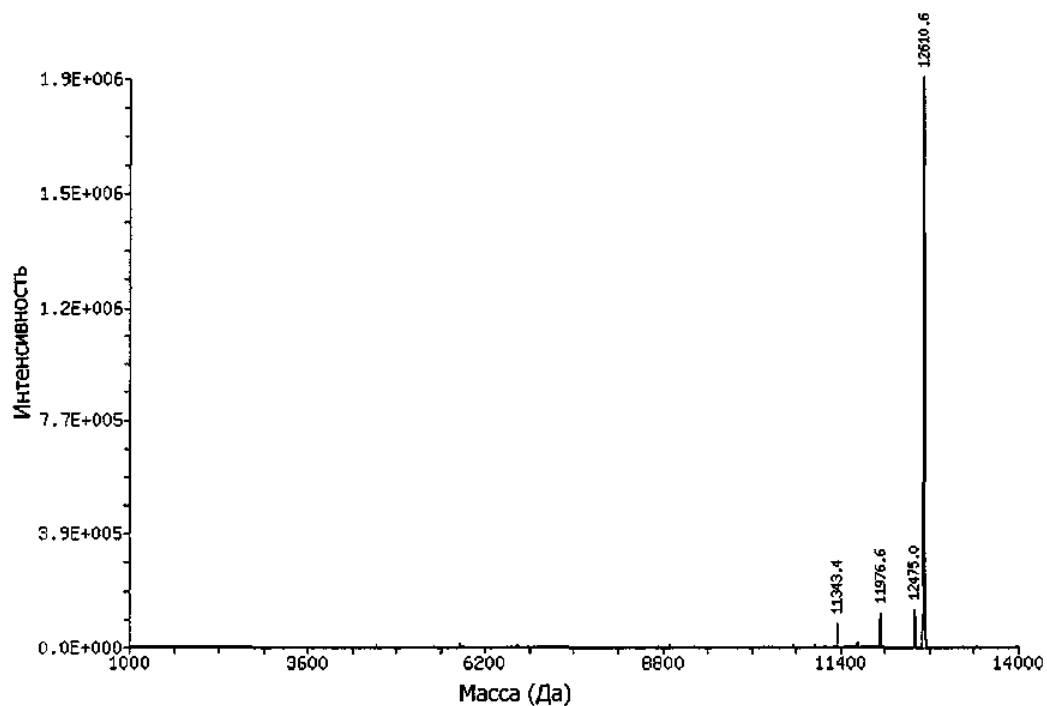
Фиг. 54



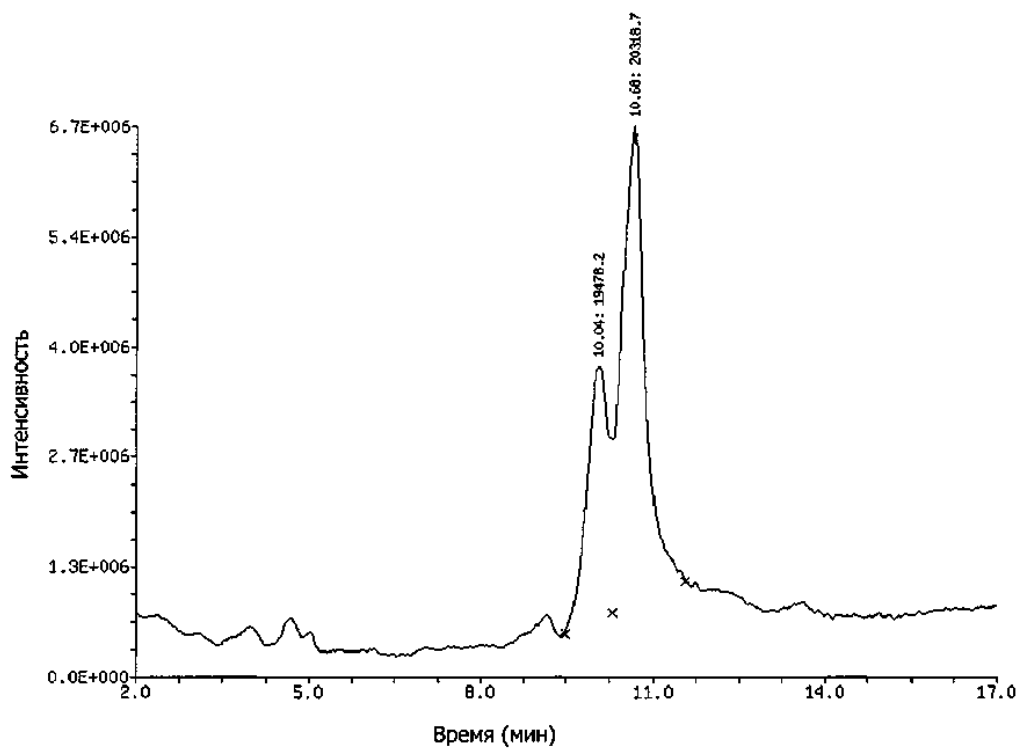
Фиг. 55



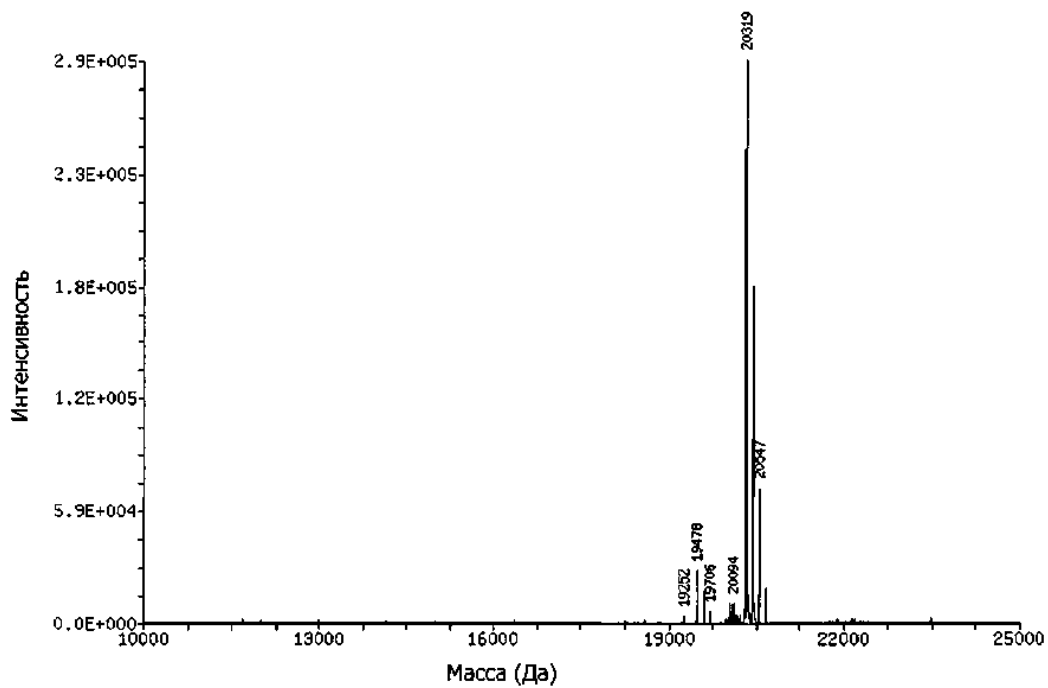
Фиг. 56



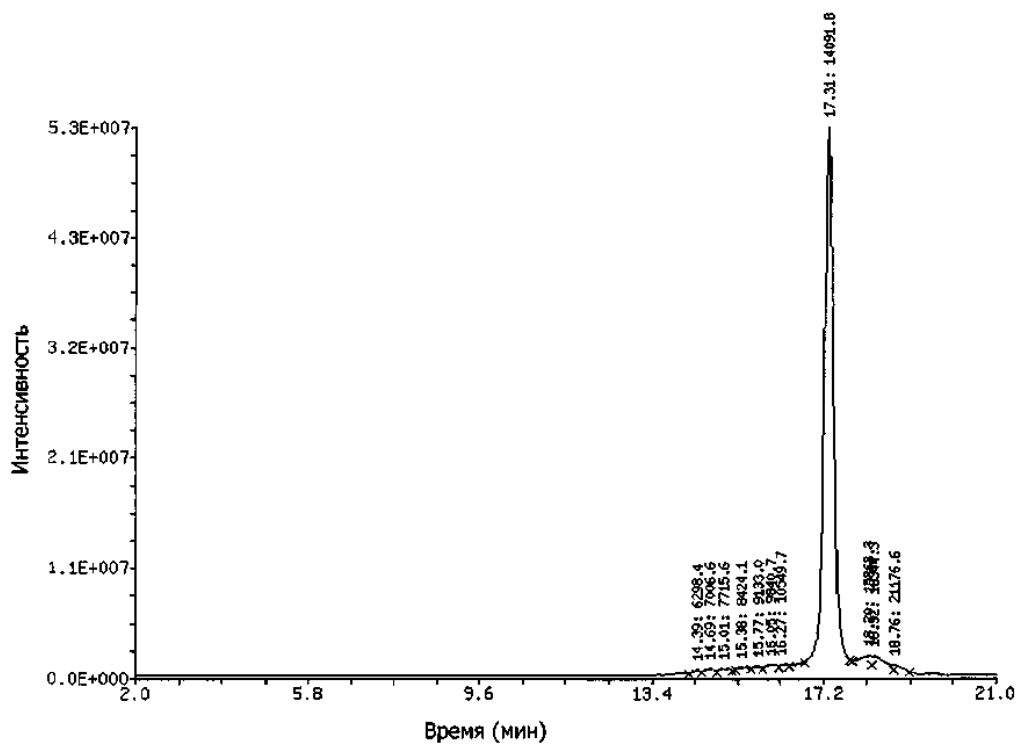
Фиг. 57



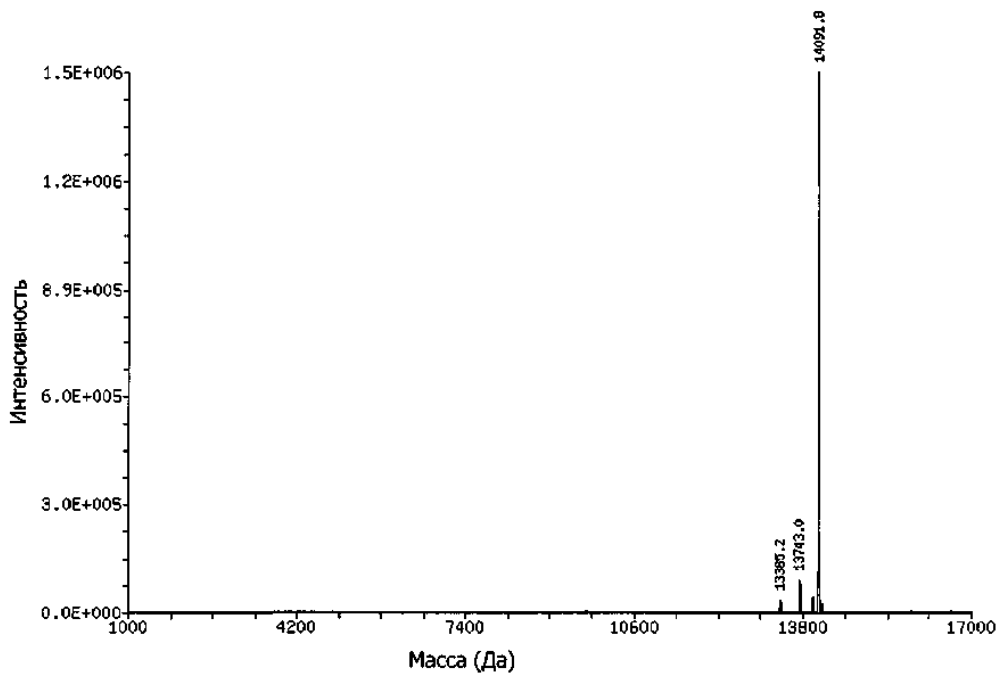
Фиг. 58



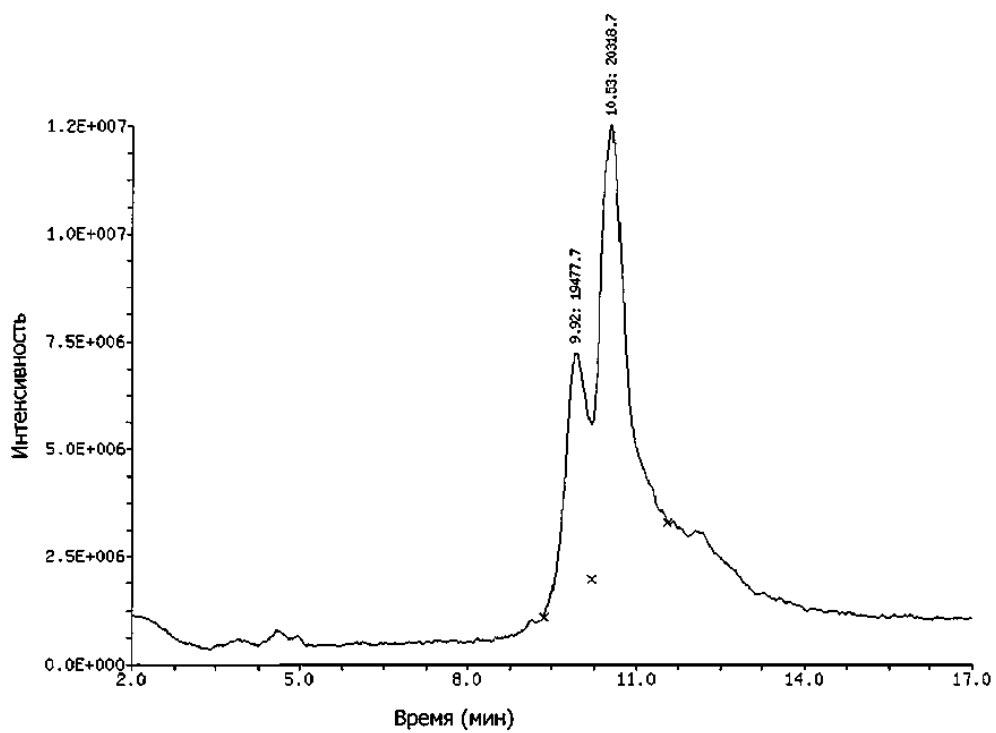
Фиг. 59



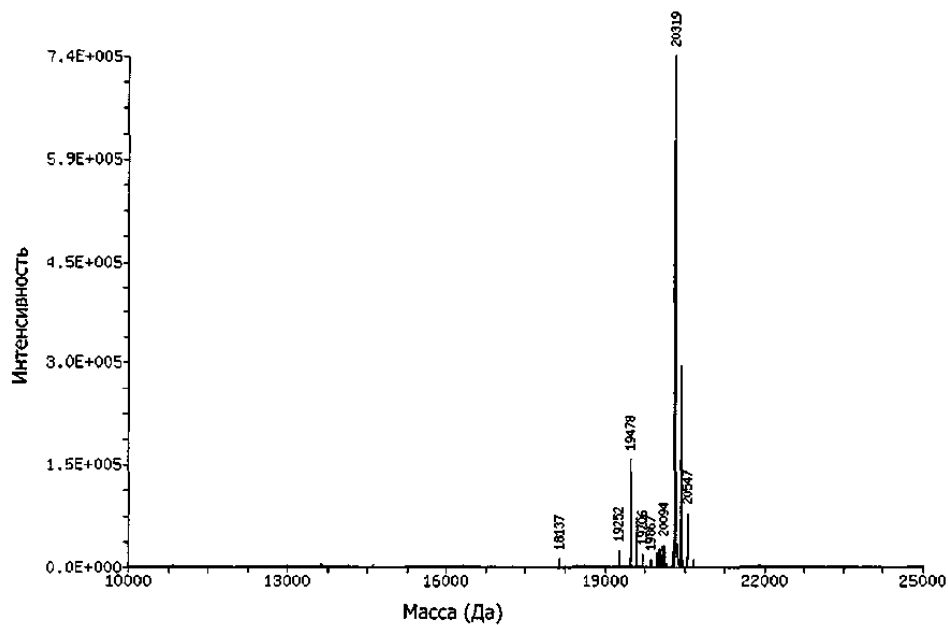
Фиг. 60



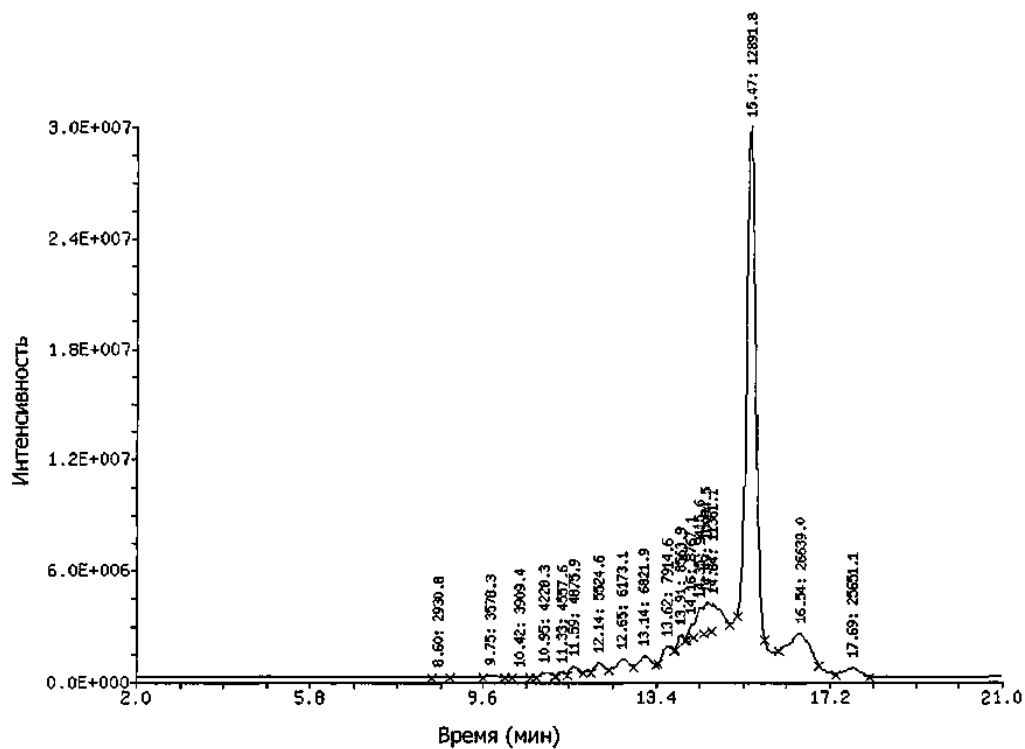
Фиг. 61



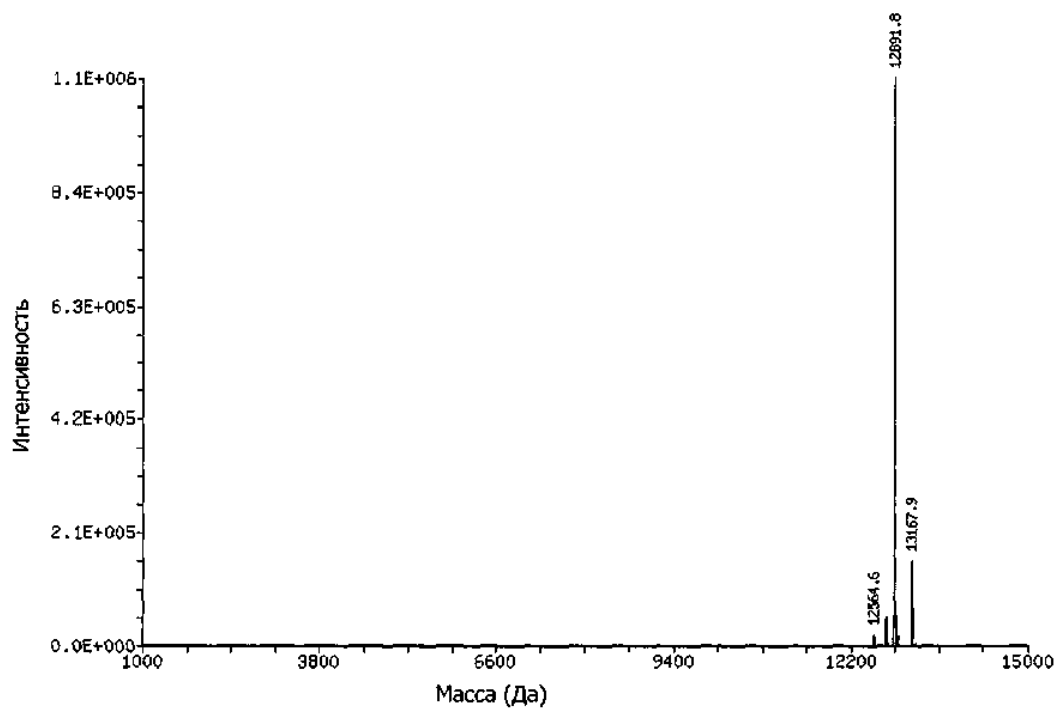
Фиг. 62



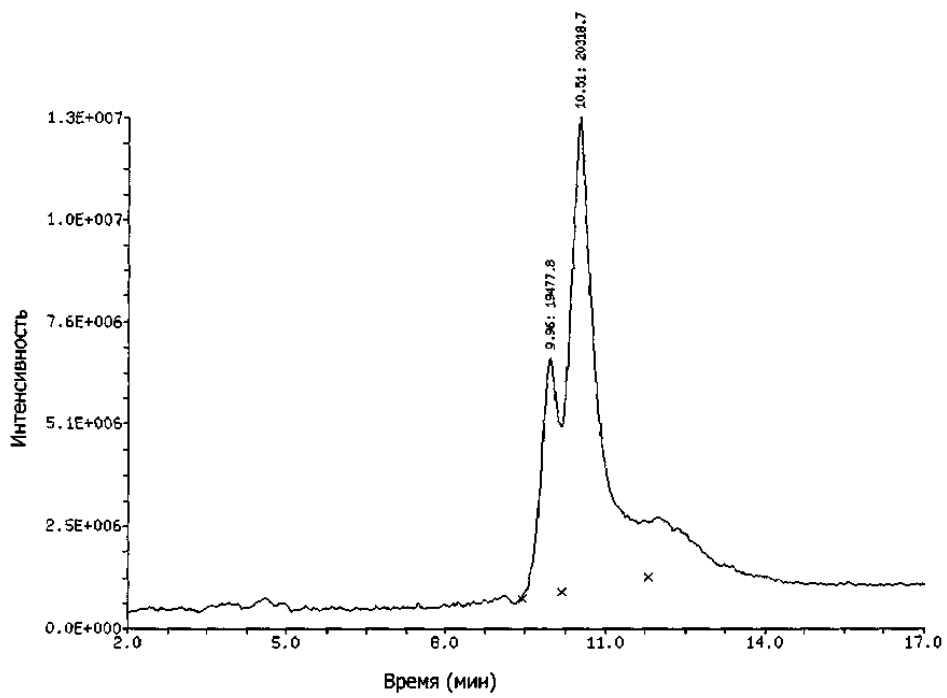
Фиг. 63



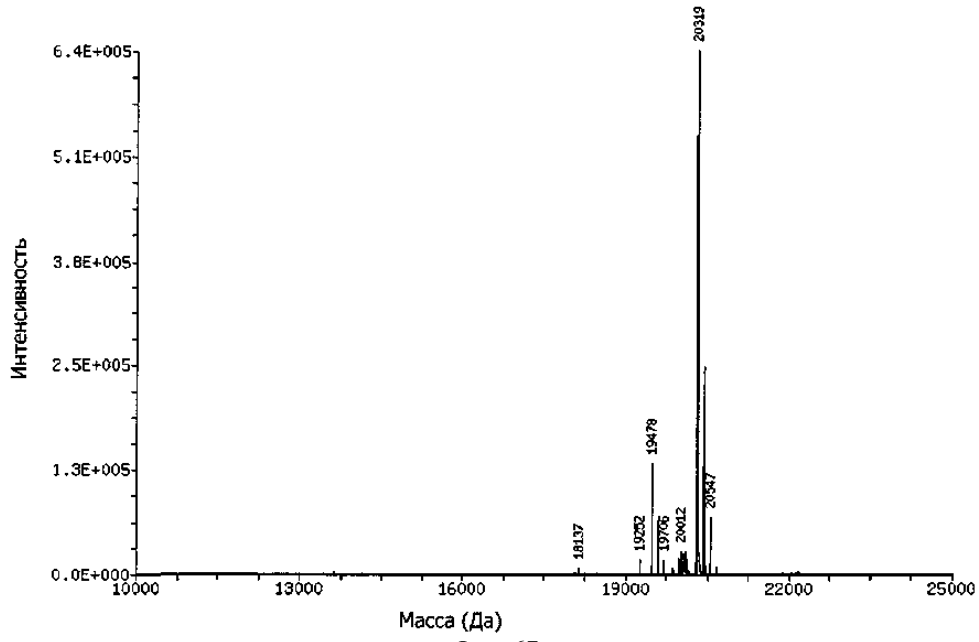
Фиг. 64



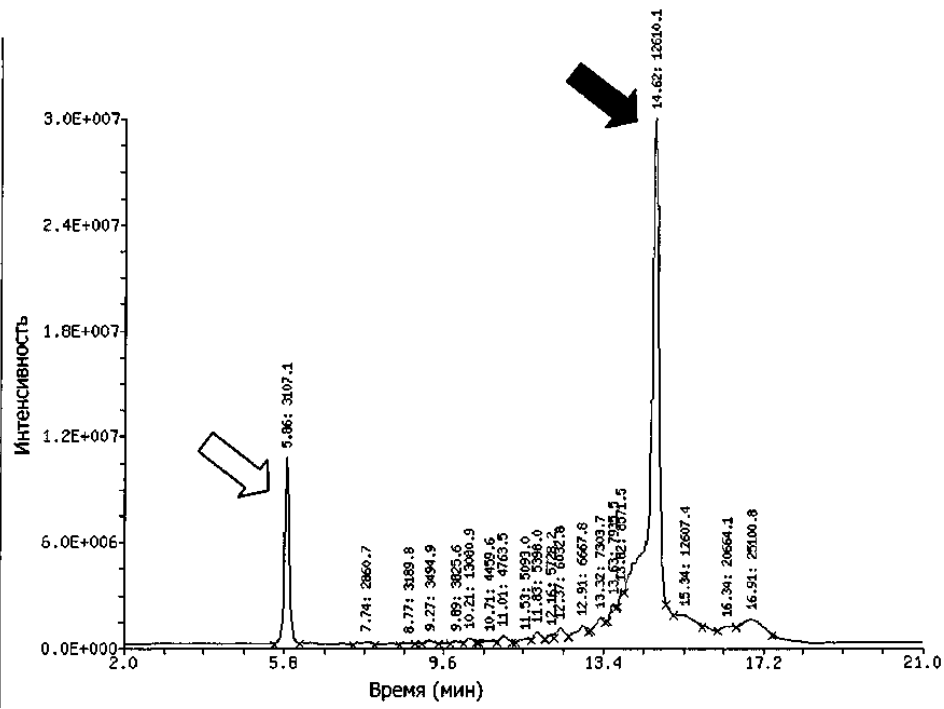
Фиг. 65



Фиг. 66

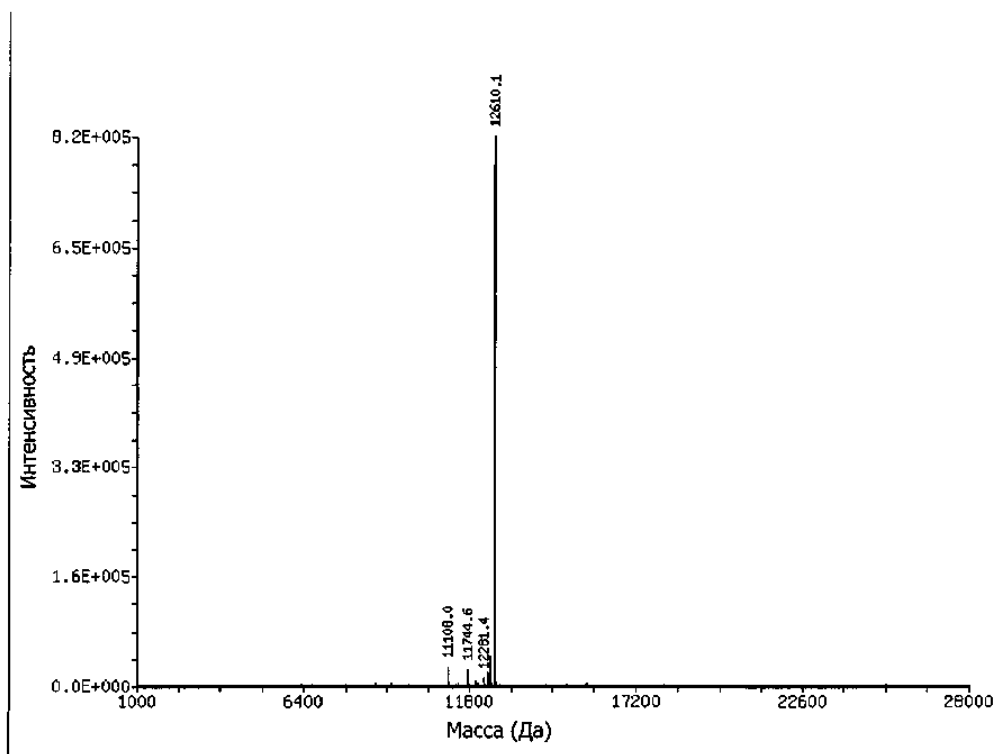


Фиг. 67

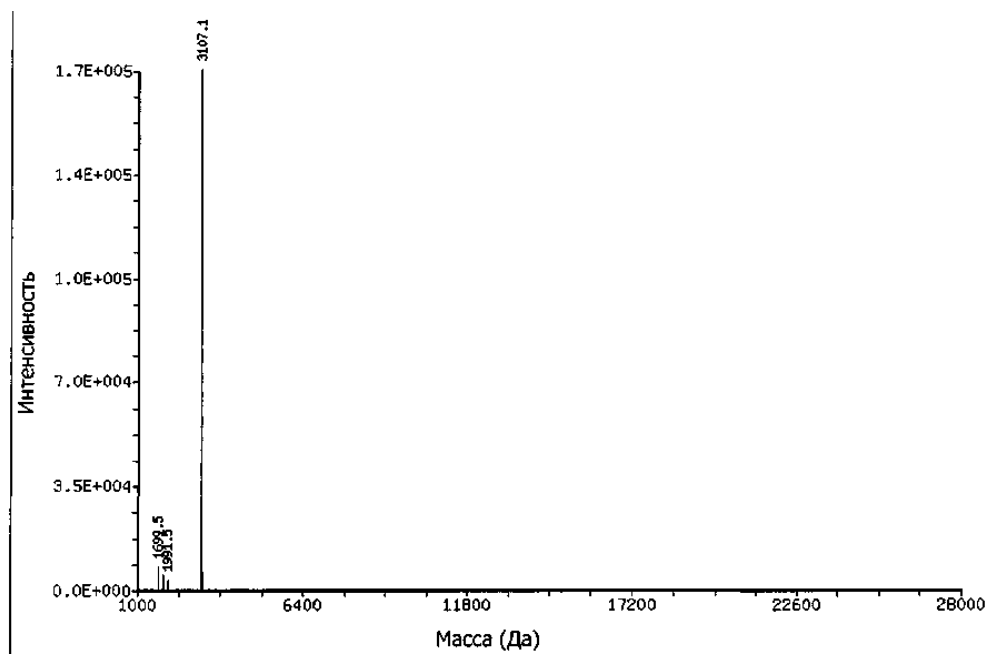


Фиг. 68

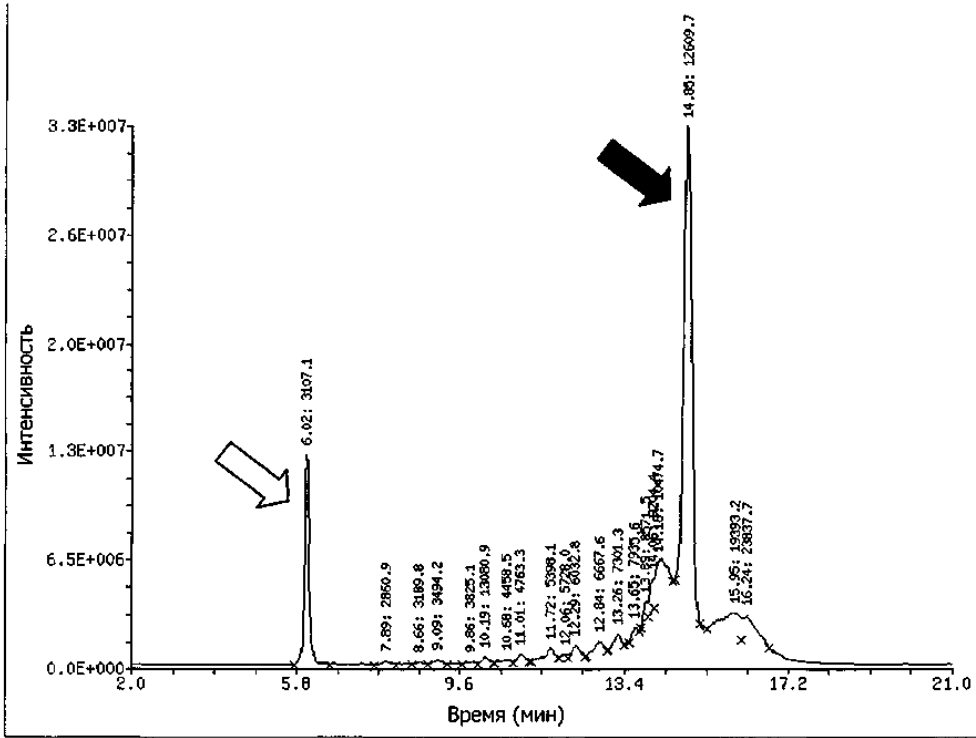
035967



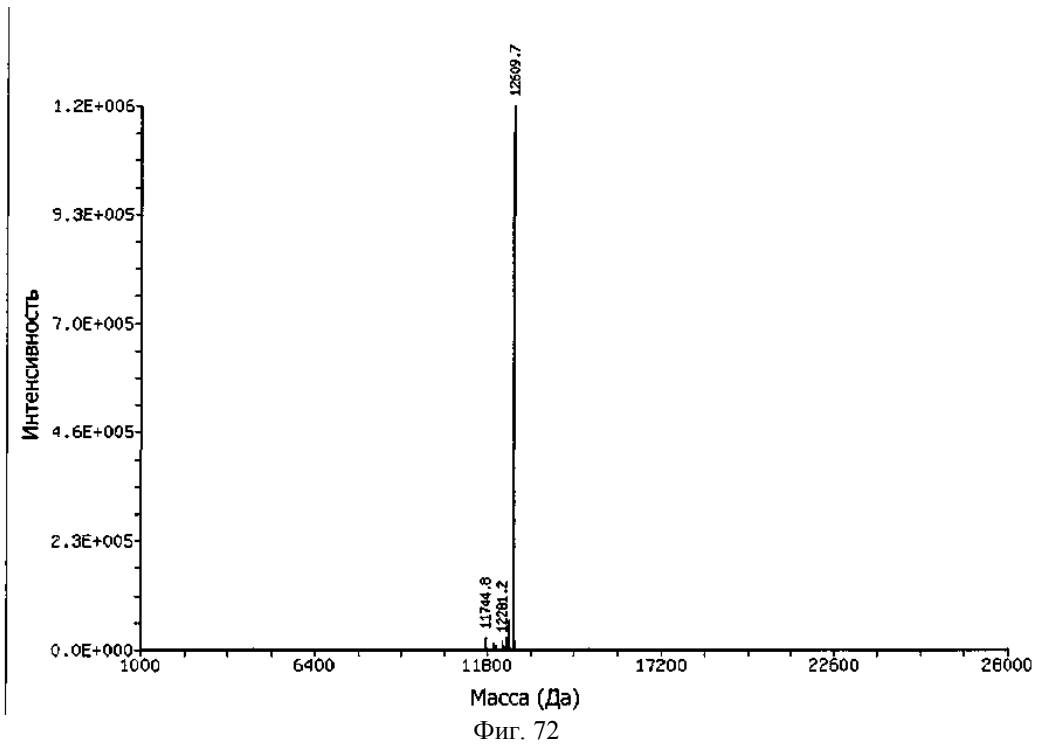
Фиг. 69



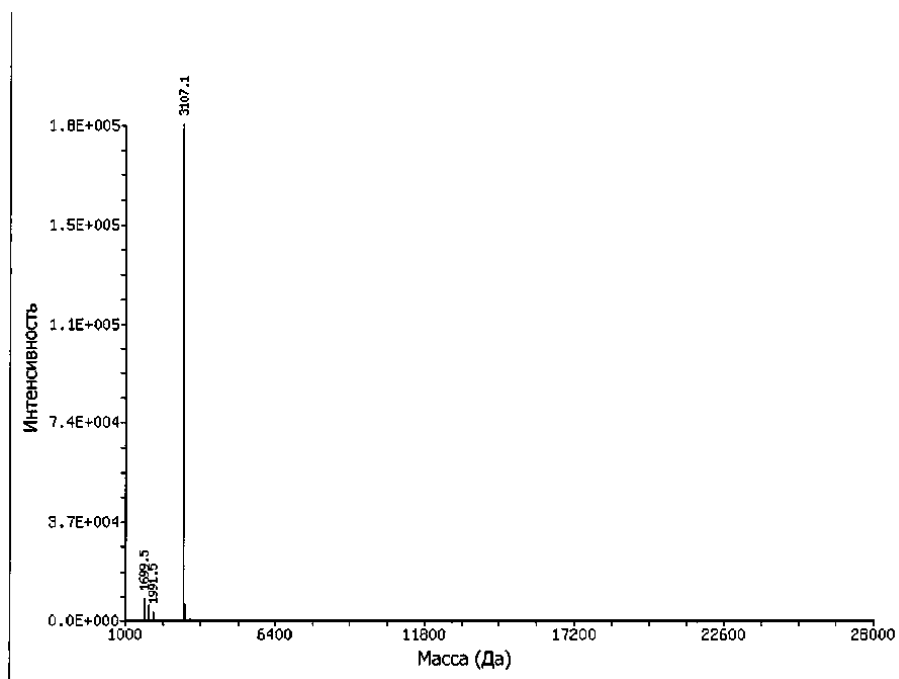
Фиг. 70



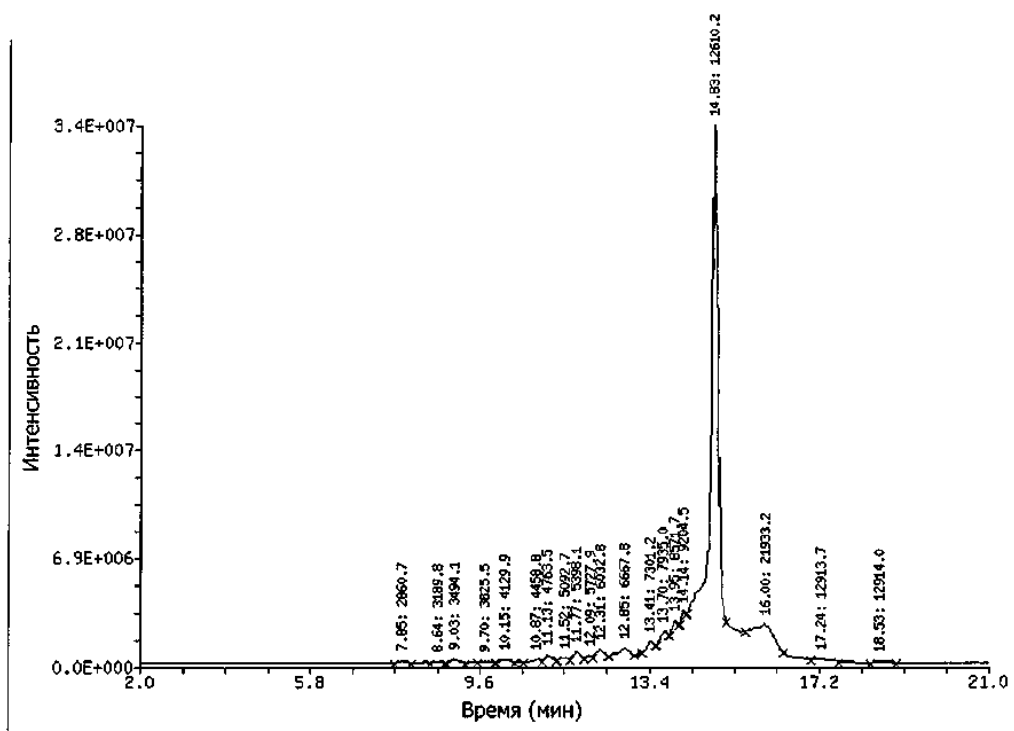
Фиг. 71



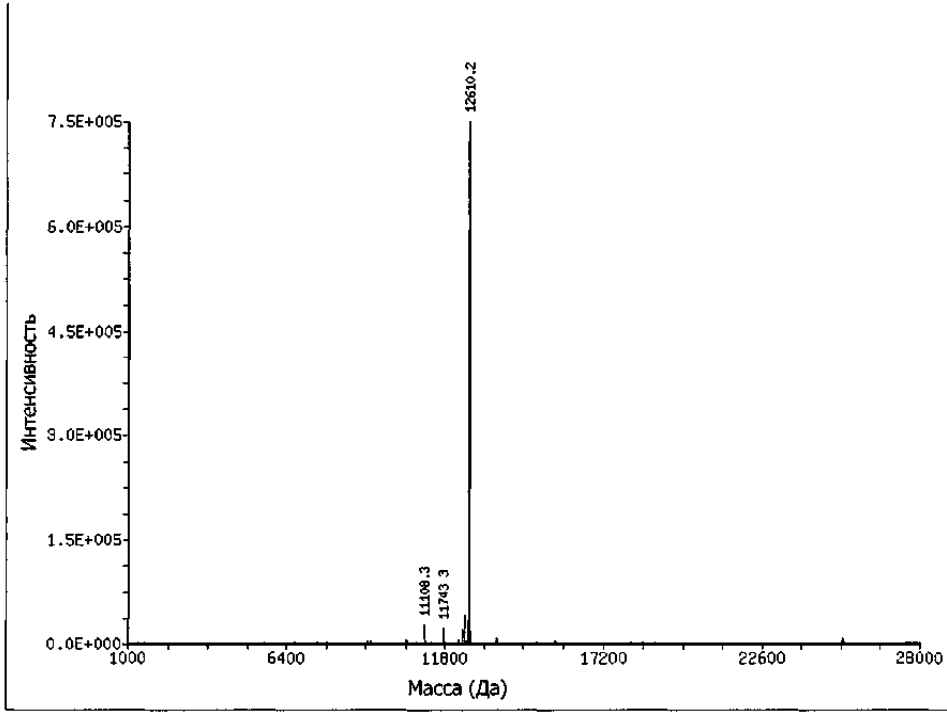
Фиг. 72



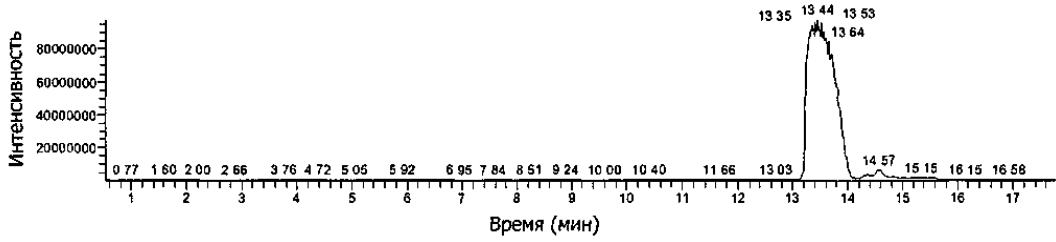
Фиг. 73



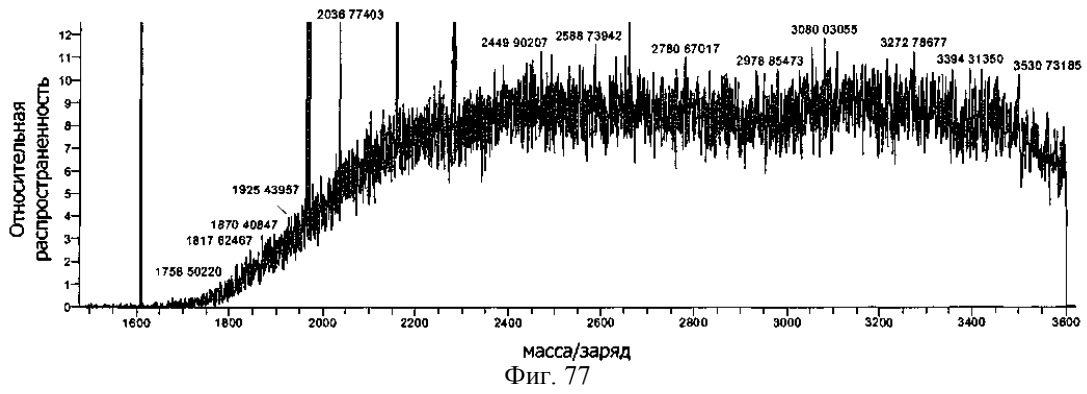
Фиг. 74



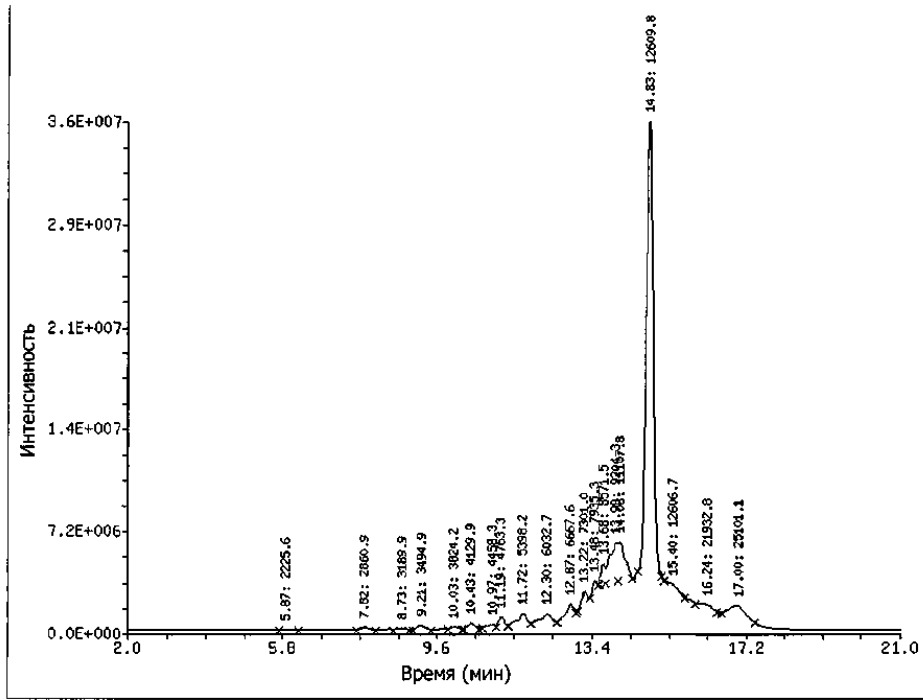
Фиг. 75



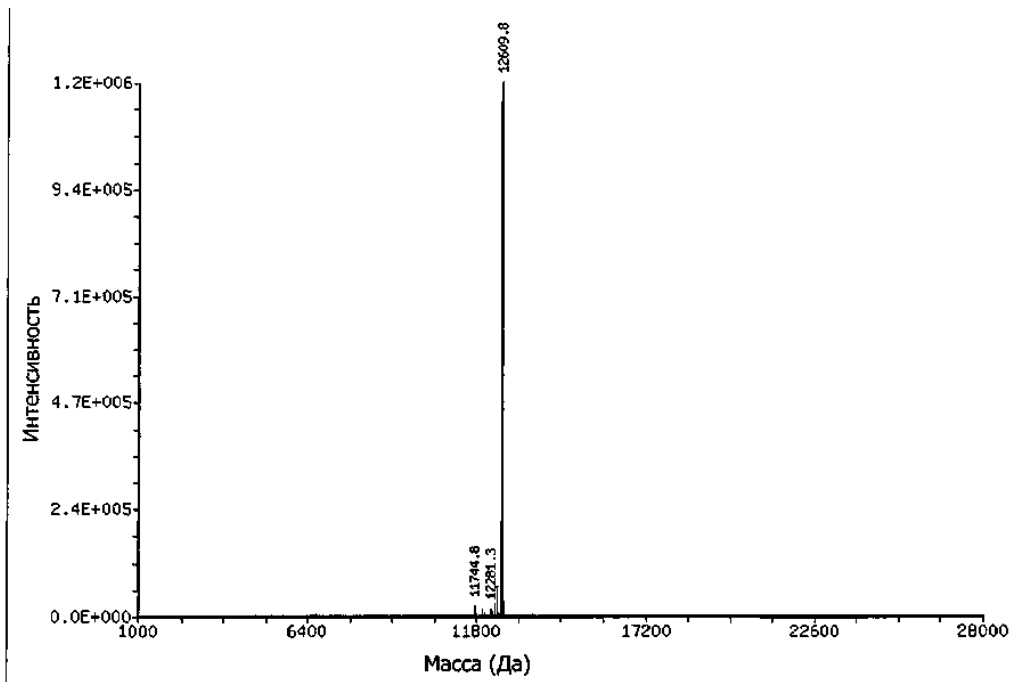
Фиг. 76



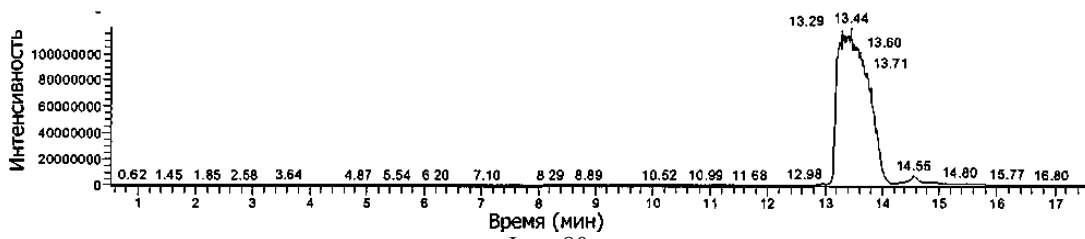
Фиг. 77



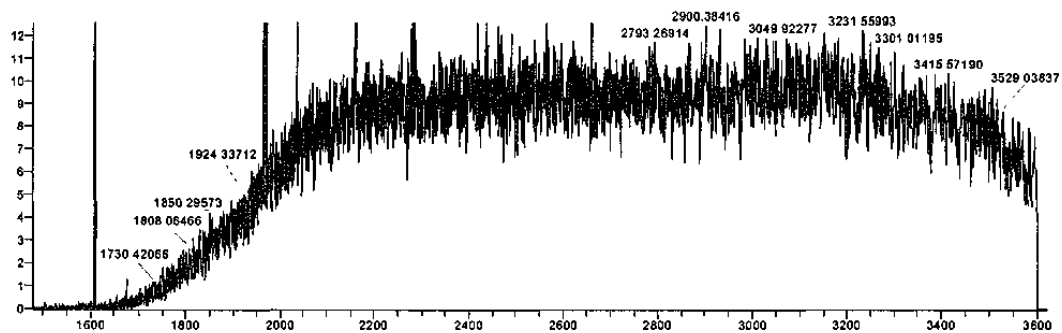
Фиг. 78



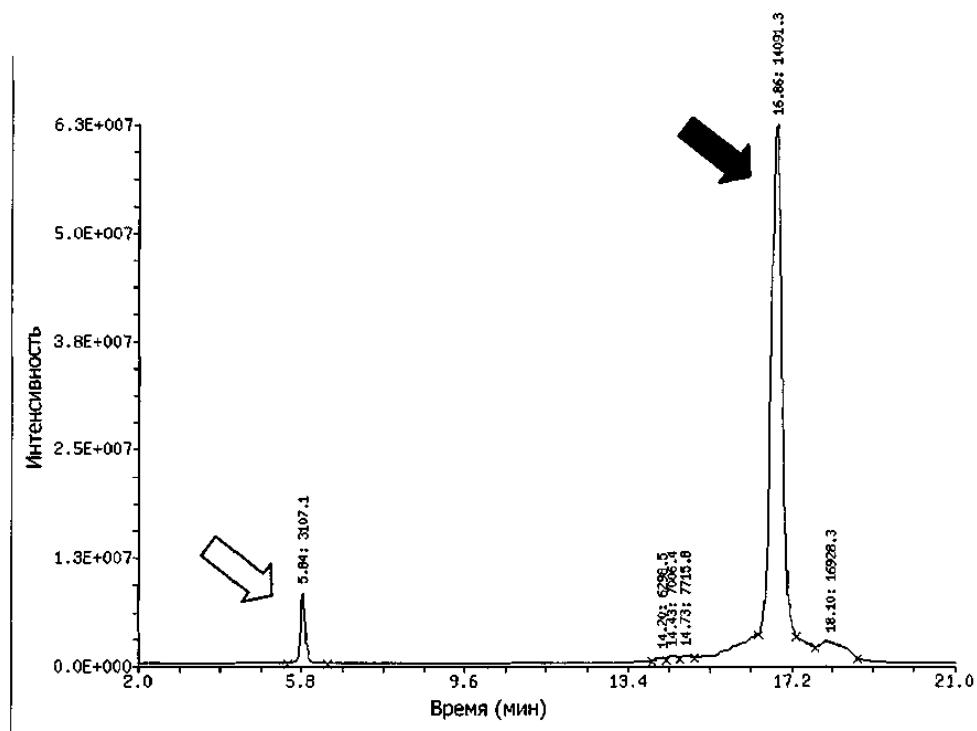
Фиг. 79



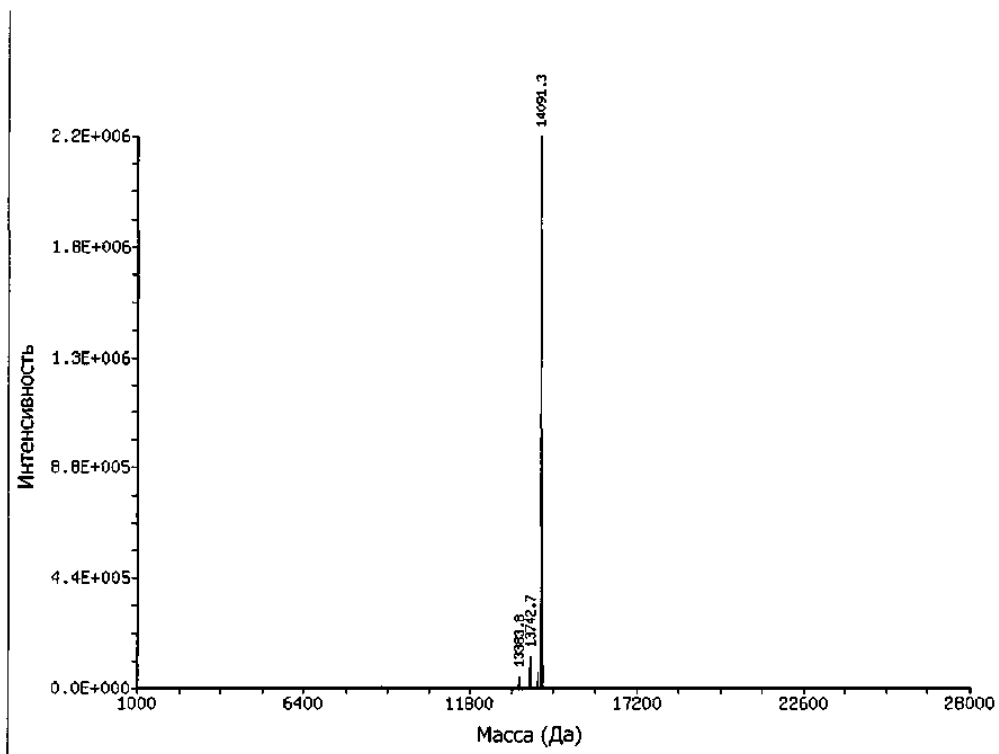
Фиг. 80



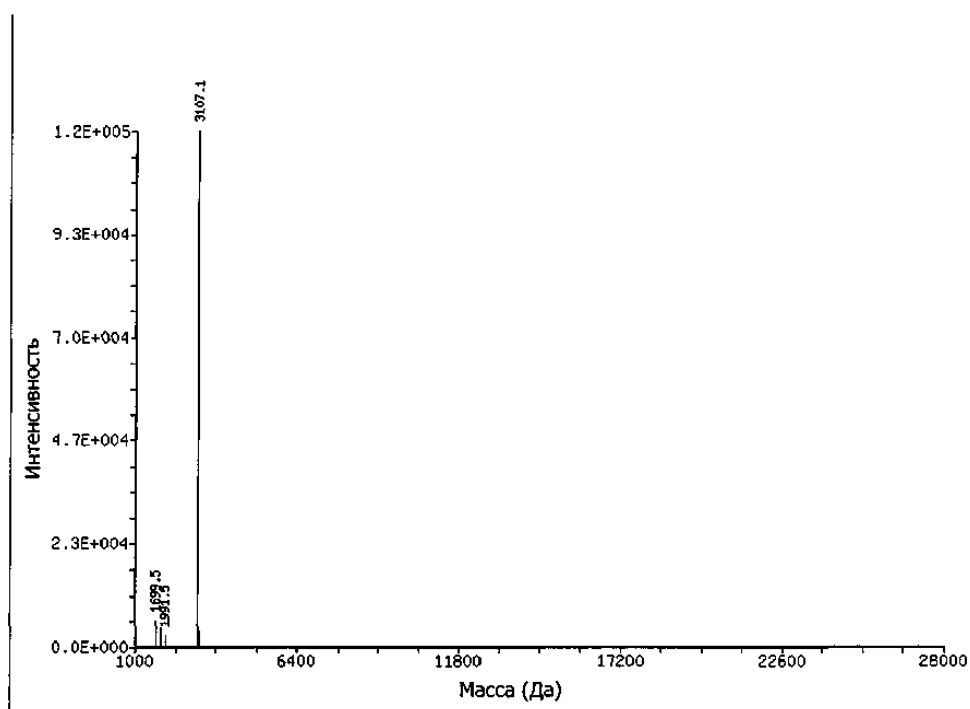
масса/заряд
Фиг. 81



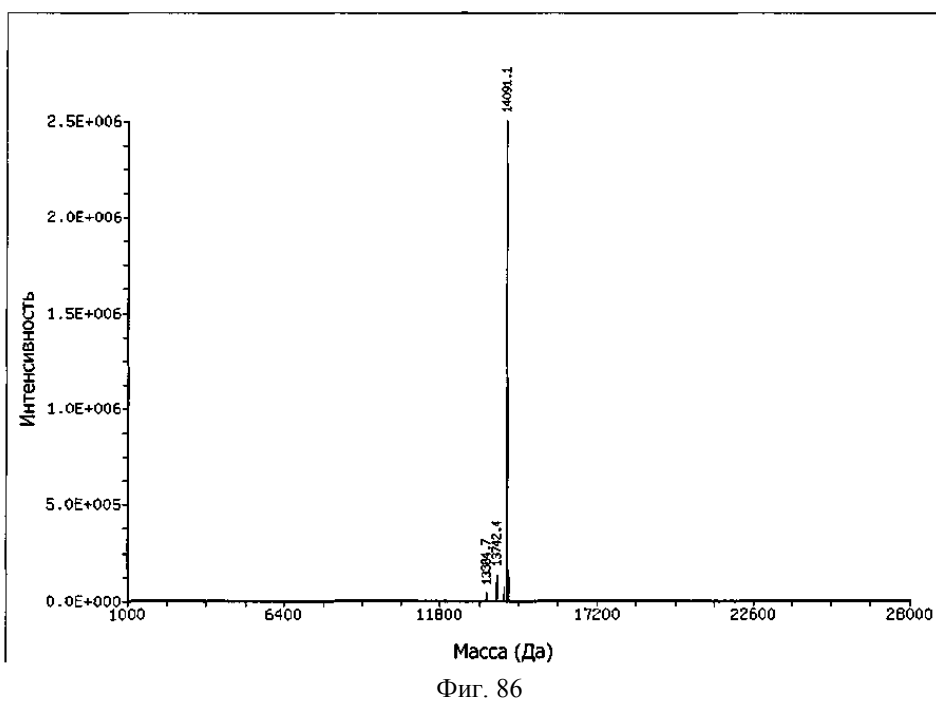
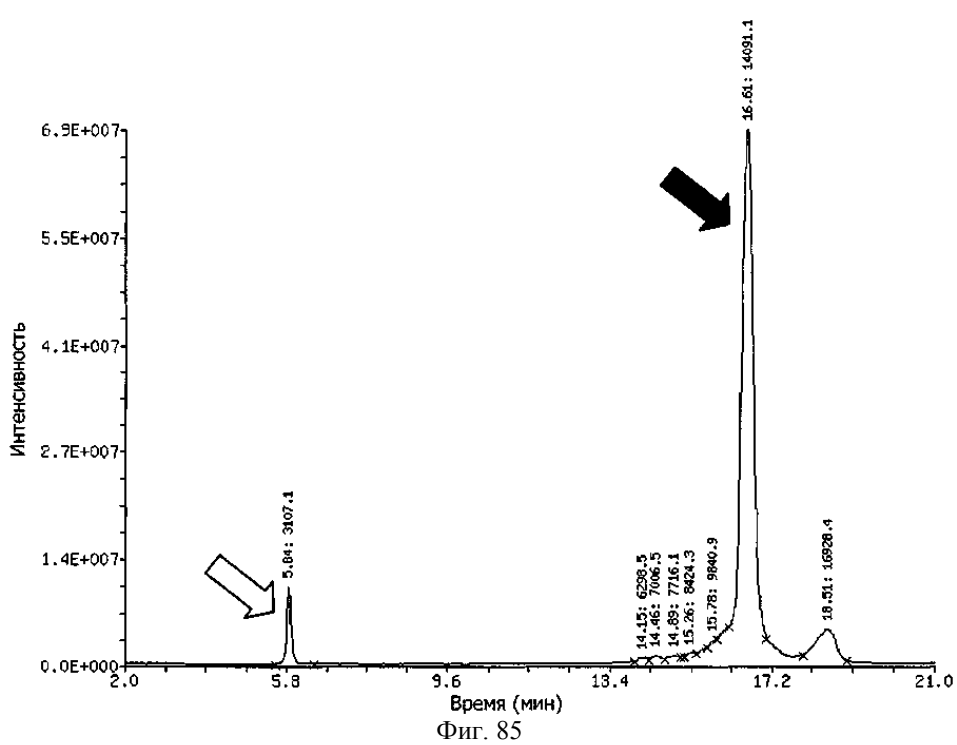
Фиг. 82

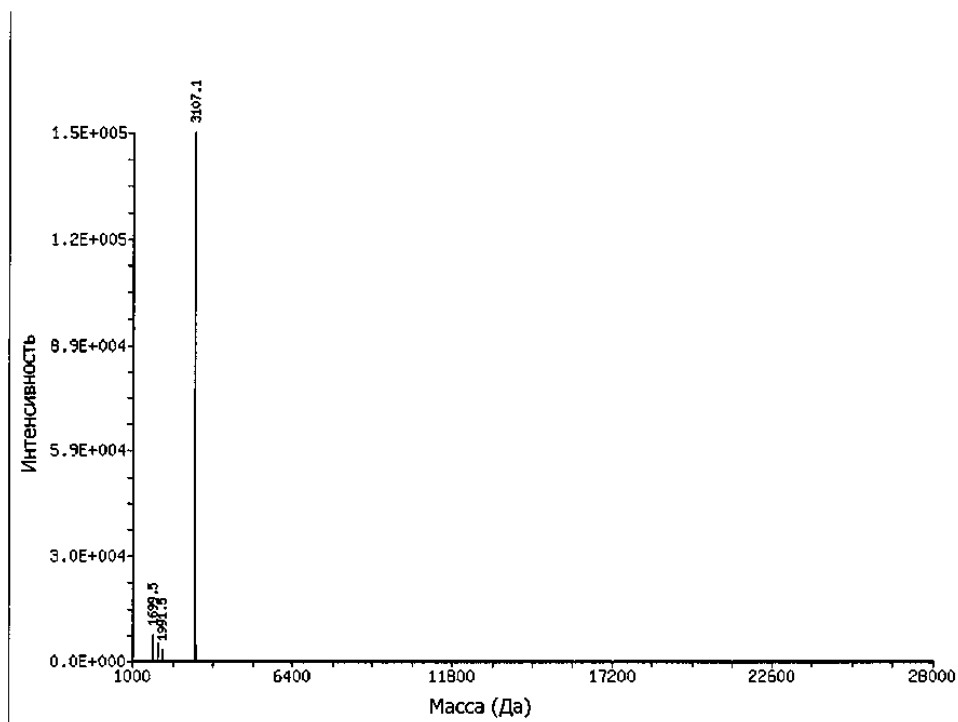


Фиг. 83

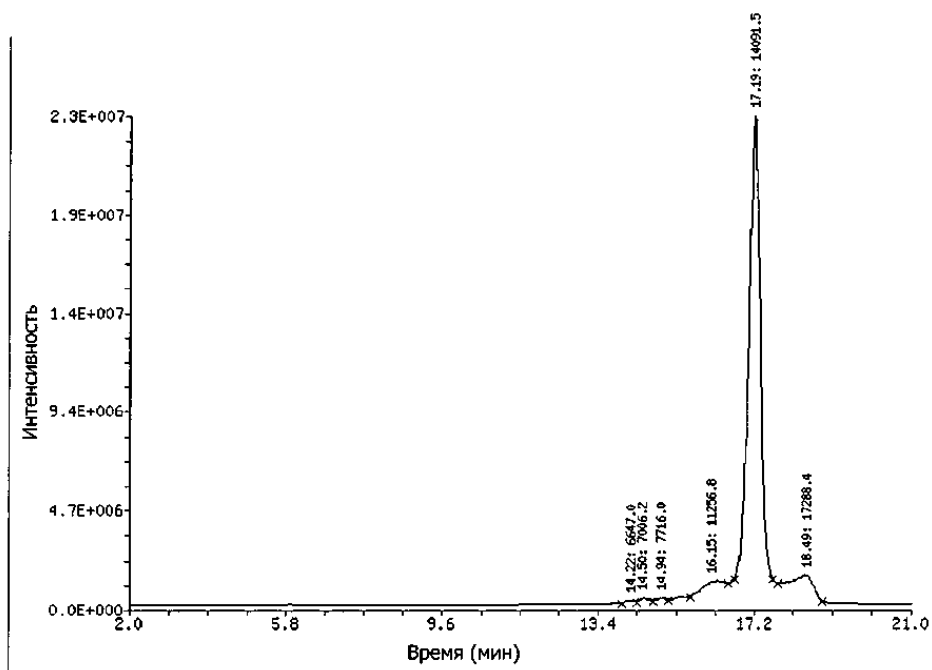


Фиг. 84

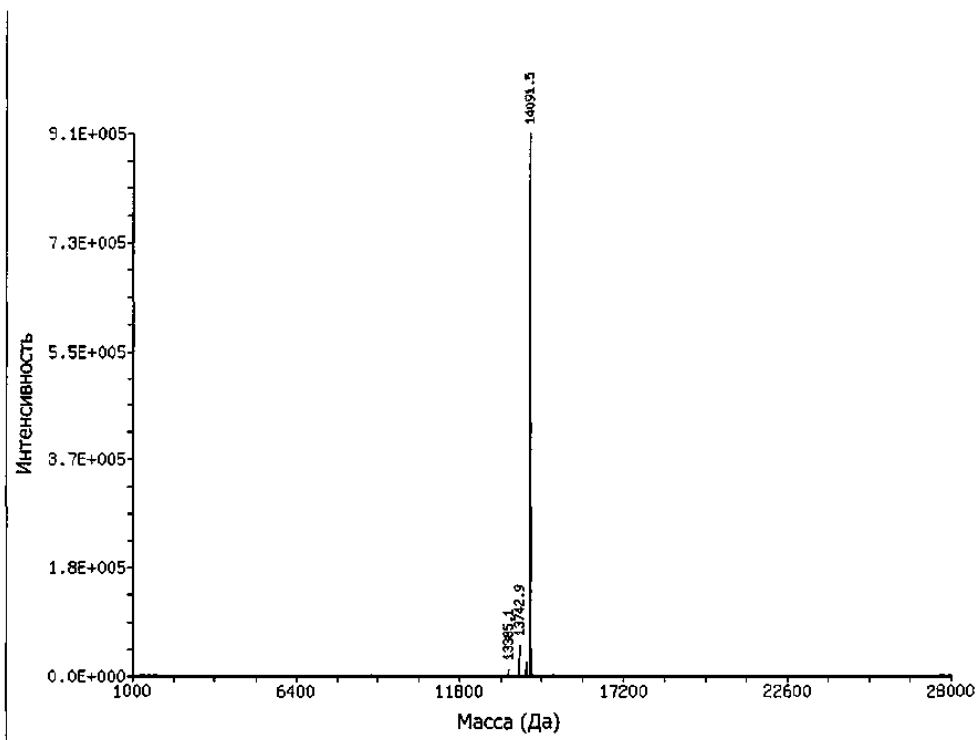




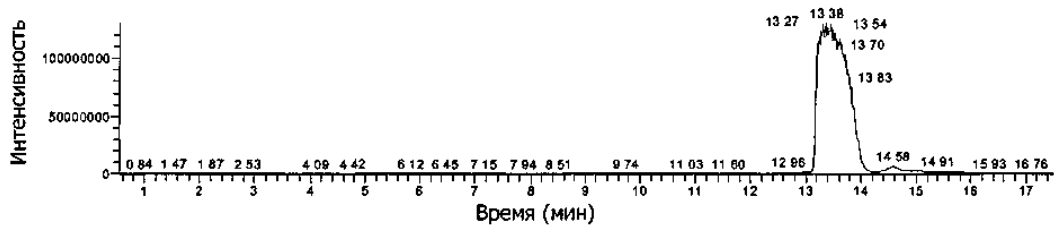
Фиг. 87



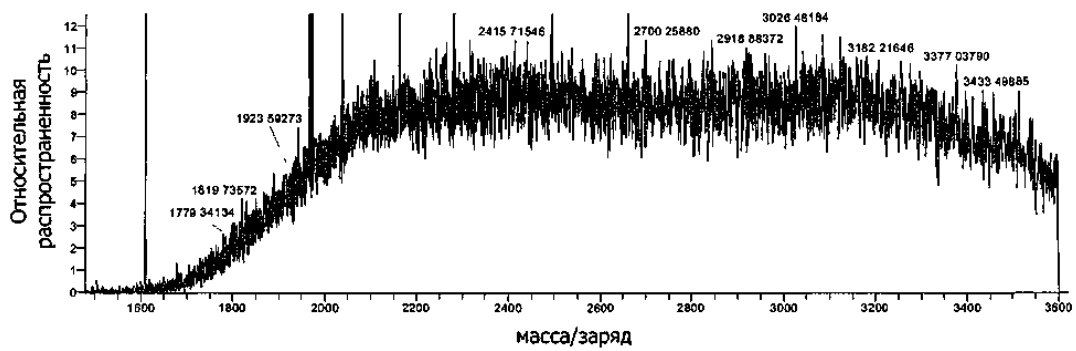
Фиг. 88



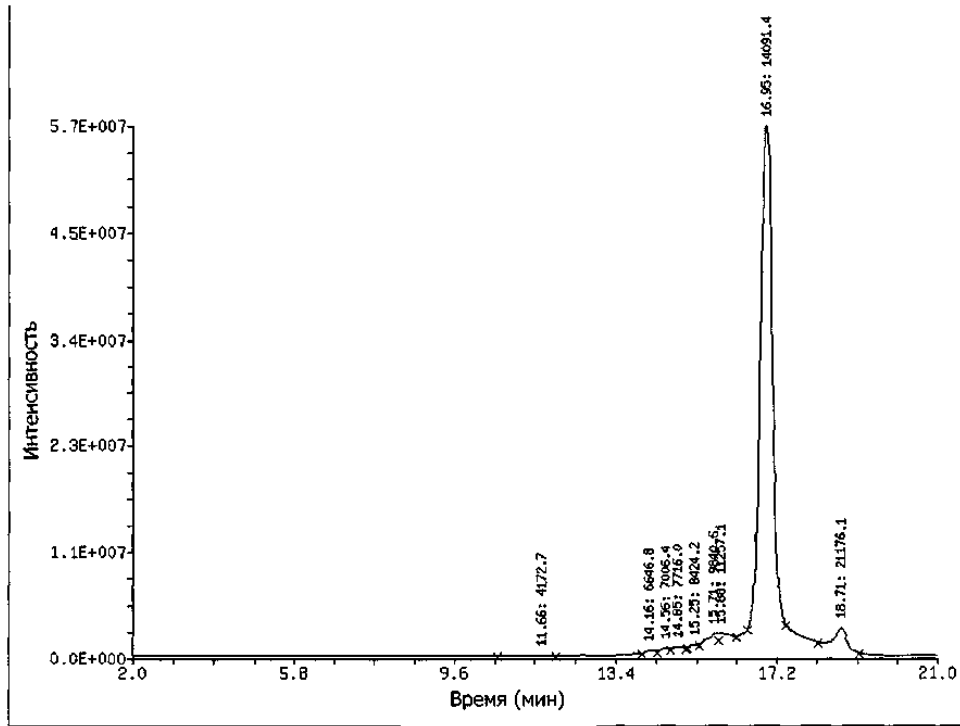
Фиг. 89



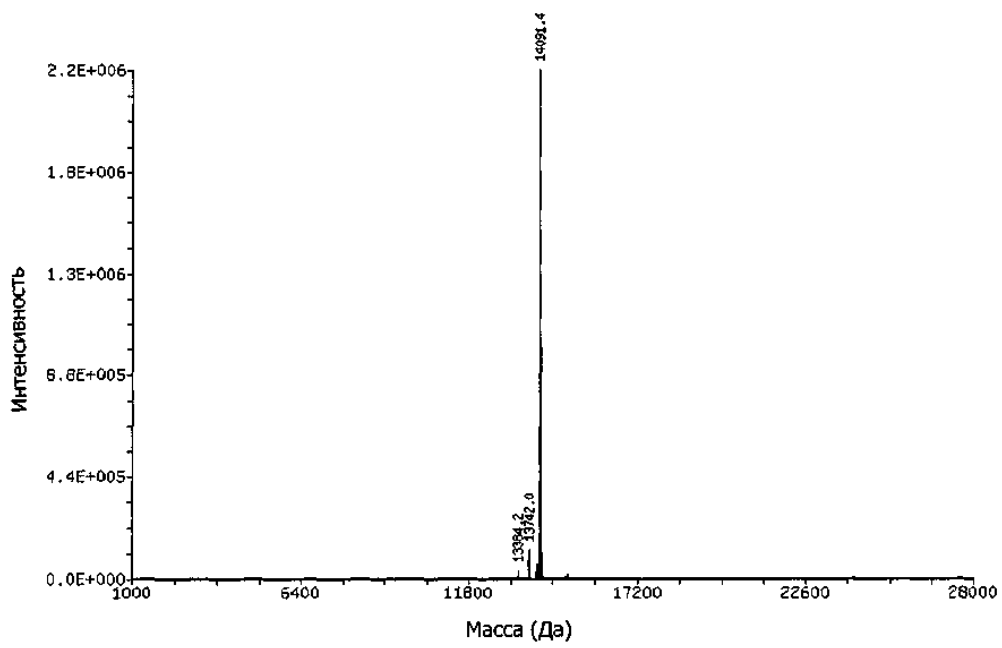
Фиг. 90



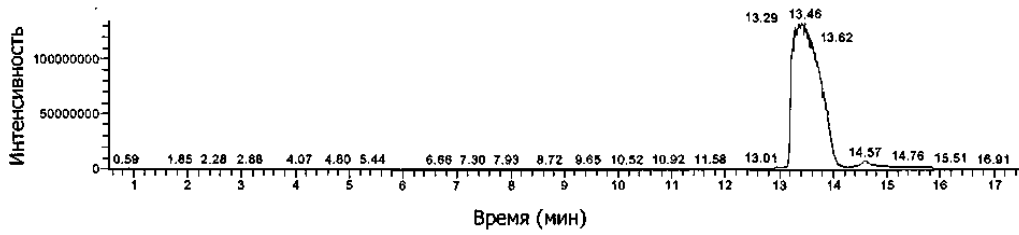
Фиг. 91



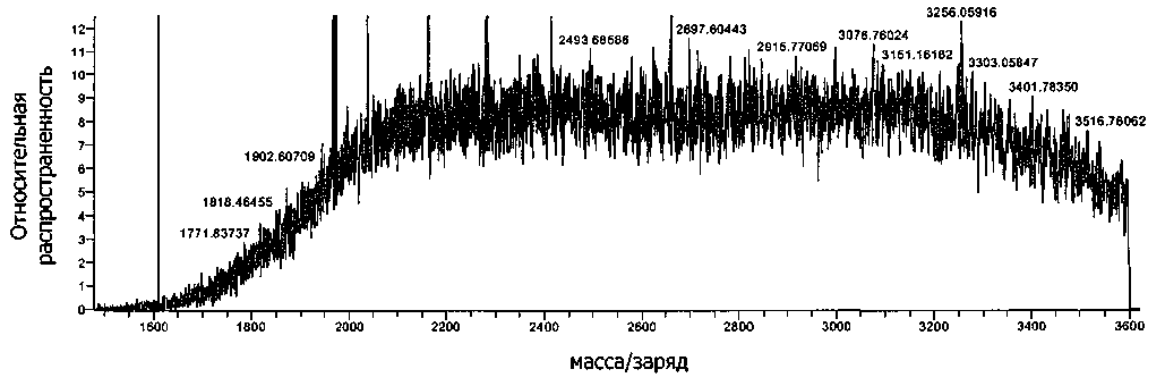
Фиг. 92



Фиг. 93



Фиг. 94



Фиг. 95