

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036496**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.11.17

(21) Номер заявки
201692204

(22) Дата подачи заявки
2015.05.01

(51) Int. Cl. **C12N 5/00** (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(54) КОНЬЮГИРОВАННЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ ДЛЯ МОДУЛИРОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ ФАКТОРА КОМПЛЕМЕНТА В

(31) **61/987,471; 62/076,273**

(32) **2014.05.01; 2014.11.06**

(33) **US**

(43) **2017.04.28**

(86) **PCT/US2015/028916**

(87) **WO 2015/168635 2015.11.05**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИОНИС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК.
(US)

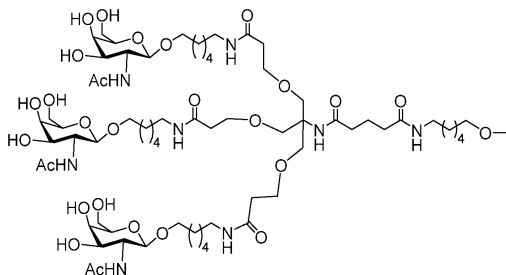
(72) Изобретатель:
Пракаш Тража П., Сэт Пунит П.,
Свэйз Эрик Э., Гроссмэн Тамар Р.,

Маккалеб Майкл Л., Ватт Эндрю Т.,
Фрэйер Сьюзан М. (US)

(74) Представитель:
Карпенко О.Ю., Лыу Т.Н., Угрюмов
В.М., Дементьев В.Н., Глухарёва
А.О., Клюкин В.А., Строкова О.В.,
Христофоров А.А. (RU)

(56) **US-A1-20100093085**
US-B2-7696344
US-A1-20020082227

(57) В вариантах реализации настоящего изобретения предложены способы, соединения и композиции для лечения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, посредством введения субъекту соединения, содержащего модифицированный олигонуклеотид и группу конъюгата, причем модифицированный олигонуклеотид состоит из 16-30 связанных нуклеозидов и имеет последовательность азотистых оснований, содержащую любую из SEQ ID NO: 440, 198, 228, 237, 444, 448, 450, 453, 455, 549 и 598, причем модифицированный олигонуклеотид имеет сегмент гэта, состоящий из связанных дезоксирибонуклеозидов; сегмент 5'-крыла, состоящий из связанных нуклеозидов; и сегмент 3'-крыла, состоящий из связанных нуклеозидов; при этом сегмент гэта расположен между сегментом 5'-крыла и сегментом 3'-крыла, и при этом каждый нуклеозид каждого сегмента крыла содержит модифицированный сахар, и при этом группа конъюгата содержит

**B1****036496****036496****B1**

Перечень последовательностей

Настоящее изобретение зарегистрировано вместе с перечнем последовательностей в электронном формате. Перечень последовательностей представлен в виде файла под названием BIOL0251WOSEQ_ST25.txt, созданного 28 апреля 2015 г., размером 204 Кб. Информация о перечне последовательностей в электронном формате в полном объеме включена в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники

В вариантах реализации настоящего изобретения предложены способы, соединения и композиции для лечения, предупреждения или облегчения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, посредством введения субъекту специфического ингибитора фактора комплемента В (CFB).

Уровень техники

Система комплемента представляет собой часть врожденной иммунной системы хозяина, участвующую в лизинге чужеродных клеток, усилении фагоцитоза антигенов, агрегации антиген-несущих агентов и привлечении макрофагов и нейтрофилов. Систему комплемента подразделяют на три пути инициации - классический, лектиновый и альтернативный пути - которые сходятся у компонента C3 с образованием ферментного комплекса, известного как C3-конвертаза, которая расщепляет C3 на C3a и C3b. C3b через CFB связывается с C3-конвертазой и приводит к образованию C5-конвертазы, которая расщепляет C5 на C5a и C5b, что инициирует мембраноатакующий каскад, приводящий к формированию мембраноатакующего комплекса (MAC), содержащего компоненты C5b, C6, C7, C8 и C9. Мембраноатакующий комплекс (MAC) образует трансмембранные каналы и разрушает двойной фосфолипидный слой клеток-мишеней, приводя к лизису клеток.

В гомеостатическом состоянии альтернативный путь непрерывно активируется на нижнем "холостом" уровне в результате активации альтернативного пути спонтанным гидролизом C3 и выработкой C3b, который образует C5-конвертазу.

Сущность изобретения

Система комплемента опосредует врожденный иммунитет и играет важную роль в нормальной воспалительной реакции на травму, но ее дисрегуляция может вызывать тяжелое повреждение. Активация альтернативного пути комплемента выше конститутивного "холостого" уровня может приводить к неограниченной гиперактивности и проявлению в форме заболеваний дисрегуляции комплемента.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к способам лечения, предупреждения или облегчения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, у субъекта посредством введения специфического ингибитора фактора комплемента В (CFB). Некоторые варианты реализации, предложенные в настоящем документе, относятся к способу ингибирования экспрессии CFB у субъекта, страдающего или имеющего риск возникновения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, посредством введения субъекту специфического ингибитора CFB. В некоторых вариантах реализации изобретения способ снижения или ингибирования накопления отложения C3 в глазу субъекта, страдающего или имеющего риск возникновения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, включает введение субъекту специфического ингибитора CFB. В некоторых вариантах реализации изобретения способ снижения или ингибирования накопления отложения C3 в почках субъекта, страдающего или имеющего риск возникновения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, включает введение субъекту специфического ингибитора CFB.

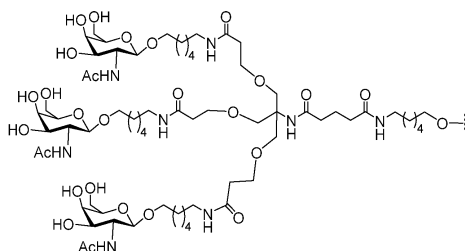
Одним из вариантов реализации изобретения является соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид и группу конъюгата, причем модифицированный олигонуклеотид состоит из 16-30 связанных нуклеозидов и имеет последовательность азотистых оснований, содержащую любую из SEQ ID NO: 440, 198, 228, 237, 444, 448, 450, 453, 455, 549 и 598, причем модифицированный олигонуклеотид имеет

сегмент гэта, состоящий из связанных дезоксирибонуклеозидов;

сегмент 5'-крыла, состоящий из связанных нуклеозидов; и

сегмент 3'-крыла, состоящий из связанных нуклеозидов;

при этом сегмент гэта расположен между сегментом 5'-крыла и сегментом 3'-крыла, и при этом каждый нуклеозид каждого сегмента крыла содержит модифицированный сахар, и при этом группа конъюгата содержит



Другой вариант реализации изобретения предусматривает, что модифицированный олигонуклеотид состоит из 20 связанных нуклеозидов и имеет последовательность азотистых оснований, состоящую из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 440, 198, 228, 237, 444, 448, 450, 453 или 455, при этом модифицированный олигонуклеотид имеет

сегмент гэта, состоящий из десяти связанных дезоксинуклеозидов; сегмент 5'-крыла, состоящий из пяти связанных нуклеозидов; и сегмент 3'-крыла, состоящий из пяти связанных нуклеозидов;

при этом сегмент гэта расположен между сегментом 5'-крыла и сегментом 3'-крыла, причем каждый нуклеозид каждого сегмента крыла содержит 2'-О-метоксиэтильный сахар; где каждая межнауклеозидная связь модифицированного олигонуклеотида представляет собой тиофосфатную связь, и где каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

Другой вариант реализации изобретения предусматривает, что модифицированный олигонуклеотид состоит из 16 связанных нуклеозидов и имеет последовательность азотистых оснований, состоящую из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 598, при этом модифицированный олигонуклеотид имеет

сегмент гэта, состоящий из десяти связанных дезоксинуклеозидов; сегмент 5'-крыла, состоящий из трех связанных нуклеозидов; и сегмент 3'-крыла, состоящий из трех связанных нуклеозидов;

при этом сегмент гэта расположен между сегментом 5'-крыла и сегментом 3'-крыла; где сегмент 5'-крыла содержит 2'-О-метоксиэтильный сахар, 2'-О-метоксиэтильный сахар и сахар со стерически затрудненным этилом в направлении от 5' к 3'; где сегмент 3'-крыла содержит сахар со стерически затрудненным этилом, сахар со стерически затрудненным этилом и 2'-О-метоксиэтильный сахар в направлении от 5' к 3'; где каждая межнауклеозидная связь модифицированного олигонуклеотида представляет собой тиофосфатную связь; и где каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

Другой вариант реализации изобретения предусматривает, что модифицированный олигонуклеотид состоит из 16 связанных нуклеозидов и имеет последовательность азотистых оснований, состоящую из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 549, где модифицированный олигонуклеотид имеет

сегмент гэта, состоящий из десяти связанных дезоксинуклеозидов;

сегмент 5'-крыла, состоящий из трех связанных нуклеозидов; и

сегмент 3'-крыла, состоящий из трех связанных нуклеозидов;

при этом сегмент гэта расположен между сегментом 5'-крыла и сегментом 3'-крыла; причем каждый нуклеозид каждого сегмента крыла содержит сахар со стерически затрудненным этилом; где каждая межнауклеозидная связь модифицированного олигонуклеотида представляет собой тиофосфатную связь; и где каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

Другой вариант реализации изобретения предусматривает, что модифицированный олигонуклеотид по меньшей мере на 80, 85, 90, 95 или на 100% комплементарен равной по длине части азотистых оснований SEQ ID NO: 1 или 2.

Другой вариант реализации изобретения предусматривает, что модифицированный олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну модифицированную межнауклеозидную связь или по меньшей мере одно модифицированное азотистое основание.

Другой вариант реализации изобретения предусматривает, что модифицированная межнауклеозидная связь представляет собой тиофосфатную межнауклеозидную связь.

Другой вариант реализации изобретения предусматривает, что модифицированный олигонуклеотид содержит:

- а) по меньшей мере 1 фосфодиэфирную межнауклеозидную связь;
- б) по меньшей мере 2 фосфодиэфирные межнауклеозидные связи;
- в) по меньшей мере 3 фосфодиэфирные межнауклеозидные связи;
- г) по меньшей мере 4 фосфодиэфирные межнауклеозидные связи;
- д) по меньшей мере 5 фосфодиэфирных межнауклеозидных связей;
- е) по меньшей мере 6 фосфодиэфирных межнауклеозидных связей или
- ж) по меньшей мере 7 фосфодиэфирных межнауклеозидных связей.

Другой вариант реализации изобретения предусматривает, что каждая межнауклеозидная связь модифицированного олигонуклеотида выбрана из фосфодиэфирной межнауклеозидной связи и тиофосфатной межнауклеозидной связи.

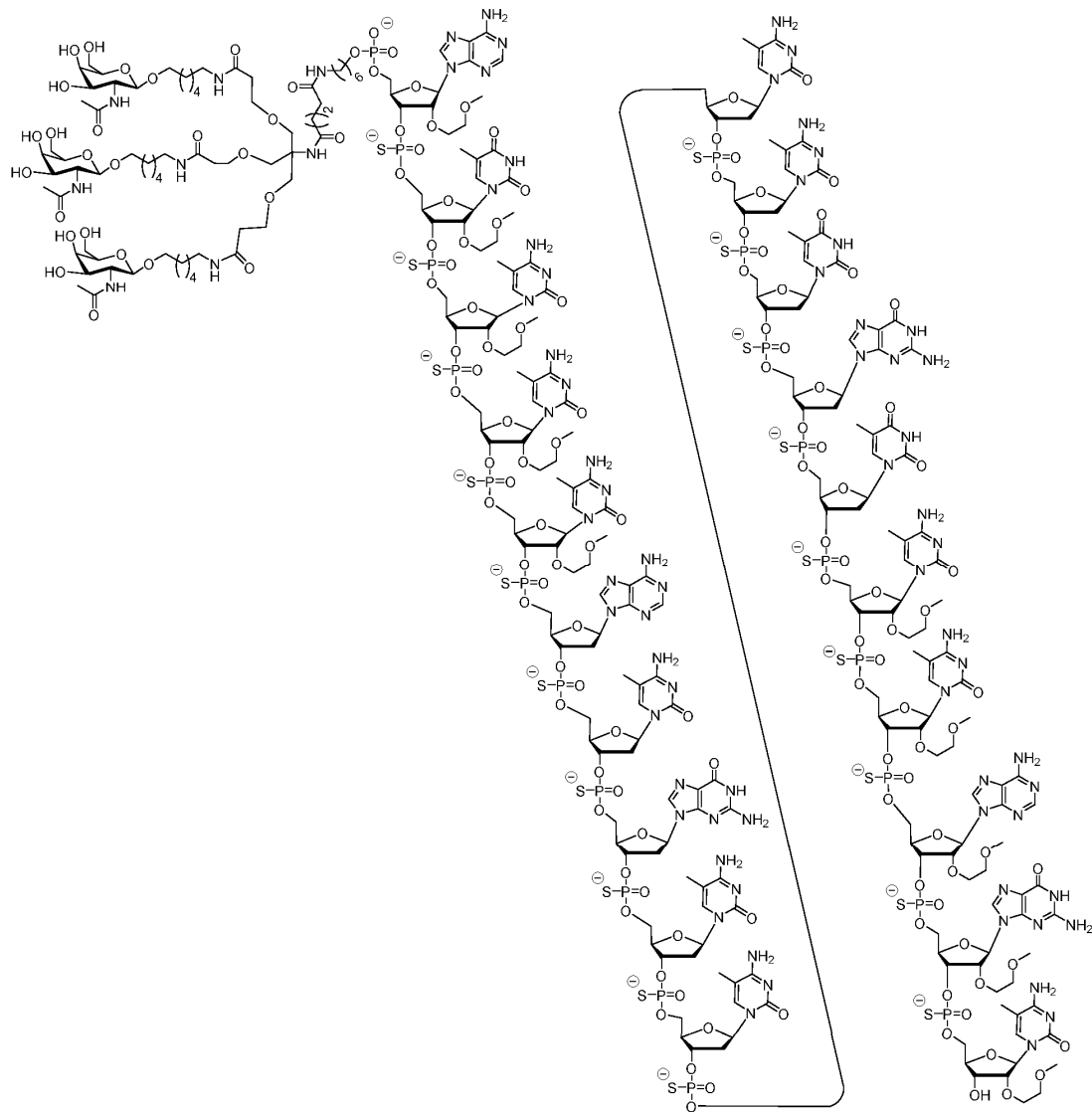
Другой вариант реализации изобретения предусматривает, что каждая межнауклеозидная связь модифицированного олигонуклеотида представляет собой тиофосфатную межнауклеозидную связь.

$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ и R^4 представляет собой H; либо R^3 и R^4 вместе образуют мостик, где R^3 представляет собой $-\text{O}-$, и R^4 представляет собой $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ или $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ и R^3 и R^4 напрямую связаны так, что полученный мостик выбран из $-\text{O}-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ и $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$;

и R^5 выбран из H и $-\text{CH}_3$;

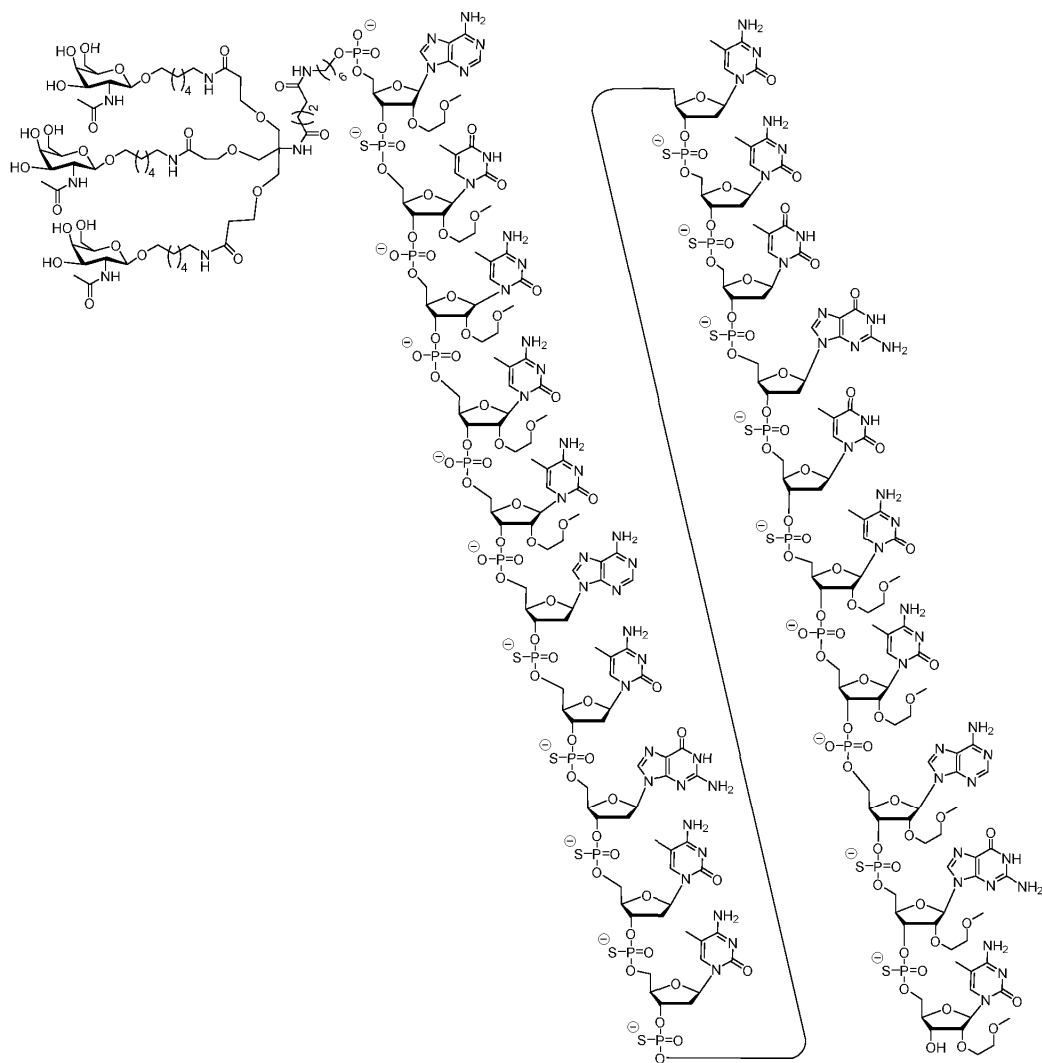
и Z выбран из S^- и O^- или его соль.

Другой вариант реализации изобретения предусматривает соединение, характеризующееся формулой



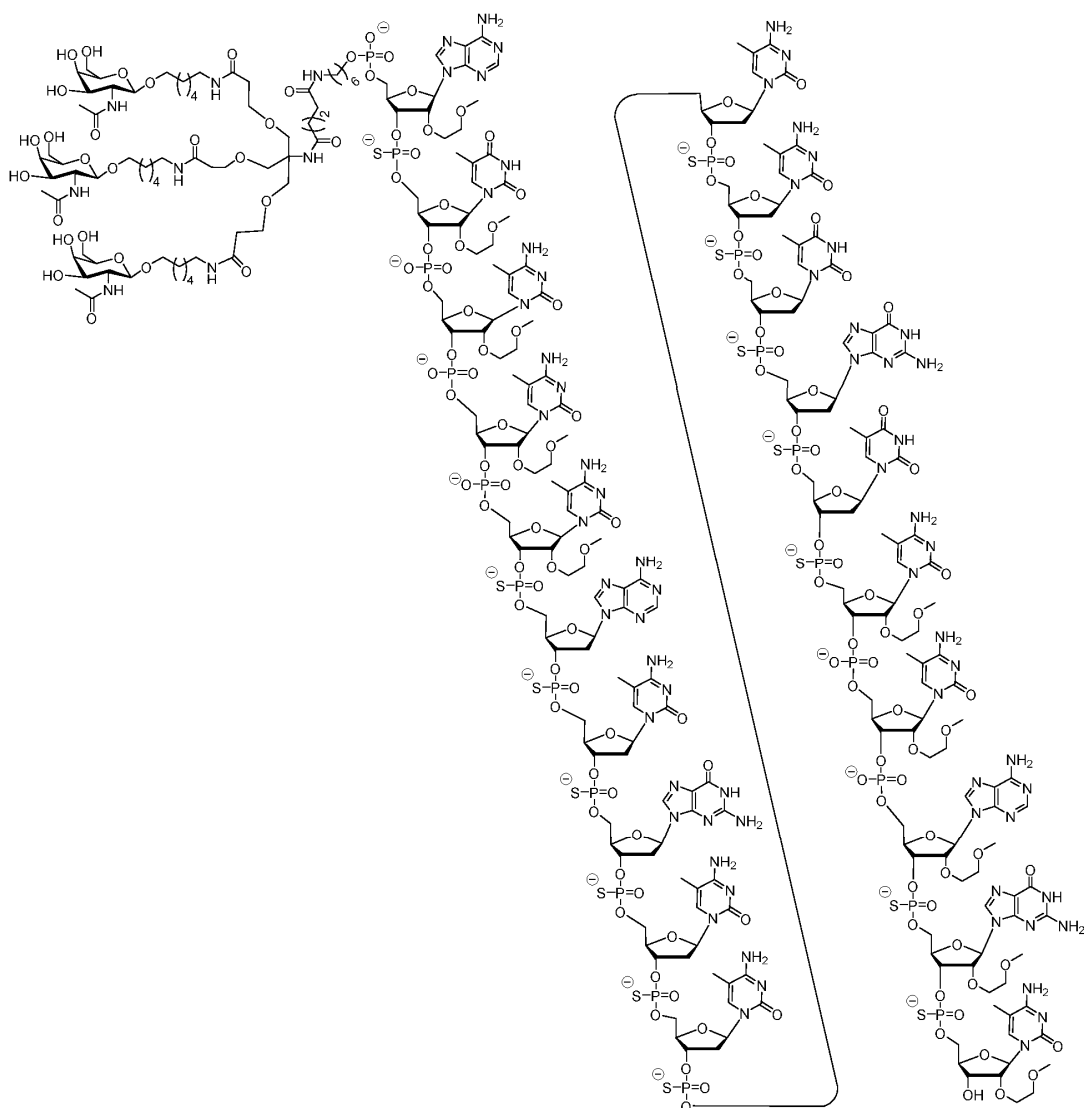
или его соль.

Другой вариант реализации изобретения предусматривает соединение, характеризующееся формулой



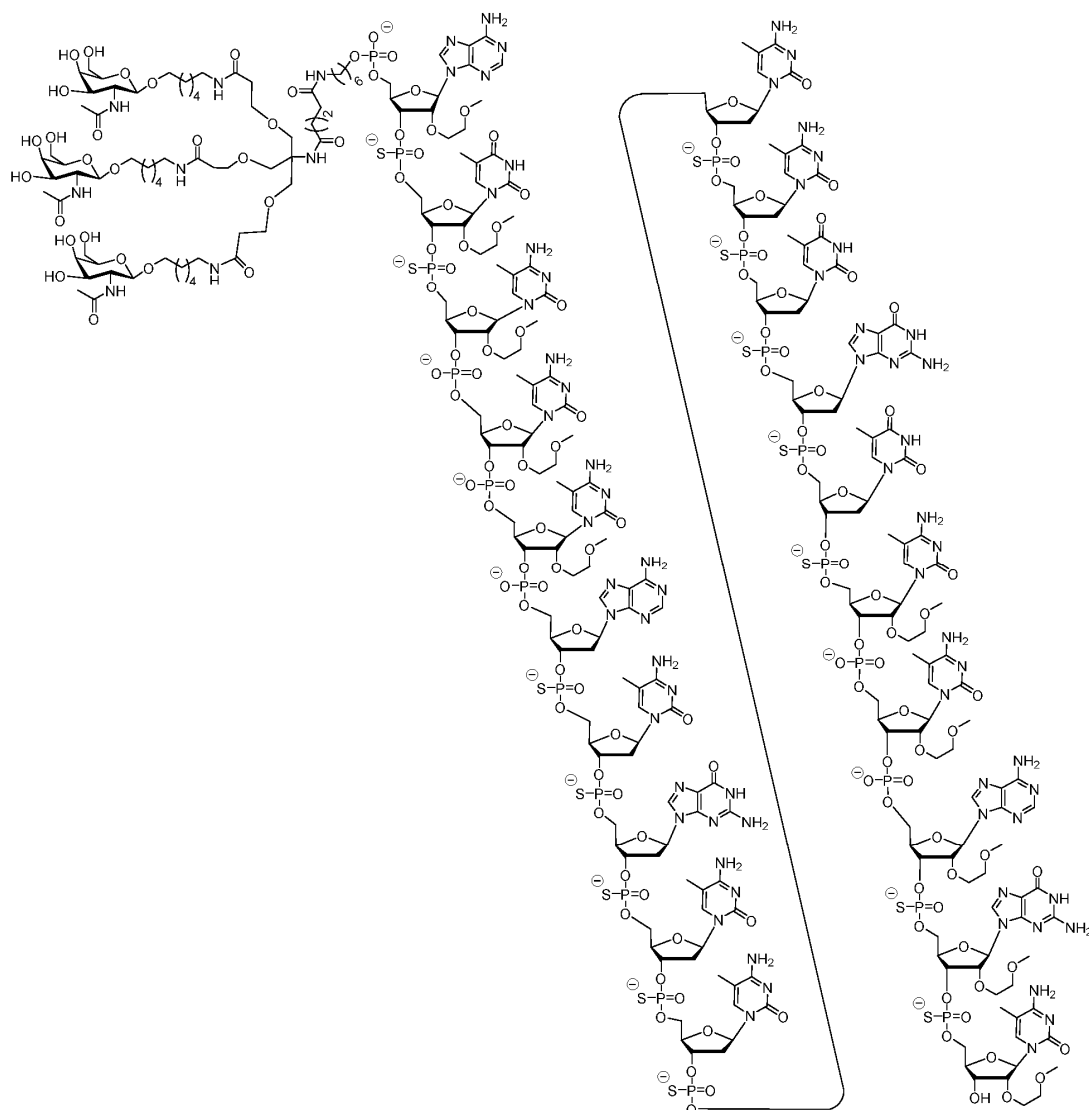
или его соль.

Другой вариант реализации изобретения предусматривает соединение, характеризующееся формулой



или его соль.

Другой вариант реализации изобретения предусматривает соединение, характеризующееся формулой



или его соль.

Другой вариант реализации изобретения относится к композиции для лечения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, содержащая указанное выше соединение или его соль и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Другой вариант реализации изобретения относится к способу лечения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, у субъекта, включающий введение субъекту указанного выше соединения, тем самым обеспечивая лечение заболевания.

Другой вариант реализации изобретения относится к способу лечения заболевания, представляющего собой дегенерацию желтого пятна, возрастную дегенерацию желтого пятна (AMD), влажную AMD, сухую AMD или географическую атрофию.

Другой вариант реализации изобретения относится к способу лечения заболевания, представляющего собой болезнь почек.

Другой вариант реализации изобретения относится к способу лечения, где болезнь почек представляет собой волчаночный нефрит, системную красную волчанку (SLE), болезнь плотного осадка (DDD), C3 гломерулонефрит (C3GN), CFHR5 нефропатию или атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS).

Другой вариант реализации изобретения относится к применению указанного выше соединения для лечения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента.

Другой вариант реализации изобретения относится к применению указанного выше соединения, где заболевание представляет собой дегенерацию желтого пятна, возрастную дегенерацию желтого пятна (AMD), влажную AMD, сухую AMD или географическую атрофию.

Другой вариант реализации изобретения относится к применению указанного выше соединения, где заболевание представляет собой болезнь почек.

Другой вариант реализации изобретения относится к применению указанного выше соединения, где болезнь почек представляет собой волчаночный нефрит, болезнь плотного осадка (DDD), С3 гломеруло-нефрит (С3GN), CFHR5 нефропатию или атипический гемолитико-уремический синдром (аHUS).

Другой вариант реализации изобретения относится к применению указанного выше соединения в производстве лекарственного средства для лечения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента.

Другой вариант реализации изобретения относится к применению указанного выше соединения, где заболевание представляет собой дегенерацию желтого пятна, возрастную дегенерацию желтого пятна (AMD), влажную AMD, сухую AMD или географическую атрофию.

Другой вариант реализации изобретения относится к применению указанного выше соединения, где заболевание представляет собой болезнь почек.

Другой вариант реализации изобретения относится к применению указанного выше соединения, где болезнь почек представляет собой волчаночный нефрит, болезнь плотного осадка (DDD), С3 гломеруло-нефрит (С3GN), CFHR5 нефропатию или атипический гемолитико-уремический синдром (аHUS).

Подробное описание изобретения

Следует понимать, что изложенное выше общее описание и следующее подробное описание являются лишь примерными и пояснительными, и не являются ограничивающими заявленное изобретение. В настоящем документе использование единственного числа включает множественное число, если специально не указано иное. При использовании в настоящем документе, термин "или" означает "и/или", если не указано иное. Кроме того, использование термина "включая", а также других форм, таких как "включает" и "включенный", не является ограничивающим. Также, такие термины как "элемент" или "компонент" охватывают как элементы и компоненты, содержащие одну единицу, так и элементы и компоненты, которые содержат более одной субъединицы, если специально не указано иное.

Названия разделов, используемые в настоящем документе, предназначены лишь для организационных целей, и их не следует толковать как ограничение описанного объекта изобретения. Все документы или части документов, цитируемые в настоящем изобретении, включая, но не ограничиваясь ими, патенты, патентные заявки, статьи, книги и трактаты, в явной форме включены в настоящий документ посредством ссылки в отношении частей документов, обсуждаемых в данном описании, а также в полном объеме.

При отсутствии конкретных определений, номенклатура, используемая в связи с ними, а также в связи с приемами и методиками аналитической химии, синтетической органической химии, а также медицинской и фармацевтической химии, описанная в настоящем документе, является общеизвестной и общепринятой в данной области техники. Для химического синтеза и химического анализа могут быть использованы стандартные методики. Некоторые такие методики и приемы представлены, например, в публикациях "Carbohydrate Modifications in Antisense Research" под редакцией Sangvi и Cook, American Chemical Society, федеральный округ Вашингтон, 1994; "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Истон, штат Пенсильвания, 21^е издание, 2005; и "Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications" под редакцией Stanley T. Crooke, CRC Press, Бока-Ратон, штат Флорида; а также в книге Sambrook et al., "Molecular Cloning, A laboratory Manual", 2^е издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, которые включены в настоящий документ посредством ссылки для всех целей. Если это допустимо, все патенты, заявки, опубликованные заявки и другие публикации, а также другие данные, упоминаемые в тексте настоящего описания, включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Если не указано иное, следующие термины имеют следующие значения:

"2'-F нуклеозид" относится к нуклеозиду, содержащему сахар, который содержит фтор в 2'-положении. Если не указано иное, то фтор в 2'-F нуклеозиде находится в рибо-положении (заменяя ОН природной рибозы).

"2'-О-метоксиэтил" (также 2'-МОЕ и 2'-O(CH₂)₂-OCH₃) относится к О-метоксиэтил модификации в 2' положении фуранозного кольца. 2'-О-метоксиэтил-модифицированный сахар представляет собой модифицированный сахар.

"2'-МОЕ нуклеозид" (также 2'-О-метоксиэтил-нуклеозид) означает нуклеозид, содержащий 2'-МОЕ модифицированный сахарный фрагмент.

"2'-замещенный нуклеозид" означает нуклеозид, содержащий заместитель в 2'-положении фуранозного кольца, отличный от Н или ОН. В некоторых вариантах реализации 2'-замещенные нуклеозиды включают нуклеозиды с бициклическими сахарными модификациями.

"3' Сайт-мишень" обозначает нуклеотид нуклеиновой кислоты-мишени, комплементарный 3'-крайнему нуклеотиду конкретного антисмыслового соединения.

"5' Сайт-мишень" обозначает нуклеотид нуклеиновой кислоты-мишени, комплементарный 5'-крайнему нуклеотиду конкретного антисмыслового соединения.

"5-метилцитозин" означает цитозин модифицированный метильной группой в 5 положении. 5-метилцитозин представляет собой модифицированное азотистое основание.

"Около" означает в пределах $\pm 10\%$ от значения. Например, если указано, что "соединения вызыва-

ют по меньшей мере около 70% ингибирования CFB", подразумевается, что уровни CFB ингибируются в пределах 60-80%.

"Вводить" или "введение" относится к способам введения субъекту антисмыслового соединения, предложенного в настоящем документе, для выполнения его предназначенной функции.

Пример способа введения, который может быть использован, включает, но не ограничивается им, парентеральное введение, такое как подкожная, внутривенная или внутримышечная инъекция или инфузия.

"Алкил" в данном контексте означает насыщенный прямой или разветвленный углеводородный радикал, содержащий до двадцати четырех атомов углерода. Примеры алкильных групп включают, без ограничения, метил, этил, пропил, бутил, изопропил, н-гексил, октил, децил, додецил и т.п. Алкильные группы обычно содержат от 1 до около 24 атомов углерода, более часто от 1 до около 12 атомов углерода (C_1 - C_{12} -алкил), более предпочтительно от 1 до около 6 атомов углерода.

В данном контексте "алкенил" означает прямой или разветвленный углеводородный радикал, содержащий до двадцати четырех атомов углерода и имеющий по меньшей мере одну двойную углерод-углеродную связь. Примеры алкенильных групп включают, без ограничения, этенил, пропенил, бутенил, 1-метил-2-бутен-1-ил, диены, такие как 1,3-бутадиен и т.п. Алкенильные группы обычно содержат от 2 до около 24 атомов углерода, более часто от 2 до около 12 атомов углерода, более предпочтительно от 2 до около 6 атомов углерода. Алкенильные группы, используемые в настоящем документе, могут необязательно содержать одну или более дополнительных групп заместителей.

В данном контексте "алкинил" означает прямой или разветвленный углеводородный радикал, содержащий до двадцати четырех атомов углерода и имеющий по меньшей мере одну тройную углерод-углеродную связь. Примеры алкинильных групп включают, без ограничения, этинил, 1-пропинил, 1-бутинил и т.п. Алкинильные группы обычно содержат от 2 до около 24 атомов углерода, более часто от 2 до около 12 атомов углерода, более предпочтительно от 2 до около 6 атомов углерода. Алкинильные группы, используемые в настоящем документе, могут необязательно содержать одну или более дополнительных групп заместителей.

В данном контексте "ацил" означает радикал, образованный за счет удаления гидроксильной группы от органической кислоты, и имеет общую формулу $-C(O)-X$, где X обычно является алифатическим, алициклическим или ароматическим. Примеры включают алифатические карбонилы, ароматические карбонилы, алифатические сульфонилы, ароматические сульфинилы, алифатические сульфинилы, ароматические фосфаты, алифатические фосфаты и т.п. Ацильные группы, используемые в настоящем документе, могут необязательно содержать дополнительные группы заместителей.

В данном контексте "алициклическая" означает циклическую кольцевую систему, в которой кольцо является алифатическим. Кольцевая система может содержать одно или более колец, при этом по меньшей мере одно кольцо является алифатическим. Предпочтительные алициклические системы включают кольца, имеющие от около 5 до около 9 атомов углерода в кольце. Алициклические группы, используемые в настоящем документе, могут необязательно содержать дополнительные группы заместителей.

В данном контексте "алифатический" означает прямой или разветвленный углеводородный радикал, содержащий до двадцати четырех атомов углерода, в котором насыщенность между любыми двумя атомами углерода представляет собой одинарную, двойную или тройную связь. Алифатическая группа предпочтительно содержит от 1 до около 24 атомов углерода, более часто от 1 до около 12 атомов углерода, более предпочтительно от 1 до около 6 атомов углерода. Прямая или разветвленная цепь алифатической группы может быть прервана одним или более гетероатомами, которые включают азот, кислород, серу и фосфор. Такие алифатические группы, прерванные гетероатомами, включают, без ограничения, полиалкокси, такие как полиалкиленгликоли, полиамины и полиимины. Алифатические группы, используемые в настоящем документе, могут необязательно содержать дополнительные группы заместителей.

В данном контексте "алкокси" означает радикал, образованный между алкильной группой и атомом кислорода, при этом атом кислорода используется для присоединения алкокси-группы к исходной молекуле. Примеры алкокси-групп включают, без ограничения, метокси, этокси, пропокси, изопропокси, н-бутокси, втор-бутокси, трет-бутокси, н-пентокси, неопентокси, н-гексокси и т.п. Алкокси-группы, используемые в настоящем документе, могут необязательно содержать дополнительные группы заместителей.

В данном контексте "аминоалкил" означает аминозамещенный C_1 - C_{12} -алкильный радикал. Алкильная часть указанного радикала образует ковалентную связь с исходной молекулой. Аминогруппа может быть расположена в любом положении, и аминоалкильная группа может быть замещена дополнительной группой заместителя в алкильной и/или амино-части.

В данном контексте "аралкил" и "арилалкил" означает ароматическую группу, которая ковалентно связана с C_1 - C_{12} -алкильным радикалом. Часть алкильного радикала образовавшейся аралкильной (или арилалкильной) группы образует ковалентную связь с исходной молекулой. Примеры включают, без ограничения, бензил, фенетил и т.п.

Аралкильные группы, используемые в настоящем документе, могут необязательно содержать дополнительные группы заместителей, присоединенные к алкильной, арильной или к обеим группам, кото-

рые образуют указанную радикальную группу.

В данном контексте "арил" и "ароматический" означают радикалы моно- или полициклической карбоциклической кольцевой системы, имеющие одно или более ароматических колец. Примеры арильных групп включают, без ограничения, фенил, нафтил, тетрагидронафтил, инданил, инденил и т.п. Предпочтительные арильные кольцевые системы имеют от около 5 до около 20 атомов углерода в одном или более кольцах. Арильные группы, используемые в настоящем документе, могут необязательно содержать дополнительные группы заместителей.

"Ослабление" относится к уменьшению по меньшей мере одного показателя, признака или симптома связанного заболевания, расстройства или патологического состояния. В некоторых вариантах реализации ослабление включает отсрочку или замедление развития одного или более показателей патологического состояния или заболевания. Степень тяжести показателей может быть определена субъективными или объективными показателями, которые известны специалистам в данной области техники.

"Животное" относится к человеку или животному, не являющемуся человеком, включающему, но не ограничивающемуся ими, мышей, крыс, кроликов, собак, кошек, свиней и приматов, включая, но не ограничиваясь ими, обезьян и шимпанзе.

"Антисмысловая активность" означает любую обнаруживаемую или поддающуюся измерению активность, обусловленную гибридизацией антисмыслового соединения с его нуклеиновой кислотой-мишенью. В некоторых вариантах реализации антисмысловая активность представляет собой уменьшение количества или экспрессии нуклеиновой кислоты-мишени или белка, кодируемого такой нуклеиновой кислотой-мишенью.

"Антисмысловое соединение" обозначает олигомерное соединение, которое способно к гибридизации с нуклеиновой кислотой-мишенью посредством водородной связи. Примеры антисмысловых соединений включают одноцепочечные и двухцепочечные соединения, такие как антисмысловые олигонуклеотиды, миРНК, мшРНК, оцРНК и соединения на их основе.

"Антисмысловое ингибирование" означает снижение уровней нуклеиновой кислоты-мишени в присутствии антисмыслового соединения, комплементарного нуклеиновой кислоте-мишени, по сравнению с уровнями нуклеиновой кислоты-мишени в отсутствие антисмыслового соединения.

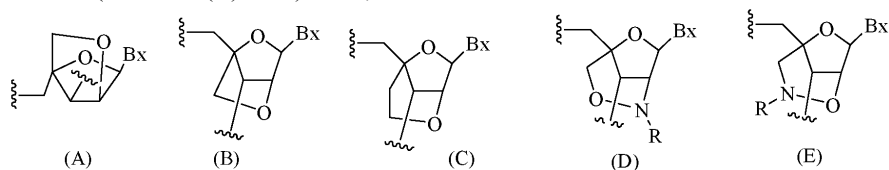
"Антисмысловые механизмы" представляют собой все механизмы, принимающие участие в гибридизации соединения с нуклеиновой кислотой-мишенью, причем результат или эффект гибридизации представляет собой разложение мишени или оккупацию мишени с сопутствующей остановкой клеточного аппарата, включая, например, транскрипцию или сплайсинг.

"Антисмысловой олигонуклеотид" означает одноцепочечный олигонуклеотид, имеющий последовательность азотистых оснований, обеспечивающую возможность гибридизации с соответствующей областью или сегментом нуклеиновой кислоты-мишени.

"Комплементарность основания" относится к способности спаривания конкретной пары азотистых оснований антисмыслового олигонуклеотида с соответствующими азотистыми основаниями в нуклеиновой кислоте-мишени (т.е. гибридизации), опосредованной уотсон-криковским, хугстиновским или обратным хугстиновским водородным связыванием между соответствующими азотистыми основаниями.

"Бициклический сахарный фрагмент" означает модифицированный сахарный фрагмент, содержащий 4-7-членное кольцо (включая, но не ограничиваясь им, фуранозил), содержащее мостик, связывающий два атома 4-7-членного кольца с образованием второго кольца, что приводит к получению бициклической структуры. В некоторых вариантах реализации 4-7-членное кольцо представляет собой сахарное кольцо. В некоторых вариантах реализации 4-7-членное кольцо представляет собой фуранозил. В некоторых таких вариантах реализации мостик соединяет 2'-углерод и 4'-углерод фуранозила.

"Бициклическая нуклеиновая кислота" или "БНК" или "БНК нуклеозид" означает, что мономеры нуклеиновой кислоты имеют мостик, соединяющий два атома углерода между 4' и 2' положениями нуклеозидной сахарной единицы, тем самым образуя бициклический сахар. Примеры такого бициклического сахара включают, но не ограничиваются ими, (A) α -L-метиленокси (4'-CH₂-O-2') LNA, (B) β -D-метиленокси (4'-CH₂-O-2') LNA, (C) этиленокси (4'-(CH₂)₂-O-2') LNA, (D) аминоокси (4'-CH₂-O-N(R)-2') LNA и (E) оксиамино (4'-CH₂-N(R)-O-2') LNA, как показано ниже.



В данном контексте соединения LNA включают, но не ограничиваются ими, соединения, имеющие по меньшей мере один мостик между 4' и 2' положениями сахара, причем каждый из мостиков независимо содержит 1 или от 2 до 4 связанных групп, независимо выбранных из $-[C(R_1)(R_2)]_n-$, $-C(R_1)=C(R_2)-$, $-C(R_1)=N-$, $-C(=NR_1)-$, $-C(=O)-$, $-C(=S)-$, $-O-$, $-Si(R_1)_2-$, $-S(=O)_x-$ и $-N(R_1)-$; где x равен 0, 1 или 2; n равен 1, 2, 3 или 4; каждый R₁ и R₂ независимо представляет собой H, защитную группу, гидроксил, C₁-C₁₂-алкил, замещенный C₁-C₁₂-алкил, C₂-C₁₂-алкенил, замещенный C₂-C₁₂-алкенил, C₂-C₁₂-алкинил, замещенный C₂-

C₁₂-алкинил, C₅-C₂₀-арил, замещенный C₅-C₂₀-арил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал, гетероарил, замещенный гетероарил, C₅-C₇-алициклический радикал, замещенный C₅-C₇-алициклический радикал, галоген, OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, COOJ₁, ацил (C(=O)-H), замещенный ацил, CN, сульфонил (S(=O)₂-J₁) или сульфоксил (S(=O)-J₁); и каждый J₁ и J₂ независимо представляет собой H, C₁-C₁₂-алкил, замещенный C₁-C₁₂-алкил, C₂-C₁₂-алкенил, замещенный C₂-C₁₂-алкенил, C₂-C₁₂-алкинил, замещенный C₂-C₁₂-алкинил, C₅-C₂₀-арил, замещенный C₅-C₂₀-арил, ацил (C(=O)-H), замещенный ацил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал, C₁-C₁₂-аминоалкил, замещенный C₁-C₁₂-аминоалкил или защитную группу.

Примеры 4'-2' мостиковых групп, входящих в определение LNA, включают, но не ограничиваются ими, одну из формул: $-[C(R_1)(R_2)]_n-$, $-[C(R_1)(R_2)]_n-O-$, $-C(R_1R_2)-N(R_1)-O-$ или $-C(R_1R_2)-O-N(R_1)-$. Кроме того, другие мостиковые группы, входящие в определение LNA, представляют собой мостики 4'-CH₂-2', 4'-(CH₂)₂-2', 4'-(CH₂)₃-2', 4'-CH₂-O-2', 4'-(CH₂)₂-O-2', 4'-CH₂-O-N(R₁)-2' и 4'-CH₂-N(R₁)-O-2', где каждый R₁ и R₂ независимо представляет собой H, защитную группу или C₁-C₁₂-алкил.

Также в определение LNA согласно настоящему изобретению включены LNA, в которых 2'-гидроксильная группа рибозильного сахарного кольца соединена с 4' атомом углерода сахарного кольца, с образованием таким образом мостика метиленокси (4'-CH₂-O-2'), формируя бициклический сахарный фрагмент. Мостик также может быть метиленовой группой (-CH₂-), соединяющей атом кислорода 2' и атом углерода 4', для которой используется термин метиленокси (4'-CH₂-O-2') LNA. Кроме того, в случае бициклического сахарного фрагмента, содержащего этиленовую мостиковую группу в данном положении, применяется термин этиленокси (4'-CH₂CH₂-O-2') LNA. α-L-метиленокси (4'-CH₂-O-2'), изомер метиленокси (4'-CH₂-O-2') LNA, также попадает под определение LNA в данном контексте.

"Кэп-структура" или "кэп-терминальный фрагмент" означает химические модификации, которые были сделаны у любого конца антисмыслового соединения.

"Углевод" означает природный углевод, модифицированный углевод или производное углевода.

"Углеводный кластер" означает соединение, имеющее один или более углеводных остатков, присоединенных к скелету или линкерной группе, (см., например, Maier et al., "Synthesis of Antisense Oligonucleotides Conjugated to a Multivalent Carbohydrate Cluster for Cellular Targeting", Bioconjugate Chemistry, 2003, (14): 18-29, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки, или Rensen et al., "Design and Synthesis of Novel N-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoproteins to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor", J. Med. Chem. 2004, (47): 5798-5808, где представлены примеры углеводных сопряженных кластеров).

"Производное углевода" означает любое соединение, которое может быть синтезировано с использованием углевода в качестве исходного материала или промежуточного соединения.

"сEt" или "стерически затрудненный этил" означает бициклический сахарный фрагмент, содержащий мостик, соединяющий 4'-углерод и 2'-углерод, причем мостик имеет формулу: 4'-CH(CH₃)-O-2'.

"Химическая модификация" означает химическое отличие в соединении, по сравнению с природным аналогом. Химические модификации олигонуклеотидов включают нуклеозидные модификации (включая модификации сахарного фрагмента и модификации азотистого основания) и модификации межнуклеозидных линкеров. В отношении олигонуклеотида химическая модификация включает не только отличия в последовательности азотистых оснований.

"Расщепляемая связь" означает любую химическую связь, которая может быть расщеплена. В некоторых вариантах реализации расщепляемая связь выбрана из: амида, полиамида, сложного эфира, эфира, одного или обоих сложных эфиров фосфодиэфира, фосфатного сложного эфира, карбамата, дисульфида или пептида.

"Расщепляемый фрагмент" означает связь или группу, которая может быть расщеплена при физиологических условиях. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент расщепляется внутри клетки или во внутриклеточных отделах, таких как лизосома. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент расщепляется эндогенными ферментами, такими как нуклеазы. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент содержит группу атомов, имеющую один, два, три, четыре или более четырех расщепляемых связей.

"Конъюгат" или "группа конъюгата" означает атом или группу атомов, связанную с олигонуклеотидом или олигомерным соединением. Как правило, группы конъюгата модифицируют одно или более свойств соединения, к которому они присоединены, включая, но не ограничиваясь ими, свойства фармакодинамики, фармакокинетики, связывания, поглощения, клеточного распределения, клеточного захвата, заряда и/или выведения.

"Линкер конъюгата" или "линкер" к контексте группы конъюгата означает часть группы конъюгата, содержащую любой атом или группу атомов и ковалентно связывающую (1) олигонуклеотид с другой частью группы конъюгата или (2) две или более частей группы конъюгата.

Группы конъюгата представлены в настоящем документе как радикалы, обеспечивающие связь для образования ковалентного присоединения к олигомерному соединению, такому как антисмысловый олигонуклеотид. В некоторых вариантах реализации точка присоединения в олигомерном соединении представляет собой 3'-атом кислорода 3'-гидроксильной группы 3'-концевого нуклеозида олигомерного со-

единения. В некоторых вариантах реализации точка присоединения у олигомерного соединения представляет собой 5'-атом кислорода 5'-гидроксильной группы 5'-концевого нуклеозида олигомерного соединения. В некоторых вариантах реализации связь для образования присоединения к олигомерному соединению представляет собой расщепляемую связь. В некоторых таких вариантах реализации такая расщепляемая связь составляет весь или часть расщепляемого фрагмента.

В некоторых вариантах реализации группы конъюгата содержат расщепляемый фрагмент (например, расщепляемую связь или расщепляемый нуклеозид) и часть углеводного кластера, такую как часть кластера GalNAc. Такая часть углеводного кластера содержит: нацеливающий фрагмент и необязательно линкер конъюгата. В некоторых вариантах реализации часть углеводного кластера определяют по количеству и сущности лиганда. Например, в некоторых вариантах реализации часть углеводного кластера содержит 3 группы GalNAc и обозначена "GalNAc3". В некоторых вариантах реализации часть углеводного кластера содержит 4 группы GalNAc и обозначена "GalNAc4". Конкретные части углеводных кластеров (имеющие конкретную связку, группы ветвления и линкера конъюгата) описаны в настоящем документе и обозначены римской цифрой с последующим нижним индексом "а". Соответственно, "GalNAc3-1a" относится к конкретной части углеводного кластера конъюгата, имеющей 3 группы GalNAc и конкретно определенную связку, группы ветвления и линкера. Такой фрагмент углеводного кластера присоединен к олигомерному соединению через расщепляемый фрагмент, такой как расщепляемая связь или расщепляемый нуклеозид.

"Сопряженное соединение" означает любые атомы, группы атомов или группу связанных атомов, подходящую для применения в качестве группы конъюгата. В некоторых вариантах реализации сопряженные соединения могут обладать или влиять на одно или более свойств, включая, но не ограничиваясь ими, свойства фармакодинамики, фармакокинетики, связывания, абсорбции, клеточного распределения, клеточного захвата, заряда и/или выведения.

"Нуклеозид со стерически затрудненным этилом" (также cEt нуклеозид) означает нуклеозид, содержащий бициклический сахарный фрагмент, содержащий 4'-CH(CH₃)-O-2' мостик.

"Фактор комплемента В (CFB)" означает любую нуклеиновую кислоту или белок CFB. "Нуклеиновая кислота CFB" означает любую нуклеиновую кислоту, кодирующую CFB. Например, в некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота CFB включает последовательность ДНК, кодирующую CFB, последовательность РНК, транскрибированную из ДНК, кодирующей CFB (включая геномную ДНК, содержащую интроны и экзоны), включая не кодирующую белок (т.е. не кодирующую) последовательность РНК, и последовательность мРНК, кодирующую CFB. "мРНК CFB" означает мРНК, кодирующую белок CFB.

"Специфический ингибитор CFB" относится к любому агенту, способному специфически ингибировать экспрессию РНК CFB и/или белка CFB или активность на молекулярном уровне. Например, CFB-специфические ингибиторы включают нуклеиновые кислоты (включая антисмысловые соединения), пептиды, антитела, низкомолекулярные соединения и другие агенты, способные ингибировать экспрессию РНК CFB и/или белка CFB.

"Химически различимый участок" относится к участку антисмыслового соединения, который в некотором роде химически отличается от другого участка того же антисмыслового соединения. Например, участок, содержащий 2'-О-метоксиэтиловые нуклеозиды, является химически отличным от участка, содержащего нуклеозиды без 2'-О-метоксиэтиловых модификаций.

"Химерное антисмысловое соединение" означает антисмысловое соединение, которое имеет по меньшей мере 2 химически различных участка, каждая позиция имеет множество субъединиц.

"Комплементарность" означает способность спаривания азотистых оснований первой и второй нуклеиновых кислот.

"Включать", "включает" и "включающий" следует понимать как обозначение включения указанной стадии или элемента, или группы элементов или стадий, но не исключения любого другого элемента или стадии, или группы стадий или элементов.

"Непрерывные азотистые основания" означают азотистые основания, непосредственно примыкающие друг к другу.

"Дезоксинуклеозид" означает нуклеозид, содержащий 2'-Н фуранозильный сахарный фрагмент, находящийся в природных дезоксирибонуклеозидах (ДНК). В некоторых вариантах реализации 2'-дезоксинуклеозид может содержать модифицированное азотистое основание или может содержать азотистое основание РНК (например, урацил).

"Дезоксирибонуклеотид" означает нуклеотид, имеющий водород в 2' положении сахарной части нуклеотида. Дезоксирибонуклеотиды могут быть модифицированы с помощью любого из множества заместителей.

"Конструирование" или "разработка" относится к процессу конструирования олигомерного соединения, которое специфически гибридизуется с выбранной молекулой нуклеиновой кислоты.

"По-разному модифицированные" означает химические модификации или химические заместители, которые отличны друг от друга, включая отсутствие модификаций. Так, например, МОЕ нуклеозид и немодифицированный нуклеозид ДНК являются "по-разному модифицированными", даже несмотря на

то, что нуклеозид ДНК не является модифицированным. Точно так же, ДНК и РНК являются "по-разному модифицированными", даже несмотря на то, что оба представляют собой природные не модифицированные нуклеозиды. Нуклеозиды, которые являются одинаковыми, но содержат различные азотистые основания, не являются по-разному модифицированными. Например, нуклеозид, содержащий 2'-ОМе модифицированный сахар и немодифицированное азотистое основание аденин, и нуклеозид, содержащий 2'-ОМе модифицированный сахар и немодифицированное азотистое основание тимин, не являются по-разному модифицированными.

"Двухцепочечные" относится к двум отдельным олигомерным соединениям, которые гибридизованы друг с другом. Такие двухцепочечные соединения могут иметь один или более негибридизованных нуклеозидов у одного или обоих концов одной или обеих цепей (выступы) и/или один или более внутренних негибридизованных нуклеозидов (несоответствий), при условии, что существует достаточная комплементарность для сохранения гибридизации при физиологически релевантных условиях.

"Эффективное количество" означает количество активного фармацевтического агента, достаточное для достижения желаемого физиологического результата у индивидуума, нуждающегося в таком агенте. Эффективное количество может варьировать среди индивидуумов в зависимости от здоровья и физического состояния индивидуума, подлежащего лечению, таксономической группы индивидуумов, подлежащих лечению, рецептуры композиции, оценки индивидуального состояния здоровья и других релевантных факторов.

"Эффективность" означает способность производить желаемый эффект.

"Экспрессия" включает в себя все функции, благодаря которым информация, закодированная в гене, преобразуется в структуры, присутствующие и функционирующие в клетке. Такие структуры включают, но не ограничиваются ими, продукты транскрипции и трансляции.

"Полностью комплементарный" или "100% комплементарный" означает, что каждое азотистое основание первой нуклеиновой кислоты имеет комплементарное азотистое основание во второй нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах реализации первая нуклеиновая кислота представляет собой антисмысловое соединение, а нуклеиновая кислота-мишень представляет собой вторую нуклеиновую кислоту.

"Фуранозил" означает структуру, содержащую 5-членное кольцо, содержащее четыре атома углерода и один атом кислорода.

"Гэпмер" означает химерное антисмысловое соединение, в котором внутренний участок, имеющий множество нуклеозидов, которые поддерживают расщепление РНКазой H, располагается между внешними участками, имеющими один или несколько нуклеозидов, причем нуклеозиды, составляющие внутренние участки, химически отличаются от нуклеозида или нуклеозидов, составляющих внешние участки. Внутренний участок может быть описан как "гэп", а внешние участки могут быть описаны как "крылья".

"Гало" и "галоген" означают атом, выбранный из фтора, хлора, брома и йода.

"Гетероарил" и "гетероароматический" означают радикал, содержащий моно- или полициклическое ароматическое кольцо, кольцевую систему или конденсированную кольцевую систему, в которой по меньшей мере одно из колец является ароматическим и содержит один или более гетероатомов. Гетероарил включает также конденсированные кольцевые системы, включая системы, в которых одно или более из конденсированных колец не содержат гетероатомов. Гетероарильные группы, как правило, содержат один кольцевой атом, выбранный из серы, азота или кислорода. Примеры гетероарильных групп включают, без ограничения, пиридинил, пирозинил, пиримидинил, пирролил, пирозол, имидазол, тиазол, оксазол, изоксазол, тиадиазол, оксадиазол, тиофенил, фуранил, хинолинил, изохинолинил, бензимидазол, бензоксазол, хиноксалинил и т.п. Гетероарильные радикалы могут быть присоединены к исходной молекуле напрямую или через линкерный фрагмент, такой как алифатическая группа или гетероатом. Гетероарильные группы, используемые в настоящем документе, могут необязательно содержать дополнительные группы заместителей.

"Гибридизация" означает соединение комплементарных молекул нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах реализации комплементарные молекулы нуклеиновых кислот включают, но не ограничиваются ими, антисмысловые соединения и нуклеиновую кислоту-мишень. В некоторых вариантах реализации комплементарные молекулы нуклеиновых кислот включают, но не ограничиваются ими, антисмысловой олигонуклеотид и нуклеиновую кислоту-мишень.

"Идентификация животного, страдающего или имеющего риск возникновения заболевания, расстройства и/или патологического состояния" обозначает идентификацию животного, которому поставлен диагноз заболевания, расстройства и/или патологического состояния, или идентификацию животного, предрасположенного к развитию заболевания, расстройства и/или патологического состояния. Такая идентификация может быть выполнена любым способом, включая оценку истории болезни индивидуума и стандартные клинические испытания или оценки.

"Непосредственно примыкающий" означает, что нет никаких промежуточных элементов между непосредственно примыкающими элементами.

"Индивидуум" означает человека или животное, не являющееся человеком, выбранное для лечения или терапии.

"Ингибирование экспрессии или активности" означает снижение, блокаду экспрессии или активности и не обязательно говорит о полном прекращении экспрессии или активности.

"Межнуклеозидная связь" относится к химической связи между нуклеозидами.

"Межнуклеозидная нейтральная линкерная группа" означает нейтральную линкерную группу, которая напрямую связывает два нуклеозида.

"Межнуклеозидная фосфорная линкерная группа" означает фосфорную линкерную группу, которая напрямую связывает два нуклеозида.

"Удлиненные" антисмысловые олигонуклеотиды представляют собой олигонуклеотиды, которые имеют один или более дополнительных нуклеозидов, по сравнению с антисмысловым олигонуклеотидом, описанным в настоящем документе.

"Линкерный мотив" означает характерный участок линкерных модификаций в олигонуклеотиде или его области. Нуклеозиды такого олигонуклеотида могут быть модифицированными или немодифицированными. Если не указано иное, мотивы, описывающие в настоящем документе только линкеры, представляют собой линкерные мотивы. Следовательно, в таких случаях нуклеозиды не ограничены.

"Связанный дезоксирибозид" означает основание нуклеиновой кислоты (A, G, C, T, U), замещенное дезоксирибозой, связанной фосфатным эфиром, с образованием нуклеотида.

"Связанные нуклеозиды" означают соседние нуклеозиды, связанные между собой межнуклеозидной связью.

"Нуклеозид закрытой нуклеиновой кислоты" или "LNA" означает нуклеозид, содержащий бициклический сахарный фрагмент, который содержит мостик 4'-CH₂-O-2'.

"Несоответствие" или "некомплементарное азотистое основание" относится к случаю, когда азотистое основание первой нуклеиновой кислоты не способно связываться с соответствующим азотистым основанием второй или нуклеиновой кислоты-мишени.

"Модифицированная межнуклеозидная связь" обозначает замену или любое изменение природной межнуклеозидной связи (т.е. фосфодиэфирной межнуклеозидной связи).

"Модифицированное азотистое основание" означает любое азотистое основание, отличное от аденина, цитозина, гуанина, тимидина или урацила. "Немодифицированное азотистое основание" означает пуриновые основания: аденин (A) и гуанин (G), и пиримидиновые основания: тимин (T), цитозин (C), и урацил (U).

"Модифицированный нуклеозид" обозначает нуклеозид, содержащий независимо модифицированный сахарный фрагмент и/или модифицированное азотистое основание.

"Модифицированный нуклеотид" означает нуклеотид, содержащий независимо модифицированный сахарный фрагмент, модифицированную межнуклеозидную связь или модифицированное азотистое основание.

"Модифицированный олигонуклеотид" обозначает олигонуклеотид, содержащий по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь, модифицированный сахар, и/или модифицированное азотистое основание.

"Модифицированный сахар" означает замещение и/или измену любого из природных сахарных фрагментов.

"Модулирование" относится к изменению или регулированию характеристики в клетке, ткани, органе или организме. Например, модулирование мРНК CFB может означать увеличение или снижение уровня мРНК CFB и/или белка CFB в клетке, ткани, органе или организме. "Модулятор" вызывает изменение в клетке, ткани, органе или организме. Например, антисмысловое соединение CFB может представлять собой модулятор, который снижает количество мРНК CFB и/или белка CFB в клетке, ткани, органе или организме.

"Мономер" означает одно звено олигомера. Мономеры включают, но не ограничиваются ими, нуклеозиды и нуклеотиды, природные или модифицированные.

"Моно- или полициклическая кольцевая система" включает все кольцевые системы, выбранные из одиночных или полициклических радикальных кольцевых систем, в которых указанные кольца конденсированы или связаны, и включает одиночные или смешанные кольцевые системы, индивидуально выбранные из алифатических, алициклических, арильных, гетероарильных, аралкильных, арилалкильных, гетероциклических, гетероарильных, гетероароматических и гетероарилалкильных. Такие моно- и полициклические структуры могут содержать кольца, каждое из которых имеет одинаковую степень насыщенности, или каждое независимо имеет переменные степени насыщенности, включая полностью насыщенные, частично насыщенные или полностью ненасыщенные. Каждое кольцо может содержать кольцевые атомы, выбранные из C, N, O и S с образованием гетероциклических колец, а также колец, содержащих только кольцевые атомы C, которые могут быть представлены в смешанном мотиве, как, например, в бензимидазоле, в котором одно кольцо имеет только кольцевые атомы углерода, а конденсированное кольцо имеет два атома азота. Моно- или полициклическая кольцевая система может быть дополнительно замещена группами заместителей, как, например, фталимид, который имеет две группы =O, присоединенные к одному из колец. Моно- или полициклические кольцевые системы могут быть присоединены к исходным молекулам при помощи различных способов, таких как непосредственно через кольцевой

атом, путем конденсации через несколько кольцевых атомов, через группу заместителя или через бифункциональный линкерный фрагмент.

"Мотив" означает конфигурацию из немодифицированных и модифицированных нуклеозидов в антисмысловом соединении.

"Природный сахарный фрагмент" означает фрагмент сахара, находящийся в ДНК (2'-H) или РНК (2'-ОН).

"Природная межнуклеозидная связь" означает 3' к 5' фосфодиэфирную связь.

"Нейтральная линкерная группа" означает линкерную группу, которая не имеет заряда. Нейтральные линкерные группы включают, без ограничения, фосфотриэфиры, метилфосфонаты, MMI (-CH₂-N(CH₃)-O-), амид-3 (-CH₂-C(=O)-N(H)-), амид-4 (-CH₂-N(H)-C(=O)-), формацеталь (-O-CH₂-O-) и тиоформацеталь (-S-CH₂-O-). Дополнительные нейтральные группы включают неионные линкеры, содержащие силоксан (диалкилсилоксан), карбоксилатный эфир, карбоксамид, сульфид, сульфонатный эфир и амиды (см., например: Carbohydrate Modifications in Antisense Research; Y.S. Sanghvi and P.D. Cook Eds. ACS Symposium Series 580; главы 3 и 4, (сс. 40-65)). Дополнительные нейтральные линкерные группы включают неионные линкеры, содержащие смешанные составные части N, O, S и CH₂.

"Некомплементарное азотистое основание" относится к паре азотистых оснований нуклеиновых кислот, которые не образуют водородных связей друг с другом или иным образом не поддерживают гибридизацию.

"Немежнуклеозидная нейтральная линкерная группа" означает нейтральную линкерную группу, которая не связывает напрямую два нуклеозида. В некоторых вариантах реализации немежнуклеозидная нейтральная линкерная группа связывает нуклеозид с группой, отличной от нуклеозида. В некоторых вариантах реализации немежнуклеозидная нейтральная линкерная группа связывает две группы, ни одна из которых не является нуклеозидом.

"Немежнуклеозидная фосфорная линкерная группа" означает фосфорную линкерную группу, которая не связывает напрямую два нуклеозида. В некоторых вариантах реализации немежнуклеозидная фосфорная линкерная группа связывает нуклеозид с группой, отличной от нуклеозида. В некоторых вариантах реализации немежнуклеозидная фосфорная линкерная группа связывает две группы, ни одна из которых не является нуклеозидом.

"Нуклеиновая кислота" означает молекулы, состоящие из мономерных нуклеотидов. Нуклеиновая кислота включает, но не ограничивается ими, рибонуклеиновые кислоты (РНК), дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК), одноцепочечные нуклеиновые кислоты их двуцепочечные нуклеиновые кислоты.

"Азотистое основание" означает гетероциклический фрагмент, способный спариваться с основанием другой нуклеиновой кислоты.

"Комплементарность азотистого основания" относится к азотистому основанию, способному к спариванию с другим основанием. Например, в ДНК аденин (А) комплементарен тимину (Т). Например, в РНК аденин (А) комплементарен урацилу (У). В некоторых вариантах реализации комплементарное азотистое основание относится к азотистому основанию антисмыслового соединения, способному спариваться с азотистым основанием своей нуклеиновой кислоты-мишени. Например, если азотистое основание в определенном положении антисмыслового соединения способно к водородному связыванию с азотистым основанием в определенном положении нуклеиновой кислоты-мишени, то это положение водородного связывания между олигонуклеотидом и нуклеиновой кислотой-мишенью считается комплементарным по этой паре азотистых оснований.

"Мотив модификации азотистого основания" означает характерный участок модификаций азотистых оснований вдоль олигонуклеотида. Если не указано иное, то мотив модификации азотистого основания не зависит от последовательности азотистого основания.

"Последовательность азотистых оснований" означает порядок последовательных азотистых оснований, независимый от любого сахара, связи и/или модификации азотистого основания.

"Нуклеозид" означает азотистое основание, связанное с сахаром.

"Миметик нуклеозида" включает структуры, используемые для замены сахара или сахара и основания и необязательно связи в одном или нескольких положениях олигомерного соединения, например, такие как миметики нуклеозидов, содержащие морфолино, циклогексенил, циклогексил, тетрагидропиранил, бицикло или трицикло сахара-миметики, например, нефуранозные сахарные звенья. Нуклеотид-миметик включает в себя структуры, используемые для замены нуклеозида и связи в одном или более положениях олигомерного соединения, такие как, например, пептидные нуклеиновые кислоты или морфолино-соединения (морфолино-соединения, связанные -N(H)-C(=O)-O-или другой нефосфодиэфирной связью). Заменитель сахара пересекается более широким термином нуклеозид-миметик, но предназначен для обозначения замены только сахарной единицы (фуранозного кольца). Тетрагидропираниловые кольца, представленные в настоящем документе, иллюстрируют пример заменителя сахара, в котором сахарная фуранозная группа заменена тетрагидропираниловой кольцевой системой. "Миметик" относится к группам, которые заменяют сахар, азотистое основание и/или межнуклеозидную связь. Как правило, миметик используют вместо сахара или комбинации сахара с межнуклеозидной связью, а азотистое основание сохраняется для гибридизации с выбранной мишенью.

"Нуклеозидный мотив" означает характерный участок нуклеозидных модификаций в олигонуклеотиде или его области. Связи такого олигонуклеотида могут быть модифицированными или немодифицированными. Если не указано иное, мотивы, описывающие в настоящем документе только нуклеозиды, представляют собой нуклеозидные мотивы. Следовательно, в таких случаях связи не ограничены.

"Нуклеотид" означает нуклеозид, имеющий фосфатную группу, ковалентно связанную с сахарной частью нуклеозида.

"Олигомерное соединение" означает полимер из связанных мономерных субъединиц, которые способны к гибридизации с по меньшей мере областью молекулы нуклеиновой кислоты.

"Олигонуклеозид" означает олигонуклеотид, в котором ни одна из межнауклеозидных связей не содержит атома фосфора.

"Олигонуклеотид" означает полимер связанных нуклеозидов, каждый из которых может быть модифицированным или немодифицированным, независимо друг от друга.

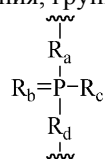
"Парентеральное введение" означает введение путем инъекций или инфузии. Парентеральное введение включает подкожное введение, внутривенное введение, внутримышечное введение, внутриартериальное введение, внутрибрюшинное введение или внутричерепное введение, например, интратекальное или интрацеребровентрикулярное введение.

"Фармацевтическая композиция" означает смесь веществ, пригодных для введения индивидууму. Например, фармацевтическая композиция может содержать один или более активных фармацевтических агентов и стерильный водный раствор.

"Фармацевтически приемлемые соли" обозначает физиологически и фармацевтически приемлемые соли антисмысловых соединений, т.е. соли, которые сохраняют желательную биологическую активность исходного олигонуклеотида и не вызывают нежелательных токсикологических эффектов.

"Тиофосфатная связь" означает связь между нуклеозидами, где фосфодиэфирные связи модифицированы путем замены одного из немоستيковых атомов кислорода на атом серы. Тиофосфатная связь представляет собой модифицированную межнауклеозидную связь.

"Фосфорная линкерная группа" означает линкерную группу, содержащую атом фосфора. Фосфорные линкерные группы включают, без ограничения, группы, имеющие формулу



где R_a и R_d , каждый независимо, представляют собой O, S, CH_2 , NH или NJ_1 , где J_1 представляет собой C_1 - C_6 -алкил или замещенный C_1 - C_6 -алкил;

R_b представляет собой O или S;

R_c представляет собой OH, SH, C_1 - C_6 -алкил, замещенный C_1 - C_6 -алкил, C_1 - C_6 -алкокси, замещенный C_1 - C_6 -алкокси, amino или замещенный amino; и

J_1 представляет собой R_b представляет собой O или S.

Фосфорные линкерные группы включают, без ограничения, фосфодиэфир, тиофосфат, дитиофосфат, фосфонат, фосфорамидат, фосфортиоамидат, тиоалкилфосфонат, фосфотриэфиры, тиоалкилфосфотриэфиры и боранофосфат.

"Часть" означает определенное количество смежных (т.е. связанных) азотистых оснований нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации часть представляет собой определенное число смежных азотистых оснований нуклеиновой кислоты-мишени. В некоторых вариантах реализации часть представляет собой определенное число смежных азотистых оснований антисмыслового соединения.

"Предупредить" относится к задержке или предотвращению появления, развития или прогрессирования заболевания, расстройства или патологического состояния в течение периода времени от нескольких минут до неопределенного срока. Предупреждение означает также снижение риска развития заболевания, расстройства или патологического состояния.

"Пролекарство" означает неактивную или менее активную форму соединения, которая при введении субъекту метаболизируется с образованием активного или более активного соединения (например, лекарства).

"Профилактически эффективное количество" означает такое количество фармацевтического агента, которое обеспечивает профилактический или превентивный эффект для животного.

"Защитная группа" означает любое соединение или защитную группу, известную специалистам в данной области техники. Неограничивающие примеры защитных групп представлены в книге "Protective Groups in Organic Chemistry", T. W. Greene, P. G. M. Wuts, ISBN 0-471-62301-6, John Wiley & Sons, Inc, Нью-Йорк, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

"Участок" определяют как фрагмент нуклеиновой кислоты-мишени, имеющий по меньшей мере одну идентифицируемую структуру, функцию или характеристику.

"Рибонуклеотид" означает нуклеотид, имеющий гидроксигруппу в 2' положении сахарного фрагмента нуклеотида. Рибонуклеотиды могут быть модифицированы с помощью любого из множества за-

местителей.

"Антисмысловое соединение на основе RISC" означает антисмысловое соединение, в котором по меньшей мере часть антисмысловой активности антисмыслового соединения обусловлена РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC).

"Антисмысловое соединение на основе РНКазы Н" означает антисмысловое соединение, в котором по меньшей мере часть антисмысловой активности антисмыслового соединения обусловлена гибридизацией антисмыслового соединения с нуклеиновой кислотой-мишенью и последующим расщеплением нуклеиновой кислоты-мишени под действием РНКазы Н.

"Сегменты" определяют как меньшие или субфрагменты участков в составе нуклеиновой кислоты-мишени.

"Отдельные участки" означает части олигонуклеотида, в которых химические модификации или мотив химических модификаций любой из соседних частей содержит по меньшей мере одно отличие для обеспечения возможности различать участки друг от друга.

"Мотив последовательности" означает характерный участок азотистых оснований, расположенных вдоль олигонуклеотида или его части. Если не указано иное, то мотив последовательности не зависит от химических модификаций и, следовательно, может иметь любую комбинацию химических модификаций, включая отсутствие химических модификаций.

"Побочные эффекты" означают физиологическое заболевание и/или состояния, обусловленные лечением, которые отличны от желаемого эффекта. В некоторых вариантах реализации побочные эффекты включают реакции в месте инъекции, аномалии функциональных проб печени, отклонения в функциях почек, гепатотоксичность, нефротоксичность, аномалии центральной нервной системы, миопатии и недомогание. Например, повышение уровней аминотрансферазы в сыворотке может указывать на гепатотоксичность или нарушение функции печени. Например, повышенный билирубин может указывать на гепатотоксичность или нарушение функции печени.

"Сайты" в данном контексте определяют как уникальные положения азотистых оснований в нуклеиновой кислоте-мишени.

"Замедляет прогрессирование" означает ослабление развития указанного заболевания.

"Специфично гибридизуется" обозначает антисмысловое соединение, обладающее достаточной степенью комплементарности между антисмысловым олигонуклеотидом и нуклеиновой кислотой-мишенью, чтобы вызывать желаемый эффект, минимально или никак не влияя на нецелевые нуклеиновые кислоты в условиях, в которых специфическое связывание является желательным, т.е., в физиологических условиях в случае анализов *in vivo* и терапевтического лечения. "Строгие условия гибридизации" или "жесткие условия" означают условия, при которых олигомерное соединение гибридизуется со своей целевой последовательностью, но с минимальным количеством других последовательностей.

"Субъект" означает человека или животного, не являющегося человеком, выбранного для лечения или терапии.

"Заместитель" и "группа заместителя" означает атом или группу, которая вытесняет атом или группу указанного исходного соединения. Например, заместитель модифицированного нуклеозида представляет собой любой атом или группу, которая отлична от атома или группы, находящейся в природном нуклеозиде (например, модифицированный 2'-заместитель представляет собой любой атом или группу в 2'-положении нуклеозида, отличную от Н или ОН). Группы заместителей могут быть защищенными или незащищенными. В некоторых вариантах реализации соединения настоящего описания имеют заместители в одном или более чем в одном положении исходного соединения. Заместители также могут быть дополнительно замещены другими группами заместителей и могут быть присоединены напрямую или через линкерную группу, такую как алкильная или углеводородная группа, к исходному соединению.

Точно так же, в данном контексте "заместитель" в отношении химической функциональной группы означает атом или группу атомов, которая отлична от атома или группы атомов, обычно содержащихся в указанной функциональной группе. В некоторых вариантах реализации заместитель вытесняет атом водорода функциональной группы (например, в некоторых вариантах реализации заместитель замещенной метильной группы представляет собой атом или группу, отличную от водорода, которая вытесняет один или более атомов водорода незамещенной метильной группы). Если не указано иное, группы, которые могут быть использованы в качестве заместителей, включают, без ограничения, галоген, гидроксил, алкил, алкенил, алкинил, ацил (-C(O)Raa), карбоксил (-C(O)O-Raa), алифатические группы, алициклические группы, алкокси, замещенный окси (-O-Raa), арил, аралкил, гетероциклический радикал, гетероарил, гетероарилалкил, аминоксид (N(Rbb)(Rcc)), имино (=NRbb), амидо (C(O)N(Rbb)(Rcc) или N(Rbb)C(O)Raa), азидо (-N₃), нитро (NO₂), циано (-CN), карбамидо (OC(O)N(Rbb)(Rcc) или N(Rbb)C(O)ORaa), уреидо (N(Rbb)C(O)N(Rbb)(Rcc)), тиюреидо (N(Rbb)C(S)N(Rbb)(Rcc)), гуанидинил (N(Rbb)C(=NRbb)N(Rbb)(Rcc)), амидинил (C(=NRbb)N(Rbb)(Rcc) или N(Rbb)C(=NRbb)(Raa)), тиол (-SRbb), сульфинил (S(O)Rbb), сульфонил (-S(O)₂Rbb) и сульфонамидил (-S(O)₂N(Rbb)(Rcc) или N(Rbb)S(O)₂Rbb). Где каждый Raa, Rbb и Rcc независимо представляет собой Н, необязательно связанную химическую функциональную группу или дополнительную группу заместителя, при этом предпочтительный перечень включает, без ограничения, алкил, алкенил, алкинил, алифатические, алкокси, ацил,

арил, аралкил, гетероарил, алициклические, гетероциклические и гетероарилалкил. Выбранные заместители в соединениях, описанных в настоящем документе, находятся в рекурсивной степени.

"Замещенный сахарный фрагмент" означает фуранозил, который не является природным сахарным фрагментом. Замещенные сахарные фрагменты включают, но не ограничиваются ими, фуранозилы, содержащие заместители в 2'-положении, 3'-положении, 5'-положении и/или 4'-положении. Некоторые замещенные сахарные фрагменты представляют собой бициклические сахарные фрагменты.

"Сахарный фрагмент" означает природный сахарный фрагмент или модифицированный сахарный фрагмент нуклеозида.

"Сахарный мотив" означает характерный участок сахарных модификаций в олигонуклеотиде или его области.

"Заменитель сахара" означает структуру, которая не содержит фуранозила и способна заменять природный сахарный фрагмент нуклеозида, так что образующиеся нуклеозидные субъединицы могут связываться вместе и/или связываться с другими нуклеозидами с образованием олигомерного соединения, которое может гибридизоваться с комплементарным олигомерным соединением. Такие структуры включают кольца, содержащие другое количество атомов, чем фуранозил (например, 4-, 6- или 7-членные кольца); замену кислорода фуранозила неокислородным атомом (например, углеродом, серой или азотом); или одновременное изменение количества атомов и замену кислорода. Такие структуры также могут содержать замещения, соответствующие замещениям, описанным для замещенных сахарных фрагментов (например, 6-членные карбоциклические бициклические заменители сахара, необязательно содержащие дополнительные заместители). Заменители сахара включают также более сложные сахарные замены (например, некольцевые системы пептидной нуклеиновой кислоты). Заменители сахара включают, без ограничения, морфолино, циклогексенилы и циклогекситы.

"Мишень" обозначает белок, модуляция которого является желательной. "Ген-мишень" означает ген, кодирующий белок-мишень.

"Таргетинг" означает процесс конструирования и выбора антисмыслового соединения, которое будет специфически гибридизоваться с нуклеиновой кислотой-мишенью и вызывать желаемый эффект.

"Нуклеиновая кислота-мишень", "РНК-мишень", "транскрипт РНК-мишени" и "целевая нуклеиновая кислота" означают нуклеиновую кислоту, способную подвергаться целевому воздействию антисмысловых соединений.

"Целевой участок" означает фрагмент целевой нуклеиновой кислоты, на который нацелено одно или более антисмысловых соединений.

"Целевой сегмент" означает последовательность нуклеотидов нуклеиновой кислоты-мишени, на который нацелено антисмысловое соединение. "5' целевой сайт" относится к 5'-крайнему нуклеотиду целевого сегмента. "3' целевой сайт" относится к 3'-крайнему нуклеотиду целевого сегмента.

"Концевая группа" означает один или более атомов, присоединенных к любому или к обоим 3'- или 5'-концам олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации концевая группа представляет собой группу конъюгата. В некоторых вариантах реализации концевая группа содержит один или более нуклеозидов концевой группы.

"Концевая межнуклеозидная связь" означает связь между последними двумя нуклеозидами олигонуклеотида или его определенной области.

"Терапевтически эффективное количество" означает количество фармацевтического агента, которое обеспечивает терапевтический эффект для индивидуума.

"Лечение" означает введение композиции животному для изменения или облегчения заболевания, расстройства или патологического состояния у животного. В некоторых вариантах реализации животному может быть введена одна или более фармацевтических композиций.

"Немодифицированные" азотистые основания означают пуриновые основания: аденин (А) и гуанин (G), и пиримидиновые основания: тимин (Т), цитозин (С) и урацил (U).

"Немодифицированный нуклеотид" означает нуклеотид, состоящий из природных азотистых оснований, сахарных фрагментов и межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения немодифицированный нуклеотид представляет собой РНК нуклеотид (т.е. β -D-рибонуклеозиды) или ДНК нуклеотид (т.е. β -D-дезоксирибонуклеозид).

Некоторые варианты реализации изобретения.

В некоторых вариантах реализации изобретения предложены способы, соединения и композиции для ингибирования экспрессии фактора комплемента В (CFB).

В некоторых вариантах реализации предложены антисмысловые соединения, направленные на нуклеиновую кислоту CFB. В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота CFB имеет последовательность с номером доступа GENBANK NM_001710.5 (включенную в настоящий документ как SEQ ID NO: 1), с номером доступа GENBANK NT_007592.15, усеченную с нуклеотида 31852000 по 31861000 (включенную в настоящий документ как SEQ ID NO: 2), с номером доступа GENBANK NW_001116486.1, усеченную с нуклеотида 536000 по 545000 (включенную в настоящий документ как SEQ ID NO: 3), с номером доступа GENBANK XM_001113553.2 (включенную в настоящий документ как

SEQ ID NO: 4) или с номером доступа GENBANK NM_008198.2 (включенную в настоящий документ как SEQ ID NO: 5).

В некоторых вариантах реализации предложено соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид и группу конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов и имеет последовательность азотистых оснований, содержащую по меньшей мере 8 смежных азотистых оснований любой из последовательностей азотистых оснований SEQ ID NO: 6-808.

В некоторых вариантах реализации предложено соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид и группу конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов и имеет последовательность азотистых оснований, содержащую по меньшей мере 9 смежных азотистых оснований любой из последовательностей азотистых оснований SEQ ID NO: 6-808.

В некоторых вариантах реализации предложено соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид и группу конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов и имеет последовательность азотистых оснований, содержащую по меньшей мере 10 смежных азотистых оснований любой из последовательностей азотистых оснований SEQ ID NO: 6-808.

В некоторых вариантах реализации предложено соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид и группу конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов и имеет последовательность азотистых оснований, содержащую по меньшей мере 11 смежных азотистых оснований любой из последовательностей азотистых оснований SEQ ID NO: 6-808.

В некоторых вариантах реализации предложено соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид и группу конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов и имеет последовательность азотистых оснований, содержащую по меньшей мере 12 смежных азотистых оснований любой из последовательностей азотистых оснований SEQ ID NO: 6-808.

В некоторых вариантах реализации предложено соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид и группу конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов и имеет последовательность азотистых оснований, содержащую последовательность азотистых оснований любой из SEQ ID NO: 6-808.

В некоторых вариантах реализации предложено соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид и группу конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид состоит из последовательности азотистых оснований SEQ ID NO: 6-808.

В некоторых вариантах реализации предложено соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид и группу конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов, комплементарных азотистым основаниям 30-49, 48-63, 150-169, 151-170, 152-171, 154-169, 154-173, 156-171, 156-175, 157-176, 158-173, 158-177, 480-499, 600-619, 638-657, 644-663, 738-757, 1089-1108, 1135-1154, 1141-1160, 1147-1166, 1150-1169, 1153-1172, 1159-1178, 1162-1181, 1165-1184, 1171-1186, 1171-1190, 1173-1188, 1173-1192, 1175-1190, 1175-1194, 1177-1196, 1183-1202, 1208-1227, 1235-1254, 1298-1317, 1304-1323, 1310-1329, 1316-1335, 1319-1338, 1322-1341, 1328-1347, 1349-1368, 1355-1374, 1393-1412, 1396-1415, 1399-1418, 1405-1424, 1421-1440, 1621-1640, 1646-1665, 1646-1665, 1647-1666, 1689-1708, 1749-1768, 1763-1782, 1912-1931, 2073-2092, 2085-2104, 2166-2185, 2172-2191, 2189-2208, 2191-2210, 2193-2212, 2195-2210, 2195-2214, 2196-2215, 2197-2212, 2197-2216, 2202-2221, 2223-2238, 2223-2242, 2225-2240, 2226-2245, 2227-2242, 2227-2246, 2238-2257, 2241-2260, 2267-2286, 2361-2380, 2388-2407, 2397-2416, 2448-2467, 2453-2472, 2455-2474, 2457-2472, 2457-2476, 2459-2474, 2459-2478, 2461-2476, 2461-2480, 2532-2551, 2550-2569, 2551-2566, 2551-2570, 2552-2568, 2552-2570, 2552-2571, 2553-2568, 2553-2570, 2553-2571, 2553-2572, 2554-2571, 2554-2572, 2554-2573, 2555-2570, 2555-2572, 2555-2574, 2556-2573, 2556-2574, 2556-2575, 2557-2573, 2557-2574, 2557-2575, 2557-2576, 2558-2575, 2558-2576, 2558-2577, 2559-2576, 2559-2577, 2559-2578, 2560-2577, 2560-2578, 2560-2579, 2561-2576, 2561-2578, 2561-2579, 2561-2580, 2562-2577, 2562-2579, 2562-2581, 2563-2578, 2563-2580, 2563-2582, 2564-2581, 2564-2583, 2565-2584, 2566-2583, 2566-2585, 2567-2582, 2567-2584, 2567-2586, 2568-2583, 2568-2585, 2568-2587, 2569-2586, 2569-2588, 2570-2585, 2570-2587, 2570-2589, 2571-2586, 2571-2588, 2571-2590, 2572-2589, 2572-2590, 2572-2591, 2573-2590, 2573-2592, 2574-2590, 2574-2591, 2574-2593, 2575-2590, 2575-2591, 2575-2592, 2575-2594, 2576-2593, 2576-2595, 2577-2594, 2577-2595, 2577-2596, 2578-2594, 2578-2596, 2578-2597, 2579-2598, 2580-2596, 2580-2597, 2580-2598, 2580-2599, 2581-2597, 2581-2598, 2581-2599, 2581-2600, 2582-2598, 2582-2599, 2582-2600, 2582-2601, 2583-2599, 2583-2600, 2583-2601, 2583-2602, 2584-2600, 2584-2601, 2584-2602, 2584-2603, 2585-2601, 2585-2603, 2585-2604, 2586-2601, 2586-2602, 2586-2604, 2586-2605, 2587-2602, 2587-2603, 2587-2605, 2587-2606, 2588-2603, 2588-2604, 2588-2605, 2588-2606, 2588-2607, 2589-2604, 2589-2605, 2589-2606, 2589-2607, 2589-2608, 2590-2605, 2590-2606, 2590-2607, 2590-2608, 2590-2609, 2590-2609, 2591-2607, 2591-2608, 2591-2609, 2591-2610, 2592-2607, 2592-2608, 2592-2609, 2592-2610, 2592-2611, 2593-2608, 2593-2609, 2593-2610, 2593-2612, 2594-2609, 2594-2610, 2594-2611, 2594-2612, 2594-2613, 2595-2610, 2595-2611, 2595-2612, 2595-2613, 2595-2614, 2596-2611, 2596-2612, 2596-2613, 2596-2614, 2596-2615, 2597-2612, 2597-2612, 2597-2613, 2597-2614, 2597-2615, 2597-2616, 2598-2613, 2598-2614, 2598-2615, 2598-2616, 2598-2617, 2599-2614, 2599-2615, 2599-2616, 2599-2617, 2599-2618, 2600-2615, 2600-2616, 2600-2617, 2600-2618, 2600-2619, 2601-2616, 2601-2617, 2601-2618, 2601-2619, 2601-2620, 2602-2617, 2602-2618, 2602-

2619, 2602-2620, 2602-2621, 2603-2618, 2603-2619, 2603-2620, 2603-2621, 2603-2622, 2604-2619, 2604-2620, 2604-2621, 2604-2622, 2604-2623, 2605-2620, 2605-2621, 2605-2622, 2605-2623, 2605-2624, 2606-2621, 2606-2622, 2606-2623, 2606-2624, 2606-2625, 2607-2622, 2607-2623, 2607-2624, 2607-2625, 2607-2626, 2608-2623, 2608-2624, 2608-2625, 2608-2626, 2608-2627, 2609-2624, 2609-2625, 2609-2626, 2609-2627, 2609-2628, 2610-2625, 2610-2626, 2610-2627, 2610-2628, 2610-2629, 2611-2626, 2611-2627, 2611-2628, 2611-2629, 2611-2630, 2612-2627, 2612-2628, 2612-2629, 2612-2630, 2612-2631, 2613-2628, 2613-2629, 2613-2630, 2613-2631, 2614-2629, 2614-2630, 2614-2631, 2615-2630, 2615-2631 или 2616-2631 SEQ ID NO: 1, и при этом указанный модифицированный олигонуклеотид по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% комплементарен SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах реализации предложено соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид и группу конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов, имеющих последовательность азотистых оснований, содержащую часть из по меньшей мере 8 смежных азотистых оснований, комплементарную равной по длине части азотистых оснований 30-49, 48-63, 150-169, 151-170, 152-171, 154-169, 154-173, 156-171, 156-175, 157-176, 158-173, 158-177, 480-499, 600-619, 638-657, 644-663, 738-757, 1089-1108, 1135-1154, 1141-1160, 1147-1166, 1150-1169, 1153-1172, 1159-1178, 1162-1181, 1165-1184, 1171-1186, 1171-1190, 1173-1188, 1173-1192, 1175-1190, 1175-1194, 1177-1196, 1183-1202, 1208-1227, 1235-1254, 1298-1317, 1304-1323, 1310-1329, 1316-1335, 1319-1338, 1322-1341, 1328-1347, 1349-1368, 1355-1374, 1393-1412, 1396-1415, 1399-1418, 1405-1424, 1421-1440, 1621-1640, 1646-1665, 1646-1665, 1647-1666, 1689-1708, 1749-1768, 1763-1782, 1912-1931, 2073-2092, 2085-2104, 2166-2185, 2172-2191, 2189-2208, 2191-2210, 2193-2212, 2195-2210, 2195-2214, 2196-2215, 2197-2212, 2197-2216, 2202-2221, 2223-2238, 2223-2242, 2225-2240, 2226-2245, 2227-2242, 2227-2246, 2238-2257, 2241-2260, 2267-2286, 2361-2380, 2388-2407, 2397-2416, 2448-2467, 2453-2472, 2455-2474, 2457-2472, 2457-2476, 2459-2474, 2459-2478, 2461-2476, 2461-2480, 2532-2551, 2550-2569, 2551-2566, 2551-2570, 2552-2568, 2552-2570, 2552-2571, 2553-2568, 2553-2570, 2553-2571, 2553-2572, 2554-2571, 2554-2572, 2554-2573, 2555-2570, 2555-2572, 2555-2574, 2556-2573, 2556-2574, 2556-2575, 2557-2573, 2557-2574, 2557-2575, 2557-2576, 2558-2575, 2558-2576, 2558-2577, 2559-2576, 2559-2577, 2559-2578, 2560-2577, 2560-2578, 2560-2579, 2561-2576, 2561-2578, 2561-2579, 2561-2580, 2562-2577, 2562-2579, 2562-2581, 2563-2578, 2563-2580, 2563-2582, 2564-2581, 2564-2583, 2565-2584, 2566-2583, 2566-2585, 2567-2582, 2567-2584, 2567-2586, 2568-2583, 2568-2585, 2568-2587, 2569-2586, 2569-2588, 2570-2585, 2570-2587, 2570-2589, 2571-2586, 2571-2588, 2571-2590, 2572-2589, 2572-2590, 2572-2591, 2573-2590, 2573-2592, 2574-2590, 2574-2591, 2574-2593, 2575-2590, 2575-2591, 2575-2592, 2575-2594, 2576-2593, 2576-2595, 2577-2594, 2577-2595, 2577-2596, 2578-2594, 2578-2596, 2578-2597, 2579-2598, 2580-2596, 2580-2597, 2580-2598, 2580-2599, 2581-2597, 2581-2598, 2581-2599, 2581-2600, 2582-2598, 2582-2599, 2582-2600, 2582-2601, 2583-2599, 2583-2600, 2583-2601, 2583-2602, 2584-2600, 2584-2601, 2584-2602, 2584-2603, 2585-2601, 2585-2603, 2585-2604, 2586-2601, 2586-2602, 2586-2604, 2586-2605, 2587-2602, 2587-2603, 2587-2605, 2587-2606, 2588-2603, 2588-2604, 2588-2605, 2588-2606, 2588-2607, 2589-2604, 2589-2605, 2589-2606, 2589-2607, 2589-2608, 2590-2605, 2590-2606, 2590-2607, 2590-2608, 2590-2609, 2590-2609, 2591-2607, 2591-2608, 2591-2609, 2591-2610, 2592-2607, 2592-2608, 2592-2609, 2592-2610, 2592-2611, 2593-2608, 2593-2609, 2593-2610, 2593-2612, 2594-2609, 2594-2610, 2594-2611, 2594-2612, 2594-2613, 2595-2610, 2595-2611, 2595-2612, 2595-2613, 2595-2614, 2596-2611, 2596-2612, 2596-2613, 2596-2614, 2596-2615, 2597-2612, 2597-2612, 2597-2613, 2597-2614, 2597-2615, 2597-2616, 2598-2613, 2598-2614, 2598-2615, 2598-2616, 2598-2617, 2599-2614, 2599-2615, 2599-2616, 2599-2617, 2599-2618, 2600-2615, 2600-2616, 2600-2617, 2600-2618, 2600-2619, 2601-2616, 2601-2617, 2601-2618, 2601-2619, 2601-2620, 2602-2617, 2602-2618, 2602-2619, 2602-2620, 2602-2621, 2603-2618, 2603-2619, 2603-2620, 2603-2621, 2603-2622, 2604-2619, 2604-2620, 2604-2621, 2604-2622, 2604-2623, 2605-2620, 2605-2621, 2605-2622, 2605-2623, 2605-2624, 2606-2621, 2606-2622, 2606-2623, 2606-2624, 2606-2625, 2607-2622, 2607-2623, 2607-2624, 2607-2625, 2607-2626, 2608-2623, 2608-2624, 2608-2625, 2608-2626, 2608-2627, 2609-2624, 2609-2625, 2609-2626, 2609-2627, 2609-2628, 2610-2625, 2610-2626, 2610-2627, 2610-2628, 2610-2629, 2611-2626, 2611-2627, 2611-2628, 2611-2629, 2611-2630, 2612-2627, 2612-2628, 2612-2629, 2612-2630, 2612-2631, 2613-2628, 2613-2629, 2613-2630, 2613-2631, 2614-2629, 2614-2630, 2614-2631, 2615-2630, 2615-2631 или 2616-2631 SEQ ID NO: 1, и при этом последовательность азотистых оснований модифицированного олигонуклеотида по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% комплементарна SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах реализации предложено соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид и группу конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов, комплементарных азотистым основаниям 1608-1627, 1685-1704, 1686-1705, 1751-1770, 1769-1784, 1871-1890, 1872-1891, 1873-1892, 1875-1890, 1875-1894, 1877-1892, 1877-1896, 1878-1897, 1879-1894, 1879-1898, 2288-2307, 2808-2827, 2846-2865, 2852-2871, 2946-2965, 3773-3792, 3819-3838, 3825-3844, 3831-3850, 3834-3853, 3837-3856, 3843-3862, 4151-4166, 4151-4170, 4153-4172, 4159-4178, 4184-4203, 4211-4230, 4609-4628, 4612-4631, 4615-4634, 4621-4640, 4642-4661, 4648-4667, 4686-4705, 4689-4708, 4692-4711, 4698-4717, 4714-4733, 5270-5289, 5295-5314, 5296-5315, 5830-5849, 5890-5909, 5904-5923, 6406-6425, 6662-6681, 6674-6693, 6954-6973, 6960-6979, 6977-6996, 6979-6998, 6981-7000, 6983-

6998, 6983-7002, 6984-7003, 6985-7000, 6985-7004, 6990-7009, 7122-7141, 7125-7144, 7151-7170, 7353-7372, 7362-7381, 7683-7702, 7688-7707, 7690-7709, 7692-7707, 7692-7711, 7694-7709, 7694-7713, 7696-7711, 7696-7715, 7767-7786, 7785-7804, 7786-7801, 7787-7803, 7787-7805, 7787-7806, 7788-7803, 7788-7805, 7788-7806, 7788-7807, 7789-7806, 7789-7807, 7789-7808, 7790-7805, 7790-7807, 7790-7809, 7791-7808, 7791-7809, 7791-7810, 7792-7808, 7792-7809, 7792-7810, 7792-7811, 7793-7810, 7793-7811, 7793-7812, 7794-7811, 7794-7812, 7794-7813, 7795-7812, 7795-7813, 7795-7814, 7796-7811, 7796-7813, 7796-7814, 7796-7815, 7797-7812, 7797-7814, 7797-7816, 7798-7813, 7798-7815, 7798-7817, 7799-7816, 7799-7818, 7800-7819, 7801-7818, 7801-7820, 7802-7817, 7802-7819, 7802-7821, 7803-7818, 7803-7820, 7803-7822, 7804-7821, 7804-7823, 7805-7820, 7805-7822, 7805-7824, 7806-7821, 7806-7823, 7806-7825, 7807-7824, 7807-7825, 7807-7826, 7808-7825, 7808-7827, 7809-7825, 7809-7826, 7809-7828, 7810-7825, 7810-7826, 7810-7827, 7810-7829, 7811-7828, 7811-7830, 7812-7829, 7812-7830, 7812-7831, 7813-7829, 7813-7831, 7813-7832, 7814-7833, 7815-7831, 7815-7832, 7815-7833, 7815-7834, 7816-7832, 7816-7833, 7816-7834, 7816-7835, 7817-7833, 7817-7834, 7817-7835, 7817-7836, 7818-7834, 7818-7835, 7818-7836, 7818-7837, 7819-7835, 7819-7836, 7819-7837, 7819-7838, 7820-7836, 7820-7838, 7820-7839, 7821-7836, 7821-7837, 7821-7839, 7821-7840, 7822-7837, 7822-7838, 7822-7840, 7822-7841, 7823-7838, 7823-7839, 7823-7839, 7823-7840, 7823-7841, 7823-7842, 7824-7839, 7824-7840, 7824-7840, 7824-7841, 7824-7842, 7824-7843, 7825-7840, 7825-7841, 7825-7842, 7825-7843, 7825-7844, 7826-7842, 7826-7843, 7826-7844, 7826-7845, 7827-7842, 7827-7843, 7827-7844, 7827-7845, 7827-7846, 7828-7843, 7828-7844, 7828-7845, 7828-7847, 7829-7844, 7829-7845, 7829-7846, 7829-7847, 7829-7848, 7830-7845, 7830-7846, 7830-7847, 7830-7848, 7830-7849, 7831-7846, 7831-7847, 7831-7848, 7831-7849, 7831-7850, 7832-7847, 7832-7848, 7832-7849, 7832-7850, 7832-7851, 7833-7848, 7833-7849, 7833-7850, 7833-7851, 7833-7852, 7834-7849, 7834-7850, 7834-7851, 7834-7852, 7834-7853, 7835-7850, 7835-7851, 7835-7852, 7835-7853, 7835-7854, 7836-7851, 7836-7852, 7836-7853, 7836-7854, 7836-7855, 7837-7852, 7837-7853, 7837-7854, 7837-7855, 7837-7856, 7838-7853, 7838-7854, 7838-7855, 7838-7856, 7838-7857, 7839-7854, 7839-7855, 7839-7856, 7839-7857, 7839-7858, 7840-7855, 7840-7856, 7840-7857, 7840-7858, 7840-7859, 7841-7856, 7841-7857, 7841-7858, 7841-7859, 7841-7860, 7842-7857, 7842-7858, 7842-7859, 7842-7860, 7842-7861, 7843-7858, 7843-7859, 7843-7860, 7843-7861, 7843-7862, 7844-7859, 7844-7860, 7844-7861, 7844-7862, 7845-7860, 7845-7861, 7845-7862, 7846-7861 или 7846-7862 SEQ ID NO: 2, и где указанный модифицированный олигонуклеотид по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% комплементарен SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах реализации предложено соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид и группу конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов, имеющий последовательность азотистых оснований, содержащую часть из по меньшей мере 8 смежных азотистых оснований, комплементарную равной по длине части азотистых оснований 1608-1627, 1685-1704, 1686-1705, 1751-1770, 1769-1784, 1871-1890, 1872-1891, 1873-1892, 1875-1890, 1875-1894, 1877-1892, 1877-1896, 1878-1897, 1879-1894, 1879-1898, 2288-2307, 2808-2827, 2846-2865, 2852-2871, 2946-2965, 3773-3792, 3819-3838, 3825-3844, 3831-3850, 3834-3853, 3837-3856, 3843-3862, 4151-4166, 4151-4170, 4153-4172, 4159-4178, 4184-4203, 4211-4230, 4609-4628, 4612-4631, 4615-4634, 4621-4640, 4642-4661, 4648-4667, 4686-4705, 4689-4708, 4692-4711, 4698-4717, 4714-4733, 5270-5289, 5295-5314, 5296-5315, 5830-5849, 5890-5909, 5904-5923, 6406-6425, 6662-6681, 6674-6693, 6954-6973, 6960-6979, 6977-6996, 6979-6998, 6981-7000, 6983-6998, 6983-7002, 6984-7003, 6985-7000, 6985-7004, 6990-7009, 7122-7141, 7125-7144, 7151-7170, 7353-7372, 7362-7381, 7683-7702, 7688-7707, 7690-7709, 7692-7707, 7692-7711, 7694-7709, 7694-7713, 7696-7711, 7696-7715, 7767-7786, 7785-7804, 7786-7801, 7787-7803, 7787-7805, 7787-7806, 7788-7803, 7788-7805, 7788-7806, 7788-7807, 7789-7806, 7789-7807, 7789-7808, 7790-7805, 7790-7807, 7790-7809, 7791-7808, 7791-7809, 7791-7810, 7792-7808, 7792-7809, 7792-7810, 7792-7811, 7793-7810, 7793-7811, 7793-7812, 7794-7811, 7794-7812, 7794-7813, 7795-7812, 7795-7813, 7795-7814, 7796-7811, 7796-7813, 7796-7814, 7796-7815, 7797-7812, 7797-7814, 7797-7816, 7798-7813, 7798-7815, 7798-7817, 7799-7816, 7799-7818, 7800-7819, 7801-7818, 7801-7820, 7802-7817, 7802-7819, 7802-7821, 7803-7818, 7803-7820, 7803-7822, 7804-7821, 7804-7823, 7805-7820, 7805-7822, 7805-7824, 7806-7821, 7806-7823, 7806-7825, 7807-7824, 7807-7825, 7807-7826, 7808-7825, 7808-7827, 7809-7825, 7809-7826, 7809-7828, 7810-7825, 7810-7826, 7810-7827, 7810-7829, 7811-7828, 7811-7830, 7812-7829, 7812-7830, 7812-7831, 7813-7829, 7813-7831, 7813-7832, 7814-7833, 7815-7831, 7815-7832, 7815-7833, 7815-7834, 7816-7832, 7816-7833, 7816-7834, 7816-7835, 7817-7833, 7817-7834, 7817-7835, 7817-7836, 7818-7834, 7818-7835, 7818-7836, 7818-7837, 7819-7835, 7819-7836, 7819-7837, 7819-7838, 7820-7836, 7820-7838, 7820-7839, 7821-7836, 7821-7837, 7821-7839, 7821-7840, 7822-7837, 7822-7838, 7822-7840, 7822-7841, 7823-7838, 7823-7839, 7823-7839, 7823-7840, 7823-7841, 7823-7842, 7824-7839, 7824-7840, 7824-7840, 7824-7841, 7824-7842, 7824-7843, 7825-7840, 7825-7841, 7825-7842, 7825-7843, 7825-7844, 7826-7842, 7826-7843, 7826-7844, 7826-7845, 7827-7842, 7827-7843, 7827-7844, 7827-7845, 7827-7846, 7828-7843, 7828-7844, 7828-7845, 7828-7847, 7829-7844, 7829-7845, 7829-7846, 7829-7847, 7829-7848, 7830-7845, 7830-7846, 7830-7847, 7830-7848, 7830-7849, 7831-7846, 7831-7847, 7831-7848, 7831-7849, 7831-7850, 7832-7847, 7832-7848, 7832-7849, 7832-7850, 7832-7851, 7833-7848, 7833-7849, 7833-7850, 7833-7851, 7833-7852, 7834-7849, 7834-7850, 7834-7851, 7834-7852, 7834-7853, 7835-7850,

7835-7851, 7835-7852, 7835-7853, 7835-7854, 7836-7851, 7836-7852, 7836-7853, 7836-7854, 7836-7855, 7837-7852, 7837-7853, 7837-7854, 7837-7855, 7837-7856, 7838-7853, 7838-7854, 7838-7855, 7838-7856, 7838-7857, 7839-7854, 7839-7855, 7839-7856, 7839-7857, 7839-7858, 7840-7855, 7840-7856, 7840-7857, 7840-7858, 7840-7859, 7841-7856, 7841-7857, 7841-7858, 7841-7859, 7841-7860, 7842-7857, 7842-7858, 7842-7859, 7842-7860, 7842-7861, 7843-7858, 7843-7859, 7843-7860, 7843-7861, 7843-7862, 7844-7859, 7844-7860, 7844-7861, 7844-7862, 7845-7860, 7845-7861, 7845-7862, 7846-7861 и 7846-7862 SEQ ID NO: 2, и где последовательность азотистых оснований модифицированного олигонуклеотида по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% комплементарна SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения или олигонуклеотиды направлены на область нуклеиновой кислоты CFB. В некоторых вариантах реализации такие соединения или олигонуклеотиды, направленные на область нуклеиновой кислоты CFB, имеют часть смежных азотистых оснований, которая комплементарна равной по длине части азотистых оснований указанной области. Например, область может представлять собой часть из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 смежных азотистых оснований, комплементарную равной по длине части области, указанной в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации соединение содержит или состоит из конъюгата и модифицированного олигонуклеотида, направленного на любые из следующих нуклеотидных областей SEQ ID NO: 1: 30-49, 48-63, 150-169, 151-170, 152-171, 154-169, 154-173, 156-171, 156-175, 157-176, 158-173, 158-177, 480-499, 600-619, 638-657, 644-663, 738-757, 1089-1108, 1135-1154, 1141-1160, 1147-1166, 1150-1169, 1153-1172, 1159-1178, 1162-1181, 1165-1184, 1171-1186, 1171-1190, 1173-1188, 1173-1192, 1175-1190, 1175-1194, 1177-1196, 1183-1202, 1208-1227, 1235-1254, 1298-1317, 1304-1323, 1310-1329, 1316-1335, 1319-1338, 1322-1341, 1328-1347, 1349-1368, 1355-1374, 1393-1412, 1396-1415, 1399-1418, 1405-1424, 1421-1440, 1621-1640, 1646-1665, 1646-1665, 1647-1666, 1689-1708, 1749-1768, 1763-1782, 1912-1931, 2073-2092, 2085-2104, 2166-2185, 2172-2191, 2189-2208, 2191-2210, 2193-2212, 2195-2210, 2195-2214, 2196-2215, 2197-2212, 2197-2216, 2202-2221, 2223-2238, 2223-2242, 2225-2240, 2226-2245, 2227-2242, 2227-2246, 2238-2257, 2241-2260, 2267-2286, 2361-2380, 2388-2407, 2397-2416, 2448-2467, 2453-2472, 2455-2474, 2457-2472, 2457-2476, 2459-2474, 2459-2478, 2461-2476, 2461-2480, 2532-2551, 2550-2569, 2551-2566, 2551-2570, 2552-2568, 2552-2570, 2552-2571, 2553-2568, 2553-2570, 2553-2571, 2553-2572, 2554-2571, 2554-2572, 2554-2573, 2555-2570, 2555-2572, 2555-2574, 2556-2573, 2556-2574, 2556-2575, 2557-2573, 2557-2574, 2557-2575, 2557-2576, 2558-2575, 2558-2576, 2558-2577, 2559-2576, 2559-2577, 2559-2578, 2560-2577, 2560-2578, 2560-2579, 2561-2576, 2561-2578, 2561-2579, 2561-2580, 2562-2577, 2562-2579, 2562-2581, 2563-2578, 2563-2580, 2563-2582, 2564-2581, 2564-2583, 2565-2584, 2566-2583, 2566-2585, 2567-2582, 2567-2584, 2567-2586, 2568-2583, 2568-2585, 2568-2587, 2569-2586, 2569-2588, 2570-2585, 2570-2587, 2570-2589, 2571-2586, 2571-2588, 2571-2590, 2572-2589, 2572-2590, 2572-2591, 2573-2590, 2573-2592, 2574-2590, 2574-2591, 2574-2593, 2575-2590, 2575-2591, 2575-2592, 2575-2594, 2576-2593, 2576-2595, 2577-2594, 2577-2595, 2577-2596, 2578-2594, 2578-2596, 2578-2597, 2579-2598, 2580-2596, 2580-2597, 2580-2598, 2580-2599, 2581-2597, 2581-2598, 2581-2599, 2581-2600, 2582-2598, 2582-2599, 2582-2600, 2582-2601, 2583-2599, 2583-2600, 2583-2601, 2583-2602, 2584-2600, 2584-2601, 2584-2602, 2584-2603, 2585-2601, 2585-2603, 2585-2604, 2586-2601, 2586-2602, 2586-2604, 2586-2605, 2587-2602, 2587-2603, 2587-2605, 2587-2606, 2588-2603, 2588-2604, 2588-2605, 2588-2606, 2588-2607, 2589-2604, 2589-2605, 2589-2606, 2589-2607, 2589-2608, 2590-2605, 2590-2606, 2590-2607, 2590-2608, 2590-2609, 2590-2609, 2591-2607, 2591-2608, 2591-2609, 2591-2610, 2592-2607, 2592-2608, 2592-2609, 2592-2610, 2592-2611, 2593-2608, 2593-2609, 2593-2610, 2593-2612, 2594-2609, 2594-2610, 2594-2611, 2594-2612, 2594-2613, 2595-2610, 2595-2611, 2595-2612, 2595-2613, 2595-2614, 2596-2611, 2596-2612, 2596-2613, 2596-2614, 2596-2615, 2597-2612, 2597-2612, 2597-2613, 2597-2614, 2597-2615, 2597-2616, 2598-2613, 2598-2614, 2598-2615, 2598-2616, 2598-2617, 2599-2614, 2599-2615, 2599-2616, 2599-2617, 2599-2618, 2600-2615, 2600-2616, 2600-2617, 2600-2618, 2600-2619, 2601-2616, 2601-2617, 2601-2618, 2601-2619, 2601-2620, 2602-2617, 2602-2618, 2602-2619, 2602-2620, 2602-2621, 2603-2618, 2603-2619, 2603-2620, 2603-2621, 2603-2622, 2604-2619, 2604-2620, 2604-2621, 2604-2622, 2604-2623, 2605-2620, 2605-2621, 2605-2622, 2605-2623, 2605-2624, 2606-2621, 2606-2622, 2606-2623, 2606-2624, 2606-2625, 2607-2622, 2607-2623, 2607-2624, 2607-2625, 2607-2626, 2608-2623, 2608-2624, 2608-2625, 2608-2626, 2608-2627, 2609-2624, 2609-2625, 2609-2626, 2609-2627, 2609-2628, 2610-2625, 2610-2626, 2610-2627, 2610-2628, 2610-2629, 2611-2626, 2611-2627, 2611-2628, 2611-2629, 2611-2630, 2612-2627, 2612-2628, 2612-2629, 2612-2630, 2612-2631, 2613-2628, 2613-2629, 2613-2630, 2613-2631, 2614-2629, 2614-2630, 2614-2631, 2615-2630, 2615-2631 и 2616-2631.

В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения или олигонуклеотиды направлены на область нуклеиновой кислоты CFB. В некоторых вариантах реализации такие соединения или олигонуклеотиды, направленные на область нуклеиновой кислоты CFB, имеют часть смежных азотистых оснований, которая комплементарна равной по длине части азотистых оснований указанной области. Например, область может представлять собой часть из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 смежных азотистых оснований, комплементарную равной по длине части области, указанной в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации соединение содержит или состоит из конъюгата и модифицированного олигонуклеотида, направленного на следующие нуклеотидные области SEQ ID NO:

2: 1608-1627, 1685-1704, 1686-1705, 1751-1770, 1769-1784, 1871-1890, 1872-1891, 1873-1892, 1875-1890, 1875-1894, 1877-1892, 1877-1896, 1878-1897, 1879-1894, 1879-1898, 2288-2307, 2808-2827, 2846-2865, 2852-2871, 2946-2965, 3773-3792, 3819-3838, 3825-3844, 3831-3850, 3834-3853, 3837-3856, 3843-3862, 4151-4166, 4151-4170, 4153-4172, 4159-4178, 4184-4203, 4211-4230, 4609-4628, 4612-4631, 4615-4634, 4621-4640, 4642-4661, 4648-4667, 4686-4705, 4689-4708, 4692-4711, 4698-4717, 4714-4733, 5270-5289, 5295-5314, 5296-5315, 5830-5849, 5890-5909, 5904-5923, 6406-6425, 6662-6681, 6674-6693, 6954-6973, 6960-6979, 6977-6996, 6979-6998, 6981-7000, 6983-6998, 6983-7002, 6984-7003, 6985-7000, 6985-7004, 6990-7009, 7122-7141, 7125-7144, 7151-7170, 7353-7372, 7362-7381, 7683-7702, 7688-7707, 7690-7709, 7692-7707, 7692-7711, 7694-7709, 7694-7713, 7696-7711, 7696-7715, 7767-7786, 7785-7804, 7786-7801, 7787-7803, 7787-7805, 7787-7806, 7788-7803, 7788-7805, 7788-7806, 7788-7807, 7789-7806, 7789-7807, 7789-7808, 7790-7805, 7790-7807, 7790-7809, 7791-7808, 7791-7809, 7791-7810, 7792-7808, 7792-7809, 7792-7810, 7792-7811, 7793-7810, 7793-7811, 7793-7812, 7794-7811, 7794-7812, 7794-7813, 7795-7812, 7795-7813, 7795-7814, 7796-7811, 7796-7813, 7796-7814, 7796-7815, 7797-7812, 7797-7814, 7797-7816, 7798-7813, 7798-7815, 7798-7817, 7799-7816, 7799-7818, 7800-7819, 7801-7818, 7801-7820, 7802-7817, 7802-7819, 7802-7821, 7803-7818, 7803-7820, 7803-7822, 7804-7821, 7804-7823, 7805-7820, 7805-7822, 7805-7824, 7806-7821, 7806-7823, 7806-7825, 7807-7824, 7807-7825, 7807-7826, 7808-7825, 7808-7827, 7809-7825, 7809-7826, 7809-7828, 7810-7825, 7810-7826, 7810-7827, 7810-7829, 7811-7828, 7811-7830, 7812-7829, 7812-7830, 7812-7831, 7813-7829, 7813-7831, 7813-7832, 7814-7833, 7815-7831, 7815-7832, 7815-7833, 7815-7834, 7816-7832, 7816-7833, 7816-7834, 7816-7835, 7817-7833, 7817-7834, 7817-7835, 7817-7836, 7818-7834, 7818-7835, 7818-7836, 7818-7837, 7819-7835, 7819-7836, 7819-7837, 7819-7838, 7820-7836, 7820-7838, 7820-7839, 7821-7836, 7821-7837, 7821-7839, 7821-7840, 7822-7837, 7822-7838, 7822-7840, 7822-7841, 7823-7838, 7823-7839, 7823-7839, 7823-7840, 7823-7841, 7823-7842, 7824-7839, 7824-7840, 7824-7840, 7824-7841, 7824-7842, 7824-7843, 7825-7840, 7825-7841, 7825-7842, 7825-7843, 7825-7844, 7826-7842, 7826-7843, 7826-7844, 7826-7845, 7827-7842, 7827-7843, 7827-7844, 7827-7845, 7827-7846, 7828-7843, 7828-7844, 7828-7845, 7828-7847, 7829-7844, 7829-7845, 7829-7846, 7829-7847, 7829-7848, 7830-7845, 7830-7846, 7830-7847, 7830-7848, 7830-7849, 7831-7846, 7831-7847, 7831-7848, 7831-7849, 7831-7850, 7832-7847, 7832-7848, 7832-7849, 7832-7850, 7832-7851, 7833-7848, 7833-7849, 7833-7850, 7833-7851, 7833-7852, 7834-7849, 7834-7850, 7834-7851, 7834-7852, 7834-7853, 7835-7850, 7835-7851, 7835-7852, 7835-7853, 7835-7854, 7836-7851, 7836-7852, 7836-7853, 7836-7854, 7836-7855, 7837-7852, 7837-7853, 7837-7854, 7837-7855, 7837-7856, 7838-7853, 7838-7854, 7838-7855, 7838-7856, 7838-7857, 7839-7854, 7839-7855, 7839-7856, 7839-7857, 7839-7858, 7840-7855, 7840-7856, 7840-7857, 7840-7858, 7840-7859, 7841-7856, 7841-7857, 7841-7858, 7841-7859, 7841-7860, 7842-7857, 7842-7858, 7842-7859, 7842-7860, 7842-7861, 7843-7858, 7843-7859, 7843-7860, 7843-7861, 7843-7862, 7844-7859, 7844-7860, 7844-7861, 7844-7862, 7845-7860, 7845-7861, 7845-7862, 7846-7861 и 7846-7862.

В некоторых вариантах реализации соединения содержит или состоит из конъюгата и модифицированного олигонуклеотида, направленного на 3' НТО нуклеиновой кислоты CFB. В некоторых аспектах модифицированный олигонуклеотид направлен на диапазон нуклеотидов 2574-2626 нуклеиновой кислоты CFB, имеющей последовательность азотистых оснований SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах модифицированный олигонуклеотид имеет часть из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 смежных азотистых оснований, комплементарную равной по длине части в диапазоне нуклеотидов 2576-2626 нуклеиновой кислоты CFB, имеющей последовательность азотистых оснований SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах реализации соединения содержит или состоит из конъюгата и модифицированного олигонуклеотида, направленного на область нуклеиновой кислоты CFB, имеющую последовательность азотистых оснований SEQ ID NO: 1 в диапазоне азотистых оснований 2457-2631, 2457-2472, 2457-2474, 2457-2476, 2457-2566, 2457-2570, 2457-2571, 2457-2572, 2457-2573, 2457-2574, 2457-2575, 2457-2576, 2457-2577, 2457-2578, 2457-2579, 2457-2580, 2457-2581, 2457-2582, 2457-2583, 2457-2584, 2457-2585, 2457-2586, 2457-2587, 2457-2588, 2457-2589, 2457-2590, 2457-2591, 2457-2592, 2457-2593, 2457-2594, 2457-2595, 2457-2596, 2457-2597, 2457-2598, 2457-2599, 2457-2600, 2457-2601, 2457-2602, 2457-2603, 2457-2604, 2457-2605, 2457-2606, 2457-2607, 2457-2608, 2457-2609, 2457-2610, 2457-2611, 2457-2612, 2457-2613, 2457-2614, 2457-2615, 2457-2616, 2457-2617, 2457-2618, 2457-2619, 2457-2620, 2457-2621, 2457-2622, 2457-2623, 2457-2624, 2457-2625, 2457-2626, 2457-2627, 2457-2628, 2457-2629, 2457-2630, 2457-2631, 2459-2474, 2459-2476, 2459-2566, 2459-2570, 2459-2571, 2459-2572, 2459-2573, 2459-2574, 2459-2575, 2459-2576, 2459-2577, 2459-2578, 2459-2579, 2459-2580, 2459-2581, 2459-2582, 2459-2583, 2459-2584, 2459-2585, 2459-2586, 2459-2587, 2459-2588, 2459-2589, 2459-2590, 2459-2591, 2459-2592, 2459-2593, 2459-2594, 2459-2595, 2459-2596, 2459-2597, 2459-2598, 2459-2599, 2459-2600, 2459-2601, 2459-2602, 2459-2603, 2459-2604, 2459-2605, 2459-2606, 2459-2607, 2459-2608, 2459-2609, 2459-2610, 2459-2611, 2459-2612, 2459-2613, 2459-2614, 2459-2615, 2459-2616, 2459-2617, 2459-2618, 2459-2619, 2459-2620, 2459-2621, 2459-2622, 2459-2623, 2459-2624, 2459-2625, 2459-2626, 2459-2627, 2459-2628, 2459-2629, 2459-2630, 2459-2631, 2461-2476, 2461-2566, 2461-2570, 2461-2571, 2461-2572, 2461-2573, 2461-2574, 2461-2575, 2461-2576, 2461-2577, 2461-2578, 2461-2579, 2461-2580, 2461-2581, 2461-2582, 2461-2583, 2461-2584, 2461-2585, 2461-2586, 2461-2587, 2461-2588, 2461-2589, 2461-2590, 2461-2591, 2461-2592, 2461-2593, 2461-2594, 2461-2595, 2461-2596, 2461-2597, 2461-2598, 2461-2599,

2461-2600,	2461-2601,	2461-2602,	2461-2603,	2461-2604,	2461-2605,	2461-2606,	2461-2607,	2461-2608,
2461-2609,	2461-2610,	2461-2611,	2461-2612,	2461-2613,	2461-2614,	2461-2615,	2461-2616,	2461-2617,
2461-2618,	2461-2619,	2461-2620,	2461-2621,	2461-2622,	2461-2623,	2461-2624,	2461-2625,	2461-2626,
2461-2627,	2461-2628,	2461-2629,	2461-2630,	2461-2631,	2551-2566,	2551-2570,	2551-2571,	2551-2572,
2551-2573,	2551-2574,	2551-2575,	2551-2576,	2551-2577,	2551-2578,	2551-2579,	2551-2580,	2551-2581,
2551-2582,	2551-2583,	2551-2584,	2551-2585,	2551-2586,	2551-2587,	2551-2588,	2551-2589,	2551-2590,
2551-2591,	2551-2592,	2551-2593,	2551-2594,	2551-2595,	2551-2596,	2551-2597,	2551-2598,	2551-2599,
2551-2600,	2551-2601,	2551-2602,	2551-2603,	2551-2604,	2551-2605,	2551-2606,	2551-2607,	2551-2608,
2551-2609,	2551-2610,	2551-2611,	2551-2612,	2551-2613,	2551-2614,	2551-2615,	2551-2616,	2551-2617,
2551-2618,	2551-2619,	2551-2620,	2551-2621,	2551-2622,	2551-2623,	2551-2624,	2551-2625,	2551-2626,
2551-2627,	2551-2628,	2551-2629,	2551-2630,	2551-2631,	2553-2570,	2553-2571,	2553-2572,	2553-2573,
2553-2574,	2553-2575,	2553-2576,	2553-2577,	2553-2578,	2553-2579,	2553-2580,	2553-2581,	2553-2582,
2553-2583,	2553-2584,	2553-2585,	2553-2586,	2553-2587,	2553-2588,	2553-2589,	2553-2590,	2553-2591,
2553-2592,	2553-2593,	2553-2594,	2553-2595,	2553-2596,	2553-2597,	2553-2598,	2553-2599,	2553-2600,
2553-2601,	2553-2602,	2553-2603,	2553-2604,	2553-2605,	2553-2606,	2553-2607,	2553-2608,	2553-2609,
2553-2610,	2553-2611,	2553-2612,	2553-2613,	2553-2614,	2553-2615,	2553-2616,	2553-2617,	2553-2618,
2553-2619,	2553-2620,	2553-2621,	2553-2622,	2553-2623,	2553-2624,	2553-2625,	2553-2626,	2553-2627,
2553-2628,	2553-2629,	2553-2630,	2553-2631,	2554-2573,	2554-2574,	2554-2575,	2554-2576,	2554-2577,
2554-2578,	2554-2579,	2554-2580,	2554-2581,	2554-2582,	2554-2583,	2554-2584,	2554-2585,	2554-2586,
2554-2587,	2554-2588,	2554-2589,	2554-2590,	2554-2591,	2554-2592,	2554-2593,	2554-2594,	2554-2595,
2554-2596,	2554-2597,	2554-2598,	2554-2599,	2554-2600,	2554-2601,	2554-2602,	2554-2603,	2554-2604,
2554-2605,	2554-2606,	2554-2607,	2554-2608,	2554-2609,	2554-2610,	2554-2611,	2554-2612,	2554-2613,
2554-2614,	2554-2615,	2554-2616,	2554-2617,	2554-2618,	2554-2619,	2554-2620,	2554-2621,	2554-2622,
2554-2623,	2554-2624,	2554-2625,	2554-2626,	2554-2627,	2554-2628,	2554-2629,	2554-2630,	2554-2631,
2555-2572,	2555-2573,	2555-2574,	2555-2575,	2555-2576,	2555-2577,	2555-2578,	2555-2579,	2555-2580,
2555-2581,	2555-2582,	2555-2583,	2555-2584,	2555-2585,	2555-2586,	2555-2587,	2555-2588,	2555-2589,
2555-2590,	2555-2591,	2555-2592,	2555-2593,	2555-2594,	2555-2595,	2555-2596,	2555-2597,	2555-2598,
2555-2599,	2555-2600,	2555-2601,	2555-2602,	2555-2603,	2555-2604,	2555-2605,	2555-2606,	2555-2607,
2555-2608,	2555-2609,	2555-2610,	2555-2611,	2555-2612,	2555-2613,	2555-2614,	2555-2615,	2555-2616,
2555-2617,	2555-2618,	2555-2619,	2555-2620,	2555-2621,	2555-2622,	2555-2623,	2555-2624,	2555-2625,
2555-2626,	2555-2627,	2555-2628,	2555-2629,	2555-2630,	2555-2631,	2556-2573,	2556-2574,	2556-2575,
2556-2576,	2556-2577,	2556-2578,	2556-2579,	2556				

2572-2604,	2572-2605,	2572-2606,	2572-2607,	2572-2608,	2572-2609,	2572-2610,	2572-2611,	2572-2612,
2572-2613,	2572-2614,	2572-2615,	2572-2616,	2572-2617,	2572-2618,	2572-2619,	2572-2620,	2572-2621,
2572-2622,	2572-2623,	2572-2624,	2572-2625,	2572-2626,	2572-2627,	2572-2628,	2572-2629,	2572-2630,
2572-2631,	2573-2590,	2573-2591,	2573-2592,	2573-2593,	2573-2594,	2573-2595,	2573-2596,	2573-2597,
2573-2598,	2573-2599,	2573-2600,	2573-2601,	2573-2602,	2573-2603,	2573-2604,	2573-2605,	2573-2606,
2573-2607,	2573-2608,	2573-2609,	2573-2610,	2573-2611,	2573-2612,	2573-2613,	2573-2614,	2573-2615,
2573-2616,	2573-2617,	2573-2618,	2573-2619,	2573-2620,	2573-2621,	2573-2622,	2573-2623,	2573-2624,
2573-2625,	2573-2626,	2573-2627,	2573-2628,	2573-2629,	2573-2630,	2573-2631,	2574-2591,	2574-2592,
2574-2593,	2574-2594,	2574-2595,	2574-2596,	2574-2597,	2574-2598,	2574-2599,	2574-2600,	2574-2601,
2574-2602,	2574-2603,	2574-2604,	2574-2605,	2574-2606,	2574-2607,	2574-2608,	2574-2609,	2574-2610,
2574-2611,	2574-2612,	2574-2613,	2574-2614,	2574-2615,	2574-2616,	2574-2617,	2574-2618,	2574-2619,
2574-2620,	2574-2621,	2574-2622,	2574-2623,	2574-2624,	2574-2625,	2574-2626,	2574-2627,	2574-2628,
2574-2629,	2574-2630,	2574-2631,	2575-2592,	2575-2593,	2575-2594,	2575-2595,	2575-2596,	2575-2597,
2575-2598,	2575-2599,	2575-2600,	2575-2601,	2575-2602,	2575-2603,	2575-2604,	2575-2605,	2575-2606,
2575-2607,	2575-2608,	2575-2609,	2575-2610,	2575-2611,	2575-2612,	2575-2613,	2575-2614,	2575-2615,
2575-2616,	2575-2617,	2575-2618,	2575-2619,	2575-2620,	2575-2621,	2575-2622,	2575-2623,	2575-2624,
2575-2625,	2575-2626,	2575-2627,	2575-2628,	2575-2629,	2575-2630,	2575-2631,	2576-2593,	2576-2594,
2576-2595,	2576-2596,	2576-2597,	2576-2598,	2576-2599,	2576-2600,	2576-2601,	2576-2602,	2576-2603,
2576-2604,	2576-2605,	2576-2606,	2576-2607,	2576-2608,	2576-2609,	2576-2610,	2576-2611,	2576-2612,
2576-2613,	2576-2614,	2576-2615,	2576-2616,	2576-2617,	2576-2618,	2576-2619,	2576-2620,	2576-2621,
2576-2622,	2576-2623,	2576-2624,	2576-2625,	2576-2626,	2576-2627,	2576-2628,	2576-2629,	2576-2630,
2576-2631,	2577-2594,	2577-2595,	2577-2596,	2577-2597,	2577-2598,	2577-2599,	2577-2600,	2577-2601,
2577-2602,	2577-2603,	2577-2604,	2577-2605,	2577-2606,	2577-2607,	2577-2608,	2577-2609,	2577-2610,
2577-2611,	2577-2612,	2577-2613,	2577-2614,	2577-2615,	2577-2616,	2577-2617,	2577-2618,	2577-2619,
2577-2620,	2577-2621,	2577-2622,	2577-2623,	2577-2624,	2577-2625,	2577-2626,	2577-2627,	2577-2628,
2577-2629,	2577-2630,	2577-2631,	2578-2597,	2578-2598,	2578-2599,	2578-2600,	2578-2601,	2578-2602,
2578-2603,	2578-2604,	2578-2605,	2578-2606,	2578-2607,	2578-2608,	2578-2609,	2578-2610,	2578-2611,
2578-2612,	2578-2613,	2578-2614,	2578-2615,	2578-2616,	2578-2617,	2578-2618,	2578-2619,	2578-2620,
2578-2621,	2578-2622,	2578-2623,	2578-2624,	2578-2625,	2578-2626,	2578-2627,	2578-2628,	2578-2629,
2578-2630,	2578-2631,	2579-2598,	2579-2599,	2579-2600,	2579-2601,	2579-2602,	2579-2603,	2579-2604,
2579-2605,	2579-2606,	2579-2607,	2579-2608,	2579-2609,	2579-2610,	2579-2611,	2579-2612,	2579-2613,
2579-2614,	2579-2615,	2579-2616,	2579-2617,	2579				

2589-2626, 2589-2627, 2589-2628, 2589-2629, 2589-2630, 2589-2631, 2590-2606, 2590-2607, 2590-2608, 2590-2609, 2590-2610, 2590-2611, 2590-2612, 2590-2613, 2590-2614, 2590-2615, 2590-2616, 2590-2617, 2590-2618, 2590-2619, 2590-2620, 2590-2621, 2590-2622, 2590-2623, 2590-2624, 2590-2625, 2590-2626, 2590-2627, 2590-2628, 2590-2629, 2590-2630, 2590-2631, 2591-2610, 2591-2611, 2591-2612, 2591-2613, 2591-2614, 2591-2615, 2591-2616, 2591-2617, 2591-2618, 2591-2619, 2591-2620, 2591-2621, 2591-2622, 2591-2623, 2591-2624, 2591-2625, 2591-2626, 2591-2627, 2591-2628, 2591-2629, 2591-2630, 2591-2631, 2592-2611, 2592-2612, 2592-2613, 2592-2614, 2592-2615, 2592-2616, 2592-2617, 2592-2618, 2592-2619, 2592-2620, 2592-2621, 2592-2622, 2592-2623, 2592-2624, 2592-2625, 2592-2626, 2592-2627, 2592-2628, 2592-2629, 2592-2630, 2592-2631, 2593-2608, 2593-2612, 2593-2613, 2593-2614, 2593-2615, 2593-2616, 2593-2617, 2593-2618, 2593-2619, 2593-2620, 2593-2621, 2593-2622, 2593-2623, 2593-2624, 2593-2625, 2593-2626, 2593-2627, 2593-2628, 2593-2629, 2593-2630, 2593-2631, 2594-2612, 2594-2613, 2594-2614, 2594-2615, 2594-2616, 2594-2617, 2594-2618, 2594-2619, 2594-2620, 2594-2621, 2594-2622, 2594-2623, 2594-2624, 2594-2625, 2594-2626, 2594-2627, 2594-2628, 2594-2629, 2594-2630, 2594-2631, 2595-2611, 2595-2612, 2595-2613, 2595-2614, 2595-2615, 2595-2616, 2595-2617, 2595-2618, 2595-2619, 2595-2620, 2595-2621, 2595-2622, 2595-2623, 2595-2624, 2595-2625, 2595-2626, 2595-2627, 2595-2628, 2595-2629, 2595-2630, 2595-2631, 2596-2614, 2596-2615, 2596-2616, 2596-2617, 2596-2618, 2596-2619, 2596-2620, 2596-2621, 2596-2622, 2596-2623, 2596-2624, 2596-2625, 2596-2626, 2596-2627, 2596-2628, 2596-2629, 2596-2630, 2596-2631, 2597-2612, 2597-2613, 2597-2614, 2597-2615, 2597-2616, 2597-2617, 2597-2618, 2597-2619, 2597-2620, 2597-2621, 2597-2622, 2597-2623, 2597-2624, 2597-2625, 2597-2626, 2597-2627, 2597-2628, 2597-2629, 2597-2630, 2597-2631, 2598-2613, 2598-2614, 2598-2615, 2598-2616, 2598-2617, 2598-2618, 2598-2619, 2598-2620, 2598-2621, 2598-2622, 2598-2623, 2598-2624, 2598-2625, 2598-2626, 2598-2627, 2598-2628, 2598-2629, 2598-2630, 2598-2631, 2599-2614, 2599-2615, 2599-2616, 2599-2617, 2599-2618, 2599-2619, 2599-2620, 2599-2621, 2599-2622, 2599-2623, 2599-2624, 2599-2625, 2599-2626, 2599-2627, 2599-2628, 2599-2629, 2599-2630, 2599-2631, 2600-2615, 2600-2616, 2600-2617, 2600-2618, 2600-2619, 2600-2620, 2600-2621, 2600-2622, 2600-2623, 2600-2624, 2600-2625, 2600-2626, 2600-2627, 2600-2628, 2600-2629, 2600-2630, 2600-2631, 2601-2616, 2601-2617, 2601-2618, 2601-2619, 2601-2620, 2601-2621, 2601-2622, 2601-2623, 2601-2624, 2601-2625, 2601-2626, 2601-2627, 2601-2628, 2601-2629, 2601-2630, 2601-2631, 2602-2618, 2602-2619, 2602-2620, 2602-2621, 2602-2622, 2602-2623, 2602-2624, 2602-2625, 2602-2626, 2602-2627, 2602-2628, 2602-2629, 2602-2630, 2602-2631, 2603-2620, 2603-2621, 2603-2622, 2603-2623, 2603-2624, 2603-2625, 2603-2626, 2603-2627, 2603-2628, 2603-2629, 2603-2630, 2603-2631, 2604-2619, 2604-2620, 2604-2621, 2604-2622, 2604-2623, 2604-2624, 2604-2625, 2604-2626, 2604-2627, 2604-2628, 2604-2629, 2604-2630, 2604-2631, 2605-2620, 2605-2621, 2605-2622, 2605-2623, 2605-2624, 2605-2625, 2605-2626, 2605-2627, 2605-2628, 2605-2629, 2605-2630, 2605-2631, 2606-2621, 2606-2622, 2606-2623, 2606-2624, 2606-2625, 2606-2626, 2606-2627, 2606-2628, 2606-2629, 2606-2630, 2606-2631, 2607-2622, 2607-2623, 2607-2624, 2607-2625, 2607-2626, 2607-2627, 2607-2628, 2607-2629, 2607-2630, 2607-2631, 2608-2623, 2608-2624, 2608-2625, 2608-2626, 2608-2627, 2608-2628, 2608-2629, 2608-2630, 2608-2631, 2609-2624, 2609-2625, 2609-2626, 2609-2627, 2609-2628, 2609-2629, 2609-2630, 2609-2631, 2610-2625, 2610-2626, 2610-2627, 2610-2628, 2610-2629, 2610-2630, 2610-2631, 2611-2626, 2611-2627, 2611-2628, 2611-2629, 2611-2630, 2611-2631, 2612-2627, 2612-2628, 2612-2629, 2612-2630, 2612-2631, 2613-2628, 2613-2629, 2613-2630, 2613-2631, 2614-2629, 2614-2630, 2614-2631, 2615-2630, 2615-2631 или 2616-2631. В некоторых аспектах антисмысловые соединения или олигонуклеотиды направлены на по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 смежных азотистых оснований в пределах вышеуказанных областей азотистых оснований.

В некоторых вариантах реализации следующие нуклеотидные области SEQ ID NO: 1, при направленном воздействии антисмысловых соединений или олигонуклеотидов, демонстрируют по меньшей мере 50% ингибирование: 30-49, 48-63, 150-169, 151-170, 152-171, 154-169, 154-173, 156-171, 156-175, 157-176, 158-173, 158-177, 480-499, 600-619, 638-657, 644-663, 738-757, 1089-1108, 1135-1154, 1141-1160, 1147-1166, 1150-1169, 1153-1172, 1159-1178, 1162-1181, 1165-1184, 1171-1186, 1171-1190, 1173-1188, 1173-1192, 1175-1190, 1175-1194, 1177-1196, 1183-1202, 1208-1227, 1235-1254, 1298-1317, 1304-1323, 1310-1329, 1316-1335, 1319-1338, 1322-1341, 1328-1347, 1349-1368, 1355-1374, 1393-1412, 1396-1415, 1399-1418, 1405-1424, 1421-1440, 1621-1640, 1646-1665, 1646-1665, 1647-1666, 1689-1708, 1749-1768, 1763-1782, 1912-1931, 2073-2092, 2085-2104, 2166-2185, 2172-2191, 2189-2208, 2191-2210, 2193-2212, 2195-2210, 2195-2214, 2196-2215, 2197-2212, 2197-2216, 2202-2221, 2223-2238, 2223-2242, 2225-2240, 2226-2245, 2227-2242, 2227-2246, 2238-2257, 2241-2260, 2267-2286, 2361-2380, 2388-2407, 2397-2416, 2448-2467, 2453-2472, 2455-2474, 2457-2472, 2457-2476, 2459-2474, 2459-2478, 2461-2476, 2461-2480, 2532-2551, 2550-2569, 2551-2566, 2551-2570, 2552-2568, 2552-2570, 2552-2571, 2553-2568, 2553-2570, 2553-2571, 2553-2572, 2554-2571, 2554-2572, 2554-2573, 2555-2570, 2555-2572, 2555-2574, 2556-2573, 2556-2574, 2556-2575, 2557-2573, 2557-2574, 2557-2575, 2557-2576, 2558-2575, 2558-2576, 2558-2577, 2559-2576, 2559-2577, 2559-2578, 2560-2577, 2560-2578, 2560-2579, 2561-2576, 2561-2578, 2561-2579, 2561-2580, 2562-2577, 2562-2579, 2562-2581, 2563-2578, 2563-2580, 2563-2582, 2564-2581, 2564-2583, 2565-2584, 2566-2583, 2566-2585, 2567-2582, 2567-2584, 2567-2586, 2568-2583, 2568-2585, 2568-2587, 2569-2586, 2569-2588, 2570-2585, 2570-2587, 2570-2589, 2571-2586, 2571-2588, 2571-2590, 2572-2589,

2572-2590, 2572-2591, 2573-2590, 2573-2592, 2574-2590, 2574-2591, 2574-2593, 2575-2590, 2575-2591, 2575-2592, 2575-2594, 2576-2593, 2576-2595, 2577-2594, 2577-2595, 2577-2596, 2578-2594, 2578-2596, 2578-2597, 2579-2598, 2580-2596, 2580-2597, 2580-2598, 2580-2599, 2581-2597, 2581-2598, 2581-2599, 2581-2600, 2582-2598, 2582-2599, 2582-2600, 2582-2601, 2583-2599, 2583-2600, 2583-2601, 2583-2602, 2584-2600, 2584-2601, 2584-2602, 2584-2603, 2585-2601, 2585-2603, 2585-2604, 2586-2601, 2586-2602, 2586-2604, 2586-2605, 2587-2602, 2587-2603, 2587-2605, 2587-2606, 2588-2603, 2588-2604, 2588-2605, 2588-2606, 2588-2607, 2589-2604, 2589-2605, 2589-2606, 2589-2607, 2589-2608, 2590-2605, 2590-2606, 2590-2607, 2590-2608, 2590-2609, 2590-2609, 2591-2607, 2591-2608, 2591-2609, 2591-2610, 2592-2607, 2592-2608, 2592-2609, 2592-2610, 2592-2611, 2593-2608, 2593-2609, 2593-2610, 2593-2612, 2594-2609, 2594-2610, 2594-2611, 2594-2612, 2594-2613, 2595-2610, 2595-2611, 2595-2612, 2595-2613, 2595-2614, 2596-2611, 2596-2612, 2596-2613, 2596-2614, 2596-2615, 2597-2612, 2597-2612, 2597-2613, 2597-2614, 2597-2615, 2597-2616, 2598-2613, 2598-2614, 2598-2615, 2598-2616, 2598-2617, 2599-2614, 2599-2615, 2599-2616, 2599-2617, 2599-2618, 2600-2615, 2600-2616, 2600-2617, 2600-2618, 2600-2619, 2601-2616, 2601-2617, 2601-2618, 2601-2619, 2601-2620, 2602-2617, 2602-2618, 2602-2619, 2602-2620, 2602-2621, 2603-2618, 2603-2619, 2603-2620, 2603-2621, 2603-2622, 2604-2619, 2604-2620, 2604-2621, 2604-2622, 2604-2623, 2605-2620, 2605-2621, 2605-2622, 2605-2623, 2605-2624, 2606-2621, 2606-2622, 2606-2623, 2606-2624, 2606-2625, 2607-2622, 2607-2623, 2607-2624, 2607-2625, 2607-2626, 2608-2623, 2608-2624, 2608-2625, 2608-2626, 2608-2627, 2609-2624, 2609-2625, 2609-2626, 2609-2627, 2609-2628, 2610-2625, 2610-2626, 2610-2627, 2610-2628, 2610-2629, 2611-2626, 2611-2627, 2611-2628, 2611-2629, 2611-2630, 2612-2627, 2612-2628, 2612-2629, 2612-2630, 2612-2631, 2613-2628, 2613-2629, 2613-2630, 2613-2631, 2614-2629, 2614-2630, 2614-2631, 2615-2630, 2615-2631 и 2616-2631.

В некоторых вариантах реализации следующие нуклеотидные области SEQ ID NO: 2, при направленном воздействии антисмысловых соединений или олигонуклеотидов, демонстрируют по меньшей мере 50% ингибирование: 1608-1627, 1685-1704, 1686-1705, 1751-1770, 1769-1784, 1871-1890, 1872-1891, 1873-1892, 1875-1890, 1875-1894, 1877-1892, 1877-1896, 1878-1897, 1879-1894, 1879-1898, 2288-2307, 2808-2827, 2846-2865, 2852-2871, 2946-2965, 3773-3792, 3819-3838, 3825-3844, 3831-3850, 3834-3853, 3837-3856, 3843-3862, 4151-4166, 4151-4170, 4153-4172, 4159-4178, 4184-4203, 4211-4230, 4609-4628, 4612-4631, 4615-4634, 4621-4640, 4642-4661, 4648-4667, 4686-4705, 4689-4708, 4692-4711, 4698-4717, 4714-4733, 5270-5289, 5295-5314, 5296-5315, 5830-5849, 5890-5909, 5904-5923, 6406-6425, 6662-6681, 6674-6693, 6954-6973, 6960-6979, 6977-6996, 6979-6998, 6981-7000, 6983-6998, 6983-7002, 6984-7003, 6985-7000, 6985-7004, 6990-7009, 7122-7141, 7125-7144, 7151-7170, 7353-7372, 7362-7381, 7683-7702, 7688-7707, 7690-7709, 7692-7707, 7692-7711, 7694-7709, 7694-7713, 7696-7711, 7696-7715, 7767-7786, 7785-7804, 7786-7801, 7787-7803, 7787-7805, 7787-7806, 7788-7803, 7788-7805, 7788-7806, 7788-7807, 7789-7806, 7789-7807, 7789-7808, 7790-7805, 7790-7807, 7790-7809, 7791-7808, 7791-7809, 7791-7810, 7792-7808, 7792-7809, 7792-7810, 7792-7811, 7793-7810, 7793-7812, 7794-7811, 7794-7812, 7794-7813, 7795-7812, 7795-7813, 7795-7814, 7796-7811, 7796-7813, 7796-7814, 7796-7815, 7797-7812, 7797-7814, 7797-7816, 7798-7813, 7798-7815, 7798-7817, 7799-7816, 7799-7818, 7800-7819, 7801-7818, 7801-7820, 7802-7817, 7802-7819, 7802-7821, 7803-7818, 7803-7820, 7803-7822, 7804-7821, 7804-7823, 7805-7820, 7805-7822, 7805-7824, 7806-7821, 7806-7823, 7806-7825, 7807-7824, 7807-7825, 7807-7826, 7808-7825, 7808-7827, 7809-7825, 7809-7826, 7809-7828, 7810-7825, 7810-7826, 7810-7827, 7810-7829, 7811-7828, 7811-7830, 7812-7829, 7812-7830, 7812-7831, 7813-7829, 7813-7831, 7813-7832, 7814-7833, 7815-7831, 7815-7832, 7815-7833, 7815-7834, 7816-7832, 7816-7833, 7816-7834, 7816-7835, 7817-7833, 7817-7834, 7817-7835, 7817-7836, 7818-7834, 7818-7835, 7818-7836, 7818-7837, 7819-7835, 7819-7836, 7819-7837, 7819-7838, 7820-7836, 7820-7838, 7820-7839, 7821-7836, 7821-7837, 7821-7839, 7821-7840, 7822-7837, 7822-7838, 7822-7840, 7822-7841, 7823-7838, 7823-7839, 7823-7839, 7823-7840, 7823-7841, 7823-7842, 7824-7839, 7824-7840, 7824-7840, 7824-7841, 7824-7842, 7824-7843, 7825-7840, 7825-7841, 7825-7842, 7825-7843, 7825-7844, 7826-7842, 7826-7843, 7826-7844, 7826-7845, 7827-7842, 7827-7843, 7827-7844, 7827-7845, 7827-7846, 7828-7843, 7828-7844, 7828-7845, 7828-7847, 7829-7844, 7829-7845, 7829-7846, 7829-7847, 7829-7848, 7830-7845, 7830-7846, 7830-7847, 7830-7848, 7830-7849, 7831-7846, 7831-7847, 7831-7848, 7831-7849, 7831-7850, 7832-7847, 7832-7848, 7832-7849, 7832-7850, 7832-7851, 7833-7848, 7833-7849, 7833-7850, 7833-7851, 7833-7852, 7834-7849, 7834-7850, 7834-7851, 7834-7852, 7834-7853, 7835-7850, 7835-7851, 7835-7852, 7835-7853, 7835-7854, 7836-7851, 7836-7852, 7836-7853, 7836-7854, 7836-7855, 7837-7852, 7837-7853, 7837-7854, 7837-7855, 7837-7856, 7838-7853, 7838-7854, 7838-7855, 7838-7856, 7838-7857, 7839-7854, 7839-7855, 7839-7856, 7839-7857, 7839-7858, 7840-7855, 7840-7856, 7840-7857, 7840-7858, 7840-7859, 7841-7856, 7841-7857, 7841-7858, 7841-7859, 7841-7860, 7842-7857, 7842-7858, 7842-7859, 7842-7860, 7842-7861, 7843-7858, 7843-7859, 7843-7860, 7843-7861, 7843-7862, 7844-7859, 7844-7860, 7844-7861, 7844-7862, 7845-7860, 7845-7861, 7845-7862, 7846-7861 и 7846-7862.

В некоторых вариантах реализации следующие нуклеотидные области SEQ ID NO: 1, при направленном воздействии антисмысловых соединений или олигонуклеотидов, демонстрируют по меньшей мере 60% ингибирование: 48-63, 150-169, 152-171, 154-169, 154-173, 156-171, 156-175, 158-173, 158-177, 600-619, 1135-1154, 1141-1160, 1147-1166, 1153-1172, 1171-1186, 1173-1188, 1175-1190, 1749-1768, 1763-

1782, 1763-1782, 1912-1931, 2189-2208, 2191-2210, 2193-2212, 2195-2210, 2195-2214, 2197-2212, 2197-2216, 2223-2238, 2225-2240, 2227-2242, 2238-2257, 2448-2467, 2453-2472, 2455-2474, 2457-2472, 2457-2476, 2459-2474, 2459-2478, 2461-2476, 2461-2480, 2550-2569, 2551-2566, 2552-2571, 2553-2568, 2553-2570, 2553-2571, 2553-2572, 2554-2571, 2554-2572, 2554-2573, 2555-2572, 2555-2574, 2556-2573, 2556-2574, 2556-2575, 2557-2574, 2557-2575, 2557-2576, 2558-2575, 2558-2576, 2558-2577, 2559-2576, 2559-2577, 2559-2578, 2560-2577, 2560-2578, 2560-2579, 2561-2578, 2561-2579, 2561-2580, 2562-2577, 2562-2579, 2562-2581, 2563-2578, 2563-2580, 2563-2582, 2564-2581, 2564-2583, 2565-2584, 2566-2583, 2566-2585, 2567-2582, 2567-2584, 2567-2586, 2568-2583, 2568-2585, 2568-2587, 2569-2586, 2569-2588, 2570-2587, 2570-2589, 2571-2588, 2572-2590, 2572-2591, 2573-2590, 2573-2592, 2574-2591, 2574-2593, 2575-2590, 2575-2592, 2575-2594, 2576-2593, 2576-2595, 2577-2594, 2577-2595, 2577-2596, 2578-2594, 2578-2597, 2579-2598, 2580-2596, 2580-2597, 2580-2598, 2580-2599, 2581-2597, 2581-2598, 2581-2599, 2581-2600, 2582-2598, 2582-2599, 2582-2600, 2582-2601, 2583-2599, 2583-2600, 2583-2601, 2583-2602, 2584-2600, 2584-2602, 2584-2603, 2585-2601, 2585-2603, 2585-2604, 2586-2602, 2586-2604, 2586-2605, 2587-2603, 2587-2605, 2587-2606, 2588-2603, 2588-2604, 2588-2606, 2588-2607, 2589-2605, 2589-2606, 2589-2607, 2589-2608, 2590-2605, 2590-2606, 2590-2607, 2590-2608, 2590-2609, 2591-2607, 2591-2609, 2591-2610, 2592-2608, 2592-2609, 2592-2611, 2593-2608, 2593-2609, 2593-2612, 2594-2609, 2594-2610, 2594-2611, 2594-2612, 2594-2613, 2595-2610, 2595-2611, 2595-2612, 2595-2613, 2595-2614, 2596-2611, 2596-2612, 2596-2613, 2596-2614, 2596-2615, 2597-2612, 2597-2613, 2597-2614, 2597-2615, 2597-2616, 2598-2613, 2598-2614, 2598-2615, 2598-2616, 2598-2617, 2599-2614, 2599-2615, 2599-2616, 2599-2617, 2599-2618, 2600-2615, 2600-2616, 2600-2617, 2600-2618, 2600-2619, 2601-2616, 2601-2617, 2601-2618, 2601-2619, 2601-2620, 2602-2617, 2602-2618, 2602-2619, 2602-2620, 2602-2621, 2603-2618, 2603-2619, 2603-2620, 2603-2621, 2603-2622, 2604-2619, 2604-2620, 2604-2621, 2604-2622, 2604-2623, 2605-2620, 2605-2621, 2605-2622, 2605-2623, 2605-2624, 2606-2621, 2606-2622, 2606-2623, 2606-2624, 2606-2625, 2607-2622, 2607-2623, 2607-2624, 2607-2625, 2607-2626, 2608-2623, 2608-2624, 2608-2625, 2608-2625, 2608-2626, 2608-2627, 2609-2624, 2609-2625, 2609-2626, 2609-2627, 2609-2628, 2610-2625, 2610-2626, 2610-2627, 2610-2628, 2610-2629, 2611-2626, 2611-2626, 2611-2627, 2611-2628, 2611-2629, 2611-2630, 2612-2627, 2612-2628, 2612-2629, 2612-2630, 2612-2631, 2613-2628, 2613-2629, 2613-2630, 2613-2631, 2614-2629, 2614-2630, 2614-2631, 2615-2630, 2615-2630, 2615-2631, 2615-2631 и 2616-2631.

В некоторых вариантах реализации следующие нуклеотидные области SEQ ID NO: 2, при направленном воздействии антисмысловых соединений или олигонуклеотидов, демонстрируют по меньшей мере 60% ингибирование: 1685-1704, 1686-1705, 1769-1784, 1871-1890, 1873-1892, 1875-1890, 1875-1894, 1877-1892, 1877-1896, 1879-1894, 1879-1898, 2808-2827, 3819-3838, 3825-3844, 3831-3850, 3837-3856, 4151-4166, 5890-5909, 5904-5923, 5904-5923, 6406-6425, 6977-6996, 6979-6998, 6981-7000, 6983-6998, 6983-7002, 6985-7000, 6985-7004, 7122-7141, 7683-7702, 7688-7707, 7690-7709, 7692-7707, 7692-7711, 7694-7709, 7696-7711, 7696-7715, 7786-7801, 7787-7806, 7788-7803, 7788-7805, 7788-7806, 7788-7807, 7789-7806, 7789-7807, 7789-7808, 7790-7807, 7790-7809, 7791-7808, 7791-7809, 7791-7810, 7792-7809, 7792-7810, 7792-7811, 7793-7810, 7793-7811, 7793-7812, 7794-7811, 7794-7812, 7794-7813, 7795-7812, 7795-7813, 7795-7814, 7796-7813, 7796-7814, 7796-7815, 7797-7812, 7797-7814, 7797-7816, 7798-7813, 7798-7815, 7798-7817, 7799-7816, 7799-7818, 7800-7819, 7801-7818, 7801-7820, 7802-7817, 7802-7819, 7802-7821, 7803-7818, 7803-7820, 7803-7822, 7804-7821, 7804-7823, 7805-7822, 7805-7824, 7806-7823, 7806-7825, 7807-7824, 7807-7825, 7807-7826, 7808-7825, 7808-7827, 7809-7826, 7809-7828, 7810-7825, 7810-7827, 7810-7829, 7811-7828, 7811-7830, 7812-7829, 7812-7830, 7812-7831, 7813-7829, 7813-7832, 7814-7833, 7815-7831, 7815-7832, 7815-7833, 7815-7834, 7816-7832, 7816-7833, 7816-7834, 7816-7835, 7817-7833, 7817-7834, 7817-7835, 7817-7836, 7818-7834, 7818-7835, 7818-7836, 7818-7837, 7819-7835, 7819-7837, 7819-7838, 7820-7836, 7820-7838, 7820-7839, 7821-7837, 7821-7839, 7821-7840, 7822-7838, 7822-7840, 7822-7841, 7823-7838, 7823-7839, 7823-7841, 7823-7842, 7824-7840, 7824-7841, 7824-7842, 7824-7843, 7825-7840, 7825-7841, 7825-7842, 7825-7843, 7825-7844, 7826-7842, 7826-7844, 7826-7845, 7827-7843, 7827-7844, 7827-7846, 7828-7843, 7828-7844, 7828-7847, 7829-7844, 7829-7845, 7829-7846, 7829-7847, 7829-7848, 7830-7845, 7830-7846, 7830-7847, 7830-7848, 7830-7849, 7831-7846, 7831-7847, 7831-7848, 7831-7849, 7831-7850, 7832-7847, 7832-7848, 7832-7849, 7832-7850, 7832-7851, 7833-7848, 7833-7849, 7833-7850, 7833-7851, 7833-7852, 7834-7849, 7834-7850, 7834-7851, 7834-7852, 7834-7853, 7835-7850, 7835-7851, 7835-7852, 7835-7853, 7835-7854, 7836-7851, 7836-7852, 7836-7853, 7836-7854, 7836-7855, 7837-7852, 7837-7853, 7837-7854, 7837-7855, 7837-7856, 7838-7853, 7838-7854, 7838-7855, 7838-7856, 7838-7857, 7839-7854, 7839-7855, 7839-7856, 7839-7857, 7839-7858, 7840-7855, 7840-7856, 7840-7857, 7840-7858, 7840-7859, 7841-7856, 7841-7857, 7841-7858, 7841-7859, 7841-7860, 7842-7857, 7842-7858, 7842-7859, 7842-7860, 7842-7861, 7843-7858, 7843-7859, 7843-7860, 7843-7861, 7843-7862, 7844-7859, 7844-7860, 7844-7861, 7844-7862, 7845-7860, 7845-7861, 7845-7862, 7846-7861, 7846-7862 и 7847-7862.

В некоторых вариантах реализации следующие нуклеотидные области SEQ ID NO: 1, при направленном воздействии антисмысловых соединений или олигонуклеотидов, демонстрируют по меньшей мере 70% ингибирование: 48-63, 150-169, 152-171, 154-169, 154-173, 156-171, 156-175, 158-173, 158-177, 1135-1154, 1141-1160, 1147-1166, 1171-1186, 1173-1188, 1175-1190, 1749-1768, 1763-1782, 1912-1931,

2193-2212, 2195-2210, 2195-2214, 2197-2212, 2197-2216, 2223-2238, 2225-2240, 2227-2242, 2453-2472, 2455-2474, 2457-2472, 2457-2476, 2459-2474, 2461-2476, 2461-2480, 2550-2569, 2551-2566, 2552-2571, 2553-2570, 2553-2571, 2553-2572, 2554-2571, 2554-2572, 2554-2573, 2554-2573, 2555-2572, 2555-2574, 2555-2574, 2556-2573, 2556-2574, 2556-2575, 2557-2574, 2557-2576, 2558-2575, 2558-2576, 2558-2577, 2559-2576, 2559-2577, 2559-2578, 2560-2577, 2560-2578, 2560-2579, 2561-2578, 2561-2579, 2561-2580, 2562-2577, 2562-2579, 2562-2581, 2563-2578, 2563-2580, 2563-2582, 2564-2581, 2564-2583, 2565-2584, 2566-2583, 2566-2585, 2567-2582, 2567-2584, 2567-2586, 2568-2585, 2568-2587, 2569-2586, 2569-2588, 2570-2587, 2570-2589, 2571-2588, 2571-2590, 2572-2589, 2572-2591, 2573-2590, 2573-2592, 2574-2591, 2574-2593, 2575-2592, 2575-2594, 2576-2593, 2576-2595, 2577-2594, 2577-2596, 2578-2597, 2579-2598, 2580-2596, 2580-2598, 2580-2599, 2581-2597, 2581-2600, 2582-2598, 2582-2600, 2582-2601, 2583-2599, 2583-2601, 2583-2602, 2584-2600, 2584-2602, 2584-2603, 2585-2601, 2585-2603, 2585-2604, 2586-2605, 2587-2606, 2588-2604, 2588-2606, 2588-2607, 2589-2605, 2589-2606, 2589-2607, 2589-2608, 2590-2605, 2590-2606, 2590-2607, 2590-2609, 2591-2607, 2591-2610, 2592-2611, 2593-2608, 2593-2612, 2594-2609, 2594-2610, 2594-2612, 2594-2613, 2595-2610, 2595-2611, 2595-2612, 2595-2613, 2595-2614, 2596-2611, 2596-2614, 2596-2615, 2597-2612, 2597-2613, 2597-2614, 2597-2615, 2597-2616, 2598-2613, 2598-2614, 2598-2615, 2598-2616, 2598-2617, 2599-2614, 2599-2615, 2599-2616, 2599-2617, 2599-2618, 2600-2615, 2600-2616, 2600-2617, 2600-2618, 2600-2619, 2601-2616, 2601-2617, 2601-2618, 2601-2619, 2601-2620, 2602-2617, 2602-2618, 2602-2619, 2602-2620, 2602-2621, 2603-2619, 2603-2620, 2603-2621, 2603-2622, 2604-2619, 2604-2620, 2604-2621, 2604-2622, 2604-2623, 2605-2620, 2605-2621, 2605-2622, 2605-2623, 2605-2624, 2606-2621, 2606-2622, 2606-2623, 2606-2624, 2606-2625, 2607-2622, 2607-2623, 2607-2624, 2607-2625, 2607-2626, 2608-2623, 2608-2624, 2608-2625, 2608-2626, 2608-2627, 2609-2624, 2609-2625, 2609-2626, 2609-2627, 2609-2628, 2610-2625, 2610-2626, 2610-2627, 2610-2628, 2610-2629, 2611-2626, 2611-2627, 2611-2629, 2611-2630, 2612-2627, 2612-2628, 2612-2629, 2612-2630, 2612-2631, 2613-2628, 2613-2629, 2613-2630, 2613-2631, 2614-2629, 2614-2630, 2614-2631, 2615-2630, 2615-2630, 2615-2631 и 2616-2631.

В некоторых вариантах реализации следующие нуклеотидные области SEQ ID NO: 2, при направленном воздействии антисмысловых соединений или олигонуклеотидов, демонстрируют по меньшей мере 70% ингибирование: 1685-1704, 1686-1705, 1769-1784, 1871-1890, 1873-1892, 1875-1890, 1875-1894, 1877-1892, 1877-1896, 1879-1894, 1879-1898, 3819-3838, 3825-3844, 3831-3850, 4151-4166, 5890-5909, 5904-5923, 5904-5923, 6406-6425, 6983-6998, 6983-7002, 6985-7000, 6985-7004, 7688-7707, 7690-7709, 7692-7707, 7692-7711, 7694-7709, 7696-7711, 7696-7715, 7786-7801, 7787-7806, 7788-7805, 7788-7806, 7788-7807, 7789-7806, 7789-7807, 7789-7808, 7790-7807, 7790-7809, 7791-7808, 7791-7809, 7791-7810, 7792-7809, 7792-7811, 7793-7810, 7793-7811, 7793-7812, 7794-7811, 7794-7812, 7794-7813, 7795-7812, 7795-7813, 7795-7814, 7796-7813, 7796-7814, 7796-7815, 7797-7812, 7797-7814, 7797-7816, 7798-7813, 7798-7815, 7798-7817, 7799-7816, 7799-7818, 7800-7819, 7801-7818, 7801-7820, 7802-7817, 7802-7819, 7802-7821, 7803-7820, 7803-7822, 7804-7821, 7804-7823, 7805-7822, 7805-7824, 7806-7823, 7806-7825, 7807-7824, 7807-7826, 7808-7825, 7808-7827, 7809-7826, 7809-7828, 7810-7827, 7811-7828, 7811-7830, 7812-7829, 7812-7831, 7813-7832, 7814-7833, 7815-7831, 7815-7833, 7815-7834, 7816-7832, 7816-7835, 7817-7833, 7817-7835, 7817-7836, 7818-7834, 7818-7836, 7818-7837, 7819-7835, 7819-7837, 7819-7838, 7820-7836, 7820-7838, 7820-7839, 7821-7840, 7822-7841, 7823-7839, 7823-7841, 7823-7842, 7824-7840, 7824-7841, 7824-7842, 7824-7843, 7825-7840, 7825-7841, 7825-7842, 7825-7844, 7826-7842, 7826-7845, 7827-7846, 7828-7843, 7828-7847, 7829-7844, 7829-7845, 7829-7847, 7829-7848, 7830-7845, 7830-7846, 7830-7847, 7830-7848, 7830-7849, 7831-7846, 7831-7849, 7831-7850, 7832-7847, 7832-7848, 7832-7849, 7832-7850, 7832-7851, 7833-7848, 7833-7849, 7833-7850, 7833-7851, 7833-7852, 7834-7849, 7834-7850, 7834-7851, 7834-7852, 7834-7853, 7835-7850, 7835-7851, 7835-7852, 7835-7853, 7835-7854, 7836-7851, 7836-7852, 7836-7853, 7836-7854, 7836-7855, 7837-7852, 7837-7853, 7837-7854, 7837-7855, 7837-7856, 7838-7854, 7838-7855, 7838-7856, 7838-7857, 7839-7854, 7839-7855, 7839-7856, 7839-7857, 7839-7858, 7840-7855, 7840-7856, 7840-7857, 7840-7858, 7840-7859, 7841-7856, 7841-7857, 7841-7858, 7841-7859, 7841-7860, 7842-7857, 7842-7858, 7842-7859, 7842-7860, 7842-7861, 7843-7858, 7843-7859, 7843-7860, 7843-7861, 7843-7862, 7844-7859, 7844-7860, 7844-7861, 7844-7862, 7845-7860, 7845-7861, 7845-7862, 7846-7861, 7846-7862 и 7847-7862.

В некоторых вариантах реализации следующие нуклеотидные области SEQ ID NO: 1, при направленном воздействии антисмысловых соединений или олигонуклеотидов, демонстрируют по меньшей мере 80% ингибирование: 152-171, 154-169, 156-171, 158-173, 1135-1154, 1171-1186, 1173-1188, 1175-1190, 1763-1782, 1912-1931, 2197-2212, 2223-2238, 2225-2240, 2227-2242, 2457-2472, 2459-2474, 2461-2476, 2551-2566, 2553-2570, 2553-2571, 2553-2572, 2554-2573, 2555-2572, 2555-2574, 2556-2573, 2556-2574, 2556-2575, 2557-2574, 2557-2576, 2558-2575, 2558-2576, 2559-2577, 2559-2578, 2560-2577, 2560-2578, 2560-2579, 2561-2578, 2561-2579, 2561-2580, 2562-2577, 2562-2579, 2562-2581, 2563-2580, 2563-2582, 2564-2581, 2564-2583, 2565-2584, 2566-2583, 2567-2584, 2567-2586, 2568-2585, 2568-2587, 2569-2586, 2569-2588, 2570-2587, 2571-2588, 2571-2590, 2572-2589, 2572-2591, 2573-2590, 2573-2592, 2574-2591, 2574-2593, 2575-2592, 2576-2593, 2576-2595, 2577-2594, 2577-2596, 2578-2597, 2580-2598, 2580-2599, 2581-2597, 2581-2600, 2582-2601, 2583-2602, 2584-2603, 2585-2604, 2586-2605, 2587-2606, 2588-

2607, 2589-2608, 2590-2606, 2590-2607, 2590-2609, 2591-2610, 2592-2611, 2593-2608, 2593-2612, 2594-2613, 2595-2611, 2595-2614, 2596-2615, 2597-2612, 2597-2613, 2597-2614, 2597-2615, 2597-2616, 2598-2613, 2598-2613, 2598-2614, 2598-2615, 2598-2616, 2598-2617, 2599-2614, 2599-2617, 2599-2618, 2600-2615, 2600-2617, 2600-2618, 2600-2619, 2601-2616, 2601-2617, 2601-2619, 2601-2620, 2602-2618, 2602-2621, 2603-2620, 2603-2621, 2603-2622, 2604-2619, 2604-2620, 2604-2621, 2604-2622, 2604-2623, 2605-2620, 2605-2621, 2605-2622, 2605-2623, 2605-2624, 2606-2621, 2606-2622, 2606-2623, 2606-2624, 2606-2625, 2607-2622, 2607-2623, 2607-2624, 2607-2625, 2607-2626, 2608-2623, 2608-2624, 2608-2625, 2608-2627, 2609-2624, 2609-2626, 2609-2627, 2609-2628, 2610-2625, 2610-2626, 2610-2628, 2610-2629, 2611-2626, 2611-2627, 2611-2629, 2611-2630, 2612-2627, 2612-2628, 2612-2630, 2612-2631, 2613-2628, 2613-2629, 2613-2631, 2614-2629, 2614-2630, 2614-2631, 2615-2630 и 2616-2631.

В некоторых вариантах реализации следующие нуклеотидные области SEQ ID NO: 2, при направленном воздействии антисмысловых соединений или олигонуклеотидов, демонстрируют по меньшей мере 80% ингибирование: 1685-1704, 1686-1705, 1873-1892, 1875-1890, 1877-1892, 1879-1894, 3819-3838, 4151-4166, 5904-5923, 6406-6425, 6985-7000, 7692-7707, 7694-7709, 7696-7711, 7786-7801, 7788-7805, 7788-7806, 7788-7807, 7789-7808, 7790-7807, 7790-7809, 7791-7808, 7791-7809, 7791-7810, 7792-7809, 7792-7811, 7793-7810, 7793-7811, 7794-7812, 7794-7813, 7795-7812, 7795-7813, 7795-7814, 7796-7813, 7796-7814, 7796-7815, 7797-7812, 7797-7814, 7797-7816, 7798-7815, 7798-7817, 7799-7816, 7799-7818, 7800-7819, 7801-7818, 7802-7819, 7802-7821, 7803-7820, 7803-7822, 7804-7821, 7804-7823, 7805-7822, 7806-7823, 7806-7825, 7807-7824, 7807-7826, 7808-7825, 7808-7827, 7809-7826, 7809-7828, 7810-7827, 7811-7828, 7812-7829, 7812-7831, 7813-7832, 7814-7833, 7815-7834, 7816-7832, 7816-7835, 7817-7836, 7818-7837, 7819-7838, 7820-7839, 7821-7840, 7822-7841, 7823-7842, 7824-7843, 7825-7841, 7825-7842, 7825-7844, 7826-7845, 7827-7846, 7828-7843, 7828-7847, 7829-7848, 7830-7846, 7830-7849, 7831-7850, 7832-7847, 7832-7848, 7832-7849, 7832-7850, 7832-7851, 7833-7848, 7833-7849, 7833-7850, 7833-7851, 7833-7852, 7834-7849, 7834-7852, 7834-7853, 7835-7850, 7835-7852, 7835-7853, 7835-7854, 7836-7851, 7836-7852, 7836-7854, 7836-7855, 7837-7853, 7837-7856, 7838-7855, 7838-7856, 7838-7857, 7839-7854, 7839-7855, 7839-7856, 7839-7857, 7839-7858, 7840-7855, 7840-7856, 7840-7857, 7840-7858, 7840-7859, 7841-7856, 7841-7857, 7841-7858, 7841-7859, 7841-7860, 7842-7857, 7842-7858, 7842-7859, 7842-7860, 7842-7861, 7843-7858, 7843-7859, 7843-7860, 7843-7862, 7844-7859, 7844-7861, 7844-7862, 7845-7860, 7845-7861, 7846-7862 и 7847-7862.

В некоторых вариантах реализации следующие нуклеотидные области SEQ ID NO: 1, при направленном воздействии антисмысловых соединений или олигонуклеотидов, демонстрируют по меньшей мере 90% ингибирование: 154-169, 156-171, 158-173, 1135-1154, 1171-1186, 1173-1188, 1763-1782, 1912-1931, 2223-2238, 2227-2242, 2459-2474, 2461-2476, 2554-2573, 2555-2574, 2560-2577, 2561-2578, 2561-2579, 2562-2581, 2563-2580, 2563-2582, 2564-2581, 2566-2583, 2567-2584, 2568-2585, 2568-2587, 2569-2586, 2570-2587, 2576-2593, 2577-2594, 2577-2596, 2578-2597, 2580-2599, 2581-2600, 2582-2601, 2583-2602, 2584-2603, 2586-2605, 2587-2605, 2587-2606, 2588-2607, 2589-2608, 2590-2607, 2590-2609, 2592-2611, 2595-2614, 2596-2615, 2597-2612, 2597-2613, 2597-2615, 2597-2616, 2598-2613, 2598-2613, 2598-2617, 2599-2614, 2599-2618, 2600-2615, 2600-2619, 2601-2617, 2601-2620, 2602-2621, 2603-2622, 2604-2623, 2605-2621, 2605-2622, 2605-2624, 2606-2625, 2607-2626, 2608-2623, 2608-2625, 2609-2628, 2611-2627, 2611-2630, 2612-2628, 2612-2631, 2613-2629, 2614-2629, 2615-2630 и 2616-2631.

В некоторых вариантах реализации следующие нуклеотидные области SEQ ID NO:

2, при направленном воздействии антисмысловых соединений или олигонуклеотидов, демонстрируют по меньшей мере 90% ингибирование: 1685-1704, 1686-1705, 1875-1890, 1877-1892, 1879-1894, 3819-3838, 5904-5923, 6406-6425, 7694-7709, 7696-7711, 7789-7808, 7790-7809, 7795-7812, 7795-7813, 7796-7813, 7796-7814, 7797-7814, 7797-7816, 7798-7815, 7798-7817, 7799-7816, 7801-7818, 7802-7819, 7803-7820, 7803-7822, 7804-7821, 7805-7822, 7811-7828, 7812-7829, 7812-7831, 7813-7832, 7815-7834, 7818-7837, 7819-7838, 7821-7840, 7822-7840, 7822-7841, 7825-7842, 7832-7847, 7832-7848, 7832-7850, 7833-7848, 7833-7852, 7834-7849, 7834-7853, 7835-7850, 7836-7852, 7836-7855, 7837-7856, 7838-7856, 7839-7857, 7839-7858, 7840-7856, 7840-7857, 7840-7859, 7843-7858, 7843-7860 и 7846-7862.

В некоторых вариантах реализации следующие антисмысловые соединения или олигонуклеотиды направлены на область нуклеиновой кислоты CFB и вызывают по меньшей мере 50% ингибирование мРНК CFB, ISIS NO: 516350, 532614, 532632, 532635, 532638, 532639, 532686, 532687, 532688, 532689, 532690, 532691, 532692, 532692, 532693, 532694, 532695, 532696, 532697, 532698, 532699, 532700, 532701, 532702, 532703, 532704, 532705, 532706, 532707, 532770, 532775, 532778, 532780, 532791, 532800, 532809, 532810, 532811, 532917, 532952, 588509, 588510, 588511, 588512, 588513, 588514, 588515, 588516, 588517, 588518, 588519, 588520, 588522, 588523, 588524, 588525, 588527, 588528, 588529, 588530, 588531, 588532, 588533, 588534, 588535, 588536, 588537, 588538, 588539, 588540, 588541, 588542, 588543, 588544, 588545, 588546, 588547, 588548, 588549, 588550, 588551, 588552, 588553, 588554, 588555, 588556, 588557, 588558, 588559, 588560, 588561, 588562, 588563, 588564, 588565, 588566, 588567, 588568, 588569, 588570, 588571, 588572, 588573, 588574, 588575, 588576, 588577, 588580, 588581, 588585, 588586, 588589, 588590, 588599, 588603, 588606, 588608, 588610, 588614, 588616, 588628, 588631, 588632, 588634, 588636, 588638, 588640, 588645, 588646, 588654, 588656, 588658, 588660, 588662, 588664, 588670, 588672, 588676, 588682, 588688,

588696, 588698, 588807, 588808, 588809, 588813, 588814, 588815, 588819, 588820, 588822, 588823, 588838, 588839, 588840, 588841, 588842, 588846, 588847, 588848, 588849, 588850, 588851, 588852, 588853, 588854, 588855, 588856, 588857, 588858, 588859, 588860, 588861, 588862, 588863, 588864, 588865, 588866, 588867, 588868, 588870, 588871, 588872, 588873, 588874, 588875, 588876, 588877, 588878, 588879, 588880, 588881, 588882, 588883, 588884, 588999, 599000, 599001, 599002, 599003, 599004, 599005, 599006, 599007, 599008, 599009, 599010, 599011, 599012, 599013, 599014, 599015, 599018, 599019, 599023, 599024, 599025, 599026, 599027, 599028, 599029, 599030, 599031, 599032, 599033, 599034, 599035, 599058, 599062, 599063, 599064, 599065, 599070, 599071, 599072, 599073, 599074, 599076, 599077, 599078, 599079, 599080, 599081, 599082, 599083, 599084, 599085, 599086, 599087, 599088, 599089, 599090, 599091, 599092, 599093, 599094, 599095, 599096, 599097, 599098, 599102, 599119, 599123, 599124, 599125, 599126, 599127, 599128, 599132, 599133, 599134, 599135, 599136, 599137, 599138, 599139, 599140, 599141, 599142, 599143, 599144, 599145, 599147, 599148, 599149, 599150, 599151, 599152, 599153, 599154, 599155, 599156, 599157, 599158, 599159, 599178, 599179, 599180, 599181, 599182, 599186, 599187, 599188, 599189, 599190, 599191, 599192, 599193, 599194, 599195, 599196, 599197, 599198, 599199, 599200, 599201, 599202, 599203, 599204, 599205, 599206, 599207, 599208, 599209, 599210, 599211, 599212, 599213, 599214, 599215, 599216, 599217, 599218, 599219, 599220, 599221, 599222, 599223, 599224, 599225, 599226, 599227, 599228, 599229, 599230, 599231, 599232, 599233, 599234, 599235, 599236, 599241, 599247, 599248, 599249, 599255, 599256, 599257, 599258, 599260, 599261, 599262, 599263, 599264, 599265, 599266, 599267, 599268, 599269, 599270, 599271, 599272, 599273, 599274, 599275, 599276, 599277, 599278, 599279, 599280, 599297, 599299, 599306, 599307, 599308, 599309, 599311, 599312, 599313, 599314, 599315, 599316, 599317, 599318, 599319, 599320, 599321, 599322, 599323, 599324, 599325, 599326, 599327, 599328, 599329, 599330, 599338, 599349, 599353, 599354, 599355, 599356, 599357, 599358, 599359, 599360, 599361, 599362, 599363, 599364, 599369, 599371, 599372, 599373, 599376, 599378, 599379, 599382, 599383, 599384, 599385, 599386, 599387, 599388, 599389, 599390, 599391, 599392, 599393, 599394, 599395, 599396, 599397, 599398, 599399, 599400, 599401, 599402, 599403, 599404, 599405, 599406, 599407, 599408, 599409, 599410, 599412, 599413, 599414, 599415, 599416, 599417, 599418, 599419, 599420, 599421, 599422, 599423, 599424, 599425, 599426, 599433, 599434, 599435, 599436, 599437, 599438, 599439, 599440, 599441, 599442, 599443, 599444, 599445, 599446, 599447, 599448, 599450, 599454, 599455, 599456, 599467, 599468, 599469, 599471, 599472, 599473, 599474, 599475, 599476, 599477, 599478, 599479, 599480, 599481, 599482, 599483, 599484, 599485, 599486, 599487, 599488, 599489, 599490, 599491, 599492, 599493, 599494, 599495, 599496, 599497, 599498, 599499, 599500, 599501, 599502, 599503, 599504, 599505, 599506, 599507, 599508, 599509, 599512, 599515, 599518, 599531, 599541, 599541, 599546, 599547, 599548, 599549, 599550, 599552, 599553, 599554, 599555, 599557, 599558, 599561, 599562, 599563, 599564, 599565, 599566, 599567, 599568, 599569, 599570, 599577, 599578, 599579, 599580, 599581, 599581, 599582, 599584, 599585, 599586, 599587, 599588, 599589, 599590, 599591, 599592, 599593, 599594, 599595, 601321, 601322, 601323, 601325, 601327, 601328, 601329, 601330, 601332, 601333, 601334, 601335, 601336, 601337, 601338, 601339, 601341, 601342, 601343, 601344, 601345, 601346, 601347, 601348, 601349, 601362, 601367, 601368, 601369, 601371, 601372, 601373, 601374, 601375, 601377, 601378, 601380, 601381, 601382, 601383, 601384, 601385, 601386, 601387 и 601388.

В некоторых вариантах реализации следующие антисмысловые соединения или олигонуклеотиды направлены на область нуклеиновой кислоты CFB и вызывают по меньшей мере 50% ингибирование мРНК CFB, SEQ ID NO: 12, 30, 33, 36, 37, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 198, 203, 206, 208, 219, 228, 237, 238, 239, 317, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 468, 472, 473, 475, 478, 479, 488, 492, 494, 495, 498, 499, 500, 502, 503, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 517, 518, 522, 523, 524, 525, 529, 530, 531, 534, 535, 537, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 563, 564, 565, 569, 570, 572, 573, 577, 588, 589, 590, 591, 592, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 623, 640, 641, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 700, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 758, 759, 760, 761, 762, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 813, 833, 834, 841, 846, 849, 850, 867 и 873.

В некоторых вариантах реализации следующие антисмысловые соединения или олигонуклеотиды направлены на область нуклеиновой кислоты CFB и вызывают по меньшей мере 60% ингибирование мРНК CFB, ISIS NO: 516350, 532614, 532635, 532686, 532687, 532688, 532689, 532770, 532800, 532809, 532810, 532811, 532917, 532952, 588512, 588513, 588514, 588515, 588516, 588517, 588518, 588519, 588522, 588523, 588524, 588525, 588527, 588528, 588529, 588530, 588531, 588532, 588533, 588534, 588535, 588536, 588537, 588538, 588539, 588540, 588541, 588542, 588543, 588544, 588545, 588546, 588547, 588548, 588549,

588550, 588551, 588552, 588553, 588554, 588555, 588556, 588557, 588558, 588559, 588560, 588561, 588562, 588563, 588564, 588565, 588566, 588567, 588568, 588569, 588570, 588571, 588572, 588573, 588574, 588575, 588576, 588577, 588636, 588638, 588640, 588664, 588676, 588696, 588698, 588807, 588808, 588814, 588815, 588819, 588820, 588840, 588842, 588846, 588847, 588848, 588849, 588850, 588851, 588852, 588853, 588854, 588855, 588856, 588857, 588858, 588859, 588860, 588861, 588862, 588863, 588864, 588866, 588867, 588868, 588870, 588871, 588872, 588873, 588874, 588875, 588876, 588877, 588878, 588879, 588880, 588881, 588882, 588883, 588884, 588899, 589000, 589001, 589002, 589003, 589004, 589005, 589006, 589007, 589008, 589009, 589010, 589011, 589012, 589013, 589014, 589015, 589019, 589024, 589025, 589026, 589027, 589028, 589029, 589030, 589031, 589032, 589033, 589034, 589035, 589064, 589065, 589071, 589072, 589077, 589078, 589079, 589080, 589083, 589084, 589085, 589086, 589087, 589088, 589089, 589090, 589091, 589092, 589093, 589094, 589095, 589096, 589097, 589125, 589126, 589127, 589133, 589134, 589135, 589136, 589138, 589139, 589140, 589141, 589142, 589148, 589149, 589150, 589151, 589152, 589154, 589155, 589156, 589157, 589158, 589159, 589178, 589179, 589180, 589181, 589187, 589188, 589190, 589192, 589193, 589194, 589195, 589196, 589197, 589198, 589199, 589200, 589201, 589202, 589203, 589204, 589205, 589206, 589207, 589208, 589209, 589210, 589211, 589212, 589213, 589214, 589215, 589216, 589217, 589218, 589219, 589220, 589221, 589222, 589223, 589224, 589225, 589226, 589227, 589228, 589229, 589230, 589231, 589232, 589233, 589234, 589235, 589236, 589247, 589255, 589256, 589257, 589263, 589264, 589265, 589266, 589270, 589271, 589272, 589273, 589274, 589275, 589276, 589277, 589278, 589279, 589280, 589306, 589307, 589308, 589311, 589312, 589313, 589314, 589315, 589316, 589317, 589318, 589319, 589320, 589321, 589322, 589323, 589324, 589325, 589327, 589328, 589329, 589330, 589349, 589353, 589355, 589356, 589357, 589358, 589359, 589360, 589361, 589362, 589363, 589364, 589369, 589371, 589372, 589373, 589376, 589378, 589379, 589382, 589384, 589386, 589387, 589388, 589389, 589390, 589391, 589392, 589393, 589394, 589395, 589396, 589397, 589398, 589399, 589400, 589401, 589402, 589403, 589404, 589405, 589406, 589407, 589408, 589409, 589410, 589412, 589413, 589414, 589415, 589416, 589417, 589418, 589419, 589420, 589421, 589422, 589423, 589424, 589425, 589433, 589434, 589435, 589436, 589437, 589438, 589439, 589440, 589441, 589442, 589443, 589444, 589445, 589446, 589447, 589448, 589456, 589467, 589468, 589471, 589472, 589473, 589474, 589475, 589476, 589477, 589478, 589479, 589480, 589481, 589482, 589483, 589484, 589485, 589486, 589487, 589488, 589489, 589490, 589491, 589492, 589493, 589494, 589495, 589496, 589497, 589498, 589499, 589500, 589501, 589502, 589503, 589504, 589505, 589506, 589507, 589508, 589512, 589531, 589547, 589548, 589549, 589552, 589553, 589554, 589555, 589557, 589558, 589562, 589563, 589564, 589565, 589566, 589567, 589568, 589569, 589570, 589577, 589578, 589579, 589580, 589581, 589582, 589584, 589585, 589586, 589587, 589588, 589589, 589590, 589591, 589592, 589593, 589594, 589595, 601323, 601327, 601329, 601332, 601333, 601333, 601334, 601335, 601336, 601338, 601339, 601341, 601342, 601343, 601344, 601345, 601346, 601347, 601348, 601349, 601368, 601369, 601371, 601372, 601374, 601375, 601377, 601378, 601380, 601381, 601382, 601383, 601384, 601385, 601386, 601387 и 601388.

В некоторых вариантах реализации следующие антисмысловые соединения или олигонуклеотиды направлены на область нуклеиновой кислоты CFB и вызывают по меньшей мере 60% ингибирование мРНК CFB, SEQ ID NO: 12, 33, 84, 85, 86, 87, 198, 228, 237, 238, 239, 317, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 472, 473, 513, 514, 515, 531, 537, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 564, 565, 569, 570, 577, 590, 592, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 700, 704, 706, 707, 708, 709, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 758, 759, 760, 761, 767, 768, 770, 772, 773, 774, 775, 775, 776, 776, 777, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 783, 784, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 813, 833, 834, 841, 846, 849 и 850.

В некоторых вариантах реализации следующие антисмысловые соединения или олигонуклеотиды направлены на область нуклеиновой кислоты CFB и вызывают по меньшей мере 70% ингибирование мРНК CFB, ISIS NO: 516350, 532614, 532686, 532687, 532688, 532770, 532800, 532809, 532810, 532811, 532917, 532952, 588512, 588513, 588514, 588515, 588516, 588517, 588518, 588524, 588529, 588530, 588531, 588532, 588533, 588534, 588535, 588536, 588537, 588538, 588539, 588540, 588541, 588542, 588543, 588544, 588545, 588546, 588547, 588548, 588549, 588550, 588551, 588552, 588553, 588554, 588555, 588556, 588557, 588558, 588559, 588560, 588561, 588562, 588563, 588564, 588565, 588568, 588569, 588570, 588571, 588572, 588573, 588574, 588575, 588577, 588636, 588638, 588640, 588696, 588698, 588807, 588814, 588815, 588819, 588842, 588847, 588848, 588849, 588850, 588851, 588852, 588853, 588856, 588857, 588858, 588859, 588860, 588861, 588862, 588863, 588866, 588867, 588870, 588871, 588872, 588873, 588874, 588875, 588876, 588877, 588878, 588879, 588880, 588881, 588882, 588883, 588884, 589000, 589001, 589003, 589004, 589005, 589008, 589009, 589010, 589011, 589014, 589015, 589024, 589025, 589027, 589028, 589029, 589030, 589031, 589032, 589033, 589034, 589072, 589077, 589080, 589085, 589086, 589087, 589088, 589089, 589090, 589091, 589093,

599094, 599095, 599096, 599097, 599125, 599126, 599134, 599138, 599139, 599148, 599149, 599150, 599151, 599152, 599154, 599155, 599156, 599157, 599158, 599187, 599188, 599193, 599195, 599196, 599197, 599198, 599199, 599200, 599201, 599202, 599203, 599204, 599205, 599206, 599207, 599208, 599210, 599211, 599212, 599213, 599214, 599215, 599216, 599217, 599218, 599219, 599220, 599221, 599222, 599223, 599224, 599225, 599226, 599227, 599228, 599229, 599230, 599231, 599232, 599233, 599234, 599235, 599236, 599266, 599272, 599272, 599273, 599274, 599275, 599277, 599278, 599279, 599280, 599280, 599306, 599311, 599312, 599313, 599314, 599315, 599316, 599317, 599318, 599319, 599320, 599321, 599322, 599323, 599325, 599327, 599328, 599329, 599330, 599355, 599357, 599358, 599359, 599360, 599361, 599362, 599363, 599364, 599369, 599371, 599372, 599373, 599378, 599379, 599382, 599384, 599386, 599387, 599388, 599389, 599390, 599391, 599392, 599393, 599394, 599395, 599396, 599397, 599398, 599399, 599400, 599401, 599402, 599403, 599404, 599405, 599406, 599407, 599408, 599409, 599410, 599413, 599414, 599415, 599416, 599417, 599418, 599419, 599420, 599421, 599422, 599423, 599424, 599433, 599434, 599435, 599436, 599437, 599438, 599439, 599440, 599441, 599442, 599443, 599445, 599446, 599447, 599448, 599472, 599473, 599474, 599475, 599476, 599477, 599478, 599479, 599480, 599481, 599482, 599483, 599484, 599485, 599486, 599487, 599488, 599489, 599490, 599491, 599492, 599493, 599494, 599495, 599496, 599497, 599498, 599499, 599500, 599501, 599502, 599503, 599504, 599505, 599506, 599507, 599508, 599512, 599547, 599548, 599552, 599553, 599554, 599555, 599558, 599562, 599563, 599564, 599566, 599567, 599568, 599569, 599570, 599577, 599578, 599579, 599580, 599581, 599582, 599585, 599586, 599587, 599588, 599589, 599590, 599591, 599592, 599593, 599594, 599595, 601332, 601335, 601341, 601343, 601344, 601345, 601346, 601347, 601348, 601349, 601371, 601372, 601380, 601382, 601383, 601384, 601385, 601386 и 601387.

В некоторых вариантах реализации следующие антисмысловые соединения или олигонуклеотиды направлены на область нуклеиновой кислоты CFB и вызывают по меньшей мере 70% ингибирование мРНК CFB, SEQ ID NO: 12, 84, 85, 86, 198, 228, 237, 238, 239, 317, 395, 396, 397, 398, 399, 402, 403, 404, 405, 407, 408, 410, 411, 412, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 464, 465, 472, 473, 513, 514, 515, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 564, 565, 569, 592, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 653, 654, 655, 656, 659, 660, 662, 663, 664, 665, 666, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 677, 678, 679, 680, 682, 683, 684, 686, 687, 688, 689, 706, 708, 709, 711, 712, 713, 714, 715, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 767, 768, 773, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 793, 794, 795, 797, 798, 799, 813, 833, 834, 841, 846, 849, 867 и 873.

В некоторых вариантах реализации следующие антисмысловые соединения или олигонуклеотиды направлены на область нуклеиновой кислоты CFB и вызывают по меньшей мере 80% ингибирование мРНК CFB, ISIS NO: 532686, 532809, 532810, 532811, 532917, 532952, 588512, 588517, 588518, 588533, 588534, 588535, 588536, 588537, 588538, 588539, 588540, 588542, 588543, 588544, 588545, 588546, 588547, 588548, 588549, 588550, 588551, 588552, 588553, 588554, 588555, 588556, 588557, 588558, 588559, 588560, 588561, 588562, 588563, 588564, 588565, 588571, 588638, 588640, 588696, 588698, 588807, 588814, 588849, 588850, 588851, 588853, 588857, 588858, 588859, 588860, 588861, 588862, 588863, 588866, 588867, 588871, 588872, 588873, 588874, 588875, 588876, 588877, 588878, 588879, 588880, 588881, 588882, 588883, 599001, 599024, 599025, 599033, 599086, 599087, 599088, 599089, 599093, 599094, 599095, 599096, 599134, 599139, 599148, 599149, 599151, 599154, 599155, 599156, 599158, 599188, 599195, 599196, 599198, 599201, 599202, 599203, 599204, 599205, 599206, 599207, 599212, 599213, 599215, 599216, 599217, 599218, 599219, 599220, 599221, 599222, 599223, 599224, 599225, 599226, 599227, 599228, 599229, 599230, 599231, 599232, 599233, 599234, 599235, 599236, 599272, 599273, 599275, 599277, 599278, 599279, 599280, 599311, 599313, 599314, 599316, 599317, 599318, 599320, 599321, 599322, 599323, 599327, 599328, 599329, 599330, 599355, 599357, 599358, 599359, 599360, 599361, 599362, 599363, 599364, 599371, 599372, 599373, 599378, 599379, 599382, 599384, 599386, 599387, 599388, 599389, 599390, 599391, 599392, 599393, 599397, 599398, 599399, 599400, 599401, 599403, 599404, 599405, 599407, 599408, 599409, 599410, 599413, 599414, 599415, 599416, 599417, 599418, 599419, 599420, 599421, 599422, 599423, 599424, 599433, 599434, 599435, 599436, 599437, 599438, 599439, 599440, 599441, 599445, 599446, 599447, 599448, 599474, 599476, 599477, 599479, 599481, 599482, 599483, 599485, 599486, 599487, 599488, 599489, 599490, 599491, 599492, 599494, 599495, 599496, 599497, 599498, 599499, 599500, 599502, 599503, 599504, 599505, 599506, 599507, 599508, 599547, 599552, 599553, 599554, 599558, 599563, 599567, 599568, 599569, 599570, 599577, 599578, 599581, 599582, 599585, 599587, 599588, 599590, 599591, 599592, 599593, 599594, 601332, 601344, 601345, 601382, 601383 и 601385.

В некоторых вариантах реализации следующие антисмысловые соединения или олигонуклеотиды направлены на область нуклеиновой кислоты CFB и вызывают по меньшей мере 80% ингибирование мРНК CFB, SEQ ID NO: 84, 237, 238, 239, 317, 395, 397, 411, 412, 413, 414, 415, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 425, 426, 427, 429, 430, 431, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 472, 473, 514,

515, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 564, 595, 599, 600, 601, 602, 603, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 646, 655, 660, 662, 663, 666, 669, 670, 671, 672, 673, 675, 676, 677, 678, 679, 682, 684, 686, 687, 688, 689, 706, 708, 709, 711, 712, 713, 714, 715, 720, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 729, 730, 731, 732, 733, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 768, 775, 776, 778, 781, 782, 783, 784, 785, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 799, 813, 833, 834, 841, 849, 867 и 873.

В некоторых вариантах реализации следующие антисмысловые соединения или олигонуклеотиды направлены на область нуклеиновой кислоты CFB и вызывают по меньшей мере 90% ингибирование мРНК CFB, ISIS NO: 532686, 532811, 532917, 588536, 588537, 588538, 588539, 588544, 588545, 588546, 588548, 588551, 588552, 588553, 588554, 588555, 588556, 588557, 588558, 588559, 588560, 588561, 588562, 588564, 588638, 588640, 588696, 588698, 588849, 588850, 588851, 588860, 588866, 588867, 588872, 588873, 588874, 588876, 588877, 588878, 588879, 588881, 588883, 599149, 599188, 599203, 599206, 599220, 599221, 599222, 599223, 599224, 599225, 599226, 599227, 599228, 599229, 599235, 599236, 599279, 599280, 599314, 599321, 599362, 599378, 599390, 599391, 599398, 599399, 599404, 599413, 599414, 599416, 599419, 599420, 599422, 599435, 599437, 599438, 599441, 599483, 599494, 599508, 599552, 599553, 599554, 599568, 599570, 599577, 599581, 599591, 599592 и 599593.

В некоторых вариантах реализации следующие антисмысловые соединения или олигонуклеотиды направлены на область нуклеиновой кислоты CFB и вызывают по меньшей мере 90% ингибирование мРНК CFB, SEQ ID NO: 84, 238, 239, 317, 412, 413, 420, 421, 426, 434, 436, 437, 438, 439, 440, 442, 443, 444, 445, 446, 448, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 464, 465, 472, 473, 514, 515, 542, 543, 544, 545, 546, 551, 553, 555, 556, 599, 600, 601, 602, 610, 616, 617, 618, 662, 666, 670, 676, 677, 678, 688, 689, 713, 723, 729, 730, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 755, 756, 768, 783, 793, 833 и 867.

В некоторых вариантах реализации соединение может содержать или состоять из любого олигонуклеотида, направленного на CFB, описанного в настоящем документе, и группы конъюгата.

В некоторых вариантах реализации соединение содержит модифицированный олигонуклеотид и группу конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов, комплементарных в диапазоне нуклеотидов 2193-2212, 2195-2210, 2457-2476, 2571-2590, 2584-2603, 2588-2607, 2592-2611, 2594-2613, 2597-2616, 2600-2619 или 2596-2611 SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах реализации соединение содержит модифицированный олигонуклеотид и группу конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов, имеющих последовательность азотистых оснований, содержащую любую из SEQ ID NO: 198, 228, 237, 440, 444, 448, 450, 453, 455, 549 и 598.

В некоторых вариантах реализации соединение содержит модифицированный олигонуклеотид и группу конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид имеет последовательность азотистых оснований, состоящую из любой из SEQ ID NO: 198, 228, 237, 440, 444, 448, 450, 453, 455, 549 и 598.

В некоторых вариантах реализации любое из предыдущих соединений или олигонуклеотидов может содержать по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь, по меньшей мере один модифицированный сахар и/или по меньшей мере одно модифицированное азотистое основание.

В некоторых аспектах любое из предыдущих соединений или олигонуклеотидов может содержать по меньшей мере один модифицированный сахар. В некоторых аспектах по меньшей мере один модифицированный сахар содержит 2'-О-метоксиэтильную группу. В некоторых аспектах по меньшей мере один модифицированный сахар представляет собой бициклический сахар, такой как группа 4'-CH(CH₃)-O-2', группа 4'-CH₂-O-2' или группа 4'-(CH₂)₂-O-2'.

В некоторых аспектах модифицированный олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь, такую как тиофосфатная межнуклеозидная связь.

В некоторых вариантах реализации модифицированный олигонуклеотид содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 фосфодиэфирных межнуклеозидных связей.

В некоторых вариантах реализации каждая межнуклеозидная связь модифицированного олигонуклеотида выбрана из фосфодиэфирной межнуклеозидной связи и тиофосфатной межнуклеозидной связи.

В некоторых вариантах реализации каждая межнуклеозидная связь модифицированного олигонуклеотида представляет собой тиофосфатную связь.

В некоторых вариантах реализации любые предыдущие соединения или олигонуклеотиды содержат по меньшей мере одно модифицированное азотистое основание, такое как 5-метилцитозин.

В некоторых вариантах реализации соединение содержит группу конъюгата и модифицированный олигонуклеотид, содержащий

сегмент гэта, состоящий из связанных дезоксинуклеозидов; сегмент 5'-крыла, состоящий из связанных нуклеозидов; и сегмент 3'-крыла, состоящий из связанных нуклеозидов;

причем сегмент гэта расположен между сегментом 5'-крыла и сегментом 3'-крыла, и при этом каждый нуклеозид каждого сегмента крыла содержит модифицированный сахар. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов, имеющих последовательность азотистых оснований, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 198, 228, 237, 440, 444,

448, 450, 453, 455, 549 или 598.

В некоторых вариантах реализации модифицированный олигонуклеотид имеет последовательность азотистых оснований, содержащую или состоящую из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 198, 228, 237, 440, 444, 448, 450, 453 или 455, причем модифицированный олигонуклеотид содержит

сегмент гэта, состоящий из десяти связанных дезоксинуклеозидов; сегмент 5'-крыла, состоящий из пяти связанных нуклеозидов; и сегмент 3'-крыла, состоящий из пяти связанных нуклеозидов;

где каждый сегмент гэта расположен между сегментом 5'-крыла и сегментом 3'-крыла, причем каждый нуклеозид каждого сегмента крыла содержит 2'-О-метоксиэтильный сахар; где каждая межнауклеозидная связь представляет собой тиофосфатную связь, и где каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

В некоторых вариантах реализации соединение содержит или состоит из одноцепочечного модифицированного олигонуклеотида и группы конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид состоит из 20 связанных нуклеозидов, имеющих последовательность азотистых оснований, состоящую из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 198, 228, 237, 440, 444, 448, 450, 453 или 455, причем олигонуклеотид содержит

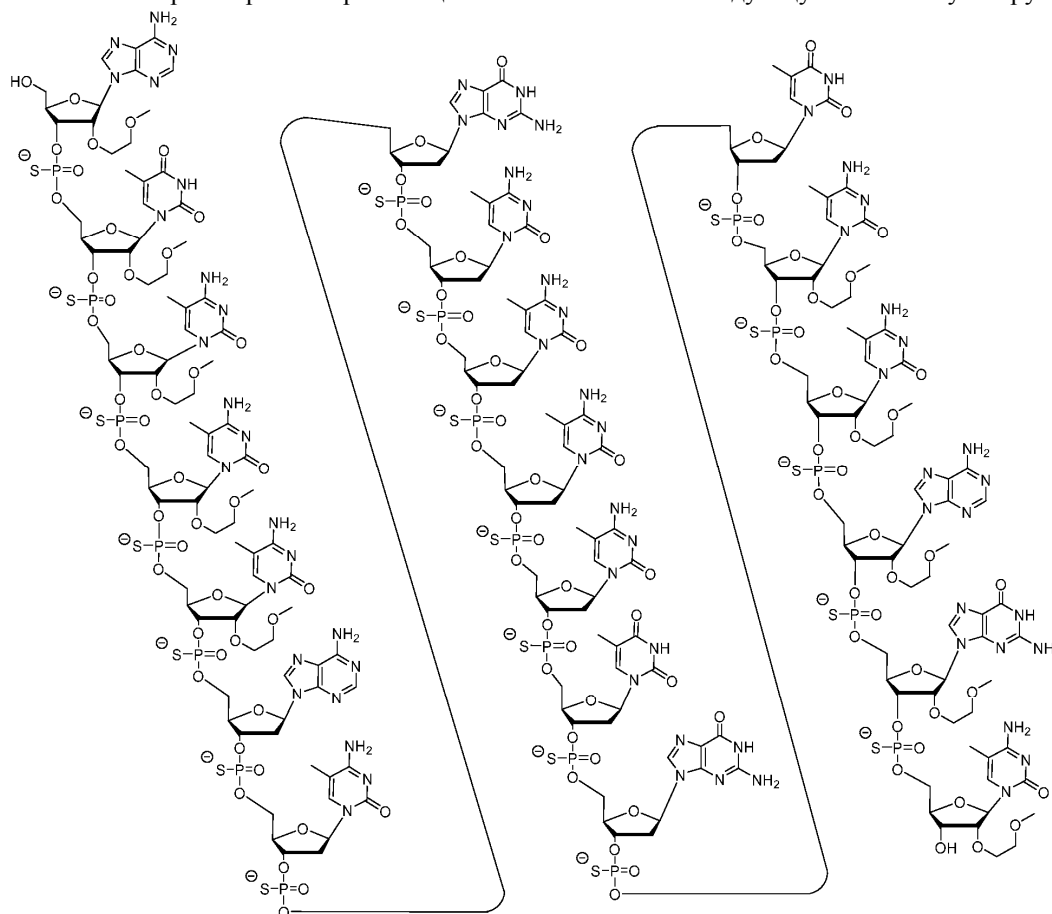
сегмент гэта, состоящий из десяти связанных дезоксинуклеозидов;

сегмент 5'-крыла, состоящий из пяти связанных нуклеозидов; и

сегмент 3'-крыла, состоящий из пяти связанных нуклеозидов;

где сегмент гэта расположен между сегментом 5'-крыла и сегментом 3'-крыла, где каждый нуклеозид каждого сегмента крыла содержит 2'-О-метоксиэтильный сахар; причем каждая межнауклеозидная связь представляет собой тиофосфатную связь; и где каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

В некоторых вариантах реализации соединение содержит или состоит из ISIS 588540 и группы конъюгата. В некоторых вариантах реализации ISIS 588540 имеет следующую химическую структуру:



В некоторых вариантах реализации модифицированный олигонуклеотид имеет последовательность азотистых оснований, содержащую или состоящую из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 549, где модифицированный олигонуклеотид содержит

сегмент гэта, состоящий из десяти связанных дезоксинуклеозидов; сегмент 5'-крыла, состоящий из трех связанных нуклеозидов; и сегмент 3'-крыла, состоящий из трех связанных нуклеозидов;

где сегмент гэта расположен между сегментом 5'-крыла и сегментом 3'-крыла; причем каждый нуклеозид каждого сегмента крыла содержит сEt сахар; где каждая межнауклеозидная связь представляет собой тиофосфатную связь; и где каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

В некоторых аспектах модифицированный олигонуклеотид имеет последовательность азотистых

оснований, содержащую или состоящую из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 598, где модифицированный олигонуклеотид содержит

сегмент гэта, состоящий из десяти связанных дезоксирибонуклеотидов; сегмент 5'-крыла, состоящий из трех связанных нуклеотидов; и сегмент 3'-крыла, состоящий из трех связанных нуклеотидов;

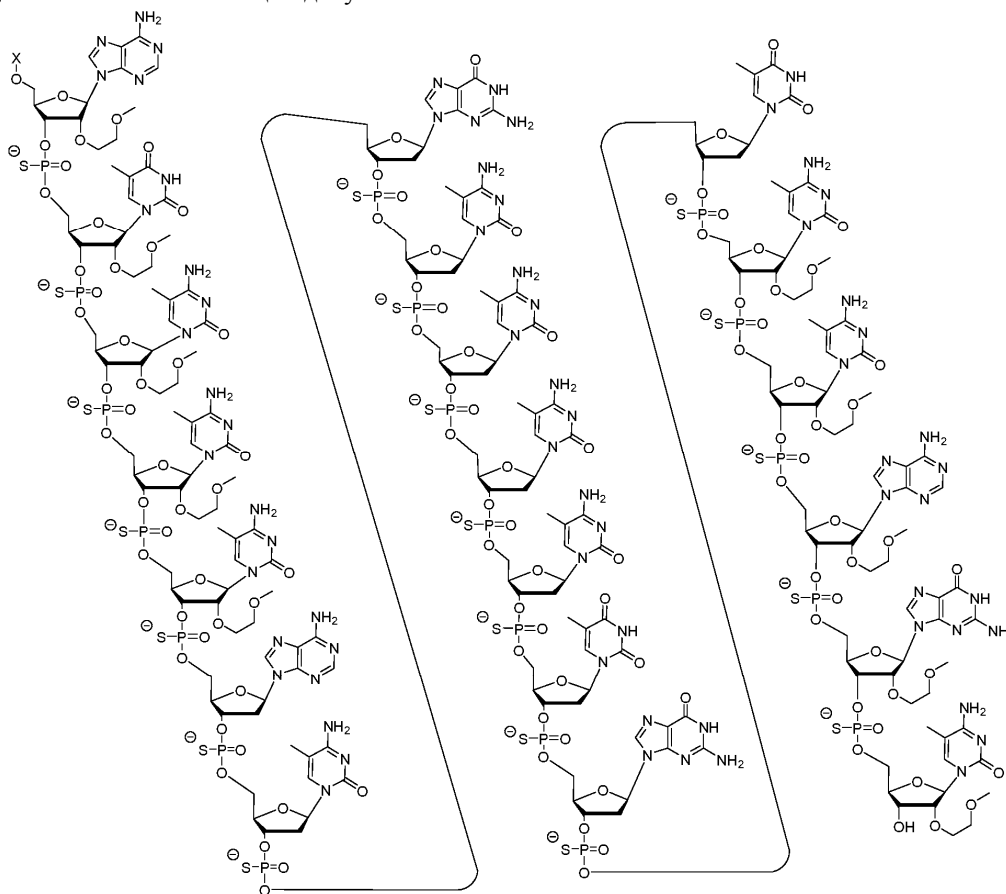
где сегмент гэта расположен между сегментом 5'-крыла и сегментом 3'-крыла; где сегмент 5'-крыла содержит 2'-О-метоксиэтильный сахар, 2'-О-метоксиэтильный сахар и сEt сахар в направлении от 5' к 3'; где сегмент 3'-крыла содержит сEt сахар, сEt сахар и 2'-О-метоксиэтильный сахар в направлении от 5' к 3'; где каждая межнауклеотидная связь представляет собой тиофосфатную связь; и где каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

В некоторых предыдущих вариантах реализации соединения или олигонуклеотида может быть по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% комплементарен нуклеиновой кислоте, кодирующей CFB.

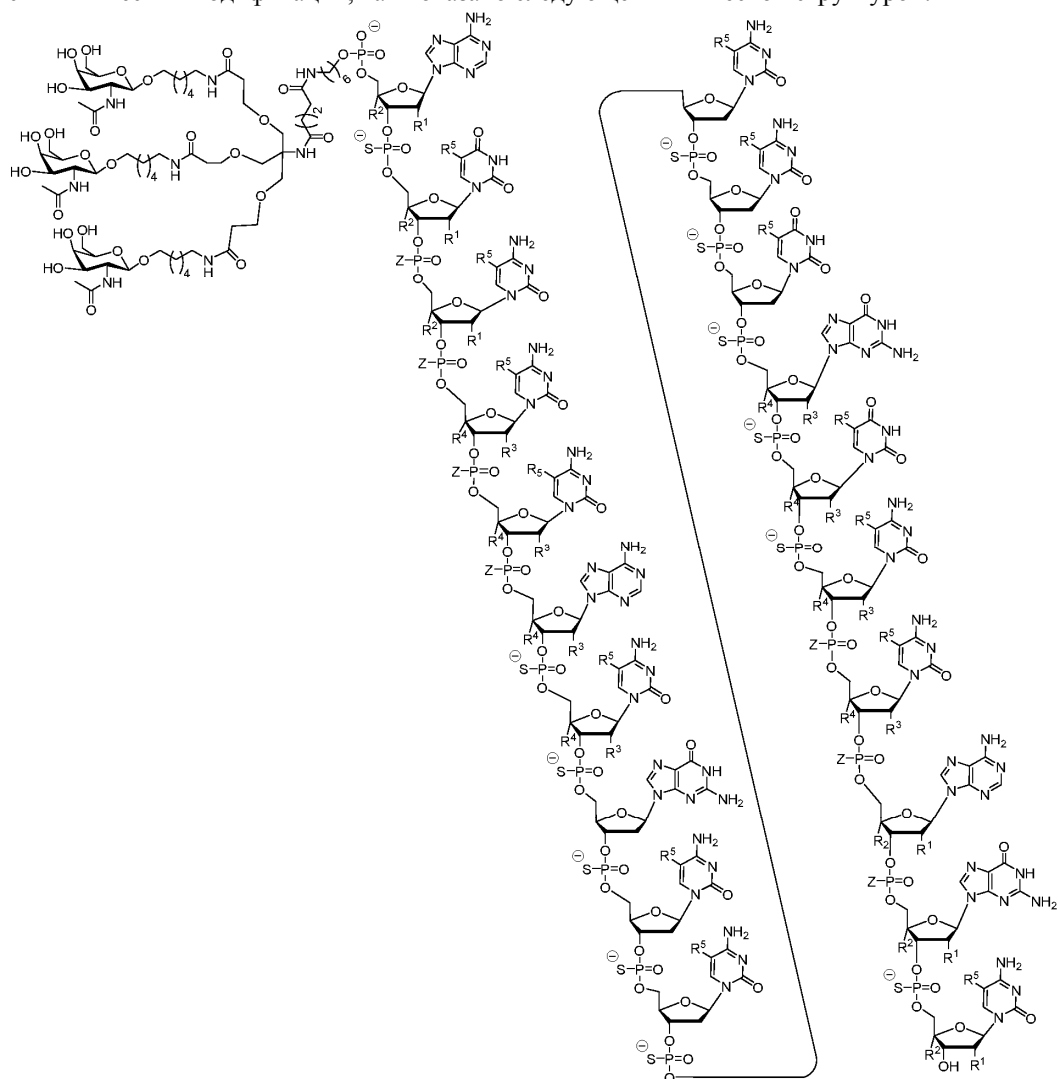
В любых предыдущих вариантах реализации соединения или олигонуклеотида может быть одноцепочечным.

В некоторых вариантах реализации группа конъюгата связана с модифицированным олигонуклеотидом на 5'-конце модифицированного олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации группа конъюгата связана с модифицированным олигонуклеотидом на 3'-конце модифицированного олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации группа конъюгата содержит по меньшей мере один N-ацетил галактоз амин (GalNAc), по меньшей мере два N-ацетилгалактозамина (GalNAc) или по меньшей мере три N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

В некоторых вариантах реализации соединения, имеющее следующую химическую структуру, содержит или состоит из ISIS 588540 с 5'-X, где X представляет собой группу конъюгата, содержащую GalNAc, как описано в настоящем документе:



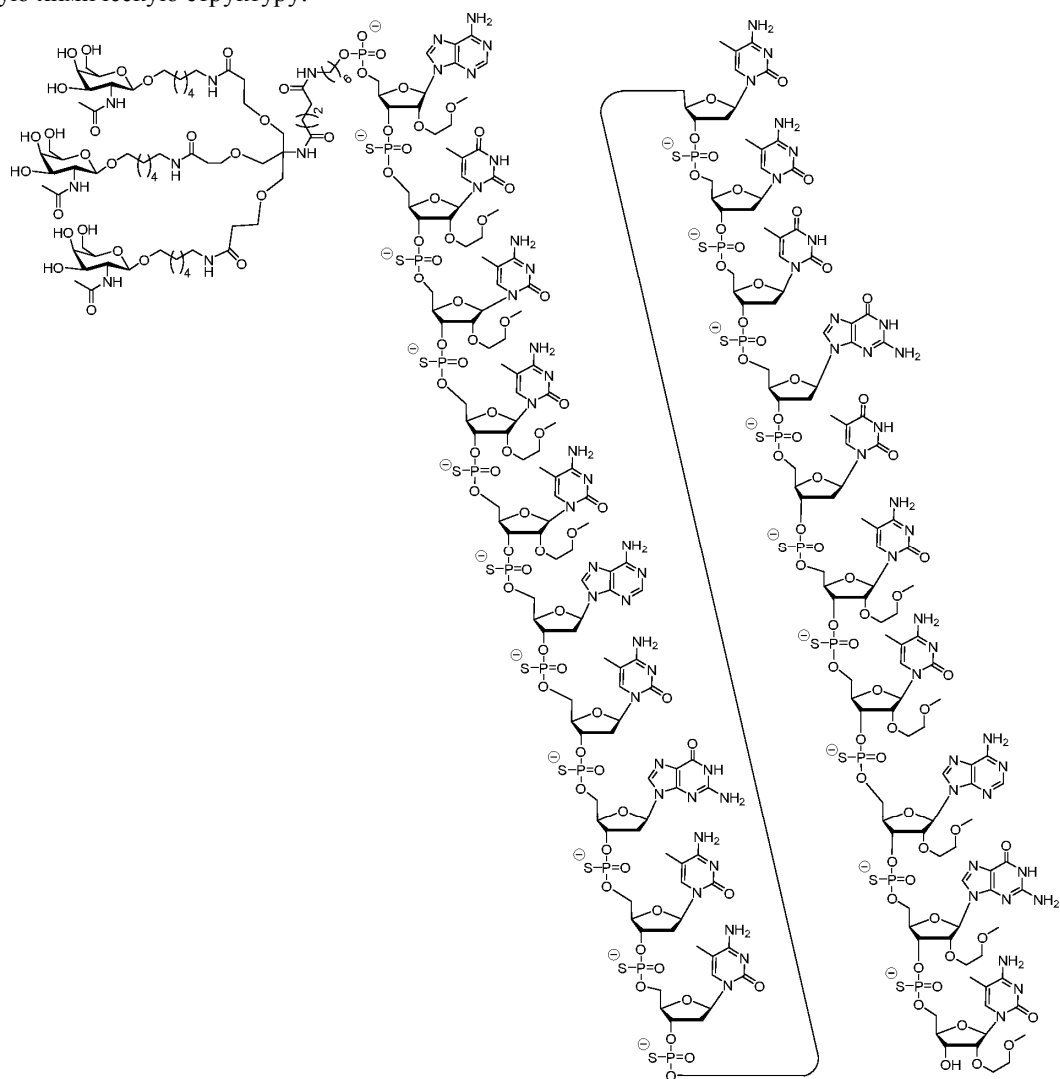
В некоторых вариантах реализации соединение содержит или состоит из SEQ ID NO: 440, 5'-GalNAc и химических модификаций, как показано следующей химической структурой:



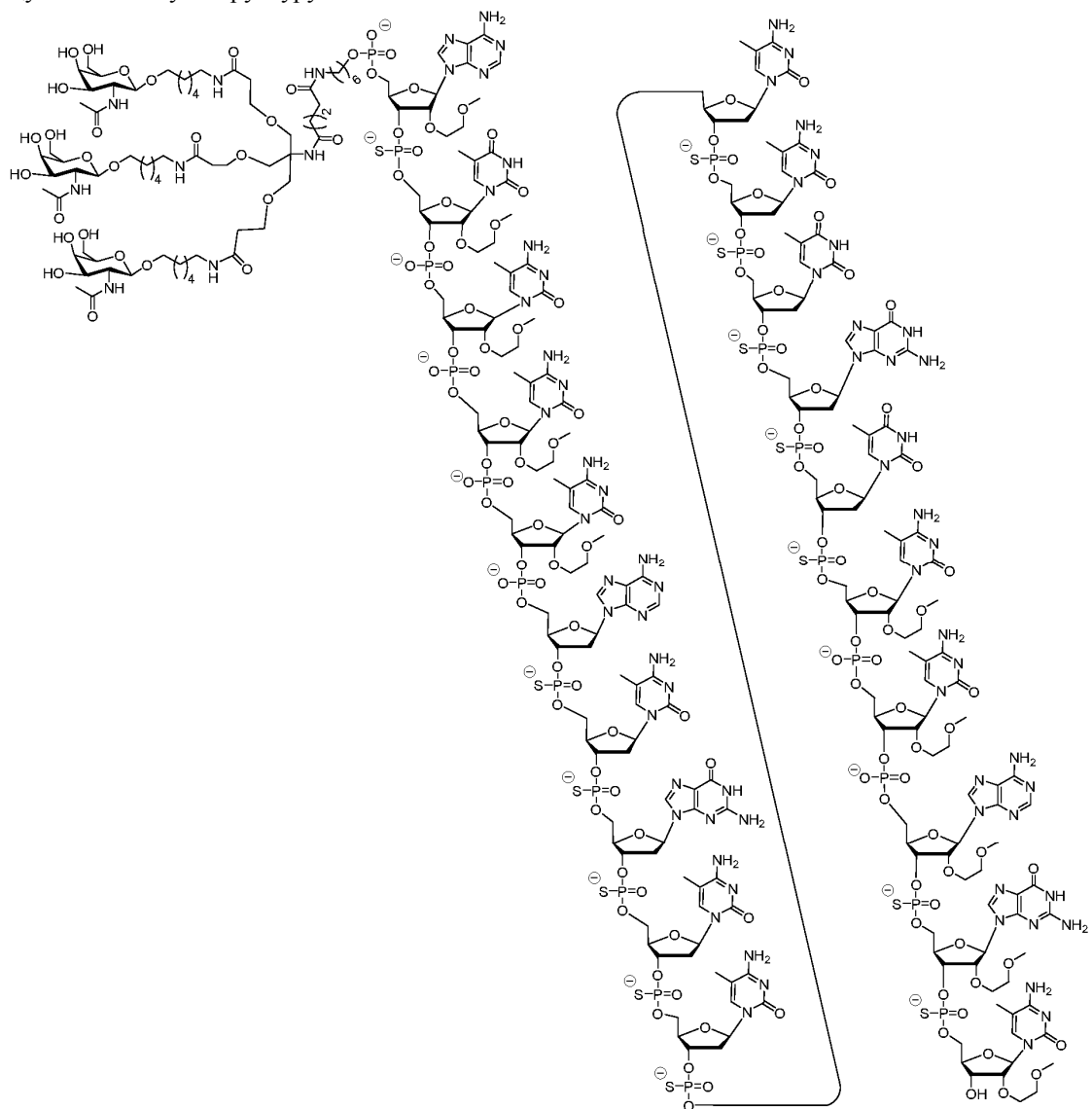
где любой R^1 представляет собой $-OCH_2CH_2OCH_3$ (MOE), и R^2 представляет собой H; или R^1 и R^2 вместе образуют мостик, где R^1 представляет собой $-O-$, и R^2 представляет собой $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$ или $-CH_2CH_2-$, и R^1 и R^2 напрямую связаны так, что полученный мостик выбран из $-O-CH_2-$, $-O-CH(CH_3)-$ и $-O-CH_2CH_2-$;

и для каждой пары R^3 и R^4 в одном кольце, независимо для каждого кольца: каждый R^3 выбран из H и $-OCH_2CH_2OCH_3$, и R^4 представляет собой H; или R^3 и R^4 вместе образуют мостик, где R^3 представляет собой $-O-$, и R^4 представляет собой $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$ или $-CH_2CH_2-$, и R^3 и R^4 напрямую соединены так, что полученный мостик выбран из $-O-CH_2-$, $-O-CH(CH_3)-$ и $-O-CH_2CH_2-$; и R^5 выбран из H и $-CH_3$; и Z выбран из S^- и O^- .

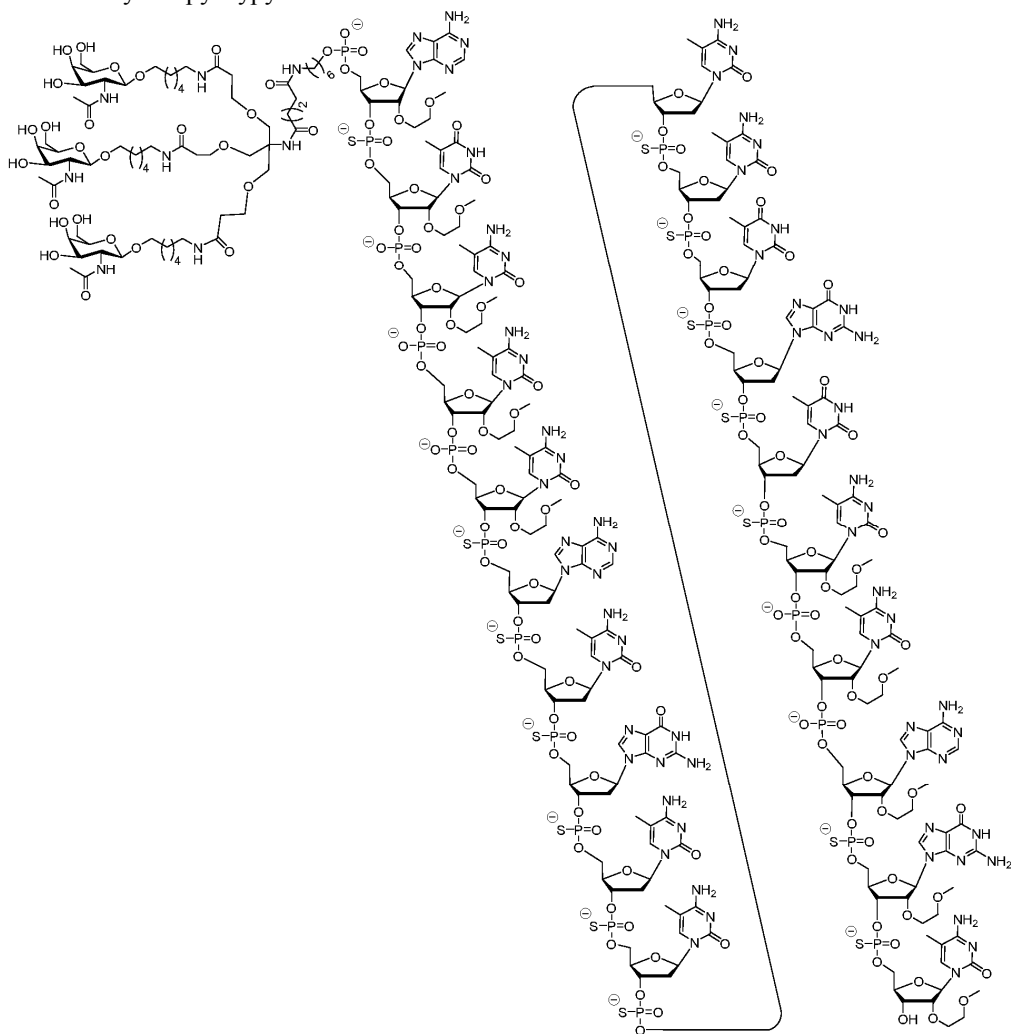
В некоторых вариантах реализации соединение содержит ISIS 696844. В некоторых вариантах реализации соединение состоит из ISIS 696844. В некоторых вариантах реализации ISIS 696844 имеет следующую химическую структуру:



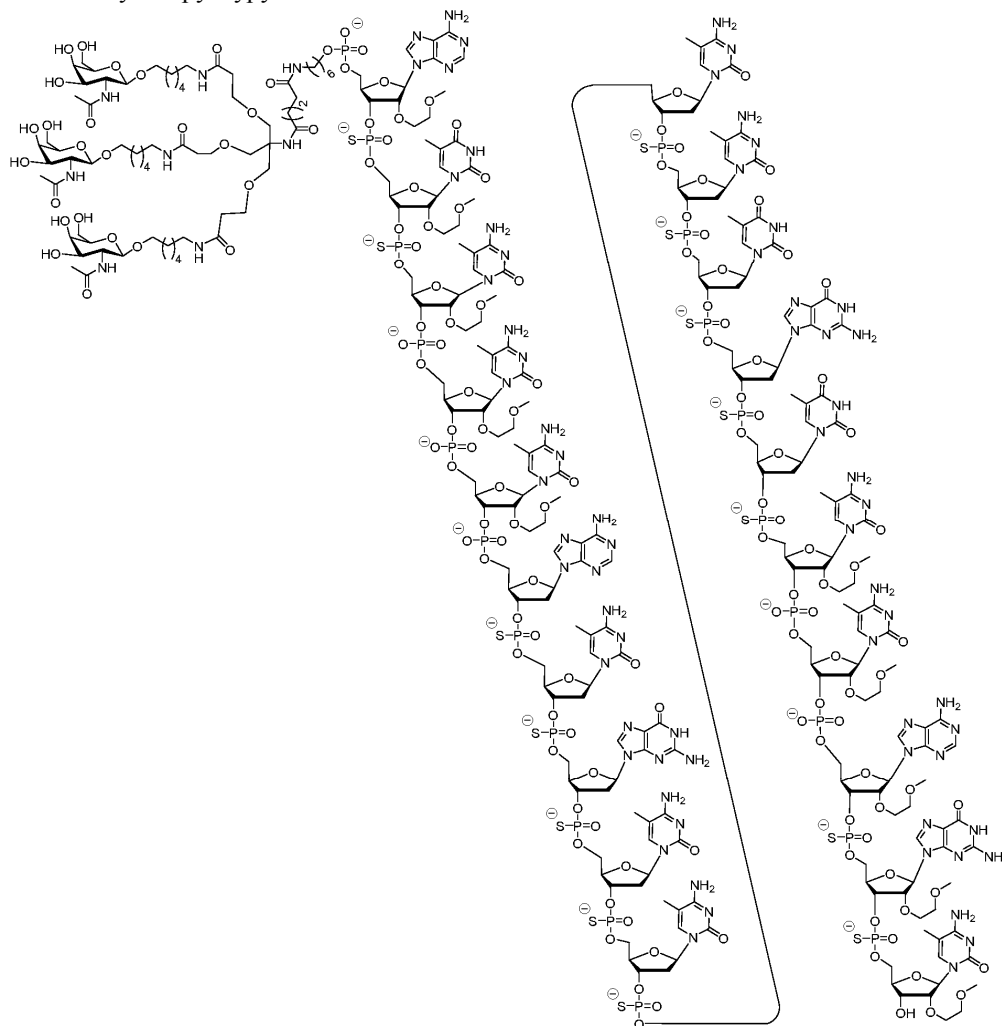
В некоторых вариантах реализации соединения содержит ISIS 696845. В некоторых вариантах реализации соединение состоит из ISIS 696845. В некоторых вариантах реализации ISIS 696845 имеет следующую химическую структуру:



В некоторых вариантах реализации соединения содержит ISIS 698969. В некоторых вариантах реализации соединения состоит из ISIS 698969. В некоторых вариантах реализации ISIS 698969 имеет следующую химическую структуру:



В некоторых вариантах реализации соединения содержит ISIS 698970. В некоторых вариантах реализации соединения состоит из ISIS 698970. В некоторых вариантах реализации ISIS 698970 имеет следующую химическую структуру:



В некоторых вариантах реализации изобретения предложены композиции, содержащие любое соединение, содержащее или состоящее из модифицированного олигонуклеотида, направленного на CFB, или его соль, и группу конъюгата, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

В некоторых вариантах реализации соединения или композиции, описанные в настоящем документе, эффективны в том отношении, что они имеют по меньшей мере одну *in vitro* IC₅₀ менее 250 нМ, менее 200, менее 150, менее 100, менее 90, менее 80, менее 70, менее 65, менее 60, менее 55, менее 50, менее 45, менее 40, менее 35, менее 30, менее 25 или менее 20 нМ.

В некоторых вариантах реализации соединения или композиции, описанные в настоящем документе, являются хорошо переносимыми, что демонстрируется наличием по меньшей мере одного из показателей: повышения значения ALT или AST не более чем в 4 раза, 3 раза или 2 раза по сравнению с животными, обработанными солевым раствором, или увеличения массы печени, селезенки или почек не более чем на 30, 20, 15, 12, 10, 5 или 2%. В некоторых вариантах реализации соединения или композиции, описанные в настоящем документе, являются хорошо переносимыми, что демонстрируется отсутствием увеличения ALT или AST по сравнению с животными, обработанными солевым раствором. В некоторых вариантах реализации соединения или композиции, описанные в настоящем документе, являются хорошо переносимыми, что демонстрируется отсутствием увеличения массы печени, селезенки или почек по сравнению с животными, обработанными солевым раствором.

В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая соединение по любому из предыдущих вариантов реализации или его соль и по меньшей мере один из фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя. В некоторых аспектах композиция имеет вязкость менее около 40 сантипуаз (сП), менее около 30, менее около 20, менее около 15 или менее около 10 сП. В некоторых аспектах композиция, имеющая любую вышеуказанную вязкость, содержит соединение, предложенное в настоящем документе, в концентрации около 100, около 125, около 150, около 175, около 200, около 225, около 250, около 275 или около 300 мг/мл. В некоторых аспектах композиция, имеющая любую вышеуказан-

ную вязкость и/или концентрацию соединения, имеет температуру комнатной температуры или около 20, около 21, около 22, около 23, около 24, около 25, около 26, около 27, около 28, около 29 или около 30°C.

В некоторых вариантах реализации способ лечения, предупреждения или ослабления заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента у субъекта, включает введение субъекту соединения или композиции, описанной в настоящем документе, тем самым обеспечивая лечение, предупреждение или облегчение заболевания. В некоторых аспектах альтернативный путь комплемента активирован выше нормального уровня. В некоторых вариантах реализации способ лечения, предупреждения или облегчения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента у субъекта, включает введение субъекту соединения, содержащего или состоящего из модифицированного олигонуклеотида и группы конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов и имеет последовательность азотистых оснований, содержащую последовательность азотистых оснований любой из SEQ ID NO: 6-808. В некоторых вариантах реализации способ лечения, предупреждения или облегчения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента у субъекта, включает введение субъекту соединения, содержащего или состоящего из модифицированного олигонуклеотида и группы конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов, имеющих последовательность азотистых оснований, содержащую любую из SEQ ID NO: 198, 228, 237, 440, 444, 448, 450, 453, 455, 549 и 598. В некоторых вариантах реализации способ лечения, предупреждения или облегчения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента у субъекта, включает введение субъекту соединения, содержащего или состоящего из ISIS 696844, ISIS 696845, ISIS 698969 или ISIS 698970.

В некоторых вариантах реализации способ лечения, предупреждения или облегчения дегенерации желтого пятна, такой как возрастная дегенерация желтого пятна (AMD), у субъекта включает введение субъекту соединения или композиции, описанной в настоящем документе, тем самым обеспечивая лечение, предупреждение или облегчение AMD. В некоторых аспектах альтернативный путь комплемента активирован выше нормального уровня. В некоторых аспектах AMD представляет собой влажную AMD. В некоторых вариантах реализации AMD представляет собой сухую AMD или географическую атрофию. В некоторых вариантах реализации способ лечения, предупреждения или облегчения дегенерации желтого пятна у субъекта, такой как возрастная дегенерация желтого пятна (AMD), влажная AMD, сухая AMD или географическая атрофия, включает введение субъекту соединения, содержащего или состоящего из модифицированного олигонуклеотида и группы конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов и имеет последовательность азотистых оснований, содержащую последовательность азотистых оснований любой из SEQ ID NO: 6-808. В некоторых вариантах реализации способ лечения, предупреждения или облегчения дегенерации желтого пятна, такой как возрастная дегенерация желтого пятна (AMD), влажная AMD, сухая AMD или географическая атрофия у субъекта, включает введение субъекту соединения, содержащего или состоящего из модифицированного олигонуклеотида и группы конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов, имеющих последовательность азотистых оснований, содержащую любую из SEQ ID NO: 198, 228, 237, 440, 444, 448, 450, 453, 455, 549 и 598. В некоторых вариантах реализации способ лечения, предупреждения или облегчения дегенерации желтого пятна, такой как возрастная дегенерация желтого пятна (AMD), влажная AMD, сухая AMD или географическая атрофия у субъекта, включает введение субъекту соединения, содержащего или состоящего из ISIS 696844, ISIS 696845, ISIS 698969 или ISIS 698970. В некоторых аспектах соединение или композицию вводят субъекту парентерально.

В некоторых вариантах реализации способ лечения, предупреждения или облегчения заболевания почек, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента у субъекта, включает введение субъекту соединения или композиции, описанной в настоящем документе, обеспечивая тем самым лечение, предупреждение или облегчение заболевания почек. В некоторых вариантах реализации способ лечения, предупреждения или облегчения заболевания почек, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента у субъекта, включает введение субъекту соединения, содержащего или состоящего из модифицированного олигонуклеотида и группы конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов и имеет последовательность азотистых оснований, содержащую последовательность азотистых оснований любой из SEQ ID NO: 6-808. В некоторых вариантах реализации способ лечения, предупреждения или облегчения заболевания почек, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента у субъекта, включает введение субъекту соединения, содержащего или состоящего из модифицированного олигонуклеотида и группы конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов, имеющих последовательность азотистых оснований, содержащую любую из SEQ ID NO: 198, 228, 237, 440, 444, 448, 450, 453, 455, 549 и 598. В некоторых вариантах реализации способ лечения, предупреждения или облегчения заболевания почек, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента у субъекта, включает введение субъекту соединения, содержащего или состоящего из ISIS 696844, ISIS 696845, ISIS 698969 или ISIS 698970. В некоторых аспектах альтернативный путь комплемента активирован выше нормального уровня. В некоторых аспектах заболевание почек представляет собой волчаночный нефрит, системную красную волчанку (SLE), болезнь плотного осадка (DDD), C3 гломерулонефрит (C3GN), CFHR5 нефропатию или

атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS), или любую их комбинацию. В некоторых аспектах заболевание почек связано с отложением C3, например, отложением C3 в гломеруле. В некоторых аспектах заболевание почек связано с более низкими по сравнению с нормальными уровнями циркулирующего C3, например, уровнями C3 в сыворотке или плазме. В некоторых аспектах введение соединения или композиции снижает или ингибирует накопление содержания C3 в глазах, например, содержания белка C3. В некоторых аспектах введение соединения или композиции снижает уровень отложений C3 в глазах или ингибирует накопление содержания C3 в глазах. В некоторых аспектах соединение или композицию вводят субъекту парентерально. В некоторых аспектах введение соединения или композиции снижает или ингибирует накопление содержания C3 в почках, например, содержания белка C3. В некоторых аспектах введение соединения или композиции снижает уровни отложений C3 в почках или ингибирует накопление отложений C3 в почках, например, уровней C3 в гломеруле. В некоторых аспектах субъекта идентифицируют как страдающего или имеющего риск возникновения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, например, путем определения уровней комплемента или уровней мембраноатакующего комплекса в крови субъекта и/или путем генетического теста на генетические мутации факторов комплемента, связанные с заболеванием.

В некоторых вариантах реализации способ ингибирования экспрессии фактора комплемента В (CFB) у субъекта, страдающего или имеющего риск возникновения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, включает введение субъекту соединения или композиции, описанной в настоящем документе, обеспечивая тем самым ингибирование экспрессии CFB у субъекта. В некоторых вариантах реализации способ ингибирования экспрессии фактора комплемента В (CFB) у субъекта, страдающего или имеющего риск возникновения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, включает введение субъекту соединения, содержащего или состоящего из модифицированного олигонуклеотида и группы конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов и имеет последовательность азотистых оснований, содержащую последовательность азотистых оснований любой из SEQ ID NO: 6-808. В некоторых вариантах реализации способ ингибирования экспрессии фактора комплемента В (CFB) у субъекта, страдающего или имеющего риск возникновения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, включает введение субъекту соединения, содержащего или состоящего из модифицированного олигонуклеотида и группы конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов, имеющих последовательность азотистых оснований, содержащую любую из SEQ ID NO: 198, 228, 237, 440, 444, 448, 450, 453, 455, 549 и 598. В некоторых вариантах реализации способ ингибирования экспрессии фактора комплемента В (CFB) у субъекта, страдающего или имеющего риск возникновения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, включает введение субъекту соединения, содержащего или состоящего из ISIS 696844, ISIS 696845, ISIS 698969 или ISIS 698970. В некоторых аспектах введение соединения или композиции ингибирует экспрессию CFB в глазах. В некоторых аспектах субъект страдает или имеет риск возникновения возрастной дегенерации желтого пятна (AMD), такой как влажная AMD или сухая AMD. В некоторых аспектах сухая AMD может представлять собой географическую атрофию. Географическую атрофию считают прогрессирующей формой сухой AMD, затрагивающей дегенерацию сетчатки. В некоторых аспектах введение соединения или композиции ингибирует экспрессию CFB в почках, например, в гломеруле. В некоторых аспектах субъект страдает или имеет риск возникновения волчаночного нефрита, системной красной волчанки (SLE), болезни плотного осадка (DDD), C3 гломерулонефрита C3GN), CFHR5 нефропатии или атипичного гемолитико-уремического синдрома (aHUS), или любой их комбинации.

В некоторых вариантах реализации способ снижения или ингибирования накопления отложения C3 в глазу субъекта, страдающего или имеющего риск возникновения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, включает введение субъекту соединения или композиции, описанной в настоящем документе, тем самым снижая или ингибируя накопление отложений C3 в глазу субъекта. В некоторых вариантах реализации способ снижения или ингибирования накопления отложений C3 в глазу субъекта, страдающего или имеющего риск возникновения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, включает введение субъекту соединения, содержащего или состоящего из модифицированного олигонуклеотида и группы конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов и имеет последовательность азотистых оснований, содержащую последовательность азотистых оснований любой из SEQ ID NO: 6-808. В некоторых вариантах реализации способ снижения или ингибирования накопления отложений C3 в глазу субъекта, страдающего или имеющего риск возникновения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, включает введение субъекту соединения, содержащего или состоящего из модифицированного олигонуклеотида и группы конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов, имеющих последовательность азотистых оснований, содержащую любую из SEQ ID NO: 198, 228, 237, 440, 444, 448, 450, 453, 455, 549 и 598. В некоторых вариантах реализации способ снижения или ингибирования накопления отложений C3 в глазу субъекта, страдающего или имеющего риск возникновения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, включает введение субъекту соединения, содержащего или состоящего из ISIS 696844, ISIS

696845, ISIS 698969 или ISIS 698970. В некоторых аспектах субъект страдает или имеет риск возникновения возрастной дегенерации желтого пятна (AMD), такой как влажная AMD или сухая AMD. В некоторых аспектах сухая AMD может представлять собой географическую атрофию. В некоторых аспектах соединение или композицию вводят субъекту парентерально.

В некоторых вариантах реализации способ снижения или ингибирования накопления отложений C3 в почках субъекта, страдающего или имеющего риск возникновения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, включает введение субъекту соединения или композиции, описанной в настоящем документе, тем самым снижая или ингибируя накопление отложений C3 в почках субъекта. В некоторых вариантах реализации способ снижения или ингибирования накопления отложений C3 в почках субъекта, страдающего или имеющего риск возникновения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, включает введение субъекту соединения, содержащего или состоящего из модифицированного олигонуклеотида и группы конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов и имеет последовательность азотистых оснований, содержащую последовательность азотистых оснований любой из SEQ ID NO: 6-808. В некоторых вариантах реализации способ снижения или ингибирования накопления отложений C3 в почках субъекта, страдающего или имеющего риск возникновения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, включает введение субъекту соединения, содержащего или состоящего из модифицированного олигонуклеотида и группы конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов, имеющих последовательность азотистых оснований любой из SEQ ID NO: 198, 228, 237, 440, 444, 448, 450, 453, 455, 549 и 598. В некоторых вариантах реализации способ снижения или ингибирования накопления отложений C3 в почках субъекта, страдающего или имеющего риск возникновения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, включает введение субъекту соединения, содержащего или состоящего из ISIS 696844, ISIS 696845, ISIS 698969 или ISIS 698970. В некоторых аспектах субъект страдает или имеет риск возникновения волчаночного нефрита, системной красной волчанки (SLE), болезни плотного осадка (DDD), C3 гломерулонефрита (C3GN), CFHR5 нефропатии или атипического гемолитико-уремического синдрома (aHUS), или любой их комбинации. В некоторых аспектах соединение или композицию вводят субъекту парентерально.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к применению соединения или композиции, описанной в настоящем документе, для лечения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента. Некоторые варианты реализации относятся к применению соединения, содержащего или состоящего из модифицированного олигонуклеотида и группы конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов и имеет последовательность азотистых оснований, содержащую последовательность азотистых оснований любой из SEQ ID NO: 6-808, для лечения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к применению соединения, содержащего или состоящего из модифицированного олигонуклеотида и группы конъюгата, где модифицированный олигонуклеотид состоит из 10-30 связанных нуклеозидов, имеющих последовательность азотистых оснований, содержащую любую из SEQ ID NO: 198, 228, 237, 440, 444, 448, 450, 453, 455, 549 и 598, для лечения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента. Некоторые варианты реализации относятся к применению соединения, содержащего или состоящего из ISIS 696844, ISIS 696845, ISIS 698969 или ISIS 698970, для лечения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента. В некоторых аспектах альтернативный путь комплемента активирован выше нормального уровня. В некоторых аспектах заболевание представляет собой дегенерацию желтого пятна, такую как возрастная дегенерация желтого пятна (AMD), которая может быть влажной AMD или сухой AMD. В некоторых аспектах сухая AMD может представлять собой географическую атрофию. В некоторых аспектах заболевание представляет собой болезнь почек, такую как волчаночный нефрит, системная красная волчанка (SLE), болезнь плотного осадка (DDD), C3 гломерулонефрит (C3GN), CFHR5 нефропатия или атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS), или любая их комбинация. В некоторых аспектах соединение или композицию вводят субъекту парентерально.

В некоторых вариантах реализации соединение или композицию, описанную в настоящем документе, вводят парентерально. Например, в некоторых вариантах реализации соединение или композиция может быть введена через инъекцию или инфузию. Парентеральное введение включает подкожное введение, внутривенное введение, внутримышечное введение, внутриартериальное введение, внутрибрюшинное введение или внутричерепное введение, например, интратекальное или интрацеребровентрикулярное введение.

Антисмысловые соединения.

Олигомерные соединения включают, но не ограничиваются ими, олигонуклеотиды, олигонуклеозиды, аналоги олигонуклеотидов, миметики олигонуклеотидов, антисмысловые соединения, антисмысловые олигонуклеотиды и мПНК. Олигомерное соединение может быть "антисмысловым" к нуклеиновой кислоте-мишени, что означает, что оно способно подвергаться гибридизации с нуклеиновой кислотой-мишенью посредством водородного связывания.

В некоторых вариантах реализации антисмысловое соединение содержит последовательность азотистых оснований, которая при написании в 5'-3' направлении содержит обратный комплемент целевого сегмента нуклеиновой кислоты-мишени, на которую она нацелена.

В некоторых вариантах реализации антисмысловое соединение имеет 10-30 субъединиц в длину. В некоторых вариантах реализации антисмысловое соединение имеет от 12 до 30 субъединиц в длину. В некоторых вариантах реализации антисмысловое соединение имеет от 12 до 22 субъединиц в длину. В некоторых вариантах реализации антисмысловое соединение содержит от 14 до 30 субъединиц в длину. В некоторых вариантах реализации антисмысловое соединение имеет от 14 до 20 субъединиц в длину. В некоторых вариантах реализации антисмысловое соединение имеет от 15 до 30 субъединиц в длину. В некоторых вариантах реализации антисмысловое соединение имеет от 15 до 20 субъединиц в длину. В некоторых вариантах реализации антисмысловое соединение имеет от 16 до 30 субъединиц в длину. В некоторых вариантах реализации антисмысловое соединение имеет от 16 до 20 субъединиц в длину. В некоторых вариантах реализации антисмысловое соединение имеет от 17 до 30 субъединиц в длину. В некоторых вариантах реализации антисмысловое соединение имеет от 17 до 20 субъединиц в длину. В некоторых вариантах реализации антисмысловое соединение имеет от 18 до 30 субъединиц в длину. В некоторых вариантах реализации антисмысловое соединение имеет от 18 до 21 субъединицы в длину. В некоторых вариантах реализации антисмысловое соединение имеет от 18 до 20 субъединиц в длину. В некоторых вариантах реализации антисмысловое соединение имеет от 20 до 30 субъединиц в длину. Другими словами, такие антисмысловые соединения имеют от 12 до 30 связанных субъединиц, от 14 до 30 связанных субъединиц, от 14 до 20 субъединиц, от 15 до 30 субъединиц, от 15 до 20 субъединиц, от 16 до 30 субъединиц, от 16 до 20 субъединиц, от 17 до 30 субъединиц, от 17 до 20 субъединиц, от 18 до 30 субъединиц, от 18 до 20 субъединиц, от 18 до 21 субъединицы, от 20 до 30 субъединиц или от 12 до 22 связанных субъединиц, соответственно. В некоторых вариантах реализации антисмысловое соединение имеет 14 субъединиц в длину. В некоторых вариантах реализации антисмысловое соединение имеет 16 субъединиц в длину. В некоторых вариантах реализации антисмысловое соединение имеет 17 субъединиц в длину. В некоторых вариантах реализации антисмысловое соединение имеет 18 субъединиц в длину. В некоторых вариантах реализации антисмысловое соединение имеет 19 субъединиц в длину. В некоторых вариантах реализации антисмысловое соединение имеет 20 субъединиц в длину. В других вариантах реализации антисмысловое соединение имеет 8-80, 12-50, 13-30, 13-50, 14-30, 14-50, 15-30, 15-50, 16-30, 16-50, 17-30, 17-50, 18-22, 18-24, 18-30, 18-50, 19-22, 19-30, 19-50 или 20-30 связанных субъединиц. В некоторых таких вариантах реализации антисмысловые соединения содержат 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 связанных субъединиц в длину или диапазон, определяемый любыми двумя из указанных выше значений. В некоторых вариантах реализации антисмысловое соединение представляет собой антисмысловый олигонуклеотид, а связанные субъединицы представляют собой нуклеотиды.

В некоторых вариантах реализации антисмысловые олигонуклеотиды могут быть укороченными или усеченными. Например, одна субъединица может быть удалена с 5' конца (5' усечение), или же с 3' конца (3' усечение). Укороченное или усеченное антисмысловое соединение, направленное на нуклеиновую кислоту CFB, может иметь две субъединицы удаленные с 5' конца, или же может иметь две субъединицы удаленные с 3' конца антисмыслового соединения. В альтернативном варианте, удаленные нуклеотиды могут быть рассеяны по всему антисмысловому соединению, например, в антисмысловом соединении с одним нуклеотидом, удаленным с 5' конца, и одним нуклеотидом, удаленным с 3' конца.

Если одна дополнительная субъединица присутствует в удлиненном антисмысловом соединении, дополнительная субъединица может быть расположена на 5' или 3' конце антисмыслового соединения. Если присутствуют две или более дополнительных субъединиц, присоединенные субъединицы могут быть смежными друг с другом, например, в антисмысловом соединении, имеющем две субъединицы присоединенные к 5' концу (5' присоединение), или же к 3' концу (3' присоединение) антисмыслового соединения. В альтернативном варианте присоединенные субъединицы могут быть рассеяны по всему антисмысловому соединению, например, в антисмысловом соединении, имеющем одну субъединицу, присоединенную к 5' концу, и одну субъединицу, присоединенную к 3' концу.

Возможно увеличение или уменьшение длины антисмыслового соединения, такого как антисмысловый олигонуклеотид, и/или введение некомплементарного азотистого основания без устранения активности. Например, Woolf et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7305-7309, 1992), описывают ряд антисмысловых олигонуклеотидов длиной 13-25 азотистых оснований, которые были испытаны на их способность индуцировать расщепление РНК-мишени в модели инъекции в ооцит. Антисмысловые олигонуклеотиды длиной 25 азотистых оснований с 8 или 11 некомплементарными основаниями вблизи концов антисмысловых олигонуклеотидов были в состоянии управлять прямым специфическим расщеплением мРНК-мишени, хотя и в меньшей степени, чем антисмысловые олигонуклеотиды, которые не содержали никаких несоответствий. Аналогичным образом, целевое специфическое расщепление было получено с применением антисмысловых олигонуклеотидов из 13 азотистых оснований, включая такие, что имели 1 или 3 несоответствия.

Gautschi et al. (J. Natl. Cancer Inst. 93:463-471, март, 2001) продемонстрировали способность олигонуклеотида, обладающего 100% комплементарностью к мРНК bcl-2 и содержащего 3 рассогласованных основания по отношению к мРНК bcl-xL, уменьшать экспрессию как bcl-2, так и bcl-xL *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, данный олигонуклеотид продемонстрировал высокую противоопухолевую активность *in vivo*.

Maher and Dolnick (Nuc. Acid. Res. 16:3341-3358, 1988) испытания серии тандемов антисмысловых олигонуклеотидов из 14 азотистых оснований и антисмысловых олигонуклеотидов из 28 и 42 азотистых оснований, состоящий из последовательности двух или трех тандемов антисмысловых олигонуклеотидов, соответственно, на их способность к блокированию трансляции ДГФР человека в анализе на ретикулоцитах кролика. Каждый из трех антисмысловых олигонуклеотидов из 14 азотистых оснований в одиночку был способен ингибировать трансляцию, хотя и на более низком уровне, чем антисмысловые олигонуклеотиды из 28 или 42 азотистых оснований.

Некоторые мотивы и механизмы антисмысловых соединений.

В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловые соединения содержат химически модифицированные субъединицы, организованные в паттерны или мотивы, для придания антисмысловым соединениям таких свойств, как усиленная ингибирующая активность, повышенная аффинность связывания с нуклеиновой кислотой-мишенью или сопротивление разложению нуклеазами *in vivo*.

Химерные антисмысловые соединения обычно содержат по меньшей мере один участок, измененный таким образом, чтобы придать повышенную устойчивость к деградации под действием нуклеаз, усиление клеточного поглощения, повышенную аффинность связывания с нуклеиновой кислотой-мишенью и/или повышенную ингибирующую активность. Второй участок химерного антисмыслового соединения может обеспечивать другое требуемое свойство, например, служить в качестве субстрата для клеточной эндонуклеазы РНКазы Н, которая расщепляет спираль РНК в дуплексе РНК:ДНК.

Антисмысловая активность может быть результатом любого механизма, затрагивающего гибридизацию антисмыслового соединения (например, олигонуклеотида) с нуклеиновой кислотой-мишенью, при этом гибридизация в конечном итоге приводит к биологическому эффекту. В некоторых вариантах реализации модулируют количество и/или активность нуклеиновой кислоты-мишени. В некоторых вариантах реализации снижают количество и/или активность нуклеиновой кислоты-мишени. В некоторых вариантах реализации гибридизация антисмыслового соединения с нуклеиновой кислотой-мишенью в конечном итоге приводит к разрушению нуклеиновой кислоты-мишени. В некоторых вариантах реализации гибридизация антисмыслового соединения с нуклеиновой кислотой-мишенью не приводит к разрушению нуклеиновой кислоты-мишени. В некоторых вариантах реализации наличие антисмыслового соединения, гибридизованного с нуклеиновой кислотой-мишенью (занятость), приводит к модулированию антисмысловой активности. В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения, имеющие определенный химический мотив или паттерн химических модификаций, особенно подходят для функционирования одного или более механизмов. В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения функционируют более чем по одному механизму и/или по механизмам, которые не были выяснены. Соответственно, антисмысловые соединения, описанные в настоящем документе, не ограничены конкретным механизмом.

Антисмысловые механизмы включают, без ограничения, антисенс, опосредованный РНКазой Н; механизмы РНКи, в которых используется путь RISC и которые включают, без ограничения, механизмы миРНК, оцРНК и микроРНК; и механизмы на основании занятости. Некоторые антисмысловые соединения могут действовать более чем по одному такому механизму и/или по дополнительным механизмам.

Антисенс, опосредованный РНКазой Н.

В некоторых вариантах реализации антисмысловая активность по меньшей мере частично обусловлена разрушением РНК-мишени РНКазой Н. РНКазы Н представляют собой клеточную эндонуклеазу, которая расщепляет спираль РНК дуплекса РНК:ДНК. В данной области техники известно, что одноцепочечные антисмысловые соединения, которые являются "ДНК-подобными", вызывают активность РНКазы Н в клетках млекопитающих. Соответственно, антисмысловые соединения, содержащие по меньшей мере часть ДНК или ДНК-подобных нуклеозидов, могут активировать РНКазу Н, приводя к расщеплению нуклеиновой кислоты-мишени. В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения, использующие РНКазу Н, содержат один или более модифицированных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации такие антисмысловые соединения содержат по меньшей мере один блок из 1-8 модифицированных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации модифицированные нуклеозиды не поддерживают активность РНКазы Н. В некоторых вариантах реализации такие антисмысловые соединения представляют собой гэммеры, как описано в настоящем документе. В некоторых таких вариантах реализации гэм гэмпера содержит ДНК нуклеозиды. В некоторых таких вариантах реализации гэм гэмпера содержит ДНК-подобные нуклеозиды. В некоторых таких вариантах реализации гэм гэмпера содержит ДНК нуклеозиды и ДНК-подобные нуклеозиды.

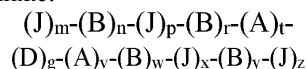
Некоторые антисмысловые соединения, имеющие гэмперный мотив, считаются химерными антисмысловыми соединениями. В гэмпере внутренний участок имеет множество нуклеотидов, которые поддерживают расщепление РНКазой Н, расположенных между внешними областями, имеющими множест-

во нуклеотидов, химически отличных от нуклеозидов внутренней области. В случае, когда антисмысловой олигонуклеотид имеет гэммерный мотив, сегмент гэм, как правило, служит в качестве субстрата для расщепления эндонуклеазой, в то время, как сегменты крыльев содержат модифицированные нуклеозиды. В некоторых вариантах реализации участки гэммера различаются по типам сахарных фрагментов в составе каждого отдельного участка. Типы сахарных фрагментов, используемых для дифференциации участков гэммера, в некоторых вариантах реализации могут включать β -D-рибонуклеозиды, β -D-дезоксирибонуклеозиды, 2'-модифицированные нуклеозиды (такие 2'-модифицированные нуклеозиды могут включать, среди прочих, 2'-МОЕ и 2'-О-CH₃) и модифицированные нуклеозиды с бициклическим сахаром (такие модифицированные нуклеозиды с бициклическим сахаром могут включать те, которые содержат стерически затрудненный этил). В некоторых вариантах реализации нуклеозиды в крыльях могут содержать несколько модифицированных сахарных фрагментов, включая, например, 2'-МОЕ и бициклические сахарные фрагменты, такие как стерически затрудненный этил или LNA. В некоторых вариантах реализации крылья могут содержать несколько модифицированных и немодифицированных сахарных фрагментов. В некоторых вариантах реализации крылья могут содержать различные комбинации 2'-МОЕ нуклеозидов, бициклических сахарных фрагментов, таких как нуклеозиды со стерически затрудненным этилом или LNA нуклеозиды, и 2'-дезоксинуклеозиды.

Каждый отдельный участок может содержать одинаковые сахарные фрагменты, отличные или чередующиеся сахарные фрагменты. Мотив крыло-гэм-крыло часто описывают как "X-Y-Z", где "X" обозначает длину 5'-крыла, "Y" обозначает длину гэпа, а "Z" обозначает длину 3'-крыла. "X" и "Z" могут содержать одинаковые, отличные или чередующиеся сахарные фрагменты. В некоторых вариантах реализации "X" и "Y" могут содержать один или более 2'-дезоксинуклеозидов. "Y" может содержать 2'-дезоксинуклеозиды. В данном контексте гэммер, описанный как "X-Y-Z", имеет конфигурацию, в которой гэм расположен непосредственно прилегая к 5'-крылу и 3'-крылу. Таким образом, между 5'-крылом и гэпом или гэпом и 3'-крылом не существует промежуточных нуклеотидов. Любые антисмысловые соединения, описанные в настоящем документе, могут иметь гэммерный мотив. В некоторых вариантах реализации "X" и "Z" являются одинаковыми; в других вариантах реализации они различны. В некоторых вариантах реализации "Y" содержит от 8 до 15 нуклеозидов. X, Y или Z могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 или более нуклеозидов.

В некоторых вариантах реализации антисмысловое соединение, направленное на нуклеиновую кислоту CFB, имеет гэммерный мотив, в котором гэм состоит из 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 связанных нуклеозидов.

В некоторых вариантах реализации антисмысловый олигонуклеотид имеет сахарный мотив, описанный формулой A, представленной ниже:



где каждый A независимо представляет собой 2'-замещенный нуклеозид; каждый B независимо представляет собой бициклический нуклеозид; каждый J независимо представляет собой либо 2'-замещенный нуклеозид, либо 2'-дезоксинуклеозид;

каждый D представляет собой 2'-дезоксинуклеозид;

m равен 0-4; n равен 0-2; p равен 0-2; r равен 0-2; t равен 0-2; v равен 0-2; w равен 0-4; x равен 0-2; y равен 0-2; z равен 0-4; g равен 6-14; при условии, что по меньшей мере один из m, n и r отличен от 0; по меньшей мере один из w и y отличен от 0; сумма m, n, p, r и t равна от 2 до 5; и сумма v, w, x, y и z равна от 2 до 5.

Соединения РНКи.

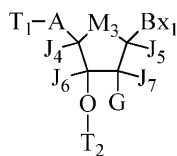
В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения представляют собой соединения интерферирующей РНК (РНКи), которые включают двухцепочечные соединения РНК (также называемые малой интерферирующей РНК или миРНК) и одноцепочечные соединения РНКи (или оцРНК). Такие соединения по меньшей мере частично действуют по пути RISC для разрушения и/или изолирования нуклеиновой кислоты-мишени (следовательно, включают соединения микроРНК/микроРНК-миметики).

В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения содержат модификации, которые делают их особенно подходящими для таких механизмов.

i. Соединения оцРНК.

В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения, включая соединения, особенно подходящие для применения в качестве одноцепочечных РНКи соединений (оцРНК), содержат модифицированный 5'-терминальный конец. В некоторых таких вариантах реализации 5'-терминальный конец содержит модифицированный фосфатный фрагмент. В некоторых вариантах реализации такой модифицированный фосфат является стабилизированным (например, устойчивым к разложению/расщеплению по сравнению с немодифицированным 5'-фосфатом). В некоторых вариантах реализации такие 5'-концевые нуклеозиды стабилизируют 5'-фосфорный фрагмент. Некоторые модифицированные 5'-концевые нуклеозиды описаны в известном уровне техники, например, в WO/2011/139702.

В некоторых вариантах реализации 5'-нуклеозид соединения оцРНК имеет формулу Ps

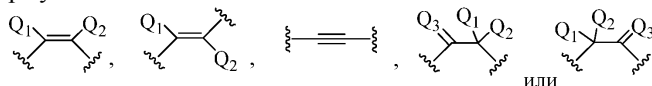


Пс

где T_1 представляет собой необязательно защищенный фосфорный фрагмент;

T_2 представляет собой межнуклеозидную линкерную группу, связывающую соединение формулы Пс с олигомерным соединением;

A имеет одну из формул:



Q_1 и Q_2 , каждый независимо, представляют собой H, галоген, C_1 - C_6 -алкил, замещенный C_1 - C_6 -алкил, C_1 - C_6 -алкокси, замещенный C_1 - C_6 -алкокси, C_2 - C_6 -алкенил, замещенный C_2 - C_6 -алкенил, C_2 - C_6 -алкинил, замещенный C_2 - C_6 -алкинил или $N(R_3)(R_4)$;

Q_3 представляет собой O, S, $N(R_5)$ или $C(R_6)(R_7)$;

каждый R_3 , R_4 , R_5 , R_6 и R_7 независимо представляет собой H, C_1 - C_6 -алкил, замещенный C_1 - C_6 -алкил или C_1 - C_6 -алкокси;

M_3 представляет собой O, S, NR_{14} , $C(R_{15})(R_{16})$, $C(R_{15})(R_{16})C(R_{17})(R_{18})$, $C(R_{15})=C(R_{17})$, $OC(R_{15})(R_{16})$ или $OC(R_{15})(Bx_2)$;

R_{14} представляет собой H, C_1 - C_6 -алкил, замещенный C_1 - C_6 -алкил, C_1 - C_6 -алкокси, замещенный C_1 - C_6 -алкокси, C_2 - C_6 -алкенил, замещенный C_2 - C_6 -алкенил, C_2 - C_6 -алкинил или замещенный C_2 - C_6 -алкинил;

R_{15} , R_{16} , R_{17} и R_{18} , каждый независимо, представляют собой H, галоген, C_1 - C_6 -алкил, замещенный C_1 - C_6 -алкил, C_1 - C_6 -алкокси, замещенный C_1 - C_6 -алкокси, C_2 - C_6 -алкенил, замещенный C_2 - C_6 -алкенил, C_2 - C_6 -алкинил или замещенный C_2 - C_6 -алкинил;

Bx_1 представляет собой фрагмент гетероциклического основания;

или если присутствует Bx_2 , то Bx_2 представляет собой фрагмент гетероциклического основания, а Bx_1 представляет собой H, галоген, C_1 - C_6 -алкил, замещенный C_1 - C_6 -алкил, C_1 - C_6 -алкокси, замещенный C_1 - C_6 -алкокси, C_2 - C_6 -алкенил, замещенный C_2 - C_6 -алкенил, C_2 - C_6 -алкинил или замещенный C_2 - C_6 -алкинил;

J_4 , J_5 , J_6 и J_7 , каждый независимо, представляют собой H, галоген, C_1 - C_6 -алкил, замещенный C_1 - C_6 -алкил, C_1 - C_6 -алкокси, замещенный C_1 - C_6 -алкокси, C_2 - C_6 -алкенил, замещенный C_2 - C_6 -алкенил, C_2 - C_6 -алкинил или замещенный C_2 - C_6 -алкинил;

или J_4 образует мостик с одним из J_5 или J_7 , где указанный мостик состоит из 1-3 связанных бирадикальных групп, выбранных из O, S, NR_{19} , $C(R_{20})(R_{21})$, $C(R_{20})=C(R_{21})$, $C[=C(R_{20})(R_{21})]$ и $C(=O)$, а другие два из J_5 , J_6 и J_7 , каждый независимо, представляют собой H, галоген, C_1 - C_6 -алкил, замещенный C_1 - C_6 -алкил, C_1 - C_6 -алкокси, замещенный C_1 - C_6 -алкокси, C_2 - C_6 -алкенил, замещенный C_2 - C_6 -алкенил, C_2 - C_6 -алкинил или замещенный C_2 - C_6 -алкинил;

каждый R_{19} , R_{20} и R_{21} независимо представляет собой H, C_1 - C_6 -алкил, замещенный C_1 - C_6 -алкил, C_1 - C_6 -алкокси, замещенный C_1 - C_6 -алкокси, C_2 - C_6 -алкенил, замещенный C_2 - C_6 -алкенил, C_2 - C_6 -алкинил или замещенный C_2 - C_6 -алкинил;

G представляет собой H, OH, галоген или $O-[C(R_8)(R_9)]_n-[(C=O)_m-X_1]_j-Z$;

каждый R_8 и R_9 независимо представляет собой H, галоген, C_1 - C_6 -алкил или замещенный C_1 - C_6 -алкил;

X_1 представляет собой O, S или $N(E_1)$;

Z представляет собой H, галоген, C_1 - C_6 -алкил, замещенный C_1 - C_6 -алкил, C_2 - C_6 -алкенил, замещенный C_2 - C_6 -алкенил, C_2 - C_6 -алкинил, замещенный C_2 - C_6 -алкинил или $N(E_2)(E_3)$;

E_1 , E_2 и E_3 , каждый независимо, представляют собой H, C_1 - C_6 -алкил или замещенный C_1 - C_6 -алкил;

n равен от 1 до около 6;

m равен 0 или 1;

j равен 0 или 1;

каждая замещенная группа содержит одну или более необязательно защищенных групп заместителей, независимо выбранных из галогена, OJ_1 , $N(J_1)(J_2)$, $=NJ_1$, SJ_1 , N_3 , CN , $OC(=X_2)J_1$, $OC(=X_2)N(J_1)(J_2)$ и $C(=X_2)N(J_1)(J_2)$;

X_2 представляет собой O, S или NJ_3 ;

каждый J_1 , J_2 и J_3 независимо представляет собой H или C_1 - C_6 -алкил;

если j равен 1, то Z отличен от галогена или $N(E_2)(E_3)$; и

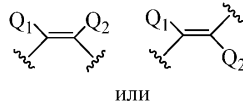
где указанное олигомерное соединение содержит от 8 до 40 мономерных субъединиц и может подвергаться гибридизации с по меньшей мере частью нуклеиновой кислоты-мишени.

В некоторых вариантах реализации M_3 представляет собой O, $CH=CH$, OCH_2 или $OC(H)(Bx_2)$. В не-

которых вариантах реализации M_3 представляет собой О.

В некоторых вариантах реализации J_4 , J_5 , J_6 и J_7 представляют собой Н. В некоторых вариантах реализации J_4 образует мостик с одним из J_5 или J_7 .

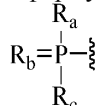
В некоторых вариантах реализации А имеет одну из формул:



или

где Q_1 и Q_2 , каждый независимо, представляют собой Н, галоген, C_1 - C_6 -алкил, замещенный C_1 - C_6 -алкил, C_1 - C_6 -алкокси или замещенный C_1 - C_6 -алкокси. В некоторых вариантах реализации Q_1 и Q_2 представляют собой Н. В некоторых вариантах реализации Q_1 и Q_2 , каждый независимо, представляют собой Н или галоген. В некоторых вариантах реализации Q_1 и Q_2 представляет собой Н, а другой из Q_1 и Q_2 представляет собой F, CH_3 или OCH_3 .

В некоторых вариантах реализации T_1 имеет формулу

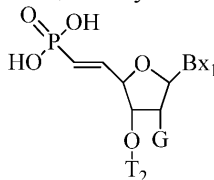


где R_a и R_c , каждый независимо, представляют собой защищенный гидроксил, защищенный тиол, C_1 - C_6 -алкил, замещенный C_1 - C_6 -алкил, C_1 - C_6 -алкокси, замещенный C_1 - C_6 -алкокси, защищенный амин или замещенный амин; и

R_b представляет собой О или S. В некоторых вариантах реализации R_b представляет собой О, а R_a и R_c , каждый независимо, представляют собой OCH_3 , OCH_2CH_3 или $CH(CH_3)_2$.

В некоторых вариантах реализации G представляет собой галоген, OCH_3 , OCH_2F , $OCHF_2$, OCF_3 , OCH_2CH_3 , $O(CH_2)_2F$, OCH_2CHF_2 , OCH_2CF_3 , $OCH_2-CH=CH_2$, $O(CH_2)_2-OCH_3$, $O(CH_2)_2-SCH_3$, $O(CH_2)_2-OCF_3$, $O(CH_2)_3-N(R_{10})(R_{11})$, $O(CH_2)_2-ON(R_{10})(R_{11})$, $O(CH_2)_2-O(CH_2)_2-N(R_{10})(R_{11})$, $OCH_2C(=O)-N(R_{10})(R_{11})$, $OCH_2C(=O)-N(R_{12})-(CH_2)_2-N(R_{10})(R_{11})$ или $O(CH_2)_2-N(R_{12})-C(=NR_{13})[N(R_{10})(R_{11})]$, где R_{10} , R_{11} , R_{12} и R_{13} , каждый независимо, представляют собой Н или C_1 - C_6 -алкил. В некоторых вариантах реализации G представляет собой галоген, OCH_3 , OCF_3 , OCH_2CH_3 , OCH_2CF_3 , $OCH_2-CH=CH_2$, $O(CH_2)_2-OCH_3$, $O(CH_2)_2-O(CH_2)_2-N(CH_3)_2$, $OCH_2C(=O)-N(H)CH_3$, $OCH_2C(=O)-N(H)-(CH_2)_2-N(CH_3)_2$ или $OCH_2-N(H)-C(=NH)NH_2$. В некоторых вариантах реализации G представляет собой F, OCH_3 или $O(CH_2)_2-OCH_3$. В некоторых вариантах реализации G представляет собой $O(CH_2)_2-OCH_3$.

В некоторых вариантах реализации 5'-концевой нуклеозид имеет формулу Πe



Πe

В некоторых вариантах реализации изобретения антисмысловые соединения, включая соединения, которые особенно подходят для оцРНК, содержат один или более типов модифицированных сахарных фрагментов и/или природных сахарных фрагментов, расположенных вдоль олигонуклеотида или его области в определенном паттерне или мотиве сахарной модификации. Такие мотивы могут содержать любые сахарные модификации, рассмотренные в настоящем документе, и/или другие известные модификации сахара.

В некоторых вариантах реализации олигонуклеотиды содержат или состоят из области, имеющей одинаковые сахарные модификации. В некоторых вариантах реализации каждый нуклеозид области содержит одинаковую РНК-подобную сахарную модификацию. В некоторых вариантах реализации каждый нуклеозид области представляет собой 2'-F нуклеозид. В некоторых вариантах реализации каждый нуклеозид области представляет собой 2'-ОМе нуклеозид. В некоторых вариантах реализации каждый нуклеозид области представляет собой 2'-МОЕ нуклеозид. В некоторых вариантах реализации каждый нуклеозид области представляет собой cEt нуклеозид. В некоторых вариантах реализации каждый нуклеозид области представляет собой LNA нуклеозид. В некоторых вариантах реализации однородная область образует весь или по существу весь олигонуклеотид. В некоторых вариантах реализации область образует весь нуклеотид, за исключением 1-4 концевых нуклеозидов.

В некоторых вариантах реализации олигонуклеотиды содержат одну или более областей чередующихся сахарных модификаций, где нуклеозиды чередуются между нуклеотидами, имеющими сахарную модификацию первого типа, и нуклеотидами, имеющими сахарную модификацию второго типа. В некоторых вариантах реализации нуклеозиды обоих типов представляют собой РНК-подобные нуклеозиды. В некоторых вариантах реализации чередующиеся нуклеозиды выбраны из 2'-ОМе, 2'-F, 2'-МОЕ, LNA и cEt. В некоторых вариантах реализации чередующиеся модификации представляют собой 2'-F и 2'-ОМе.

Такие области могут быть смежными или могут быть прерваны по-другому модифицированными нуклеозидами или конъюгированными нуклеозидами.

В некоторых вариантах реализации каждая чередующаяся область чередующихся модификаций состоит из одного нуклеозида (т.е. паттерн представляет собой $(AB)_x A_y$, где А представляет собой нуклеозид, имеющий сахарную модификацию первого типа, и В представляет собой нуклеозид, имеющий сахарную модификацию второго типа; x равен 1-20, и y равен 0 или 1). В некоторых вариантах реализации одна или более чередующихся областей в чередующемся мотиве содержит более одного нуклеозида не-которого типа. Например, олигонуклеотиды могут содержать одну или более областей любого из следующих нуклеозидных мотивов:

AABVAA;
 ABBABV;
 AABAAB;
 ABBABAABV;
 AVABA;
 AABABAB;
 AVABA;
 ABBAABVABA;
 VABBAABVABA; или
 AVABBAABVABA;

где А представляет собой нуклеозид первого типа, и В представляет собой нуклеозид второго типа. В некоторых вариантах реализации каждый А и В выбран из 2'-F, 2'-ОМе, БНК и МОЕ.

В некоторых вариантах реализации олигонуклеотиды, имеющие такой чередующийся мотив, содержат также модифицированный 5'-концевой нуклеозид, такой как нуклеозид формулы IIc или IIe.

В некоторых вариантах реализации олигонуклеотиды содержат область, имеющую мотив 2-2-3. Такие области содержат следующий мотив:

$-(A)_2-(B)_x-(A)_2-(C)_y-(A)_3-$

где А представляет собой первый тип модифицированного нуклеозида;

В и С представляют собой нуклеозиды, модифицированные иначе, чем А, однако В и С могут иметь одинаковые или разные модификации относительно друг друга;

x и y равны от 1 до 15.

В некоторых вариантах реализации А представляет собой 2'-Оме модифицированный нуклеозид. В некоторых вариантах реализации В и С представляют собой 2'-F модифицированные нуклеозиды. В некоторых вариантах реализации А представляет собой 2'-Оме модифицированный нуклеозид, а В и С представляют собой 2'-F модифицированные нуклеозиды.

В некоторых вариантах реализации олигонуклеотиды имеют следующий сахарный мотив:

$5'-(Q)-(AB)_x A_y-(D)_z$

где Q представляет собой нуклеозид, содержащий стабилизированный фосфатный фрагмент. В некоторых вариантах реализации Q представляет собой нуклеозид, имеющий формулы IIc или IIe;

А представляет собой первый тип модифицированного нуклеозида;

В представляет собой второй тип модифицированного нуклеозида;

D представляет собой модифицированный нуклеозид, содержащий модификацию, отличную от нуклеозида, смежного с ним. Так, если y равен 0, то D должен быть модифицирован иначе, чем В, а если y равен 1, то D должен быть модифицирован иначе, чем А. В некоторых вариантах реализации D отличен и от А, и от В.

x равен 5-15;

y равен 0 или 1;

z равен 0-4.

В некоторых вариантах реализации олигонуклеотиды имеют следующий сахарный мотив:

$5'-(Q)-(A)_x-(D)_z$

где Q представляет собой нуклеозид, содержащий стабилизированный фосфатный фрагмент. В некоторых вариантах реализации Q представляет собой нуклеозид, имеющий формулы IIc или IIe;

А представляет собой первый тип модифицированного нуклеозида;

D представляет собой модифицированный нуклеозид, содержащий модификацию, отличную от А.

x равен 11-30;

z равен 0-4.

В некоторых вариантах реализации А, В, С и D в представленных выше мотивах выбраны из 2'-ОМе, 2'-F, 2'-МОЕ, LNA и cEt. В некоторых вариантах реализации D представляет собой концевые нуклеозиды. В некоторых вариантах реализации такие концевые нуклеозиды не предназначены для гибри-

зации с нуклеиновой кислотой-мишенью (хотя может происходить случайная гибридизация одного или более из них). В некоторых вариантах реализации азотистое основание каждого нуклеотида D представляет собой аденин, независимо от идентичности азотистого основания в соответствующем положении нуклеиновой кислоты-мишени. В некоторых вариантах реализации азотистое основание каждого нуклеотида D представляет собой тимин.

В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения, включая соединения, которые особенно подходят для применения в качестве оцРНК, содержат модифицированные межнуклеозидные связи, расположенные вдоль олигонуклеотида или его области в определенном порядке или в мотиве модифицированной межнуклеозидной связи. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотиды содержат область, имеющую мотив чередующихся межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотиды содержат область одинаково модифицированных межнуклеозидных связей. В некоторых таких вариантах реализации олигонуклеотид содержит область, которая равномерна связана тиофосфатными межнуклеозидными связями. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотид равномерно связан тиофосфатными межнуклеозидными связями. В некоторых вариантах реализации каждая межнуклеозидная связь олигонуклеотида выбрана из фосфодиэфира и тиофосфата. В некоторых вариантах реализации каждая межнуклеозидная связь олигонуклеотида выбрана из фосфодиэфира и тиофосфата, и по меньшей мере одна межнуклеозидная связь представляет собой тиофосфат.

В некоторых вариантах реализации олигонуклеотид содержит по меньшей мере 6 тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотид содержит по меньшей мере 8 тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотид содержит по меньшей мере 10 тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотид содержит по меньшей мере один блок из по меньшей мере 6 последовательных тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотид содержит по меньшей мере один блок из по меньшей мере 8 последовательных тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотид содержит по меньшей мере один блок из по меньшей мере 10 последовательных тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотид содержит по меньшей мере один блок из по меньшей мере 12 последовательных тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых таких вариантах реализации по меньшей мере один такой блок расположен на 3' конце олигонуклеотида. В некоторых таких вариантах реализации по меньшей мере один такой блок расположен в пределах 3 нуклеотидов от 3' конца олигонуклеотида.

Олигонуклеотиды, имеющие любые из различных сахарных мотивов, описанных в настоящем документе, могут иметь любой связывающий мотив. Например, олигонуклеотиды, включая, но не ограничиваясь ими, те, которые описаны выше, могут иметь связывающий мотив, выбранный из неограничивающей таблицы, представленной ниже:

5' крайняя связь	Центральная область	3'-область
PS	Чередующиеся PO/PS	6 PS
PS	Чередующиеся PO/PS	7 PS
PS	Чередующиеся PO/PS	8 PS

ii. Соединения миРНК.

В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения представляют собой двухцепочечные РНКи соединения (миРНК). В таких вариантах реализации одна или обе цепи могут содержать любой мотив модификации, описанный выше для оцРНК. В некоторых вариантах реализации оцРНК соединения могут представлять собой немодифицированные РНК. В некоторых вариантах реализации соединения миРНК могут содержать немодифицированные нуклеотиды РНК, но модифицированные межнуклеозидные связи.

Некоторые варианты реализации относятся к двухцепочечным композициям, в которых каждая цепь содержит мотив, определенный положением одного или более модифицированных или немодифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации предложены композиции, содержащие первое и второе олигомерное соединение, которые полностью или по меньшей мере частично гибридизованы с образованием дуплексной области, и дополнительно содержащие область, которая комплементарна нуклеиновой кислоте-мишени и гибридизуется с ней. Удобно, что такая композиция содержит первое олигомерное соединение, которое представляет собой антисмысловую цепь, имеющую полную или частичную комплементарность нуклеиновой кислоте-мишени, и второе олигомерное соединение, которое представляет собой смысловую цепь, имеющую одну или более областей, комплементарных и образующих по меньшей мере одну дуплексную область с первым олигомерным соединением.

Композиции согласно некоторым вариантам реализации модулируют генную экспрессию посредством гибридизации с нуклеиновой кислотой-мишенью, что приводит к потере ее нормальной функции. В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота-мишень представляет собой CFB. В некоторых вариантах реализации разрушение CFB-мишени облегчается активированным комплексом RISC, кото-

рый образуется с композициями согласно настоящему изобретению.

Некоторые варианты реализации относятся к двухцепочечным композициям, в которых одна из цепей подходит, например, для воздействия на предпочтительное включения противоположной цепи в RISC (или расщепляющий) комплекс. Указанные композиции подходят для направленного воздействия на выбранные молекулы нуклеиновых кислот и для модулирования экспрессии одного или более генов. В некоторых вариантах реализации композиции согласно настоящему изобретению гибридизуются с частью РНК-мишени, что приводит к потере нормальной функции РНК-мишени.

Некоторые варианты реализации относятся к двухцепочечным композициям, в которых обе цепи содержат гемимерный мотив, полностью модифицированный мотив, позиционно модифицированный мотив или чередующийся мотив. Каждая цепь композиций согласно настоящему изобретению может быть модифицирована для выполнения определенной роли, например, в каскаде миРНК. Используя различные мотивы в каждой цепи или одинаковый мотив с различными химическими модификациями в каждой цепи, может быть обеспечено направленное воздействие на антисмысловую цепь комплекса RISC при ингибировании внедрения смысловой цепи. В рамках такой модели каждая цепь может быть модифицирована независимо, так что она лучше выполняет свою конкретную роль. Антисмысловая цепь может быть модифицирована на 5'-конце для усиления его роли в одной области RISC, тогда как 3'-конец может быть модифицирован иначе для усиления его роли в другой области RISC.

Молекулы двухцепочечных олигонуклеотидов могут представлять собой молекулу двухцепочечного полинуклеотида, содержащую самокомплементарные смысловые и антисмысловые области, где антисмысловая область содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна нуклеотидной последовательности в молекуле нуклеиновой кислоты-мишени или ее части, а смысловая область имеет нуклеотидную последовательность, соответствующую последовательности нуклеиновой кислоты-мишени или ее части. Молекулы двухцепочечных олигонуклеотидов могут быть собраны из двух отдельных олигонуклеотидов, где одна цепь представляет собой смысловую цепь, а другая представляет собой антисмысловую цепь, при этом антисмысловая и смысловая цепи являются самокомплементарными (т.е. каждая цепь содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна нуклеотидной последовательности в другой цепи; например, если антисмысловая цепь и смысловая цепь образуют дуплекс или двухцепочечную структуру, например, если двухцепочечная область имеет от около 15 до около 30, например, около 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 пар оснований); антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна нуклеотидной последовательности в молекуле нуклеиновой кислоты-мишени или ее части, а смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, соответствующую последовательности нуклеиновой кислоты-мишени или ее части (например, от около 15 до около 25 или более нуклеотидов молекулы двухцепочечного олигонуклеотида комплементарны нуклеиновой кислоте-мишени или ее части). В альтернативном варианте, двухцепочечный олигонуклеотид собирается из одного олигонуклеотида, где самокомплементарные смысловые и антисмысловые области миРНК связаны посредством линкера(ов) на основе нуклеиновой кислоты или не на основе нуклеиновой кислоты.

Двухцепочечный олигонуклеотид может представлять собой полинуклеотид с дуплексом, асимметричным дуплексом, шпильчатой или асимметричной шпильчатой вторичной структурой, имеющий самокомплементарные смысловые и антисмысловые области, при этом антисмысловая область содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна нуклеотидной последовательности в отдельной молекуле нуклеиновой кислоты-мишени или ее части, а смысловая область имеет нуклеотидную последовательность, соответствующую последовательности нуклеиновой кислоты-мишени или ее части. Двухцепочечный олигонуклеотид может представлять собой кольцевой одноцепочечный полинуклеотид, имеющий две или более петлевых структур и ствол, содержащий самокомплементарные смысловые и антисмысловые области, при этом антисмысловая область содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна нуклеотидной последовательности в молекуле нуклеиновой кислоты-мишени или ее части, а смысловая область имеет нуклеотидную последовательность, соответствующую последовательности нуклеиновой кислоты-мишени или ее части, и при этом кольцевой полинуклеотид может быть процессирован *in vivo* или *in vitro* с получением активной молекулы миРНК, способной опосредовать РНКи.

В некоторых вариантах реализации двухцепочечный олигонуклеотид содержит отдельные смысловые и антисмысловые последовательности или области, при этом смысловая и антисмысловая области ковалентно связаны нуклеотидными или нуклеотидными линкерными молекулами, известными в данной области техники, или в альтернативном варианте реализации связаны нековалентно посредством ионных взаимодействий, водородного связывания, ван-дер-ваальсовских взаимодействий, гидрофобных взаимодействий и/или стэкинг-взаимодействий. В некоторых вариантах реализации двухцепочечный олигонуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна нуклеотидной последовательности гена-мишени. В другом варианте реализации двухцепочечный олигонуклеотид взаимодействует с нуклеотидной последовательностью гена-мишени таким образом, который вызывает ингибирование экспрессии гена-мишени.

В данном контексте двухцепочечные олигонуклеотиды не ограничены молекулами, содержащими

только РНК, а дополнительно охватывают химически модифицированные нуклеотиды и нуклеотиды. В некоторых вариантах реализации молекулы малой интерферирующей нуклеиновой кислоты не имеют нуклеотидов, содержащих 2'-гидроксильную группу (2'-ОН). В некоторых вариантах реализации малые интерферирующие нуклеиновые кислоты необязательно не содержат рибонуклеотидов (например, нуклеотидов, имеющих группу 2'-ОН). Такие двухцепочечные олигонуклеотиды, которые не требуют наличия рибонуклеотидов в молекуле для поддержания РНКи, могут тем не менее иметь присоединенный линкер или линкеры или другие присоединенные или связанные группы, фрагменты или цепи, содержащие один или более нуклеотидов с группами 2'-ОН. Необязательно, двухцепочечный олигонуклеотид может содержать рибонуклеотиды в около 5, 10, 20, 30, 40 или 50% положений нуклеотидов. В контексте настоящего документа термин миРНК считают эквивалентным другим терминам, используемым для описания молекул нуклеиновых кислот, которые могут опосредовать последовательность-специфичную РНКи, например, малой интерферирующей РНК (миРНК), двухцепочечной РНК (дцРНК), микро-РНК (микроРНК), короткой шпилечной РНК (кшРНК), малого интерферирующего олигонуклеотида, малой интерферирующей нуклеиновой кислоты, малого интерферирующего модифицированного олигонуклеотида, химически модифицированной миРНК, РНК посттранскрипционного сайленсинга гена (ptgsРНК) и других. Кроме того, в данном контексте термин РНК считают эквивалентным другим терминам, используемым для описания последовательность-специфической интерференции РНК, такой как посттранскрипционный сайленсинг гена, трансляционное ингибирование или эпигенетика. Например, двухцепочечные олигонуклеотиды могут быть использованы для эпигенетического сайленсинга генов на посттранскрипционном уровне и на дотранскрипционном уровне. В неограничивающем примере эпигенетическое регулирование генной экспрессии молекулами миРНК согласно настоящему изобретению может быть результатом миРНК-опосредованной модификации структуры хроматина или паттерна метилирования для изменения генной экспрессии (см., например, Verdel et al., 2004, Science, 303, 672-676; Pal-Bhadra et al., 2004, Science, 303, 669-672; Allshire, 2002, Science, 297, 1818-1819; Volpe et al., 2002, Science, 297, 1833-1837; Jenuwein, 2002, Science, 297, 2215-2218; и Hall et al., 2002, Science, 297, 2232-2237).

Подразумевается, что соединения и композиции согласно некоторым вариантам реализации, предложенным в настоящем документе, могут направленно воздействовать на CFB посредством дцРНК-опосредованного сайленсинга гена или механизма РНКи, включая, например, эффекторные молекулы "шпилечной" или двухцепочечной РНК из ствола-петли, в которых одна цепь РНК с самокомплементарными последовательностями может принимать двухцепочечную конформацию, или эффекторные молекулы дуплексной дцРНК, содержащие две отдельные цепи РНК. В различных вариантах реализации дцРНК полностью состоит из рибонуклеотидов или состоит из смеси рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов, таких как гибриды РНК/ДНК, описанные, например, в WO 00/63364, поданной 19 апреля 2000 года, или в патенте США с серийным номером 60/130377, поданном 21 апреля 1999 г. дцРНК или эффекторная молекула дцРНК может представлять собой одну молекулу с областью самокомплементарности, так что нуклеотиды в одном сегменте молекулы участвуют в спаривании оснований с нуклеотидами в другом сегменте молекулы. В различных вариантах реализации дцРНК, которая состоит из одной молекулы, полностью состоит из рибонуклеотидов или содержит область рибонуклеотидов, которая комплементарна области дезоксирибонуклеотидов. В альтернативном варианте реализации дцРНК может содержать две разные цепи, которые имеют область комплементарности друг с другом.

В различных вариантах реализации обе цепи полностью состоят из рибонуклеотидов, одна цепь полностью состоит из рибонуклеотидов, и одна цепь полностью состоит из дезоксирибонуклеотидов, или одна или обе цепи содержат смесь рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов. В некоторых вариантах реализации области комплементарности по меньшей мере на 70, 80, 90, 95, 98 или 100% комплементарны друг другу и последовательности нуклеиновой кислоты-мишени. В некоторых вариантах реализации область дцРНК, которая находится в двухцепочечной конформации, содержит по меньшей мере 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 50, 75, 100, 200, 500, 1000, 2000 или 5000 нуклеотидов или содержит все нуклеотиды в кДНК или другой последовательности нуклеиновой кислоты-мишени, находящейся в дцРНК. В некоторых вариантах реализации дцРНК не содержит одноцепочечных областей, таких как одноцепочечные концы, или дцРНК представляет собой шпильку. В других вариантах реализации дцРНК имеет одну или более одноцепочечных областей или выступов. В некоторых вариантах реализации гибриды РНК/ДНК содержат цепь или область ДНК, которая представляет собой антисмысловую цепь или область (например, имеет по меньшей мере 70, 80, 90, 95, 98 или 100% комплементарность с нуклеиновой кислотой-мишенью), и цепь или область РНК, которая представляет собой смысловую цепь или область (например, имеет по меньшей мере 70, 80, 90, 95, 98 или 100% идентичность с нуклеиновой кислотой-мишенью) и наоборот.

В различных вариантах реализации гибриды РНК/ДНК получают *in vitro* с помощью методов ферментного или химического синтеза, таких как описаны в настоящем документе или в WO 00/63364, поданной 19 апреля 2000 г., или в патенте США с серийным номером 60/130377, поданном 21 апреля 1999 г. В других вариантах реализации цепь ДНК, синтезированная *in vitro*, связана в комплекс с цепью РНК, полученной *in vivo* или *in vitro* до, после или одновременно с трансформацией ДНК цепи в клетку. В других вариантах реализации дцРНК представляет собой одну кольцевую нуклеиновую кислоту, содержа-

щую смысловую и антисмысловую область, или дцРНК содержит кольцевую нуклеиновую кислоту и вторую кольцевую нуклеиновую кислоту или линейную нуклеиновую кислоту (см., например, WO 00/63364, поданную 19 апреля 2000 г., или в патенте США с серийным номером 60/130377, поданном 21 апреля 1999 г.). Иллюстративные кольцевые нуклеиновые кислоты включают лариатные структуры, в которых свободная 5' фосфорильная группа нуклеотида становится связанной с 2' гидроксильной группой другого нуклеотида путем закольцовывания.

В других вариантах реализации дцРНК содержит один или более модифицированных нуклеотидов, в которых 2' положение сахара содержит галоген (такой как группа фтора) или содержит алкокси-группу (такую как метокси-группа), что увеличивает период полувыведения дцРНК *in vitro* или *in vivo* по сравнению с соответствующей дцРНК, в которой соответствующее 2' положение содержит водород или гидроксильную группу. В других вариантах реализации дцРНК содержит одну или более связей между смежными нуклеотидами, отличных от природной фосфодиэфирной связи. Примеры таких связей включают фосфорамидные, тиофосфатные и дитиофосфатные связи. дцРНК также могут представлять собой химически модифицированные молекулы нуклеиновых кислот, как описано в патенте США № 6673661. В других вариантах реализации дцРНК содержит одну или две экзипированных цепей, как описано, например, в WO 00/63364, поданной 19 апреля 2000 г.а, или в патенте США с серийным номером 60/130377, поданном 21 апреля 1999 г.

В других вариантах реализации дцРНК может представлять собой любую из по меньшей мере частично дцРНК молекул, описанных в WO 00/63364, а также любую из дцРНК молекул, описанных в предварительной заявке США 60/399998; и в предварительной заявке США 60/419532, и в РСТ/US2003/033466, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Любая из дцРНК может быть экспрессирована *in vitro* или *in vivo* с помощью способов, описанных в настоящем документе, или стандартных способов, таких как описаны в WO 00/63364.

Занятость.

В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения предположительно не приводят к расщеплению нуклеиновой кислоты-мишени посредством РНКазы Н или не приводят к расщеплению или секвестрации по пути RISC. В некоторых таких вариантах реализации антисмысловая активность может быть результатом занятости, при этом наличие гибридного антисмыслового соединения нарушает активность нуклеиновой кислоты-мишени. В некоторых таких вариантах реализации антисмысловое соединение может быть равномерно модифицировано или может содержать смесь модификаций и/или модифицированных и немодифицированных нуклеозидов.

Нуклеиновые кислоты-мишени, области-мишени и нуклеотидные последовательности.

Нуклеотидные последовательности, кодирующие фактор комплемента В (CFB), включают, без ограничения, следующие: с номером доступа GENBANK NM_001710.5 (включенную в настоящий документ как SEQ ID NO: 1), с номером доступа GENBANK NT_007592.15, усеченную с нуклеотида 31852000 по 31861000 (включенную в настоящий документ как SEQ ID NO: 2), с номером доступа GENBANK NW_001116486.1, усеченную с нуклеотида 536000 по 545000 (включенную в настоящий документ как SEQ ID NO: 3), с номером доступа GENBANK XM_001113553.2 (включенную в настоящий документ как SEQ ID NO: 4) или с номером доступа GENBANK NM_008198.2 (включенную в настоящий документ как SEQ ID NO: 5).

Гибридизация.

В некоторых вариантах реализации гибридизация происходит между антисмысловым соединением, описанным в настоящем документе, и нуклеиновой кислотой CFB. Наиболее распространенный механизм гибридизации включает водородное связывание (например, уотсон-криковское, хугстиновское или обратное хугстиновское водородное связывание) между комплементарными азотистыми основаниями молекул нуклеиновых кислот.

Гибридизация может происходить в различных условиях. Жесткие условия являются последовательность-зависимыми и определяются природой и составом гибридизируемых молекул нуклеиновых кислот.

Способ определения, является ли последовательность специфически гибридизируемой с целевой нуклеиновой кислотой, хорошо известны в данной области техники. В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения, представленные в настоящем документе, являются специфически гибридизируемыми с нуклеиновой кислотой CFB.

Комплементарность.

Антисмысловое соединение и нуклеиновая кислота-мишень являются комплементарными друг к другу, если достаточное количество азотистых оснований антисмыслового соединения могут образовать водородные связи с соответствующими азотистыми основаниями нуклеиновой кислоты-мишени, таким образом, чтобы возникал желаемый эффект (например, антисмысловое ингибирование нуклеиновой кислоты-мишени, такой как нуклеиновая кислота CFB).

Некомплементарные азотистые основания между антисмысловым соединением и нуклеиновой кислотой CFB могут быть приемлемыми при условии, что антисмысловое соединение по-прежнему способно специфически гибридизоваться с нуклеиновой кислотой-мишенью. Кроме того, антисмысловое

соединение может гибридизоваться более чем с одним или более сегментами нуклеиновой кислоты CFB так, чтобы промежуточные или соседние сегменты не участвовали в гибридизации (например, петлевая структура, некомплементарное основание или шпилька).

В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения, представленные в настоящем изобретении, или определенные их части, являются или по меньшей мере на 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% комплементарны к нуклеиновой кислоте CFB, области-мишени, сегменту-мишени или определенной ее части. Процент комплементарности антисмыслового соединения с целевой нуклеиновой кислотой может быть определен с использованием стандартных методов.

Например, антисмысловое соединение, в котором 18 из 20 азотистых оснований антисмыслового соединения являются комплементарными к области-мишени, и поэтому будут специфически гибридизоваться, имеет 90 процентов комплементарности. В данном примере оставшиеся некомплементарные азотистые основания могут быть расположены кластерно или вперемешку с комплементарными азотистыми основаниями и не обязаны быть смежными друг с другом или комплементарными азотистыми основаниями. Таким образом, антисмысловое соединение, длина которого составляет 18 азотистых оснований, содержащее четыре некомплементарных азотистых основания, фланкированных двумя участками полной комплементарности с нуклеиновой кислотой-мишенью, обладает общей комплементарностью с нуклеиновой кислотой-мишенью 77,8%, и таким образом, входит в пределы объема настоящего изобретения. Процент комплементарности антисмыслового соединения с областью нуклеиновой кислоты-мишени может быть определен с помощью программ BLAST (основное средство поиска локального выравнивания) и программ PowerBLAST, известных в данной области техники (Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang и Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656). Процент гомологии, идентичность или комплементарность последовательностей, могут быть определены, например, программой Gap (висконсинский пакет анализа последовательностей, версия 8 для Unix, Genetics Computer Group, Висконсинский Университет, Мэдисон, штат Висконсин), с использованием настроек по умолчанию, которые использует алгоритм Смита и Ватермана (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489).

В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения, предложенные в настоящем документе, или их определенные части полностью комплементарны (т.е. на 100% комплементарны) нуклеиновой кислоте-мишени или ее определенной части. Например, антисмысловое соединение может быть полностью комплементарно нуклеиновой кислоте CFB или ее области-мишени, или ее сегменту-мишени, или ее последовательности-мишени. В данном контексте "полностью комплементарный" означает, что каждое азотистое основание антисмыслового соединения способно точно спариваться с соответствующими азотистыми основаниями нуклеиновой кислоты-мишени. Например, антисмысловое соединение из 20 азотистых оснований полностью комплементарно целевой последовательности, имеющей 400 азотистых оснований, если существует соответствующий фрагмент из 20 азотистых оснований нуклеиновой кислоты-мишени, полностью комплементарный антисмысловому соединению. Полностью комплементарный может также использоваться в ссылке на определенный фрагмент первой и/или второй нуклеиновой кислоты. Например, фрагмент из 20 азотистых оснований антисмыслового соединения, состоящего из 30 азотистых оснований, может быть "полностью комплементарным" к последовательности-мишени, которая имеет 400 азотистых оснований в длину. Фрагмент из 20 азотистых оснований олигонуклеотида, состоящего из 30 азотистых оснований, полностью комплементарен целевой последовательности, если целевая последовательность имеет соответствующий фрагмент из 20 азотистых оснований, при этом каждое его азотистое основание комплементарно фрагменту из 20 азотистых оснований антисмыслового соединения. В то же время, всё антисмысловое соединение из 30 азотистых оснований может быть или не быть полностью комплементарным целевой последовательности в зависимости от того, будут ли остальные 10 азотистых оснований антисмыслового соединения также комплементарны целевой последовательности.

Некомплементарное азотистое основание может располагаться на 5' конце или 3' конце антисмыслового соединения. В альтернативном варианте некомплементарное азотистое основание или азотистые основания могут быть внутри антисмыслового соединения. Если присутствуют два или более некомплементарных азотистых оснований, они могут быть смежными (т.е. связанными) или не смежными. В одном варианте реализации некомплементарное азотистое основание располагается в сегменте крыла гэмпера антисмыслового олигонуклеотида.

В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения, которые содержат точно или до 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 азотистых оснований в длину, содержат не более 4, не более 3, не более 2 или не более 1 некомплементарного азотистого основания(ий) относительно нуклеиновой кислоты-мишени, такой как нуклеиновая кислота CFB, или ее определенной части.

В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения, которые содержат точно или до 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 азотистых оснований в длину, содержат не более 6, не более 5, не более 4, не более 3, не более 2 или не более 1 некомплементарного азотистого основания(ий) относительно нуклеиновой кислоты-мишени, такой как нуклеиновая кислота CFB, или ее определенной части.

Предложенные антисмысловые соединения включают также соединения, которые комплементарны

части нуклеиновой кислоты-мишени. В данном контексте "часть" относится к определенному количеству смежных (т.е. связанных) азотистых оснований в пределах области или сегмента нуклеиновой кислоты-мишени. "Часть" также может относиться к определенному количеству смежных азотистых оснований антисмыслового соединения. В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения комплементарны части целевого сегмента из по меньшей мере 8 азотистых оснований. В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения комплементарны части целевого сегмента из по меньшей мере 9 азотистых оснований. В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения комплементарны части целевого сегмента из по меньшей мере 10 азотистых оснований. В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения комплементарны части целевого сегмента из по меньшей мере 11 азотистых оснований. В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения комплементарны части целевого сегмента из по меньшей мере 12 азотистых оснований. В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения комплементарны части целевого сегмента из по меньшей мере 13 азотистых оснований. В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения комплементарны части целевого сегмента из по меньшей мере 14 азотистых оснований. В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения комплементарны части целевого сегмента из по меньшей мере 15 азотистых оснований. Также рассматриваются антисмысловые соединения, которые являются комплементарными по меньшей мере 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более азотистым основаниям части целевого сегмента, или диапазон, определяемый любыми двумя из указанных значений.

Идентичность.

Антисмысловые соединения, представленные в настоящем документе, также могут иметь определенный процент идентичности конкретной нуклеотидной последовательности, SEQ ID NO, или соединению, представленному конкретным номером Isis, или его части. В данном контексте антисмысловое соединение идентично последовательности, описанной в настоящем документе, если оно имеет такую же способность к спариванию азотистых оснований. Например, РНК, которая содержит урацил вместо тимидина в описанной последовательности ДНК, считают идентичной последовательности ДНК, поскольку и урацил, и тимидин спариваются с аденином. Рассматриваются также укороченный и удлиненный варианты антисмысловых соединений, описанных в настоящем документе, а также соединений, обладающих неидентичными основаниями по отношению к антисмысловым соединениям, предложенным в настоящем документе. Неидентичные основания могут быть смежными друг с другом или рассеянными по всему антисмысловому соединению. Процент идентичности антисмыслового соединения рассчитывают по количеству оснований, которые имеют идентичное спаривание оснований, относительно последовательности, с которой идет сравнение.

В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения или их части по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны одному или более антисмысловым соединениям из SEQ ID NO, или их части, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации фрагмент антисмыслового соединения сравнивают с равной по длине части нуклеиновой кислоты-мишени. В некоторых вариантах реализации сравнивают часть из 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 азотистых оснований с равной по длине частью нуклеиновой кислоты-мишени.

В некоторых вариантах реализации часть антисмыслового олигонуклеотида сравнивают с равной по длине частью нуклеиновой кислоты-мишени. В некоторых вариантах реализации сравнивают часть из 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 азотистых оснований с равной по длине частью нуклеиновой кислоты-мишени.

Модификации.

Нуклеозид представляет собой комбинацию азотистое основание-сахар. Азотистое основание (также известное как основание) - часть нуклеозида, обычно представляющая собой фрагмент гетероциклического основания. Нуклеотиды представляют собой нуклеозиды, которые дополнительно содержат фосфатную группу, ковалентно связанную с сахарной частью нуклеозида. Для тех нуклеозидов, которые содержат пентофуранозильный сахар, фосфатная группа может быть связана с 2', 3' или 5' гидроксильным фрагментом сахара. Олигонуклеотиды образуются посредством ковалентного связывания соседних нуклеозидов друг с другом с образованием линейного полимерного олигонуклеотида. В олигонуклеотидной структуре фосфатные группы обычно называют как образующие межнуклеозидные связи олигонуклеотида.

Модификации антисмысловых соединений охватывают замещения или изменения межнуклеозидных связей, сахарных фрагментов или азотистых оснований. Модифицированные антисмысловые соединения зачастую предпочтительны по сравнению с нативными формами за счет желаемых свойств, таких как, например, улучшенное клеточное поглощение, повышенная аффинность связывания с нуклеиновой кислотой-мишенью, повышенная стабильность в присутствии нуклеаз или повышенная ингибирующая активность.

Химически модифицированные нуклеозиды также могут быть использованы для повышения аффинности связывания укороченного или усеченного антисмыслового олигонуклеотида с его нуклеиновой кислотой-мишенью. Следовательно, сопоставимые результаты часто могут быть получены с помощью

более коротких антисмысловых соединений, которые имеют такие химически модифицированные нуклеозиды.

Модифицированные межнуклеозидные связи.

Природная межнуклеозидная связь РНК и ДНК представляет собой 3'-5' фосфодиэфирную связь. Антисмысловые соединения, имеющие одну или более модифицированных, т.е. неприродных межнуклеозидных связей, часто предпочтительны по сравнению с антисмысловыми соединениями, имеющими природные межнуклеозидные связи, благодаря желаемым свойствам, таким как, например, улучшенное клеточное поглощение, усиленная аффинность связывания с нуклеиновыми кислотами-мишенями и повышенная стабильность в присутствии нуклеаз.

Олигонуклеотиды, имеющие модифицированные межнуклеозидные связи, включают межнуклеозидные связи, которые сохраняют атом фосфора, а также межнуклеозидные связи, которые не имеют атома фосфора. Иллюстративные фосфорсодержащие межнуклеозидные связи включают, но не ограничиваются ими, фосфодиэфиры, фосфотриэфиры, метилфосфонаты, фосфорамидаты и тиофосфаты. Способы получения фосфорсодержащих и не содержащих фосфор связей хорошо известны.

В некоторых вариантах реализации антисмысловых соединения, направленные на нуклеиновую кислоту CFB, содержат одну или более модифицированных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации модифицированные межнуклеозидные связи представляют собой тиофосфатные связи. В некоторых вариантах реализации каждая межнуклеозидная связь антисмыслового соединения представляет собой тиофосфатную межнуклеозидную связь.

В некоторых вариантах реализации олигонуклеотиды содержат модифицированные межнуклеозидные связи, расположенные вдоль олигонуклеотида или его области определенным образом в виде мотива модифицированной межнуклеозидной связи. В некоторых вариантах реализации межнуклеозидные связи расположены в разорванном мотиве. В таких вариантах реализации межнуклеозидные связи в каждой из двух областей крыльев отличны от межнуклеозидных связей в области гзп. В некоторых вариантах реализации межнуклеозидные связи в крыльях являются фосфодиэфирными, а межнуклеозидные связи в гзп являются тиофосфатными. Нуклеозидный мотив выбран независимо, так что олигонуклеотиды, имеющие разорванный мотив межнуклеозидных связей может иметь или не иметь разорванный нуклеозидный мотив, и если он имеет разорванный нуклеозидный мотив, то длина крыльев и гзп может быть или не быть одинаковой.

В некоторых вариантах реализации олигонуклеотиды содержат область, имеющую мотив чередующихся межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотиды согласно настоящему изобретению содержат область одинаково модифицированных межнуклеозидных связей. В некоторых таких вариантах реализации олигонуклеотид содержит область, которая равномерна связана тиофосфатными межнуклеозидными связями. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотид равномерно связан тиофосфатными межнуклеозидными связями. В некоторых вариантах реализации каждая межнуклеозидная связь олигонуклеотида выбрана из фосфодиэфира и тиофосфата. В некоторых вариантах реализации каждая межнуклеозидная связь олигонуклеотида выбрана из фосфодиэфира и тиофосфата, и по меньшей мере одна межнуклеозидная связь представляет собой тиофосфат.

В некоторых вариантах реализации олигонуклеотид содержит по меньшей мере 6 тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотид содержит по меньшей мере 8 тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотид содержит по меньшей мере 10 тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотид содержит по меньшей мере один блок из по меньшей мере 6 последовательных тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотид содержит по меньшей мере один блок из по меньшей мере 8 последовательных тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотид содержит по меньшей мере один блок из по меньшей мере 10 последовательных тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотид содержит по меньшей мере один блок из по меньшей мере 12 последовательных тиофосфатных межнуклеозидных связей. В некоторых таких вариантах реализации по меньшей мере один такой блок расположен на 3' конце олигонуклеотида. В некоторых таких вариантах реализации по меньшей мере один такой блок расположен в пределах 3 нуклеозидов от 3' конца олигонуклеотида.

В некоторых вариантах реализации олигонуклеотиды содержат одну или более метилфосфонатных связей. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотиды, имеющие гзпмерный нуклеозидный мотив, содержат мотив связи, содержащий все тиофосфатные межнуклеозидные связи, за исключением одной или двух метилфосфонатных связей. В некоторых вариантах реализации одна метилфосфонатная связь находится в центральном гзп олигонуклеотида, имеющего гзпмерный нуклеозидный мотив.

В некоторых вариантах реализации желательно распределять количество тиофосфатных межнуклеозидных связей и фосфодиэфирных межнуклеозидных связей для сохранения устойчивости к действию нуклеаз. В некоторых вариантах реализации желательно распределять количество и положение тиофосфатных межнуклеозидных связей и количество и положение фосфодиэфирных межнуклеозидных связей для сохранения устойчивости к действию нуклеаз. В некоторых вариантах реализации количество

тиофосфатных межнуклеозидных связей может быть уменьшено, а количество фосфодиэфирных межнуклеозидных связей может быть увеличено. В некоторых вариантах реализации количество тиофосфатных межнуклеозидных связей может быть уменьшено, а количество фосфодиэфирных межнуклеозидных связей может быть увеличено при сохранении устойчивости к действию нуклеаз. В некоторых вариантах реализации желательно уменьшить количество тиофосфатных межнуклеозидных связей при сохранении устойчивости к действию нуклеаз. В некоторых вариантах реализации желательно увеличить количество фосфодиэфирных межнуклеозидных связей при сохранении устойчивости к действию нуклеаз.

Модифицированные сахарные фрагменты.

Антисмысловые соединения могут необязательно содержать один или более нуклеозидов, в которых модифицирована сахарная группа. Указанные нуклеозиды с модифицированным сахаром могут обеспечивать повышенную устойчивость к действию нуклеаз, повышенную аффинность связывания или некоторые другие полезные биологические свойства антисмысловых соединений. В некоторых вариантах реализации нуклеозиды содержат химически модифицированные фрагменты рибофуранозного кольца. Примеры химически модифицированных рибофуранозных колец включают, без ограничения, добавление групп заместителей (включая 5' и 2' группы заместителей, соединение мостиком негеминальных кольцевых атомов с образованием бициклических нуклеиновых кислот (БНК), замену рибозильного кольцевого атома кислорода на S, N(R) или C(R₁)(R₂) (R, R₁ и R₂, каждый независимо, представляют собой H, C₁-C₁₂-алкил или защитную группу) и их комбинации. Примеры химически модифицированных сахаров включают 2'-F-5'-метилзамещенный нуклеозид (см. международную заявку PCT WO 2008/101157, опубликованную 8/21/08, где описаны другие 5',2'-бис-замещенные нуклеозиды) или замену рибозильного кольцевого атома кислорода на S с дополнительным замещением в 2'-положении (см. опубликованную заявку на патент США US2005-0130923, опубликованную 16 июня 2005 года), или в альтернативном варианте 5'-замещение БНК (см. международную заявку PCT WO 2007/134181, опубликованную 11/22/07, где LNA замещена, например, 5'-метильной или 5'-винильной группой).

Примеры нуклеозидов, имеющих модифицированные сахарные фрагменты, включают, без ограничения, нуклеозиды, содержащие 5'-винильные, 5'-метильные (R или S, 4'-S, 2'-F, 2'-OCH₃, 2'-OCH₂CH₃, 2'-OCH₂CH₂F и 2'-O(CH₂)₂OCH₃ группы заместителей. Заместитель в 2' положении также может быть выбран из аллила, amino, азидо, тио, O-аллила, O-C₁-C₁₀-алкила, OCF₃, OCH₂F, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n), O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n) и O-CH₂-C(=O)-N(R₁)-(CH₂)₂-N(R_m)(R_n), где каждый R₁, R_m и R_n независимо представляет собой H или замещенный или незамещенный C₁-C₁₀-алкил.

В данном контексте "бициклические нуклеозиды" относятся к модифицированным нуклеозидам, содержащим бициклический сахарный фрагмент. Примеры бициклических нуклеозидов включают без ограничения нуклеозиды, содержащие мостик между 4' и 2' атомами рибозильного кольца. В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения, предложенные в настоящем документе, содержат один или более бициклических нуклеозидов, содержащих 4'-2' мостик. Примеры таких бициклических нуклеозидов с 4'-2' мостиками включают, но не ограничиваются одной из формул: 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' (также называемая стерически затрудненным этилом или cEt) и 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' (и их аналоги, см. патент США 7399845, выданный 15 июля 2008 г.); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' (и их аналоги, см. опубликованную международную заявку WO 2009/006478, опубликованную 8 января 2009 года); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (и их аналоги, см. опубликованную международную заявку WO/2008/150729, опубликованную 11 декабря 2008 г.); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (см. опубликованную заявку на патент США US2004-0171570, опубликованную 2 сентября 2004 г.); 4'-CH₂-N(R)-O-2', где R представляет собой H, C₁-C₁₂-алкил или защитную группу (см. патент США 7427672, выданный 23 сентября 2008 года); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (см. Zhou et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134); и 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (и их аналоги, см. опубликованную международную заявку WO 2008/154401, опубликованную 8 декабря 2008 г.).

Дальнейшие сообщения, связанные с бициклическими нуклеозидами могут также быть найдены в опубликованной литературе (см., например: Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97, 5633-5638; Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129(26) 8362-8379; Elayadi et al., Curr. Opinion Invest. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch et al., Chem. Biol, 2001, 8, 1-7; и Orum et al., Curr. Opinion Mol Ther., 2001, 3, 239-243; патенты США № 6268490; 6525191; 6670461; 6770748; 6794499; 7034133; 7053207; 7399845; 7547684; 8530640; и 7696345; публикации патентов США № US2008-0039618; US2009-0012281; патенты США с серийными номерами 61/026995 и 61/097787; опубликованные международные заявки PCT; WO 2009/067647; WO 2011/017521; WO 2010/036698 WO 1999/014226; WO 2004/106356; WO 2005/021570; WO 2007/134181; WO 2008/150729; WO 2008/154401; и WO 2009/006478. Каждый из указанных бициклических нуклеозидов можно получить, имея одну или более стереохимическую сахарную конфигурацию, включающие, например, α-L-рибофуранозу и β-D-рибофуранозу (см. международную заявку PCT PCT/DK98/00393, опубликованную 25 марта 1999 г. как WO 99/14226).

В некоторых вариантах реализации бициклические сахарные фрагменты нуклеозидов БНК включают, но не ограничиваются ими, соединения, имеющие по меньшей мере один мостик между 4' и 2' по-

ложением пентофуранозильного сахарного фрагмента, где такие мостики независимо содержат 1 или от 2 до 4 связанных групп, независимо выбранных из $-[C(R_a)(R_b)]_n-$, $-C(R_a)=C(R_b)-$, $-C(R_a)=N-$, $-C(=O)-$, $-C(=NR_a)-$, $-C(=S)-$, $-O-$, $-Si(R_a)_2-$, $-S(=O)_x-$ и $-N(R_a)-$;

где x равен 0, 1 или 2;

n равен 1, 2, 3 или 4;

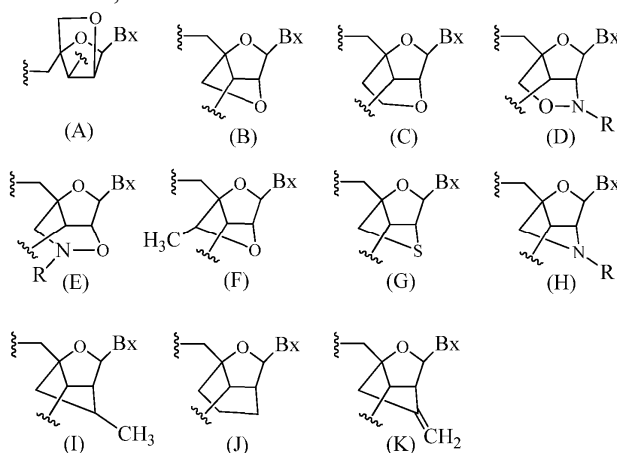
каждый R_a и R_b независимо представляет собой H, защитную группу, гидроксил, C_1 - C_{12} -алкил, замещенный C_1 - C_{12} -алкил, C_2 - C_{12} -алкенил, замещенный C_2 - C_{12} -алкенил, C_2 - C_{12} -алкинил, замещенный C_2 - C_{12} -алкинил, C_5 - C_{20} -арил, замещенный C_5 - C_{20} -арил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал, гетероарил, замещенный гетероарил, C_5 - C_7 -алициклический радикал, замещенный C_5 - C_7 -алициклический радикал, галоген, OJ_1 , NJ_1J_2 , SJ_1 , N_3 , $COOJ_1$, ацил ($C(=O)-H$), замещенный ацил, CN, сульфонил ($S(=O)_2-J_1$) или сульфоксил ($S(=O)-J_1$); и

каждый J_1 и J_2 независимо представляет собой H, C_1 - C_{12} -алкил, замещенный C_1 - C_{12} -алкил, C_2 - C_{12} -алкенил, замещенный C_2 - C_{12} -алкенил, C_2 - C_{12} -алкинил, замещенный C_2 - C_{12} -алкинил, C_5 - C_{20} -арил, замещенный C_5 - C_{20} -арил, ацил ($C(=O)-H$), замещенный ацил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал, C_1 - C_{12} -аминоалкил, замещенный C_1 - C_{12} -аминоалкил или защитную группу.

В некоторых вариантах реализации мостик бициклического сахарного фрагмента представляет собой $-[C(R_a)(R_b)]_n-$, $-[C(R_a)(R_b)]_n-O-$, $-C(R_aR_b)-N(R)-O-$ или $-C(R_aR_b)-O-N(R)-$. В некоторых вариантах реализации мостик представляет собой $4'-CH_2-2'$, $4'-(CH_2)_2-2'$, $4'-(CH_2)_3-2'$, $4'-CH_2-O-2'$, $4'-(CH_2)_2-O-2'$, $4'-CH_2-O-N(R)-2'$ и $4'-CH_2-N(R)-O-2'$, где каждый R независимо представляет собой H, защитную группу или C_1 - C_{12} -алкил.

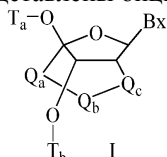
В некоторых вариантах реализации бициклические нуклеозиды дополнительно определяют по изомерной конфигурации. Например, нуклеозид, содержащий мостик $4'-2'$ -метиленокси, может быть в α -L конфигурации или в β -D конфигурации. Ранее α -L-метиленокси ($4'-CH_2-O-2'$) БНК были внедрены в антисмысловые олигонуклеотиды, которые демонстрировали антисмысловую активность (Frieden et al., Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365-6372).

В некоторых вариантах реализации бициклические нуклеозиды включают, но не ограничиваются ими, (A) α -L-метиленокси ($4'-CH_2-O-2'$) БНК, (B) β -D-метиленокси ($4'-CH_2-O-2'$) БНК, (C) этиленокси ($4'-(CH_2)_2-O-2'$) БНК, (D) аминокси ($4'-CH_2-O-N(R)-2'$) БНК, (E) оксиамино ($4'-CH_2-N(R)-O-2'$) БНК и (F) метил(метиленокси) ($4'-CH(CH_3)-O-2'$) БНК, (G) метилентии ($4'-CH_2-S-2'$) БНК, (H) метиленамино ($4'-CH_2-N(R)-2'$) БНК, (I) метилкарбоциклические ($4'-CH_2-CH(CH_3)-2'$) БНК, (J) пропиленкарбоциклические ($4'-(CH_2)_3-2'$) БНК и (K) винил БНК, как показано ниже:



где Bx представляет собой фрагмент основания, а R независимо представляет собой H, защитную группу, C_1 - C_{12} -алкил или C_1 - C_{12} -алкокси.

В некоторых вариантах реализации представлены бициклические нуклеозиды, имеющие формулу I



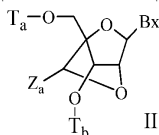
где Bx представляет собой фрагмент гетероциклического основания;

$-Q_a-Q_b-Q_c-$ представляет собой $-CH_2-N(R_c)-CH_2-$, $-C(=O)-N(R_c)-CH_2-$, $-CH_2-O-N(R_c)-$, $-CH_2-N(R_c)-O-$ или $-N(R_c)-O-CH_2-$;

R_c представляет собой C_1 - C_{12} -алкил или аминоксигруппу; и

T_a и T_b , каждый независимо, представляют собой H, гидроксил-защитную группу, группу конъюгата, реакционноспособную фосфорную группу, фосфорный фрагмент или ковалентное присоединение к среде подложки.

В некоторых вариантах реализации представлены бициклические нуклеозиды, имеющие формулу II



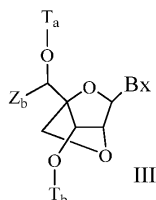
где Bx представляет собой фрагмент гетероциклического основания;

T_a и T_b, каждый независимо, представляют собой H, гидрокси-защитную группу, группу конъюгата, реакционноспособную фосфорную группу, фосфорный фрагмент или ковалентное присоединение к среде подложки;

Z_a представляет собой C₁-C₆-алкил, C₂-C₆-алкенил, C₂-C₆-алкинил, замещенный C₁-C₆-алкил, замещенный C₂-C₆-алкенил, замещенный C₂-C₆-алкинил, ацил, замещенный ацил, замещенный амид, тиол или замещенный тио.

В одном из вариантов реализации каждая из замещенных групп независимо является моно или полизамещенной группами заместителей, выбранными из галогена, оксо, гидроксила, OJ_c, NJ_cJ_d, SJ_c, N₃, OS(=X)J_c и NJ_cC(=X)NJ_cJ_d, где каждый J_c, J_d и J_e независимо представляет собой H, C₁-C₆-алкил или замещенный C₁-C₆-алкил, и X представляет собой O или NJ_c.

В некоторых вариантах реализации представлены бициклические нуклеозиды, имеющие формулу III

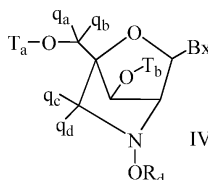


где Bx представляет собой фрагмент гетероциклического основания;

T_a и T_b, каждый независимо, представляют собой H, гидрокси-защитную группу, группу конъюгата, реакционноспособную фосфорную группу, фосфорный фрагмент или ковалентное присоединение к среде подложки;

Z_b представляет собой C₁-C₆-алкил, C₂-C₆-алкенил, C₂-C₆-алкинил, замещенный C₁-C₆-алкил, замещенный C₂-C₆-алкенил, замещенный C₂-C₆-алкинил или замещенный ацил (C(=O)-).

В некоторых вариантах реализации представлены бициклические нуклеозиды, имеющие формулу IV:



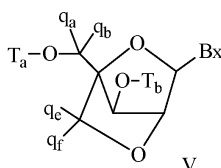
где Bx представляет собой фрагмент гетероциклического основания;

T_a и T_b, каждый независимо, представляют собой H, гидрокси-защитную группу, группу конъюгата, реакционноспособную фосфорную группу, фосфорный фрагмент или ковалентное присоединение к среде подложки;

R_d представляет собой C₁-C₆-алкил, замещенный C₁-C₆-алкил, C₂-C₆-алкенил, замещенный C₂-C₆-алкенил, C₂-C₆-алкинил или замещенный C₂-C₆-алкинил;

каждый q_a, q_b, q_c и q_d независимо представляет собой H, галоген, C₁-C₆-алкил, замещенный C₁-C₆-алкил, C₂-C₆-алкенил, замещенный C₂-C₆-алкенил, C₂-C₆-алкинил или замещенный C₂-C₆-алкинил, C₁-C₆-алкоксил, замещенный C₁-C₆-алкоксил, ацил, замещенный ацил, C₁-C₆-аминоалкил или замещенный C₁-C₆-аминоалкил;

В некоторых вариантах реализации представлены бициклические нуклеозиды, имеющие формулу V:



где Bx представляет собой фрагмент гетероциклического основания;

T_a и T_b, каждый независимо, представляют собой H, гидрокси-защитную группу, группу конъюгата, реакционноспособную фосфорную группу, фосфорный фрагмент или ковалентное присоединение к среде подложки;

q_a, q_b, q_c и q_d, каждый независимо, представляют собой водород, галоген, C₁-C₁₂-алкил, замещенный

C_1 - C_{12} -алкил, C_2 - C_{12} -алкенил, замещенный C_2 - C_{12} -алкенил, C_2 - C_{12} -алкинил, замещенный C_2 - C_{12} -алкинил, C_1 - C_{12} -алкокси, замещенный C_1 - C_{12} -алкокси, OJ_j , SJ_j , SOJ_j , SO_2J_j , NJ_jJ_k , N_3 , CN , $C(=O)OJ_j$, $C(=O)NJ_jJ_k$, $C(=O)J_j$, $O-C(=O)NJ_jJ_k$, $N(H)C(=NH)NJ_jJ_k$, $N(H)C(=O)NJ_jJ_k$ или $N(H)C(=S)NJ_jJ_k$;

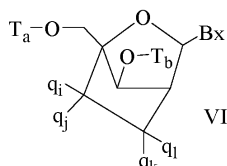
или q_e и q_f вместе представляют собой $=C(q_g)(q_h)$;

q_g и q_h , каждый независимо, представляют собой H , галоген, C_1 - C_{12} -алкил или замещенный C_1 - C_{12} -алкил.

Описаны синтез и получение метиленокси (4'- CH_2 -O-2') мономеров БНК: аденина, цитозина, гуанина, 5-метилцитозина, тимина и урацила, а также их олигомеризация и свойства распознавания нуклеиновых кислот (Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630). БНК и их получение также описаны в WO 98/39352 и WO 99/14226.

Были также получены аналоги метиленокси (4'- CH_2 -O-2') БНК и 2'-тио-БНК (Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222). Описано также получение аналогов запертых нуклеозидов, содержащих олигодезоксирибонуклеотидные дуплексы в качестве субстратов полимераз нуклеиновых кислот (Wengel et al., WO 99/14226). Кроме того, в данной области техники описан синтез 2'-амино-БНК, нового конформационно ограниченного высокоаффинного аналога олигонуклеотида (Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039). Кроме того, ранее были получены 2'-амино- и 2'-метиленамино БНК, и была описана термостабильность их дуплексов с комплементарными нитями РНК и ДНК.

В некоторых вариантах реализации представлены бициклические нуклеозиды, имеющие формулу VI:



где Bx представляет собой фрагмент гетероциклического основания;

T_a и T_b , каждый независимо, представляют собой H , гидроксигруппу, группу конъюгата, реакционноспособную фосфорную группу, фосфорный фрагмент или ковалентное присоединение к среде подложки;

каждый q_i , q_j , q_k и q_l независимо представляет собой H , галоген, C_1 - C_{12} -алкил, замещенный C_1 - C_{12} -алкил, C_2 - C_{12} -алкенил, замещенный C_2 - C_{12} -алкенил, C_2 - C_{12} -алкинил, замещенный C_2 - C_{12} -алкинил, C_1 - C_{12} -алкоксил, замещенный C_1 - C_{12} -алкоксил, OJ_j , SJ_j , SOJ_j , SO_2J_j , NJ_jJ_k , N_3 , CN , $C(=O)OJ_j$, $C(=O)NJ_jJ_k$, $C(=O)J_j$, $O-C(=O)NJ_jJ_k$, $N(H)C(=NH)NJ_jJ_k$, $N(H)C(=O)NJ_jJ_k$ или $N(H)C(=S)NJ_jJ_k$; и

q_i и q_j или q_k и q_l вместе представляют собой $=C(q_g)(q_h)$, где q_g и q_h , каждый независимо, представляют собой H , галоген, C_1 - C_{12} -алкил или замещенный C_1 - C_{12} -алкил.

Описан один карбоциклический бициклический нуклеозид, имеющий мостик 4'-(CH_2)₃-2', и мостик из аналога алкенила 4'- $CH=CH$ - CH_2 -2' (Freier et al., Nucleic Acids Research, 1997, 25(22), 4429-4443 и Alback et al., J. Org. Chem., 2006, 71, 7731-7740). Описан также синтез и получение карбоциклических бициклических нуклеозидов вместе с их олигомеризацией и биохимическими исследованиями (Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129(26), 8362-8379).

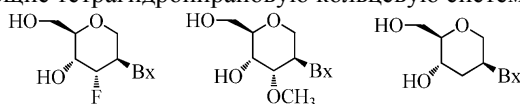
В данном контексте "4'-2' бициклический нуклеозид" или "4' к 2' бициклический нуклеозид" относится к бициклическому нуклеозиду, содержащему фуранозное кольцо, содержащее мостик, соединяющий два атома углерода фуранозного кольца, соединяющий 2' атом углерода и 4' атом углерода сахарного кольца.

В данном контексте "моноциклические нуклеозиды" относятся к нуклеозидам, содержащим модифицированные сахарные фрагменты, которые не являются бициклическими сахарными фрагментами. В некоторых вариантах реализации сахарный фрагмент или аналог сахарного фрагмента нуклеозида может быть модифицирован или замещен в любом положении.

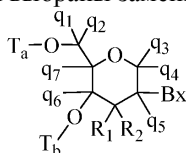
В данном контексте "2'-модифицированный сахар" означает фуранозильный сахар, модифицированный в 2' положении. В некоторых вариантах реализации такие модификации включают заместители, выбранные из: галогенидов, включая, но не ограничиваясь ими, замещенный и незамещенный алкокси, замещенный и незамещенный тиоалкил, замещенный и незамещенный аминоалкил, замещенный и незамещенный алкил, замещенный и незамещенный аллил и замещенный и незамещенный алкинил. В некоторых вариантах реализации 2' модификации выбраны из заместителей, включающих, но не ограничиваясь ими: $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nF$, $O(CH_2)_nONH_2$, $OCH_2C(=O)N(H)CH_3$, $HO(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$, где n и m равны от 1 до около 10. Другие 2' группы заместителей также могут быть выбраны из: C_1 - C_{12} -алкила, замещенного алкила, алкенила, алкинила, алкарила, аралкила, О-алкарила или О-аралкила, SH , SCH_3 , OCN , Cl , Br , CN , F , CF_3 , OCF_3 , $SOCH_3$, SO_2CH_3 , ONO_2 , NO_2 , N_3 , NH_2 , гетероциклоалкила, гетероциклоалкарила, аминоалкиламино, полиалкиламино, замещенного силила, РНК расщепляющей группы, репортерной группы, интеркалятора, группы для улучшения фармакокинетических свойств или группы для улучшения фармакодинамических свойств антисмыслового соединения, и других заместителей с подобными свойствами. В некоторых вариантах реализации модифициро-

ванные нуклеозиды содержат 2'-МОЕ боковую цепь (Baker et al., J. Biol. Chem., 1997, 272, 11944-12000). Такие 2'-МОЕ замещения описаны как улучшающие аффинность связывания по сравнению с немодифицированными нуклеозидами и с другими модифицированными нуклеозидами, такими как 2'-О-метил, О-пропил и О-аминопропил. Было показано, что олигонуклеотиды, имеющие 2'-МОЕ заместитель, являются антисмысловыми ингибиторами экспрессии генов с перспективными возможностями для применения *in vivo* (Martin, Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504; Altmann et al., Chimia, 1996, 50, 168-176; Altmann et al., Biochem. Soc. Trans., 1996, 24, 630-637; и Altmann et al., Nucleosides Nucleotides, 1997, 16, 917-926).

В данном контексте "модифицированный тетрагидропирановый нуклеозид" или "модифицированный ТГП нуклеозид" означает нуклеозид, имеющий шестичленный тетрагидропирановый "сахар", заменивший пентофуранозильный остаток в обычных нуклеозидах (заменитель сахара). ТГП-модифицированные нуклеозиды включают, но не ограничиваются ими, те, которые в данной области техники называют гекситоловой нуклеиновой кислотой (ГНК), анитоловой нуклеиновой кислотой (АНК), манитоловой нуклеиновой кислотой (МНК) (см. Leumann, Bioorg. Med. Chem., 2002, 10, 841-854) или фтор-ГНК (F-ГНК), имеющие тетрагидропирановую кольцевую систему, представленную ниже:



В некоторых вариантах реализации выбраны заменители сахара, имеющие формулу VII



VII

где независимо для каждого из указанного по меньшей мере одного тетрагидропиранового нуклеозидного аналога формулы VII:

Bx представляет собой фрагмент гетероциклического основания;

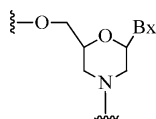
T_a и T_b, каждый независимо, представляют собой межнуклеозидную линкерную группу, которая связывает тетрагидропирановый нуклеозидный аналог с антисмысловым соединением, или один из T_a и T_b представляет собой межнуклеозидную линкерную группу, которая связывает тетрагидропирановый нуклеозидный аналог с антисмысловым соединением, а другой из T_a и T_b представляет собой H, гидроксил-защитную группу, связанную группу конъюгата или 5' или 3'-концевую группу;

q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ и q₇, каждый независимо, представляют собой H, C₁-C₆-алкил, замещенный C₁-C₆-алкил, C₂-C₆-алкенил, замещенный C₂-C₆-алкенил, C₂-C₆-алкинил или замещенный C₂-C₆-алкинил; и каждый из R₁ и R₂ выбран из водорода, гидроксила, галогена, замещенного или незамещенного алкокси, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, OC(=X)J₁, OC(=X)NJ₁J₂, NJ₃C(=X)NJ₁J₂ и CN, где X представляет собой O, S или NJ₁, и каждый J₁, J₂ и J₃ независимо представляет собой H или C₁-C₆-алкил.

В некоторых вариантах реализации предложены модифицированные ТГП нуклеозиды формулы VII, где q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ и q₇ представляют собой H. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере один из q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ и q₇ является отличным от H. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере один из q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ и q₇ представляет собой метил. В некоторых вариантах реализации предложены ТГП нуклеозиды формулы VII, где один из R₁ и R₂ представляет собой фтор. В некоторых вариантах реализации R₁ представляет собой фтор, а R₂ представляет собой H; R₁ представляет собой метокси, а R₂ представляет собой H, и R₁ представляет собой метоксиэтокси, а R₂ представляет собой H.

В некоторых вариантах реализации заменители сахара содержат кольца, имеющие более 5 атомов и более одного гетероатома. Например, описаны нуклеозиды, содержащие морфолиносахарные фрагменты, и их применение в олигомерных соединениях (см., например: Braasch et al., Biochemistry, 2002, 41, 4503-4510; и патенты США 5698685;

5166315; 5185444; и 5034506). В данном контексте термин "морфолино" означает заменитель сахара, имеющий следующую формулу:

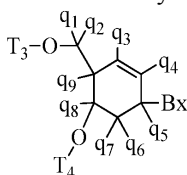


В некоторых вариантах реализации морфолино могут быть модифицированными, например, добавлением или изменением различных групп заместителей относительно представленной выше структуры морфолино. Такие заменители сахара в данном контексте называют "модифицированными морфолино".

Предложены также комбинации модификаций, без ограничения, такие как 2'-F-5'-метил-замещенные нуклеозиды (см. международную заявку PCT WO 2008/101157, опубликованную 8/21/08, где описаны другие 5', 2'-бис-замещенные нуклеозиды) и замену рибозильного кольцевого атома кислорода

на S с дополнительным замещением в 2'-положении (см. опубликованную заявку на патент США US2005-0130923, опубликованную 16 июня 2005 года) или в альтернативном варианте с 5'-замещением бициклической нуклеиновой кислоты (см. международную заявку PCT WO 2007/134181, опубликованную 11/22/07, где 4'-CH₂-O-2' бициклический нуклеозид дополнительно замещен в 5' положении 5'-метильной или 5'-винильной группой). Описан также синтез и получение карбоциклических бициклических нуклеозидов вместе с их олигомеризацией и биохимическими исследованиями (см., например, Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc. 2007, 129(26), 8362-8379).

В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения содержат один или более модифицированных циклогексенильных нуклеозидов, которые представляют собой нуклеозиды, имеющие шестичленный циклогексенил вместо пентофуранозильного остатка в природных нуклеозидах. Модифицированные циклогексенильные нуклеозиды включают, но не ограничиваются ими, нуклеозиды, описанные в данной области техники (см., например, параллельную опубликованную заявку PCT WO 2010/036696, опубликованную 10 апреля, 2010, Robeyns et al., J. Am. Chem. Soc. 2008, 130(6), 1979-1984; Horváth et al., Tetrahedron Letters, 2007, 48, 3621-3623; Nauwelaerts et al., J. Am. Chem. Soc. 2007, 129(30), 9340-9348; Gu et al., Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 2005, 24(5-7), 993-998; Nauwelaerts et al., Nucleic Acids Research, 2005, 33(8), 2452-2463; Robeyns et al., Acta Crystallographica, Section F: Structural Biology and Crystallization Communications, 2005, F61(6), 585-586; Gu et al., Tetrahedron, 2004, 60(9), 2111-2123; Gu et al., Oligonucleotides, 2003, 13(6), 479-489; Wang et al., J. Org. Chem., 2003, 68, 4499-4505; Verbeure et al., Nucleic Acids Research, 2001, 29(24), 4941-4947; Wang et al., J. Org. Chem., 2001, 66, 8478-82; Wang et al., Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 2001, 20(4-7), 785-788; Wang et al., J. Am. Chem., 2000, 122, 8595-8602; опубликованную заявку PCT WO 06/047842; и опубликованную заявку PCT WO 01/049687; полное содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки). Некоторые модифицированные циклогексенильные нуклеозиды имеют формулу X.



X

где независимо для каждого указанного по меньшей мере одного циклогексенильного нуклеозидного аналога формулы X:

Bx представляет собой фрагмент гетероциклического основания;

T₃ и T₄, каждый независимо, представляют собой межнуклеозидную линкерную группу, которая связывает циклогексенильный нуклеозидный аналог с антисмысловым соединением, или один из T₃ и T₄ представляет собой межнуклеозидную линкерную группу, которая связывает тетрагидропирановый нуклеозидный аналог с антисмысловым соединением, а другой из T₃ и T₄ представляет собой H, гидроксил-защитную группу, связанную группу конъюгата или 5'-или 3'-концевую группу; и

q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆, q₇, q₈ и q₉, каждый независимо, представляют собой H, C₁-C₆-алкил, замещенный C₁-C₆-алкил, C₂-C₆-алкенил, замещенный C₂-C₆-алкенил, C₂-C₆-алкинил, замещенный C₂-C₆-алкинил или другие группы-заместители сахара.

В данном контексте "2'-модифицированный" или "2'-замещенный" относится к нуклеозиду, содержащему сахар, содержащий заместитель в 2' положении, отличный от H или OH. 2'-модифицированные нуклеозиды включают, но не ограничиваются ими, бициклические нуклеозиды, в которых мостик, соединяющий два атом углерода сахарного кольца, соединяет 2' атом углерода и другой атом углерода сахарного кольца; и нуклеозиды с немостиковыми 2' заместителями, такими как аллил, amino, азидо, тино, O-аллил, O-C₁-C₁₀-алкил, -OCF₃, O-(CH₂)₂-O-CH₃, 2'-O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n), or O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), где каждый R_m и R_n независимо представляет собой H или замещенный или незамещенный C₁-C₁₀-алкил. 2'-Модифицированные нуклеозиды могут также содержать другие модификации, например, в других положениях сахара и/или азотистого основания.

В данном контексте "2'-F" относится к нуклеозиду, содержащему сахар, содержащий группу фтора в 2' положении сахарного кольца.

В данном контексте "2'-OMe" или "2'-OCH₃", или "2'-O-метил" относится к нуклеозиду, содержащему сахар, содержащий группу -OCH₃ в 2' положении сахарного кольца.

В данном контексте "MOE" или "2'-MOE", или "2'-OCH₂CH₂OCH₃", или "2'-O-метоксиэтил" относится к нуклеозиду, содержащему сахар, содержащий группу -OCH₂CH₂OCH₃ в 2' положении сахарного кольца.

В данном контексте "олигонуклеотид" относится к соединению, содержащему множество связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации один или более из множества нуклеозидов являются модифицированными. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотид содержит один или более рибонуклеозидов (РНК) и/или дезоксирибонуклеозидов (ДНК).

В данной области техники известны также многие другие бициклические и трициклические кольца-

вые системы заменителей сахара, которые могут быть использованы для модификации нуклеозидов для внедрения в антисмысловые соединения (см., например, обзорную статью: Leumann, Bioorg. Med. Chem., 2002, 10, 841-854). Такие кольцевые системы могут подвергаться различным дополнительным замещениям для повышения активности.

Способы получения модифицированных сахаров хорошо известны специалистам в данной области техники. Некоторые иллюстративные патенты США, которые описывают получение таких модифицированных сахаров, включают, без ограничения, патенты США 4981957; 5118800; 5319080; 5359044; 5393878; 5446137; 5466786; 5514785; 5519134; 5567811; 5576427; 5591722; 5597909; 5610300; 5627053; 5639873; 5646265; 5670633; 5700920; 5792847 и 6600032, а также международную заявку PCT/US2005/019219, поданную 2 июня 2005 г. и опубликованную как WO 2005/121371 12 декабря 2005 г., полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

В нуклеотидах, имеющих модифицированные сахарные фрагменты, фрагменты азотистых оснований (природные, модифицированные или их комбинации) сохраняются для гибридизации с соответствующей нуклеиновой кислотой-мишенью.

В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения содержат один или более нуклеозидов, имеющих модифицированные сахарные фрагменты. В некоторых вариантах реализации модифицированный сахарный фрагмент представляет собой 2'-МОЕ. В некоторых вариантах реализации 2'-МОЕ модифицированные нуклеозиды расположены в гэммерном мотиве. В некоторых вариантах реализации модифицированный сахарный фрагмент представляет собой бициклический нуклеозид, имеющий мостиковую группу (4'-CH(CH₃)-O-2'). В некоторых вариантах реализации (4'-CH(CH₃)-O-2') модифицированные нуклеозиды расположены в крыльях гэммерного мотива.

Модифицированные азотистые основания.

Модификации или замещения азотистого основания (или основания) структурно отличаются и функционально взаимозаменяемы с природными или синтетическими немодифицированными азотистыми основаниями. Природные и модифицированные азотистые основания могут участвовать в водородном связывании. Такие модификации азотистых оснований могут влиять на стабильность к действию нуклеаз, аффинность связывания или некоторые другие полезные биологические свойства антисмысловых соединений. Модифицированные азотистые основания включают синтетические и природные азотистые основания, такие как, например, 5-метилцитозин (5-me-C). Некоторые замещения азотистых оснований, включая 5-метилцитозиновые замещения, особенно подходят для повышения аффинности связывания антисмыслового соединения с нуклеиновой кислотой-мишенью. Например, было показано, что 5-метилцитозиновые замещения повышают стабильность дуплекса нуклеиновой кислоты на 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. и Lebleu, B., ред., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, сс. 276-278).

Дополнительные модифицированные азотистые основания включают 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галогенурацил и цитозин, 5-пропинил (-C≡C-CH₃) урацил и цитозин и другие алкильные производные пиримидиновых оснований, 6-азоурацил, цитозин и тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген, 8-амино, 8-тиол, 8-тиоалкил, 8-гидроксил и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген, в частности, 5-бром, 5-трифторметил и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 2-Ф-аденин, 2-аминоаденин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-дезазагуанин и 7-дезазааденин, и 3-дезазагуанин и 3-дезазааденин.

Фрагменты гетероциклических оснований также могут включать те, в которых пуриновое или пиримидиновое основание заменено другими гетероциклами, например, 7-дезазааденин, 7-дезазагуанозин, 2-аминопиридин и 2-пиридон. Азотистые основания, которые особенно подходят для повышения аффинности связывания антисмысловых соединений, включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и O-6 замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин.

В некоторых вариантах реализации антисмысловые соединения, направленные на нуклеиновую кислоту CFB, содержат одно или более модифицированных азотистых оснований. В некоторых вариантах реализации укороченные или гэм-расширенные антисмысловые олигонуклеотиды, направленные на нуклеиновую кислоту CFB, содержат одно или более модифицированных азотистых оснований. В некоторых вариантах реализации модифицированное азотистое основание представляет собой 5-метилцитозин. В некоторых вариантах реализации каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

Сопряженные антисмысловые соединения.

В некоторых вариантах реализации настоящего описания предложены сопряженные антисмысловые соединения. В некоторых вариантах реализации настоящего описания предложены сопряженные антисмысловые соединения, содержащие антисмысловый олигонуклеотид, комплементарный транскрипту нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации настоящего описания предложены способы, включающие приведение в контакт клетки с сопряженным антисмысловым соединением, содержащим антисмысловый олигонуклеотид, комплементарный транскрипту нуклеиновой кислоты. В некоторых

вариантах реализации настоящего описания предложены способы, включающие приведение в контакт клетки с сопряженным антисмысловым соединением, содержащим антисмысловый олигонуклеотид, и уменьшение количества или активности транскрипта нуклеиновой кислоты в клетке.

Ранее был описан асиалогликопротеиновый рецептор (ASGP-R). См. например, Park et al., PNAS, том. 102, № 47, сс. 17125-17129 (2005). Такие рецепторы экспрессируются на клетках печени, в частности, гепатоцитах. Кроме того, было показано, что соединения, содержащие кластеры трех N-ацетилгалактозаминовых (GalNAc) лигандов, способны связываться с ASGP-R, приводя к захвату указанного соединения в клетку. См. например, Khorev et al., Bioorganic and Medicinal Chemistry, 16, 9, сс. 5216-5231 (май, 2008). Соответственно, конъюгаты, содержащие такие кластеры GalNAc, использовали для облегчения захвата некоторых соединений в клетки печени, в частности, гепатоциты. Например, было показано, что некоторые GalNAc-содержащие конъюгаты увеличивают активность дуплексных миРНК соединений в клетках печени *in vivo*. В таких случаях GalNAc-содержащий конъюгат, как правило, прикрепляется к смысловой спирали дуплекса миРНК. Поскольку смысловая спираль отбрасывается перед окончательной гибридизацией антисмысловой спирали с нуклеиновой кислотой-мишенью, то маловероятно, что такой конъюгат будет влиять на активность. Как правило, конъюгат присоединяется к 3'-концу смысловой спирали миРНК. См. например, патент США 8106022. Некоторые группы конъюгата, описанные в настоящем документе, более активны и/или синтезируются легче, чем группы конъюгата, описанные ранее.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения конъюгаты присоединяются к односпиральным антисмысловым соединениям, включая, но не ограничиваясь ими, антисмысловые соединения на основе РНКазы Н и антисмысловые соединения, которые изменяют сплайсинг целевой нуклеиновой кислоты пре-мРНК. В таких вариантах реализации конъюгат должен оставаться присоединенным к антисмысловому соединению достаточно долго для обеспечения преимущества (улучшенного захвата в клетки), но затем он должен либо расщепляться, либо иным образом не препятствовать последующим стадиям, необходимым для активности, таким как гибридизация с целевой нуклеиновой кислотой и взаимодействие с РНКазой Н или ферментами, связанными со сплайсингом или модулированием сплайсинга. Такой баланс свойств более важен при осаждении односпиральных антисмысловых соединений, чем соединений миРНК, где конъюгат может быть просто присоединен к смысловой спирали. В настоящем документе описаны односпиральные антисмысловые соединения, обладающие улучшенной активностью в клетках печени *in vivo*, по сравнению с таким же антисмысловым соединением, не имеющим конъюгата. Учитывая необходимый баланс свойств для этих соединений, такая улучшенная активность является неожиданной.

В некоторых вариантах реализации группы конъюгата по настоящему документу содержат расщепляемый фрагмент. Как было отмечено, не ограничиваясь каким-либо механизмом, логично, что конъюгат должен сохраняться у соединения достаточно долго для обеспечения усиления захвата, но после этого желательно, чтобы некоторая его часть или, в идеале, весь конъюгат расщеплялся, выделяя исходное соединение (например, антисмысловое соединение) в его наиболее активной форме. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент представляет собой расщепляемый нуклеозид. Такие варианты реализации обладают преимуществом эндогенных нуклеаз в клетке за счет присоединения остальной части конъюгата (кластера) к антисмысловому олигонуклеотиду через нуклеозид при помощи одной или более расщепляемых связей, таких как фосфодиэфирная связь. В некоторых вариантах реализации кластер связан с расщепляемым нуклеозидом через фосфодиэфирную связь. В некоторых вариантах реализации расщепляемый нуклеозид присоединен к антисмысловому олигонуклеотиду (антисмысловому соединению) фосфодиэфирной связью. В некоторых вариантах реализации группа конъюгата может содержать два или три расщепляемых нуклеозида. В таких вариантах реализации указанные расщепляемые нуклеозиды связаны друг с другом, с антисмысловым соединением и/или с кластером посредством расщепляемых связей (таких как фосфодиэфирная связь). Некоторые конъюгаты по настоящему документу не содержат расщепляемый нуклеозид, а вместо этого содержат расщепляемую связь. Показано, что достаточное расщепление конъюгата из олигонуклеотида обеспечивается по меньшей мере за счет одной связи, которая легко поддается расщеплению в клетке (расщепляемая связь).

В некоторых вариантах реализации сопряженные антисмысловые соединения представляют собой пролекарства. Такие пролекарства вводят животному, и они в конечном итоге метаболизируются до более активной формы. Например, сопряженные антисмысловые соединения расщепляются с удалением всего или части конъюгата, приводя к активной (или более активной) форме антисмыслового соединения, не содержащего всего или части конъюгата.

В некоторых вариантах реализации конъюгаты присоединены у 5'-конца олигонуклеотида. Некоторые такие 5'-конъюгаты расщепляются более эффективно, чем аналоги, имеющие такую же группу конъюгата, присоединенную у 3'-конца. В некоторых вариантах реализации улучшенная активность может коррелировать с улучшенным расщеплением. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотиды, содержащие конъюгат у 5'-конца, обладают более высокой эффективностью, чем олигонуклеотиды, содержащие конъюгат у 3'-конца (см., например, Примеры 56, 81, 83 и 84). Кроме того, 5'-присоединение обеспечивает более простой синтез олигонуклеотида. Как правило, олигонуклеотиды синтезируют на

твердой подложке в направлении от 3' к 5'. Для получения 3'-сопряженного олигонуклеотида, как правило присоединяют предварительно сопряженный 3'-нуклеозид к твердой подложке, а затем обычным путем создают олигонуклеотид. Однако присоединение такого сопряженного нуклеозида к твердой подложке усложняет синтез. Кроме того, используя такой подход, конъюгат затем присутствует в ходе всего синтеза олигонуклеотида и может разрушаться во время последующих стадий или может ограничивать типы реакций и реагентов, которые можно использовать. Используя структуры и методики, описанные в настоящем документе для 5'-сопряженных олигонуклеотидов, можно синтезировать олигонуклеотид при помощи стандартных автоматизированных методик и внедрять в конъюгат последний (5'-крайний) нуклеозид или после отделения олигонуклеотида от твердой подложки.

С учетом известного уровня техники и настоящего описания, специалисты в данной области техники могут легко получить любые из конъюгатов и сопряженных олигонуклеотидов, описанных в настоящем документе. Кроме того, синтез некоторых таких конъюгатов и сопряженных олигонуклеотидов, описанных в настоящем документе, проще и/или требует меньше стадий и, следовательно, менее дорогой, чем синтез ранее описанных конъюгатов, что дает преимущество при производстве. Например, синтез некоторых групп конъюгата состоит из меньшего количества синтетических стадий, что приводит к увеличению выхода, по сравнению с ранее описанными группами конъюгата. Группы конъюгатов, такие как GalNAc3-10 в примере 46 и GalNAc3-7 в примере 48 гораздо проще, чем ранее описанные конъюгаты, такие как описаны в публикациях U.S. 8106022 или U.S. 7262177, для которых необходима сборка большого количества химических промежуточных соединений. Соответственно, эти и другие конъюгаты, описанные в настоящем документе, обладают преимуществом по сравнению с ранее описанными соединениями для применения с любым олигонуклеотидом, включая односпиральные олигонуклеотиды и любую спираль двухспиральных олигонуклеотидов (например, мРНК).

Точно так же, в настоящем документе описаны группы конъюгатов, имеющие только один или два лиганда GalNAc. Как показано, такие сопряженные группы усиливают активность антисмысловых соединений. Такие соединения гораздо проще получить, чем конъюгаты, содержащие три лиганда GalNAc. Группы конъюгатов, содержащие один или два лиганда GalNAc, могут быть присоединены к любым антисмысловым соединениям, включая односпиральные олигонуклеотиды и любую спираль двухспиральных олигонуклеотидов (например, мРНК).

В некоторых вариантах реализации конъюгаты, описанные в настоящем документе, существенно не изменяют некоторые показатели переносимости. Например, в настоящем документе показано, что сопряженные антисмысловые соединения являются не более иммуногенными, чем несопряженные исходные соединения. Поскольку активность улучшается, то варианты реализации, в которых переносимость остается такой же (или в действительности если даже переносимость ухудшается лишь незначительно, по сравнению с приростом активности), обладают улучшенными характеристиками для терапии.

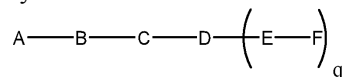
В некоторых вариантах реализации сопряжение позволяет изменять антисмысловые соединения так, чтобы они обладали менее выраженными последствиями в отсутствие сопряжения. Например, в некоторых вариантах реализации замена одной или более тиофосфатных связей полностью тиофосфатного антисмыслового соединения на фосфодиэфирные связи приводит к улучшению некоторых показателей переносимости. Например, в некоторых случаях такие антисмысловые соединения, имеющие один или более фосфодиэфиров, являются менее иммуногенными, чем такие же соединения, в которых каждая связь представляет собой тиофосфат. Однако в некоторых случаях, как показано в примере 26, такое же замещение одной или более тиофосфатных связей на фосфодиэфирные связи приводит также к снижению клеточного захвата и/или к снижению активности. В некоторых вариантах реализации сопряженные антисмысловые соединения, описанные в настоящем документе, допускают такое изменение связей с небольшим снижением или без снижения захвата и активности, по сравнению с сопряженным полностью тиофосфатным аналогом. В действительности, в некоторых вариантах реализации, например, в примерах 44, 57, 59 и 86, олигонуклеотиды, содержащие конъюгат и по меньшей мере одну фосфодиэфирную межнуклеозидную связь, фактически демонстрируют повышенную активность *in vivo* даже по сравнению с полностью тиофосфатным аналогом, также содержащим такой же конъюгат. Более того, поскольку сопряжение приводит к значительному увеличению захвата /активности, то небольшое снижение такого существенного прироста может быть приемлемым для достижения улучшенной переносимости. Соответственно, в некоторых вариантах реализации сопряженные антисмысловые соединения содержат по меньшей мере одну фосфодиэфирную связь.

В некоторых вариантах реализации сопряжение антисмысловых соединений по настоящему документу приводит к улучшенной доставке, захвату и активности в гепатоцитах. Следовательно, в ткань печени доставляется большее количество соединения. Однако в некоторых вариантах реализации такая улучшенная доставка сама по себе не объясняет общего увеличения активности. В некоторых таких вариантах реализации в гепатоциты поступает большее количество соединения. В некоторых вариантах реализации даже такой улучшенный захват гепатоцитов сам по себе не объясняет общего увеличения активности. В таких вариантах реализации увеличивается продуктивный захват сопряженного соединения. Например, как показано в примере 102, некоторые варианты реализации GalNAc-содержащих конъюгатов увеличивают обогащение антисмысловых олигонуклеотидов в гепатоцитах, по сравнению с

не паренхимальными клетками. Такое обогащение преимущественно для олигонуклеотидов, которые направлены на гены, экспрессируемые в гепатоцитах.

В некоторых вариантах реализации сопряженные антисмысловые соединения по настоящему документу приводят к уменьшению воздействия на почки. Например, как показано в примере 20, концентрации антисмысловых олигонуклеотидов, содержащих некоторые варианты реализации GalNAc-содержащих конъюгатов, в почках ниже, чем концентрации антисмысловых олигонуклеотидов, не имеющих GalNAc-содержащего конъюгата. Это имеет несколько преимущественных терапевтических применений. Для терапевтических показаний, в которых не требуется проявление активности в почках, воздействие на почки подвергает их риску токсичности без соответствующей пользы. Более того, высокая концентрация в почках обычно приводит к выводу соединения с мочой, обеспечивая более быстрое выведение. Соответственно, для внепочечных мишеней накопление в почках является нежелательным.

В некоторых вариантах реализации настоящего описания предложены сопряженные антисмысловые соединения, представленные формулой



где A представляет собой антисмысловый олигонуклеотид;

B представляет собой расщепляемый фрагмент;

C представляет собой линкер конъюгата;

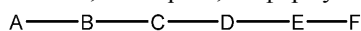
D представляет собой группу ветвления;

каждый E представляет собой связку;

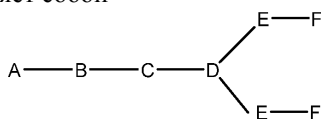
каждый F представляет собой лиганд; и

q представляет собой целое число от 1 до 5.

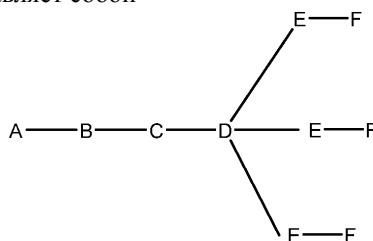
На представленной выше схеме и в аналогичных схемах в настоящем документе группа ветвления "D" разветвляется такое количество раз, которое необходимо для соответствия количеству групп (E-F), указанному количеством "q". Следовательно, если q = 1, то формула представляет собой



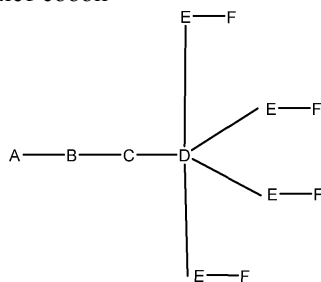
если q = 2, то формула представляет собой



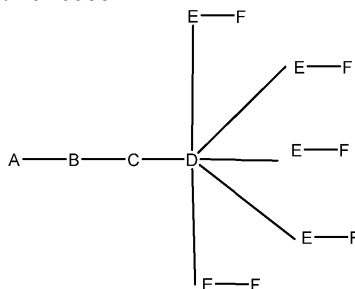
если q = 3, то формула представляет собой



если q = 4, то формула представляет собой

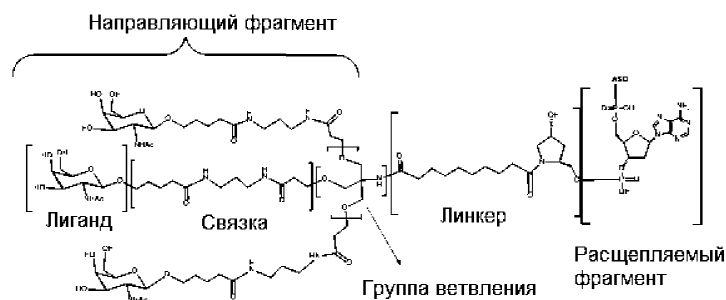


если q = 5, то формула представляет собой

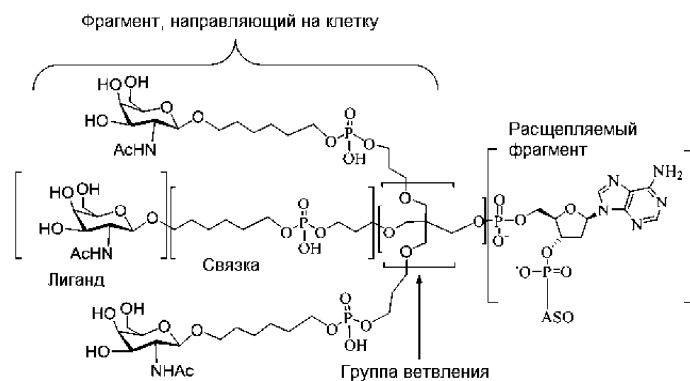


В некоторых вариантах реализации предложены сопряженные антисмысловые соединения, имею-

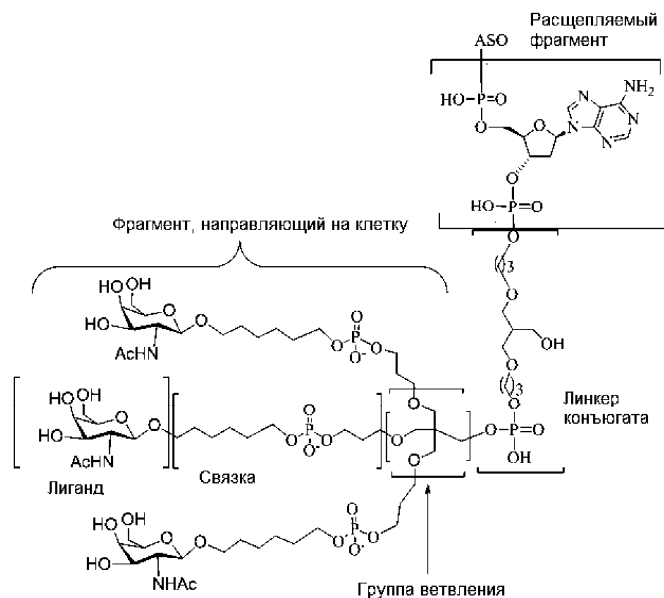
щие структуру



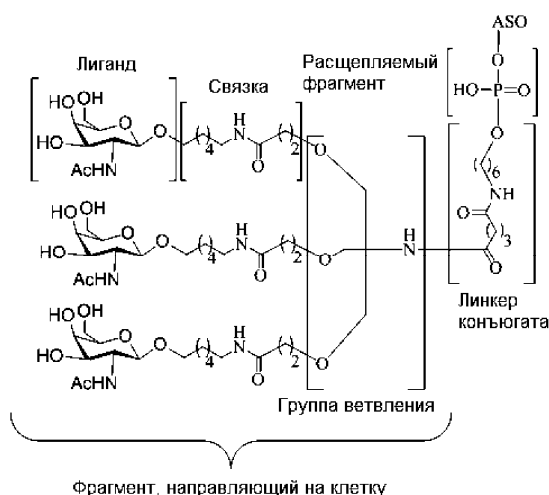
В некоторых вариантах реализации предложены сопряженные антисмысловые соединения, имеющие структуру



В некоторых вариантах реализации предложены сопряженные антисмысловые соединения, имеющие структуру

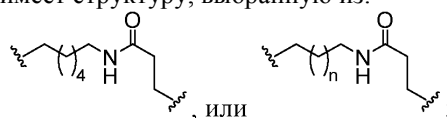


В некоторых вариантах реализации предложены сопряженные антисмысловые соединения, имеющие структуру



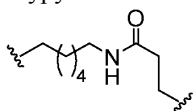
В настоящем описании предложены следующие неограничивающие нумерованные варианты реализации.

Вариант реализации 1. Сопряженное антисмысловое соединение по любому из вариантов реализации 1179-1182, в котором связка имеет структуру, выбранную из:

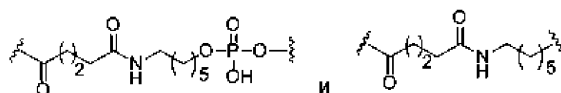


где каждый n независимо равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7.

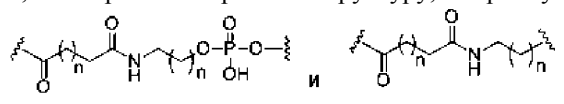
Вариант реализации 2. Сопряженное антисмысловое соединение по любому из вариантов реализации 1179-1182, в котором связка имеет структуру:



Вариант реализации 3. Сопряженное антисмысловое соединение по любому из вариантов реализации 1179-1182 или 1688-1689, в котором линкер имеет структуру, выбранную из:

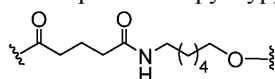


Вариант реализации 4. Сопряженное антисмысловое соединение по любому из вариантов реализации 1179-1182 или 1688-1689, в котором линкер имеет структуру, выбранную из:



где каждый n независимо равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7.

Вариант реализации 5. Сопряженное антисмысловое соединение по любому из вариантов реализации 1179-1182 или 1688-1689, в котором линкер имеет структуру:



В вариантах реализации, имеющих более одной конкретной переменной (например, более одного "m" или "n"), если не указано иное, каждая такая конкретная переменная выбрана независимо. Следовательно, для структуры, имеющей более одного n , каждый n выбран независимо, так что они могут быть или не быть одинаковыми между собой.

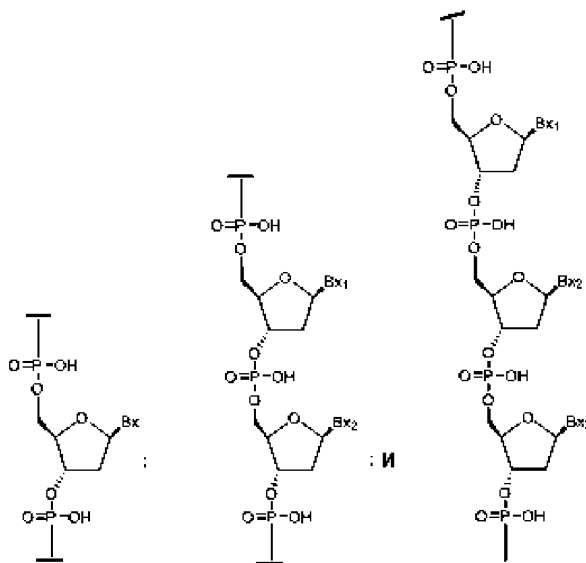
i. Некоторые расщепляемые фрагменты.

В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент представляет собой расщепляемую связь. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент содержит расщепляемую связь. В некоторых вариантах реализации группа конъюгата содержит расщепляемый фрагмент. В некоторых таких вариантах реализации расщепляемый фрагмент присоединяется к антисмысловому олигонуклеотиду. В некоторых таких вариантах реализации расщепляемый фрагмент присоединяется непосредственно к фрагменту, направляющему на клетку. В некоторых таких вариантах реализации расщепляемый фрагмент присоединяется к линкеру конъюгата. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент содержит фосфат или фосфодиэфир. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент представляет собой расщепляемый нуклеозид или нуклеозидный аналог. В некоторых вариантах

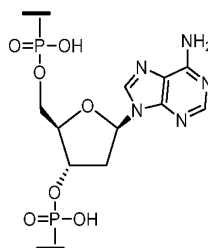
реализации нуклеозид или нуклеозидный аналог содержит необязательно защищенное гетероциклическое основание, выбранное из пурина, замещенного пурина, пиримидина или замещенного пиримидина. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент представляет собой нуклеозид, содержащий необязательно защищенное гетероциклическое основание, выбранное из урацила, тимина, цитозина, 4-N-бензоилцитозина, 5-метилцитозина, 4-N-бензоил-5-метилцитозина, аденина, 6-N-бензоиладенина, гуанина и 2-N-изобутирилгуанина. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент представляет собой 2'-дезоксинуклеозид, который присоединен к 3'-положению антисмыслового олигонуклеотида фосфодиэфирной связью и присоединен к линкеру фосфодиэфирной или тиофосфатной связью. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент представляет собой 2'-дезоксаденозин, который присоединен к 3'-положению антисмыслового олигонуклеотида фосфодиэфирной связью и присоединен к линкеру фосфодиэфирной или тиофосфатной связью. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент представляет собой 2'-дезоксаденозин, который присоединен к 3'-положению антисмыслового олигонуклеотида фосфодиэфирной связью и присоединен к линкеру фосфодиэфирной связью.

В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент присоединен к 3'-положению антисмыслового олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент присоединен к 5'-положению антисмыслового олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент присоединен к 2'-положению антисмыслового олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент присоединен к антисмысловому олигонуклеотиду фосфодиэфирной связью. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент присоединен к указанному линкеру либо фосфодиэфирной, либо тиофосфатной связью. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент присоединен к указанному линкеру фосфодиэфирной связью. В некоторых вариантах реализации группа конъюгата не содержит расщепляемый фрагмент.

В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент расщепляется после введения указанного комплекса в организм животного только после его поглощения целевой клеткой. Внутри клетки расщепляемый фрагмент расщепляется, высвобождая таким образом активный антисмысловый олигонуклеотид. Не ограничиваясь теорией, предполагают, что расщепляемый фрагмент расщепляется под действием одной или более нуклеаз внутри клетки. В некоторых вариантах реализации одна или более нуклеаз расщепляют фосфодиэфирную связь между расщепляемым фрагментом и линкером. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент имеет структуру, выбранную из следующих:



где каждый из Bx, Bx₁, Bx₂ и Bx₃ независимо представляет собой фрагмент гетероциклического основания. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент имеет структуру, выбранную из следующих:



ii. Некоторые линкеры.

В некоторых вариантах реализации группы конъюгата содержат линкер. В некоторых таких вариантах реализации линкер ковалентно связан с расщепляемым фрагментом. В некоторых таких вариантах

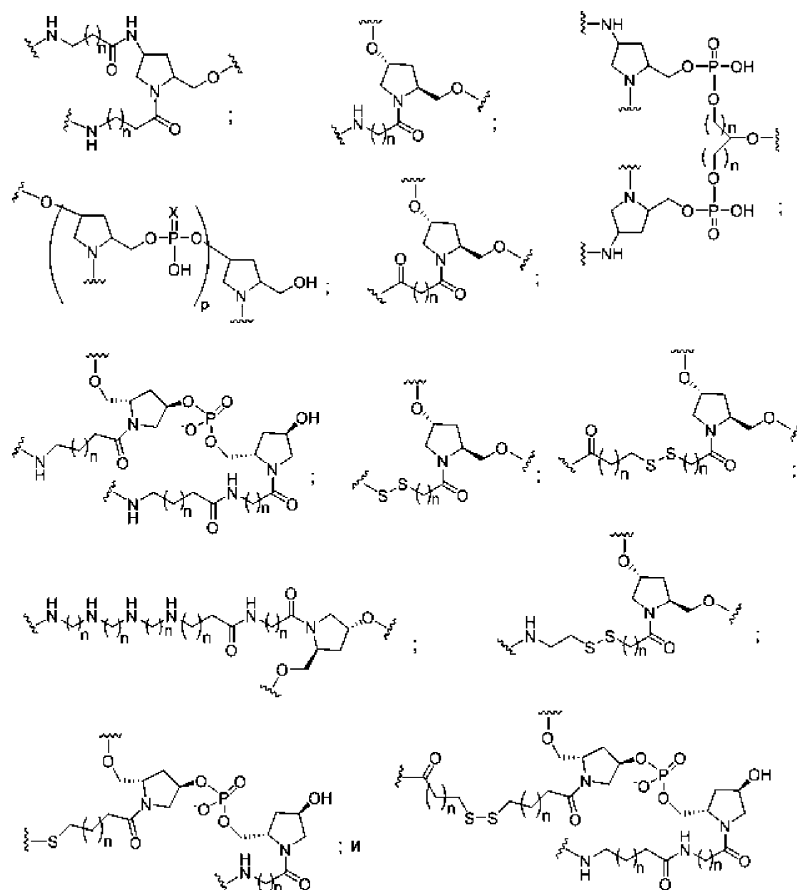
реализации линкер ковалентно связан с антисмысловым олигонуклеотидом. В некоторых вариантах реализации линкер ковалентно связан с фрагментом, направляющим на клетку. В некоторых вариантах реализации линкер дополнительно содержит ковалентное присоединение к твердой подложке. В некоторых вариантах реализации линкер дополнительно содержит ковалентное присоединение к белковому связывающему фрагменту. В некоторых вариантах реализации линкер дополнительно содержит ковалентное присоединение к твердой подложке и дополнительно содержит ковалентное присоединение к белковому связывающему фрагменту. В некоторых вариантах реализации линкер содержит несколько положений для присоединения связанных лигандов. В некоторых вариантах реализации линкер содержит несколько положений для присоединения связанных лигандов и не присоединен к группе ветвления. В некоторых вариантах реализации линкер дополнительно содержит одну или более расщепляемых связей. В некоторых вариантах реализации группа конъюгата не содержит линкер.

В некоторых вариантах реализации линкер содержит по меньшей мере одну линейную группу, содержащую группы, выбранные из алкильных, амидных, дисульфидных, полиэтиленгликолевых, тиоэфирных (-S-) и гидроксиламино (-O-N(H)-) групп. В некоторых вариантах реализации линейная группа содержит группы, выбранные из алкильных, амидных и простых эфирных групп. В некоторых вариантах реализации линейная группа содержит группы, выбранные из алкильных и простых эфирных групп. В некоторых вариантах реализации линейная группа содержит по меньшей мере одну фосфорную линкерную группу. В некоторых вариантах реализации линейная группа содержит по меньшей мере одну фосфодифирную группу. В некоторых вариантах реализации линейная группа содержит по меньшей мере одну нейтральную линкерную группу. В некоторых вариантах реализации линейная группа ковалентно присоединена к фрагменту, направляющему на клетку, и к расщепляемому фрагменту. В некоторых вариантах реализации линейная группа ковалентно присоединена к фрагменту, направляющему на клетку, и к антисмысловому олигонуклеотиду. В некоторых вариантах реализации линейная группа ковалентно присоединена к фрагменту, направляющему на клетку, к расщепляемому фрагменту и к твердой подложке. В некоторых вариантах реализации линейная группа ковалентно присоединена к фрагменту, направляющему на клетку, к расщепляемому фрагменту, к твердой подложке и к белковому связывающему фрагменту. В некоторых вариантах реализации линейная группа содержит одну или более расщепляемых связей.

В некоторых вариантах реализации линкер содержит линейную группу, ковалентно присоединенную к группе скелета. В некоторых вариантах реализации скелет содержит разветвленную алифатическую группу, которая содержит группы, выбранные из алкильных, амидных, дисульфидных, полиэтиленгликолевых, простых эфирных, тиоэфирных и гидроксиламино-групп. В некоторых вариантах реализации скелет содержит разветвленную алифатическую группу, которая содержит группы, выбранные из алкильных, амидных и простых эфирных групп. В некоторых вариантах реализации скелет содержит по меньшей мере одну моно- или полициклическую кольцевую систему. В некоторых вариантах реализации скелет содержит по меньшей мере две моно- или полициклические кольцевые системы. В некоторых вариантах реализации линейная группа ковалентно присоединена к группе скелета, а группа скелета ковалентно присоединена к расщепляемому фрагменту и линкеру. В некоторых вариантах реализации линейная группа ковалентно присоединена к группе скелета, а группа скелета ковалентно присоединена к расщепляемому фрагменту, линкеру и твердой подложке. В некоторых вариантах реализации линейная группа ковалентно присоединена к группе скелета, а группа скелета ковалентно присоединена к расщепляемому фрагменту, линкеру и белковому связывающему фрагменту. В некоторых вариантах реализации линейная группа ковалентно присоединена к группе скелета, а группа скелета ковалентно присоединена к расщепляемому фрагменту, линкеру, белковому связывающему фрагменту и твердой подложке. В некоторых вариантах реализации группа скелета содержит одну или более расщепляемых связей.

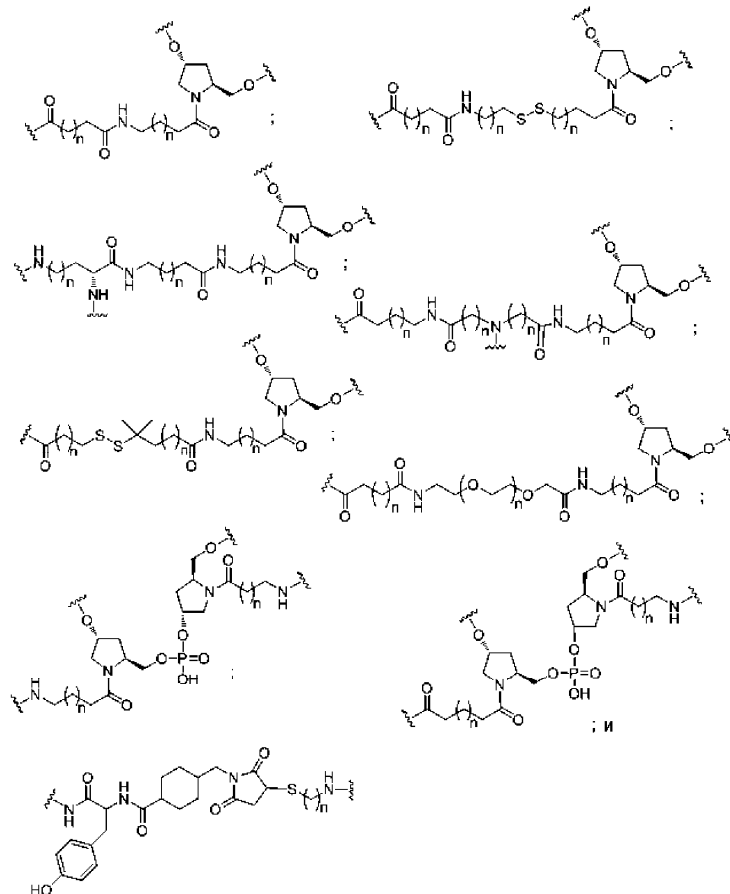
В некоторых вариантах реализации линкер содержит белок связывающий фрагмент. В некоторых вариантах реализации белок связывающий фрагмент представляет собой липид, такой как, например, включая, но не ограничиваясь ими, холестерин, холевая кислота, адамантан-уксусная кислота, 1-пирен-масляная кислота, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилоксигексильная группа, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадециловая группа, пальмитиновая кислота, миристиновая кислота, ОЗ-(олеоил)лихолевая кислота, ОЗ-(олеоил)холеновая кислота, диметокситриглицерин или феноксазин, витамин (например, фолат, витамин А, витамин Е, биотин, пиридоксаль), пептид, углевод (например, моносахарид, дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид, полисахарид), эндосомолитический компонент, стероид (например, уаол, гецигенин, диосгенин), терпен (например, тритерпен, например, сарсасапогенин, фриделин, лихолевая кислота, дериватизованная эпифриделанолом) или катионный липид. В некоторых вариантах реализации белок связывающий фрагмент представляет собой насыщенную или ненасыщенную жирную кислоту с длиной цепи от C16 до C22, холестерин, холевую кислоту, витамин Е, адамантан или 1-пентафторпропил.

В некоторых вариантах реализации линкер имеет структуру, выбранную из:



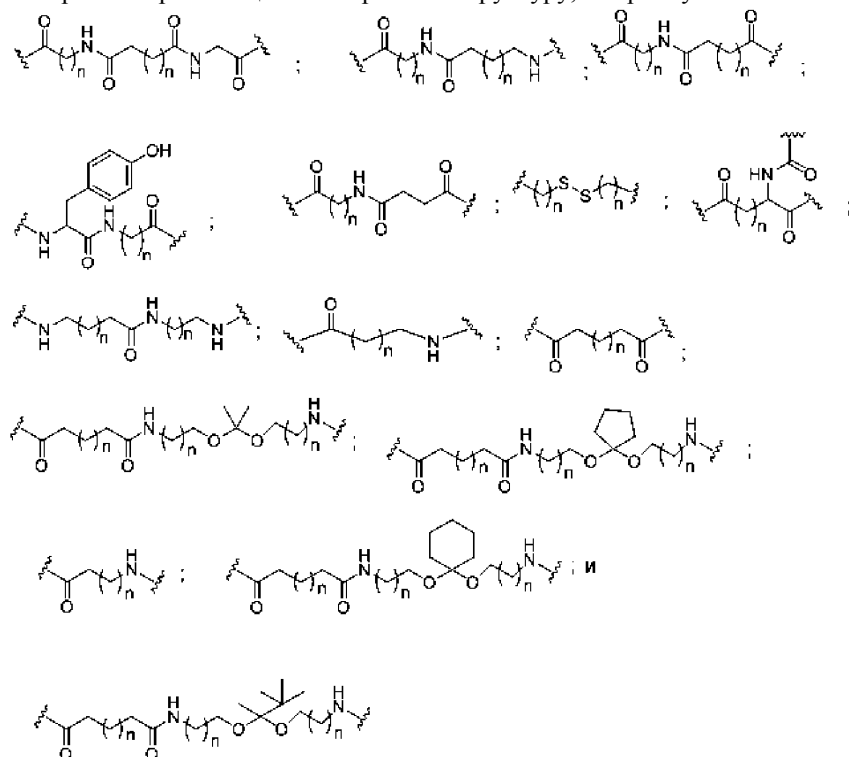
где каждый n независимо равен от 1 до 20; и p равен от 1 до 6.

В некоторых вариантах реализации линкер имеет структуру, выбранную из:



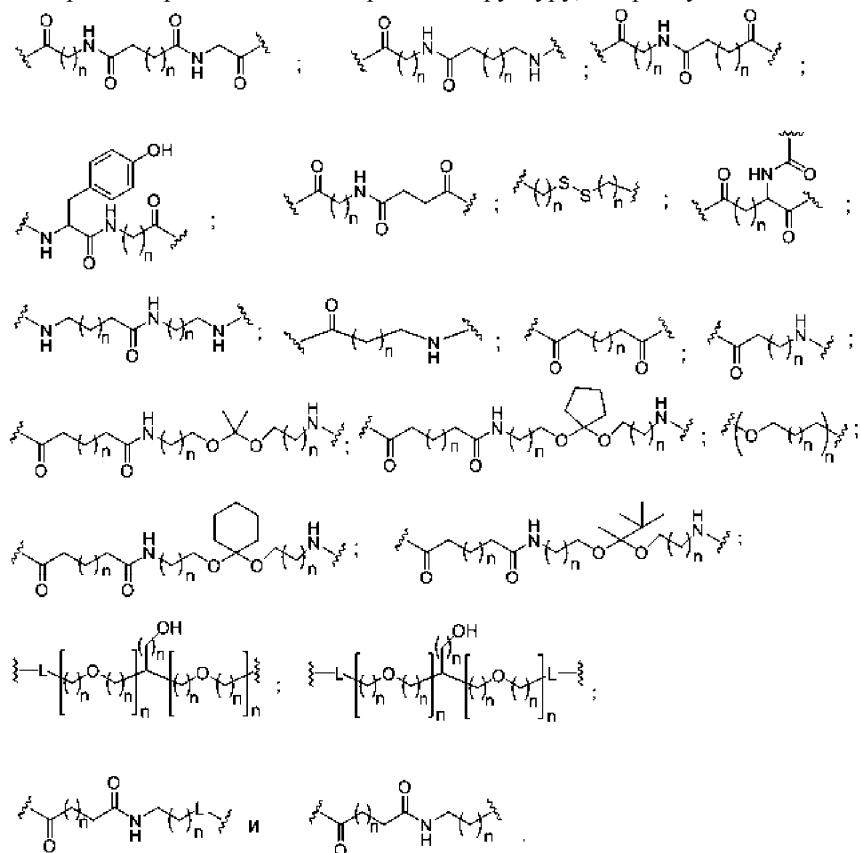
где каждый n независимо равен от 1 до 20.

В некоторых вариантах реализации линкер имеет структуру, выбранную из:



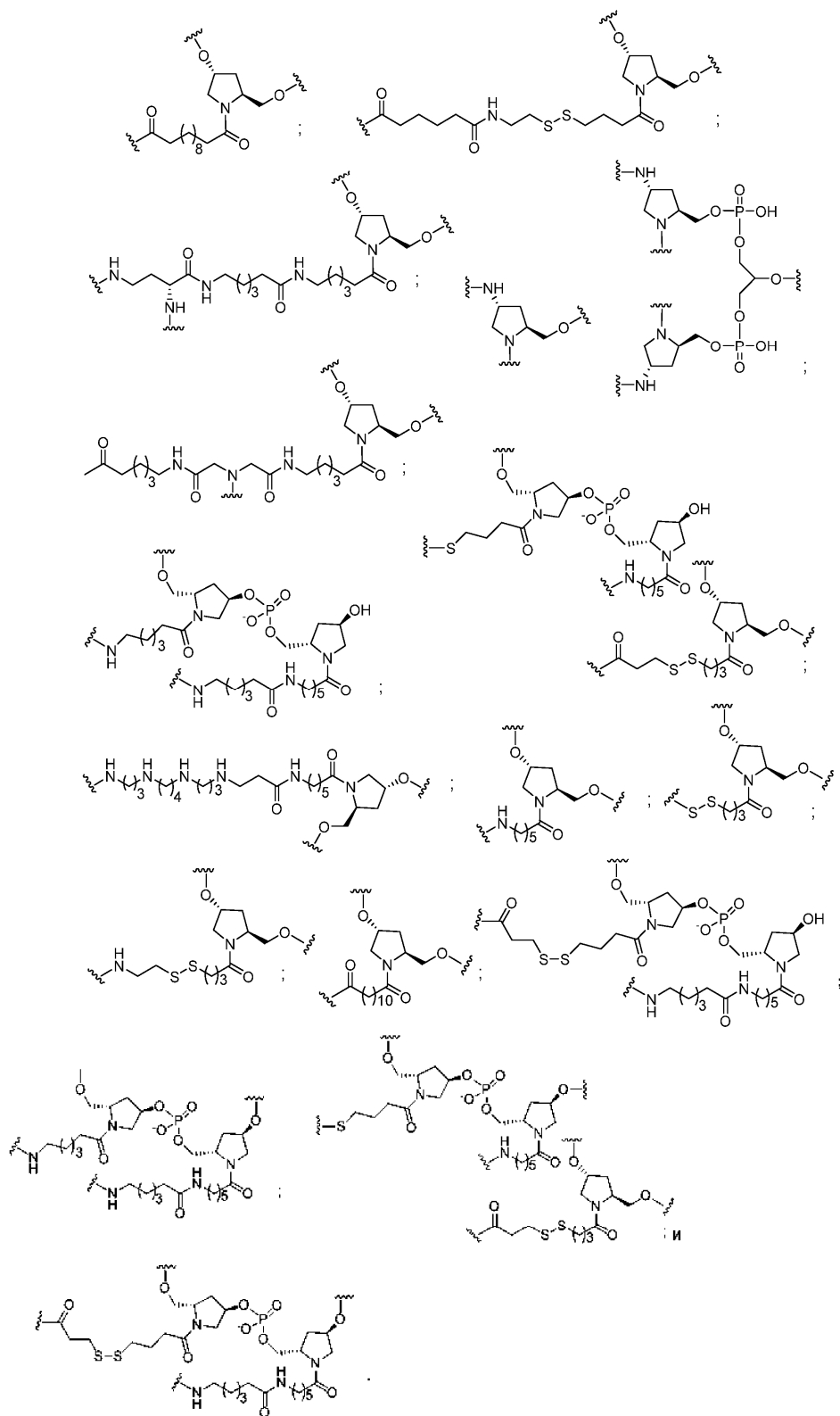
где n равен от 1 до 20.

В некоторых вариантах реализации линкер имеет структуру, выбранную из:

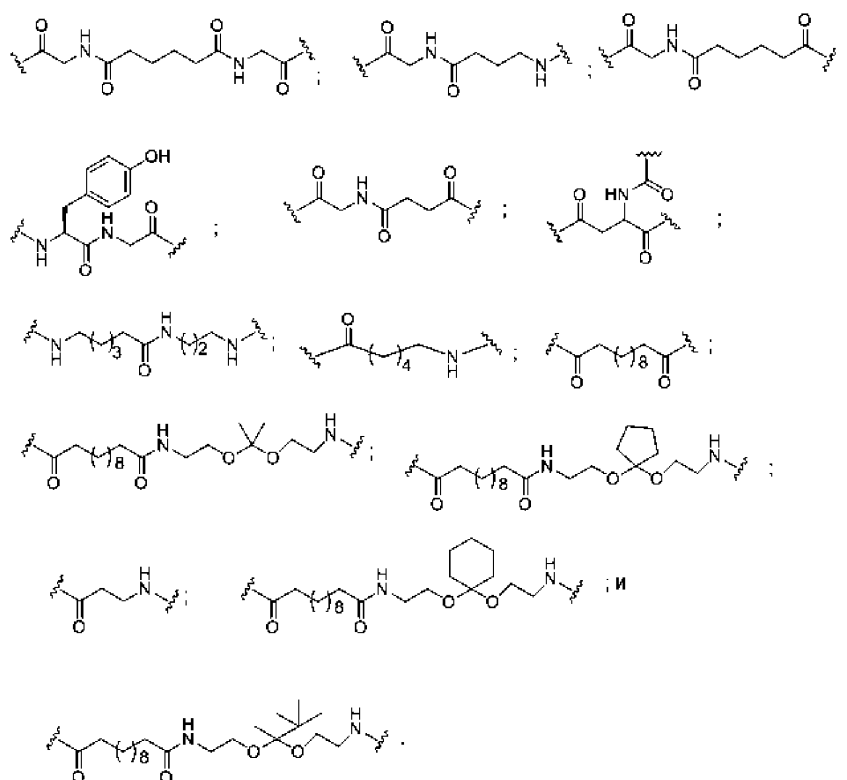


где каждый L независимо представляет собой фосфорную линкерную группу или нейтральную линкерную группу; и каждый n независимо равен от 1 до 20.

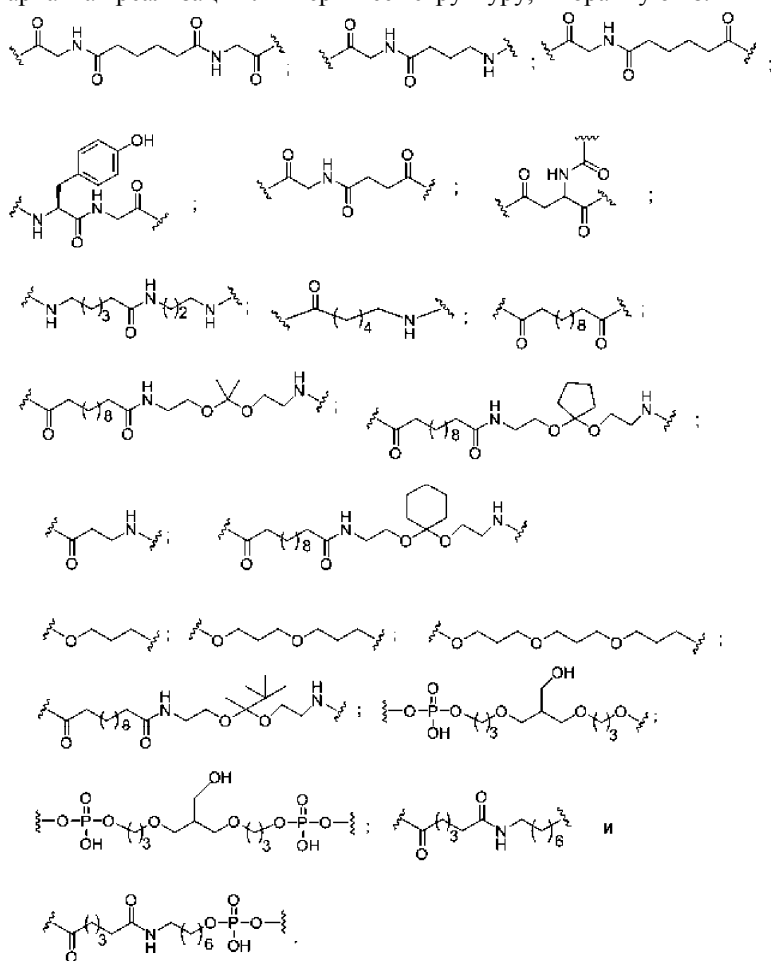
В некоторых вариантах реализации линкер имеет структуру, выбранную из:



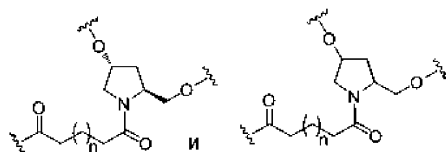
В некоторых вариантах реализации линкер имеет структуру, выбранную из:



В некоторых вариантах реализации линкер имеет структуру, выбранную из:

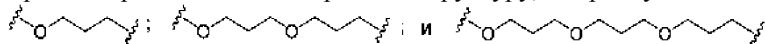


В некоторых вариантах реализации линкер имеет структуру, выбранную из:

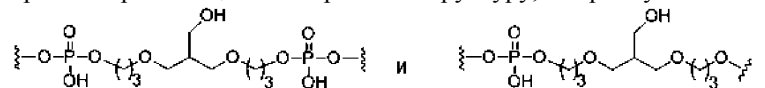


где n равен от 1 до 20.

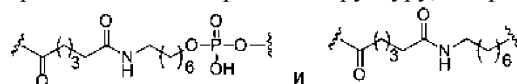
В некоторых вариантах реализации линкер имеет структуру, выбранную из:



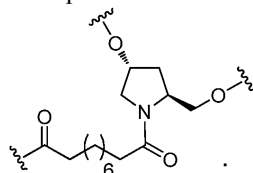
В некоторых вариантах реализации линкер имеет структуру, выбранную из:



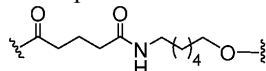
В некоторых вариантах реализации линкер имеет структуру, выбранную из:



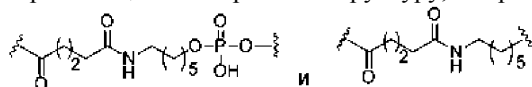
В некоторых вариантах реализации линкер конъюгата имеет структуру



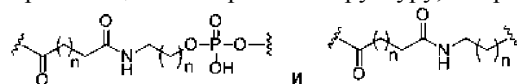
В некоторых вариантах реализации линкер конъюгата имеет структуру



В некоторых вариантах реализации линкер имеет структуру, выбранную из:



В некоторых вариантах реализации линкер имеет структуру, выбранную из:



где каждый n независимо равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7.

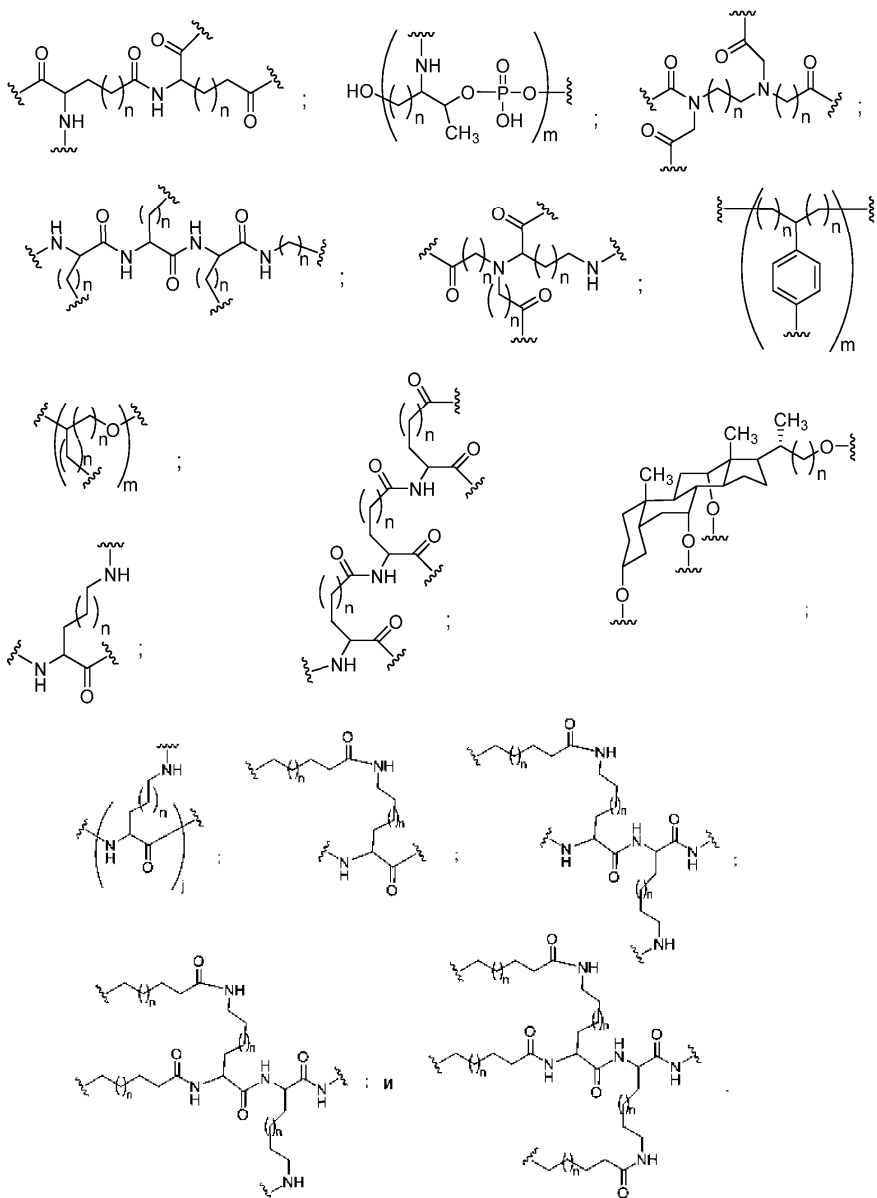
iii. Некоторые фрагменты, направляющие на клетку.

В некоторых вариантах реализации группы конъюгата содержат фрагменты, направляющие на клетку. Некоторые такие фрагменты, направляющие на клетку, увеличивают клеточный захват анти-смысловых соединений. В некоторых вариантах реализации фрагменты, направляющие на клетку, содержат группу ветвления, одну или более связей и один или более лигандов. В некоторых вариантах реализации фрагменты, направляющие на клетку, содержат группу ветвления, одну или более связей, один или более лигандов и одну или более расщепляемых связей.

1. Некоторые группы ветвления.

В некоторых вариантах реализации группы конъюгата содержат нацеливающий фрагмент, содержащий группу ветвления и по меньшей мере два связанных лиганда. В некоторых вариантах реализации группа ветвления присоединяет линкер конъюгата. В некоторых вариантах реализации группа ветвления присоединяет расщепляемый фрагмент. В некоторых вариантах реализации группа ветвления присоединяет антисмысловый олигонуклеотид. В некоторых вариантах реализации группа ветвления ковалентно присоединена к линкеру и каждому из связанных лигандов. В некоторых вариантах реализации группа ветвления содержит разветвленную алифатическую группу, которая содержит группы, выбранные из алкильных, амидных, дисульфидных, полиэтиленгликолевых, простых эфирных, тиоэфирных и гидроксиламино-групп. В некоторых вариантах реализации группа ветвления содержит группы, выбранные из алкильных, амидных и простых эфирных групп. В некоторых вариантах реализации группа ветвления содержит группы, выбранные из алкильных и простых эфирных групп. В некоторых вариантах реализации группа ветвления содержит моно- или полициклическую кольцевую систему. В некоторых вариантах реализации группа ветвления содержит одну или более расщепляемых связей. В некоторых вариантах реализации группа конъюгата не содержит группу ветвления.

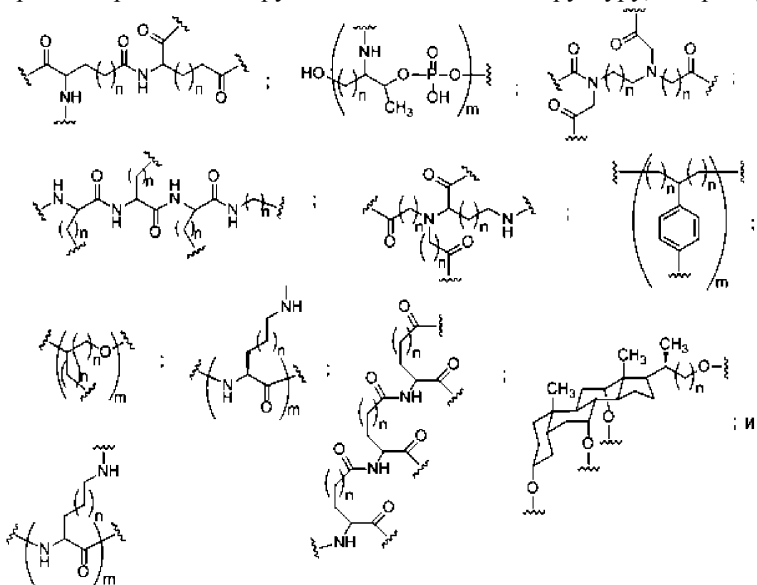
В некоторых вариантах реализации группа ветвления имеет структуру, выбранную из:



где каждый n независимо равен от 1 до 20;

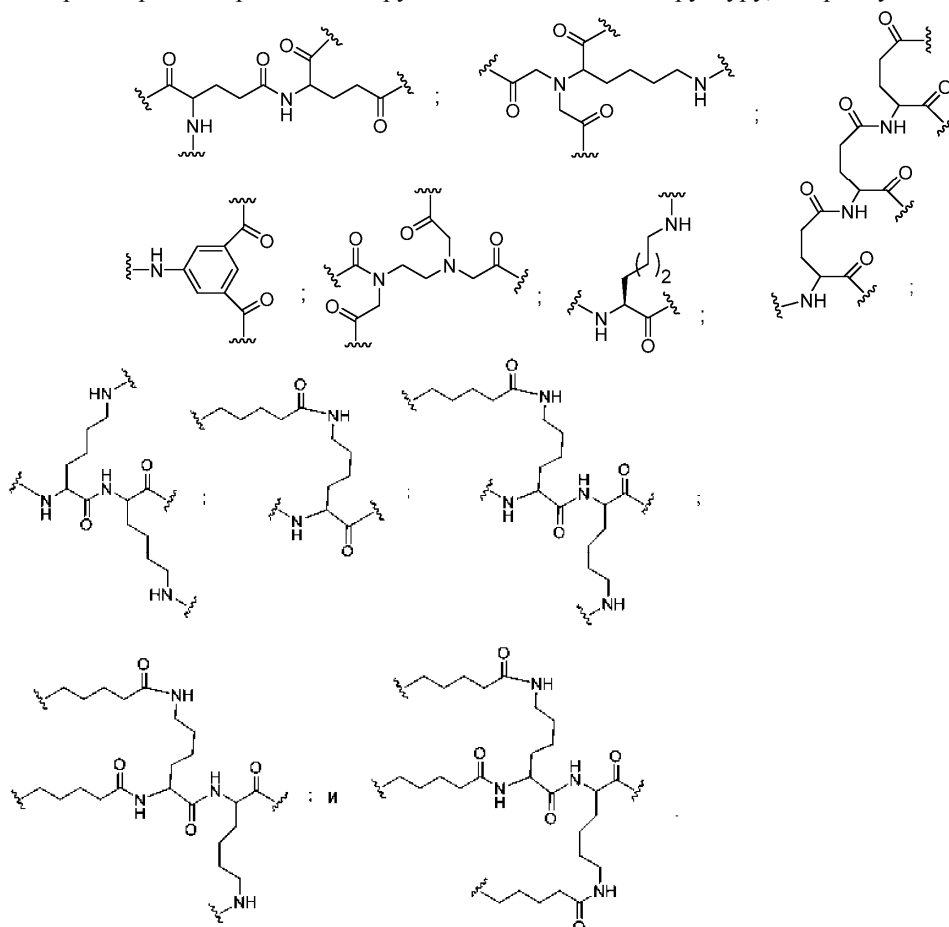
j равен от 1 до 3; и m равен от 2 до 6.

В некоторых вариантах реализации группа ветвления имеет структуру, выбранную из:

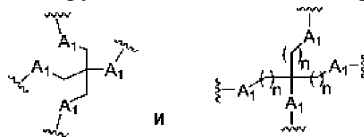


где каждый n независимо равен от 1 до 20; и m равен от 2 до 6.

В некоторых вариантах реализации группа ветвления имеет структуру, выбранную из:

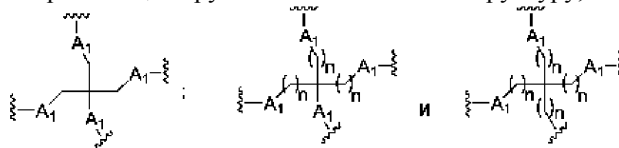


В некоторых вариантах реализации группа ветвления имеет структуру, выбранную из:

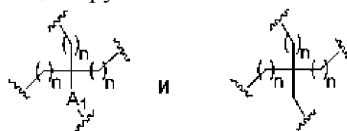


где каждый A_1 независимо представляет собой O, S, C=O или NH; и каждый n независимо равен от 1 до 20.

В некоторых вариантах реализации группа ветвления имеет структуру, выбранную из:

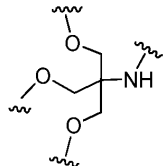


где каждый A_1 независимо представляет собой O, S, C=O или NH; и каждый n независимо равен от 1 до 20. В некоторых вариантах реализации группа ветвления имеет структуру, выбранную из:

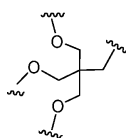


где A_1 представляет собой O, S, C=O или NH; и каждый n независимо равен от 1 до 20.

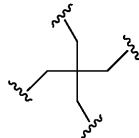
В некоторых вариантах реализации группа ветвления имеет структуру, выбранную из



В некоторых вариантах реализации группа ветвления имеет структуру, выбранную из



В некоторых вариантах реализации группа ветвления имеет структуру, выбранную из



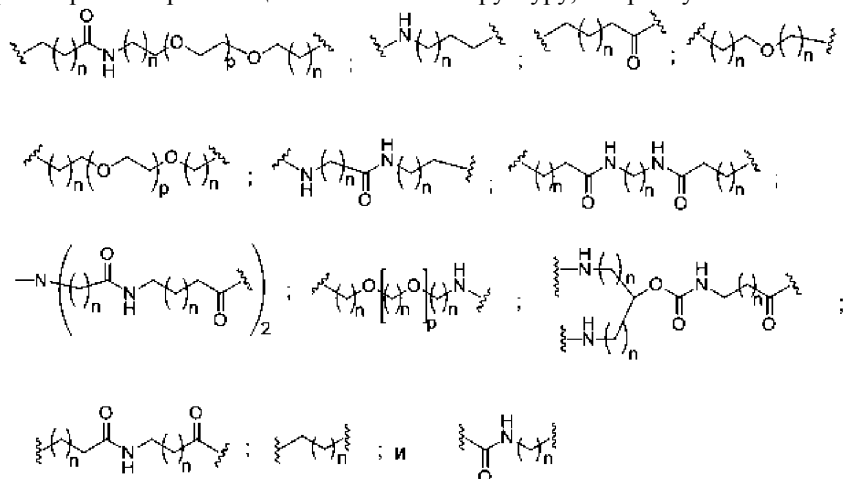
2. Некоторые связки.

В некоторых вариантах реализации группы конъюгата содержат одну или более связей, ковалентно присоединенных к группе ветвления. В некоторых вариантах реализации группы конъюгата содержат одну или более связей, ковалентно присоединенных к линкерной группе. В некоторых вариантах реализации каждая связка представляет собой линейную алифатическую группу, содержащую одну или более групп, выбранных из алкильных, простых эфирных, тиоэфирных, дисульфидных, амидных и полиэтиленгликолевых групп в любой комбинации. В некоторых вариантах реализации каждая связка представляет собой линейную алифатическую группу, содержащую одну или более групп, выбранных из алкильных, замещенных алкильных, простых эфирных, тиоэфирных, дисульфидных, амидных, фосфодиэфирных и полиэтиленгликолевых групп в любой комбинации. В некоторых вариантах реализации каждая связка представляет собой линейную алифатическую группу, содержащую одну или более групп, выбранных из алкильных, простых эфирных и амидных групп в любой комбинации. В некоторых вариантах реализации каждая связка представляет собой линейную алифатическую группу, содержащую одну или более групп, выбранных из алкильных, замещенных алкильных, фосфодиэфирных, простых эфирных и амидных групп в любой комбинации. В некоторых вариантах реализации каждая связка представляет собой линейную алифатическую группу, содержащую одну или более групп, выбранных из алкила и фосфодиэфира в любой комбинации. В некоторых вариантах реализации каждая связка содержит по меньшей мере одну фосфорную линкерную группу или нейтральную линкерную группу.

В некоторых вариантах реализации связка содержит одну или более расщепляемых связей. В некоторых вариантах реализации связка присоединена к группе ветвления либо через амидную, либо через простую эфирную группу. В некоторых вариантах реализации связка присоединена к группе ветвления через фосфодиэфирную группу. В некоторых вариантах реализации связка присоединена к группе ветвления через фосфорную линкерную группу или через нейтральную линкерную группу. В некоторых вариантах реализации связка присоединена к группе ветвления через простую эфирную группу. В некоторых вариантах реализации связка присоединена к лиганду либо через амидную, либо через простую эфирную группу. В некоторых вариантах реализации связка присоединена к лиганду через простую эфирную группу. В некоторых вариантах реализации связка присоединена к лиганду либо через амидную, либо через простую эфирную группу. В некоторых вариантах реализации связка присоединена к лиганду через простую эфирную группу.

В некоторых вариантах реализации каждая связка имеет длину от около 8 до около 20 атомов в цепи между лигандом и группой ветвления. В некоторых вариантах реализации каждая связка имеет длину от около 10 до около 18 атомов в цепи между лигандом и группой ветвления. В некоторых вариантах реализации каждая связка имеет длину около 13 атомов в цепи.

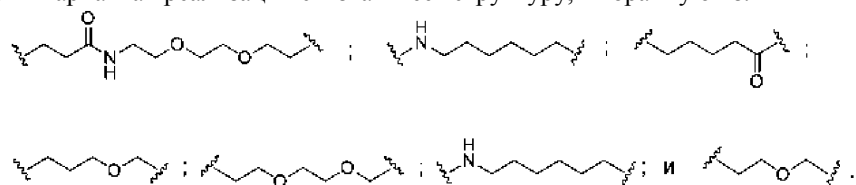
В некоторых вариантах реализации связка имеет структуру, выбранную из:



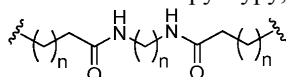
где каждый n независимо равен от 1 до 20; и

каждый p равен от 1 до около 6.

В некоторых вариантах реализации связка имеет структуру, выбранную из:

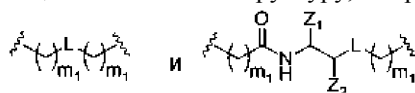


В некоторых вариантах реализации связка имеет структуру, выбранную из



где каждый n независимо равен от 1 до 20.

В некоторых вариантах реализации связка имеет структуру, выбранную из:



где L представляет собой либо фосфорную линкерную группу, либо нейтральную линкерную группу;

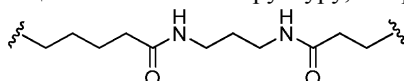
Z_1 представляет собой $C(=O)O-R_2$;

Z_2 представляет собой H , C_1-C_6 -алкил или замещенный C_1-C_6 -алкил;

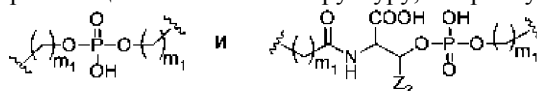
R_2 представляет собой H , C_1-C_6 -алкил или замещенный C_1-C_6 -алкил; и

каждый m_1 независимо равен от 0 до 20, при этом по меньшей мере один m_1 больше 0 для каждой связки.

В некоторых вариантах реализации связка имеет структуру, выбранную из:



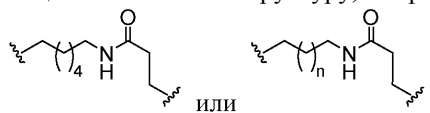
В некоторых вариантах реализации связка имеет структуру, выбранную из:



где Z_2 представляет собой H или CH_3 ; и

каждый m_1 независимо равен от 0 до 20, при этом по меньшей мере один m_1 больше 0 для каждой связки.

В некоторых вариантах реализации связка имеет структуру, выбранную из:



где каждый n независимо равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7.

В некоторых вариантах реализации связка содержит фосфорную линкерную группу. В некоторых вариантах реализации связка не содержит ни одной амидной связи. В некоторых вариантах реализации связка содержит фосфорную линкерную группу и не содержит ни одной амидной связи.

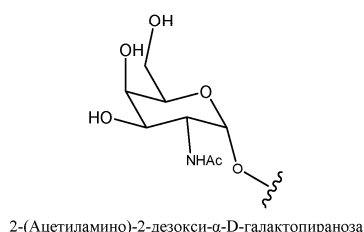
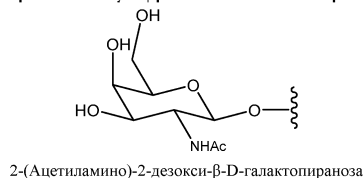
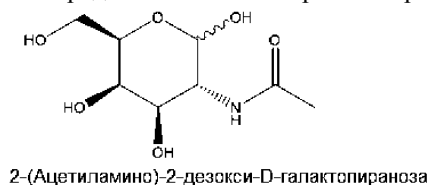
3. Некоторые лиганды.

В некоторых вариантах реализации настоящего описания представлены лиганды, при этом каждый лиганд ковалентно присоединен к связке. В некоторых вариантах реализации каждый лиганд выбран так, чтобы он обладал аффинностью по меньшей мере к одному типу рецептора на клетке-мишени. В некоторых вариантах реализации лиганды выбраны так, чтобы они обладали аффинностью по меньшей мере к одному типу рецептора на поверхности клетки печени млекопитающего. В некоторых вариантах реализации лиганды выбраны так, чтобы они обладали аффинностью к печеночному асиалогликопротеиновому рецептору (ASGP-R). В некоторых вариантах реализации каждый лиганд представляет собой углевод. В некоторых вариантах реализации каждый лиганд независимо выбран из галактозы, N-ацетилгалактозамина, маннозы, глюкозы, глюкозамина и фукозы. В некоторых вариантах реализации каждый лиганд представляет собой N-ацетилгалактозамин (GalNAc). В некоторых вариантах реализации нацеливающий фрагмент содержит 2-6 лигандов. В некоторых вариантах реализации нацеливающий фрагмент содержит 3 лиганда. В некоторых вариантах реализации нацеливающий фрагмент содержит 3 N-ацетилгалактозаминных лиганда.

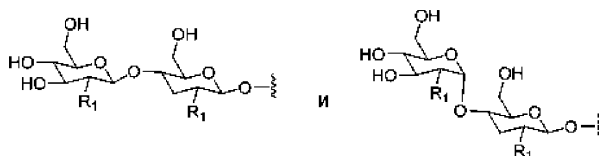
В некоторых вариантах реализации лиганд представляет собой углевод, углеводное производное, модифицированный углевод, поливалентный углеводный кластер, полисахарид, модифицированный полисахарид или полисахаридное производное. В некоторых вариантах реализации лиганд представляет собой аминоксахар или тиосахар. Например, аминоксахара могут быть выбраны из любого количества со-

единений, известных в данной области техники, например, глюкозамина, сиаловой кислоты, α-D-галактозамина, N-ацетилгалактозамина, 2-ацетида-2-дезоксид-D-галактопиранозы (GalNAc), 2-амино-3-O-[(R)-1-карбоксиэтил]-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозы (β-мурамовой кислоты), 2-дезоксид-2-метиламино-L-глюкопиранозы, 4,6-дидезокси-4-формаидо-2,3-ди-O-метил-D-маннопиранозы, 2-дезоксид-2-сульфоамино-D-глюкопиранозы и N-сульфо-D-глюкозамина, и N-гликолоил-α-нейраминовой кислоты. Например, тиосахара могут быть выбраны из группы, состоящей из 5-тио-β-D-глюкопиранозы, метил-2,3,4-три-O-ацетил-1-тио-6-O-третил-α-D-глюкопиранозид, 4-тио-β-D-галактопиранозы и этил-3,4,6,7-тетра-O-ацетил-2-дезоксид-1,5-дитио-α-D-glucos-гептопиранозид.

В некоторых вариантах реализации "GalNAc" или "Gal-NAc" относится к 2-(ацетиламино)-2-дезоксид-D-галактопиранозе, обычно упоминаемой в литературе как N-ацетилгалактозамин. В некоторых вариантах реализации "N-ацетилгалактозамин" относится к 2-(ацетиламино)-2-дезоксид-D-галактопиранозе. В некоторых вариантах реализации "GalNAc" или "Gal-NAc" относится к 2-(ацетиламино)-2-дезоксид-D-галактопиранозе. В некоторых вариантах реализации "GalNAc" или "Gal-NAc" относится к 2-(ацетиламино)-2-дезоксид-D-галактопиранозе, которая включает и β-форму: 2-(ацетиламино)-2-дезоксид-β-D-галактопиранозу, и α-форму: 2-(ацетиламино)-2-дезоксид-D-галактопиранозу. В некоторых вариантах реализации обе формы, β-форма: 2-(ацетиламино)-2-дезоксид-β-D-галактопираноза, и α-форма: 2-(ацетиламино)-2-дезоксид-D-галактопираноза, могут быть использованы взаимозаменяемо. Соответственно, в структурах, в которых изображена одна форма, подразумевается, что эти структуры включают также и другую форму. Например, если показана структура для α-формы: 2-(ацетиламино)-2-дезоксид-D-галактопиранозы, то подразумевается, что эта структура включает также и другую форму. В некоторых предпочтительных вариантах реализации β-форма 2-(ацетиламино)-2-дезоксид-D-галактопиранозы является предпочтительным вариантом реализации.

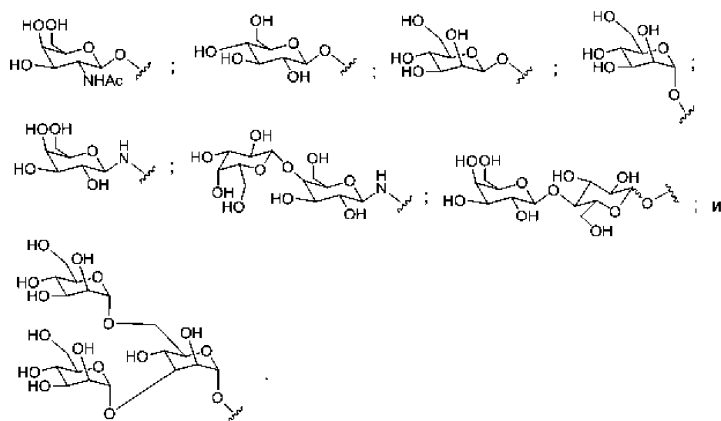


В некоторых вариантах один или более лигандов имеют структуру, выбранную из:

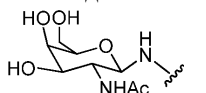


где каждый R_1 выбран из OH и NHCOOH.

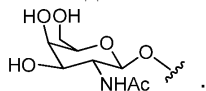
В некоторых вариантах один или более лигандов имеют структуру, выбранную из:



В некоторых вариантах один или более лигандов имеют структуру, выбранную из

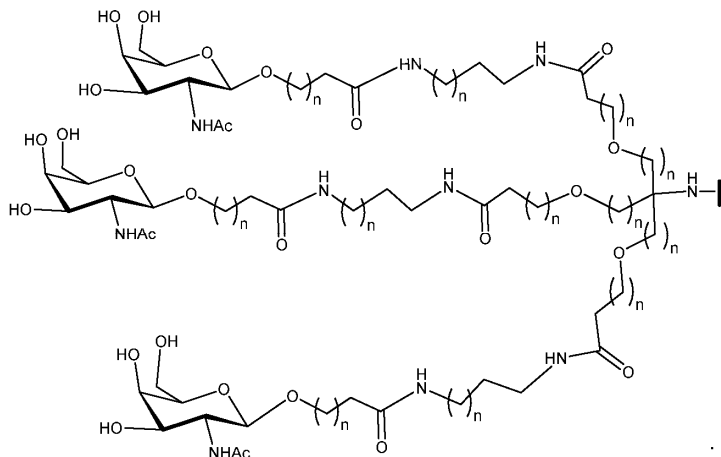


В некоторых вариантах один или более лигандов имеют структуру, выбранную из



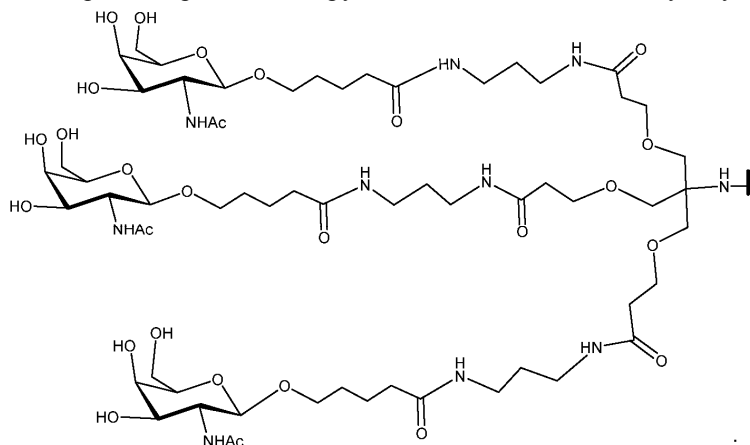
i. Некоторые конъюгаты.

В некоторых вариантах реализации группы конъюгата содержат структурные особенности, представленные выше. В некоторых таких вариантах реализации группы конъюгата имеют следующую структуру:

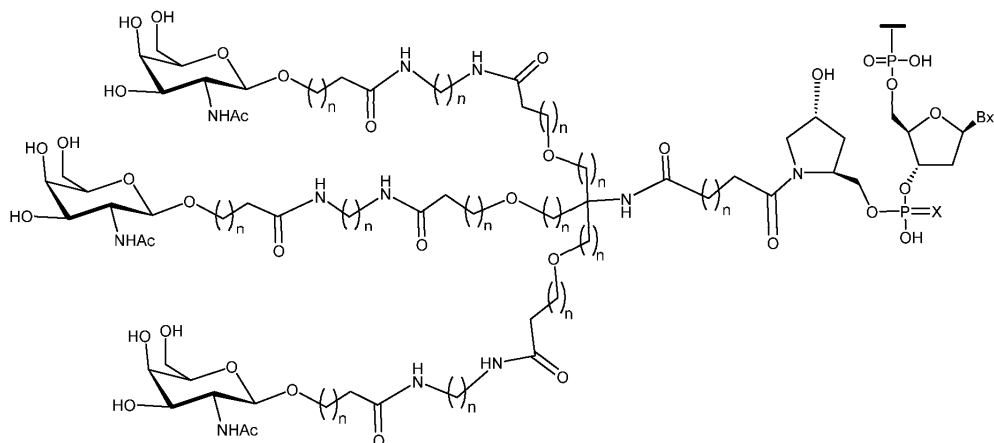


где каждый n независимо равен от 1 до 20.

В некоторых таких вариантах реализации группы конъюгата имеют следующую структуру:



В некоторых таких вариантах реализации группы конъюгата имеют следующую структуру:



где каждый n независимо равен от 1 до 20;

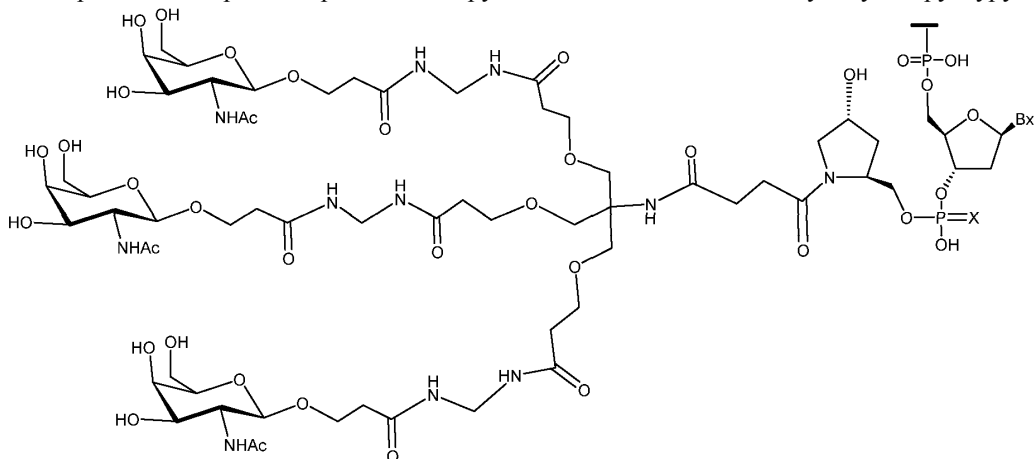
Z представляет собой H или связанную твердую подложку;

Q представляет собой антисмысловое соединение;

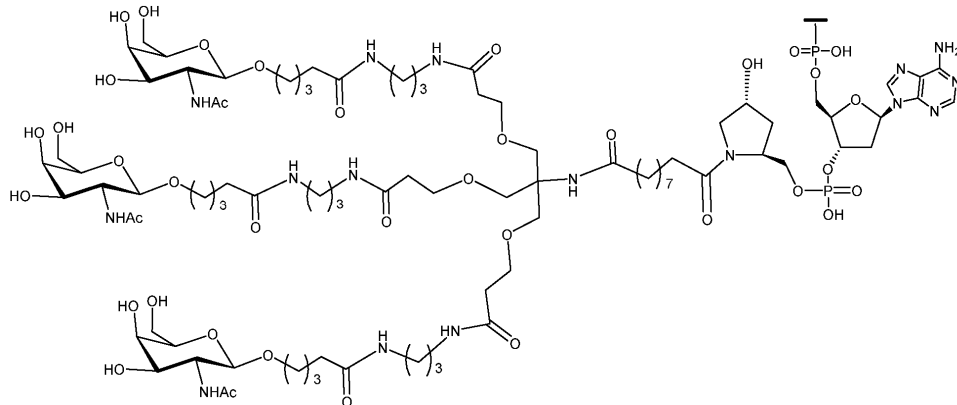
X представляет собой O или S ; и

Bx представляет собой фрагмент гетероциклического основания.

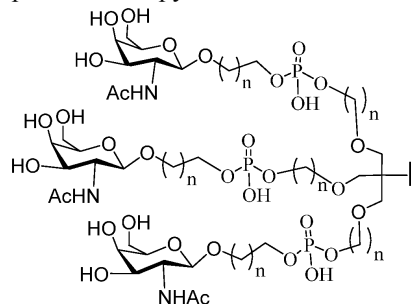
В некоторых таких вариантах реализации группы конъюгата имеют следующую структуру:



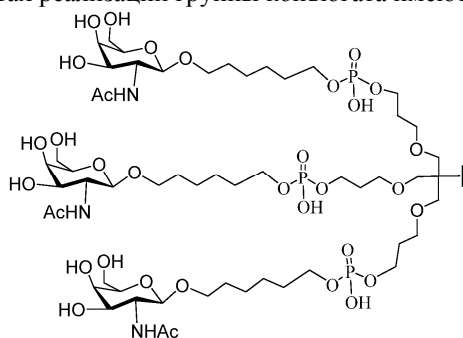
В некоторых таких вариантах реализации группы конъюгата имеют следующую структуру:



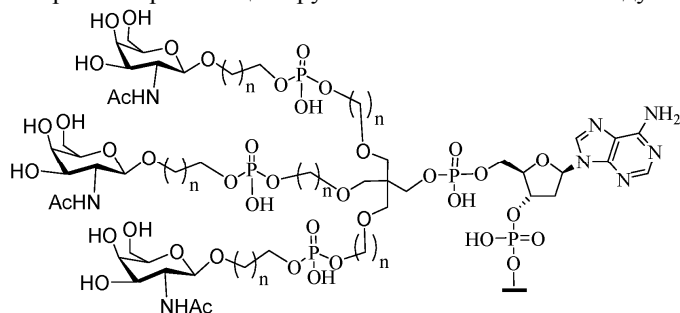
В некоторых таких вариантах реализации группы конъюгата имеют следующую структуру:



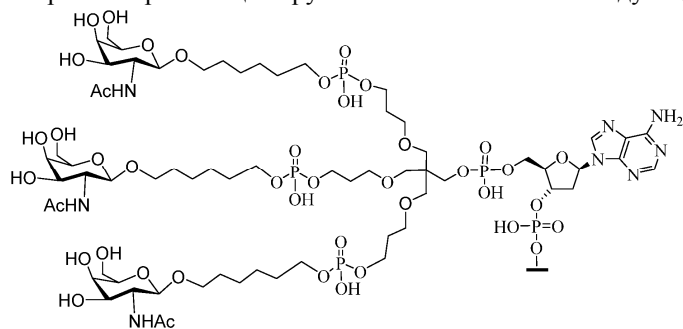
В некоторых таких вариантах реализации группы конъюгата имеют следующую структуру:



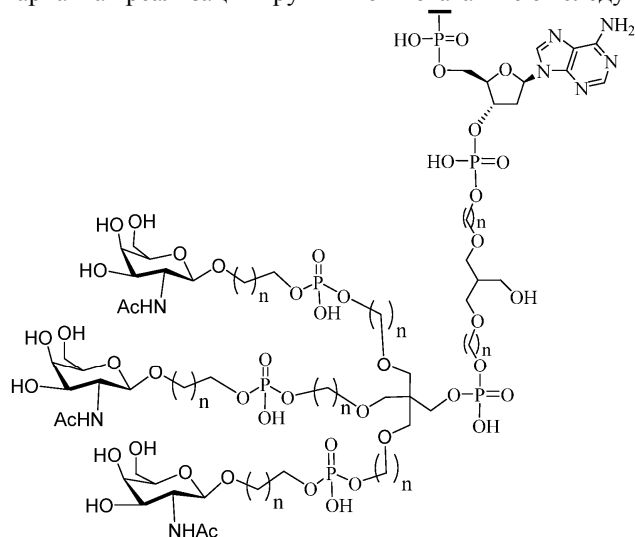
В некоторых таких вариантах реализации группы конъюгата имеют следующую структуру:



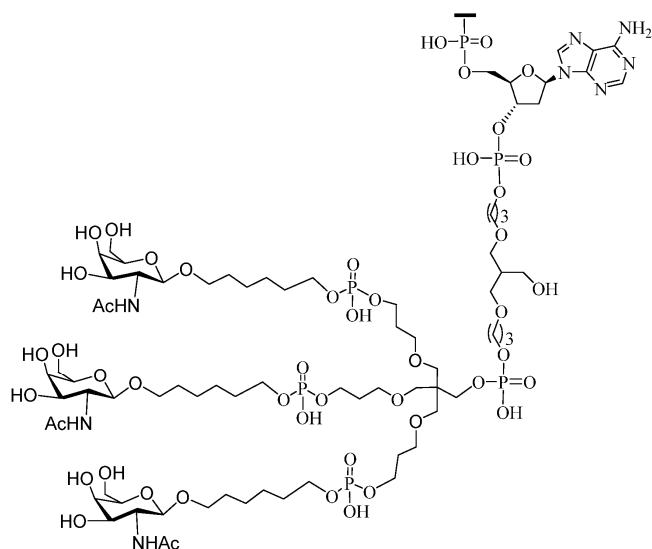
В некоторых таких вариантах реализации группы конъюгата имеют следующую структуру:



В некоторых таких вариантах реализации группы конъюгата имеют следующую структуру:

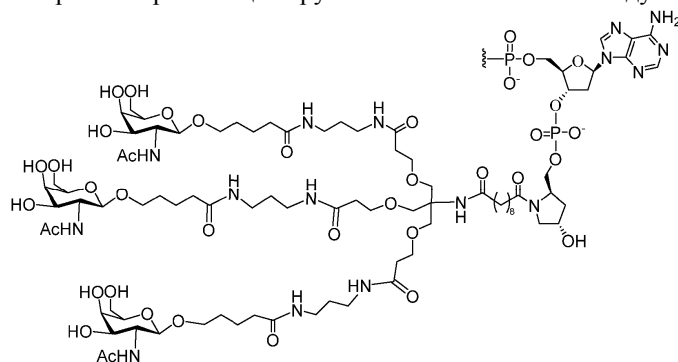


В некоторых таких вариантах реализации группы конъюгата имеют следующую структуру:

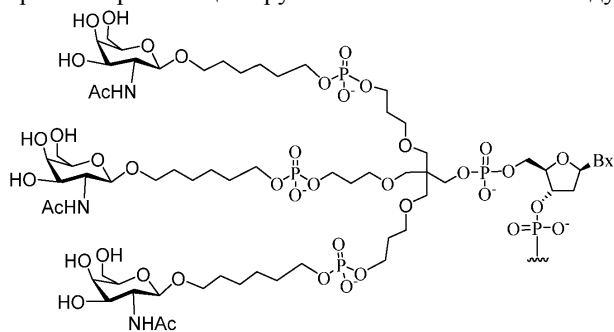


В некоторых вариантах реализации конъюгаты не содержат пирролидин.

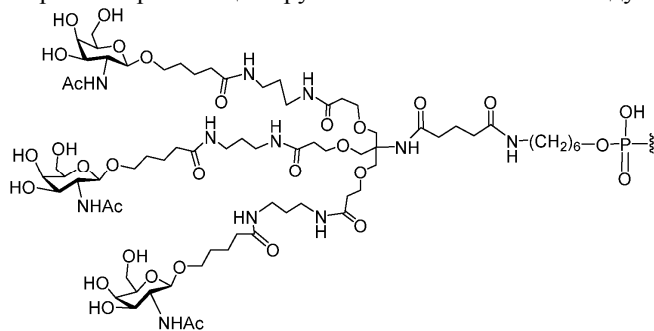
В некоторых таких вариантах реализации группы конъюгата имеют следующую структуру:



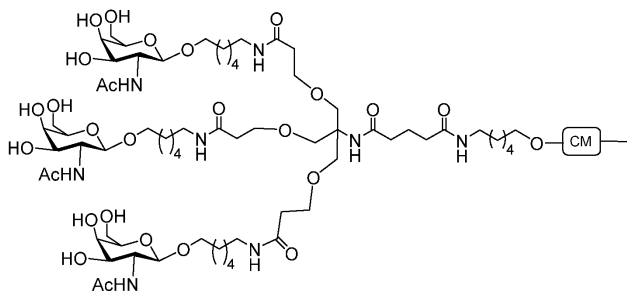
В некоторых таких вариантах реализации группы конъюгата имеют следующую структуру:



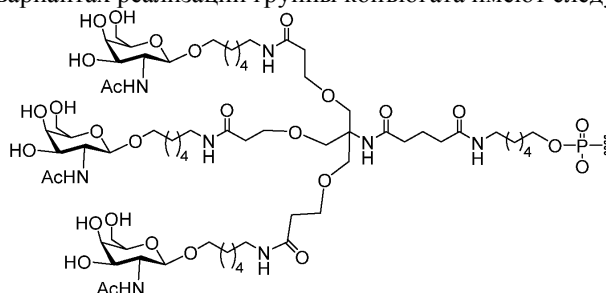
В некоторых таких вариантах реализации группы конъюгата имеют следующую структуру:



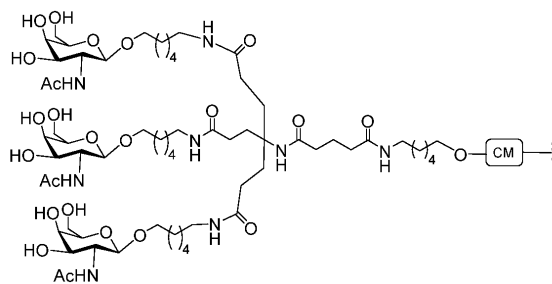
В некоторых таких вариантах реализации группы конъюгата имеют следующую структуру:



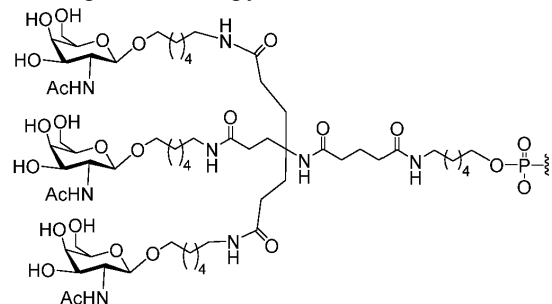
В некоторых таких вариантах реализации группы конъюгата имеют следующую структуру:



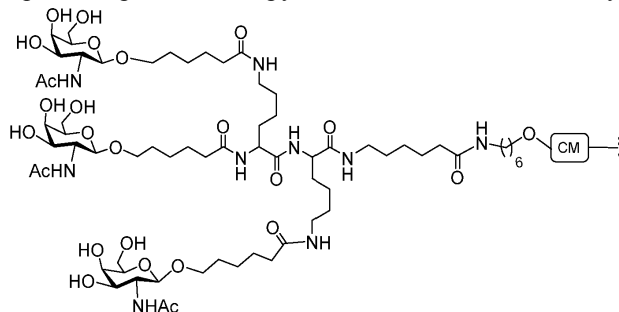
В некоторых таких вариантах реализации группы конъюгата имеют следующую структуру:



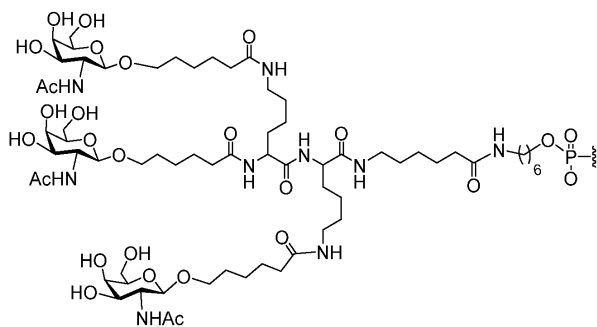
В некоторых таких вариантах реализации группы конъюгата имеют следующую структуру:



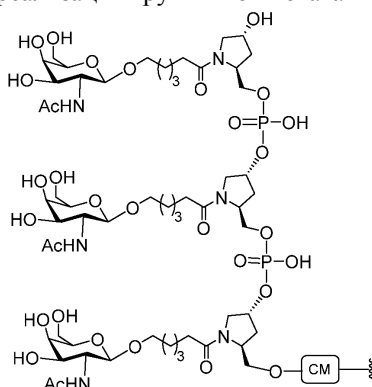
В некоторых таких вариантах реализации группы конъюгата имеют следующую структуру:



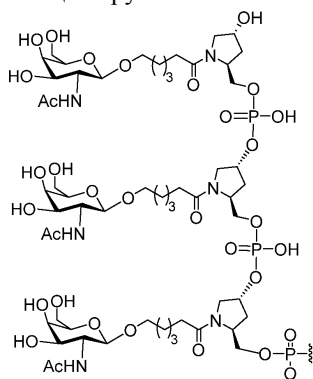
В некоторых таких вариантах реализации группы конъюгата имеют следующую структуру:



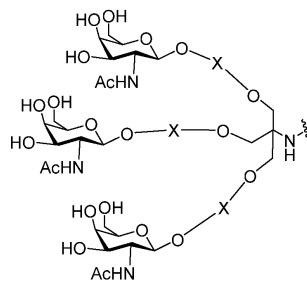
В некоторых таких вариантах реализации группы конъюгата имеют следующую структуру:



В некоторых таких вариантах реализации группы конъюгата имеют следующую структуру:

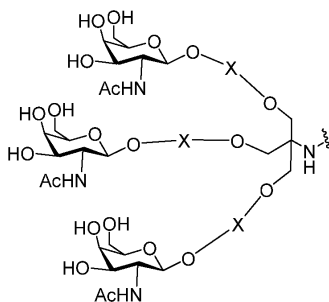


В некоторых вариантах реализации фрагмент группы конъюгата, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:



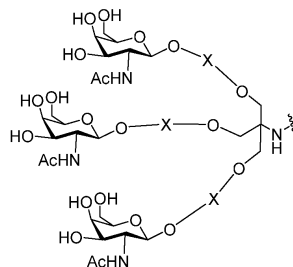
где X представляет собой замещенную или незамещенную связку из шести-одиннадцати последовательно связанных атомов.

В некоторых вариантах реализации фрагмент группы конъюгата, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:



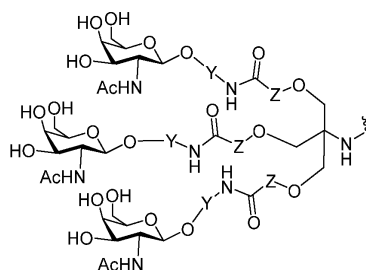
где X представляет собой замещенную или незамещенную связку из десяти последовательно связанных атомов.

В некоторых вариантах реализации фрагмент группы конъюгата, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:



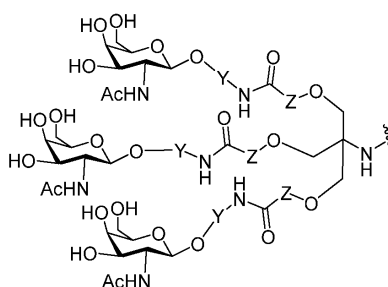
где X представляет собой замещенную или незамещенную связку из четырех-одиннадцати последовательно связанных атомов, и при этом указанная связка содержит только одну амидную связь.

В некоторых вариантах реализации фрагмент группы конъюгата, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:



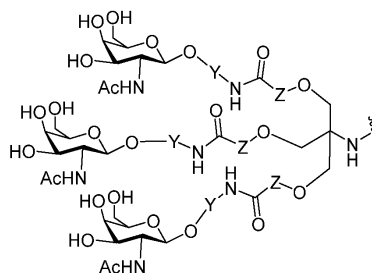
где Y и Z независимо выбраны из C₁-C₁₂-замещенной или незамещенной алкильной, алкенильной или алкинильной группы или группы, содержащей эфир, кетон, амид, сложный эфир, карбамат, амин, пиперидин, фосфат, фосфодиэфир, тиофосфат, триазол, пирролидин, дисульфид или тиоэфир.

В некоторых таких вариантах реализации фрагмент группы конъюгата, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:



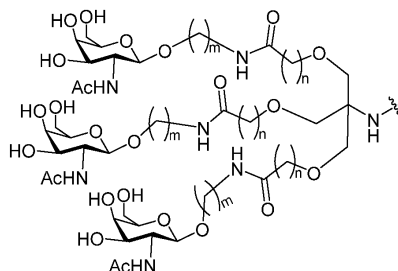
где Y и Z независимо выбраны из C₁-C₁₂-замещенной или незамещенной алкильной группы или группы, содержащей только один эфир или только два эфира, амид, амин, пиперидин, фосфат, фосфодиэфир или тиофосфат.

В некоторых таких вариантах реализации фрагмент группы конъюгата, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:



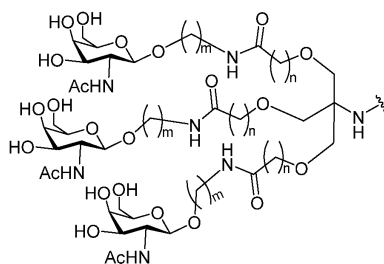
где Y и Z независимо выбраны из C_1 - C_{12} -замещенной или незамещенной алкильной группы.

В некоторых таких вариантах реализации фрагмент группы конъюгата, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:



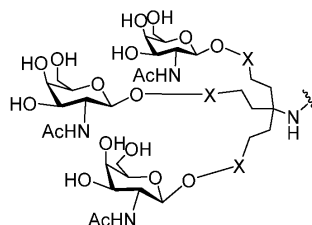
где m и n независимо выбраны из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12.

В некоторых таких вариантах реализации фрагмент группы конъюгата, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:

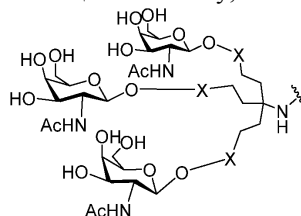


где m равен 4, 5, 6, 7 или 8, и n равен 1, 2, 3 или 4.

В некоторых вариантах реализации фрагмент группы конъюгата, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:

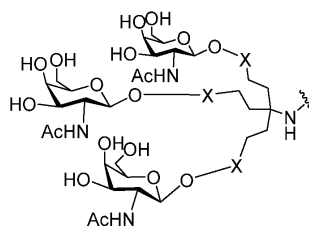


где X представляет собой замещенную или незамещенную связку из четырех-тринадцати последовательно связанных атомов, и при этом X не содержит эфирную группу. В некоторых вариантах реализации фрагмент группы конъюгата, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:



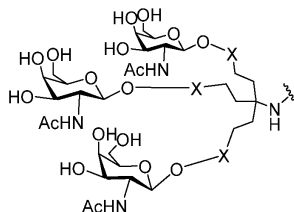
где X представляет собой замещенную или незамещенную связку из восьми последовательно связанных атомов, и при этом X не содержит эфирную группу.

В некоторых вариантах реализации фрагмент группы конъюгата, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:



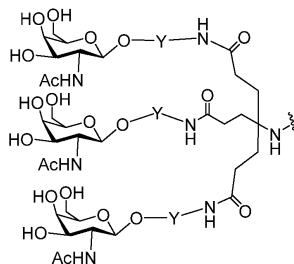
где X представляет собой замещенную или незамещенную связку из четырех-тринадцати последовательно связанных атомов, и при этом указанная связка содержит только одну амидную связь, а X не содержит эфирную группу.

В некоторых вариантах реализации фрагмент группы конъюгата, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:



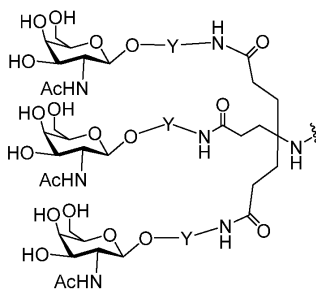
где X представляет собой замещенную или незамещенную связку из четырех-тринадцати последовательно связанных атомов, и при этом указанная связка состоит из амидной связи и замещенной или незамещенной C_2 - C_{11} -алкильной группы.

В некоторых вариантах реализации фрагмент группы конъюгата, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:

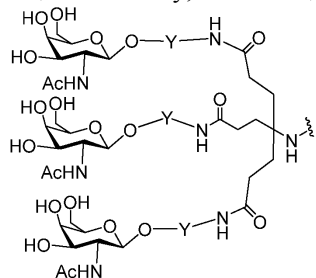


где Y выбран из C_1 - C_{12} -замещенной или незамещенной алкильной, алкенильной или алкинильной группы или группы, содержащей эфир, кетон, амид, сложный эфир, карбамат, амин, пиперидин, фосфат, фосфодиэфир, тиофосфат, триазол, пирролидин, дисульфид или тиоэфир.

В некоторых таких вариантах реализации фрагмент группы конъюгата, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:



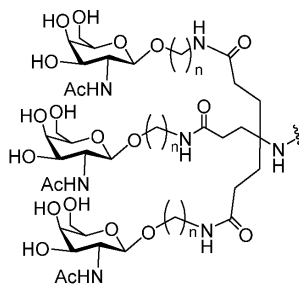
где Y выбран из C_1 - C_{12} -замещенной или незамещенной алкильной группы или группы, содержащей эфир, амин, пиперидин, фосфат, фосфодиэфир или тиофосфат. В некоторых таких вариантах реализации фрагмент группы конъюгата, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:



где Y выбран из C_1 - C_{12} -замещенной или незамещенной алкильной группы.

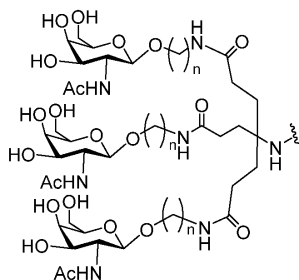
В некоторых таких вариантах реализации фрагмент группы конъюгата, нацеливающий на клетку,

имеет следующую структуру:



где n равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12.

В некоторых таких вариантах реализации фрагмент группы конъюгата, нацеливающий на клетку, имеет следующую структуру:

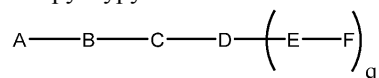


где n равен 4, 5, 6, 7 или 8.

В некоторых вариантах реализации конъюгаты не содержат пирролидин.

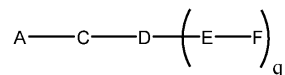
Некоторые сопряженные антисмысловые соединения.

В некоторых вариантах реализации конъюгаты связаны с нуклеозидом антисмыслового олигонуклеотида в 2', 3' или 5' положении нуклеозида. В некоторых вариантах реализации сопряженное антисмысловое соединение имеет следующую структуру:



где A представляет собой антисмысловый олигонуклеотид; B представляет собой расщепляемый фрагмент C представляет собой линкер конъюгата D представляет собой группу ветвления каждый E представляет собой связку; каждый F представляет собой лиганд; и q представляет собой целое число от 1 до 5.

В некоторых вариантах реализации сопряженное антисмысловое соединение имеет следующую структуру:



где A представляет собой антисмысловый олигонуклеотид;

C представляет собой линкер конъюгата;

D представляет собой группу ветвления;

каждый E представляет собой связку;

каждый F представляет собой лиганд; и

q представляет собой целое число от 1 до 5.

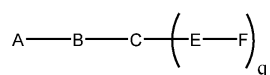
В некоторых таких вариантах реализации линкер конъюгата содержит по меньшей мере одну расщепляемую связь.

В некоторых таких вариантах реализации группа ветвления содержит по меньшей мере одну расщепляемую связь.

В некоторых вариантах реализации каждая связка содержит по меньшей мере одну расщепляемую связь.

В некоторых вариантах реализации конъюгаты связаны с нуклеозидом антисмыслового олигонуклеотида в 2', 3' или 5' положении нуклеозида.

В некоторых вариантах реализации сопряженное антисмысловое соединение имеет следующую структуру:



где A представляет собой антисмысловый олигонуклеотид;

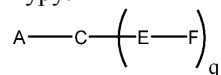
B представляет собой расщепляемый фрагмент;

C представляет собой линкер конъюгата;

каждый E представляет собой связку;

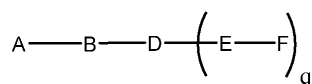
каждый F представляет собой лиганд; и
q представляет собой целое число от 1 до 5.

В некоторых вариантах реализации конъюгаты связаны с нуклеозидом антисмыслового олигонуклеотида в 2', 3' или 5' положении нуклеозида. В некоторых вариантах реализации сопряженное антисмысловое соединение имеет следующую структуру:



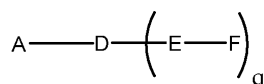
где A представляет собой антисмысловый олигонуклеотид;
C представляет собой линкер конъюгата;
каждый E представляет собой связку;
каждый F представляет собой лиганд; и
q представляет собой целое число от 1 до 5.

В некоторых вариантах реализации сопряженное антисмысловое соединение имеет следующую структуру:



где A представляет собой антисмысловый олигонуклеотид;
B представляет собой расщепляемый фрагмент;
D представляет собой группу ветвления;
каждый E представляет собой связку;
каждый F представляет собой лиганд; и
q представляет собой целое число от 1 до 5.

В некоторых вариантах реализации сопряженное антисмысловое соединение имеет следующую структуру:

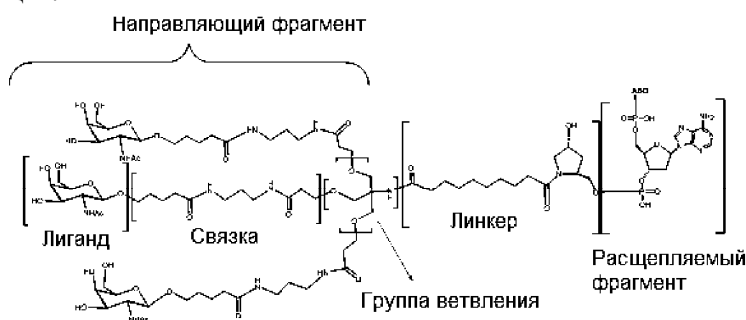


где A представляет собой антисмысловый олигонуклеотид;
D представляет собой группу ветвления;
каждый E представляет собой связку;
каждый F представляет собой лиганд; и
q представляет собой целое число от 1 до 5.

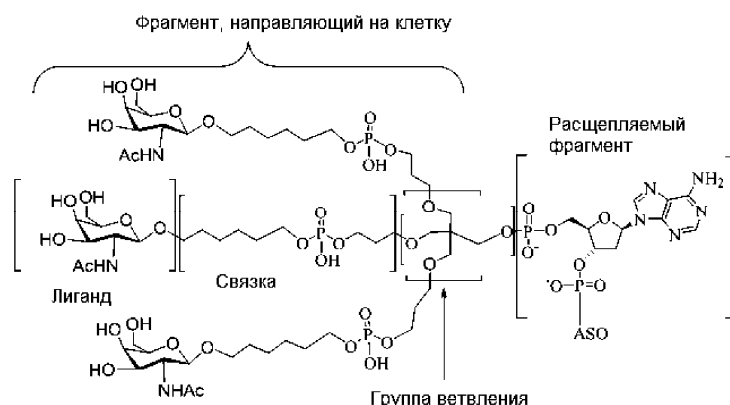
В некоторых таких вариантах реализации линкер конъюгата содержит по меньшей мере одну расщепляемую связь.

В некоторых вариантах реализации каждая связка содержит по меньшей мере одну расщепляемую связь.

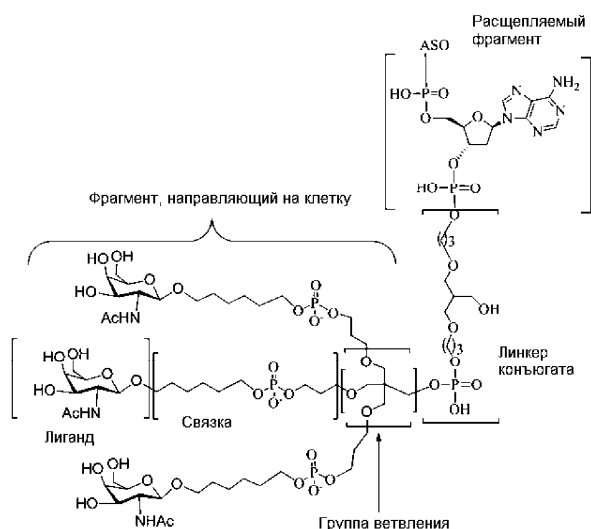
В некоторых вариантах реализации сопряженное антисмысловое соединение имеет структуру, выбранную из следующих:



В некоторых вариантах реализации сопряженное антисмысловое соединение имеет структуру, выбранную из следующих:



В некоторых вариантах реализации сопряженное антисмысловое соединение имеет структуру, выbranную из следующих:



Иллюстративные патенты Соединенных штатов Америки, публикации патентных заявок Соединенных штатов Америки и публикации международных патентных заявок, в которых описано получение некоторых из указанных выше конъюгатов, сопряженных антисмысловых соединений, связей, линкеров, групп ветвления, лигандов, расщепляемых фрагментов, а также других модификаций, включают, без ограничения, US 5994517, US 6300319, US 6660720, US 6906182, US 7262177, US 7491805, US 8106022, US 7723509, US 2006/0148740, US 2011/0123520, WO 2013/033230 и WO 2012/037254, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Иллюстративные публикации, в которых описано получение некоторых из указанных выше конъюгатов, сопряженных антисмысловых соединений, связей, линкеров, групп ветвления, лигандов, расщепляемых фрагментов, а также других модификаций, включают, без ограничения, BIESSEN et al., "The Cholesterol Derivative of a Triantennary Galactoside with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor: a Potent Cholesterol Lowering Agent" J. Med. Chem. (1995) 38:1846-1852, BIESSEN et al., "Synthesis of Cluster Galactosides with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" J. Med. Chem. (1995) 38:1538-1546, LEE et al., "New and more efficient multivalent glyco-ligands for asialoglycoprotein receptor of mammalian hepatocytes" Bioorganic & Medicinal Chemistry (2011) 19:2494-2500, RENSEN et al., "Determination of the Upper Size Limit for Uptake and Processing of Ligands by the Asialoglycoprotein Receptor on Hepatocytes in Vitro and in Vivo" J. Biol. Chem. (2001) 276(40):37577-37584, RENSEN et al., "Design and Synthesis of Novel N-Acetylglucosamine-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoproteins to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" J. Med. Chem. (2004) 47:5798-5808, SLIEDREGT et al., "Design and Synthesis of Novel Amphiphilic Dendritic Galactosides for Selective Targeting of Liposomes to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" J. Med. Chem. (1999) 42:609-618, и Valentijn et al., "Solid-phase synthesis of lysine-based cluster galactosides with high affinity for the Asialoglycoprotein Receptor" Tetrahedron, 1997, 53(2), 759-770, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах реализации сопряженные антисмысловые соединения содержат олигонуклеотид на основе РНКазы H (такой как гэпмер) или сплайс-модулирующий олигонуклеотид (такой как полностью модифицированный олигонуклеотид) и любую группу конъюгата, содержащую по меньшей мере одну, две или три группы GalNAc. В некоторых вариантах реализации сопряженное антисмысловое соединение содержит любую группу конъюгата, описанную в любой из следующих ссылок: Lee, Carbohydr Res, 1978, 67, 509-514; Connolly et al., J Biol Chem, 1982, 257, 939-945; Pavia et al., Int J Pep Protein

Res, 1983, 22, 539-548; Lee et al., Biochem, 1984, 23, 4255-4261; Lee et al., Glycoconjugate J, 1987, 4, 317-328; Toyokuni et al., Tetrahedron Lett., 1990, 31, 2673-2676; Biessen et al., J Med Chem, 1995, 38, 1538-1546; Valentijn et al., Tetrahedron, 1997, 53, 759-770; Kim et al., Tetrahedron Lett., 1997, 38, 3487-3490; Lee et al., Bioconjug Chem, 1997, 8, 762-765; Kato et al., Glycobiol, 2001, 11, 821-829; Rensen et al., J Biol Chem, 2001, 276, 37577-37584; Lee et al., Methods Enzymol, 2003, 362, 38-43; Westerlind et al., Glycoconj J, 2004, 21, 227-241; Lee et al., Bioorg Med Chem Lett., 2006, 16(19), 5132-5135; Maierhofer et al., BioorgMedChem, 2007, 15, 7661-7676; Khorev et al., Bioorg Med Chem, 2008, 16, 5216-5231; Lee et al., Bioorg Med Chem, 2011, 19, 2494-2500; Kornilova et al., Analyt Biochem, 2012, 425, 43-46; Pujol et al., Angew Chemie Int Ed Engl, 2012, 51, 7445-7448; Biessen et al., J Med Chem, 1995, 38, 1846-1852; Slidregt et al., J Med Chem, 1999, 42, 609-618; Rensen et al., J Med Chem, 2004, 47, 5798-5808; Rensen et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26, 169-175; van Rossenberg et al., Gene Ther, 2004, 11, 457-464; Sato et al., J Am Chem Soc, 2004, 126, 14013-14022; Lee et al., J Org Chem, 2012, 77, 7564-7571; Biessen et al., FASEB J, 2000, 14, 1784-1792; Rajur et al., Bioconjug Chem, 1997, 8, 935-940; Duff et al., Methods Enzymol, 2000, 313, 297-321; Maier et al., Bioconjug Chem, 2003, 14, 18-29; Jayaprakash et al., Org Lett., 2010, 12, 5410-5413; Manoharan, Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 2002, 12, 103-128; Merwin et al., Bioconjug Chem, 1994, 5, 612-620; Tomiya et al., Bioorg Med Chem, 2013, 21, 5275-5281; в международных заявках WO1998/013381; WO 2011/038356; WO1997/046098; WO 2008/098788; WO 2004/101619; WO 2012/037254; WO 2011/120053; WO 2011/100131; WO 2011/163121; WO 2012/177947; WO 2013/033230; WO 2013/075035; WO 2012/083185; WO 2012/083046; WO 2009/082607; WO 2009/134487; WO 2010/144740; WO 2010/148013; WO1997/020563; WO 2010/088537; WO 2002/043771; WO 2010/129709; WO 2012/068187; WO 2009/126933; WO 2004/024757; WO 2010/054406; WO 2012/089352; WO 2012/089602; WO 2013/166121; WO 2013/165816; в патентах США 4751219; 8552163; 6908903; 7262177; 5994517; 6300319; 8106022; 7491805; 7491805; 7582744; 8137695; 6383812; 6525031; 6660720; 7723509; 8541548; 8344125; 8313772; 8349308; 8450467; 8501930; 8158601; 7262177; 6906182; 6620916; 8435491; 8404862; 7851615; в опубликованных заявках на патент США US2011/0097264; US2011/0097265; US2013/0004427; US2005/0164235; US2006/0148740; US2008/0281044; US2010/0240730; US2003/0119724; US2006/0183886; US2008/0206869; US2011/0269814; US2009/0286973; US2011/0207799; US2012/0136042; US2012/0165393; US2008/0281041; US2009/0203135; US2012/0035115; US2012/0095075; US2012/0101148; US2012/0128760; US2012/0157509; US2012/0230938; US2013/0109817; US2013/0121954; US2013/0178512; US2013/0236968; US2011/0123520; US2003/0077829; US2008/0108801; и US2009/0203132; полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Тестирование антисмысловых олигонуклеотидов *in vitro*.

Описываемые в настоящем документе способы лечения клеток с помощью антисмысловых олигонуклеотидов могут быть изменены соответствующим образом для лечения другими антисмысловыми соединениями.

Клетки могут быть обработаны антисмысловыми олигонуклеотидами при 60-80% уровне конфлюентности в культуре.

Реагент, используемый для введения антисмысловых олигонуклеотидов в культивируемые клетки, включает катионный липидный трансфекционный реагент Липофектин (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния). Антисмысловые олигонуклеотиды могут быть смешаны с Липофектином в OPTI-MEM 1 (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния) для достижения желаемой конечной концентрации антисмысловых олигонуклеотидов и концентрации Липофектина в пределах от 2 до 12 мкг/мл при 100 нМ антисмыслового олигонуклеотида.

Другой реагент, используемый для введения антисмысловых олигонуклеотидов в культивируемые клетки, включает Липофектамин (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния). Антисмысловый олигонуклеотид смешивают с Липофектамином в среде OPTI-MEM 1 со сниженным содержанием сыворотки (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния) для достижения желаемой концентрации антисмысловых олигонуклеотидов и концентрации Липофектамина в пределах от 2 до 12 мкг/мл при 100 нМ антисмыслового олигонуклеотида.

Еще одна методика, используемая для введения антисмысловых олигонуклеотидов в культивируемые клетки, включает электропорацию.

Другая методика, используемая для введения антисмысловых олигонуклеотидов в культивируемые клетки, включает свободный захват олигонуклеотидов клетками.

Клетки обрабатывают антисмысловыми олигонуклеотидами с помощью стандартных способов. Клетки могут быть отобраны через 16-24 ч после обработки антисмысловым олигонуклеотидом, после чего уровни РНК или белков нуклеиновых кислот-мишеней измеряют методами, известными в данной области техники и описанными в настоящем документе. Как правило, если обработку проводят в нескольких повторениях, данные представляются как среднее значение для многократных обработок.

Концентрация используемого антисмыслового олигонуклеотида варьируется в зависимости от линии клеток. Способы определения оптимальной концентрации антисмыслового олигонуклеотида для конкретной линии клеток хорошо известны в данной области техники. Антисмысловые олигонуклеотиды обычно используют в концентрациях от 1 до 300 нМ, при трансфекции с использованием Липофек-

тамина. Антисмысловые олигонуклеотиды используют в более высоких концентрациях в диапазоне от 625 до 20000 нМ при трансфекции с использованием электропорации.

Изоляция РНК.

Анализ РНК может быть проведен на общей клеточной РНК или поли(А)+ мРНК. Способы изоляции РНК хорошо известны в данной области техники. РНК получают с использованием способов, хорошо известных в данной области техники, например, с использованием реагента Тризол (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния) по рекомендуемым протоколам производителя.

Некоторые показания.

Некоторые варианты реализации, предложенные в настоящем документе, относятся к способам лечения, предупреждения или облегчения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, у субъекта посредством введения специфического ингибитора CFB, такого как антисмысловое соединение, направленное на CFB.

Примеры почечных заболеваний, связанных с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, которые можно лечить, предупреждать и/или облегчать по способам, предложенным в настоящем документе, включают С3 гломерулопатию, атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS), болезнь плотного осадка (DDD; также известную как MPGN типа II или C3Neph) и CFHR5 нефропатию.

Дополнительные почечные заболевания, связанные с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, которые можно лечить, предупреждать и/или облегчать по способам, предложенным в настоящем документе, включают IgA нефропатию; мезангиокапиллярный (мембранопролиферативный) гломерулонефрит (MPGN); аутоиммунные расстройства, включая волчаночный нефрит и системную красную волчанку (SLE); инфекционный гломерулонефрит (также известный как постинфекционный гломерулонефрит) и ишемически-реперфузионное повреждение почек, например, ишемически-реперфузионное повреждение почек после пересадки органа.

Примеры внепочечных расстройств, связанных с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, которые можно лечить и/или предупреждать по способам, предложенным в настоящем документе, включают глазные заболевания, такие как дегенерация желтого пятна, например, возрастная дегенерация желтого пятна (AMD), включая влажную AMD и сухую AMD, такую как географическая атрофия; нейрмиелит зрительного нерва; болезнь роговицы, такую как воспаление роговицы; аутоиммунные увеиты; и диабетическую ретинопатию. Описано, что система комплемента участвует в глазных заболеваниях. Jha P, et al., *Mol Immunol* (2007) 44(16): 3901-3908. Дополнительные примеры внепочечных расстройств, связанных с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, которые можно лечить и/или предупреждать по способам, предложенным в настоящем документе, включают ANCA-связанные васкулиты, антифосфолипидный синдром (также известный как синдром антифосфолипидных антител (APS)), астму, ревматоидный артрит, миастению гравис и рассеянный склероз.

Некоторые варианты реализации, предложенные в настоящем документе, относятся к способам лечения, предупреждения или облегчения почечного заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, у субъекта посредством введения специфического ингибитора CFB, такого как антисмысловое соединение, направленное на CFB. В некоторых аспектах почечное заболевание представляет собой волчаночный нефрит, системную красную волчанку (SLE), болезнь плотного осадка (DDD), С3 гломерулонефрит (С3GN), CFHR5 нефропатию или атипичный гемолитико-уремический синдром), или любую их комбинацию.

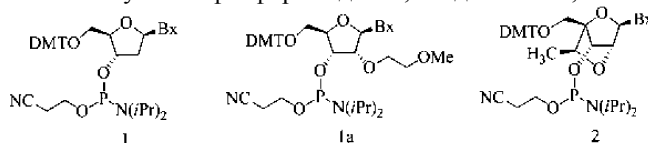
Некоторые варианты реализации, предложенные в настоящем документе, относятся к способам лечения, предупреждения или облегчения дегенерации желтого пятна, такой как возрастная дегенерация желтого пятна (AMD), у субъекта посредством введения специфического ингибитора CFB, такого как антисмысловое соединение, направленное на CFB. В некоторых аспектах AMD представляет собой влажную AMD или сухую AMD. В некоторых аспектах сухая AMD может представлять собой географическую атрофию. В исследованиях показана связь дисрегуляции альтернативного пути комплемента с AMD. Компоненты комплемента представляют собой обычные составляющие глазной друзы, внеклеточного материала, который накапливается в желтом пятне пациентов с AMD. Кроме того, было описано, что CFH и CFB варианты составляют около 75% случаев AMD в Северной Европе и Северной Америке. <skj также обнаружено, что специфический полиморфизм CFB обеспечивает защиту от AMD. Patel, N. et al., *Eye* (2008) 22(6):768-76. Кроме того, гомозиготные по нулевому CFB мыши обладают более низкой активностью пути комплемента, демонстрируют более слабые глазные повреждения и хориоидальную неоваскуляризацию (CNV) после лазерной фотокоагуляции. Rohrer, B. et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2009) 50(7):3056-64. Кроме того, лечение с применением мРНК CFB защищает мышей от CNV, индуцированной лазером. Bora, NS et al., *J Immunol.* (2006) 177(3): 1872-8. В исследованиях показано также, что почки и глаза имеют общие пути развития и структурные особенности, включая состав промотора коллагена базальной мембраны IV и васкуляриность. Savige et al., *J Am Soc Nephrol.* (2011) 22(8): 1403-15. Существуют данные, что путь комплемента участвует в почечных и глазных заболеваниях. Например, наследственный дефицит регуляторного белка системы комплемента вызывает предрасположенность к атипичному гемолитико-уремическому синдрому и AMD. Richards A et al., *Adv Immunol.* (2007) 96:141-77. Кроме того, хроническая болезнь почек связана с AMD. Nitsch, D. et al., *Ophthalmic Epidemiol.* (2009)

16(3): 181-6; Choi, J. et al., *Ophthalmic Epidemiol.* (2011) 18(6):259-63. Болезнь плотного осадка (DDD), заболевание почек, связанное с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, характеризуется острым нефритическим синдромом и глазными друзами. Cruz and Smith, *GeneReviews* (2007) Jul 20. Кроме того, мыши, несущие генетическую делецию компонента альтернативного пути комплемента, одновременно демонстрируют фенотипы почечной и глазной болезни. Описано, что у гомозиготных по нулевому CFH мышей развивается DDD и присутствуют патологии сетчатки, а также зрительная дисфункция. Pickering et al., *Nat Genet.* (2002) 31(4):424-8. Мышиные модели почечных заболеваний, связанных с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, также являются общепринятыми моделями AMD. Penesi ME et al., *Mol Aspects Med* (2012) 33:487-509. Нулевые по CFH мыши, например, представляют собой общепринятую модель почечных заболеваний, таких как DDD, и AMD. Кроме того, описано, что AMD связана с системным источником факторов комплемента, которые локально накапливаются в глазах, приводя в действие альтернативный путь активации комплемента. Loyet et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2012) 53(10):6628-37.

Примеры

Следующие примеры иллюстрируют некоторые варианты реализации настоящего описания и не являются ограничивающими. Более того, если представлены конкретные варианты реализации, авторы изобретения подразумевают общее применение указанных конкретных вариантов реализации. Например, описание олигонуклеотида, содержащего конкретный мотив, дает обоснованное основание для дополнительных олигонуклеотидов, содержащих такой же или похожий мотив. И, например, если конкретная высокоаффинная модификация возникает в определенном положении, то в этом же положении считаются подходящими другие высокоаффинные модификации, если не указано иное.

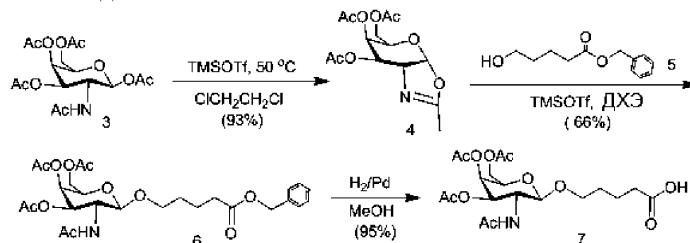
Пример 1. Общий способ получения фосфорамидитов, соединений 1, 1a и 2



Bx представляет собой
гетероциклическое основание;

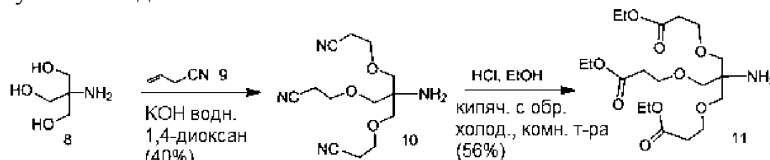
Соединения 1, 1a и 2 были получены по способам, общеизвестным в данной области техники, как описано в настоящем документе (см. Seth et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, 21(4), 1122-1125, *J. Org. Chem.*, 2010, 75(5), 1569-1581, *Nucleic Acids Symposium Series*, 2008, 52(1), 553-554); и см. также опубликованные Международные заявки PCT (WO 2011/115818, WO 2010/077578, WO 2010/036698, WO 2009/143369, WO 2009/006478 и WO 2007/090071) и патент США 7569686).

Пример 2. Получение соединения 7



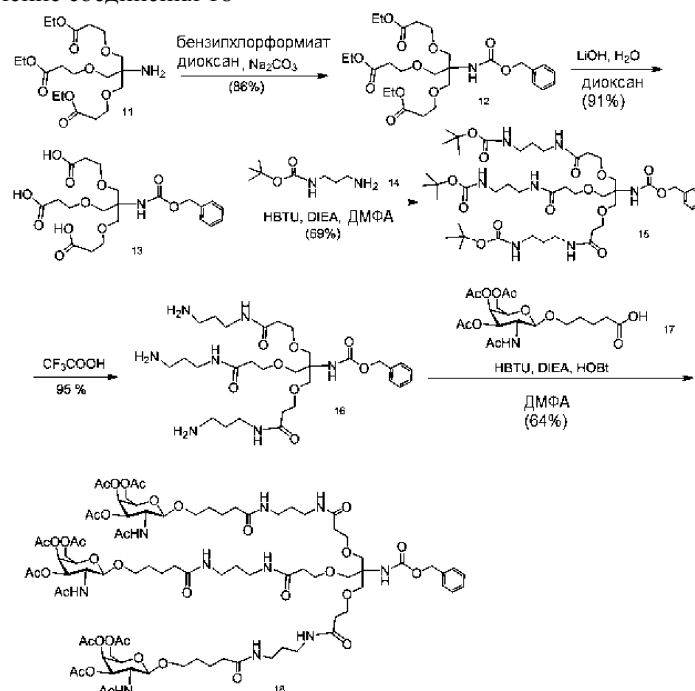
Соединение 3 (2-ацетида-1,3,4,6-тетра-О-ацетил-2-дезокс-β-D-галактопираноза или галактозамин пентаацетат) имеется в продаже. Соединение 5 получили по опубликованным методикам (Weber et al., *J. Med. Chem.*, 1991, 34, 2692).

Пример 3. Получение соединения 11



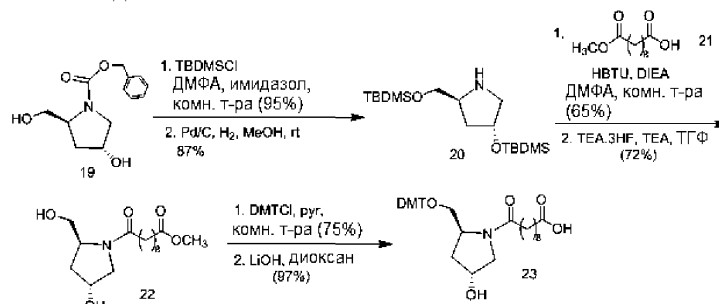
Соединения 8 и 9 имеются в продаже.

Пример 4. Получение соединения 18



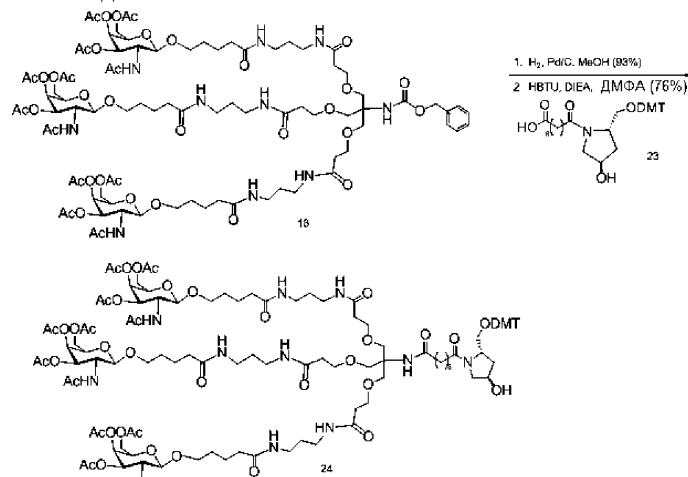
Соединение 11 получили по способам, описанным в примере 3. Соединение 14 имеется в продаже. Соединение 17 получили по такому же способу, как описан в публикации Rensen et al., J. Med. Chem., 2004, 47, 5798-5808.

Пример 5. Получение соединения 23



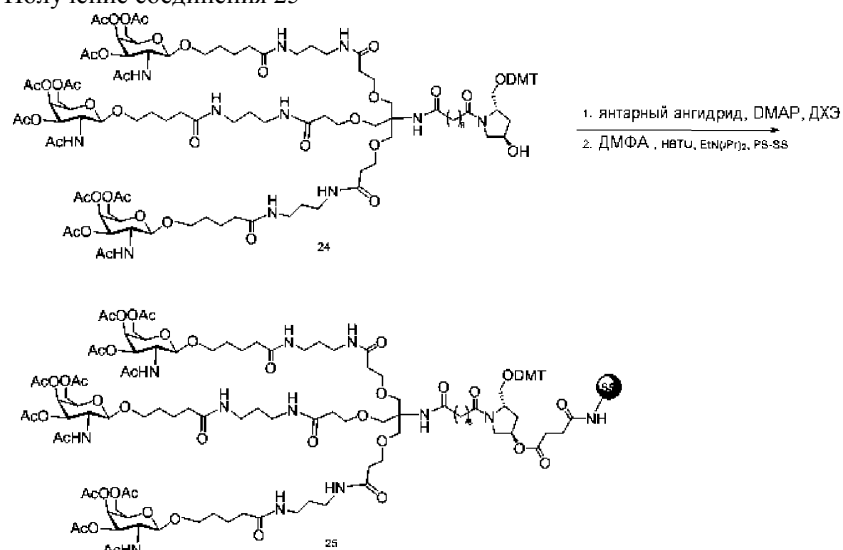
Соединения 19 и 21 имеются в продаже.

Пример 6. Получение соединения 24



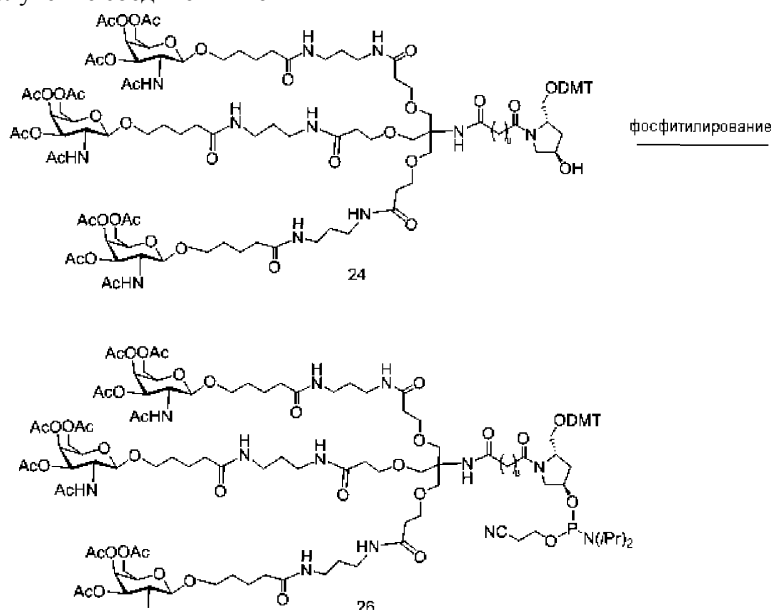
Соединения 18 и 23 получили так, как описано в способах в примерах 4 и 5.

Пример 7. Получение соединения 25



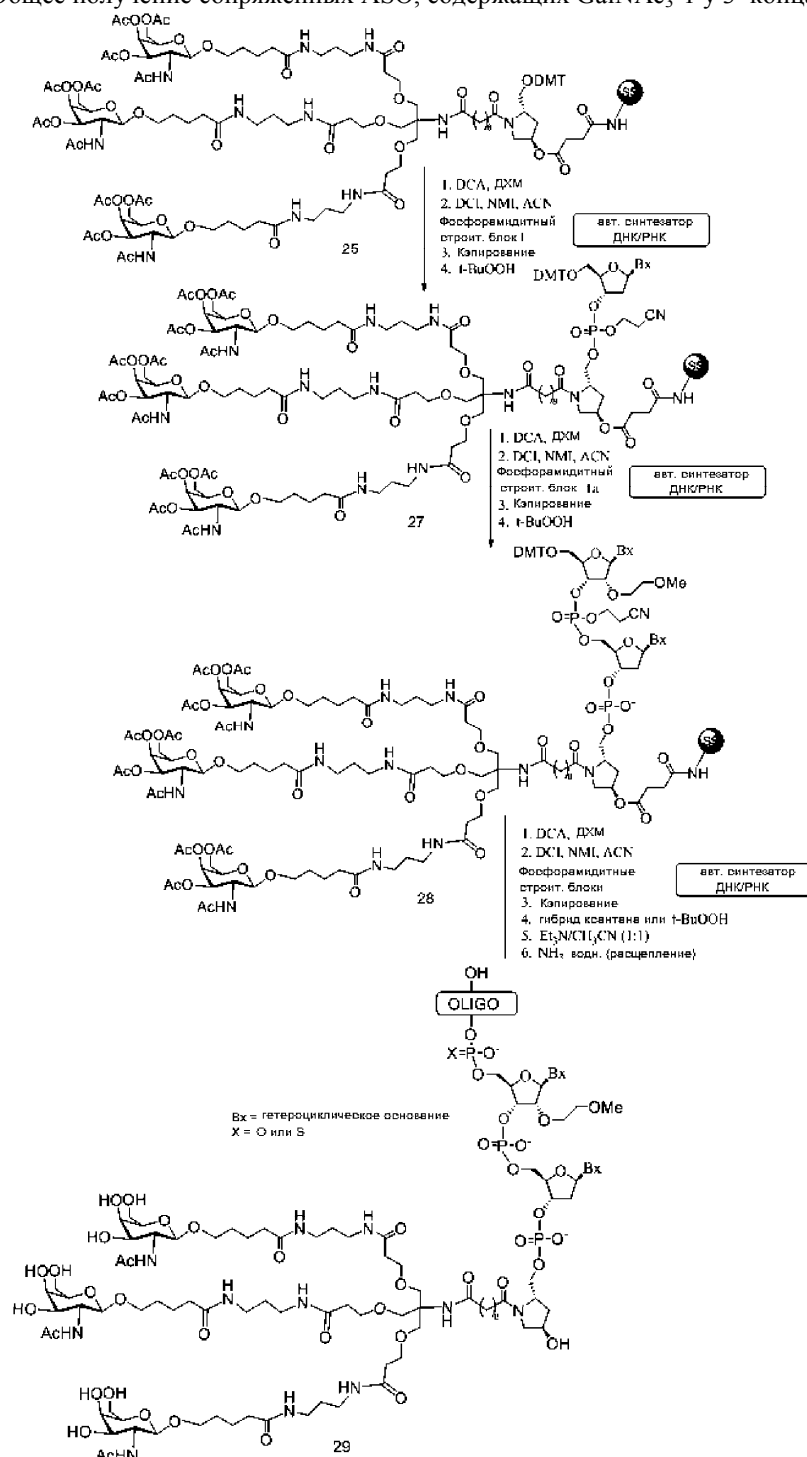
Соединение 24 получили по способам, представленным в примере 6.

Пример 8. Получение соединения 26

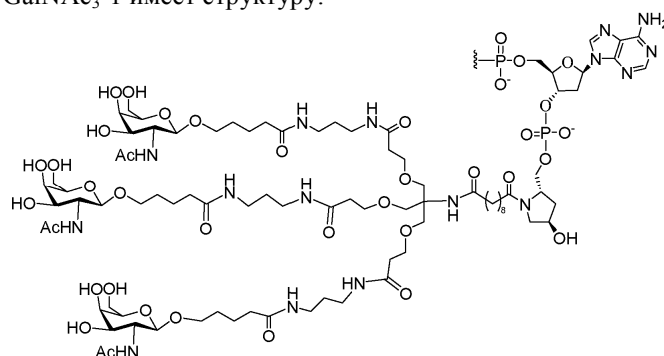


Соединение 24 получили по способам, представленным в примере 6.

Пример 9: Общее получение сопряженных ASO, содержащих GalNAc₃-1 у 3'-конца, соединения 29

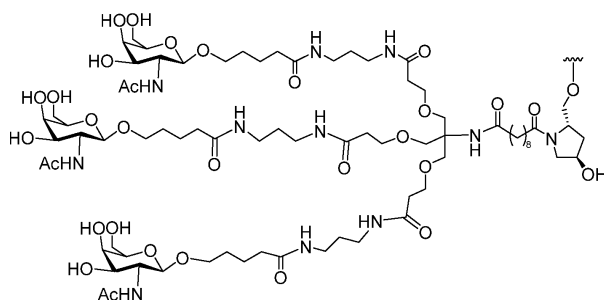


Где защищенный GalNAc₃-1 имеет структуру:



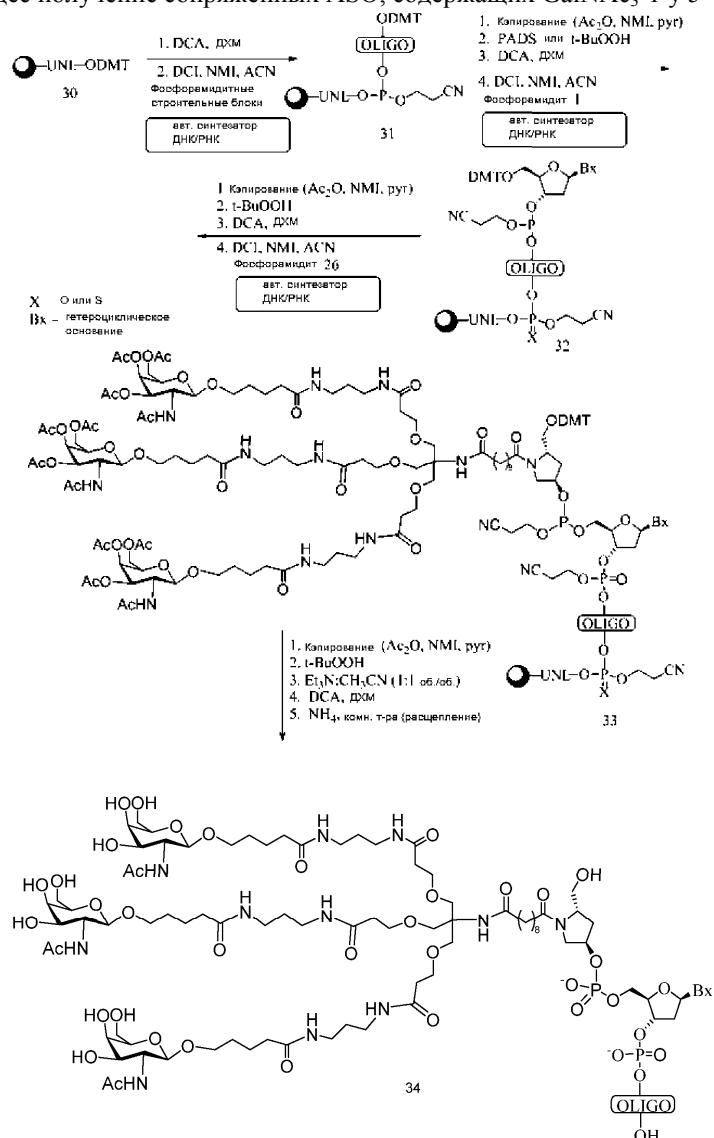
Кластерная часть GalNAc₃ группы конъюгата GalNAc₃-1 (GalNAc₃-1_a) может быть комбинирована с

любым расщепляемым фрагментом с получением различных групп конъюгата. Где GalNAc₃-1_a имеет формулу:



Защищенный GalNAc₃-1, связанный с твердой подложкой, соединение 25, получили по способам, представленным в примере 7. Олигомерное соединение 29, содержащее GalNAc₃-1 у 3'-конца, получили по стандартным способам в автоматическом синтезаторе ДНК/РНК (см. Dupouy et al., Angew. Chem. Int. Ed, 2006, 45, 3623-3627). Фосфорамидитные строительные блоки, соединения 1 и 1a, получили так, как описано в способах в примере 1. Изображенные фосфорамидиты являются иллюстративными и не предназначены для ограничения, поскольку могут быть использованы другие фосфорамидитные строительные блоки для получения олигомерных соединений, имеющих заданную последовательность и состав. Порядок и количество фосфорамидитов, добавляемых к твердой подложке, может быть подобрано для получения разорванных олигомерных соединений, описанных в настоящем документе. Такие разорванные олигомерные соединения могут иметь заданный состав и последовательность оснований, продиктованную любой данной мишенью.

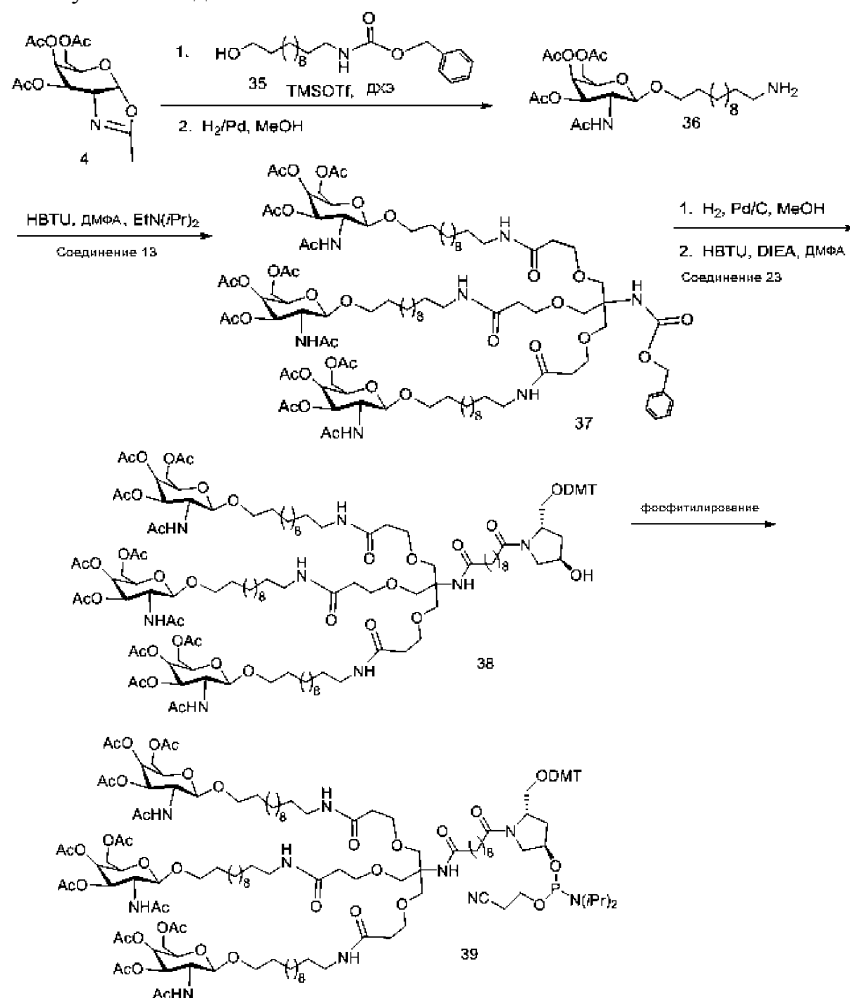
Пример 10: Общее получение сопряженных ASO, содержащих GalNAc₃-1 у 5'-конца, соединения 34



Unylinker™ 30 имеется в продаже. Олигомерное соединение 34, содержащее кластер GalNAc₃-1 у 5'-

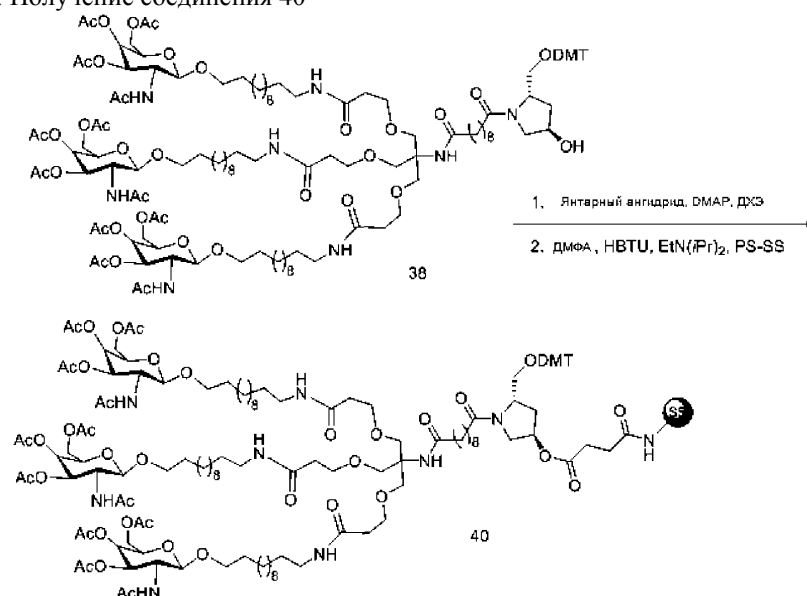
конца, получили по стандартным способам в автоматическом синтезаторе ДНК/РНК (см. Dupouy et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2006, 45, 3623-3627). Фосфорамидитные строительные блоки, соединения 1 и 1a, получили так, как описано в способах в примере 1. Изображенные фосфорамидиты являются иллюстративными и не предназначены для ограничения, поскольку могут быть использованы другие фосфорамидитные строительные блоки для получения олигомерных соединений, имеющих заданную последовательность и состав. Порядок и количество фосфорамидитов, добавляемых к твердой подложке, может быть подобрано для получения разорванных олигомерных соединений, описанных в настоящем документе. Такие разорванные олигомерные соединения могут иметь заданный состав и последовательность оснований, продиктованную любой данной мишенью.

Пример 11. Получение соединения 39



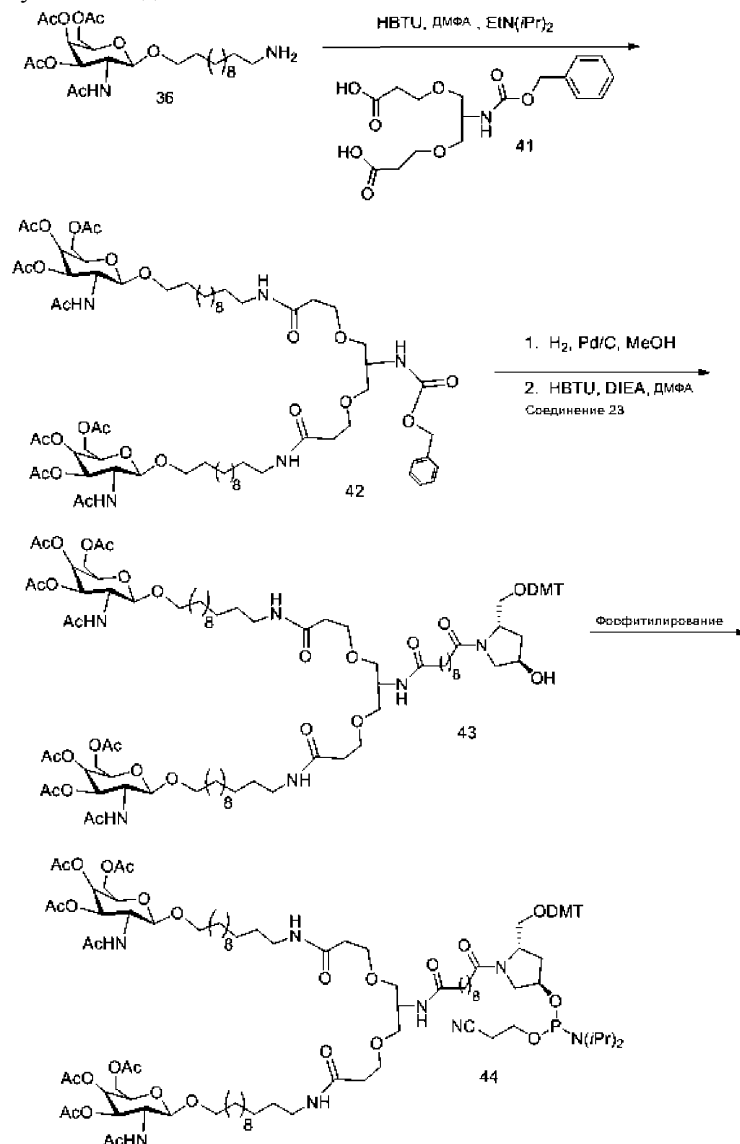
Соединения 4, 13 и 23 получили так, как описано в способах в примерах 2, 4 и 5. Соединение 35 получили по такому же способу, как описан в публикации Rouchaud et al., Eur. J. Org. Chem., 2011, 12, 2346-2353.

Пример 12. Получение соединения 40



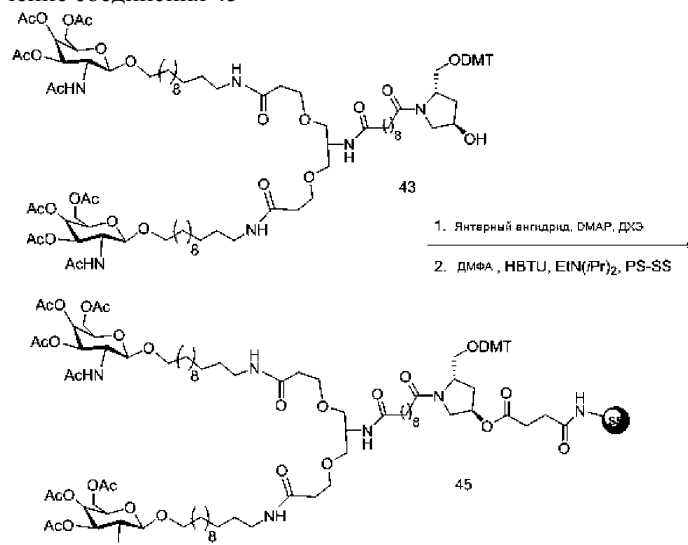
Соединение 38 получили по способам, представленным в примере 11.

Пример 13. Получение соединения 44



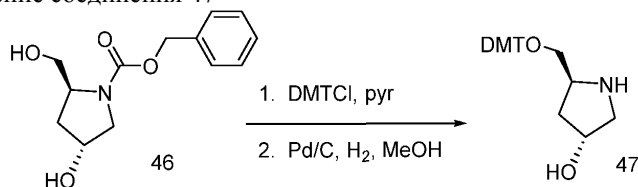
Соединения 23 и 36 получили так, как описано в способах в примерах 5 и 11. Соединение 41 получили по такому же способу, как описан в публикации WO 2009082607.

Пример 14. Получение соединения 45



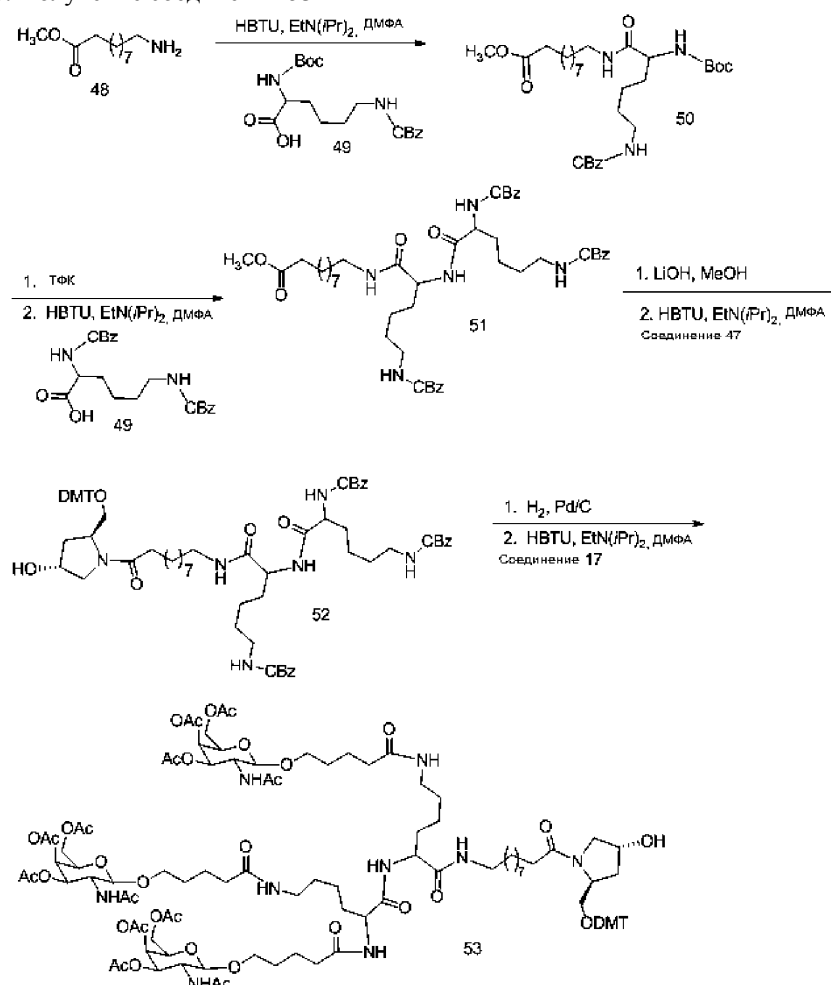
Соединение 43 получили по способам, представленным в примере 13.

Пример 15. Получение соединения 47



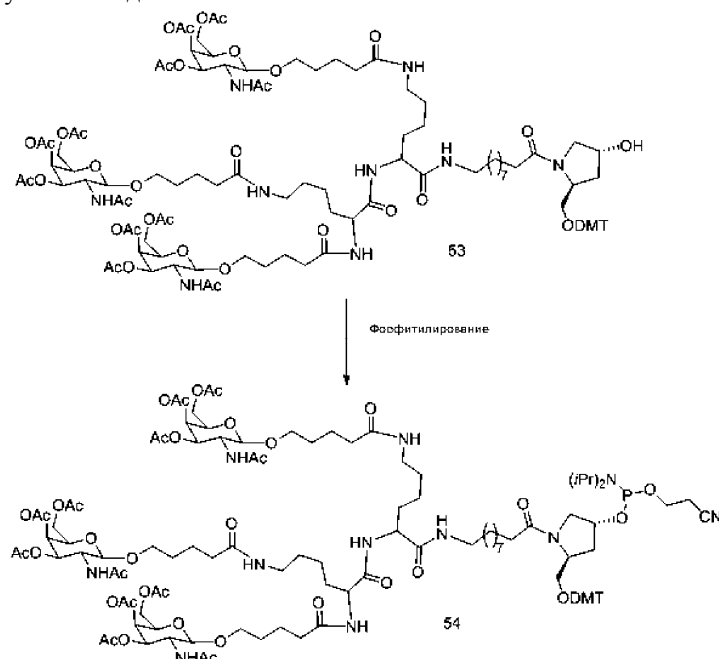
Соединение 46 имеется в продаже.

Пример 16. Получение соединения 53



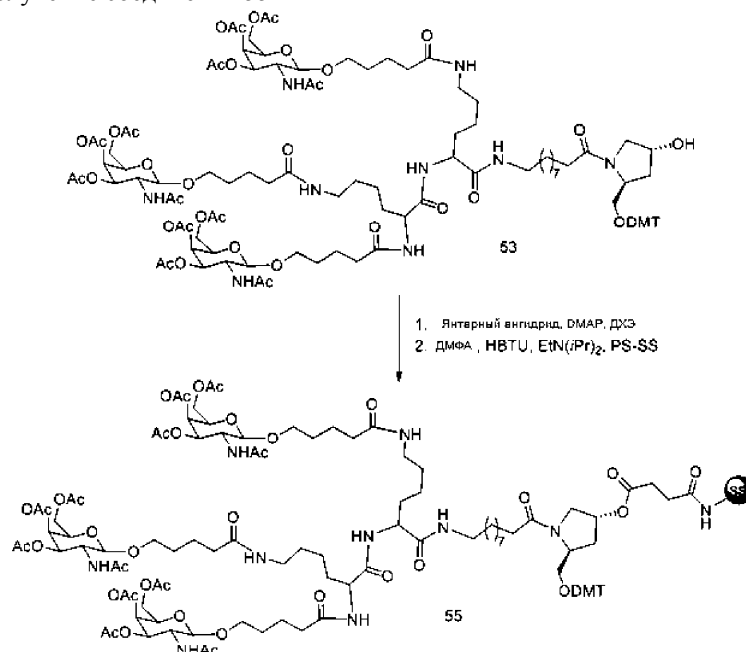
Соединения 48 и 49 имеются в продаже. Соединения 17 и 47 получили так, как описано в способах в примерах 4 и 15.

Пример 17. Получение соединения 54



Соединение 53 получили по способам, представленным в примере 16.

Пример 18. Получение соединения 55



Соединение 53 получили по способам, представленным в примере 16.

Пример 19. Общий способ получения сопряженных ASO, содержащих GalNAc₃-1 в 3'-положении, при помощи твердофазных методик (получение ISIS 647535, 647536 и 651900).

Если не указано иное, все реагенты и растворы, использованные для синтеза олигомерных соединений, приобретены у коммерческих поставщиков. Стандартные фосфорамидитные строительные блоки и твердую подложку использовали для внедрения нуклеозидных остатков, которые включают, например, остатки Т, А, Г и ¹³С. 0,1 М раствор фосфорамидита в безводном ацетонитриле использовали для β-D-2'-дезоксирибонуклеозида и 2'-МОЕ.

Синтез антисмысловых олигонуклеотидов (ASO) выполнили на синтезаторе ABI 394 (в масштабе 1-2 мкмоль) или на синтезаторе AKTA Oligopilot производства GE Healthcare Bioscience (в масштабе 40-200 мкмоль) по способу фосфорамидитного связывания на твердой подложке VIMAD, наполненной GalNAc₃-1 (110 мкмоль/г, Guzaev et al., 2003), упакованной в колонку. Для стадии связывания фосфорамидиты вводили в 4-кратном избытке по сравнению с загрузкой на твердой подложке, а конденсацию фосфорамидита выполняли в течение 10 мин. Все остальные стадии выполняли по стандартным прото-

колам, предоставленным производителем. Для удаления диметокситритильной (DMT) группы с 5'-гидроксильной группы нуклеотида использовали 6% раствор дихлоруксусной кислоты в толуоле. На стадии связывания в качестве активатора использовали 4,5-дицианоимидазол (0,7 М) в безводном CH₃CN. Тиофосфатные связи внедряли сульфированием при помощи 0,1 М раствора гидроксида ксантана в 1:1 смеси пиридина/CH₃CN в течение 3 мин времени контакта. В качестве окислительного агента для получения фосфодиэфирных межнуклеозидных связей использовали 20% раствор трет-бутилгидропероксида в CH₃CN, содержащий 6% воды, в течение 12 мин времени контакта.

После сборки требуемой последовательности цианоэтил-фосфатные защитные группы снимали при помощи 1:1 (об./об.) смеси триэтиламина и ацетонитрила в течение 45 мин времени контакта. Связанные с твердой подложкой ASO суспендировали в водном растворе аммиака (28-30 мас.%) и нагревали при 55°C в течение 6 ч.

Затем отфильтровывали не связанные ASO и выпаривали аммиак кипячением. Остаток очищали жидкостной хроматографией высокого давления на сильной анионообменной колонке (GE Healthcare Bioscience, Source 30Q, 30 мкм, 2,54 × 8 см, A = 100 мМ ацетата аммония в 30% водном CH₃CN, B = 1,5 М NaBr в A, 0-40% B за 60 мин, скорость потока 14 мл·мин⁻¹, λ = 260 нм). Остаток обессоливали при помощи ВЭЖХ на обращенно-фазовой колонке с получением заданных ASO с выделенным выходом 15-30% относительно первоначальной загрузки на твердую подложку. ASO характеризовали при помощи ион-парной ВЭЖХ, совмещенной с МС-анализом на системе Agilent 1100 MSD.

Антисмысловые олигонуклеотиды, не содержащие конъюгат, синтезировали по стандартным способам синтеза олигонуклеотидов, общеизвестным в данной области техники.

Применяя эти способы, получили три отдельных антисмысловых соединения, направленных на ApoC III. Как показано ниже в табл. 17, каждое из трех антисмысловых соединений, направленных на ApoC III, имеет одну и ту же последовательность нуклеосеций. ISIS 304801 представляет собой 5'-10-5 МОЕ гэмпер, содержащий только тиофосфатные связи; ISIS 647535 является таким же, как ISIS 304801, за исключением того, что он содержит GalNAc₃-1, сопряженный у его 3'-конца; и ISIS 647536 является таким же, как ISIS 647535, за исключением того, что некоторые межнуклеозидные связи этого соединения представляют собой фосфодиэфирные связи. Как дополнительно показано в табл. 17, были синтезированы два отдельных антисмысловых соединения, направленных на SRB-1. ISIS 440762 представляет собой 2-10-2 сEt гэмпер, содержащий только тиофосфатные межнуклеозидные связи; ISIS 651900 является таким же, как ISIS 440762, за исключением того, что он содержит GalNAc₃-1 у его 3'-конца.

Таблица 17
Модифицированные ASO, направленные на ApoC III и SRB-1

ASO	Последовательность (от 5' к 3')	Мишень	Расчетная масса	Наблюдаемая масса	SE Q ID NO
ISIS 304801	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	ApoC III	7165,4	7164,4	821
ISIS 647535	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _{eo} Ado'-GalNAc ₃ -1 _a	ApoC III	9239,5	9237,8	822
ISIS 647536	A _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{eo} T _{eo} T _{es} A _{es} T _{eo} Ado'-GalNAc ₃ -1 _a	ApoC III	9142,9	9140,8	822
ISIS 440762	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	SRB-1	4647,0	4646,4	823
ISIS 651900	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ko} A _a do'-GalNAc ₃ -1 _a	SRB-1	6721,1	6719,4	824

Нижние индексы: "e" означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид; "d" означает β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "k" означает 6'-(S)-CH₃ бициклический нуклеозид (например, сEt); "s" означает тиофосфатные межнуклеозидные связи (PS); "o" означает фосфодиэфирные межнуклеозидные связи

(PO); и "o" означает -O-P(=O)(OH)-. Верхний индекс "m" означает 5-метилцитозины. "GalNAc₃-1" означает группу конъюгата, имеющую структуру, показанную ранее в примере 9. Следует отметить, что GalNAc₃-1 содержит расщепляемый аденозин, который связывает ASO с остальной частью конъюгата, обозначенной "GalNAc₃-1_a". Номенклатура, используемая в представленной выше таблице, показывает полную последовательность азотистых оснований, включая аденозин, который является частью конъюгата. Следовательно, в представленной выше таблице последовательности также могут быть перечислены с окончанием "GalNAc₃-1", без "A_{d0}". Такое условное применение нижнего индекса "a" для обозначения части группы конъюгата, не содержащей расщепляемого нуклеозида или расщепляемого фрагмента, используется во всех представленных Примерах. Эта часть группы конъюгата, не содержащая расщепляемого фрагмента, упоминается в настоящем документе как "кластер" или "кластер конъюгата" или "кластер GalNAc₃". В некоторых случаях группа конъюгата для удобства описана путем отдельного представления ее кластера и ее расщепляемого фрагмента.

Пример 20. Дозозависимое антисмысловое ингибирование человеческого ApoC III у huApoC III трансгенных мышей.

ISIS 304801 и ISIS 647535, каждый из которых направлен на человеческий ApoC III и описан выше, отдельно испытывали и оценивали в дозозависимом исследовании на их способность ингибировать человеческий ApoC III у трансгенных мышей с человеческим ApoC III.

Лечение.

Трансгенных мышей с человеческим ApoC III выдерживали при 12-часовом цикле освещения/темноты и обеспечивали ad libitum доступ к пище Teklad lab. До начала эксперимента животных акклиматизировали по меньшей мере в течение 7 дней в исследовательской лаборатории. Получили ASO в PBS и стерилизовали фильтрованием через фильтр 0,2 мкм. ASO растворили в 0,9% PBS для инъекций.

Трансгенным мышам с человеческим ApoC III один раз в неделю в течение двух недель внутрибрюшинно вводили инъекции ISIS 304801 или 647535 при 0,08, 0,25, 0,75, 2,25 или 6,75 мкмоль/кг или PBS в качестве контроля. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Через 48 ч после введения последней дозы каждую мышь обескровили и усыпили, и собрали ткани.

Анализ мРНК ApoC III.

Уровни мРНК ApoC III в печени мышей определили при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Уровни мРНК ApoC III определяли относительно общей РНК (при помощи Ribogreen), затем нормализовали к контрольному образцу, обработанному PBS. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней мРНК ApoC III для каждой экспериментальной группы, нормализованных к контрольному образцу, обработанному PBS, и обозначены как "% PBS". Полумаксимальная эффективная доза (ED₅₀) каждого ASO представлена также ниже в табл. 18.

Показано, что оба антисмысловых соединения снижают РНК ApoC III, по сравнению с контрольным образцом, обработанным PBS. Кроме того, антисмысловое соединение, сопряженное с GalNAc₃-1 (ISIS 647535), было значительно более эффективным, чем антисмысловое соединение, не содержащее конъюгат GalNAc₃-1 (ISIS 304801).

Таблица 18

Влияние ASO лечения на уровни мРНК ApoC III у трансгенных мышей с человеческим ApoC III

ASO	Доза (мкмоль/кг)	% PBS	ED ₅₀ (мкмоль/кг)	3'-конъюгат	Межнуклеозидная связь/длина	SEQ ID NO
PBS	0	100	--	-	--	
ISIS	0,08	95	0,77	нет	PS/20	821
304801	0,75	42				
	2,25	32				
	6,75	19				
ISIS 647535	0,08	50	0,074	GalNAc ₃ -1	PS/20	822
	0,75	15				
	2,25	17				
	6,75	8				

Анализ белка ApoC III (турбидиметрический анализ).

Анализ белка ApoC III в плазме выполнили по способам, описанным в работе Graham et al., Circulation Research, до печати опубликованной онлайн 29 марта 2013 г.

Приблизительно 100 мкл плазмы, выделенной из мышей, анализировали без разбавления, используя клинический анализатор Olympus и имеющийся в продаже турбидиметрический аналитический набор ApoC III (Kamiya, кат. № KAI-006, Kamiya Biomedical, Сиэтл, штат Вашингтон). Протокол анализа выполняли по описанию поставщика.

Как показано ниже в табл. 19, оба антисмысловых соединения снижают белок ApoC III, по сравнению с PBS контрольным образцом. Кроме того, антисмысловое соединение, сопряженное с GalNAc3-1 (ISIS 647535), было значительно более эффективным, чем антисмысловое соединение, не содержащее конъюгат GalNAc3-1 (ISIS 304801).

Таблица 19

Влияние ASO лечения на уровни белка ApoC III в плазме у трансгенных мышей с человеческим ApoC III

ASO	Доза (мкмоль/кг)	% PBS	ED ₅₀ (мкмоль/кг)	3'- конъюгат	Межнуклеозидная связь/длина	SEQ ID NO
PBS	0	100	--	--	--	
ISIS 304801	0,08	86	0,73	нет	PS/20	821
	0,75	51				
	2,25	23				
	6,75	13				
ISIS 647535	0,08	72	0,19	GalNAc3-1	PS/20	822
	0,75	14				
	2,25	12				
	6,75	11				

Триглицериды и холестерин плазмы выделили по способу Bligh и Dyer (Bligh, E.G. и Dyer, W.J. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917, 1959)(Bligh, E and Dyer, W, Can J Biochem Physiol, 37, 911-917, 1959)(Bligh, E and Dyer, W, Can J Biochem Physiol, 37, 911-917, 1959) и измерили при помощи клинического анализатора Beckmann Coulter и имеющихся в продаже реагентов.

Уровни триглицеридов измерили относительно мышей, инъецированных PBS, и выразили как "% PBS". Результаты представлены в табл. 20. Показано, что оба антисмысловых соединения снижают уровни триглицеридов. Кроме того, антисмысловое соединение, сопряженное с GalNAc3-1 (ISIS 647535), было значительно более эффективным, чем антисмысловое соединение, не содержащее конъюгат GalNAc3-1 (ISIS 304801).

Таблица 20

Влияние ASO лечения на уровни триглицеридов у трансгенных мышей

ASO	Доза (мкмоль/кг)	% PBS	ED ₅₀ (мкмоль/кг)	3'- конъюгат	Межнуклеозидная связь/длина	SEQ ID NO
PBS	0	100	--	--	--	
ISIS	0,08	87	0,63	нет	PS/20	821
304801	0,75	46				
	2,25	21				
	6,75	12				
ISIS 647535	0,08	65	0,13	GalNAc3-1	PS/20	822
	0,75	9				
	2,25	8				
	6,75	9				

Образцы плазмы анализировали при помощи ВЭЖХ для определения количества общего холестерина и различных фракций холестерина (HDL и LDL). Результаты представлены в табл. 21 и 22. Показано, что оба антисмысловых соединения снижают общие уровни холестерина; оба снижают LDL; и оба

повышают HDL. Кроме того, антисмысловое соединение, сопряженное с GalNAc₃-1 (ISIS 647535), было значительно более эффективным, чем антисмысловое соединение, не содержащее конъюгат GalNAc₃-1 (ISIS 304801). Увеличение уровней HDL и снижение уровней LDL представляет собой преимущественный сердечно-сосудистый эффект антисмыслового ингибирования ApoC III.

Таблица 21

Влияние ASO лечения на уровни общего холестерина у трансгенных мышей

ASO	Доза (мкмоль/кг)	Общий холестерин (мг/дл)	3'- конъюгат	Межнуклеозидная связь/длина	SEQ ID NO
PBS	0	257	--	--	
ISIS 304801	0,08	226	нет	PS/20	821
	0,75	164			
	2,25	110			
	6,75	82			
ISIS	0,08	230	GalNAc ₃ -	PS/20	822
647535	0,75	82	1		
	2,25	86			
	6,75	99			

Таблица 22

Влияние ASO лечения на уровни HDL и LDL холестерина у трансгенных мышей

ASO	Доза (мкмоль/кг)	HDL (мг/дл)	LDL (мг/дл)	3'- конъюгат	Межнуклеозидная связь/длина	SEQ ID NO
PBS	0	17	28	--	--	
ISIS 304801	0,08	17	23	нет	PS/20	821
	0,75	27	12			
	2,25	50	4			
	6,75	45	2			
ISIS 647535	0,08	21	21	GalNAc ₃ - 1	PS/20	822
	0,75	44	2			
	2,25	50	2			
	6,75	58	2			

Фармакокинетический анализ (ФК).

Исследовали также ФК ASO. Образцы печени и почек измельчали и экстрагировали по стандартным протоколам. Образцы анализировали на MSD1, используя ИП-ВЭЖХ-МС. Определили содержание (мкг/г) в ткани ISIS 304801 и 647535 полной длины, и результаты представлены в табл. 23. Показано, что концентрации в печени антисмысловых соединений полной длины были одинаковыми для двух антисмысловых соединений. Следовательно, даже несмотря на то, что GalNAc₃-1 -сопряженное антисмысловое соединение является более активным в печени (как показано по данным РНК и белка, представленным выше), его содержание в печени не намного выше. Действительно, рассчитанное значение EC₅₀ (представленное в табл. 23) подтверждает, что наблюдаемое увеличение эффективности сопряженного соединения не может быть приписано исключительно повышенному накоплению. Такой результат позволяет предположить, что конъюгат улучшает эффективность по другому механизму, чем простое накопление в печени, возможно за счет увеличения продуктивного захвата антисмыслового соединения в клетки.

Эти результаты показывают также, что концентрация GalNAc₃-1-сопряженного антисмыслового соединения почках ниже, чем концентрация антисмыслового соединения, не содержащего конъюгата Gal-

NAc. Это имеет несколько преимущественных терапевтических применений. Для терапевтических показаний, в которых не требуется проявление активности в почках, воздействие на почки подвергает их риску токсичности без соответствующей пользы. Более того, высокая концентрация в почках обычно приводит к выводу соединения с мочой, обеспечивая более быстрое выведение. Соответственно, для внепочечных мишеней накопление в почках является нежелательным. Эти данные позволяют предположить, что сопряжение с GalNAc₃-1 снижает накопление в почках.

Таблица 23

ФК анализ ASO лечения у трансгенных мышей

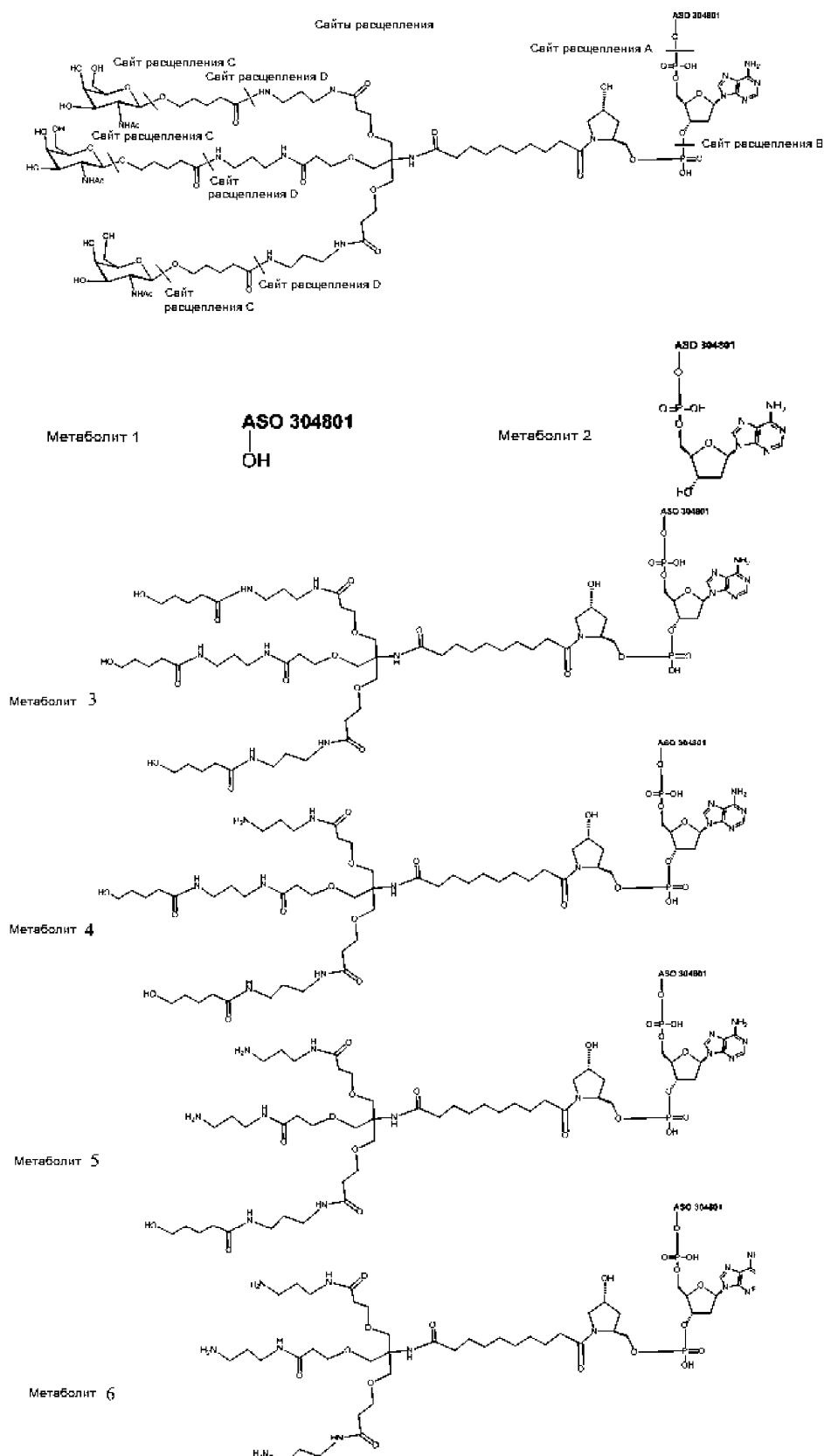
ASO	Доза (мкмоль/кг)	Печень (мкг/г)	Почки (мкг/г)	ЕС ₅₀ в печени (мкг/г)	3'- конъюгат	Межнуклеозидная связь/длина	SEQ ID NO
ISIS 304801	0,1	5,2	2,1	53	нет	PS/20	821
	0,8	62,8	119,6				
	2,3	142,3	191,5				
	6,8	202,3	337,7				
ISIS 647535	0,1	3,8	0,7	3,8	GalNAc- 1	PS/20	822
	0,8	72,7	34,3				
	2,3	106,8	111,4				
	6,8	237,2	179,3				

Идентифицировали также метаболиты ISIS 647535 и подтвердили их массы при помощи масс-спектрометрического анализа высокого разрешения. Сайты расщепления и структуры наблюдаемых метаболитов представлены ниже. Относительный % от общей длины ASO рассчитали по стандартным технологиям, а результаты представлены в табл. 23а. Основной метаболит ISIS 647535 представляет собой ASO полной длины без всего конъюгата (т.е. ISIS 304801), который образуется в результате расщепления по сайту расщепления А, представленному ниже. Кроме того, наблюдали также дополнительные метаболиты, образующиеся из других сайтов расщепления. Эти результаты позволяют предположить, что может быть пригодным также внедрение других расщепляемых связей, таких как сложные эфиры, пептиды, дисульфиды, фосфорамидаты или ацил-гидразоны, между сахаром GalNAc₃-1 и ASO, которые могут расщепляться под действием ферментов внутри клетки или которые могут расщепляться в восстановительной среде цитозоля, или которые лабильны в кислотном pH внутри эндосом и лизосом.

Таблица 23а

Наблюдаемые метаболиты полной длины ISIS 647535

Метаболит	ASO	Сайт расщепления	Относительный %
1	ISIS 304801	A	36,1
2	ISIS 304801 + dA	B	10,5
3	ISIS 647535 минус [3 GalNAc]	C	16,1
4	ISIS 647535 минус [3 GalNAc + 1 связка 5- гидроксипентановой кислоты]	D	17,6
5	ISIS 647535 минус [2 GalNAc + 2 связки 5- гидроксипентановой кислоты]	D	9,9
6	ISIS 647535 минус [3 GalNAc + 3 связки 5- гидроксипентановой кислоты]	D	9,8



Пример 21. Антисмысловое ингибирование человеческого АроС III у трансгенных мышей с АроС III в исследовании одного введения.

ISIS 304801, 647535 и 647536, каждый из которых направлен на человеческий АроС III и описан в табл. 17, дополнительно оценивали в исследовании однократного введения на их способность ингибировать человеческий АроС III у трансгенных мышей с человеческим АроС III.

Лечение.

Трансгенных мышей с человеческим АроС III выдерживали при 12-часовом цикле освеще-

ния/темноты и обеспечивали ad libitum доступ к пище Teklad lab. До начала эксперимента животных акклиматизировали по меньшей мере в течение 7 дней в исследовательской лаборатории. Получили ASO в PBS и стерилизовали фильтрованием через фильтр 0,2 мкм. ASO растворили в 0,9% PBS для инъекций.

Трансгенным мышам с человеческим ApoC III внутрибрюшинно ввели однократную инъекцию дозы, представленной ниже, соединения ISIS 304801, 647535 или 647536 (описанных выше), или PBS в качестве контрольного образца. Экспериментальная группа состояла из 3 животных, а контрольная группа состояла из 4 животных. Перед лечением, а также после последней дозы у каждой мыши брали кровь и анализировали образцы плазмы. Мышей усыпили через 72 ч после последнего введения.

Образцы собрали и анализировали для определения уровней мРНК ApoC III и белка в печени; триглицеридов в плазме; и холестерина, включая фракции HDL и LDL, которые анализировали так, как описано выше (пример 20). Данные этих анализов представлены ниже в табл. 24-28. Уровни трансаминазы в печени, аланин-аминотрансферазы (ALT) и аспартат-аминотрансферазы (AST) в сыворотке измеряли относительно мышей, инъецированных солевым раствором, используя стандартные протоколы. Уровни ALT и AST показали, что антисмысловые соединения хорошо переносятся при всех введенных дозах.

Эти результаты демонстрируют усиление эффективности антисмысловых соединений, содержащих конъюгат GalNAc₃-1 у 3'-конца (ISIS 647535 и 647536), по сравнению с антисмысловым соединением, не содержащим конъюгат GalNAc₃-1 (ISIS 304801). Кроме того, ISIS 647536, который содержит конъюгат GalNAc₃-1 и несколько фосфодиэфирных связей, был таким же эффективным, как ISIS 647535, который содержит тот же конъюгат, и все межнуклеозидные связи в этом ASO являются тиофосфатными.

Таблица 24

Влияние ASO лечения на уровни мРНК ApoC III
у трансгенных мышей с человеческим ApoC III

ASO	Доза (мг/кг)	% PBS	ED ₅₀ (мг/кг)	3'- конъюгат	Межнуклеози- дная связь/длина	SEQ ID NO
PBS	0	99	--	-	--	
ISIS 304801	1	104	13,2	нет	PS/20	821
	3	92				
	10	71				
	30	40				
ISIS 647535	0,3	98	1,9	GalNAc₃- 1	PS/20	822
	1	70				
	3	33				
	10	20				
ISIS 647536	0,3	103	1,7	GalNAc₃- 1	PS/PO/20	822
	1	60				
	3	31				
	10	21				

Таблица 25

Влияние ASO лечения на уровни белка ApoC III в плазме у трансгенных мышей с человеческим ApoC III

ASO	Доза (мг/кг)	% PBS	ED ₅₀ (мг/кг)	3'- конъюгат	Межнуклеозидная связь/длина	SEQ ID NO
PBS	0	99	--	--	--	
ISIS 304801	1	104	23,2	нет	PS/20	821
	3	92				
	10	71				
	30	40				
ISIS 647535	0,3	98	2,1	GalNAc3- 1	PS/20	822
	1	70				
	3	33				
	10	20				
ISIS 647536	0,3	103	1,8	GalNAc3- 1	PS/PO/20	822
	1	60				
	3	31				
	10	21				

Таблица 26

Влияние ASO лечения на уровни триглицеридов у трансгенных мышей

ASO	Доза (мг/кг)	% PBS	ED ₅₀ (мг/кг)	3'- конъюгат	Межнуклеозидная связь/длина	SEQ ID NO
PBS	0	98	--	--	--	
ISIS 304801	1	80	29,1	нет	PS/20	821
	3	92				
	10	70				
	30	47				
ISIS 647535	0,3	100	2,2	GalNAc3- 1	PS/20	822
	1	70				
	3	34				
	10	23				
ISIS 647536	0,3	95	1,9	GalNAc3- 1	PS/PO/20	822
	1	66				
	3	31				
	10	23				

Таблица 27

Влияние ASO лечения на уровни общего холестерина у трансгенных мышей

ASO	Доза (мг/кг)	% PBS	3'- конъюгат	Межнуклеозидная связь/длина	SEQ ID NO
PBS	0	96	--	--	
ISIS 304801	1	104	нет	PS/20	821
	3	96			
	10	86			
	30	72			
ISIS 647535	0,3	93	GalNAc3-1	PS/20	822
	1	85			
	3	61			
	10	53			
ISIS 647536	0,3	115	GalNAc3-1	PS/PO/20	822
	1	79			
	3	51			
	10	54			

Таблица 28

Влияние ASO лечения на уровни HDL и LDL холестерина у трансгенных мышей

ASO	Доза (мг/кг)	HDL % PBS	LDL % PBS	3'- конъюгат	Межнуклеозидная связь/длина	SEQ ID NO
PBS	0	131	90	--	--	
ISIS 304801	1	130	72	нет	PS/20	821
	3	186	79			
	10	226	63			
	30	240	46			
ISIS 647535	0,3	98	86	GalNAc3- 1	PS/20	822
	1	214	67			
	3	212	39			
	10	218	35			
ISIS 647536	0,3	143	89	GalNAc3- 1	PS/PO/20	822
	1	187	56			
	3	213	33			
	10	221	34			

Эти результаты подтверждают, что конъюгат GalNAc₃-1 улучшает эффективность антисмыслового соединения. Эти результаты показывают также равную эффективность GalNAc₃-1-сопряженных антисмысловых соединений, в которых антисмысловые олигонуклеотиды имеют смешанные связи (ISIS 647536, который имеет шесть фосфодиэфирных связей), и полностью тиофосфатной версии того же ан-

тисмыслового соединения (ISIS 647535).

Тиофосфатные связи обеспечивают несколько свойств антисмысловых соединений. Например, они устойчивы к нуклеазному расщеплению и связываются с белками, что приводит к накоплению соединения в печени, а не в почках/моче. Эти свойства являются желательными, особенно при лечении показаний в печени. Однако тиофосфатные связи связаны также с воспалительной реакцией. Соответственно, уменьшение количества тиофосфатных связей в соединении предположительно снижает риск воспаления, но снижает также концентрацию соединения в печени, повышает концентрацию в почках и моче, снижает стабильность в присутствии нуклеаз и уменьшает общую эффективность. Представленные результаты демонстрируют, что GalNAc₃-1-сопряженное антисмысловое соединение, в котором некоторые тиофосфатные связи заменены фосфодиэфирными связями, настолько же эффективно против мишени в печени, как и аналог, содержащий только тиофосфатные связи. Такие соединения предположительно являются менее провоспалительными (см. пример 24, в котором описан эксперимент, демонстрирующий, что уменьшение тиофосфатов (PS) приводит к снижению воспалительного действия).

Пример 22. Влияние модифицированного GalNAc₃-1-сопряженного ASO, направленного на SRB-1, *in vivo*.

ISIS 440762 и 651900, каждый из которых направлен на SRB-1 и описан в табл. 17, оценили в дозозависимом исследовании на их способность ингибировать SRB-1 у Balb/c мышей.

Лечение.

Шестинедельным самцам мышей Balb/c (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) ввели однократную подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, соединения ISIS 440762, 651900 или PBS в качестве контрольного образца. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей усыпили через 48 ч после последнего введения для определения уровней мРНК SRB-1 в печени при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Уровни мРНК SRB-1 определяли относительно общей РНК (при помощи Ribogreen), затем нормализовали к контрольному образцу, обработанному PBS. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней мРНК SRB-1 для каждой экспериментальной группы, нормализованных к контрольному образцу, обработанному PBS, и обозначены как "% PBS".

Как показано в табл. 29, оба антисмысловых соединения снижают уровни мРНК SRB-1. Кроме того, антисмысловое соединение, содержащее конъюгат GalNAc₃-1 (ISIS 651900), было значительно более эффективным, чем антисмысловое соединение, не содержащее конъюгат GalNAc₃-1 (ISIS 440762). Эти результаты демонстрируют, что преимущество эффективности конъюгатов GalNAc₃-1 наблюдается при использовании антисмысловых олигонуклеотидов, комплементарных различным мишеням и имеющих различные химически модифицированные нуклеозиды, в этом случае модифицированные нуклеозиды содержат стерически затрудненные этил-сахарные фрагменты (бициклический сахарный фрагмент).

Таблица 29

Влияние ASO лечения на уровни мРНК SRB-1 у мышей Balb/c

ASO	Доза (мг/кг)	Печень % PBS	ED ₅₀ (мг/кг)	3'- конъюгат		Межнуклео- зидная связь/длина	SEQ ID NO
PBS	0	100		-		--	
ISIS 440762	0,7	85	2,2	нет		PS/14	823
	2	55					
	7	12					
	20	3					
ISIS 651900	0,07	98	0,3	GalNAc ₃ -1		PS/14	824
	0,2	63					
	0,7	20					
	2	6					
	7	5					

Пример 23. Протокол анализа человеческих мононуклеарных клеток периферической крови (hPBMC).

Анализ hPBMC выполнили при помощи пробирочного способа BD Vautainer CPT. Получили образец цельной крови, полученной от доноров-добровольцев, давших информированное согласие в Медицинской клинике США (Faraday & El Camino Real, Карлсбад), и собрали его в 4-15 пробирки BD Vautainer CPT по 8 мл (VWR, кат. № BD362753). Приблизительный исходный общий объем цельной крови в

пробирке СРТ для каждого донора записали в формуляре анализа РВМС.

Непосредственно перед центрифугированием образец крови повторно перемешали, осторожно переворачивая пробирки 8-10 раз. Пробирки СРТ центрифугировали при комнатной температуре (18-25°C) в горизонтальном (с избыточной поворачиваемостью) роторе в течение 30 мин с фактором разделения (RCF) 1500-1800 с затормаживанием (2700 об/мин Beckman Allegra 6R). Клетки сняли с лейкоцитарной поверхности раздела (между слоями фикола и полимерного геля); перенесли в стерильную 50 мл коническую пробирку и сгруппировали по 5 СРТ пробирок/50 мл коническая пробирка/донор. Затем клетки дважды промыли PBS (без Ca^{++} , Mg^{++} ; GIBCO). Пробирки пополнили до 50 мл и перемешали, переворачивая несколько раз. Затем образец центрифугировали при $330 \times g$ в течение 15 мин при комнатной температуре (1215 об/мин в Beckman Allegra 6R) и аспирировали максимальное количество надосадочной жидкости, не нарушая осадок. Клеточный осадок сняли, осторожно поворачивая пробирку, и повторно суспендировали клетки в RPMI+10% FBS+пенициллин/стрептомицин (~1 мл/10 мл исходного объема цельной крови). Пипеткой взяли 60 мкл образца и поместили во флакон с пробой (Beckman Coulter), содержащий 600 мкл реагента VersaLyse (Beckman Coulter, кат. № A09777), и осторожно перемешивали на вортексе в течение 10-15 секунд. Образец оставили инкубироваться в течение 10 мин при комнатной температуре, и снова перемешали перед подсчетом. Суспензию клеток считывали на анализаторе жизнеспособности клеток Vicell XR (Beckman Coulter), используя клетки типа РВМС (сохранили фактор разбавления 1:11 с другими параметрами). Записали количество живых клеток/мл и жизнеспособность. Клеточную суспензию разбавили до 1×10^7 живых РВМС/мл в RPMI+10% FBS+пенициллин/стрептомицин.

Клетки поместили на планшет при 5×10^5 в 50 мкл/лунку 96-луночного тканевого культурального планшета (Falcon Microtest). 50 мкл/лунку 2х концентрации олигомеров/контроля, разбавленных в RPMI+10% FBS+пенициллин/стрептомицин, добавили в соответствии с экспериментальной матрицей (в целом 100 мкл/лунку). Планшеты установили на шейкер и оставили перемешиваться в течение около 1 мин. После инкубации в течение 24 ч при 37°C; 5% CO_2 , планшеты центрифугировали при $400 \times g$ в течение 10 мин, затем удалили надосадочную жидкость для анализа цитокинов MSD (т.е. человеческих IL-6, IL-10, IL-8 и MCP-1).

Пример 24. Оценка провоспалительных эффектов в анализе hPBMC для GalNAc₃-1-сопряженных ASO.

Антисмысловые олигонуклеотиды (ASO), перечисленные в табл. 30, оценили на провоспалительное действие в анализе hPBMC, используя протокол, описанный в примере 23. ISIS 353512 представляет собой внутренний стандарт, который, как известно, обладает высоким ответом на высвобождение IL-6 в этом анализе. hPBMC выделили из свежих образцов, полученных от доноров-добровольцев, и обработали ASO в концентрациях 0, 0,0128, 0,064, 0,32, 1,6, 8, 40 и 200 мкМ. Через 24 ч обработки измерили уровни цитокинов.

Уровни IL-6 использовали в качестве первичного значения. EC_{50} и E_{max} рассчитывали по стандартным способам. Результаты выразили как среднее отношение $\text{E}_{\text{max}}/\text{EC}_{50}$ для двух доноров и обозначили как " $\text{E}_{\text{max}}/\text{EC}_{50}$ ". Более низкое соотношение означает относительное снижение провоспалительного ответа, а более высокое соотношение означает относительное увеличение провоспалительного ответа.

В отношении исследуемых соединений, наименее провоспалительным соединением было ASO, соединенное при помощи PS/PO (ISIS 616468). GalNAc₃-1-сопряженное ASO, ISIS 647535, было немного менее провоспалительным, чем его несопряженный аналог, ISIS 304801. Эти результаты показывают, что внедрение нескольких PO связей снижает провоспалительную реакцию, а добавление конъюгата GalNAc₃-1 не делает соединение более провоспалительным, и может снижать провоспалительную реакцию. Соответственно, можно ожидать, что антисмысловое соединение, содержащее смешанные PS/PO связи и конъюгат GalNAc₃-1, может вызывать более слабые провоспалительные реакции, по сравнению с антисмысловым соединением, связанным только посредством PS, с конъюгатом GalNAc₃-1 или без него. Эти результаты показывают, что GalNAc₃-1-сопряженные антисмысловые соединения, в частности, соединения, имеющие меньшее содержание PS, являются менее провоспалительными.

В целом, эти результаты позволяют предположить, что GalNAc₃-1-сопряженное соединение, в частности, соединение со сниженным содержанием PS, может быть введено в более высокой дозе, чем аналогичное полностью PS антисмысловое соединение без конъюгата GalNAc₃-1. Поскольку не ожидается, что период полувыведения для этих соединений будет существенно различаться, то такое введение в более высокой дозе обусловит менее частое введение доз. В действительности, такое введение может быть еще более редким, поскольку GalNAc₃-1-сопряженные соединения являются более эффективными (см. примеры 20-22), а повторное введение дозы необходимо только при снижении концентрации соединения ниже заданного уровня, при этом такой заданный уровень обусловлен эффективностью.

Таблица 30

Модифицированные ASO

ASO	Последовательность (от 5' к 3')	Мишень	SEQ ID NO
ISIS 104838	G _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} A _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	TNF $\square$	825
ISIS 353512	T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} T _{es} G _{es} G _e	CRP	826
ISIS 304801	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	ApoC III	821
ISIS 647535	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _{eo} A_{do}'-GalNAc₃-1_a	ApoC III	822
ISIS 616468	A _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{eo} T _{eo} T _{es} A _{es} T _e	ApoC III	821

Нижние индексы: "e" означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид; "d" означает β -D-2'-дезоксирибонуклеозид; "k" означает 6'-(S)-CH₃ бициклический нуклеозид (например, cEt); "s" означает тиофосфатные межнуклеозидные связи (PS); "o" означает фосфодиэфирные межнуклеозидные связи (PO); и "o'" означает -O-P(=O)(OH)-. Верхний индекс "m" означает 5-метилцитозины. "A_{do}'-GalNAc₃-1_a" означает конъюгат, имеющий структуру GalNAc₃-1, показанную в примере 9, присоединенную к 3'-концу антисмыслового олигонуклеотида, как показано.

Таблица 31

Провоспалительное действие ASO, направленных на ApoC III, в анализе hPBMC

ASO	EC ₅₀ (мкМ)	E _{max} (мкМ)	E _{max} /EC ₅₀	3'-конъюгат	Межнуклеозидная связь/длина	SEQ ID NO
ISIS 353512 (повышенная реакция)	0,01	265,9	26590	нет	PS/20	826
ISIS 304801	0,07	106,55	1522	нет	PS/20	821
ISIS 647535	0,12	138	1150	GalNAc₃-1	PS/20	822
ISIS 616468	0,32	71,52	224	нет	PS/PO/20	821

Пример 25. Влияние модифицированного GalNAc₃-1-сопряженного ASO, направленного на человеческий ApoC III, *in vitro*.

ISIS 304801 и 647535, описанные выше, испытали *in vitro*. Первичные гепатоцитарные клетки трансгенных мышей при плотности 25000 клеток на лунку обработали концентрациями 0,03, 0,08, 0,24, 0,74, 2,22, 6,67 и 20 мкМ модифицированных олигонуклеотидов. После обработки в течение приблизительно 16 ч, из клеток выделили РНК и измерили уровни мРНК при помощи количественной ПЦР в реальном времени, а уровни мРНК hApoC III скорректировали в соответствии с общим содержанием РНК, измеренным при помощи RIBOGREEN.

IC₅₀ рассчитали по стандартным способам, а результаты представлены в табл. 32. Показано, что наблюдали сравнимую эффективность в клетках, обработанных ISIS 647535, по сравнению с контрольным образцом, ISIS 304801.

Таблица 32
Модифицированные ASO, направленные на человеческие
ApoC III, в первичных гепатоцитах

ASO	IC ₅₀ (мкМ)	3'-конъюгат	Межнуклеозидная связь/длина	SEQ ID NO
ISIS 304801	0,44	нет	PS/20	821
ISIS 647535	0,31	GalNAc-1	PS/20	822

В этом эксперименте *in vitro* не наблюдали такого большого преимущества эффективности сопряжения с GalNAc₃-1, как наблюдали *in vivo*. Последующие эксперименты свободного захвата в первичных гепатоцитах *in vitro* не показали повышенной эффективности олигонуклеотидов, содержащих различные конъюгаты GalNAc, по сравнению с олигонуклеотидами, не содержащими конъюгаты GalNAc (см. примеры 60, 82 и 92).

Пример 26. Влияние линкеров PO/PS на кативность ASO в отношении ApoC III.

Трансгенным мышам с человеческим ApoC III внутрибрюшинной инъекцией вводили 25 мг/кг ISIS 304801 или ISIS 616468 (оба описаны выше) или PBS в качестве контрольного образца, один раз в неделю в течение двух недель. Экспериментальная группа состояла из 3 животных, а контрольная группа состояла из 4 животных. Перед лечением, а также после последней дозы у каждой мыши брали кровь и анализировали образцы плазмы. Мышей усыпили через 72 ч после последнего введения.

Образцы собрали и анализировали для определения уровней белка ApoC III в печени, как описано выше (пример 20). Данные этих анализов представлены ниже в табл. 33.

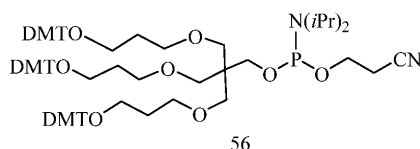
Эти результаты демонстрируют снижение эффективности антисмысловых соединений с PO/PS (ISIS 616468) в крыльях, по сравнению с соединениями, содержащими только PS (ISIS 304801).

Таблица 33

Влияние ASO лечения на уровни белка ApoC III у трансгенных мышей с человеческим ApoC III

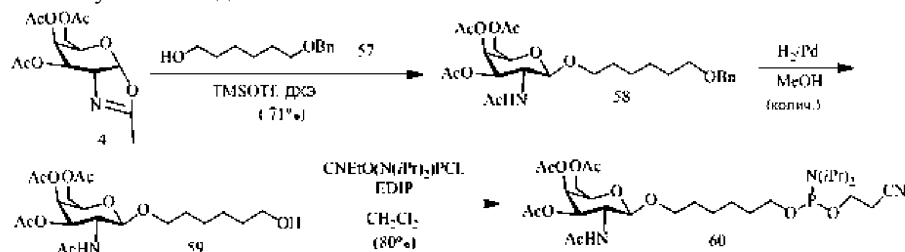
ASO	Доза (мг/кг)	% PBS	3'- конъюгат	Межнуклеози- дная связь/длина	SEQ ID NO
PBS	0	99	-	--	
ISIS 304801	25 мг/кг/неде- лю в течение 2 недель	24	нет	Полностью PS	821
ISIS 616468	25 мг/кг/неде- лю в течение 2 недель	40	нет	14 PS/6 PO	821

Пример 27. Соединение 56.



Соединение 56 имеется в продаже у компании Glen Research или может быть получено по опубликованным методикам, описанным авторами Shchepinov et al., *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22), 4447-4454.

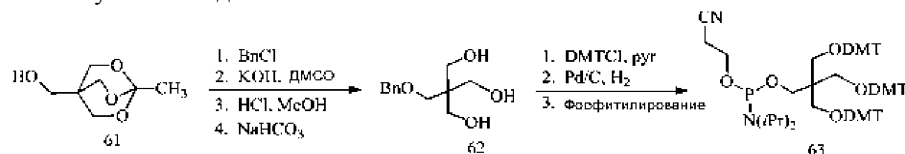
Пример 28. Получение соединения 60



Соединение 4 получили по способам, представленным в примере 2. Соединение 57 имеется в продаже. Соединение 60 подтвердили структурным анализом.

Соединение 57 является иллюстративным, и его не следует считать ограничивающим, поскольку могут быть использованы другие монозащищенные замещенные или незамещенные алкилдидолы, включая, но не ограничиваясь ими, те, которые представлены в данном описании, для получения фосфорамидитов, имеющих заданный состав.

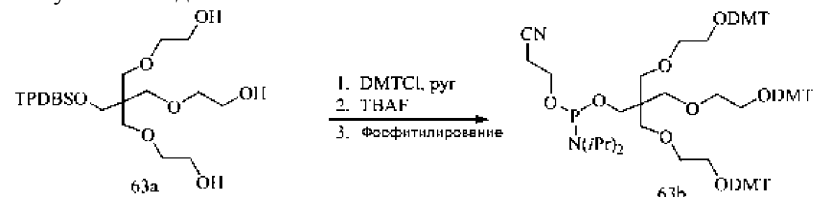
Пример 29. Получение соединения 63



Соединения 61 и 62 получили по такому же способу, как описан в публикации Tober et al., Eur. J. Org. Chem., 2013, 3, 566-577; и Jiang et al., Tetrahedron, 2007, 63(19), 3982-3988.

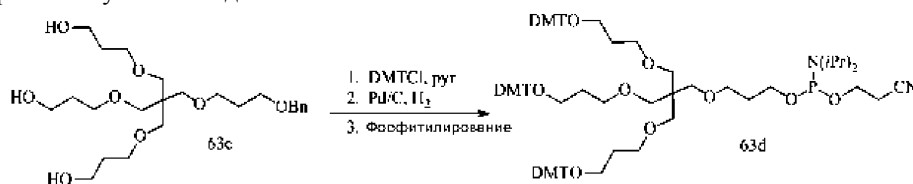
Альтернативно, соединения 63 получили по таким же способам, как описаны в научной и патентной литературе авторами Kim et al., Synlett, 2003, 12, 1838-1840; и Kim et al., в опубликованной международной заявке PCT WO 2004063208.

Пример 30. Получение соединения 63b



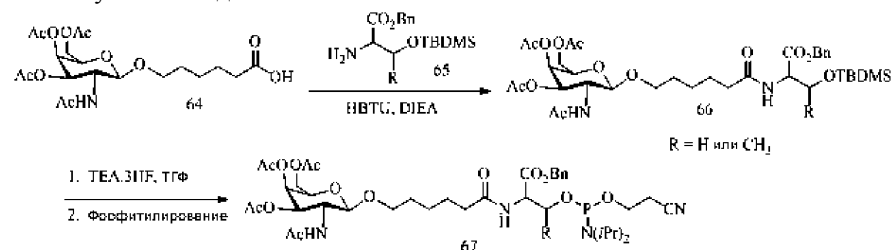
Соединение 63a получили по таким же способам, как описаны авторами Hanessian et al., Canadian Journal of Chemistry, 1996, 74(9), 1731-1737.

Пример 31. Получение соединения 63d



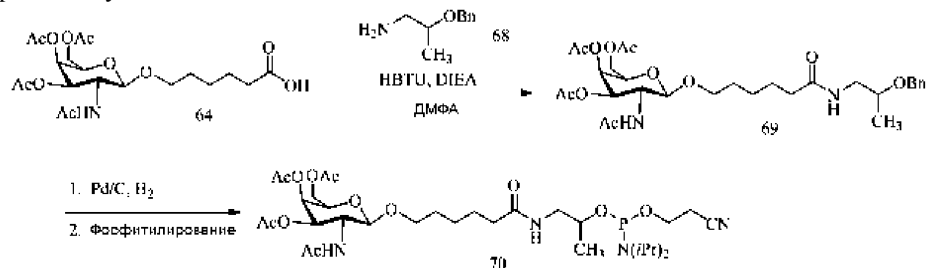
Соединение 63с получили по таким же способам, как описаны авторами Chen et al., Chinese Chemical Letters, 1998, 9(5), 451-453.

Пример 32. Получение соединения 67



Соединение 64 получили по способам, представленным в примере 2. Соединение 65 получили по таким же способам, как описаны авторами Or et al., в опубликованной международной заявке PCT WO 2009003009. Защитные группы, использованные для Соединения 65, являются иллюстративным, и их не следует считать ограничением, поскольку могут быть использованы другие защитные группы, включая, но не ограничиваясь ими, те, которые представлены в данном описании.

Пример 33. Получение соединения 70



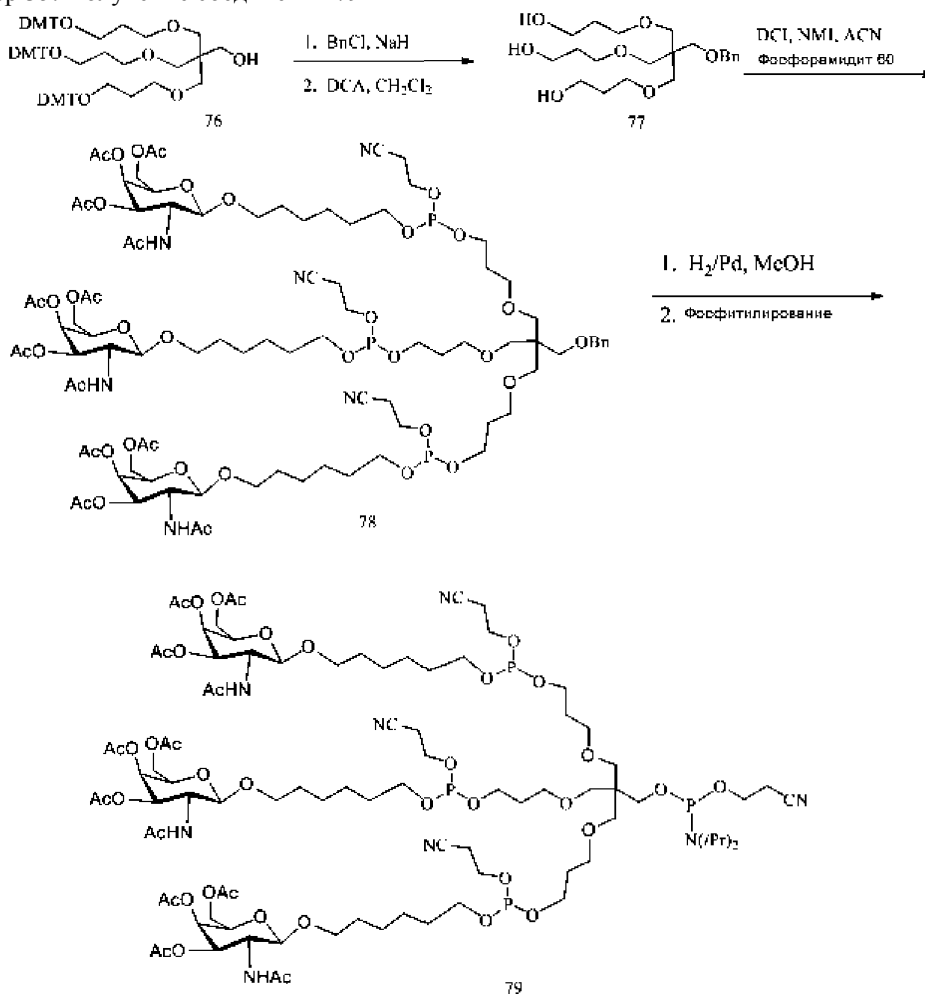
Соединение 64 получили по способам, представленным в примере 2. Соединение 68 имеется в продаже. Защитная группа, использованная для Соединения 68, является иллюстративной, и ее не следует считать ограничением, поскольку могут быть использованы другие защитные группы, включая, но не ограничиваясь ими, те, которые представлены в данном описании.

Пример 34. Получение соединения 75a



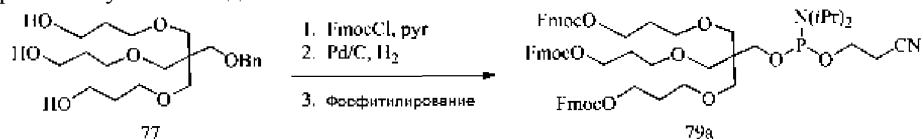
Соединение 75 получили по опубликованным способам, описанным авторами Shchepinov et al., Nucleic Acids Research, 1997, 25(22), 4447-4454.

Пример 35. Получение соединения 79



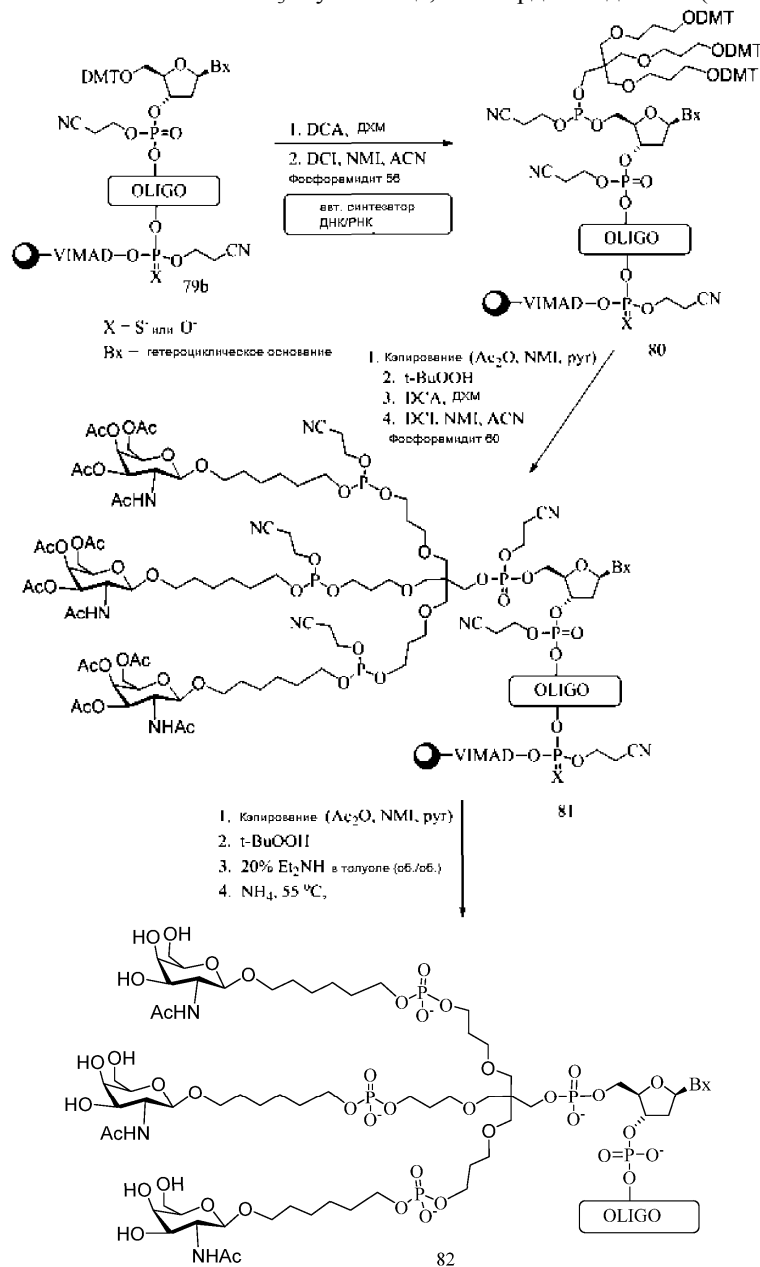
Соединение 76 получили по опубликованным способам, описанным авторами Shchepinov et al., Nucleic Acids Research, 1997, 25(22), 4447-4454.

Пример 36. Получение соединения 79a

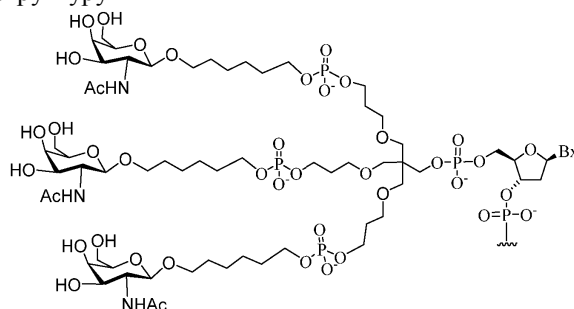


Соединение 77 получили по способам, представленным в примере 35.

Пример 37. Общий способ получения сопряженного олигомерного соединения 82, содержащего фосфодиэфир-связанный конъюгат GalNAc₃-2 у 5'-конца, via твердой подложки (способ I)

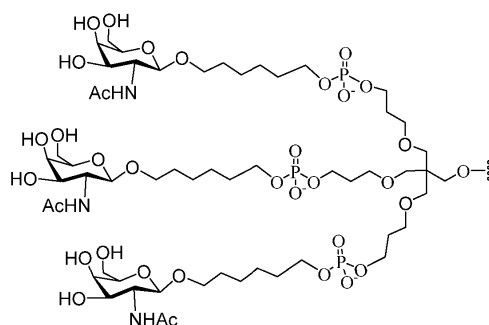


где GalNAc₃-2 имеет структуру



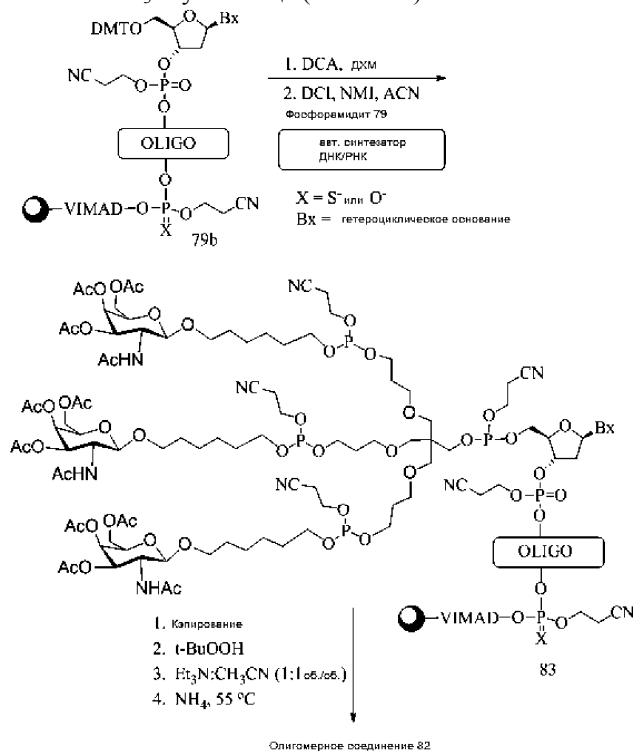
Кластерная часть GalNAc₃ группы конъюгата GalNAc₃-2 (GalNAc₃-2_a) может быть комбинирована с

любым расщепляемым фрагментом с получением различных групп конъюгата. Где GalNAc₃-2_a имеет формулу:



VIMAD-связанное олигомерное соединение 79b получили по стандартным способам в автоматическом синтезаторе ДНК/РНК (см. Dupouy et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2006, 45, 3623-3627). Фосфорамидитные Соединения 56 и 60 получили так, как описано в способах в примерах 27 и 28, соответственно. Изображенные фосфорамидиты являются иллюстративными, и их не следует считать ограничением, поскольку могут быть использованы другие фосфорамидитные строительные блоки, включая, но не ограничиваясь ими, те, которые представлены в данном описании, для получения олигомерного соединения, содержащего фосфодиэфир-связанную группу конъюгата у 5'-конца. Порядок и количество фосфорамидитов, добавляемых к твердой подложке, может быть подобрано для получения олигомерных соединений, описанных в настоящем документе, которые имеют любую заданную последовательность и состав.

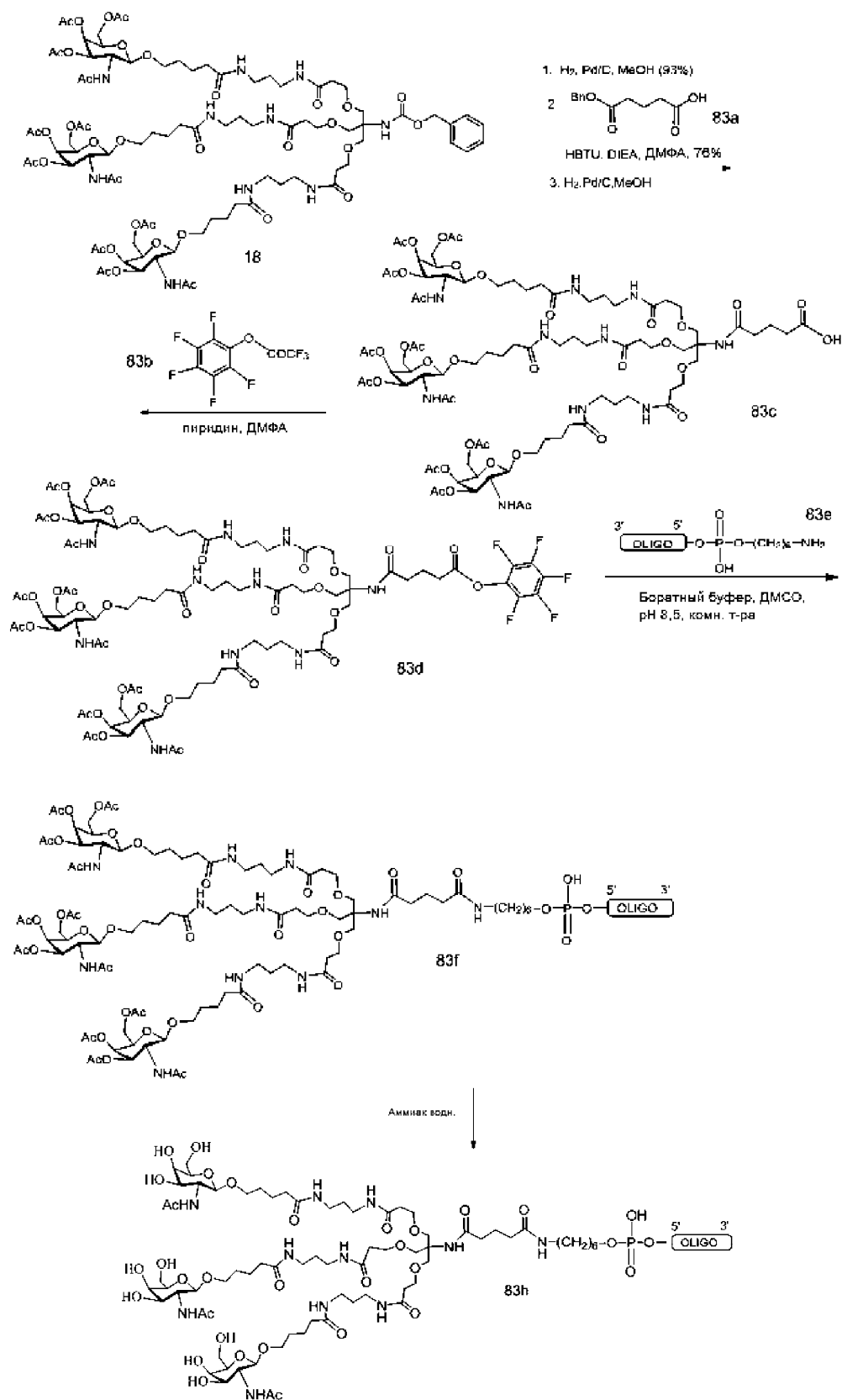
Пример 38. Альтернативный способ получения олигомерного соединения 82, содержащего фосфодиэфир-связанный конъюгат GalNAc₃-2 у 5'-конца (способ II)



VIMAD-связанное олигомерное соединение 79b получили по стандартным способам в автоматическом синтезаторе ДНК/РНК (см. Dupouy et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2006, 45, 3623-3627). GalNAc₃-2-кластерный фосфорамидит, соединение 79 получили по способам, представленным в примере 35. Альтернативный способ обеспечивает возможность одностадийной установки фосфодиэфир-связанного GalNAc₃-2 конъюгата на олигомерное соединение на последней стадии синтеза. Изображенные фосфорамидиты являются иллюстративными, и их не следует считать ограничением, поскольку могут быть использованы другие фосфорамидитные строительные блоки, включая, но не ограничиваясь ими, те, которые представлены в данном описании, для получения олигомерных соединений, содержащих фосфодиэфирный конъюгат у 5'-конца. Порядок и количество фосфорамидитов, добавляемых к твердой подложке, может быть подобрано для получения олигомерных соединений, описанных в настоящем документе, которые имеют любую заданную последовательность и состав.

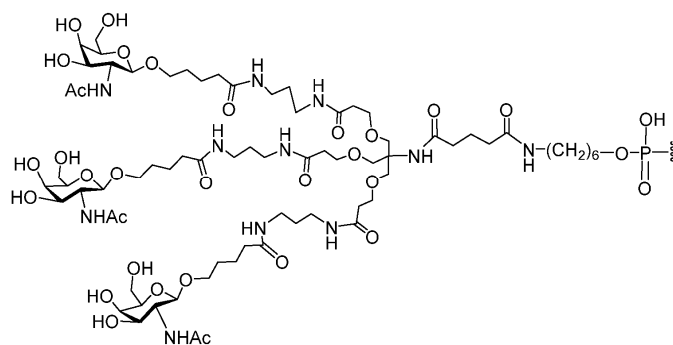
Пример 39. Общий способ получения олигомерного соединения 83h, содержащего конъюгат GalNAc₃-3 у 5'-конца (GalNAc₃-1, модифицированный для 5'-концевого присоединения), via твердой под-

ЛОЖКИ.

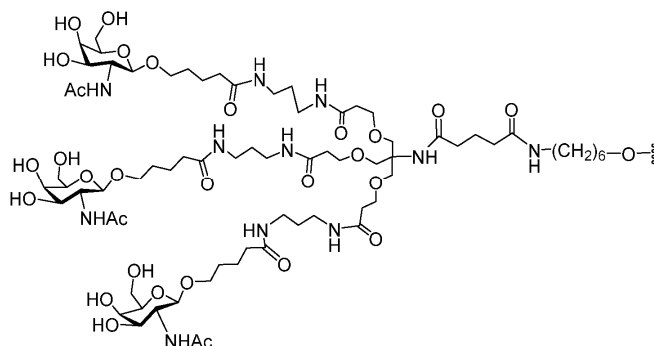


Соединение 18 получили по способам, представленным в примере 4. Соединения 83a и 83b имеются в продаже. Олигомерное соединение 83e, содержащее связанный через фосфодиэфир гексиламин, получили по стандартным способам синтеза олигонуклеотидов. В результате обработки защищенного олигомерного соединения водным раствором аммиака получили 5'-GalNAc₃-3 сопряженное олигомерное соединение (83h).

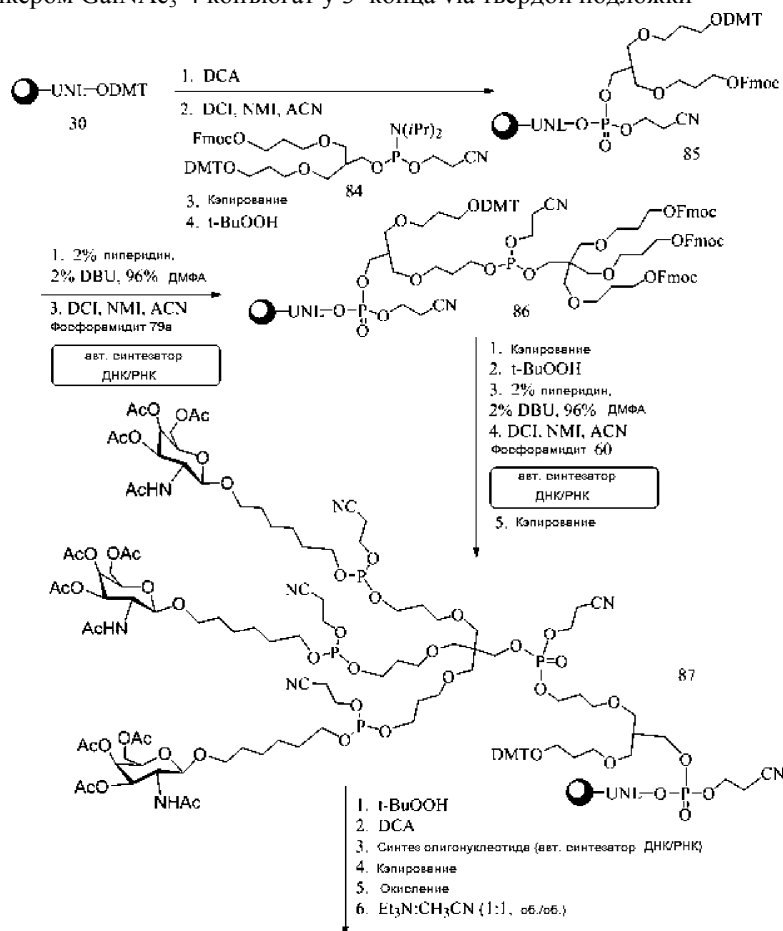
где GalNAc₃-3 имеет структуру

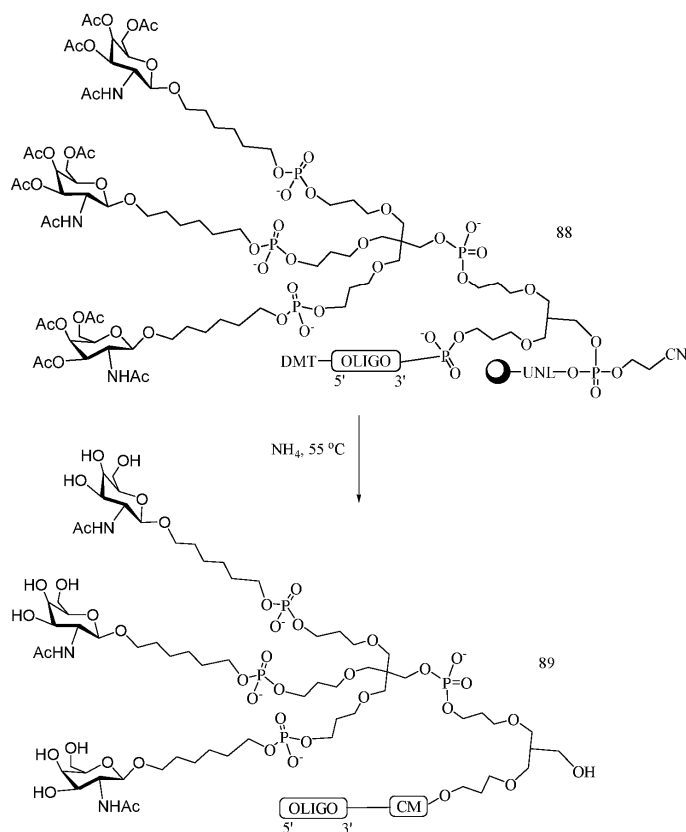


Кластерная часть GalNAc_3 группы конъюгата $\text{GalNAc}_3\text{-3}$ ($\text{GalNAc}_3\text{-3}_a$) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных групп конъюгата. Где $\text{GalNAc}_3\text{-3}_a$ имеет формулу

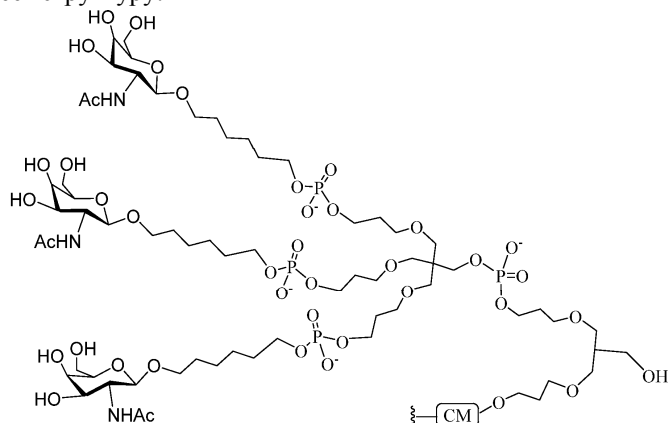


Пример 40. Общий способ получения олигомерного соединения 89, содержащего связанный фосфодиэфирным линкером GalNAc₃-4 конъюгат у 3'-конца *via* твердой подложки

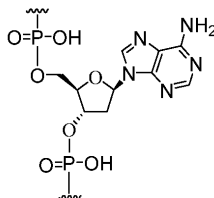




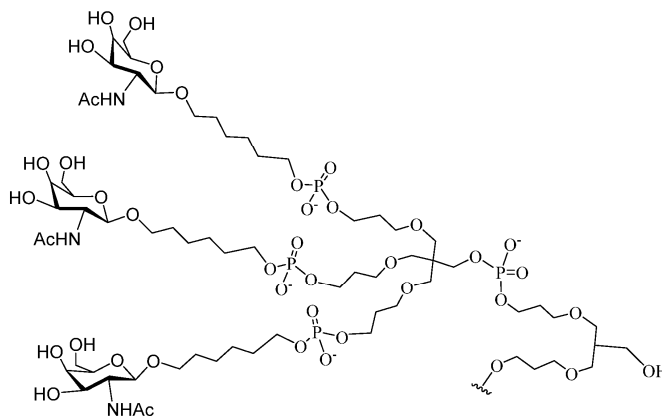
Где GalNAc₃-4 имеет структуру:



Где CM представляет собой расщепляемый фрагмент. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент представляет собой:



Кластерная часть GalNAc₃ группы конъюгата GalNAc₃-4 (GalNAc₃-4_a) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных групп конъюгата. Где GalNAc₃-4_a имеет формулу:



Защищенное соединение 30 на функционализированной твердой подложке Unylinker имеется в продаже. Соединение 84 получили по таким же способам, как описаны в литературе (см. Shchepinov et al., *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22), 4447-4454; Shchepinov et al., *Nucleic Acids Research*, 1999, 27, 3035-3041; и Horner et al., *Nucleic Acids Research*, 1997, 25, 4842-4849).

Фосфорамидитные строительные блоки, соединения 60 и 79a, получили так, как описано в способах в примерах 28 и 36. Изображенные фосфорамидиты являются иллюстративными и не предназначены для ограничения, поскольку могут быть использованы другие фосфорамидитные строительные блоки для получения олигомерного соединения, имеющего фосфодиэфир-связанный конъюгат у 3'-конца и заданную последовательность и состав. Порядок и количество фосфорамидитов, добавляемых к твердой подложке, может быть подобрано для получения олигомерных соединений, описанных в настоящем документе, которые имеют любую заданную последовательность и состав.

Пример 41. Общий способ получения ASO, содержащих фосфодиэфир-связанный конъюгат GalNAc₃-2 (см. пример 37, Вх представляет собой аденин) в 5'-положении via твердофазному способу (получение ISIS 661134).

Если не указано иное, все реагенты и растворы, использованные для синтеза олигомерных соединений, приобретены у коммерческих поставщиков. Стандартные фосфорамидитные строительные блоки и твердую подложку использовали для внедрения нуклеозидных остатков, которые включают, например, остатки Т, А, G и ¹³C. Фосфорамидитные соединения 56 и 60 использовали для синтеза фосфодиэфир-связанного конъюгата GalNAc₃-2 у 5'-конца. 0,1 М раствор фосфорамидита в безводном ацетонитриле использовали для β-D-2'-дезоксирибонуклеозида и 2'-МОЕ.

Синтез антисмысловых олигонуклеотидов (ASO) выполнили на синтезаторе ABI 394 (в масштабе 1-2 мкмоль) или на синтезаторе AKTA Oligopilot производства GE Healthcare Bioscience (в масштабе 40-200 мкмоль) по способу фосфорамидитного связывания на твердой подложке VIMAD (110 мкмоль/г, Guzaev et al., 2003), упакованной в колонку. Для стадии связывания фосфорамидиты вводили в 4-кратном избытке по сравнению с исходной загрузкой на твердой подложке, а конденсацию фосфорамидита выполняли в течение 10 мин. Все остальные стадии выполняли по стандартным протоколам, предоставленным производителем. Для удаления диметокситритильных (DMT) групп с 5'-гидроксильных групп нуклеотида использовали 6% раствор дихлоруксусной кислоты в толуоле. На стадии связывания в качестве активатора использовали 4,5-дицианоимидазол (0,7 М) в безводном CH₃CN. Тиофосфатные связи внедряли сульфированием при помощи 0,1 М раствора гидроксида ксанта в 1:1 смеси пиридина/CH₃CN в течение 3 мин времени контакта. В качестве окислительного агента для получения фосфодиэфирных меженуклеозидных связей использовали 20% раствор трет-бутилгидропероксида в CH₃CN, содержащий 6% воды, в течение 12 мин времени контакта.

После сборки требуемой последовательности цианоэтил-фосфатные защитные группы снимали при помощи 20% диэтиламина в толуоле (об./об.) в течение 45 мин времени контакта. Связанные с твердой подложкой ASO суспендировали в водном растворе аммиака (28-30 мас.%) и нагревали при 55°C в течение 6 ч.

Затем отфильтровывали не связанные ASO и выпаривали аммиак кипячением. Остаток очищали жидкостной хроматографией высокого давления на сильной анионообменной колонке (GE Healthcare Bioscience, Source 30Q, 30 мкм, 2,54 × 8 см, А = 100 мМ ацетата аммония в 30% водном CH₃CN, В = 1,5 М NaBr в А, 0-40% В за 60 мин, скорость потока 14 мл·мин⁻¹, λ = 260 нм). Остаток обессоливали при помощи ВЭЖХ на обращенно-фазовой колонке с получением заданных ASO с выделенным выходом 15-30% относительно первоначальной загрузки на твердую подложку. ASO характеризовали при помощи ион-парной ВЭЖХ, совмещенной с МС-анализом на системе Agilent 1100 MSD.

Таблица 34

ASO, содержащие фосфодиэфир-связанный конъюгат GalNAc₃-2 в 5'-положении, направленные на SRB-1

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Расчетная масса	Наблюдаемая масса	SEQ ID NO
661134	GalNAc₃-2a- o'A _{do} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	6482,2	6481,6	827

Нижние индексы: "e" означает 2'-MOE модифицированный нуклеозид; "d" означает β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "k" означает 6'-(S)-CH₃ бициклический нуклеозид (например, cEt); "s" означает тиофосфатные межнуклеозидные связи (PS); "o" означает фосфодиэфирные межнуклеозидные связи (PO); и "o" означает -O-P(=O)(OH)-. Верхний индекс "m" означает 5-метилцитозины. Структура GalNAc₃-2_a показана в примере 37.

Пример 42. Общий способ получения ASO, содержащих конъюгат GalNAc₃-3 в 5'-положении, via твердофазным методикам (получение ISIS 661166).

Синтез ISIS 661166 выполнили по таким же способам, как представлены в примерах 39 и 41.

ISIS 661166 представляет собой 5-10-5 MOE гэлмер, в котором 5'-положение содержит конъюгат GalNAc₃-3. Это ASO характеризовали при помощи ион-парной ВЭЖХ, совмещенной с МС-анализом на системе Agilent 1100 MSD.

Таблица 34a

ASO, содержащее конъюгат GalNAc₃-3 в 5'-положении через гексиламино-фосфодиэфирный линкер, направленное на Malat-1

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Конъюгат	Расчетная масса	Наблюдаемая масса	SEQ ID NO
661166	5'- GalNAc₃-3a-o ^m C _{es} G _{es} G _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{es} A _{es} A _{es} T _{es} T _e	5'-GalNAc₃-3	8992,16	8990,51	828

Нижние индексы: "e" означает 2'-MOE модифицированный нуклеозид; "d" означает β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "s" означает тиофосфатные межнуклеозидные линкеры (PS); "o" означает фосфодиэфирные межнуклеозидные линкеры (PO); и "o" означает OP(=O)(OH)-. Верхний индекс "m" означает 5-метилцитозины. Структура "5'-GalNAc₃-3_a" показана в примере 39.

Пример 43. Дозозависимое исследование фосфодиэфир-связанного GalNAc₃-2 (см. примеры 37 и 41, Вх представляет собой аденин) у 5'-конца, направленного на SRB-1, in vivo ISIS 661134 (см. пример 41), содержащий фосфодиэфир-связанный конъюгат GalNAc₃-2 у 5'-конца, испытывали в дозозависимом исследовании на антисмысловое ингибирование SRB-1 у мышей. Несопряженные ISIS 440762 и 651900 (конъюгат (GalNAc₃-1 у 3'-конца, см. пример 9) включены в исследование для сравнения и описаны ранее в табл. 17.

Лечение.

Шестинедельным самцам мышей Balb/c (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) ввели однократную подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, соединения ISIS 440762, 651900, 661134 или PBS в качестве контрольного образца. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей усыпили через 72 ч после последнего введения для определения уровней мРНК SRB-1 в печени при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Уровни мРНК SRB-1 определяли относительно общей РНК (при помощи Ribogreen), затем нормализовали к контрольному образцу, обработанному PBS. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней мРНК SRB-1 для каждой экспериментальной группы, нормализованных к контрольному образцу, обработанному PBS, и обозначены как "% PBS". ED₅₀ измеряли по таким же способам, как описаны ранее, и указанные значения представлены ниже.

Как показано в табл. 35, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК SRB-1 дозозависимым образом. Действительно, антисмысловые олигонуклеотиды, содержащие фосфодиэфир-связанный конъюгат GalNAc₃-2 у 5'-конца (ISIS 661134) или конъюгат GalNAc₃-1, связанный у 3'-конца (ISIS 651900), демонстрируют значительное улучшение эффективности, по сравнению с несопряженным антисмысловым олигонуклеотидом (ISIS 440762). Кроме того, ISIS 661134, который содержит фосфодиэфир-связанный конъюгат GalNAc₃-2 у 5'-конца, был настолько же эффективным, как ISIS 651900, который содержит конъюгат GalNAc₃-1 у 3'-конца.

Таблица 35

ASO, содержащие GalNAc₃-1 или GalNAc₃-2, направленные на SRB-1

ISIS №	Доза (мг/кг)	Уровни мРНК SRB-1 (% PBS)	ED ₅₀ (мг/кг)	Конъюгат	SEQ ID NO
PBS	0	100	--	--	
440762	0,2	116	2,58	Без конъюгата	823
	0,7	91			
	2	69			
	7	22			
	20	5			
651900	0,07	95	0,26	3' GalNAc ₃ -1	824
	0,2	77			
	0,7	28			
	2	11			
	7	8			
661134	0,07	107	0,25	5' GalNAc ₃ -2	827
	0,2	86			
	0,7	28			
	2	10			
	7	6			

Структуры 3' GalNAc₃-1 и 5' GalNAc₃-2 описаны ранее в примерах 9 и 37.

Фармакокинетический анализ (ФК).

ФК для ASO из группы высокой дозы (7 мг/кг) исследовали и оценили таким же образом, как описано в примере 20. Образцы печени измельчили и экстрагировали по стандартным протоколам. Идентифицировали метаболиты полной длины 661134 (5' GalNAc₃-2) и ISIS 651900 (3' GalNAc₃-1) и подтвердили их массы при помощи масс-спектрометрического анализа высокого разрешения. Результаты показали, что основной метаболит, обнаруженный для ASO, содержащего фосфодиэфир-связанный конъюгат GalNAc₃-2 у 5'-конца (ISIS 661134), представлял собой ISIS 440762 (данные не показаны). Не наблюдали никаких дополнительных метаболитов в обнаруживаемом количестве. В отличие от него, для ASO, содержащего конъюгат GalNAc₃-1 у 3'-конца (ISIS 651900), наблюдали дополнительные метаболиты, аналогичные тем, которые описаны ранее в табл. 23а. Эти результаты позволяют предположить, что наличие фосфодиэфир-связанного конъюгата GalNAc₃-1 или GalNAc₃-2 может улучшать ФК профиль ASO без ухудшения их эффективности.

Пример 44. Влияние PO/PS линкеров на антисмысловое ингибирование ASO, содержащих конъюгат GalNAc₃-1 (см. пример 9) у 3'-конца, направленных на SRB-1.

ISIS 655861 и 655862, содержащие конъюгат GalNAc₃-1 у 3'-конца, каждый из которых направлен на SRB-1, испытали в исследовании однократного введения на их способность ингибировать SRB-1 у мышей. Исходное несопряженное соединение, ISIS 353382, включили в исследование для сравнения.

Эти ASO представляют собой 5-10-5 МОЕ гэммеры, в которых гэм-область содержит десять 2'-дезоксирибонуклеозидов, и каждая область крыльев содержит пять 2'-МОЕ модифицированных нуклеозидов. Эти ASO получили по таким же способам, как показаны ранее в примере 19, и они описаны ниже в табл. 36.

Таблица 36

Модифицированные ASO, содержащие конъюгат GalNAc₃-1 у 3'-конца, направленные на SRB-1

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Химизм	SEQ ID NO
353382 (исходная)	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	Полностью PS, без конъюгата	829
655861	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A_{do}'-GalNAc3-1_a	Полностью PS с конъюгатом GalNAc3-1	830
655862	G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds}	Смесь PS/PO	830
	^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A_{do}'-GalNAc3-1_a	с конъюгатом GalNAc3-1	

Нижние индексы: "e" означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид; "d" означает β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "s" означает тиофосфатные межнуклеозидные линкеры (PS); "o" означает фосфодиэфирные межнуклеозидные линкеры (PO); и "o'" означает OP(=O)(OH)-. Верхний индекс "m" означает 5-метилцитозины. Структура "GalNAc₃-1" показана в примере 9.

Лечение.

Шестинедельным самцам мышей Balb/c (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) ввели однократную подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, соединения ISIS 353382, 655861, 655862 или PBS в качестве контрольного образца. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Перед лечением, а также после последней дозы у каждой мыши брали кровь и анализировали образцы плазмы. Мышей усыпили через 72 ч после последнего введения для определения уровней мРНК SRB-1 в печени при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Уровни мРНК SRB-1 определяли относительно общей РНК (при помощи Ribogreen), затем нормализовали к контрольному образцу, обработанному PBS. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней мРНК SRB-1 для каждой экспериментальной группы, нормализованных к контрольному образцу, обработанному PBS, и обозначены как "% PBS". ED₅₀ измеряли по таким же способам, как описаны ранее, и указанные значения представлены ниже.

Как показано в табл. 37, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК SRB-1 дозозависимым образом, по сравнению с контрольным образцом, обработанным PBS. Действительно, антисмысловые олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc₃-1 у 3'-конца (ISIS 655861 и 655862), демонстрируют значительное усиление эффективности, по сравнению с несопряженным антисмысловым олигонуклеотидом (ISIS 353382). Кроме того, ISIS 655862 со смешанными PS/PO линкерами демонстрирует усиление эффективности, по сравнению с соединением, содержащим только PS (ISIS 655861).

Таблица 37

Влияние PO/PS линкеров на антисмысловое ингибирование ASO, содержащих конъюгат GalNAc₃-1 у 3'-конца, направленных на SRB-1

ISIS №	Доза (мг/кг)	Уровни мПНК SRB-1 (% PBS)	ED ₅₀ (мг/кг)	Химизм	SEQ ID NO
PBS	0	100	--	--	
353382 (исходная)	3	76,65	10,4	Полностью PS, без конъюгата	829
	10	52,40			
	30	24,95			
655861	0,5	81,22	2,2	Полностью PS с конъюгатом GalNAc ₃ -1	830
	1,5	63,51			
	5	24,61			
	15	14,80			
655862	0,5	69,57	1,3	Смесь PS/PO с конъюгатом GalNAc ₃ -1	830
	1,5	45,78			
	5	19,70			
	15	12,90			

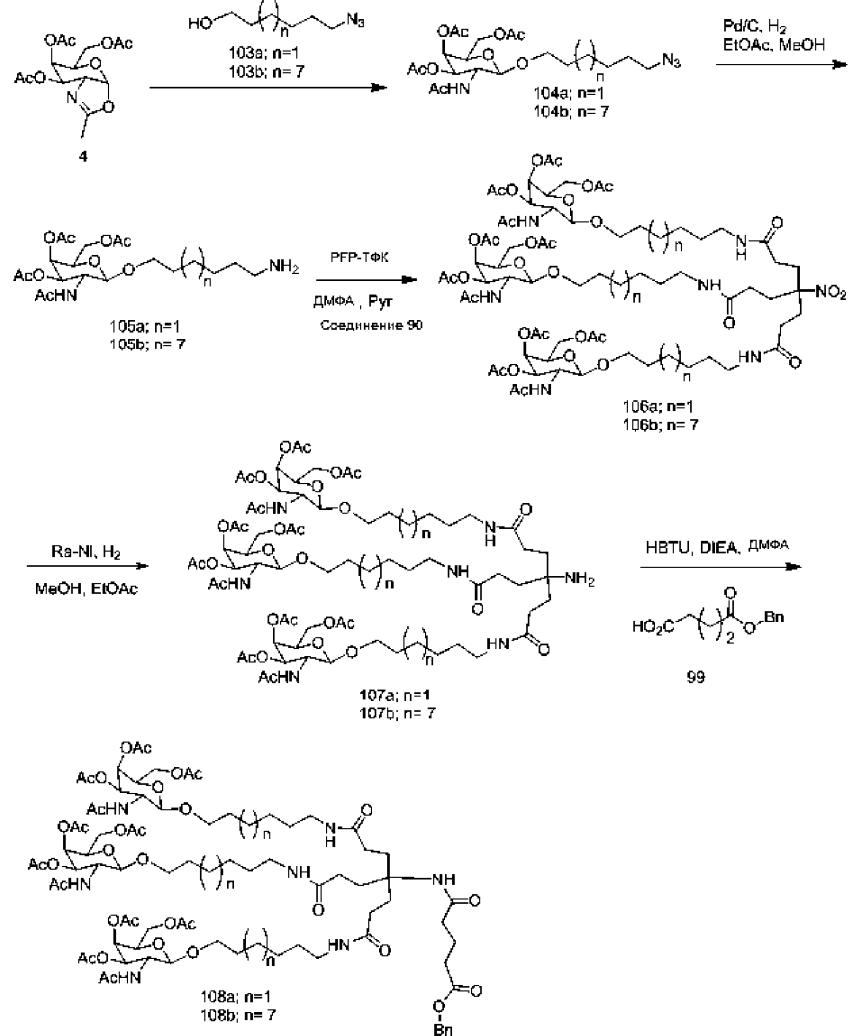
Уровни трансаминазы в печени, аланин-аминотрансферазы (ALT) и аспартат-аминотрансферазы (AST) в сыворотке измеряли относительно мышей, инъецированных солевым раствором, используя стандартные протоколы. Оценили также массу органов. Результаты показывают, что не наблюдали какого-либо увеличения уровней трансаминазы (табл. 38) или массы органов (данные не показаны) у мышей, обработанных ASO, по сравнению с PBS контролем. Кроме того, ASO со смешанными PS/PO линкерами (ISIS 655862) демонстрирует схожие уровни трансаминазы, по сравнению с соединением, содержащим только PS (ISIS 655861).

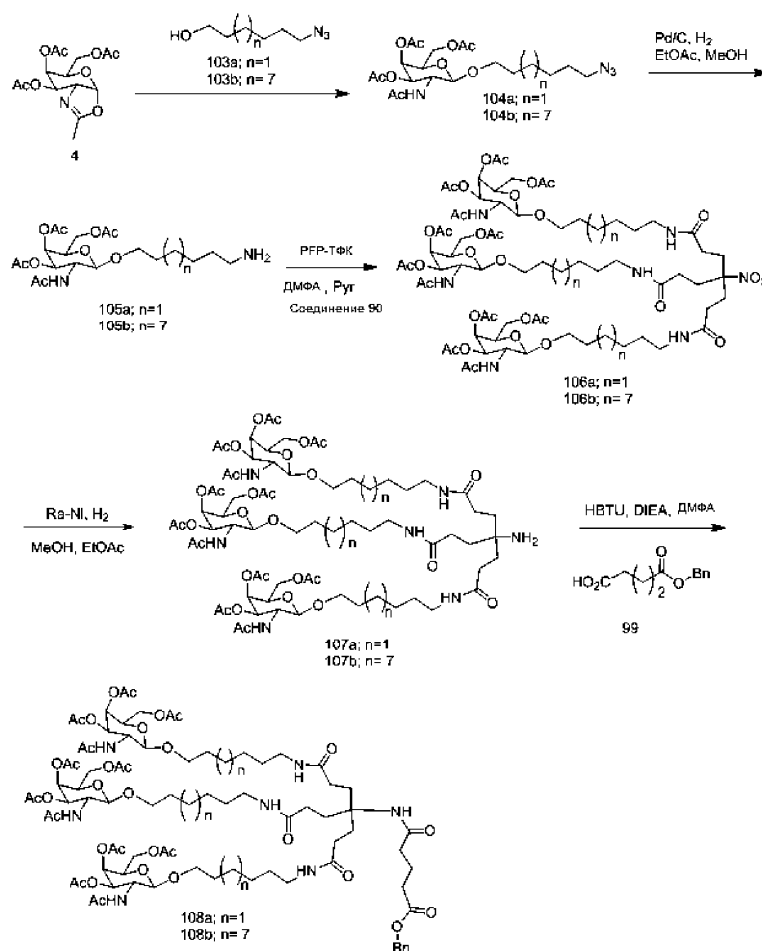
Таблица 38

Влияние PO/PS линкеров на уровни трансаминазы ASO, содержащих конъюгат GalNAc₃-1 у 3'-конца, направленных на SRB-1

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Химизм	SEQ ID NO
PBS	0	28,5	65	--	
353382 (исходная)	3	50,25	89	Полностью PS, без конъюгата	829
	10	27,5	79,3		
	30	27,3	97		
655861	0,5	28	55,7	Полностью PS с GalNAc ₃ -1	830
	1,5	30	78		
	5	29	63,5		
	15	28,8	67,8		
655862	0,5	50	75,5	Смесь PS/PO с GalNAc ₃ -1	830
	1,5	21,7	58,5		
	5	29,3	69		
	15	22	61		

Пример 45. Получение PFP эфира, соединения 110a





Соединение 4 (9,5 г, 28,8 ммоль) обрабатывали по отдельности соединением 103а или 103b (38 ммоль) и TMSOTf (0,5 экв.), и молекулярными ситами в дихлорметане (200 мл), и перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре. Затем органический слой отфильтровали через целит, затем промыли бикарбонатом натрия, водой и насыщенным соевым раствором. Затем отделили органический слой и высушили над сульфатом натрия, отфильтровали и упарили при пониженном давлении. Полученное маслянистое вещество очистили хроматографией на силикагеле (2%→10% метанол/дихлорметан) с получением соединений 104а и 104b с выходом >80%. Данные ЖХМС и протонного ЯМР согласовались с указанной структурой.

Соединения 104а и 104b обрабатывали в тех же условиях, что и соединения 100а-d (пример 47), с получением соединений 105а и 105b с выходом >90%. Данные ЖХМС и протонного ЯМР согласовались с указанной структурой.

Соединения 105а и 105b по отдельности обрабатывали соединением 90 при тех же условиях, что и соединения 901а-d, с получением соединений 106а (80%) и 106b (20%). Данные ЖХМС и протонного ЯМР согласовались с указанной структурой.

Соединения 106а и 106b обрабатывали в тех же условиях, что и соединения 96а-d (пример 47), с получением соединений 107а (60%) и 107b (20%). Данные ЖХМС и протонного ЯМР согласовались с указанной структурой.

Соединения 107а и 107b обрабатывали в тех же условиях, что и соединения 97а-d (пример 47), с получением соединений 108а and 108b с выходом 40-60%. Данные ЖХМС и протонного ЯМР согласовались с указанной структурой.

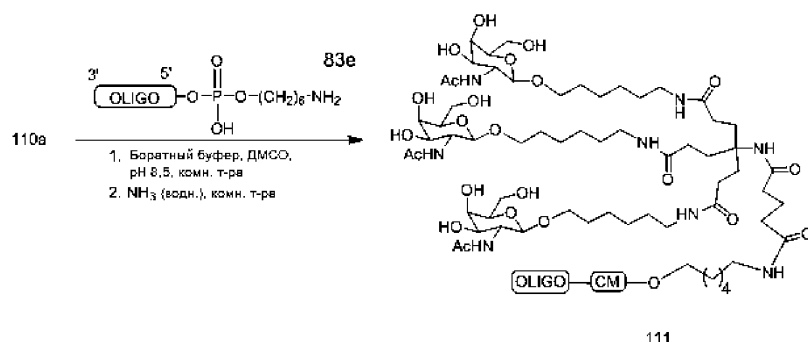
Соединения 108а (60%) и 108b (40%) обрабатывали в тех же условиях, что и соединения 100а-d (пример 47), с получением соединений 109а и 109b с выходом >80%. Данные ЖХМС и протонного ЯМР согласовались с указанной структурой.

Соединение 109а обрабатывали в тех же условиях, что и соединения 101а-d (пример 47), с получением соединения 110а с выходом 30-60%. Данные ЖХМС и протонного ЯМР согласовались с указанной структурой. Альтернативно, соединение 110b может быть получено таким же образом, исходя из Соединения 109b.

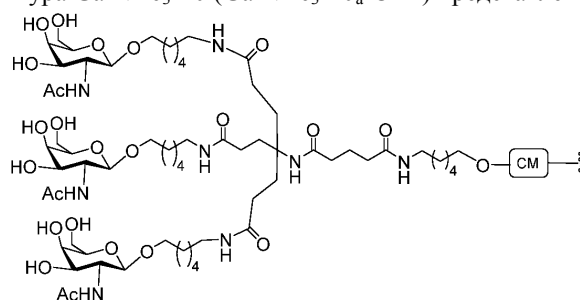
Пример 46. Общий способ сопряжения с PFP эфирами (олигонуклеотид 111); получение ISIS 666881 (GalNAc₃-10).

Синтезировали и очистили 5'-гексиламино-модифицированный олигонуклеотид по стандартным способам твердофазного получения олигонуклеотидов. 5'-Гексиламино-модифицированный олигонукле-

отид растворили в 0,1 М растворе тетрабората натрия, pH 8,5 (200 мкл) и добавили 3 эквивалента выбранного PFP-эстерифицированного кластера GalNAc₃, растворенного в ДМСО (50 мкл). Если при добавлении раствора ASO эфир PFP выпадал в осадок, то добавляли ДМСО до перехода всего эфира PFP в раствор. Реакция была завершена примерно через 16 ч перемешивания при комнатной температуре. Полученный раствор разбавили водой до 12 мл, а затем центрифугировали при 3000 об/мин в центробежном фильтре с отсечением по массе 3000 Да. Этот прием повторили два раза для удаления низкомолекулярных примесей. Затем раствор лиофилизировали досуха и повторно растворили в концентрированном водном растворе аммиака, и перемешивали при комнатной температуре в течение 2,5 часов, затем концентрировали *in vacuo* для удаления большей части аммиака. Сопряженный олигонуклеотид очистили и обессолили при помощи ОФ-ВЭЖХ, и лиофилизировали с получением GalNAc₃ сопряженного олигонуклеотида.



Олигонуклеотид 111 сопряжен с GalNAc₃-10. Кластерная часть GalNAc₃ группы конъюгата GalNAc₃-10 (GalNAc₃-10_a) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных групп конъюгата. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент представляет собой -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-, как показано ниже в олигонуклеотиде (ISIS 666881), синтезированном с GalNAc₃-10. Структура GalNAc₃-10 (GalNAc₃-10_a-CM-) представлена ниже:



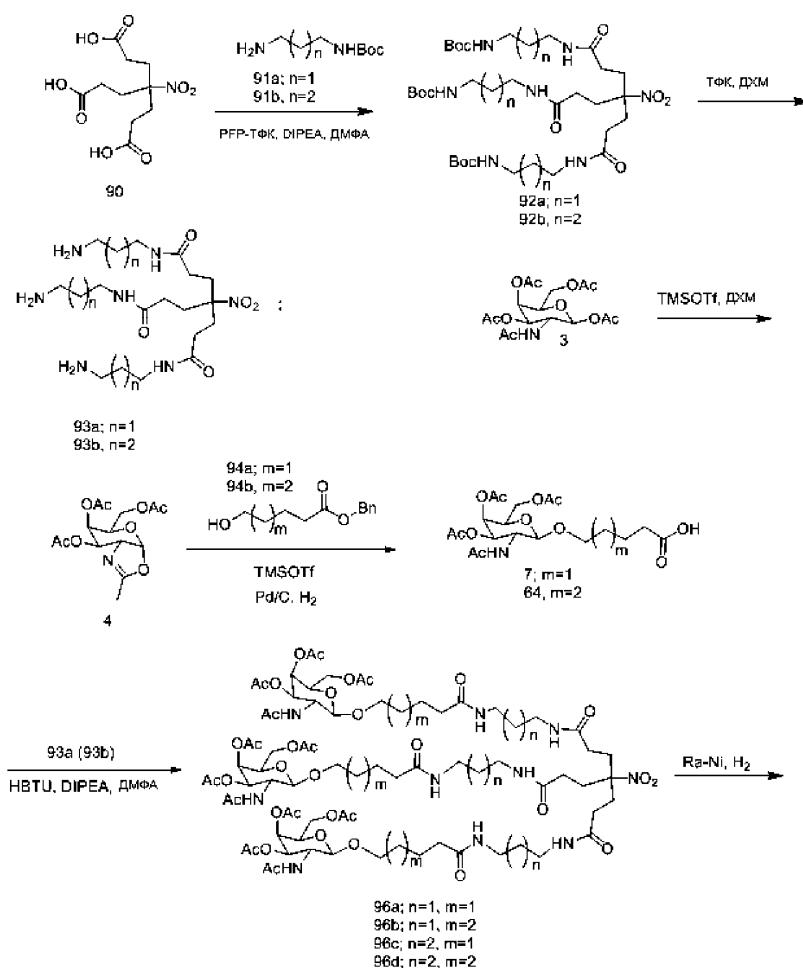
По указанному общему способу получили ISIS 666881. Синтезировали и очистили 5'-гексиламино-модифицированный олигонуклеотид, ISIS 660254, по стандартным способам твердофазного получения олигонуклеотидов. ISIS 660254 (40 мг, 5,2 мкмоль) растворили в 0,1 М растворе тетрабората натрия, pH 8,5 (200 мкл) и добавили 3 эквивалента PFP эфира (Соединения 110а), растворенного в ДМСО (50 мкл). Эфир PFP выпал в осадок при добавлении раствора ASO, поэтому потребовалось добавление дополнительного количества ДМСО (600 мкл) для полного растворения PFP эфира. Реакция была завершена через 16 ч перемешивания при комнатной температуре. Раствор разбавили водой до общего объема 12 мл, а затем центрифугировали при 3000 об/мин в центробежном фильтре с отсечением по массе 3000 Да. Этот прием повторили два раза для удаления низкомолекулярных примесей. Раствор лиофилизировали досуха и повторно растворили в концентрированном водном растворе аммиака, перемешивая при комнатной температуре в течение 2,5 часов, затем концентрировали *in vacuo* для удаления большей части аммиака. Сопряженный олигонуклеотид очистили и обессолили при помощи ОФ-ВЭЖХ, и лиофилизировали с получением ISIS 666881 с выходом 90% по массе (42 мг, 4,7 мкмоль).

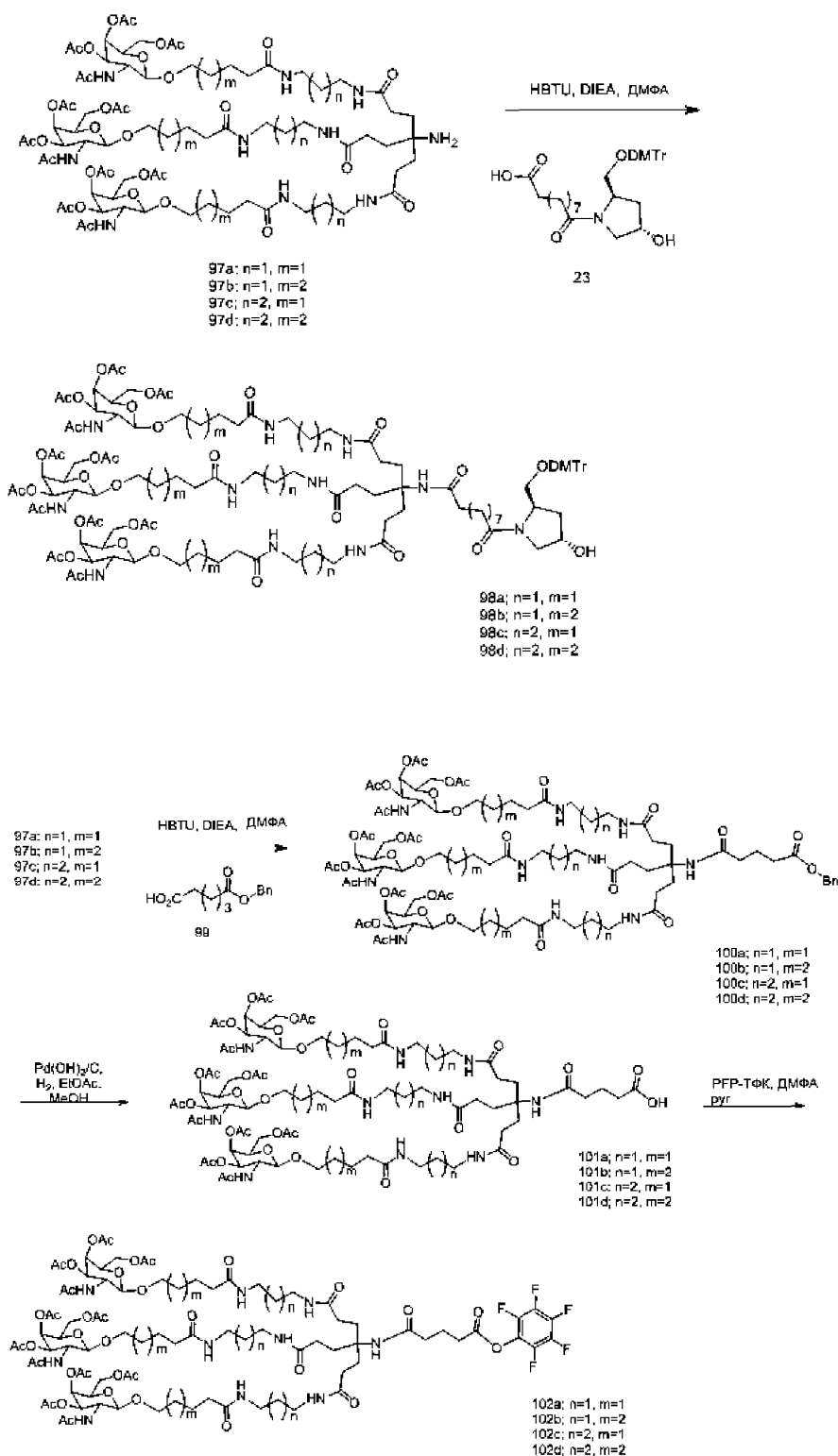
GalNAc₃-10-сопряженный олигонуклеотид.

ASO	Последовательность (от 5' к 3')	5'-группа	SEQ ID NO
ISIS 660254	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6-$ ${}^{\text{o}}\text{A}_{\text{do}}\text{G}_{\text{es}}{}^{\text{m}}\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}{}^{\text{m}}\text{C}_{\text{es}}\text{A}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}$ ${}^{\text{m}}\text{C}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}{}^{\text{m}}\text{C}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{es}}{}^{\text{m}}\text{C}_{\text{es}}{}^{\text{m}}\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{e}}$	Гексиламин	831
ISIS 666881	GalNAc₃-10a- ${}^{\text{o}}\text{A}_{\text{do}}\text{G}_{\text{es}}{}^{\text{m}}\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}{}^{\text{m}}\text{C}_{\text{es}}\text{A}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}$ ${}^{\text{m}}\text{C}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}{}^{\text{m}}\text{C}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{es}}{}^{\text{m}}\text{C}_{\text{es}}{}^{\text{m}}\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{e}}$	GalNAc₃-10	831

Заглавные буквы указывают нуклеосид для каждого нуклеотида, а ^mC означает 5-метилцитозин. Нижние индексы: "e" означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид; "d" означает β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "s" означает тиофосфатный межнуклеозидный линкер (PS); "o" означает фосфодиэфирный межнуклеозидный линкер (PO); и "o"" означает OP(=O)(OH)-. Группы конъюгата выделены жирным.

Пример 47. Получение олигонуклеотида 102, содержащего GalNAc₃-8





Трехкислотное соединение 90 (4 г, 14,43 ммоль) растворили в ДМФА (120 мл) и N,N-диизопропилэтиламин (12,35 мл, 72 ммоль). По каплям добавили пентафторфенила трифторацетат (8,9 мл, 52 ммоль) в атмосфере аргона и оставили реакционную смесь перемешиваться при комнатной температуре в течение 30 мин. Добавили Вос-диамин 91a или 91b (68,87 ммоль) вместе с N,N-диизопропилэтиламином (12,35 мл, 72 ммоль) и оставили реакционную смесь перемешиваться при комнатной температуре в течение 16 ч. Затем упарили ДМФА на >75% при пониженном давлении, а затем растворили смесь в дихлорметане. Органический слой промыли бикарбонатом натрия, водой и насыщенным соевым раствором. Затем отделили органический слой и высушили над сульфатом натрия, отфильтровали и упарили при пониженном давлении до маслянистого остатка. Полученное маслянистое вещество очистили хроматографией на силикагеле (2% → 10% метанол/дихлорметан) с получением соединений 92a и 92b с приблизительным выходом 80%. Данные ЖХМС и протонного ЯМР согласовались

с указанной структурой.

Соединение 92a или 92b (6,7 ммоль) обрабатывали 20 мл дихлорметана и 20 мл трифторуксусной кислоты при комнатной температуре в течение 16 ч. Полученный раствор выпарили, а затем растворили в метаноле и обрабатывали смолой DOWEX-OH в течение 30 мин. Полученный раствор отфильтровали и упарили до маслянистого вещества при пониженном давлении с получением 85-90% выхода соединений 93a и 93b.

Соединения 7 или 64 (9,6 ммоль) обрабатывали HBTU (3,7 г, 9,6 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламино (5 мл) в ДМФА (20 мл) в течение 15 мин. К смеси добавили либо соединение 93a, либо 93b (3 ммоль) и оставили перемешиваться при комнатной температуре на 16 ч. Затем упарили ДМФА на >75% при пониженном давлении, а затем растворили смесь в дихлорметане. Органический слой промыли бикарбонатом натрия, водой и насыщенным соевым раствором. Затем отделили органический слой и высушили над сульфатом натрия, отфильтровали и упарили при пониженном давлении до маслянистого остатка. Полученное маслянистое вещество очистили хроматографией на силикагеле (5%->20% метанол/дихлорметан) с получением соединений 96a-d с выходом 20-40%. Данные ЖХМС и протонного ЯМР согласовались с указанной структурой.

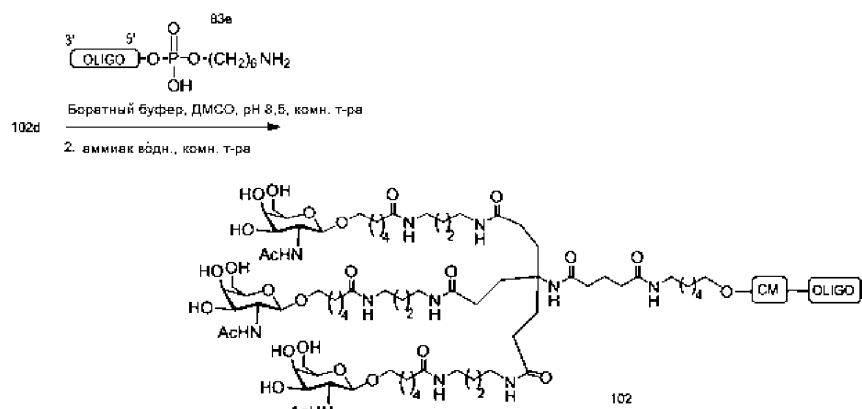
Соединения 96a-d (0,75 ммоль) по отдельности гидрировали на никеле Ренея в течение 3 часов в этаноле (75 мл). Затем катализатор удалили фильтрованием через целит, а этанол удалили при пониженном давлении с получением соединений 97a-d с выходом 80-90%. Данные ЖХМС и протонного ЯМР согласовались с указанной структурой.

Соединение 23 (0,32 г, 0,53 ммоль) обрабатывали HBTU (0,2 г, 0,53 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламино (0,19 мл, 1,14 ммоль) в ДМФА (30 мл) в течение 15 мин. К смеси по отдельности добавили соединения 97a-d (0,38 ммоль) и оставили перемешиваться при комнатной температуре на 16 ч. Затем упарили ДМФА на >75% при пониженном давлении, а затем растворили смесь в дихлорметане. Органический слой промыли бикарбонатом натрия, водой и насыщенным соевым раствором. Затем отделили органический слой и высушили над сульфатом натрия, отфильтровали и упарили при пониженном давлении до маслянистого остатка. Полученное маслянистое вещество очистили хроматографией на силикагеле (2%->20% метанол/дихлорметан) с получением соединений 98a-d с выходом 30-40%. Данные ЖХМС и протонного ЯМР согласовались с указанной структурой.

Соединение 99 (0,17 г, 0,76 ммоль) обрабатывали HBTU (0,29 г, 0,76 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламино (0,35 мл, 2,0 ммоль) в ДМФА (50 мл) в течение 15 мин. К смеси по отдельности добавили соединения 97a-d (0,38 ммоль) и оставили перемешиваться при комнатной температуре на 16 ч. Затем упарили ДМФА на >75% при пониженном давлении, а затем растворили смесь в дихлорметане. Органический слой промыли бикарбонатом натрия, водой и насыщенным соевым раствором. Затем отделили органический слой и высушили над сульфатом натрия, отфильтровали и упарили при пониженном давлении до маслянистого остатка. Полученное маслянистое вещество очистили хроматографией на силикагеле (5%->20% метанол/дихлорметан) с получением соединений 100a-d с выходом 40-60%. Данные ЖХМС и протонного ЯМР согласовались с указанной структурой.

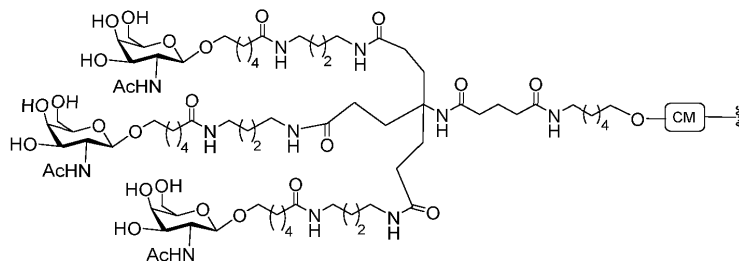
Соединения 100a-d (0,16 ммоль) по отдельности гидрировали на 10% Pd(OH)₂/C в течение 3 часов в метаноле/этилацетате (1:1, 50 мл). Затем катализатор удалили фильтрованием через целит, а органические растворители удалили при пониженном давлении с получением соединений 101a-d с выходом 80-90%. Данные ЖХМС и протонного ЯМР согласовались с указанной структурой.

Соединения 101a-d (0,15 ммоль) по отдельности растворили в ДМФА (15 мл) и пиридине (0,016 мл, 0,2 ммоль). По каплям добавили пентафторфенила трифторацетат (0,034 мл, 0,2 ммоль) в атмосфере аргона и оставили реакционную смесь перемешиваться при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем упарили ДМФА на >75% при пониженном давлении, а затем растворили смесь в дихлорметане. Органический слой промыли бикарбонатом натрия, водой и насыщенным соевым раствором. Затем отделили органический слой и высушили над сульфатом натрия, отфильтровали и упарили при пониженном давлении до маслянистого остатка. Полученное маслянистое вещество очистили хроматографией на силикагеле (2%->5% метанол/дихлорметан) с получением соединений 102a-d с приблизительным выходом 80%. Данные ЖХМС и протонного ЯМР согласовались с указанной структурой.

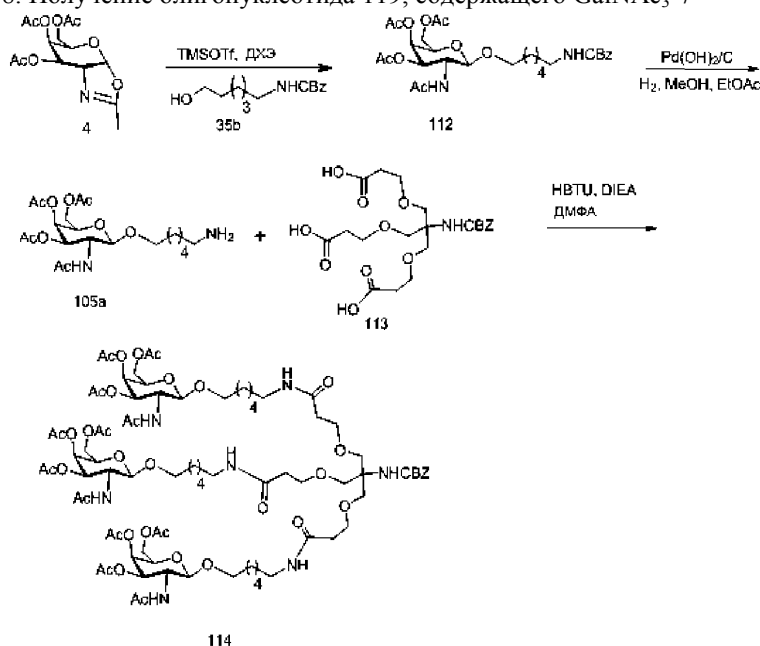


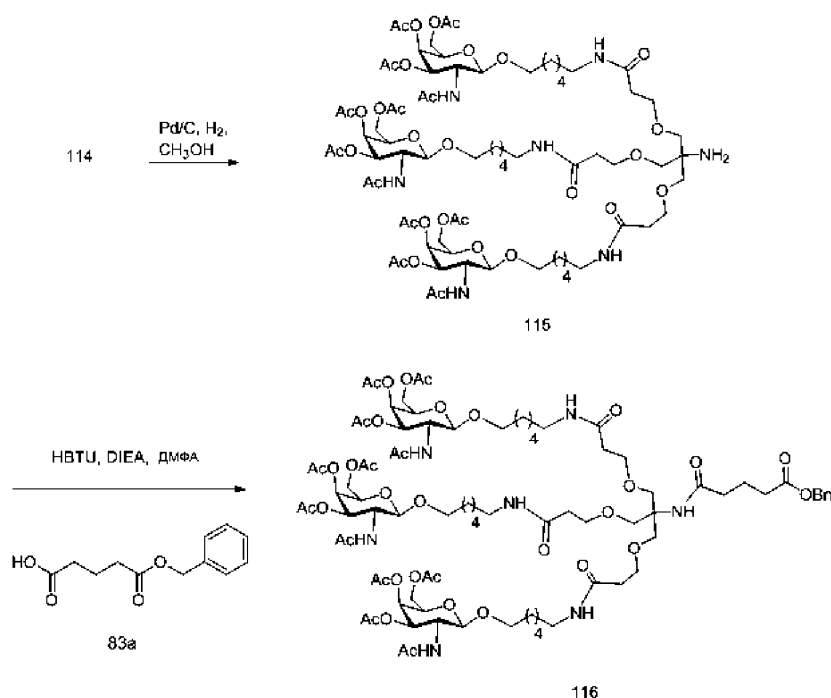
Олигомерное соединение 160, содержащее группу конъюгата GalNAc₃-8, получили по стандартным способам синтеза олигонуклеотидов. Кластерная часть GalNAc₃ группы конъюгата GalNAc₃-8 (GalNAc₃-8_a) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных групп конъюгата. В предпочтительном варианте реализации расщепляемый фрагмент представляет собой -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-.

Структура GalNAc₃-8 (GalNAc₃-8_a-CM-) представлена ниже:



Пример 48. Получение олигонуклеотида 119, содержащего GalNAc₃-7





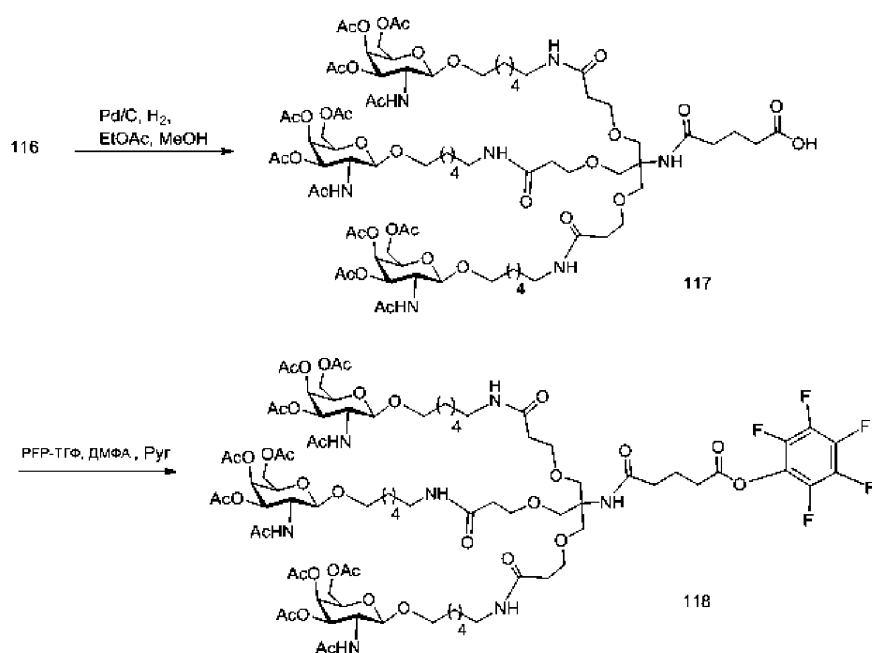
Соединение 112 синтезировали по способу, описанному в литературе (J. Med. Chem. 2004, 47, 5798-5808).

Соединение 112 (5 г, 8,6 ммоль) растворили в 1:1 смеси метанола/этилацетата (22 мл/22 мл). Добавили гидроксид палладия на углероде (0,5 г). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере водорода в течение 12 часов. Реакционную смесь отфильтровали через слой целита и промыли этот слой 1:1 смесью метанола/этилацетата. Фильтрат и промывочные растворы объединили и концентрировали досуха с получением соединения 105a (количественно). Структуру подтвердили по ЖХМС.

Соединение 113 (1,25 г, 2,7 ммоль), HBTU (3,2 г, 8,4 ммоль) и DIEA (2,8 мл, 16,2 ммоль) растворили в безводном ДМФА (17 мл) и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 5 мин. К этой смеси добавили раствор Соединения 105a (3,77 г, 8,4 ммоль) в безводном ДМФА (20 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 6 ч. Растворитель удалили при пониженном давлении с получением маслянистого вещества. Остаток растворили в CH₂Cl₂ (100 мл) и промыли насыщенным водным раствором NaHCO₃ (100 мл) и насыщенным соевым раствором (100 мл). Органическую фазу отделили, высушили (Na₂SO₄), отфильтровали и выпарили. Остаток очистили силикагелевой колоночной хроматографией и элюировали от 10 до 20% MeOH в дихлорметане с получением соединения 114 (1,45 г, 30%). Структуру подтвердили анализом ЖХМС и ¹H ЯМР.

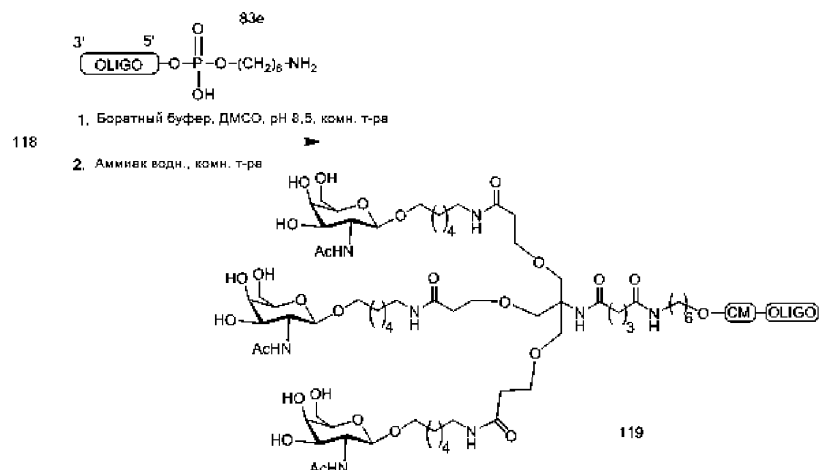
Соединение 114 (1,43 г, 0,8 ммоль) растворили в 1:1 смеси метанола/этилацетата (4 мл/4 мл). Добавили палладий на углероде (влажный, 0,14 г). Реакционную смесь продували водородом и перемешивали при комнатной температуре в атмосфере водорода в течение 12 часов. Реакционную смесь фильтровали через слой целита. Слой целита промыли метанолом/этилацетатом (1:1). Фильтрат и промывочные растворы объединили и выпарили при пониженном давлении с получением соединения 115 (количественно). Структуру подтвердили анализом ЖХМС и ¹H ЯМР.

Соединение 83a (0,17 г, 0,75 ммоль), HBTU (0,31 г, 0,83 ммоль) и DIEA (0,26 мл, 1,5 ммоль) растворили в безводном ДМФА (5 мл) и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 5 мин. К этой смеси добавили раствор Соединения 115 (1,22 г, 0,75 ммоль) в безводном ДМФА и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 6 ч. Растворитель удалили при пониженном давлении, а остаток растворили в CH₂Cl₂. Органический слой промыли насыщенным водным раствором NaHCO₃ и насыщенным соевым раствором, и высушили над безводным Na₂SO₄, и отфильтровали. Органический слой концентрировали досуха, а полученный остаток очистили силикагелевой колоночной хроматографией и элюировали от 3 до 15% MeOH в дихлорметане с получением соединения 116 (0,84 г, 61%). Структуру подтвердили анализом ЖХМС и ¹H ЯМР.

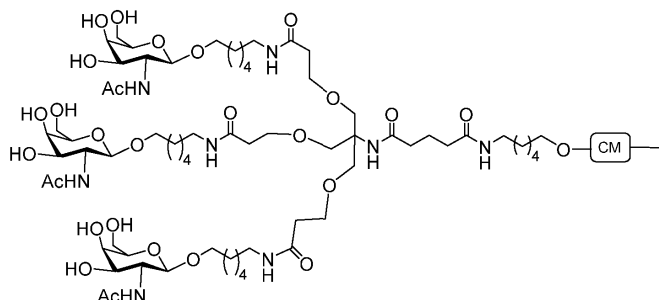
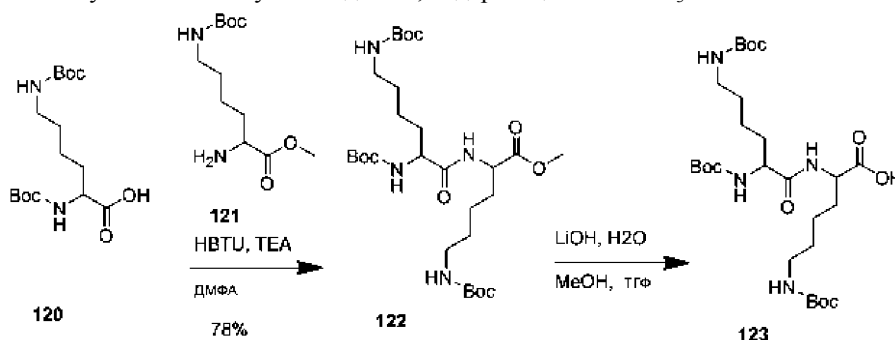


Соединение 116 (0,74 г, 0,4 ммоль) растворили в 1:1 смеси метанола/этилацетата (5 мл/5 мл). Добавили палладий на углероде (влажный, 0,074 г). Реакционную смесь продували водородом и перемешивали при комнатной температуре в атмосфере водорода в течение 12 часов. Реакционную смесь фильтровали через слой целита. Слой целита промыли метанолом/этилацетатом (1:1). Фильтрат и промывочные растворы объединили и выпарили при пониженном давлении с получением соединения 117 (0,73 г, 98%). Структуру подтвердили анализом ЖХМС и ^1H ЯМР.

Соединение 117 (0,63 г, 0,36 ммоль) растворили в безводном ДМФА (3 мл). К этому раствору добавили N,N-диизопропилэтиламин (70 мкл, 0,4 ммоль) и пентафторфенила трифторацетат (72 мкл, 0,42 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 часов и вылили в насыщенный водный раствор NaHCO_3 . Смесь экстрагировали дихлорметаном, промыли насыщенным соевым раствором и высушили над безводным Na_2SO_4 . Дихлорметановый раствор концентрировали досуха и очистили силикагелевой колоночной хроматографией, и элюировали от 5 до 10% MeOH в дихлорметане с получением соединения 118 (0,51 г, 79%). Структуру подтвердили анализом ЖХМС и ^1H и ^{19}F ЯМР.

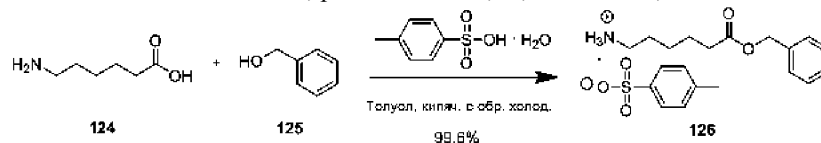


Олигомерное соединение 119, содержащее группу конъюгата $\text{GalNAc}_3\text{-7}$, получили по общим способам, представленным в примере 46. Кластерная часть GalNAc_3 группы конъюгата $\text{GalNAc}_3\text{-7}$ ($\text{GalNAc}_3\text{-7}_a$) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных групп конъюгата. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент представляет собой $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-$, $\text{A}_d\text{-P}(=\text{O})(\text{OH})-$. Структура $\text{GalNAc}_3\text{-7}$ ($\text{GalNAc}_3\text{-7}_a\text{-CM-}$) представлена ниже:

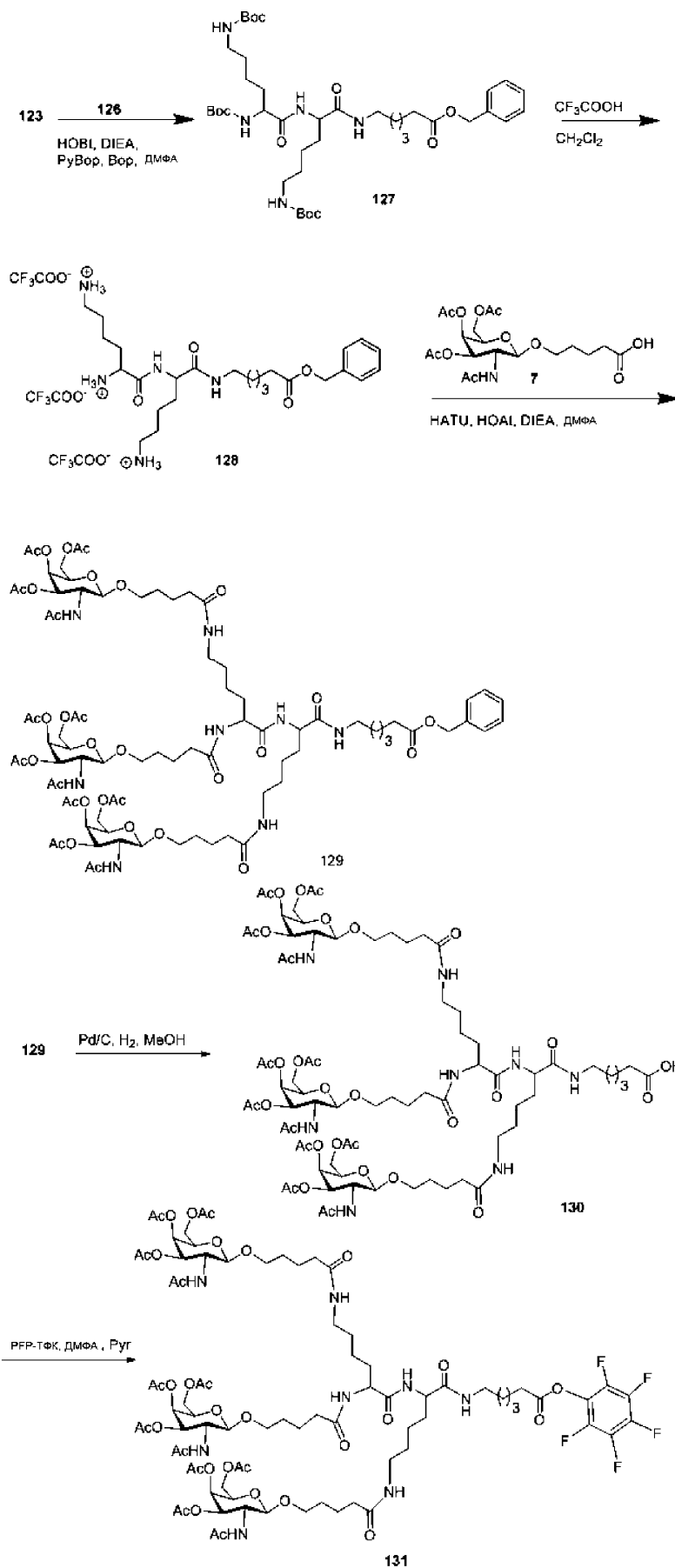
Пример 49. Получение олигонуклеотида 132, содержащего GalNAc₃₋₅

Соединение 120 (14,01 г, 40 ммоль) и HBTU (14,06 г, 37 ммоль) растворили в безводном ДМФА (80 мл). Добавили триэтиламин (11,2 мл, 80,35 ммоль) и перемешивали в течение 5 мин. Реакционную смесь охладил на ледяной бане и добавили раствор соединения 121 (10 г, ммоль) в безводном ДМФА (20 мл). Добавили дополнительное количество триэтиламина (4,5 мл, 32,28 ммоль) и перемешивали реакционную смесь в течение 18 часов в атмосфере аргона. Реакцию контролировали по ТСХ (этилацетат:гексан; 1:1; $R_f = 0,47$). Растворитель удалили при пониженном давлении. Остаток растворили в EtOAc (300 мл) и промыли 1 М раствором NaHSO_4 (3×150 мл), насыщенным водным раствором NaHCO_3 (3×150 мл) и насыщенным соевым раствором (2×100 мл). Органический слой высушили над Na_2SO_4 . Выходивший агент удалили фильтрованием, а органический слой концентрировали на ротационном испарителе. Неочищенную смесь очистили силикагелевой колоночной хроматографией и элюировали при помощи 35-50% EtOAc в гексане с получением соединения 122 (15,50 г, 78,13%). Структуру подтвердили анализом ЖХМС и ^1H ЯМР. Масса m/z 589,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

К охлажденному раствору соединения 122 (7,75 г, 13,16 ммоль), растворенного в метаноле (15 мл), добавили раствор LiOH (92,15 ммоль) в воде (20 мл) и ТГФ (10 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 45 мин и контролировали по ТСХ (EtOAc:гексан; 1:1). Реакционную смесь концентрировали до половины объема при пониженном давлении. Оставшийся раствор охладил на ледяной бане и нейтрализовали добавлением концентрированной HCl . Реакционную смесь разбавили, экстрагировали EtOAc (120 мл) и промыли насыщенным соевым раствором (100 мл). При стоянии в течение ночи образовалась и осветлилась эмульсия. Органический слой отделили, высушили (Na_2SO_4), отфильтровали и выпарили с получением соединения 123 (8,42 г). Избыточную массу вероятно обуславливает остаточная соль. ЖХМС согласовался со структурой. Продукт использовали без какой-либо дополнительной очистки. Мол. масса, расчетная: 574,36; мол. масса, найденная: 575,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



Соединение 126 синтезировали по способу, описанному в литературе (J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 958-963).



Соединение 123 (7,419 г, 12,91 ммоль), НОВт (3,49 г, 25,82 ммоль) и соединение 126 (6,33 г, 16,14 ммоль) растворили в ДМФА (40 мл), а полученную реакционную смесь охладдили на ледяной бане. К смеси добавили N,N-диизопропилэтиламин (4,42 мл, 25,82 ммоль), PyBop (8,7 г, 16,7 ммоль), затем Вор-

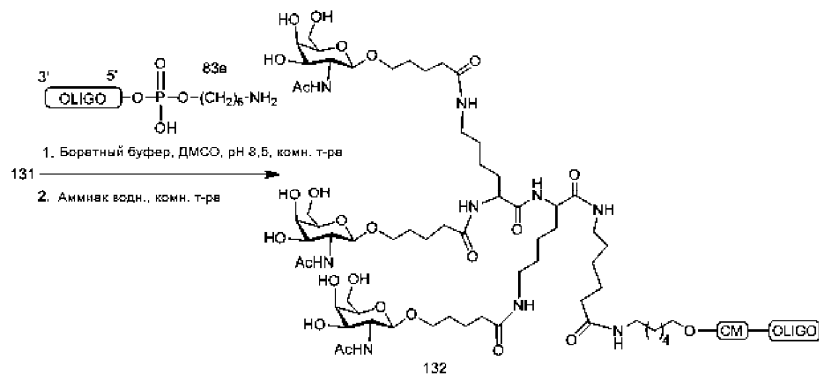
связывающий агент (1,17 г, 2,66 ммоль) в атмосфере аргона. Ледяную баню убрали и оставили раствор нагреваться до комнатной температуры. Реакция была завершена через 1 час, по результатам ТСХ (ДХМ:MeOH:AA; 89:10:1). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворили в EtOAc (200 мл) и промыли 1 М NaHSO₄ (3×100 мл), насыщенным водным раствором NaHCO₃ (3×100 мл) и насыщенным соевым раствором (2×100 мл). Отделенную органическую фазу высушили (Na₂SO₄), отфильтровали и концентрировали. Остаток очистили хроматографией на силикагелевой колонке с градиентом от 50% гексанов/EtOAc до 100% EtOAc с получением соединения 127 (9,4 г) в виде белого пенистого вещества. Данные ЖХМС и ¹H ЯМР согласовались со структурой. Масса m/z 778,4 [M+H]⁺.

Трифторуксусную кислоту (12 мл) добавили к раствору соединения 127 (1,57 г, 2,02 ммоль) в дихлорметане (12 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь выпарили совместно с толуолом (30 мл) при пониженном давлении досуха. Полученный остаток два раза совместно выпарили с ацетонитрилом (30 мл) и толуолом (40 мл) с получением соединения 129 (1,67 г) в виде трифторацетатной соли и использовали для следующей стадии без дополнительной очистки. Данные ЖХМС и ¹H ЯМР согласовались с указанной структурой. Масса m/z 478,2 [M+H]⁺.

Соединение 7 (0,43 г, 0,963 ммоль), НАТУ (0,35 г, 0,91 ммоль) и HOAt (0,035 г, 0,26 ммоль) объединили и высушивали в течение 4 часов над P₂O₅ при пониженном давлении в круглодонной колбе, а затем растворили в безводном ДМФА (1 мл) и перемешивали в течение 5 мин. К полученной смеси добавили раствор соединения 128 (0,20 г, 0,26 ммоль) в безводном ДМФА (0,2 мл) и N,N-диизопропилэтиламине (0,2 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере аргона. Реакция была завершена через 30 мин, по данным ЖХМС и ТСХ (7% MeOH/ДХМ). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворили в ДХМ (30 мл) и промыли 1 М NaHSO₄ (3×20 мл), насыщенным водным раствором NaHCO₃ (3 × 20 мл) и насыщенным соевым раствором (3×20 мл). Органическую фазу отделили, высушили над Na₂SO₄, отфильтровали и концентрировали. Остаток очистили колоночной хроматографией на силикагеле, используя 5-15% MeOH в дихлорметане, с получением соединения 129 (96,6 мг). Данные ЖХМС и ¹H ЯМР согласовались со структурой. Масса m/z 883,4 [M+ 2H]⁺.

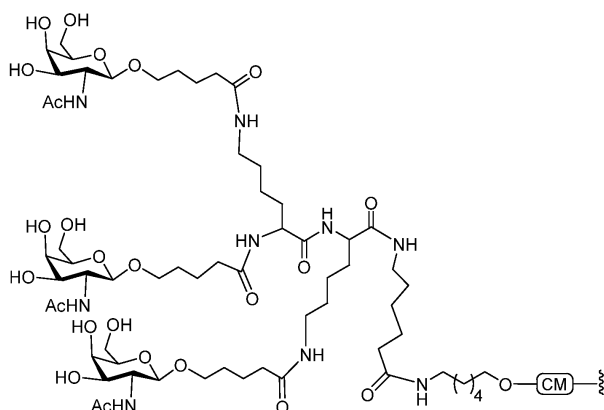
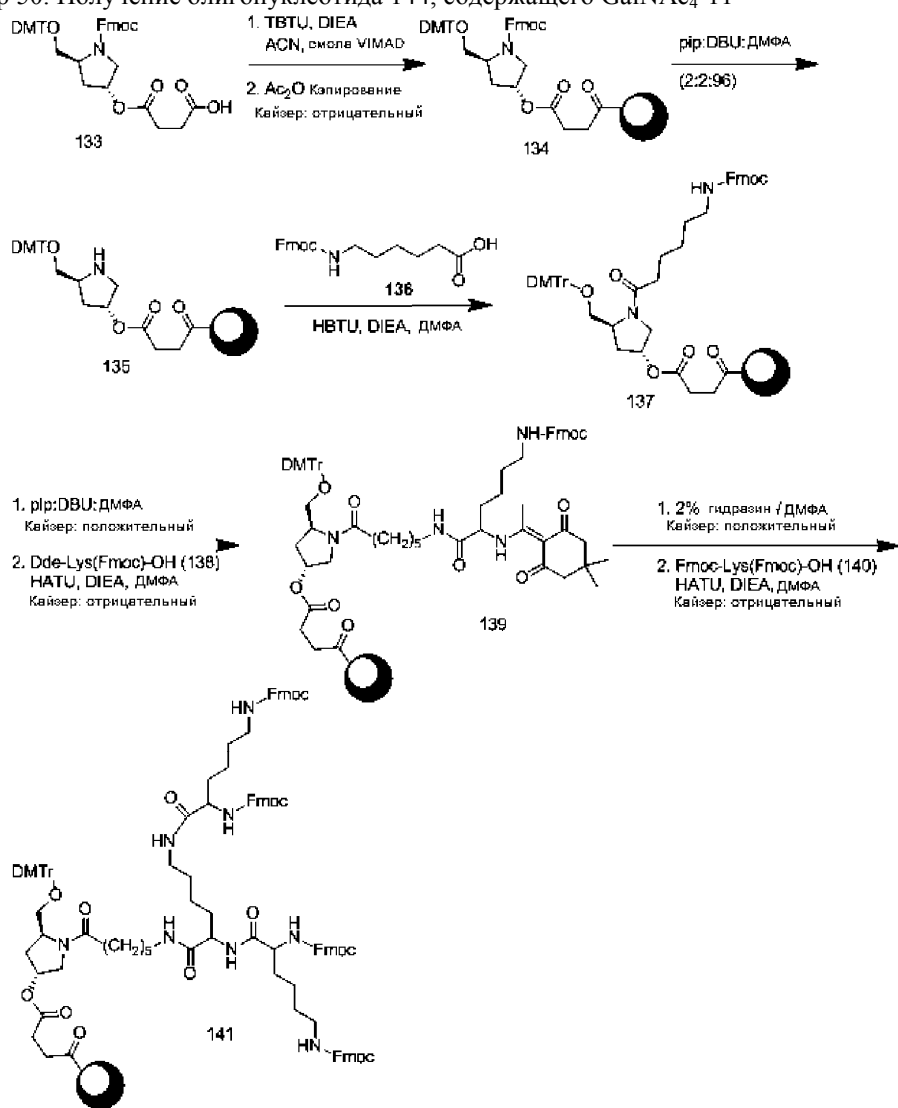
Соединение 129 (0,09 г, 0,051 ммоль) растворили в метаноле (5 мл) в сцинтилляционной пробирке объемом 20 мл. К смеси добавили небольшое количество 10% Pd/C (0,015 мг) и продували реакционный сосуд газообразным H₂. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере H₂ в течение 18 часов. Реакционную смесь отфильтровали через слой целита и промыли слой целита метанолом. Фильтрат и промывочные растворы слили вместе и концентрировали при пониженном давлении с получением соединения 130 (0,08 г). Данные ЖХМС и ¹H ЯМР согласовались с указанной структурой. Продукт использовали без дополнительной очистки. Масса m/z 838,3 [M+2H]⁺.

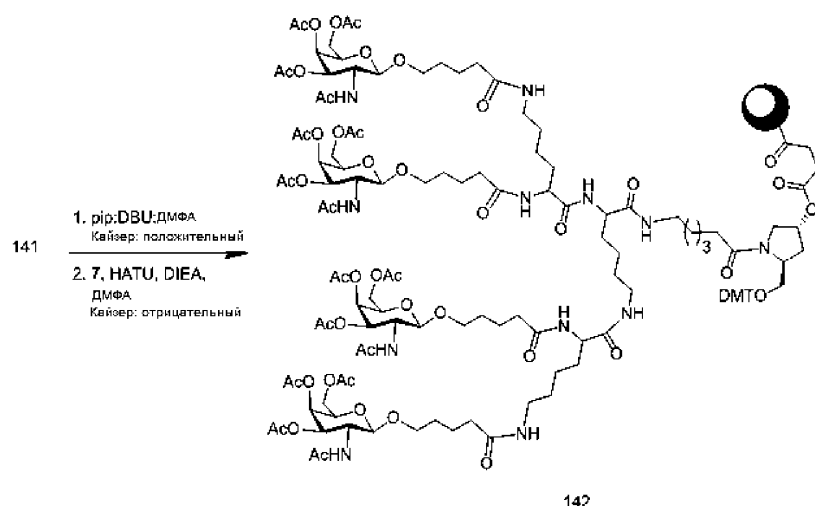
В коническую круглодонную колбу объемом 10 мл добавили соединение 130 (75,8 мг, 0,046 ммоль), 0,37 М пиридин/ДМФА (200 мкл) и мешалку. К этому раствору по каплям добавили 0,7 М пентафторфенилтрифторацетат/ДМФА (100 мкл) при перемешивании. По данным ЖХМС реакция была завершена через 1 час. Растворитель удалили при пониженном давлении и растворили остаток в CHCl₃ (~ 10 мл). Органический слой разделили между NaHSO₄ (1 М, 10 мл), насыщенным водным раствором NaHCO₃ (10 мл) и насыщенным соевым раствором (10 мл), с каждым раствором по три раза. Органическую фазу отделили и высушили над Na₂SO₄, отфильтровали и концентрировали с получением соединения 131 (77,7 мг). ЖХМС согласовался со структурой. Использовали без дополнительной очистки. Масса m/z 921,3 [M+2H]⁺.



Олигомерное соединение 132, содержащее группу конъюгата GalNAc₃-5, получили по общим способам, представленным в примере 46. Кластерная часть GalNAc₃ группы конъюгата GalNAc₃-5 (GalNAc₃-5_a) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных групп конъюгата. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент представляет собой -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-.

Структура GalNAc₃-5 (GalNAc₃-5_a-CM-) представлена ниже:

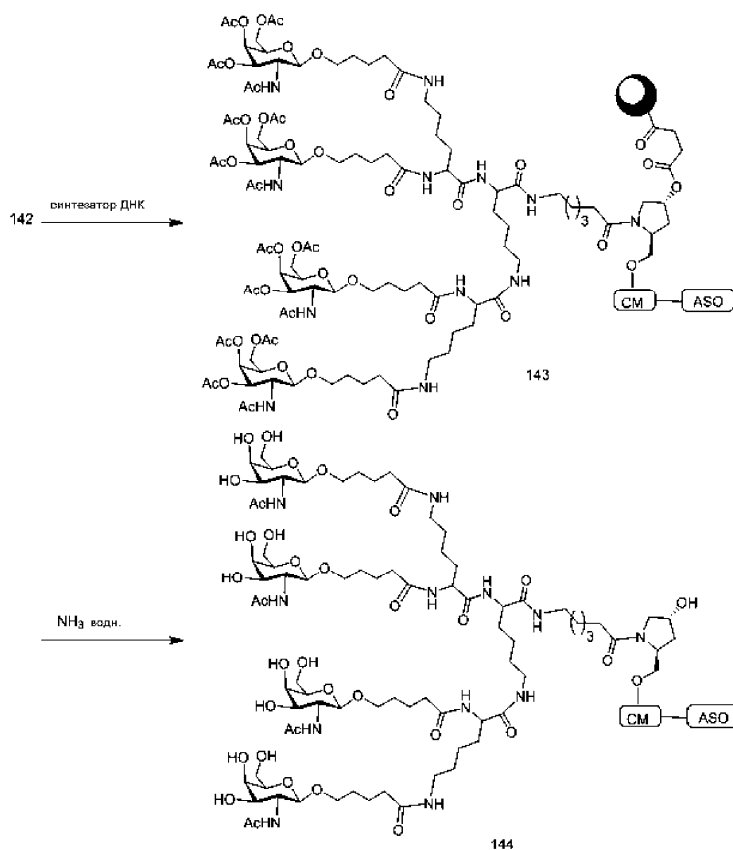
Пример 50. Получение олигонуклеотида 144, содержащего GalNAc₄-11



Синтез соединения 134. В колбу Меррифила добавили аминотетрагидрофурановую смолу VIMAD (2,5 г, 450 мкмоль/г), которую промыли ацетонитрилом, диметилформамидом, дихлорметаном и ацетонитрилом. Смолу оставили набухать в ацетонитриле (4 мл). Соединение 133 предварительно активировали в 100 мл круглодонной колбе путем добавления 20 (1,0 ммоль, 0,747 г), TBUT (1,0 ммоль, 0,321 г), ацетонитрила (5 мл) и DIEA (3,0 ммоль, 0,5 мл). Этот раствор оставили перемешиваться на 5 мин, а затем добавили в колбу Меррифила при встряхивании. Суспензию оставили встряхиваться на 3 ч. Реакционную смесь слили, а смолу промыли ацетонитрилом, ДМФА и ДХМ. Заполнение новой смолы количественно определили по измерению абсорбции DMT катиона при 500 нм (коэффициент экстинкции = 76000) в ДХМ, которое составило 238 мкмоль/г. Смолу экипировали трехкратным суспендированием в растворе уксусного ангидрида в течение 10 мин.

Соединение 141, связанное с твердой подложкой, синтезировали многократным повторением способов твердофазного синтеза пептидов при помощи Fmoc. Взяли небольшое количество твердой подложки и суспендировали в водном растворе аммиака (28-30 мас.%) в течение 6 ч. Расщепленное соединение анализировали по ЖХ-МС и наблюдали, что масса согласуется со структурой. Масса m/z 1063,8 $[M+2H]^+$.

Соединение 142, связанное с твердой подложкой, синтезировали по способам твердофазного синтеза пептидов.

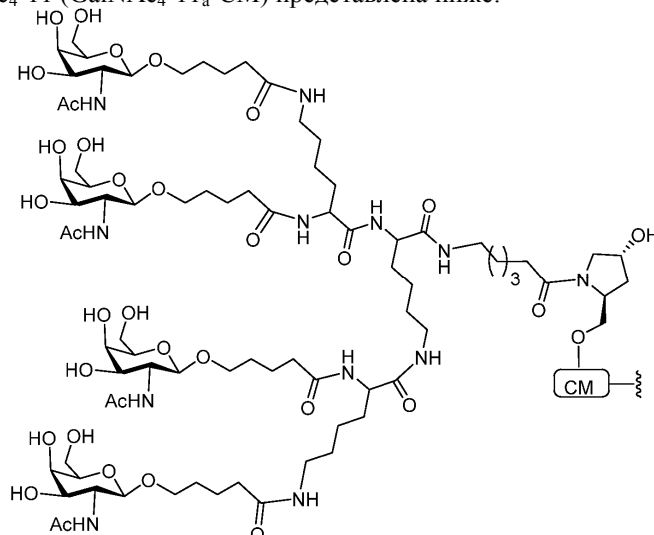


Соединение 143, связанное с твердой подложкой, синтезировали при помощи стандартного твердо-фазного синтеза на ДНК синтезаторе.

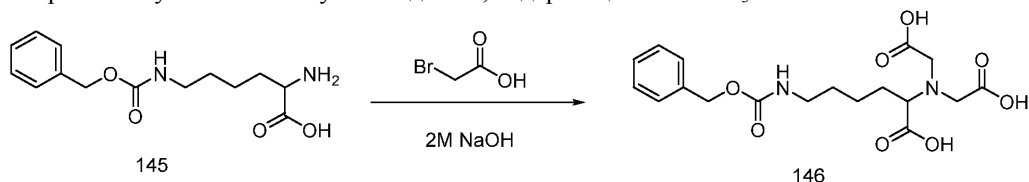
Соединение 143, связанное с твердой подложкой, суспендировали в водном аммиаке (28-30 мас.%) и нагревали при 55°C в течение 16 ч. Раствор охладили, а твердую подложку отфильтровали. Фильтрат концентрировали, а остаток растворили в воде и очистили при помощи ВЭЖХ на сильной анионообменной колонке. Фракции, содержащие соединение 144 полной длины, слили вместе и обессолили. Полученное GalNAc₄-11-сопряженное олигомерное соединение анализировали при помощи ЖХ-МС и наблюдали, что масса согласуется со структурой.

Кластерная часть GalNAc₄ группы конъюгата GalNAc₄-11 (GalNAc₄-11_a) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных групп конъюгата. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент представляет собой -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-.

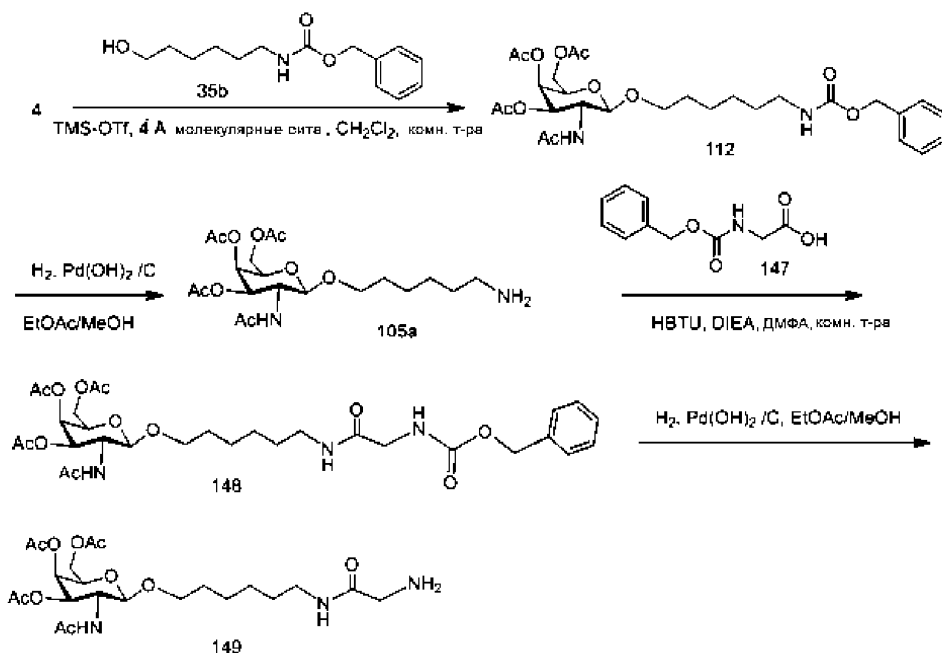
Структура GalNAc₄-11 (GalNAc₄-11_a-CM) представлена ниже:



Пример 51. Получение олигонуклеотида 155, содержащего GalNAc₃-6



Соединение 146 синтезировали так, как описано в литературе (Analytical Biochemistry 1995, 229, 54-60).



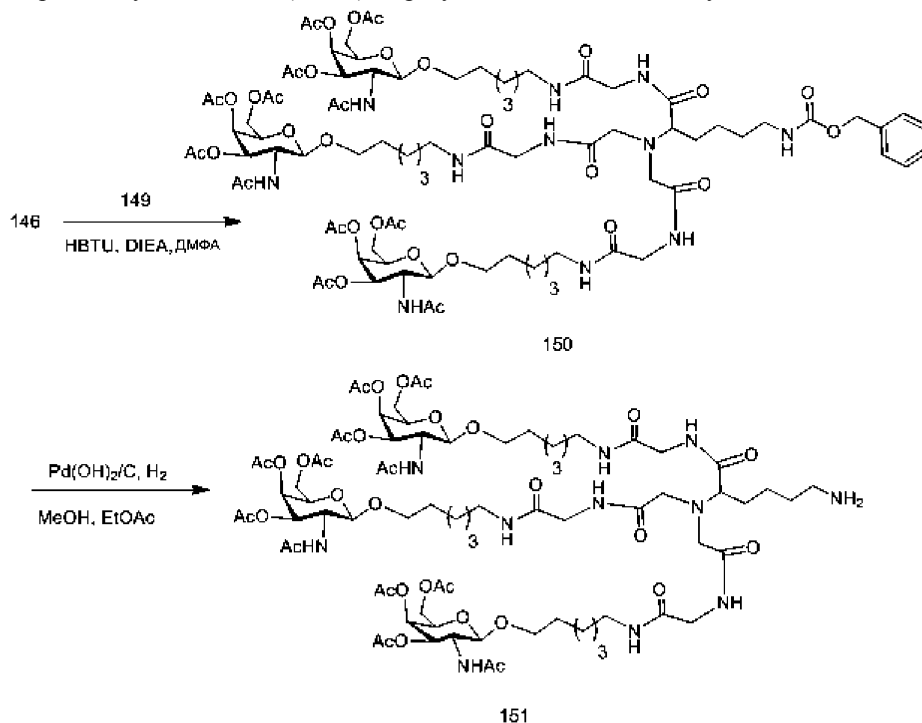
Соединение 4 (15 г, 45,55 ммоль) и соединение 35b (14,3 грамм, 57 ммоль) растворили в CH₂Cl₂ (200 мл). Добавили активированные молекулярные сита (4 Å, 2 г, порошкообразные) и оставили реакционную

смесь перемешиваться в течение 30 мин в атмосфере азота. Добавили TMS-OTf (4,1 мл, 22,77 ммоль) и оставили реакционную смесь перемешиваться при комнатной температуре в течение ночи. После завершения реакции смесь погасили, вылив в насыщенный водный раствор NaHCO_3 (500 мл) с дробленным льдом (~ 150 г). Органический слой отделили, промыли насыщенным соевым раствором, высушили над MgSO_4 , отфильтровали и концентрировали до оранжевого маслянистого вещества при пониженном давлении. Неочищенный материал очистили силикагелевой колоночной хроматографией и элюировали 2-10% MeOH в CH_2Cl_2 с получением соединения 112 (16,53 г, 63%). ЖХМС и ^1H ЯМР согласовались с ожидаемым соединением.

Соединение 112 (4,27 г, 7,35 ммоль) растворили в 1:1 MeOH/EtOAc (40 мл). Реакционную смесь очистили пропусканием потока аргона через раствор в течение 15 мин. Добавили катализатор Перлмана (гидроксид палладия на углероде, 400 мг) и пропускали через раствор газообразный водород в течение 30 мин. После завершения (ТСХ, 10% MeOH в CH_2Cl_2 , и ЖХМС), катализатор удалили фильтрованием через слой целита. Фильтрат концентрировали на ротационном испарителе и быстро высушили под высоким вакуумом с получением соединения 105a (3,28 г). Данные ЖХМС и ^1H ЯМР согласовались с заданным продуктом.

Соединение 147 (2,31 г, 11 ммоль) растворили в безводном ДМФА (100 мл). Добавили N,N-диизопропилэтиламин (DIEA, 3,9 мл, 22 ммоль), затем HBTU (4 г, 10,5 ммоль). Реакционную смесь оставили перемешиваться в течение ~15 мин в атмосфере азота. К этой смеси добавили раствор соединения 105a (3,3 г, 7,4 ммоль) в сухом ДМФА и перемешивали в течение 2 часов в атмосфере азота. Реакционную смесь разбавили EtOAc и промыли насыщенным водным раствором NaHCO_3 и насыщенным соевым раствором. Органическую фазу отделили, высушили (MgSO_4), отфильтровали и концентрировали до оранжевого сиропообразного вещества. Неочищенный материал очистили колоночной хроматографией и элюировали 2-5% MeOH в CH_2Cl_2 с получением соединения 148 (3,44 г, 73%). ЖХМС и ^1H ЯМР согласовались с ожидаемым продуктом.

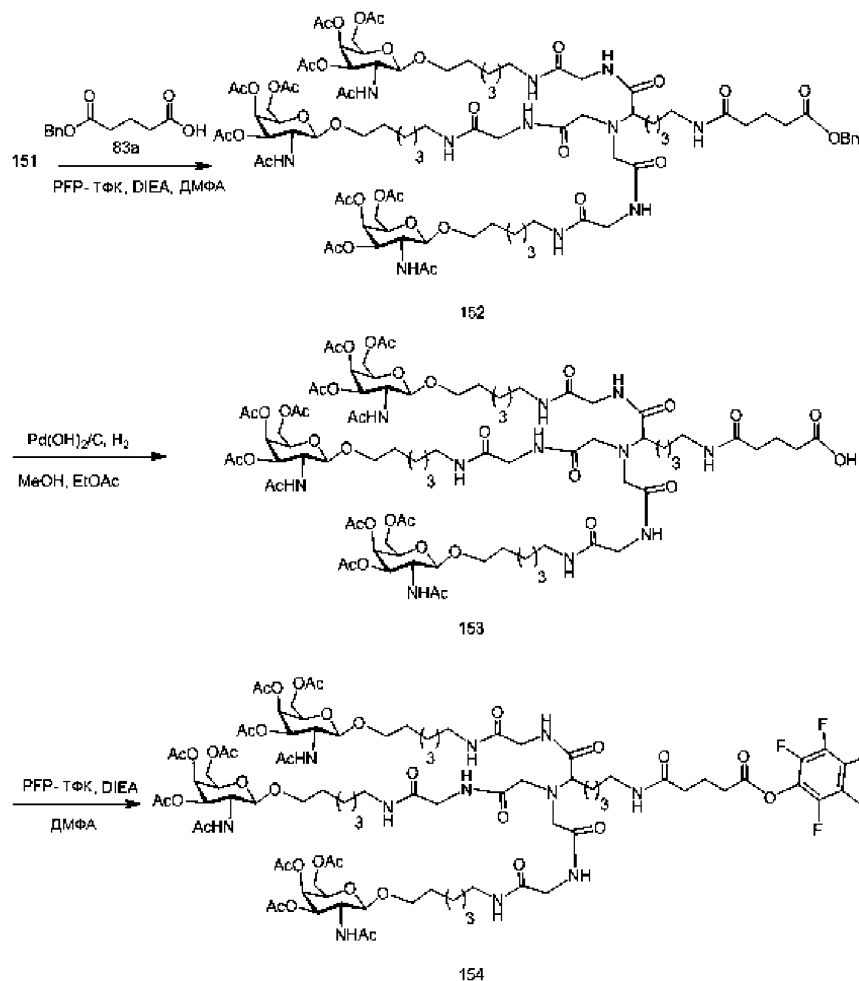
Соединение 148 (3,3 г, 5,2 ммоль) растворили в 1:1 MeOH/EtOAc (75 мл). Реакционную смесь очистили пропусканием потока аргона через раствор в течение 15 мин. Добавили катализатор Перлмана (гидроксид палладия на углероде) (350 мг). Через раствор продували газообразный водород в течение 30 мин. После завершения (ТСХ, 10% MeOH в ДХМ, и ЖХМС), катализатор удалили фильтрованием через слой целита. Фильтрат концентрировали на ротационном испарителе и быстро высушили под высоким вакуумом с получением соединения 149 (2,6 г). Данные ЖХМС согласовались с заданным продуктом. Остаток растворили в сухом ДМФА (10 мл) и сразу использовали на следующей стадии.



Соединение 146 (0,68 г, 1,73 ммоль) растворили в сухом ДМФА (20 мл). К нему добавили DIEA (450 мкл, 2,6 ммоль, 1,5 экв.) и HBTU (1,96 г, 0,52 ммоль). Реакционную смесь оставили перемешиваться в течение 15 мин при комнатной температуре в атмосфере азота. Добавили раствор соединения 149 (2,6 г) в безводном ДМФА (10 мл). pH реакционной смеси довели до pH 9-10 добавлением DIEA (при необходимости). Реакционную смесь оставили перемешиваться в течение 2 часов при комнатной температуре в атмосфере азота. После завершения реакции смесь разбавили EtOAc (100 мл) и промыли насыщенным водным раствором NaHCO_3 , затем насыщенным соевым раствором. Органическую фазу отделили, вы-

сушили над MgSO_4 , отфильтровали и концентрировали. Остаток очистили силикагелевой колоночной хроматографией и элюировали 2-10% MeOH в CH_2Cl_2 с получением соединения 150 (0,62 г, 20%). ЖХМС и ^1H ЯМР согласовались с заданным продуктом.

Соединение 150 (0,62 г) растворили в 1:1 MeOH/EtOAc (5 л). Реакционную смесь очистили пропусканием потока аргона через раствор в течение 15 мин. Добавили катализатор Перлмана (гидроксид палладия на углеводе) (60 мг). Через раствор продували газообразный водород в течение 30 мин. После завершения (ТСХ, 10% MeOH в ДХМ, и ЖХМС), катализатор удалили фильтрованием (тефлоновый фильтр с переходной канюлей шприца, 0,45 мкм). Фильтрат концентрировали на ротационном испарителе и быстро высушили под высоким вакуумом с получением соединения 151 (0,57 г). Данные ЖХМС согласовались с заданным продуктом. Продукт растворили в 4 мл сухого ДМФА и сразу использовали на следующей стадии.

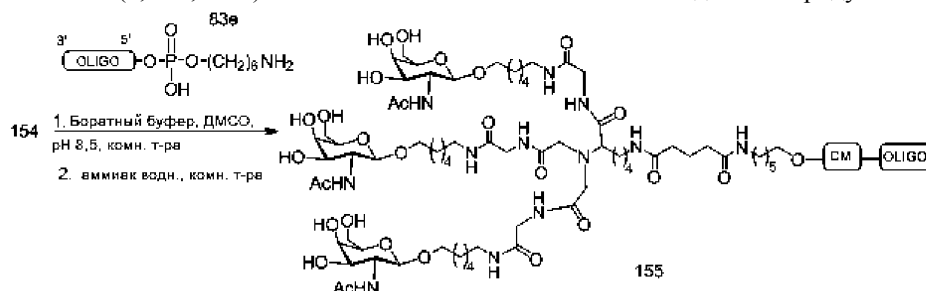


Соединение 83a (0,11 г, 0,33 ммоль) растворили в безводном ДМФА (5 мл) и добавили N,N -диизопропилэтиламин (75 мкл, 1 ммоль) и PFP-ТФК (90 мкл, 0,76 ммоль). При соприкосновении реакционная смесь стала пурпурной и постепенно изменила цвет на оранжевый в течение следующих 30 мин. Ход реакции контролировали по ТСХ и ЖХМС. После завершения (образования эфира PFP) добавили раствор соединения 151 (0,57 г, 0,33 ммоль) в ДМФА. pH реакционной смеси довели до pH 9-10 добавлением N,N -диизопропилэтиламина (при необходимости). Реакционную смесь перемешивали в атмосфере азота в течение ~ 30 мин. После завершения реакции большую часть растворителя удалили при пониженном давлении. Остаток разбавили CH_2Cl_2 и промыли насыщенным водным раствором NaHCO_3 , затем насыщенным соевым раствором. Органическую фазу отделили, высушили над MgSO_4 , отфильтровали и концентрировали до оранжевого сиропообразного вещества. Остаток очистили колоночной хроматографией на силикагеле (2-10% MeOH в CH_2Cl_2) с получением соединения 152 (0,35 г, 55%). ЖХМС и ^1H ЯМР согласовались с заданным продуктом.

Соединение 152 (0,35 г, 0,182 ммоль) растворили в 1:1 MeOH/EtOAc (10 мл). Реакционную смесь очистили пропусканием потока аргона через раствор в течение 15 мин. Добавили катализатор Перлмана (гидроксид палладия на углеводе) (35 мг). Через раствор продували газообразный водород в течение 30 мин. После завершения (ТСХ, 10% MeOH в ДХМ и ЖХМС) катализатор удалили фильтрованием (тефлоновый фильтр с переходной канюлей шприца, 0,45 мкм). Фильтрат концентрировали на ротационном испарителе и быстро высушили под высоким вакуумом с получением соединения 153 (0,33 г, количест-

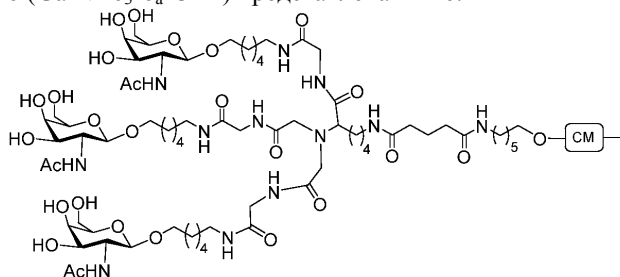
венно). Данные ЖХМС согласовались с заданным продуктом.

Соединение 153 (0,33 г, 0,18 ммоль) растворили в безводном ДМФА (5 мл) при перемешивании в атмосфере азота. К нему добавили добавили N,N-диизопропилэтиламин (65 мкл, 0,37 ммоль) и PFP-ТФК (35 мкл, 0,28 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в атмосфере азота в течение ~30 мин. При соприкосновении реакционная смесь стала пурпурной и постепенно изменила цвет на оранжевый. pH реакционной смеси поддерживали при pH 9-10 добавлением дополнительного количества N,N-диизопропилэтиламина. Ход реакции контролировали по ТСХ и ЖХМС. После завершения реакции большую часть растворителя удалили при пониженном давлении. Остаток разбавили CH_2Cl_2 (50 мл) и промыли насыщенным водным раствором NaHCO_3 , затем насыщенным соевым раствором. Органический слой высушили над MgSO_4 , отфильтровали и концентрировали до оранжевого сиропообразного вещества. Остаток очистили колоночной хроматографией и элюировали 2-10% MeOH в CH_2Cl_2 с получением соединения 154 (0,29 г, 79%). ЖХМС и ^1H ЯМР согласовались с заданным продуктом.

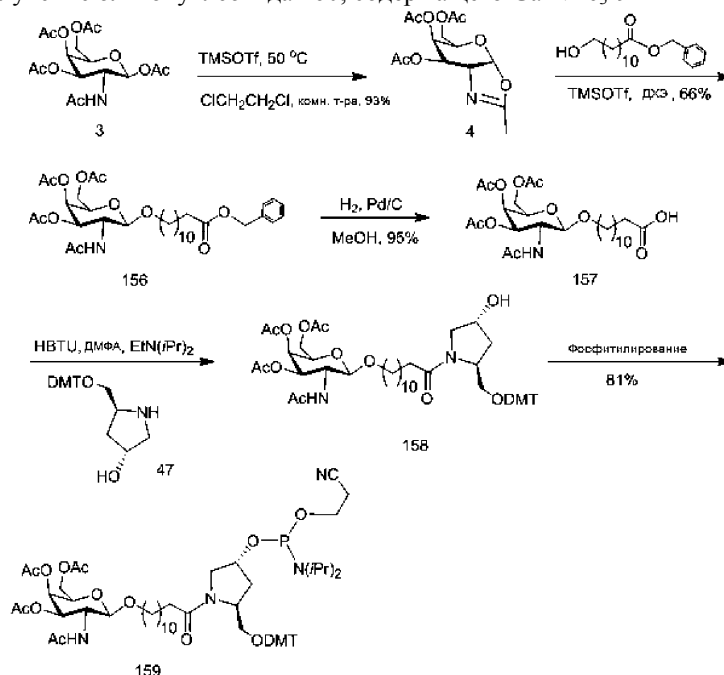


Олигомерное соединение 155, содержащее группу конъюгата GalNAc₃-6, получили по общим способам, представленным в примере 46. Кластерная часть GalNAc₃ группы конъюгата GalNAc₃-6 (GalNAc₃-6_a) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных групп конъюгата. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент представляет собой $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{A}_d-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-$.

Структура GalNAc₃-6 (GalNAc₃-6_a-CM-) представлена ниже:



Пример 52. Получение олигонуклеотида 160, содержащего GalNAc₃-9

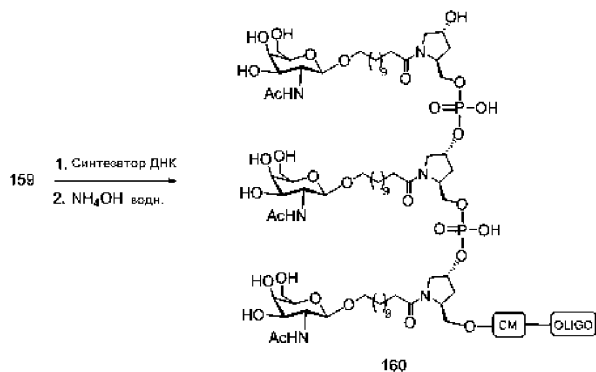


Соединение 112 синтезировали по способу, описанному в литературе (J. Med. Chem. 2004, 47, 5798-5808).

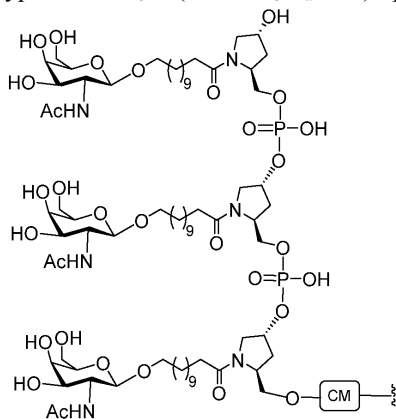
Соединение 156 (18,60 г, 29,28 ммоль) растворили в метаноле (200 мл). Добавили палладий на угле-роде (6,15 г, нагрузка 10 мас.% (в пересчете на сухое вещество), матрица из порошкообразного углерода, влажный). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере водорода в течение 18 часов. Реакционную смесь отфильтровали через слой целита и тщательно промыли слой целита метанолом. Объединенный фильтрат промыли и концентрировали досуха. Остаток очистили силикагелевой колоночной хроматографией и элюировали 5-10% метанола в дихлорметане с получением соединения 157 (14,26 г, 89%). Масса m/z 544,1 $[M-H]^+$.

Соединение 157 (5 г, 9,17 ммоль) растворили в безводном ДМФА (30 мл). Добавили НВТУ (3,65 г, 9,61 ммоль) и N,N -диизопропилэтиламин (13,73 мл, 78,81 ммоль) и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 5 мин. К нему добавили раствор соединения 47 (2,96 г, 7,04 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 8 ч. Реакционную смесь вылили в насыщенный водный раствор $NaHCO_3$. Смесь экстрагировали этилацетатом, а органический слой промыли насыщенным соевым раствором и высушили (Na_2SO_4), отфильтровали и выпарили. Полученный остаток очистили силикагелевой колоночной хроматографией и элюировали 50% этилацетатом в гексане с получением соединения 158 (8,25 г, 73,3%). Структуру подтвердили анализом МС и 1H ЯМР.

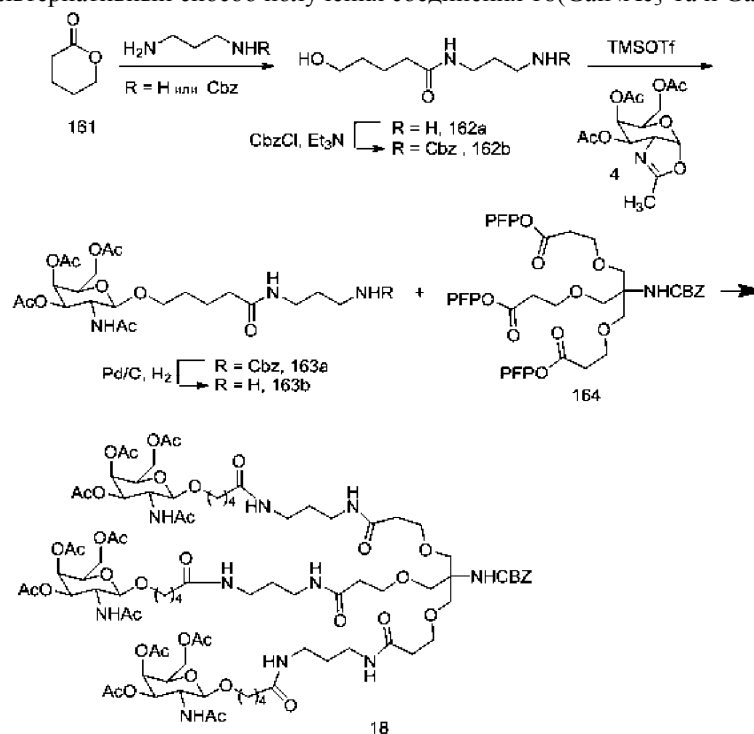
Соединение 158 (7,2 г, 7,61 ммоль) высушили над P_2O_5 при пониженном давлении. Всушенное соединение растворили в безводном ДМФА (50 мл). К нему добавили 1H -тетразол (0,43 г, 6,09 ммоль) и N -метилимидазол (0,3 мл, 3,81 ммоль), и цианоэтил- N,N,N',N' -тетраизопропил-фосфородиамидит (3,65 мл, 11,50 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в атмосфере аргона в течение 4 часов. Реакционную смесь разбавили этилацетатом (200 мл). Реакционную смесь промыли насыщенным раствором $NaHCO_3$ и насыщенным соевым раствором. Органическую фазу отделили, высушили (Na_2SO_4), отфильтровали и выпарили. Остаток очистили силикагелевой колоночной хроматографией и элюировали 50-90% этилацетатом в гексане с получением соединения 159 (7,82 г, 80,5%). Структуру подтвердили анализом ЖХМС и ^{31}P ЯМР.



Олигомерное соединение 160, содержащее группу конъюгата $GalNAc_3-9$, получили по стандартным способам синтеза олигонуклеотидов. Три единицы соединения 159 связали с твердой подложкой, затем с фосфорамидитами нуклеотидов. В результате обработки защищенного олигомерного соединения водным раствором аммиака получили соединение 160. Кластерная часть $GalNAc_3$ группы конъюгата $GalNAc_3-9$ ($GalNAc_3-9_a$) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных групп конъюгата. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент представляет собой $-P(=O)(OH)-A_4-P(=O)(OH)-$. Структура $GalNAc_3-9$ ($GalNAc_3-9_a-CM$) представлена ниже:

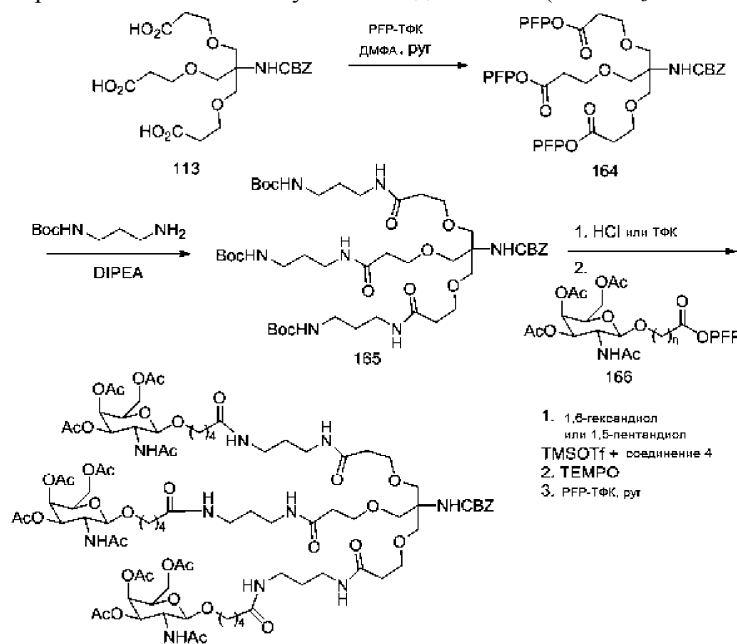


Пример 53. Альтернативный способ получения соединения 18(GalNAc₃-1a и GalNAc₃-3a)



Выполнили реакцию лактона 161 с диаминопропаном (3-5 экв.) или моно-Вос-защитным диаминопропаном (1 экв.) с получением спирта 162a или 162b. При использовании для описанной выше реакции незащищенного пропандиамина, избыток диамина удалили выпариванием под высоким вакуумом, а свободную аминогруппу в 162a защитили при помощи CbzCl с получением 162b в виде белого твердого вещества после очистки колоночной хроматографией. Спирт 162b затем взаимодействовал с соединением 4 в присутствии TMSOTf с получением 163a, которое преобразовали в 163b путем снятия Cbz группы при помощи каталитического гидрирования. Пентафторфениловый (PFP) эфир 164 получили взаимодействием трехкислотного соединения 113 (см. пример 48) с PFP-ТФК (3,5 экв.) и пиридином (3,5 экв.) в ДМФА (от 0,1 до 0,5 М). Триэфир 164 непосредственно взаимодействовал с амином 163b (3-4 экв.) и DIPEA (3-4 экв.) с получением соединения 18. Представленный выше способ значительно облегчает очистку промежуточных соединений и минимизирует образование побочных продуктов, которые образуются при использовании способа, описанного в примере 4.

Пример 54. Альтернативный способ получения соединения 18(GalNAc₃-1a и GalNAc₃-3a)



Три-PFP эфир 164 получили из кислоты 113 по способу, представленному выше в примере 53, вы-

полнили реакцию этого эфира с моно-Вос-защищенным диамином с получением 165 практически с количественным выходом. Вос группы сняли хлористоводородной кислотой или трифторуксусной кислотой с получением триамина, который взаимодействовал с активированной кислотой PFP 166 в присутствии подходящего основания, такого как DIPEA, с получением соединения 18.

PFP-защищенную кислоту Gal-NAc 166 получили из соответствующей кислоты обработкой PFP-ТФК (1-1,2 экв.) и пиридином (1-1,2 экв.) в ДМФА. Кислоту-предшественник, в свою очередь, получили из соответствующего спирта окислением с использованием TEMPO (0,2 экв.) и BAIB в ацетонитриле и воде. Спирт-предшественник получили из сахарного промежуточного соединения 4 взаимодействием с 1,6-гександиолом (или 1,5-гександиолом или другим диолом для других значений n) (2-4 экв.) и TMSOTf, используя условия, описанные ранее в примере 47.

Пример 55. Дозозависимое исследование олигонуклеотидов, содержащих либо 3'-, либо 5'-группу конъюгата (сравнение GalNAc₃-1, 3, 8 и 9), направленных на SRB-1, *in vivo*.

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже, испытали в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования SRB-1 у мышей. Несопряженный ISIS 353382 включили в качестве стандарта. Каждая из различных групп конъюгата GalNAc₃ была присоединена либо к 3', либо к 5'-концу соответствующего олигонуклеотида при помощи фосфодиэфир-связанного 2'-дезоксиаденозинового нуклеотида (расщепляемый фрагмент).

Таблица 39

Модифицированные ASO, направленные на SRB-1

ASO	Последовательность (от 5' к 3')	Мотив	Конъюгат	SEQ ID NO
ISIS 353382 (исходная)	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} mC _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5/10/5	нет	829
ISIS 655861	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} mC _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} Ado'-GalNAc₃-1_a	5/10/5	GalNAc₃-1	830
ISIS 664078	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} mC _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} Ado'-GalNAc₃-9_a	5/10/5	GalNAc₃-9	830
ISIS 661161	GalNAc₃-3_a-o'-Ado G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} mC _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5/10/5	GalNAc₃-3	831
ISIS 665001	GalNAc₃-8_a-o'-Ado G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} mC _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5/10/5	GalNAc₃-8	831

Заглавные буквы указывают нуклеоснование для каждого нуклеотида, а ^mC означает 5-метилцитозин. Нижние индексы: "e" означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид; "d" означает β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "s" означает тиофосфатный межнуклеозидный линкер (PS); "o" означает фосфодиэфирный межнуклеозидный линкер (PO); и "o'" означает OP(=O)(OH)-. Группы конъюгата выделены жирным.

Структура GalNAc₃-1_a показана ранее в примере 9. Структура GalNAc₃-9 показана ранее в примере 52. Структура GalNAc₃-3 показана ранее в примере 39. Структура GalNAc₃-8 показана ранее в примере 47.

Лечение.

Шестинедельным самцам мышей Balb/c (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) ввели однократную подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, соединения ISIS 353382, 655861, 664078, 661161, 665001 или солевого раствора. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей усыпили через 72 ч после последнего введения для определения уровней мРНК SRB-1 в печени при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней мРНК SRB-1 для каждой экспериментальной группы, нормализованных к контрольному образцу, обработанному солевым раствором.

Как показано в табл. 40, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК SRB-1 дозозависимым образом. Действительно, антисмысловые олигонуклеотиды, содержащие фосфодиэфир-связанные конъюгаты GalNAc₃-1 и GalNAc₃-9 у 3'-конца (ISIS 655861 и ISIS 664078), а также конъюгаты GalNAc₃-3 и GalNAc₃-8, связанные у 5'-конца (ISIS 661161 и ISIS 665001) демонстрируют существенное улучшение эффективности, по сравнению с несопряженным антисмысловым олигонуклеотидом (ISIS 353382). Кроме того, ISIS 664078, содержащий конъюгат GalNAc₃-9 у 3'-конца, был по суще-

ству настолько же эффективным, как ISIS 655861, который содержит конъюгат GalNAc₃-1 у 3'-конца. 5'-сопряженные антисмысловые олигонуклеотиды, ISIS 661161 и ISIS 665001, содержащие GalNAc₃-3 или GalNAc₃-9, соответственно, обладают повышенной эффективностью, по сравнению с 3'-сопряженными антисмысловыми соединениями (ISIS 655861 и ISIS 664078).

Таблица 40

ASO, содержащие GalNAc₃-1, 3, 8 или 9, направленные на SRB-1

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% от солевого раствора)	Конъюгат
Солевой раствор	н.д.	100	
353382	3	88	нет
	10	68	
	30	36	
655861	0,5	98	GalNAc ₃ -1 (3')
	1,5	76	
	5	31	
	15	20	
664078	0,5	88	GalNAc ₃ -9 (3')
	1,5	85	
	5	46	
	15	20	
661161	0,5	92	GalNAc ₃ -3 (5')
	1,5	59	
	5	19	
	15	11	
665001	0,5	100	GalNAc ₃ -8 (5')
	1,5	73	
	5	29	
	15	13	

Уровни трансаминазы в печени, аланин-аминотрансферазы (ALT) и аспартат-аминотрансферазы (AST) в сыворотке измеряли относительно мышей, инъецированных солевым раствором, используя стандартные протоколы. Оценили также общий билирубин и азот мочевины крови (АМК). Проверили изменение массы тела, которое существенно не отличалось от группы с солевым раствором. Значения ALT, AST, общего билирубина и АМК представлены ниже в таблице.

Таблица 41

ISIS №	Доза мг/кг	ALT	AST	Общий билирубин	АМК	Конъюгат
Солевой раствор		24	59	0,1	37,52	
353382	3	21	66	0,2	34,65	нет
	10	22	54	0,2	34,2	
	30	22	49	0,2	33,72	
655861	0,5	25	62	0,2	30,65	GalNac ₃ -1 (3')
	1,5	23	48	0,2	30,97	
	5	28	49	0,1	32,92	
	15	40	97	0,1	31,62	
664078	0,5	40	74	0,1	35,3	GalNac ₃ -9 (3')
	1,5	47	104	0,1	32,75	
	5	20	43	0,1	30,62	
	15	38	92	0,1	26,2	
661161	0,5	101	162	0,1	34,17	GalNac ₃ -3 (5')
	1,5 г	42	100	0,1	33,37	
	5 г	23	99	0,1	34,97	
	15	53	83	0,1	34,8	
665001	0,5	28	54	0,1	31,32	GalNac ₃ -8 (5')
	1,5	42	75	0,1	32,32	
	5	24	42	0,1	31,85	
	15	32	67	0,1	31.	

Пример 56. Дозозависимое исследование олигонуклеотидов, содержащих либо 3'-, либо 5'-группу конъюгата (сравнение GalNac₃-1, 2, 3, 5, 6, 7 и 10), направленных на SRB-1, in vivo.

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже, испытали в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования SRB-1 у мышей. Несопряженный ISIS 353382 включили в качестве стандарта. Каждая из различных групп конъюгата GalNac₃ была присоединена к 5'-концу соответствующего олигонуклеотида фосфодиэфир-связанным 2'-дезоксиаденозиновым нуклеозидом (расщепляемый фрагмент), за исключением ISIS 655861, в котором группа конъюгата GalNac₃ присоединена к 3'-концу.

Таблица 42

Модифицированные ASO, направленные на SRB-1

ASO	Последовательность (от 5' к 3')	Мотив	Конъюгат	SEQ ID NO
ISIS 353382 (исходная)	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5/10/5	Без конъюгата	829
ISIS 655861	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e o Ado - GalNAc3-1a	5/10/5	GalNAc3-1	830
ISIS 664507	GalNAc3-2a - o Ado G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5/10/5	GalNAc3-2	831
ISIS 661161	GalNAc3-3a -o Ado G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5/10/5	GalNAc3-3	831
ISIS 666224	GalNAc3-5a - o Ado G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5/10/5	GalNAc3-5	831
ISIS 666961	GalNAc3-6a -	5/10/5	GalNAc3-6	831
	o Ado G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e			
ISIS 666981	GalNAc3-7a - o Ado G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5/10/5	GalNAc3-7	831
ISIS 666881	GalNAc3-10a - o Ado G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5/10/5	GalNAc3-10	831

Заглавные буквы указывают нуклеоснование для каждого нуклеотида, а ^mC означает 5-метилцитозин. Нижние индексы: "e" означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид; "d" означает β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "s" означает тиофосфатный межнуклеозидный линкер (PS); "o" означает фосфодиэфирный межнуклеозидный линкер (PO); и "o" означает OP(=O)(OH)-. Группы конъюгата выделены жирным.

Структура GalNAc3-1_a показана ранее в примере 9. Структура GalNAc3-2_a показана ранее в примере 37. Структура GalNAc3-3_a показана ранее в примере 39. Структура GalNAc3-5_a показана ранее в примере 49. Структура GalNAc3-6_a показана ранее в примере 51. Структура GalNAc3-7_a показана ранее в примере 48. Структура GalNAc3-10_a показана ранее в примере 46.

Лечение.

Шестинедельным самцам мышей Balb/c (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) ввели однократную подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, соединения ISIS 353382, 655861, 664507, 661161, 666224, 666961, 666981, 666881 или солевого раствора. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей усыпили через 72 ч после последнего введения для определения уровней мРНК SRB-1 в печени при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней мРНК SRB-1 для каждой экспериментальной группы, нормализованных к контрольному образцу, обработанному солевым раствором.

Как показано в табл. 43, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК SRB-1 дозозависимым образом. Действительно, сопряженные антисмысловые олигонуклеотиды демонстрируют значительное усиление эффективности, по сравнению с несопряженным антисмысловым олигонуклеотидом (ISIS 353382). 5'-сопряженные антисмысловые олигонуклеотиды демонстрируют небольшое усиление эффективности, по сравнению с 3'-сопряженным антисмысловым олигонуклеотидом.

Таблица 43

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% от солевого раствора)	Конъюгат
Солевой раствор	н.д.	100,0	
353382	3	96,0	нет
	10	73,1	
	30	36,1	
655861	0,5	99,4	GalNac3-1 (3')
	1,5	81,2	
	5	33,9	
	15	15,2	
664507	0,5	102,0	GalNac3-2 (5')
	1,5	73,2	
	5	31,3	
	15	10,8	
661161	0,5	90,7	GalNac3-3 (5')
	1,5	67,6	
	5	24,3	
	15	11,5	
666224	0,5	96,1	GalNac3-5 (5')
	1,5	61,6	
	5	25,6	
	15	11,7	
666961	0,5	85,5	GalNac3-6 (5')
	1,5	56,3	
	5	34,2	
	15	13,1	
666981	0,5	84,7	GalNac3-7 (5')
	1,5	59,9	
	5	24,9	
	15	8,5	
666881	0,5	100,0	GalNac3-10 (5')
	1,5	65,8	
	5	26,0	
	15	13,0	

Уровни трансаминазы в печени, аланин-аминотрансферазы (ALT) и аспартат-аминотрансферазы (AST) в сыворотке измеряли относительно мышей, инъецированных солевым раствором, используя стандартные протоколы. Оценили также общий билирубин и азот мочевины крови (АМК). Проверили изменение массы тела, которое существенно не отличалось от группы с солевым раствором. Значения ALT, AST, общего билирубина и АМК представлены ниже в табл. 44.

Таблица 44

ISIS №	Доза мг/кг	ALT	AST	Общий билирубин	АМК	Конъюгат
Солевой раствор		26	57	0,2	27	
353382	3	25	92	0,2	27	нет
	10	23	40	0,2	25	
	30	29	54	0,1	28	
655861	0,5	25	71	0,2	34	GalNac3-1 (3')
	1,5	28	60	0,2	26	
	5	26	63	0,2	28	
	15	25	61	0,2	28	
664507	0,5	25	62	0,2	25	GalNac3-2 (5')
	1,5	24	49	0,2	26	
	5	21	50	0,2	26	
	15	59	84	0,1	22	
661161	0,5	20	42	0,2	29	GalNac3-3 (5')
	1,5 г	37	74	0,2	25	
	5 г	28	61	0,2	29	
	15	21	41	0,2	25	
666224	0,5	34	48	0,2	21	GalNac3-5 (5')
	1,5	23	46	0,2	26	
	5	24	47	0,2	23	
	15	32	49	0,1	26	
666961	0,5	17	63	0,2	26	GalNac3-6 (5')
	1,5	23	68	0,2	26	
	5	25	66	0,2	26	
	15	29	107	0,2	28	
666981	0,5	24	48	0,2	26	GalNac3-7 (5')
	1,5	30	55	0,2	24	
	5	46	74	0,1	24	
	15	29	58	0,1	26	
666881	0,5	20	65	0,2	27	GalNac3-10 (5')
	1,5	23	59	0,2	24	
	5	45	70	0,2	26	
	15	21	57	0,2	24	

Пример 57. Исследование продолжительности действия олигонуклеотидов, содержащих 3'-группу конъюгата, направленных на ApoC III, *in vivo*.

Мышам однократно ввели инъекцию дозы, указанной ниже, и в течение 42 дней наблюдали уровни ApoC III и триглицеридов в плазме (TG в плазме). Исследование выполнили, используя в каждой группе 3 трансгенных мышей, которые экспрессируют человеческий АРОС-III.

Таблица 45
Модифицированные ASO, направленные на AroC III

ASO	Последовательность (от 5' к 3')	Связи	SEQ ID NO
ISIS 304801	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	PS	821
ISIS 647535	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} A _{es} T _{eo} A _{do} ^o -GalNAc ₃ -1 _a	PS	822
ISIS 647536	A _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{eo} T _{eo} T _{es} A _{es} T _{eo} A _{do} ^o -GalNAc ₃ -1 _a	PO/PS	822

Заглавные буквы указывают нуклеосомы для каждого нуклеотида, а ^mC означает 5-метилцитозин. Нижние индексы: "e" означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид; "d" означает β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "s" означает тиофосфатный межнуклеозидный линкер (PS); "o" означает фосфодиэфирный межнуклеозидный линкер (PO); и "o" означает OP(=O)(OH)-. Группы конъюгата выделены жирным.

Структура GalNAc₃-1_a показана ранее в примере 9.

Таблица 46
мРНК AroC III (% от солевого раствора на 1 день) и уровни TG в плазме (% от солевого раствора на 1 день)

ASO	Доза	Мишень	3 день	7 день	День 14	35 день	День 42
Солевой раствор	0 мг/кг	AroC-III	98	100	100	95	116
ISIS 304801	30 мг/кг	AroC-III	28	30	41	65	74
ISIS 647535	10 мг/кг	AroC-III	16	19	25	74	94
ISIS 647536	10 мг/кг	AroC-III	18	16	17	35	51
Солевой раствор	0 мг/кг	TG в плазме	121	130	123	105	109
ISIS 304801	30 мг/кг	TG в плазме	34	37	50	69	69
ISIS 647535	10 мг/кг	TG в плазме	18	14	24	18	71
ISIS 647536	10 мг/кг	TG в плазме	21	19	15	32	35

Как можно видеть в представленной выше таблице, продолжительность действия увеличивается при добавлении 3'-группы конъюгата, по сравнению с несопряженным олигонуклеотидом. Дополнительное увеличение продолжительности действия наблюдали для смешанного сопряженного PO/PS олигонуклеотида 647536, по сравнению с сопряженным олигонуклеотидом 647535, содержащим только PS.

Пример 58. Дозозависимое исследование олигонуклеотидов, содержащих 3'-группу конъюгата (сравнение GalNAc₃-1 и GalNAc₄-11), направленных на SRB-1, in vivo.

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже, испытывали в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования SRB-1 у мышей. Несопряженный ISIS 440762 включили в качестве несопряженного стандарта. Каждая из групп конъюгата была присоединена к 3'-концу соответствующего олигонуклеотида при помощи расщепляемого фрагмента фосфодиэфир-связанного 2'-дезоксиденозинового нуклеотида.

Структура GalNAc₃-1_a показана ранее в примере 9. Структура GalNAc₃-11_a показана ранее в примере 50.

Лечение.

Шестинедельным самцам мышей Balb/c (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) ввели однократную подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, соединения ISIS 440762, 651900, 663748 или солевого раствора. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей усыпили через 72 ч после последнего введения для определения уровней мРНК SRB-1 в печени при помощи ПЦР в реаль-

ном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней мРНК SRB-1 для каждой экспериментальной группы, нормализованных к контрольному образцу, обработанному солевым раствором.

Как показано в табл. 47, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК SRB-1 дозозависимым образом. Антисмысловые олигонуклеотиды, содержащие фосфодиэфир-связанные конъюгаты GalNAc₃-1 и GalNAc₄-11 у 3'-конца (ISIS 651900 и ISIS 663748), демонстрируют значительное усиление эффективности, по сравнению с несопряженным антисмысловым олигонуклеотидом (ISIS 440762). Эти два сопряженных олигонуклеотида, GalNAc₃-1 и GalNAc₄-11, были одинаково эффективными.

Таблица 47

Модифицированные ASO, направленные на SRB-1

ASO	Последовательность (от 5' к 3')	Доза, мг/кг	% от контроля с солевым раствором	SEQ ID NO
Солевой раствор			100	
ISIS 440762	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds}	0,6	73,45	823
	^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	2	59,66	
		6	23,50	
ISIS 651900	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ko} Ado'-GalNAc3-1a	0,2	62,75	824
		0,6	29,14	
		2	8,61	
		6	5,62	
ISIS 663748	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ko} Ado'-GalNAc4-11a	0,2	63,99	824
		0,6	33,53	
		2	7,58	
		6	5,52	

Заглавные буквы указывают нуклеос основание для каждого нуклеозида, а ^mC означает 5-метилцитозин. Нижние индексы: "e" означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид; "k" означает 6'-(S)-CH₃ бициклический нуклеозид; "d" означает β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "s" означает тиофосфатную межнуклеозидную связь (PS); "o" означает фосфодиэфирную межнуклеозидную связь (PO); и "o'" означает -O-P(=O)(OH)-. Группы конъюгата выделены жирным.

Уровни трансаминазы в печени, аланин-аминотрансферазы (ALT) и аспартат-аминотрансферазы (AST) в сыворотке измеряли относительно мышей, инъецированных солевым раствором, используя стандартные протоколы. Оценили также общий билирубин и азот мочевины крови (АМК). Проверили изменение массы тела, которое существенно не отличалось от группы с солевым раствором. Значения ALT, AST, общего билирубина и АМК представлены ниже в табл. 48.

Таблица 48

ISIS №	Доза мг/кг	ALT	AST	Общий билирубин	АМК	Конъюгат
Солевой раствор		30	76	0,2	40	
440762	0,60	32	70	0,1	35	нет
	2	26	57	0,1	35	

	6	31	48	0,1	39	
651900	0,2	32	115	0,2	39	GalNac3-1 (3')
	0,6	33	61	0,1	35	
	2	30	50	0,1	37	
	6	34	52	0,1	36	
663748	0,2	28	56	0,2	36	GalNac4-11 (3')
	0,6	34	60	0,1	35	
	2	44	62	0,1	36	
	6	38	71	0,1	33	

Пример 59. Действие GalNac₃-1-сопряженных ASO, направленных на FXI, in vivo.

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже, испытали в исследовании действия многократных нарастающих доз на антисмысловое ингибирование FXI у мышей. ISIS 404071 включили в качестве несопряженного стандарта. Каждая из групп конъюгата была присоединена к 3'-концу соответствующего олигонуклеотида при помощи расщепляемого фрагмента фосфодиэфир-связанного 2'-дезоксиаденозинового нуклеозида.

Таблица 49
Модифицированные ASO, направленные на FXI

ASO	Последовательность (от 5' к 3')	Связи	SEQ ID NO
ISIS 404071	T _{es} G _{es} G _{es} T _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{es} G _{es} A _{es} G _{es} G _e	PS	832
ISIS 656172	T _{es} G _{es} G _{es} T _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{es} G _{es} A _{es} G _{es} G _{eo} A _{do} '- GalNac3-1a	PS	833
ISIS 656173	T _{es} G _{eo} G _{eo} T _{eo} A _{eo} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} G _{eo} A _{es} G _{es} G _{eo} A _{do} '- GalNac3-1a	PO/PS	833

Заглавные буквы указывают нуклеобазу для каждого нуклеозида, а ^mC означает 5-метилцитозин. Нижние индексы: "e" означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид; "d" означает β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "s" означает тиофосфатный межнуклеозидный линкер (PS); "o" означает фосфодиэфирный межнуклеозидный линкер (PO); и "o'" означает OP(=O)(OH)-. Группы конъюгата выделены жирным.

Структура GalNac₃-1a показана ранее в примере 9.

Лечение.

Шестинедельным самцам мышей Balb/c (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) дважды в неделю в течение 3 недель вводили подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, соединения ISIS 404071, 656172, 656173 или PBS в качестве контрольного образца. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей усыпили через 72 ч после последнего введения для определения уровней мРНК FXI в печени при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Измерили также уровни белка FXI в плазме при помощи твердофазного иммуноферментного анализа. Уровни мРНК FXI определяли относительно общей РНК (при помощи RIBOGREEN®), затем нормализовали к контрольному образцу, обработанному PBS. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней мРНК FXI для каждой экспериментальной группы. Данные нормализовали к контрольному образцу, обработанному PBS, и обозначили как "% PBS". ED₅₀ измеряли по таким же способам, как описаны ранее, и указанные значения представлены ниже.

Таблица 50

мРНК фактора XI (% от солевого раствора)

ASO	Доза, мг/кг	% от контрольного образца	Конъюгат	Связи
Солевой раствор		100	нет	
ISIS	3	92	нет	PS
404071	10	40		
	30	15		
ISIS 656172	0,7	74	GalNAc ₃ -1	PS
	2	33		
	6	9		
ISIS 656173	0,7	49	GalNAc ₃ -1	PO/PS
	2	22		
	6	1		

Как показано в табл. 50, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК FXI дозозависимым образом. Олигонуклеотиды, содержащие группу конъюгата 3'-GalNAc₃-1, демонстрируют значительное усиление эффективности, по сравнению с несопряженным антисмысловым олигонуклеотидом (ISIS 404071). Между эти двумя сопряженными олигонуклеотидами дополнительное усиление эффективности было обеспечено за счет замены некоторых PS линкеров на PO (ISIS 656173).

Как показано в табл. 50а, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни белка FXI дозозависимым образом. Олигонуклеотиды, содержащие группу конъюгата 3'-GalNAc₃-1, демонстрируют значительное усиление эффективности, по сравнению с несопряженным антисмысловым олигонуклеотидом (ISIS 404071). Между эти двумя сопряженными олигонуклеотидами дополнительное усиление эффективности было обеспечено за счет замены некоторых PS линкеров на PO (ISIS 656173).

Таблица 50а

Белок фактора XI (% от солевого раствора)

ASO	Доза, мг/кг	Белок (% от контрольного образца)	Конъюгат	Связи
Солевой раствор		100	нет	
ISIS 404071	3	127	нет	PS
	10	32		
	30	3		
ISIS 656172	0,7	70	GalNAc ₃ -1	PS
	2	23		
	6	1		
ISIS 656173	0,7	45	GalNAc ₃ -1	PO/PS
	2	6		
	6	0		

Уровни трансаминазы в печени, аланин-аминотрансферазы (ALT) и аспартат-аминотрансферазы (AST) в сыворотке измеряли относительно мышей, инъецированных солевым раствором, используя стандартные протоколы. Оценили также общий билирубин, общий альбумин, CRE и азот мочевины крови (АМК). Проверили изменение массы тела, которое существенно не отличалось от группы с солевым раствором. Значения ALT, AST, общего билирубина и АМК представлены ниже в таблице.

Таблица 51

ISIS №	Доза мг/кг	ALT	AST	Общий альбумин	Общий билирубин	CRE	АМК	Конъюгат
Солевой раствор		71,8	84,0	3,1	0,2	0,2	22,9	
404071	3	152,8	176,0	3,1	0,3	0,2	23,0	нет
	10	73,3	121,5	3,0	0,2	0,2	21,4	
	30	82,5	92,3	3,0	0,2	0,2	23,0	
656172	0,7	62,5	111,5	3,1	0,2	0,2	23,8	GalNac3-1 (3')
	2	33,0	51,8	2,9	0,2	0,2	22,0	
	6	65,0	71,5	3,2	0,2	0,2	23,9	
656173	0,7	54,8	90,5	3,0	0,2	0,2	24,9	GalNac3-1 (3')
	2	85,8	71,5	3,2	0,2	0,2	21,0	
	6	114,0	101,8	3,3	0,2	0,2	22,7	

Пример 60. Действие сопряженных ASO, направленных на SRB-1, in vitro.

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже, испытали в исследовании действия многократных нарастающих доз на антисмысловое ингибирование SRB-1 в первичных гепатоцитах мышей. ISIS 353382 включили в качестве несопряженного стандарта. Каждая из групп конъюгата была присоединена к 3' или 5'-концу соответствующего олигонуклеотида при помощи расщепляемого фрагмента фосфодиэфир-связанного 2'-дезоксиденозинового нуклеозида.

Таблица 52

Модифицированные ASO, направленные на SRB-1

ASO	Последовательность (от 5' к 3')	Мотив	Конъюгат	SEQ ID NO
ISIS 353382	Ges ^m CesT _{es} T _{es} ^m CesA _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} m ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m Ces ^m CesT _{es} T _e	5/10/5	нет	829
ISIS 655861	Ges ^m CesT _{es} T _{es} ^m CesA _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} m ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m Ces ^m CesT _{es} T _{eo} Ado'-GalNac3-1a	5/10/5	GalNac3-1	830
ISIS 655862	Ges ^m CeoT _{eo} T _{eo} ^m CeoA _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} m ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m Ceo ^m CesT _{es} T _{eo} Ado'-GalNac3-1a	5/10/5	GalNac3-1	830
ISIS 661161	GalNac3-3a-o'Ado Ges ^m CesT _{es} T _{es} ^m CesA _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m Ces ^m CesT _{es} T _e	5/10/5	GalNac3-3	831
ISIS 665001	GalNac3-8a-o'Ado Ges ^m CesT _{es} T _{es} ^m CesA _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m Ces ^m CesT _{es} T _e	5/10/5	GalNac3-8	831
ISIS 664078	Ges ^m CesT _{es} T _{es} ^m CesA _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} m ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m Ces ^m CesT _{es} T _{eo} Ado'-GalNac3-9a	5/10/5	GalNac3-9	830
ISIS 666961	GalNac3-6a-o'Ado Ges ^m CesT _{es} T _{es} ^m CesA _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m Ces ^m CesT _{es} T _e	5/10/5	GalNac3-6	831
ISIS 664507	GalNac3-2a- o'Ado Ges ^m CesT _{es} T _{es} ^m CesA _{ds} G _{ds} T _{ds}	5/10/5	GalNac3-2	831

	${}^m\text{C}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}{}^m\text{C}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{es}}{}^m\text{C}_{\text{es}}{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{e}}$			
ISIS 666881	GalNAc₃-10a- $\text{o}'\text{A}_{\text{do}}\text{G}_{\text{es}}{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{A}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}$ ${}^m\text{C}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}{}^m\text{C}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{es}}{}^m\text{C}_{\text{es}}{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{e}}$	5/10/5	GalNAc₃-10	831
ISIS 666224	GalNAc₃-5a- $\text{o}'\text{A}_{\text{do}}\text{G}_{\text{es}}{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{A}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}$ ${}^m\text{C}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}{}^m\text{C}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{es}}{}^m\text{C}_{\text{es}}{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{e}}$	5/10/5	GalNAc₃-5	831
ISIS 666981	GalNAc₃-7a- $\text{o}'\text{A}_{\text{do}}\text{G}_{\text{es}}{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{A}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}$ ${}^m\text{C}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}{}^m\text{C}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{es}}{}^m\text{C}_{\text{es}}{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{e}}$	5/10/5	GalNAc₃-7	831

Заглавные буквы указывают нуклеос основание для каждого нуклеотида, а ${}^m\text{C}$ означает 5-метилцитозин. Нижние индексы: "e" означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид; "d" означает β -D-2'-дезоксирибонуклеозид; "s" означает тиофосфатный межнуклеозидный линкер (PS); "o" означает фосфодиэфирный межнуклеозидный линкер (PO); и "o'" означает OP(=O)(OH)-. Группы конъюгата выделены жирным.

Структура GalNAc₃-1a показана ранее в примере 9. Структура GalNAc₃-3a показана ранее в примере 39. Структура GalNAc₃-8a показана ранее в примере 47. Структура GalNAc₃-9a показана ранее в примере 52. Структура GalNAc₃-6a показана ранее в примере 51. Структура GalNAc₃-2a показана ранее в примере 37. Структура GalNAc₃-10a показана ранее в примере 46. Структура GalNAc₃-5a показана ранее в примере 49. Структура GalNAc₃-7a показана ранее в примере 48.

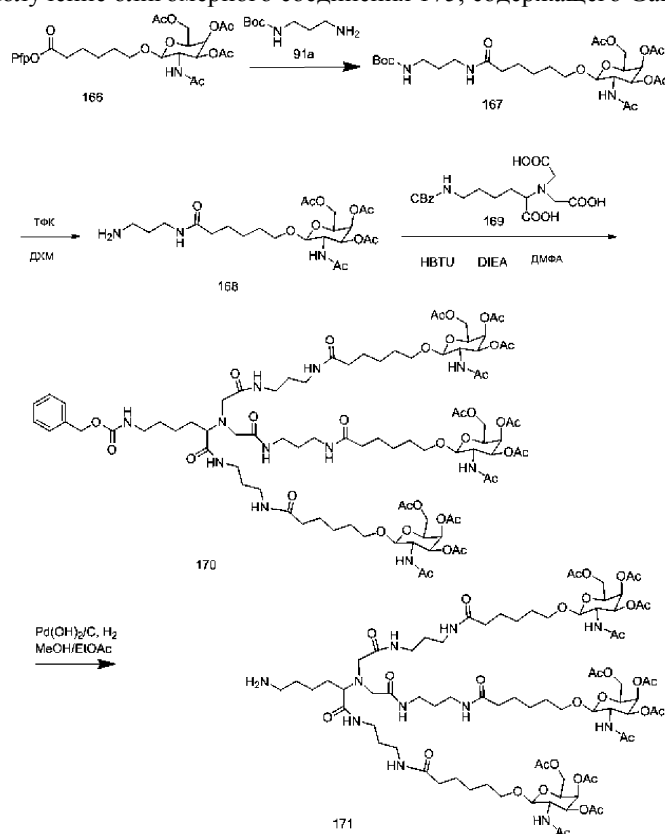
Лечение.

Олигонуклеотиды, перечисленный выше, испытывали *in vitro* в первичных гепатоцитах мышей, помещенных на планшет при плотности 25000 клеток на лунку, и обрабатывали 0,03, 0,08, 0,24, 0,74, 2,22, 6,67 или 20 нМ модифицированного олигонуклеотида. После обработки в течение приблизительно 16 ч, из клеток выделили РНК и измерили уровни мРНК при помощи количественной ПЦР в реальном времени, а уровни мРНК SRB-1 III скорректировали в соответствии с общим содержанием РНК, измеренным при помощи RIBOGREEN®.

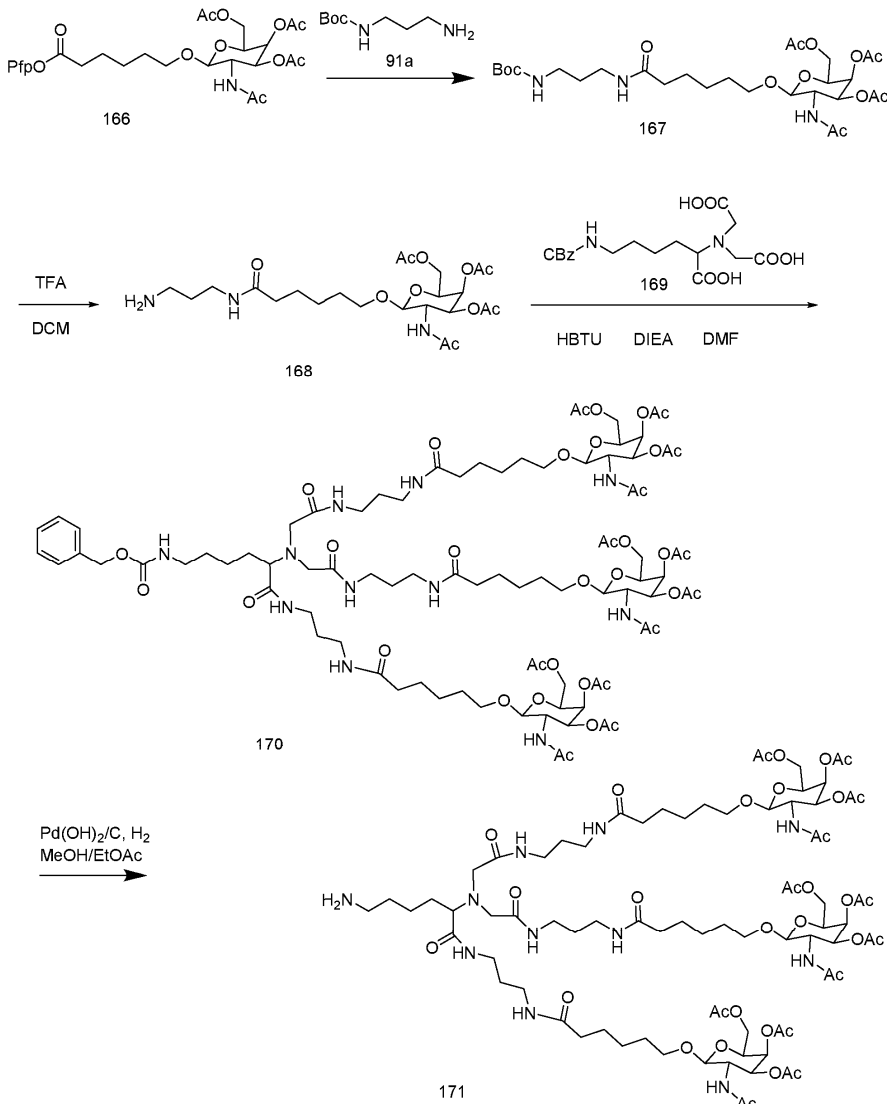
IC₅₀ рассчитали по стандартным способам, а результаты представлены в табл. 53. Результаты показывают, что при условиях свободного поглощения, в которых не использованы никакие реагенты или электроимпульсные приемы для искусственного ускорения входа олигонуклеотидов в клетки, олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc, были существенно более эффективными в гепатоцитах, чем исходный олигонуклеотид (ISIS 353382), который не содержит конъюгат GalNAc.

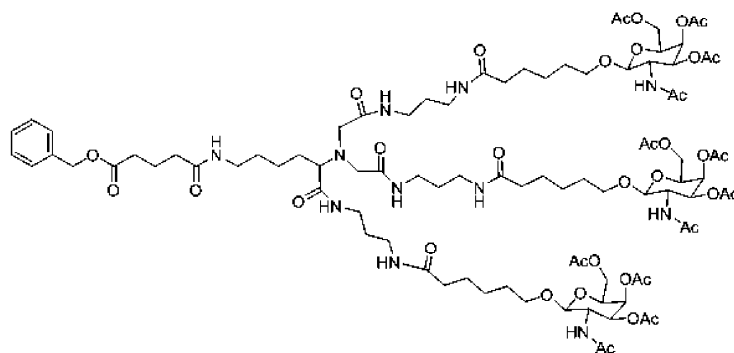
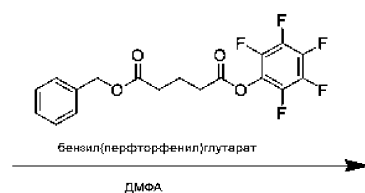
Таблица 53

ASO	IC ₅₀ (нМ)	Межнуклеозидные связи	Конъюгат	SEQ ID NO
ISIS 353382	190 ^a	PS	нет	829
ISIS 655861	11 ^a	PS	GalNAc ₃ -1	830
ISIS 655862	3	PO/PS	GalNAc ₃ -1	830
ISIS 661161	15 ^a	PS	GalNAc ₃ -3	831
ISIS 665001	20	PS	GalNAc ₃ -8	831
ISIS 664078	55	PS	GalNAc ₃ -9	830
ISIS 666961	22 ^a	PS	GalNAc ₃ -6	831
ISIS 664507	30	PS	GalNAc ₃ -2	831
ISIS 666881	30	PS	GalNAc ₃ -10	831
ISIS 666224	30 ^a	PS	GalNAc ₃ -5	831
ISIS 666981	40	PS	GalNAc ₃ -7	831

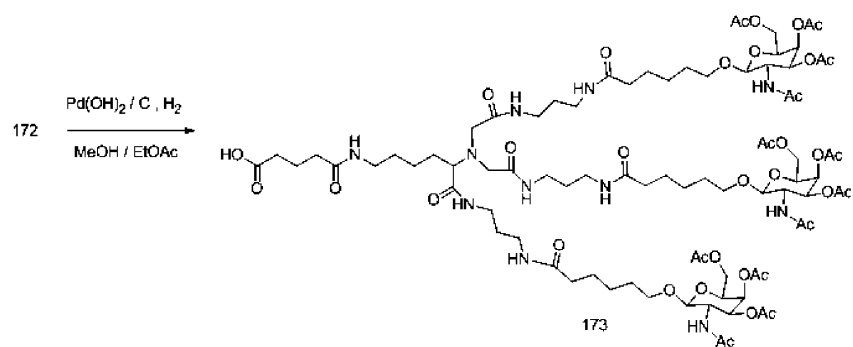
^a Среднее для нескольких повторов.Пример 61. Получение олигомерного соединения 175, содержащего GalNAc₃-12

036496

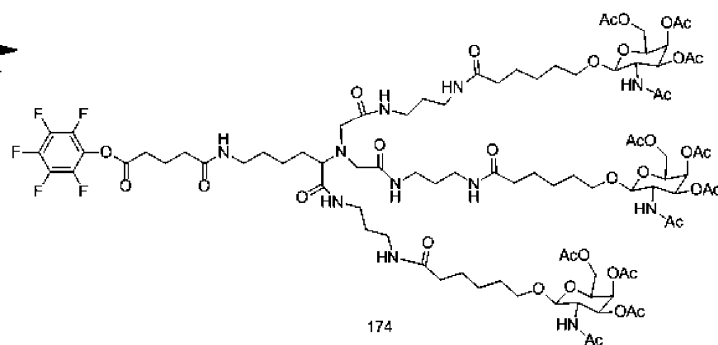
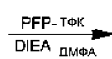




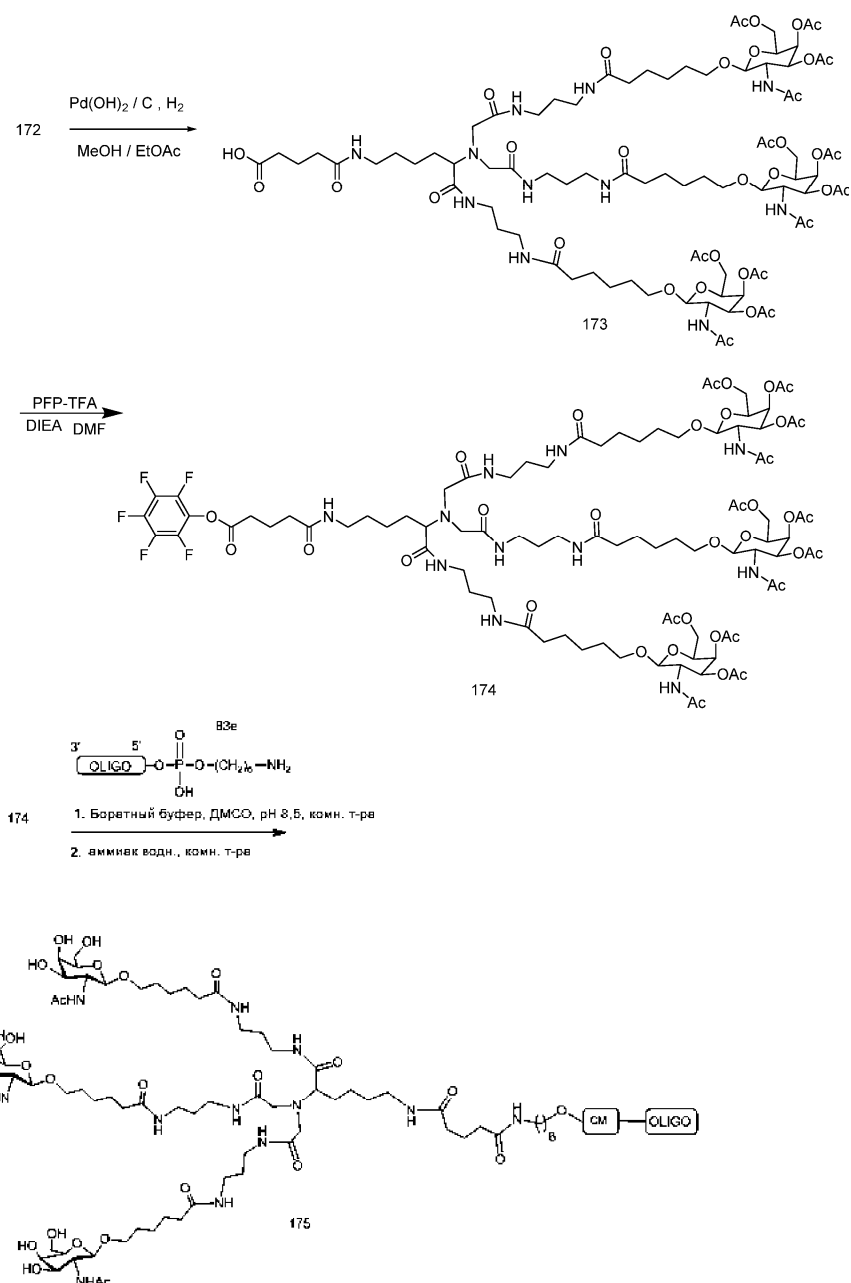
172



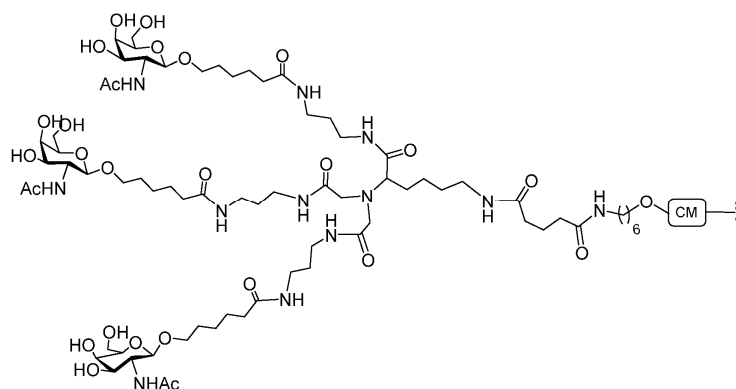
173



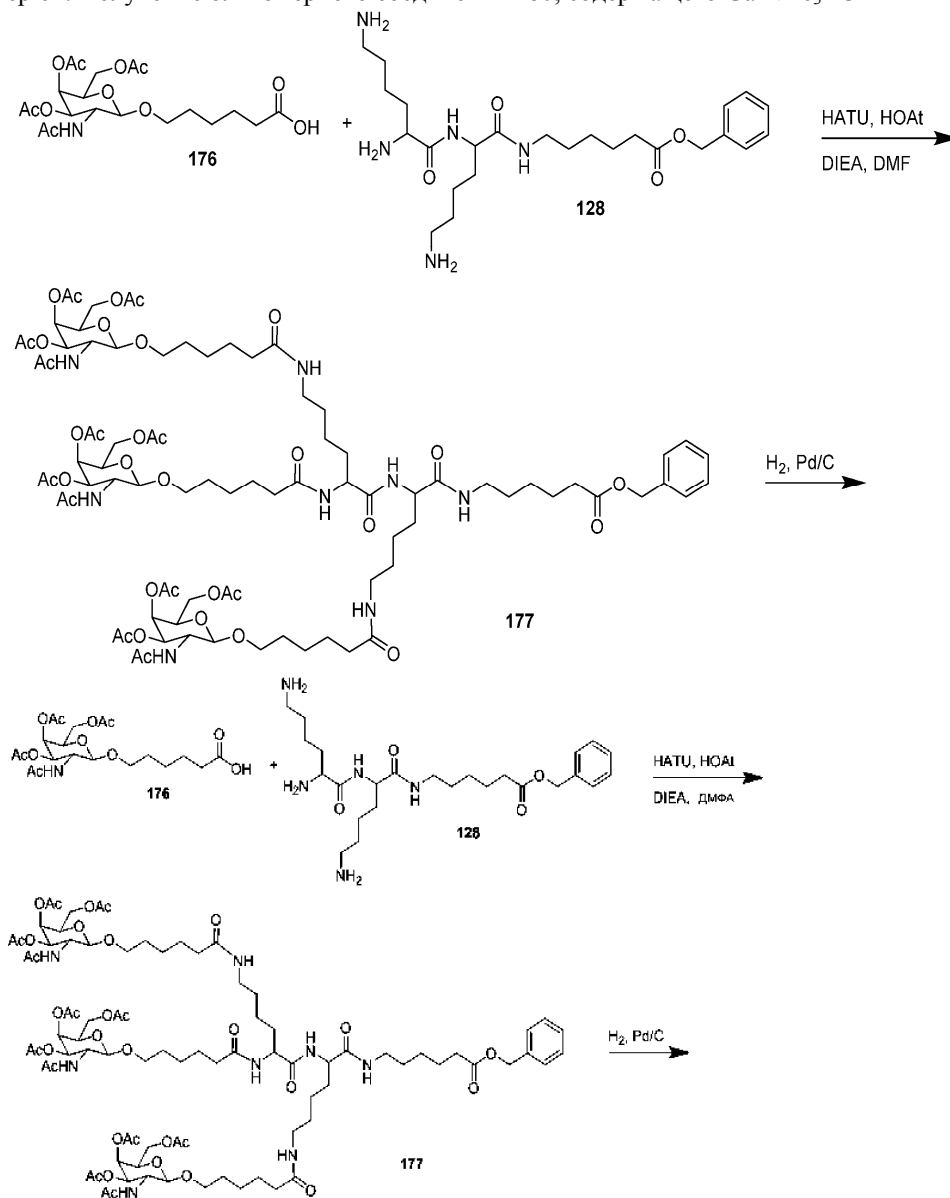
174

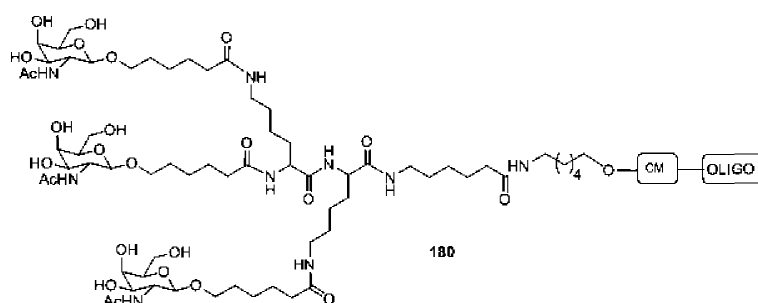
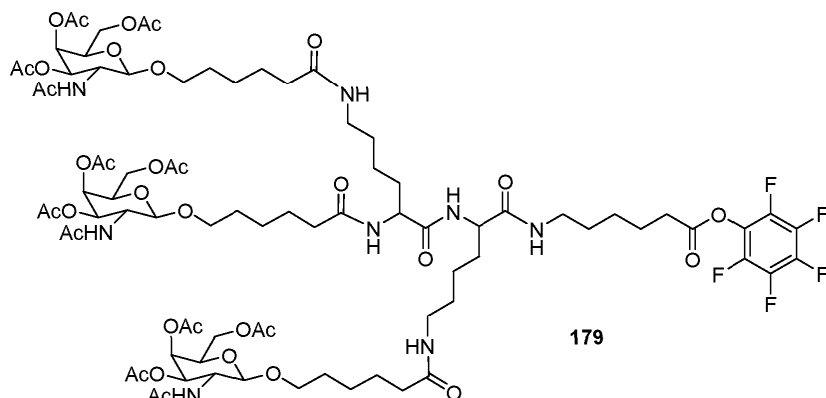
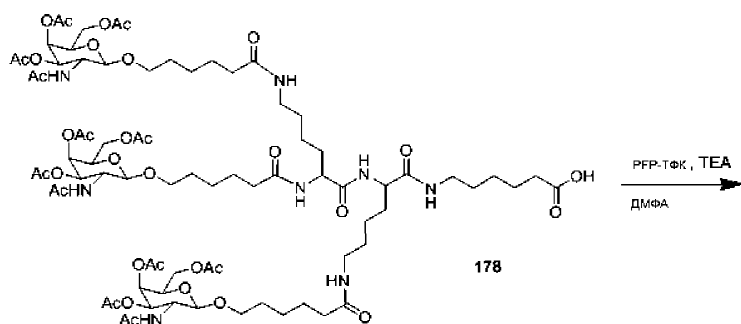


Соединение 169 имеется в продаже. Соединение 172 получили добавлением бензил(перфторфенил)глутарата к соединению 171. Бензил(перфторфенил)глутарат получили добавлением PFP-ТФК и DIEA к 5-(бензилокси)-5-оксопентановой кислоте в ДМФА. Олигомерное соединение 175, содержащее группу конъюгата GalNAc₃-12, получили из соединения 174, используя общие способы, описанные в примере 46. Кластерная часть GalNAc₃ группы конъюгата GalNAc₃-12 (GalNAc₃-12_a) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных групп конъюгата. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент представляет собой -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-. Структура GalNAc₃-12 (GalNAc₃-12_a-CM-) представлена ниже:

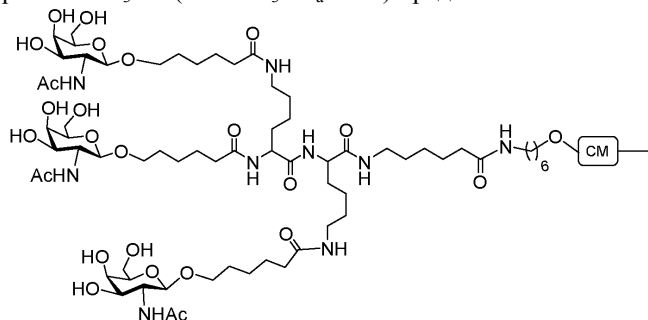


Пример 62. Получение олигомерного соединения 180, содержащего GalNAc₃-13

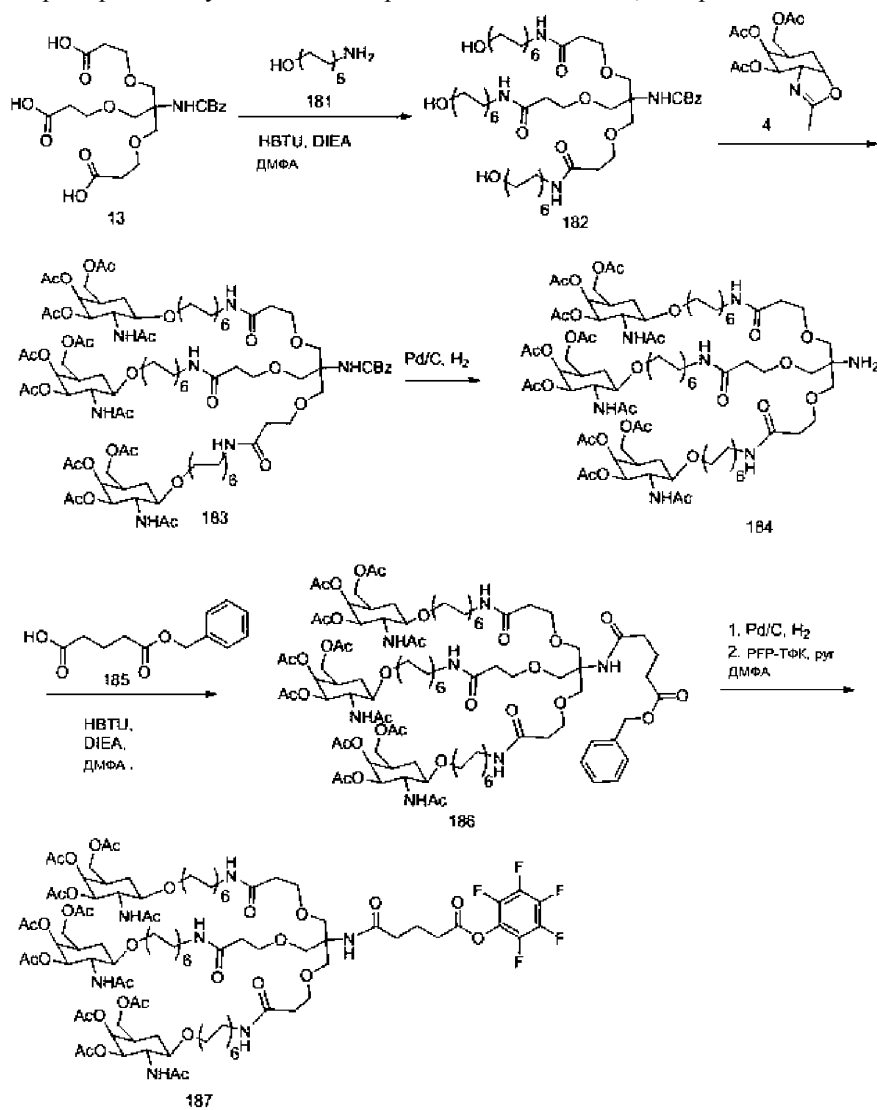


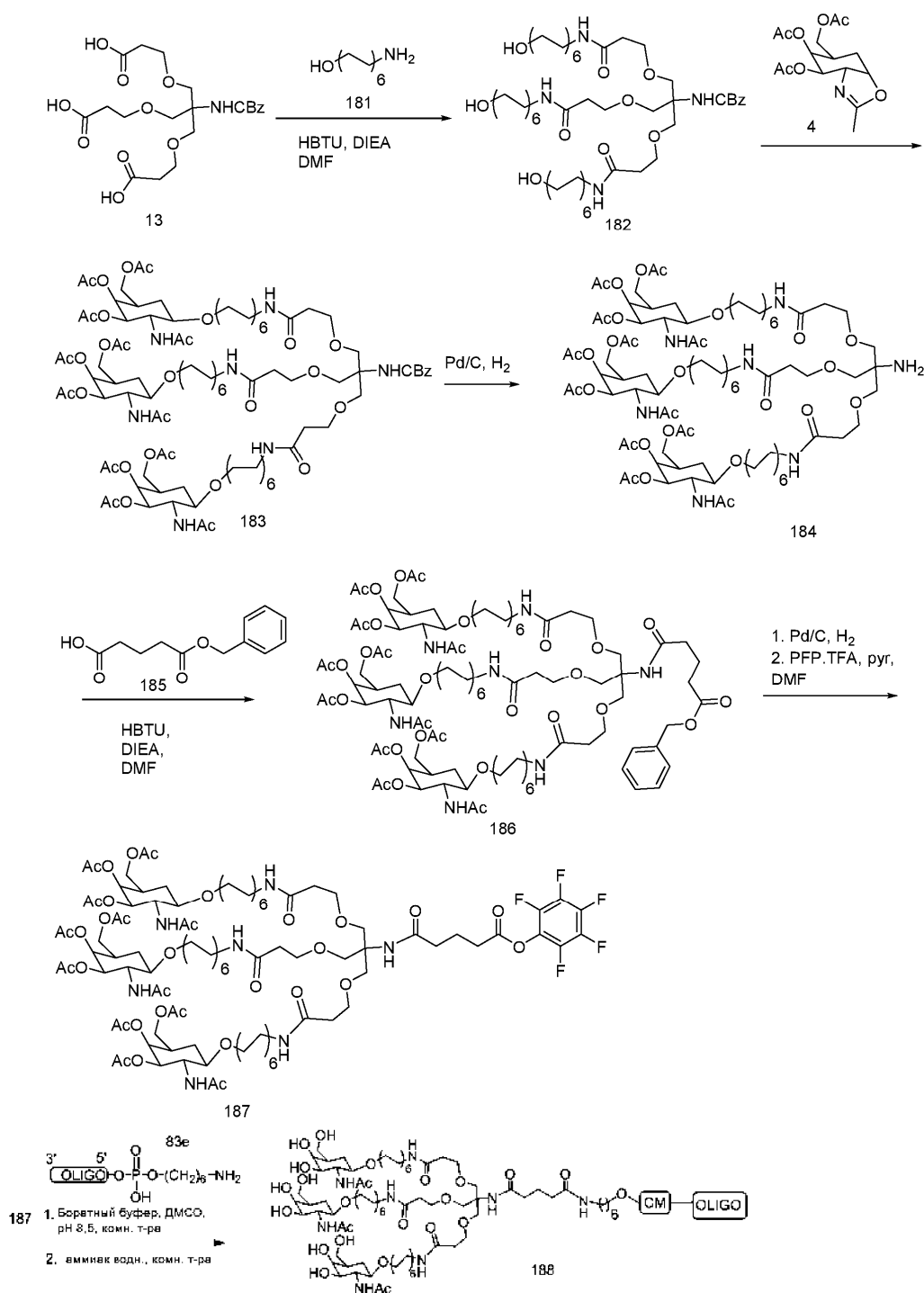


Соединение 176 получили по общему способу, представленному в примере 2. Олигомерное соединение 180, содержащее группу конъюгата GalNAc₃-13, получили из соединения 177, используя общие способы, описанные в примере 49. Кластерная часть GalNAc₃ группы конъюгата GalNAc₃-13 (GalNAc₃-13_a) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных групп конъюгата. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент представляет собой -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-. Структура GalNAc₃-13 (GalNAc₃-13_a-CM-) представлена ниже:

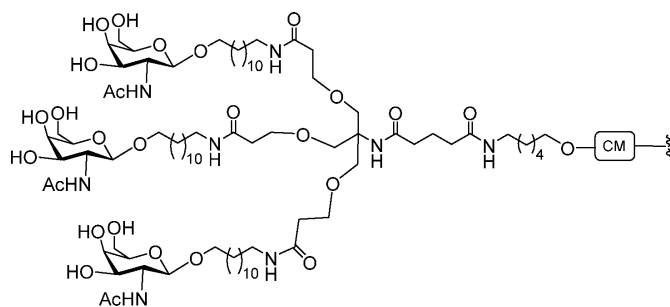
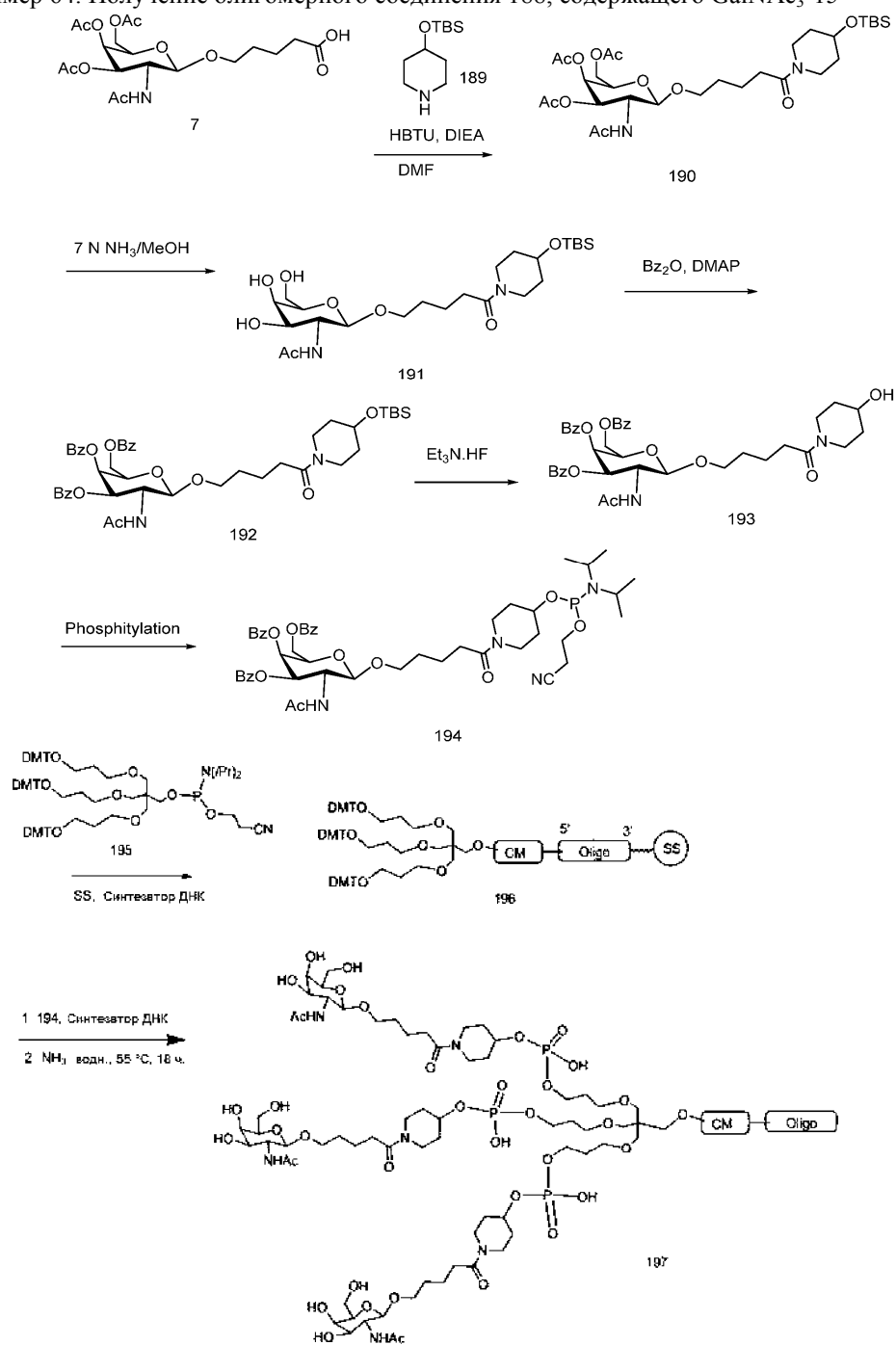


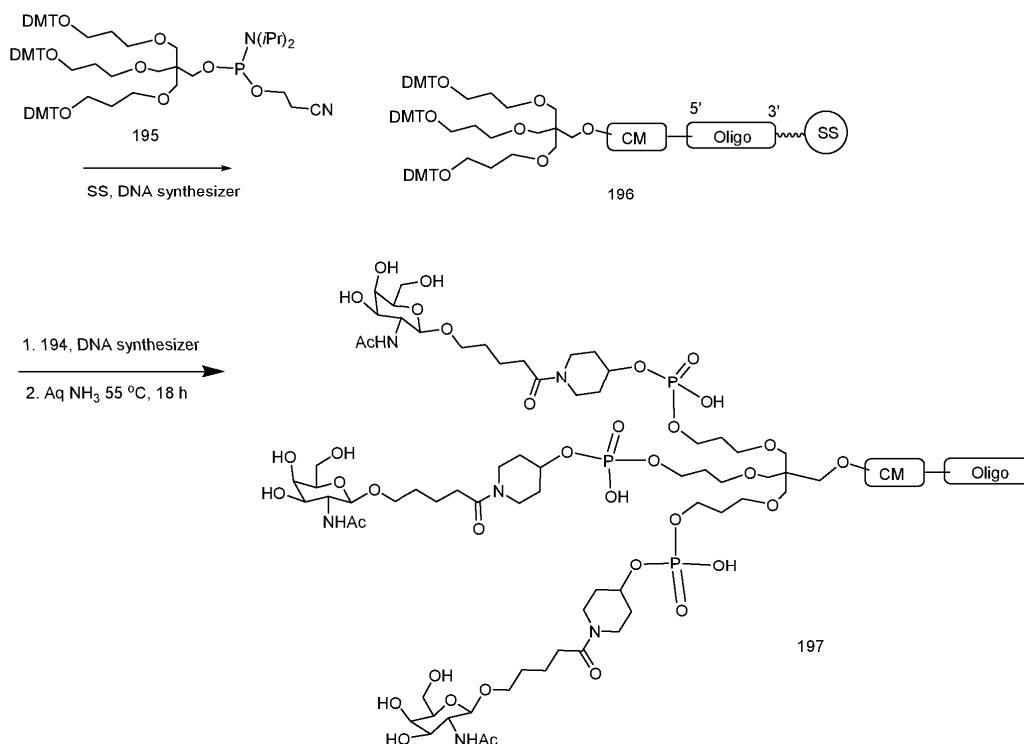
Пример 63. Получение олигомерного соединения 188, содержащего GalNAc₃-14



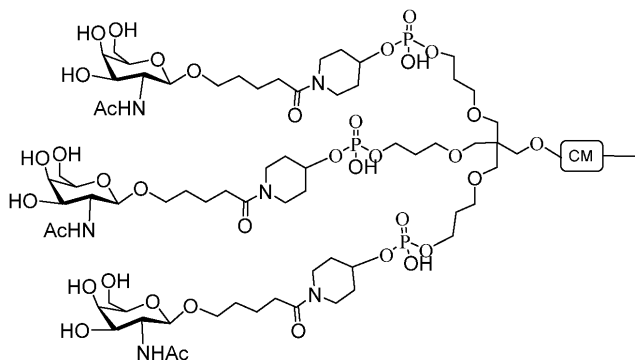


Соединения 181 и 185 имеются в продаже. Олигомерное соединение 188, содержащее группу конъюгата GalNAc₃-14, получили из соединения 187, используя общие способы, описанные в примере 46. Кластерная часть GalNAc₃ группы конъюгата GalNAc₃-14 (GalNAc₃-14_a) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных групп конъюгата. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент представляет собой -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-. Структура GalNAc₃-14 (GalNAc₃-14_a-CM-) представлена ниже:

Пример 64. Получение олигомерного соединения 188, содержащего GalNAc₃-15



Соединение 189 имеется в продаже. Соединение 195 получили по общему способу, представленному в примере 31. Олигомерное соединение 197, содержащее группу конъюгата GalNAc₃-15, получили из соединений 194 и 195 по стандартным способам синтеза олигонуклеотидов. Кластерная часть GalNAc₃ группы конъюгата GalNAc₃-15 (GalNAc₃-15_a) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных групп конъюгата. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент представляет собой -P(=O)(OH)-A_n-P(=O)(OH)-. Структура GalNAc₃-15 (GalNAc₃-15_a-CM-) представлена ниже:



Пример 65. Дозозависимое исследование олигонуклеотидов, содержащих 5'-группу конъюгата (сравнение GalNAc₃-3, 12, 13, 14 и 15), направленных на SRB-1, *in vivo*.

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже, испытали в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования SRB-1 у мышей. Несопряженный ISIS 353382 включили в качестве стандарта. Каждая из групп конъюгата GalNAc₃ была присоединена к 5'-концу соответствующего олигонуклеотида при помощи расщепляемого фрагмента фосфодиэфир-связанного 2'-дезоксиденозинового нуклеотида.

Таблица 54

Модифицированные ASO, направленные на SRB-1

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Конъюгат	SEQ ID NO
353382	G ^{es} C ^{es} T ^{es} T ^{es} C ^{es} A ^{ds} G ^{ds} T ^{ds} C ^{ds} A ^{ds} T ^{ds} G ^{ds} A ^{ds} C ^{ds} T ^{ds} T ^{es} C ^{es} C ^{es} T ^{es} T ^e	нет	829
661161	GalNAc₃-3a- o'Ado G ^{es} C ^{es} T ^{es} T ^{es} C ^{es} A ^{ds} G ^{ds} T ^{ds} C ^{ds} A ^{ds} T ^{ds} G ^{ds} A ^{ds} C ^{ds} T ^{ds} T ^{es} C ^{es} C ^{es} T ^{es} T ^e	GalNAc ₃ -3	831
671144	GalNAc₃-12a- o'Ado G ^{es} C ^{es} T ^{es} T ^{es} C ^{es} A ^{ds} G ^{ds} T ^{ds} C ^{ds} A ^{ds} T ^{ds} G ^{ds} A ^{ds} C ^{ds} T ^{ds} T ^{es} C ^{es} C ^{es} T ^{es} T ^e	GalNAc ₃ -12	831
670061	GalNAc₃-13a- o'Ado G ^{es} C ^{es} T ^{es} T ^{es} C ^{es} A ^{ds} G ^{ds} T ^{ds} C ^{ds} A ^{ds} T ^{ds} G ^{ds} A ^{ds} C ^{ds} T ^{ds} T ^{es} C ^{es} C ^{es} T ^{es} T ^e	GalNAc ₃ -13	831
671261	GalNAc₃-14a- o'Ado G ^{es} C ^{es} T ^{es} T ^{es} C ^{es} A ^{ds} G ^{ds} T ^{ds} C ^{ds} A ^{ds} T ^{ds} G ^{ds} A ^{ds} C ^{ds} T ^{ds} T ^{es} C ^{es} C ^{es} T ^{es} T ^e	GalNAc ₃ -14	831
671262	GalNAc₃-15a- o'Ado G ^{es} C ^{es} T ^{es} T ^{es} C ^{es} A ^{ds} G ^{ds} T ^{ds} C ^{ds} A ^{ds} T ^{ds} G ^{ds} A ^{ds} C ^{ds} T ^{ds} T ^{es} C ^{es} C ^{es} T ^{es} T ^e	GalNAc ₃ -15	831

Заглавные буквы указывают нуклеоснование для каждого нуклеозида, а ^mC означает 5-метилцитозин. Нижние индексы: "e" означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид; "d" означает β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "s" означает тиофосфатный межнуклеозидный линкер (PS); "o" означает фосфодиэфирный межнуклеозидный линкер (PO); и "o'" означает OP(=O)(OH)-. Группы конъюгата выделены жирным.

Структура GalNAc₃-3a показана ранее в примере 39. Структура GalNAc₃-12a показана ранее в примере 61. Структура GalNAc₃-13a показана ранее в примере 62. Структура GalNAc₃-14a показана ранее в примере 63. Структура GalNAc₃-15a показана ранее в примере 64.

Лечение.

Шести-восьминедельным мышам C57bl6 (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) один или два раза ввели подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, соединения ISIS 353382, 661161, 671144, 670061, 671261, 671262 или солевого раствора. Мыши, которым вводили дозу два раза, вторую дозу вводили через три дня после первой дозы. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей усыпили через 72 ч после последнего введения для определения уровней мРНК SRB-1 в печени при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней мРНК SRB-1 для каждой экспериментальной группы, нормализованных к контрольному образцу, обработанному солевым раствором.

Как показано в табл. 55, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК SRB-1 дозозависимым образом. Не наблюдали значительной разницы нокдауна мишени между животными, получавшими одну дозу, и животными, получавшими две дозы (см. ISIS 353382 в дозах 30 и 2 × 15 мг/кг; и ISIS 661161 в дозах 5 и 2 × 2,5 мг/кг). Антисмысловые олигонуклеотиды, содержащие фосфодиэфир-связанные конъюгаты GalNAc₃-3, 12, 13, 14 и 15, демонстрируют существенное усиление эффективности, по сравнению с несопряженным антисмысловым олигонуклеотидом (ISIS 353382).

Таблица 55

мРНК SRB-1 (% от солевого раствора)

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% от солевого раствора)	ED ₅₀ (мг/кг)	Конъюгат
Солевой раствор	н.д.	100,0	н.д.	н.д.
353382	3	85,0	22,4	нет
	10	69,2		
	30	34,2		
	2 x 15	36,0		
661161	0,5	87,4	2,2	GalNAc ₃ -3
	1,5	59,0		
	5	25,6		
	2 x 2,5	27,5		
	15	17,4		
671144	0,5	101,2	3,4	GalNAc ₃ -12
	1,5	76,1		
	5	32,0		
	15	17,6		
670061	0,5	94,8	2,1	GalNAc ₃ -13
	1,5	57,8		
	5	20,7		
	15	13,3		
671261	0,5	110,7	4,1	GalNAc ₃ -14
	1,5	81,9		
	5	39,8		
	15	14,1		
671262	0,5	109,4	9,8	GalNAc ₃ -15
	1,5	99,5		
	5	69,2		
	15	36,1		

Уровни трансаминазы в печени, аланин-аминотрансферазы (ALT) и аспартат-аминотрансферазы (AST) в сыворотке измеряли относительно мышей, инъецированных солевым раствором, используя стандартные протоколы. Оценили также общий билирубин и азот мочевины крови (АМК). Проверили изменение массы тела, которое существенно не отличалось от группы с солевым раствором (данные не показаны). Значения ALT, AST, общего билирубина и АМК представлены ниже в табл. 56.

Таблица 56

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Общий билирубин (мг/дл)	АМК (мг/дл)	Конъюгат
Солевой раствор	н.д.	28	60	0,1	39	н.д.
353382	3	30	77	0,2	36	нет
	10	25	78	0,2	36	
	30	28	62	0,2	35	
	2 x 15	22	59	0,2	33	
661161	0,5	39	72	0,2	34	GalNAc ₃ -3
	1,5	26	50	0,2	33	
	5	41	80	0,2	32	
	2 x 2,5	24	72	0,2	28	
	15	32	69	0,2	36	
671144	0,5	25	39	0,2	34	GalNAc ₃ - 12
	1,5	26	55	0,2	28	
	5	48	82	0,2	34	
	15	23	46	0,2	32	
670061	0,5	27	53	0,2	33	GalNAc ₃ - 13
	1,5	24	45	0,2	35	
	5	23	58	0,1	34	
	15	24	72	0,1	31	
671261	0,5	69	99	0,1	33	GalNAc ₃ - 14
	1,5	34	62	0,1	33	
	5	43	73	0,1	32	
	15	32	53	0,2	30	
671262	0,5	24	51	0,2	29	GalNAc ₃ - 15
	1,5	32	62	0,1	31	
	5	30	76	0,2	32	
	15	31	64	0,1	32	

Пример 66. Влияние различных расщепляемых фрагментов на антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, направленных на SRB-1, содержащих кластер 5'-GalNAc₃.

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже, испытали в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования SRB-1 у мышей. Каждая из групп конъюгата GalNAc₃ была присоединена к 5'-концу соответствующего олигонуклеотида при помощи фосфодиэфир-связанного нуклеозида (расщепляемый фрагмент (CM)).

Таблица 57

Модифицированные ASO, направленные на SRB-1

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO
66116 1	GalNAc₃-3a-o'A_{do}G_{es}^mC_{es}T_{es}T_{es}^mC_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{ds}A_{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	A _d	831
67069 9	GalNAc₃-3a- o'T_{do}G_{es}^mC_{eo}T_{eo}T_{eo}^mC_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{ds}A_{ds}T_{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	T _d	834
67070 0	GalNAc₃-3a- o'A_{eo}G_{es}^mC_{eo}T_{eo}T_{eo}^mC_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{ds}A_{ds}T_{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	A _e	831
67070 1	GalNAc₃-3a- o'T_{eo}G_{es}^mC_{eo}T_{eo}T_{eo}^mC_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{ds}A_{ds}T_{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	T _e	834
67116 5	GalNAc₃-13a- o'A_{do}G_{es}^mC_{eo}T_{eo}T_{eo}^mC_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{ds}A_{ds}T_{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -13a	A _d	831

Заглавные буквы указывают нуклеоснование для каждого нуклеозида, а ^mC означает 5-метилцитозин. Нижние индексы: "e" означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид; "d" означает β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "s" означает тиофосфатный межнуклеозидный линкер (PS); "o" означает фосфодифирный межнуклеозидный линкер (PO); и "o'" означает OP(=O)(OH)-. Группы конъюгата выделены жирным.

Структура GalNAc₃-3_a показана ранее в примере 39. Структура GalNAc₃-13_a показана ранее в примере 62.

Лечение.

Шести-восьминедельным мышам C57bl6 (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) ввели однократную подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, соединения ISIS 661161, 670699, 670700, 670701, 671165 или солевого раствора. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей усыпили через 72 ч после последнего введения для определения уровней мРНК SRB-1 в печени при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней мРНК SRB-1 для каждой экспериментальной группы, нормализованных к контрольному образцу, обработанному солевым раствором.

Как показано в табл. 58, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК SRB-1 дозозависимым образом. Все антисмысловые олигонуклеотиды, содержащие различные расщепляемые фрагменты, демонстрируют одинаковую эффективность.

Таблица 58

мРНК SRB-1(% от солевого раствора)				
ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% от солевого раствора)	Кластер GalNAc ₃	СМ
Солевой раствор	н.д.	100,0	н.д.	н.д.
661161	0,5	87,8	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1,5	61,3		
	5	33,8		
	15	14,0		
670699	0,5	89,4	GalNAc ₃ -3a	T _d
	1,5	59,4		
	5	31,3		
	15	17,1		
670700	0,5	79,0	GalNAc ₃ -3a	A _e
	1,5	63,3		
	5	32,8		
	15	17,9		
670701	0,5	79,1	GalNAc ₃ -3a	T _e
	1,5	59,2		
	5	35,8		
	15	17,7		
671165	0,5	76,4	GalNAc ₃ -13a	A _d
	1,5	43,2		
	5	22,6		
	15	10,0		

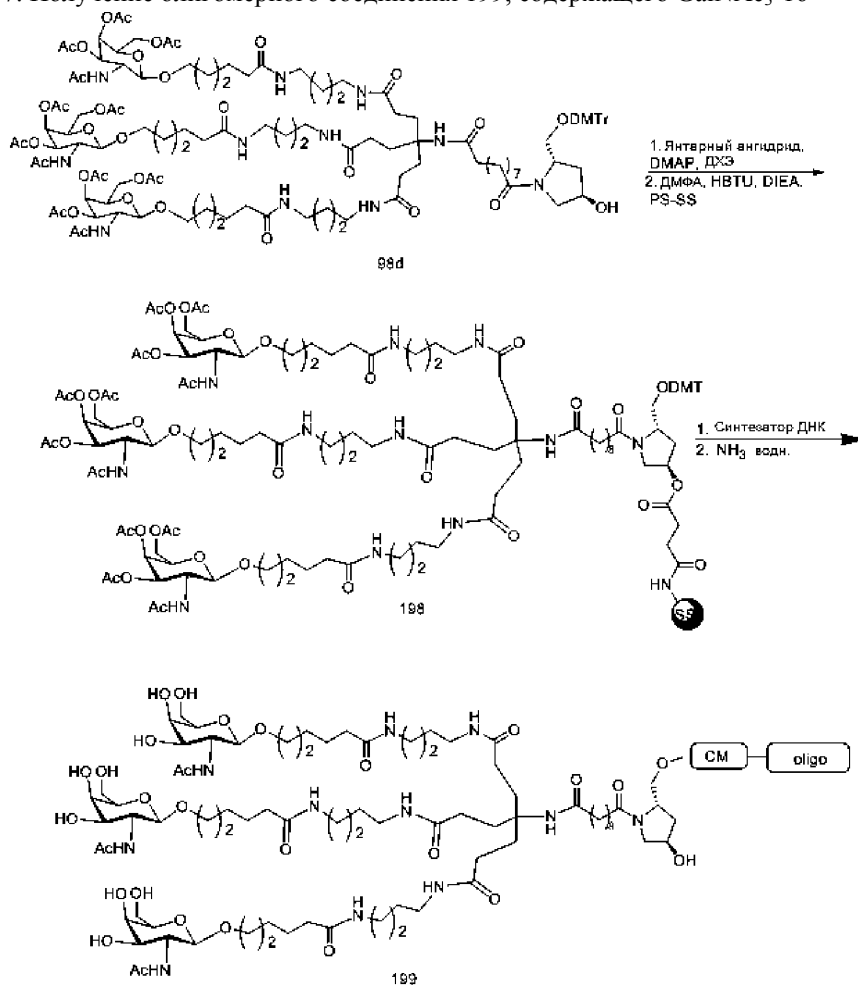
Уровни трансаминазы в печени, аланин-аминотрансферазы (ALT) и аспартат-аминотрансферазы (AST) в сыворотке измеряли относительно мышей, инъецированных солевым раствором, используя стандартные протоколы. Оценили также общий билирубин и азот мочевины крови (АМК). Проверили изменение массы тела, которое существенно не отличалось от группы с солевым раствором (данные не показаны). Значения ALT, AST, общего билирубина и АМК представлены ниже в табл. 56.

Таблица 59

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Общий билируб ин (мг/дл)	АМК (мг/дл)	Кластер GalNAc ₃	СМ
Солевой раствор	н.д.	24	64	0,2	31	н.д.	н.д.
661161	0,5	25	64	0,2	31	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1,5	24	50	0,2	32		
	5	26	55	0,2	28		

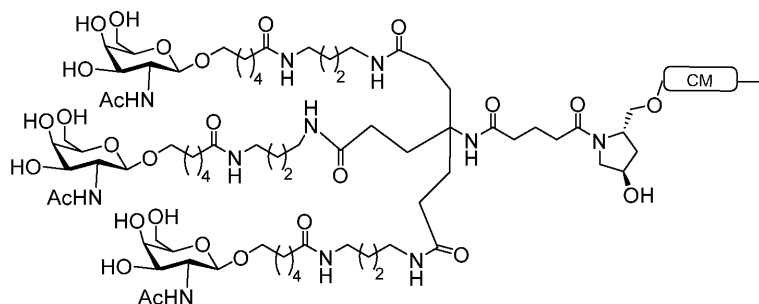
	15	27	52	0,2	31		
670699	0,5	42	83	0,2	31	GalNAc ₃ -3a	Td
	1,5	33	58	0,2	32		
	5	26	70	0,2	29		
	15	25	67	0,2	29		
670700	0,5	40	74	0,2	27	GalNAc ₃ -3a	Ac
	1,5	23	62	0,2	27		
	5	24	49	0,2	29		
	15	25	87	0,1	25		
670701	0,5	30	77	0,2	27	GalNAc ₃ -3a	Te
	1,5	22	55	0,2	30		
	5	81	101	0,2	25		
	15	31	82	0,2	24		
671165	0,5	44	84	0,2	26	GalNAc ₃ -13a	Ad
	1,5	47	71	0,1	24		
	5	33	91	0,2	26		
	15	33	56	0,2	29		

Пример 67. Получение олигомерного соединения 199, содержащего GalNAc₃-16

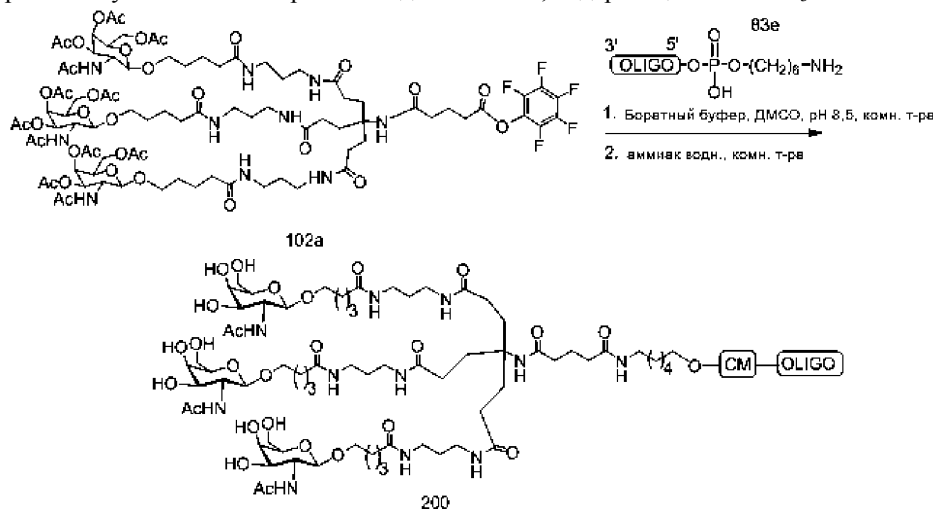


Олигомерное соединение 199, содержащее группу конъюгата GalNAc₃-16, получили с помощью общих способов, описанных в примерах 7 и 9. Кластерная часть GalNAc₃ группы конъюгата GalNAc₃-16

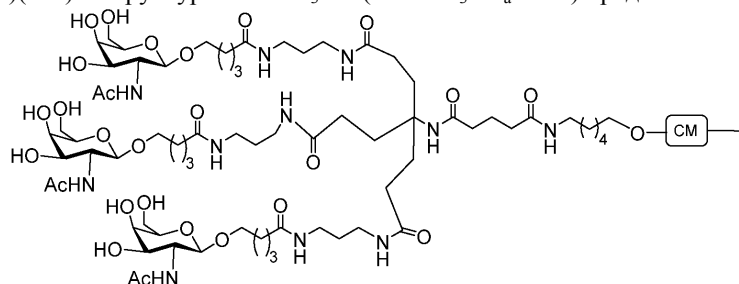
(GalNAc₃-16_a) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных групп конъюгата. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент представляет собой -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-. Структура GalNAc₃-16 (GalNAc₃-16_a-CM-) представлена ниже:



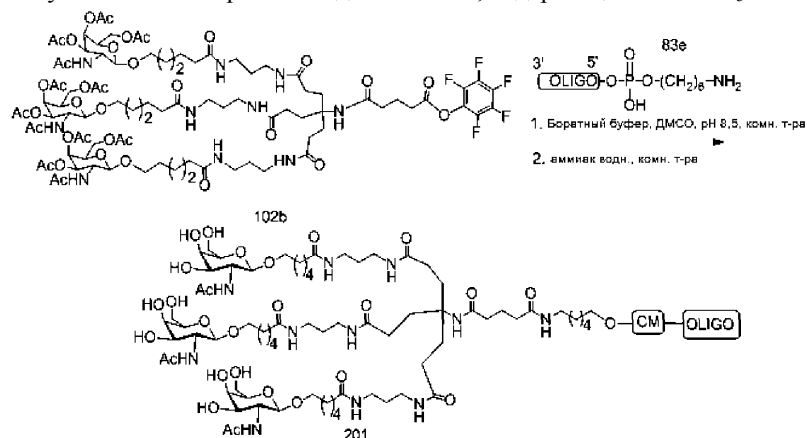
Пример 68. Получение олигомерного соединения 200, содержащего GalNAc₃-17



Олигомерное соединение 200, содержащее группу конъюгата GalNAc₃-17, получили по общим способам, представленным в примере 46. Кластерная часть GalNAc₃ группы конъюгата GalNAc₃-17 (GalNAc₃-17_a) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных групп конъюгата. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент представляет собой -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-. Структура GalNAc₃-17 (GalNAc₃-17_a-CM-) представлена ниже:

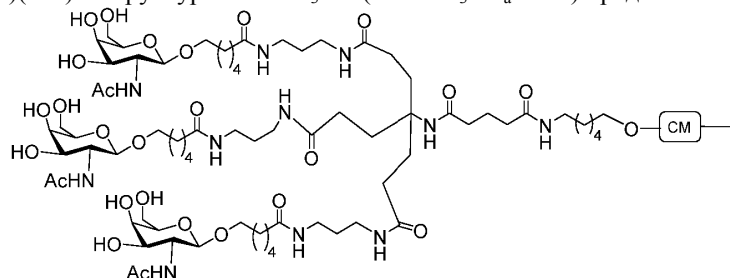


Пример 69. Получение олигомерного соединения 201, содержащего GalNAc₃-18

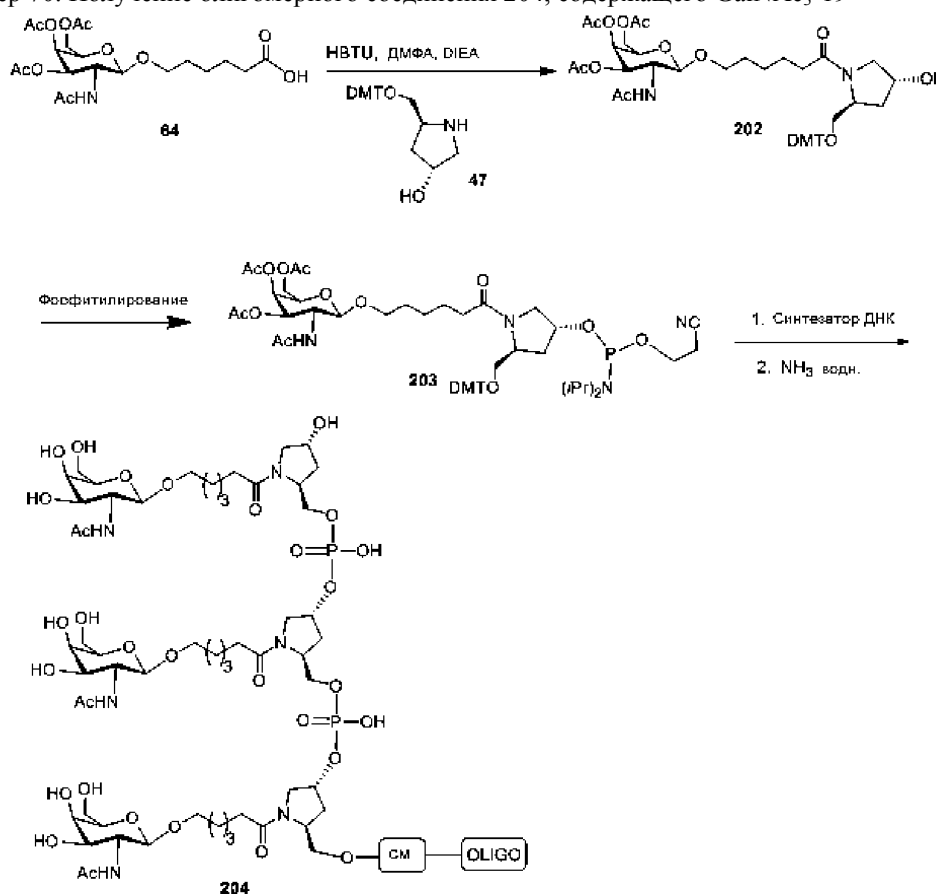


Олигомерное соединение 201, содержащее группу конъюгата GalNAc₃-18, получили по общим спо-

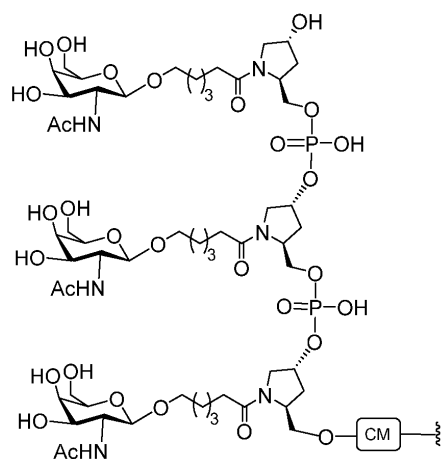
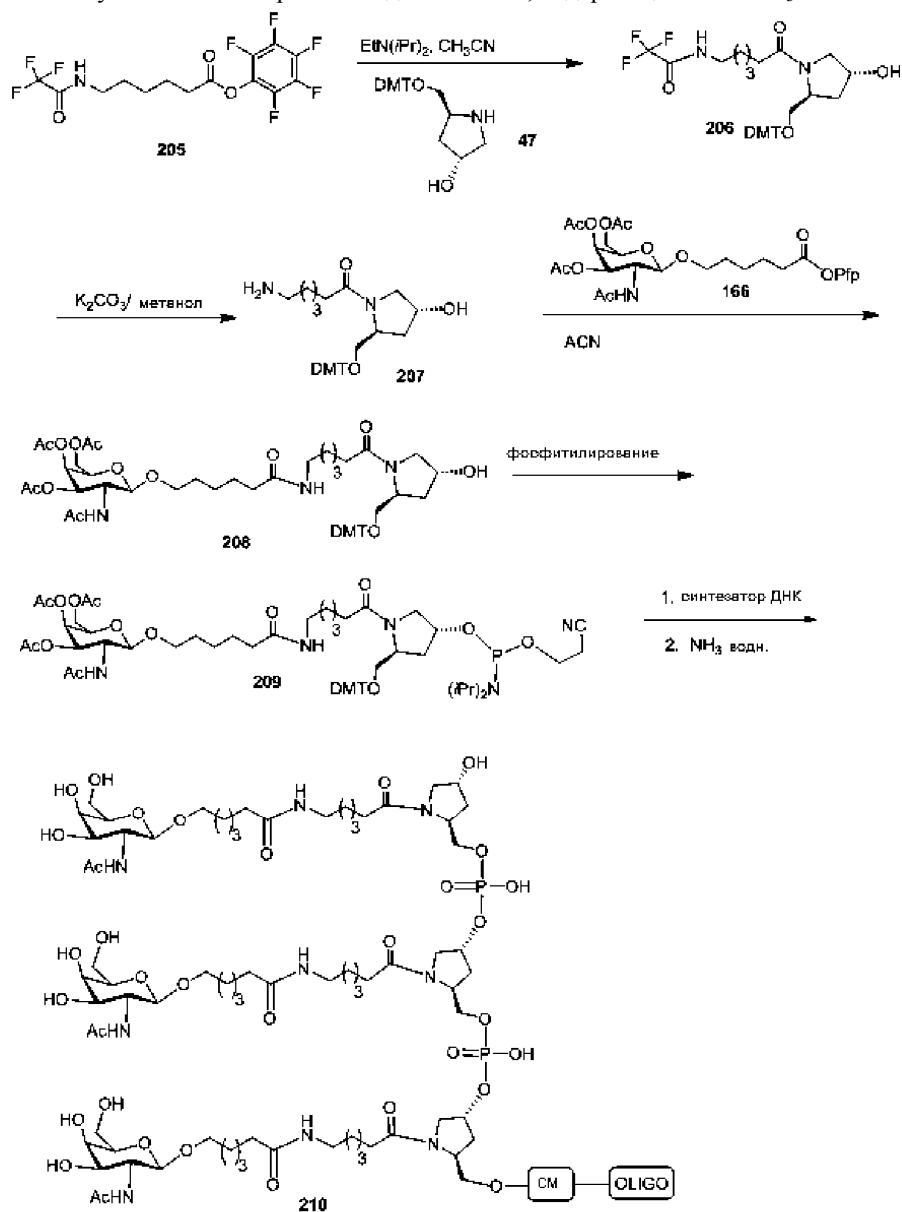
собам, представленным в примере 46. Кластерная часть GalNAc₃ группы конъюгата GalNAc₃-18 (GalNAc₃-18_a) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных групп конъюгата. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент представляет собой -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-. Структура GalNAc₃-18 (GalNAc₃-18_a-CM-) представлена ниже:



Пример 70. Получение олигомерного соединения 204, содержащего GalNAc₃-19

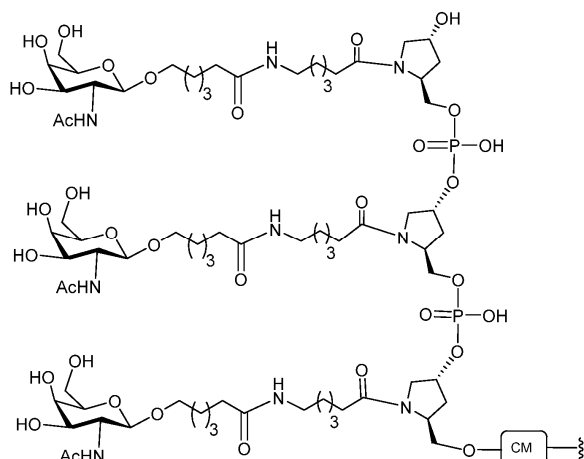


Олигомерное соединение 204, содержащее группу конъюгата GalNAc₃-19, получили из соединения 64, используя общие способы, описанные в примере 52.. Кластерная часть GalNAc₃ группы конъюгата GalNAc₃-19 (GalNAc₃-19_a) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных групп конъюгата. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент представляет собой -P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)-. Структура GalNAc₃-19 (GalNAc₃-19_a-CM-) представлена ниже:

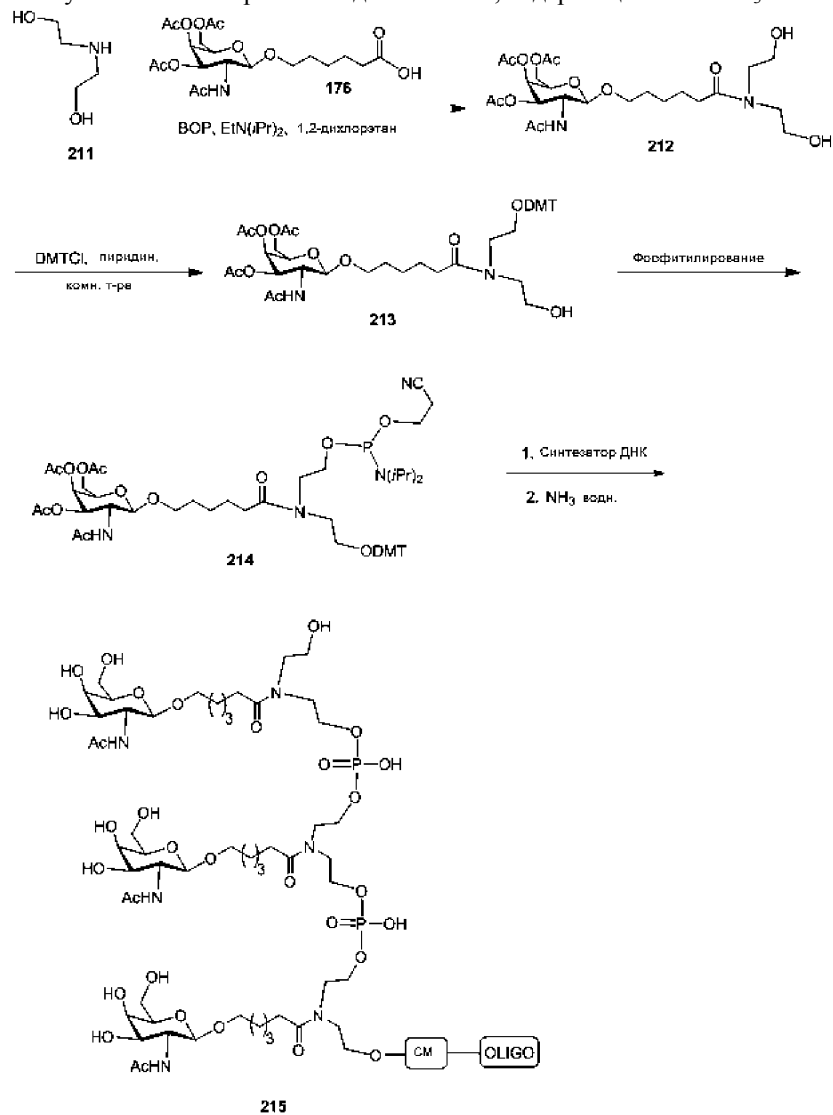
Пример 71. Получение олигомерного соединения 210, содержащего GalNAc₃-20

Соединение 205 получили добавлением PFP-ТФК и DIEA к 6-(2,2,2-трифторацетида)гексановой кислоте в ацетонитриле, которую получили добавлением трифторуксусного ангидрида к 6-аминогексановой кислоте. Реакционную смесь нагрели до 80°C, затем охладили до комнатной температуры. Олигомерное соединение 210, содержащее группу конъюгата GalNAc₃-20, получили из соединения 208, используя общие способы, представленные в примере 52. Кластерная часть GalNAc₃ группы конъюгата GalNAc₃-20 (GalNAc₃-20_a) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с полу-

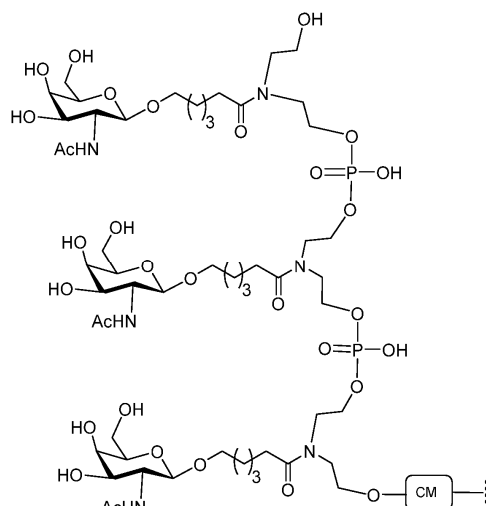
чением различных групп конъюгата. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент представляет собой $-P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-$. Структура GalNAc₃-20 (GalNAc₃-20_a-CM-) представлена ниже:



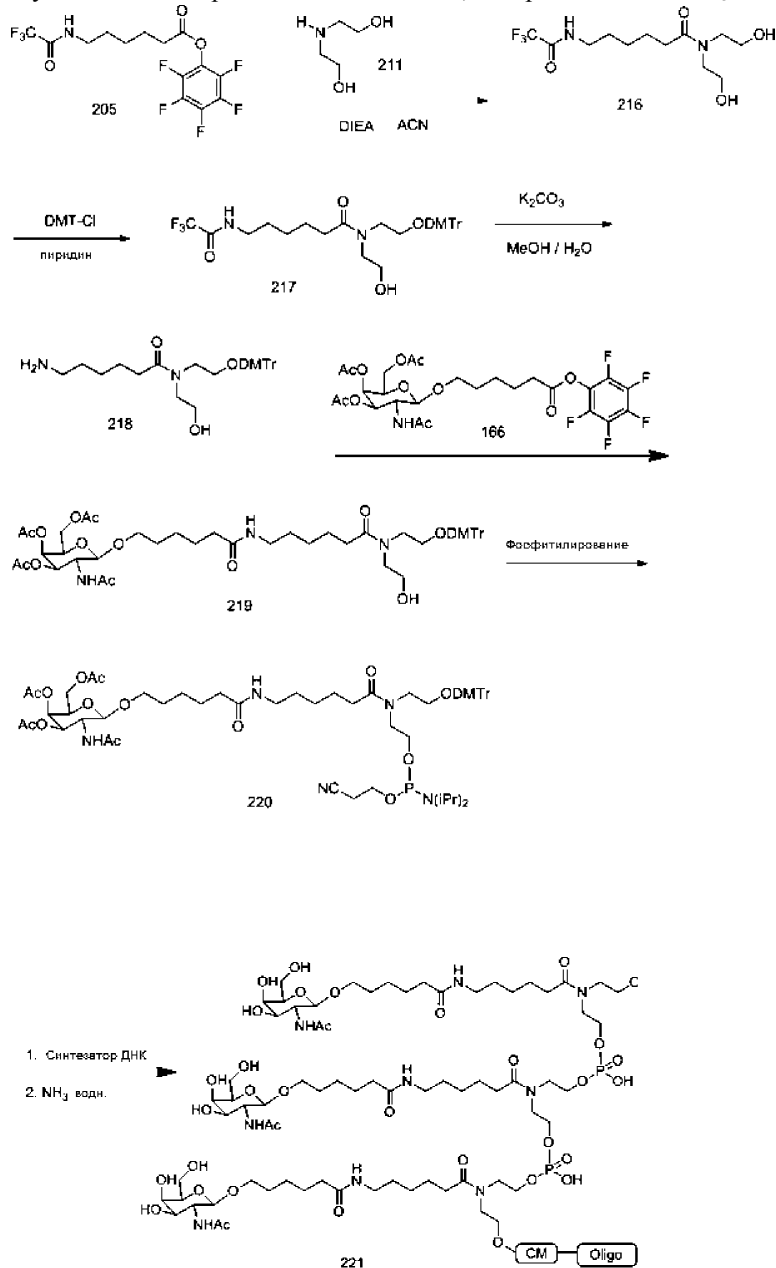
Пример 72. Получение олигомерного соединения 215, содержащего GalNAc₃-21



Соединение 211 имеется в продаже. Олигомерное соединение 215, содержащее группу конъюгата GalNAc₃-21, получили из соединения 213, используя общие способы, представленные в примере 52. Кластерная часть GalNAc₃ группы конъюгата GalNAc₃-21 (GalNAc₃-21_a) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных групп конъюгата. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент представляет собой $-P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-$. Структура GalNAc₃-21 (GalNAc₃-21_a-CM-) представлена ниже:

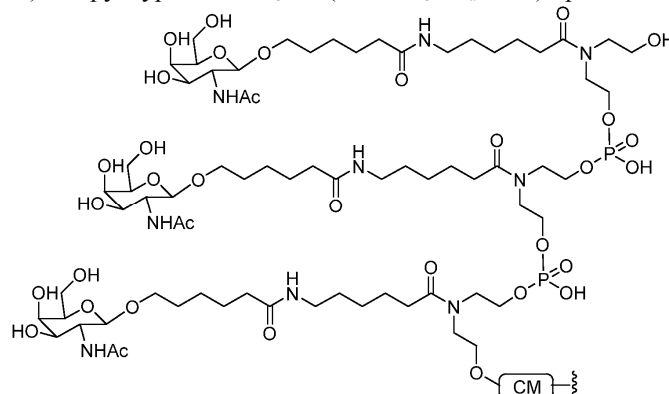


Пример 73. Получение олигомерного соединения 188, содержащего GalNAc₃-22



Соединение 220 получили из соединения 219, используя тетразолид диизопропиламмония. Олигомерное соединение 221, содержащее группу конъюгата GalNAc₃-21, получили из соединения 220, ис-

пользуя общий способ, описанный в примере 52. Кластерная часть GalNAc₃ группы конъюгата GalNAc₃-22 (GalNAc₃-22_a) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных групп конъюгата. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент представляет собой -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-. Структура GalNAc₃-22 (GalNAc₃-22_a-CM-) представлена ниже:



Пример 74. Влияние различных расщепляемых фрагментов на антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, направленных на SRB-1, содержащих конъюгат 5'-GalNAc₃.

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже, испытали в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования SRB-1 у мышей. Каждая из групп конъюгата GalNAc₃ была присоединена к 5'-концу соответствующего олигонуклеотида.

Таблица 60

Модифицированные ASO, направленные на SRB-1

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO
35338 2	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	н.д.	н.д.	829
66116	GalNAc₃-3a-	GalNAc ₃ -3a	A _d	831
1	o'A_{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e			
66690 4	GalNAc₃-3a-o' G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	PO	829
67544 1	GalNAc₃-17a- o'A_{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -17a	A _d	831
67544 2	GalNAc₃-18a- o'A_{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -18a	A _d	831

Во всех таблицах заглавные буквы указывают нуклеосиды для каждого нуклеотида, а ^mC означает 5-метилцитозин. Нижние индексы: "e" означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид; "d" означает β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "s" означает тиофосфатный межнуклеозидный линкер (PS); "o" означает фосфодиэфирный межнуклеозидный линкер (PO); и "o'" означает OP(=O)(OH)-. Группы конъюгата выделены жирным.

Структура GalNAc₃-3a показана ранее в примере 39. Структура GalNAc₃-17a показана ранее в примере 68, а структура GalNAc₃-18a показана ранее в примере 69.

Лечение.

Шести-восьминедельным мышам C57bl6 (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) ввели однократную подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, олигонуклеотида, перечисленного в табл. 60, или солевого раствора. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей усыпили

через 72 ч после последнего введения для определения уровней мРНК SRB-1 при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней мРНК SRB-1 для каждой экспериментальной группы, нормализованных к контрольному образцу, обработанному солевым раствором.

Как показано в табл. 61, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК SRB-1 дозозависимым образом. Антисмысловые олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc, демонстрируют равные эффективности и являются значительно более эффективными, чем исходный олигонуклеотид, не имеющий конъюгата GalNAc.

Таблица 61

мРНК SRB-1 (% от солевого раствора)				
ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% от солевого раствора)	Кластер GalNAc ₃	СМ
Солевой раствор	н.д.	100,0	н.д.	н.д.
353382	3	79,38	н.д.	н.д.
	10	68,67		
	30	40,70		
661161	0,5	79,18	GalNAc ₃ -3a	Ad
	1,5	75,96		
	5	30,53		
	15	12,52		
666904	0,5	91,30	GalNAc ₃ -3a	PO
	1,5	57,88		
	5	21,22		
	15	16,49		
675441	0,5	76,71	GalNAc ₃ -17a	Ad
	1,5	63,63		
	5	29,57		
	15	13,49		
675442	0,5	95,03	GalNAc ₃ -18a	Ad
	1,5	60,06		
	5	31,04		
	15	19,40		

Уровни трансаминазы в печени, аланин-аминотрансферазы (ALT) и аспартат-аминотрансферазы (AST) в сыворотке измеряли относительно мышей, инъецированных солевым раствором, используя стандартные протоколы. Оценили также общий билирубин и азот мочевины крови (АМК). Проверили изменение массы тела, которое существенно не отличалось от группы с солевым раствором (данные не показаны). Значения ALT, AST, общего билирубина и АМК представлены ниже в табл. 62.

Таблица 62

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Общий билирубин (мг/дл)	АМК (мг/дл)	Кластер GalNAc ₃	СМ
Солевой раствор	н.д.	26	59	0,16	42	н.д.	н.д.
353382	3	23	58	0,18	39	н.д.	н.д.
	10	28	58	0,16	43		
	30	20	48	0,12	34		
661161	0,5	30	47	0,13	35	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1,5	23	53	0,14	37		
	5	26	48	0,15	39		
	15	32	57	0,15	42		
666904	0,5	24	73	0,13	36	GalNAc ₃ -3a	PO
	1,5	21	48	0,12	32		
	5	19	49	0,14	33		
	15	20	52	0,15	26		
675441	0,5	42	148	0,21	36	GalNAc ₃ - 17a	A _d
	1,5	60	95	0,16	34		
	5	27	75	0,14	37		
	15	24	61	0,14	36		
675442	0,5	26	65	0,15	37	GalNAc ₃ - 18a	A _d
	1,5	25	64	0,15	43		
	5	27	69	0,15	37		
	15	30	84	0,14	37		

Пример 75. Фармакокинетический анализ олигонуклеотидов, содержащих 5'-группу конъюгата.

ФК ASO, представленных выше в табл. 54, 57 и 60, оценили с использованием образцов печени, которые получили после выполнения способов лечения, описанных в примерах 65, 66 и 74. Образцы печени измельчили и экстрагировали по стандартным протоколам, и анализировали при помощи ИП-ВЭЖХ-МС вместе с внутренним стандартом. Суммарный уровень (мкг/г) всех метаболитов в ткани измерили интегрированием соответствующих УФ пиков, а уровни в ткани ASO полной длины, не содержащих конъюгата ("исходное", в данном случае Isis № 353382), измерили с использованием подходящих ион-экстракционных хроматограмм (EIC).

Таблица 63

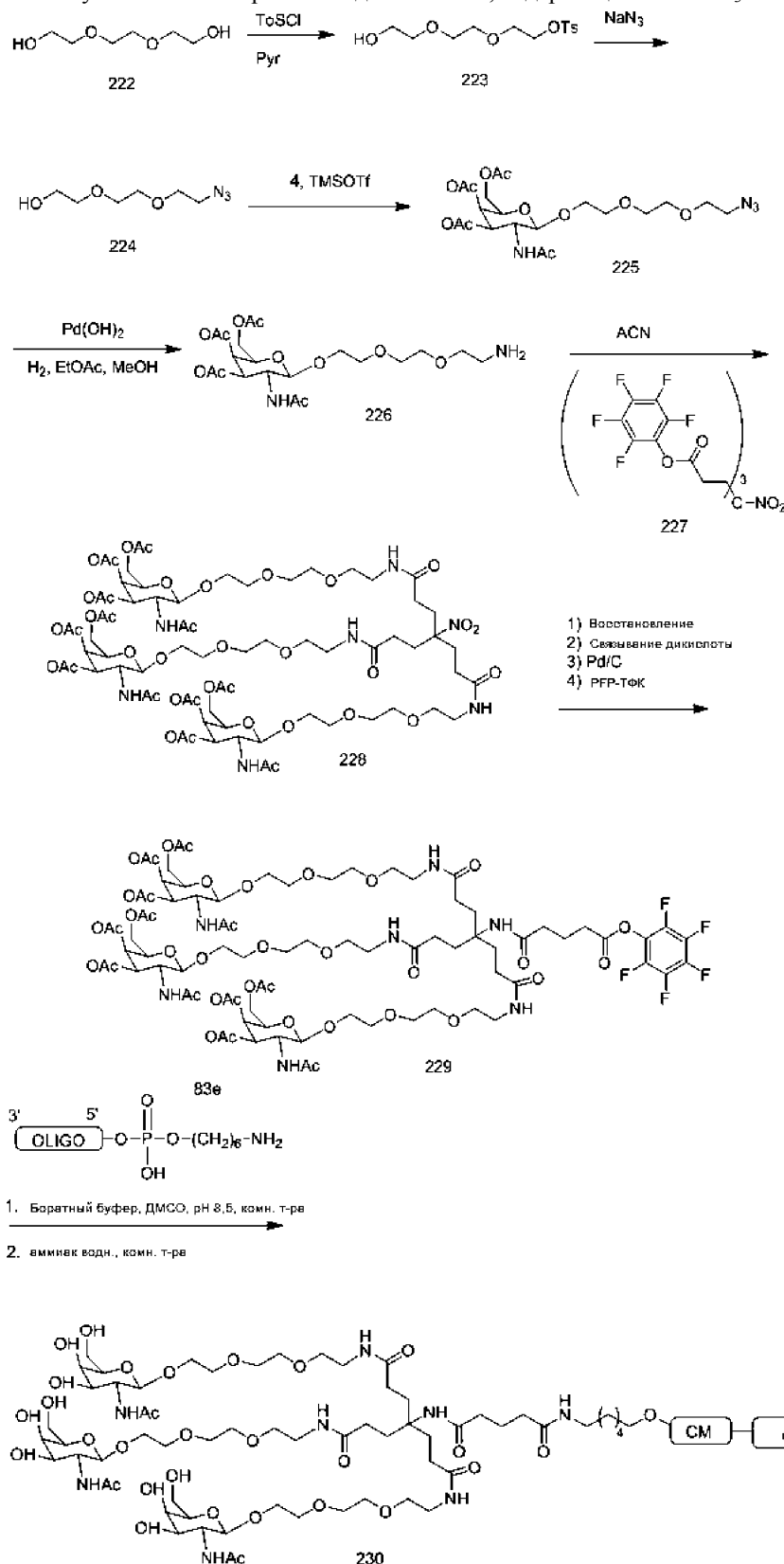
ФК анализ в печени

ISIS №	Доза (мг/кг)	Общий уровень в печени по УФ (мкг/г)	Уровень исходного ASO в печени по EIC (мкг/г)	Кластер GalNAc ₃	СМ
353382	3	8,9	8,6	н.д.	н.д.
	10	22,4	21,0		
	30	54,2	44,2		
661161	5	32,4	20,7	GalNAc ₃ -3a	A _d
	15	63,2	44,1		
671144	5	20,5	19,2	GalNAc ₃ -12a	A _d

	15	48,6	41,5		
670061	5	31,6	28,0	GalNAc ₃ -13a	A _d
	15	67,6	55,5		
671261	5	19,8	16,8	GalNAc ₃ -14a	A _d
	15	64,7	49,1		
671262	5	18,5	7,4	GalNAc ₃ -15a	A _d
	15	52,3	24,2		
670699	5	16,4	10,4	GalNAc ₃ -3a	T _d
	15	31,5	22,5		
670700	5	19,3	10,9	GalNAc ₃ -3a	A _c
	15	38,1	20,0		
670701	5	21,8	8,8	GalNAc ₃ -3a	T _c
	15	35,2	16,1		
671165	5	27,1	26,5	GalNAc ₃ -13a	A _d
	15	48,3	44,3		
666904	5	30,8	24,0	GalNAc ₃ -3a	PO
	15	52,6	37,6		
675441	5	25,4	19,0	GalNAc ₃ -17a	A _d
	15	54,2	42,1		
675442	5	22,2	20,7	GalNAc ₃ -18a	A _d
	15	39,6	29,0		

Результаты, представленные выше в табл. 63, демонстрируют, что наблюдали более высокие уровни в печени олигонуклеотидов, содержащих группу конъюгата GalNAc₃, чем исходного олигонуклеотида, не содержащего группу GalNAc₃ (ISIS 353382) через 72 ч после введения олигонуклеотида, особенно с учетом введения различных доз для олигонуклеотидов с группой конъюгата GalNAc₃ и без нее. Кроме того, через 72 ч 40-98% каждого олигонуклеотида, содержащего группу конъюгата GalNAc₃, было метаболизировано до исходного соединения, что указывает на то, что группы конъюгата GalNAc₃ расщепляются в указанных олигонуклеотидах.

Пример 76. Получение олигомерного соединения 230, содержащего GalNAc₃-23

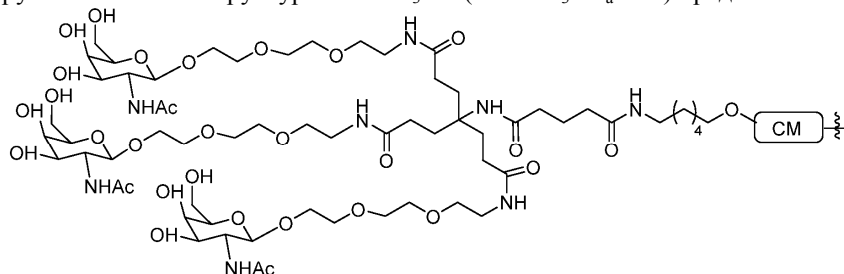


Соединение 222 имеется в продаже. 44,48 мл (0,33 моль) соединения 222 обрабатывали тозилхлоридом (25,39 г, 0,13 моль) в пиридине (500 мл) в течение 16 ч. Затем реакционную смесь выпарили до маслянистого вещества, растворили в EtOAc и промыли водой, насыщенным раствором NaHCO₃, насыщенным соевым раствором и высушили над Na₂SO₄. Этилацетат концентрировали досуха и очистили колоночной хроматографией, элюировали EtOAc в гексанах (1:1), затем 10% метанола в CH₂Cl₂ с получением соединения 223 в виде бесцветного маслянистого вещества. Данные ЖХМС и ЯМР согласовались с указанной структурой. 10 г (32,86 ммоль) 1-тозилтриэтиленгликоля (соединение 223) обрабатыва-

ли азидом натрия (10,68 г, 164,28 ммоль) в ДМСО (100 мл) при комнатной температуре в течение 17 часов. Затем реакционную смесь вылили в воду и экстрагировали EtOAc. Органический слой три раза промыли водой и высушили над Na_2SO_4 . Органический слой концентрировали досуха с получением 5,3 г соединения 224 (92%). Данные ЖХМС и ЯМР согласовались с указанной структурой. 1-Азидотриэтиленгликоль (соединение 224, 5,53 г, 23,69 ммоль) и соединение 4 (6 г, 18,22 ммоль) обрабатывали 4А молекулярными ситами (5 г) и TMSOTf (1,65 мл, 9,11 ммоль) в дихлорметане (100 мл) под инертной атмосферой. Через 14 часов реакционную смесь отфильтровали для удаления сит, а органический слой промыли насыщенным раствором NaHCO_3 , водой, насыщенным соевым раствором и высушили над Na_2SO_4 . Органический слой концентрировали досуха и очистили колоночной хроматографией, элюировали градиентом от 2 до 4% метанола в дихлорметане с получением соединения 225. Данные ЖХМС и ЯМР согласовались с указанной структурой. Соединение 225 (11,9 г, 23,59 ммоль) гидрировали в EtOAc/метаноле (4:1, 250 мл) на катализаторе Перлмана. Через 8 часов катализатор удалили фильтрованием, а растворители удалили досуха с получением соединения 226. Данные ЖХМС и ЯМР согласовались с указанной структурой.

Для получения соединения 227 раствор нитрометантриспропионовой кислоты (4,17 г, 15,04 ммоль) и основание Хюнига (10,3 мл, 60,17 ммоль) в ДМФА (100 мл) по каплям обрабатывали пентафтортрифторацетатом (9,05 мл, 52,65 ммоль). Через 30 мин реакционную смесь вылили в ледяную воду и экстрагировали EtOAc. Органический слой промыли водой, насыщенным соевым раствором и высушили над Na_2SO_4 . Органический слой концентрировали досуха, а затем перекристаллизовали из гептана с получением соединения 227 в виде белого твердого вещества. Данные ЖХМС и ЯМР согласовались с указанной структурой. Соединение 227 (1,5 г, 1,93 ммоль) и соединение 226 (3,7 г, 7,74 ммоль) перемешивали при комнатной температуре в ацетонитриле (15 мл) в течение 2 часов. Затем реакционную смесь выпарили досуха и очистили колоночной хроматографией, элюируя градиентом от 2 до 10% метанола в дихлорметане, с получением соединения 228. Данные ЖХМС и ЯМР согласовались с указанной структурой. Соединение 228 (1,7 г, 1,02 ммоль) обработали никелем Ренея (около 2 г, влажный) в этаноле (100 мл) в атмосфере водорода. Через 12 часов катализатор удалили фильтрованием, а органический слой выпарили до твердого вещества, которое использовали непосредственно на следующей стадии. Данные ЖХМС и ЯМР согласовались с указанной структурой. Это твердое вещество (0,87 г, 0,53 ммоль) обработали бензилглутаровой кислотой (0,18 г, 0,8 ммоль), HBTU (0,3 г, 0,8 ммоль) и DIEA (273,7 мкл, 1,6 ммоль) в ДМФА (5 мл). Через 16 ч ДМФА удалили при пониженном давлении при 65°C до маслянистого вещества, и это маслянистое вещество растворили в дихлорметане. Органический слой промыли насыщенным раствором NaHCO_3 , насыщенным соевым раствором и высушили над Na_2SO_4 . После выпаривания органического слоя соединение очистили колоночной хроматографией и элюировали градиентом от 2 до 20% метанола в дихлорметане с получением связанного продукта. Данные ЖХМС и ЯМР согласовались с указанной структурой. С бензильного эфира сняли защиту на катализаторе Перлмана в атмосфере водорода в течение 1 ч. Затем катализатор удалили фильтрованием, а растворители удалили досуха с получением кислоты. Данные ЖХМС и ЯМР согласовались с указанной структурой. Эту кислоту (486 мг, 0,27 ммоль) растворили в сухом ДМФА (3 мл). Добавили пиридин (53,61 мкл, 0,66 ммоль) и продули реакционную смесь аргоном. К реакционной смеси медленно добавили пентафтортрифторацетат (46,39 мкл, 0,4 ммоль). Цвет реакционной смеси изменился с бледно-желтого на винный, и появился легкий дымок, который улетучился с потоком аргона. Реакционную смесь оставили перемешиваться при комнатной температуре на один час (завершение реакции подтвердили по ЖХМС). Растворитель удалили при пониженном давлении (ротационный испаритель) при 70°C. Остаток разбавили ДХМ и промыли 1 н. NaHSO_4 , насыщенным соевым раствором, насыщенным раствором бикарбоната натрия и снова насыщенным соевым раствором. Органический слой высушили над Na_2SO_4 , отфильтровали и концентрировали досуха с получением 225 мг соединения 229 в виде хрупкой желтой пены. Данные ЖХМС и ЯМР согласовались с указанной структурой.

Олигомерное соединение 230, содержащее группу конъюгата GalNAc_3 -23, получили из соединения 229, используя общий способ, описанный в примере 46. Кластерная часть GalNAc_3 группы конъюгата GalNAc_3 -23 (GalNAc_3 -23_a) может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных групп конъюгата. Структура GalNAc_3 -23 (GalNAc_3 -23_a-CM) представлена ниже:



Пример 77. Антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, направленных на SRB-1, содержащих конъюгат GalNAc_3 .

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже, испытали в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования SRB-1 у мышей.

Таблица 64

Модифицированные ASO, направленные на SRB-1

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNac ₃	CM	SEQ ID NO
661161	GalNac3-3a- $o'AdoG_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds}$ $G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNac ₃ -3a	Ad	831
666904	GalNac3-3a-o' $G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds}$ $G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNac ₃ -3a	PO	829
673502	GalNac3-10a- $o'AdoG_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds}$ $G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{eo}^m C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNac ₃ -10a	Ad	831
677844	GalNac3-9a- $o'AdoG_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds}$ $G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNac ₃ -9a	Ad	831
677843	GalNac3-23a- $o'AdoG_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds}$ $G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNac ₃ -23a	Ad	831
655861	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_e$ $s^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{eo} Ado'-GalNac3-1a$	GalNac ₃ -1a	Ad	830
677841	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_e$ $s^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{eo} Ado'-GalNac3-19a$	GalNac ₃ -19a	Ad	830
677842	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds}$	GalNac ₃ -20a	Ad	830
	$G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{eo} Ado'-GalNac3-20a$			

Структура GalNac₃-1_a показана ранее в примере 9, GalNac₃-3_a показана в примере 39, GalNac₃-9_a показана в примере 52, GalNac₃-10_a показана в примере 46, GalNac₃-19_a показана в примере 70, GalNac₃-20_a показана в примере 71 и GalNac₃-23_a показана в примере 76.

Лечение.

Шести-восьминедельным мышам C57bl6 (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) ввели однократную подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, олигонуклеотида, перечисленного в табл. 64, или солевого раствора. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей усыпили через 72 ч после последнего введения для определения уровней мРНК SRB-1 при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней мРНК SRB-1 для каждой экспериментальной группы, нормализованных к контрольному образцу, обработанному солевым раствором.

Как показано в табл. 65, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК SRB-1 дозозависимым образом.

Таблица 65

мРНК SRB-1 (% от солевого раствора)

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% от солевого раствора)	Кластер GalNAc ₃	СМ
Солевой раствор	н.д.	100,0	н.д.	н.д.
661161	0,5	89,18	GalNAc ₃ -3a	Ad
	1,5	77,02		
	5	29,10		
	15	12,64		
666904	0,5	93,11	GalNAc ₃ -3a	PO
	1,5	55,85		
	5	21,29		
	15	13,43		
673502	0,5	77,75	GalNAc ₃ -10a	Ad
	1,5	41,05		
	5	19,27		
	15	14,41		
677844	0,5	87,65	GalNAc ₃ -9a	Ad
	1,5	93,04		
	5	40,77		
	15	16,95		
677843	0,5	102,28	GalNAc ₃ -23a	Ad
	1,5	70,51		
	5	30,68		
	15	13,26		
655861	0,5	79,72	GalNAc ₃ -1a	Ad
	1,5	55,48		
	5	26,99		
	15	17,58		
677841	0,5	67,43	GalNAc ₃ -19a	Ad
	1,5	45,13		
	5	27,02		
	15	12,41		
677842	0,5	64,13	GalNAc ₃ -20a	Ad
	1,5	53,56		
	5	20,47		
	15	10,23		

Измерили также уровни трансаминазы в печени, аланин-аминотрансферазы (ALT) и аспартат-аминотрансферазы (AST) в сыворотке, используя стандартные протоколы. Оценили также общий билирубин и азот мочевины крови (АМК). Проверили изменение массы тела, которое существенно не отлича-

лось от группы с солевым раствором (данные не показаны). Значения ALT, AST, общего билирубина и АМК представлены ниже в табл. 66.

Таблица 66

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Общий билируб ин (мг/дл)	АМК (мг/дл)	Кластер GalNAc ₃	СМ
Солевой раствор	н.д.	21	45	0,13	34	н.д.	н.д.
661161	0,5	28	51	0,14	39	GalNAc ₃ -3a	Ad
	1,5	23	42	0,13	39		
	5	22	59	0,13	37		
	15	21	56	0,15	35		
666904	0,5	24	56	0,14	37	GalNAc ₃ -3a	PO
	1,5	26	68	0,15	35		
	5	23	77	0,14	34		
	15	24	60	0,13	35		
673502	0,5	24	59	0,16	34	GalNAc ₃ - 10a	Ad
	1,5	20	46	0,17	32		
	5	24	45	0,12	31		
	15	24	47	0,13	34		
677844	0,5	25	61	0,14	37	GalNAc ₃ -9a	Ad
	1,5	23	64	0,17	33		
	5	25	58	0,13	35		
	15	22	65	0,14	34		
677843	0,5	53	53	0,13	35	GalNAc ₃ - 23a	Ad
	1,5	25	54	0,13	34		
	5	21	60	0,15	34		
	15	22	43	0,12	38		
655861	0,5	21	48	0,15	33	GalNAc ₃ -1a	Ad
	1,5	28	54	0,12	35		
	5	22	60	0,13	36		
	15	21	55	0,17	30		
677841	0,5	32	54	0,13	34	GalNAc ₃ - 19a	Ad
	1,5	24	56	0,14	34		
	5	23	92	0,18	31		
	15	24	58	0,15	31		
677842	0,5	23	61	0,15	35	GalNAc ₃ - 20a	Ad
	1,5	24	57	0,14	34		
	5	41	62	0,15	35		
	15	24	37	0,14	32		

Пример 78. Антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, направленных

на ангиотензиноген, содержащих конъюгат GalNAc₃.

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже, испытали в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования ангиотензиногена (AGT) у нормотензивных мышей Спрага-Дуули.

Таблица 67

Модифицированные ASO, направленные на AGT

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO
552668	^m C _{es} A _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{es} G _{es} G _{es} A _{es} T _e	н.д.	н.д.	835
669509	^m C _{es} A _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{es} G _{es} G _{es} A _{es} T _{eo} Ado [*] -GalNAc ₃ -1 _a	GalNAc ₃ -1 _a	Ad	836

Структура GalNAc₃-1_a показана ранее в примере 9.

Лечение.

Шестинедельным самцам крыс Спрага-Дуули один раз в неделю вводили подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, в целом три дозы олигонуклеотида, перечисленного в табл. 67, или PBS. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Крыс усыпили через 72 ч после последней дозы. Уровни мРНК AGT в печени измерили при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Уровни белка AGT в плазме измерили при помощи твердофазного иммуноферментного анализа для определения общего ангиотензиногена (кат. № JP27412, IBL International, Торонто, штат Онтарио) с разбавлением плазмы 1:20000. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент от уровней мРНК AGT в печени или от уровней белка AGT в плазме для каждой экспериментальной группы, нормализованных к контрольному образцу с PBS.

Как показано в табл. 68, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК AGT в печени и уровни белка в плазме дозозависимым образом, и олигонуклеотид, содержащий конъюгат GalNAc, был значительно более эффективным, чем исходный олигонуклеотид, не содержащий конъюгата GalNAc.

Таблица 68

Уровни мРНК AGT в печени и белка в плазме

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК AGT в печени (% PBS)	Белок AGT в плазме (% PBS)	Кластер GalNAc ₃	CM
PBS	н.д.	100	100	н.д.	н.д.
552668	3	95	122	н.д.	н.д.
	10	85	97		
	30	46	79		
	90	8	11		
669509	0,3	95	70	GalNAc ₃ -1 _a	Ad
	1	95	129		
	3	62	97		
	10	9	23		

Измерили также уровни трансаминазы в печени, аланин-аминотрансферазы (ALT) и аспартат-аминотрансферазы (AST) в плазме, а также массу тела в момент умерщвления, используя стандартные протоколы. Результаты представлены ниже в табл. 69.

Таблица 69

Уровни трансаминазы в печени и массы тела крыс

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Масса тела (% от исходного значения)	Кластер GalNAc ₃	CM
PBS	н.д.	51	81	186	н.д.	н.д.
552668	3	54	93	183	н.д.	н.д.
	10	51	93	194		
	30	59	99	182		
	90	56	78	170		
669509	0,3	53	90	190	GalNAc ₃ -1a	Ad
	1	51	93	192		
	3	48	85	189		
	10	56	95	189		

Пример 79. Продолжительность действия *in vivo* олигонуклеотидов, направленных на АРОС-III, содержащих конъюгат GalNAc₃.

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже в табл. 70, испытали в исследовании однократной дозы на продолжительность действия у мышей.

Таблица 70

Модифицированные ASO, направленные на АРОС-III

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO
30480 1	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	н.д.	н.д.	821
64753 5	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _{eo} Ado'-GalNAc₃-1a	GalNAc ₃ -1a	Ad	822
66308 3	GalNAc₃-3a- o'AdoA _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	Ad	837
67444 9	GalNAc₃-7a- o'AdoA _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	GalNAc ₃ -7a	Ad	837
67445 0	GalNAc₃-10a- o'AdoA _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	GalNAc ₃ -10a	Ad	837
67445 1	GalNAc₃-13a- o'AdoA _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	GalNAc ₃ -13a	Ad	837

Структура GalNAc₃-1_a показана ранее в примере 9, GalNAc₃-3_a показана в примере 39, GalNAc₃-7_a показана в примере 48, GalNAc₃-10_a показана в примере 46 и GalNAc₃-13_a показана в примере 62.

Лечение.

Шести-восьминедельным трансгенным мышам, экспрессирующим человеческий АРОС-III, ввели однократную подкожную инъекцию олигонуклеотида, перечисленного в табл. 70, или PBS. Каждая экспериментальная группа состояла из 3 животных. Образцы крови брали до введения дозы для определения исходного значения, а также через 72 ч, 1 неделю, 2, 3, 4, 5 и 6 недель после введения дозы. Уровни триглицеридов и белка АРОС-III в плазме измеряли так, как описано в примере 20.

Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент от уровней триглицеридов и АРОС-III в плазме для каждой экспериментальной группы, нормализованных к исходным значениям, и они демонстрируют, что олигонуклеотиды, содержащие группу конъюгата GalNAc, обладают более продолжительным действием, чем исходный олигонуклеотид, не содержащий группу конъюгата (ISIS 304801) даже несмотря на то, что доза исходного соединения была в три раза выше, чем доза олигонуклеотидов, содержащих группу конъюгата GalNAc.

Таблица 71

Уровни триглицеридов и белка АРОС-III в плазме трансгенных мышей

ISIS №	Доза (мг/кг)	Временные точки (дни после введения дозы)	Триглицериды (% от исходного значения)	Белок АРОС-III (% от исходного значения)	Кластер GalNAc ₃	СМ
PBS	н.д.	3	97	102	н.д.	н.д.
		7	101	98		
		14	108	98		
		21	107	107		
		28	94	91		
		35	88	90		
		42	91	105		
304801	30	3	40	34	н.д.	н.д.
		7	41	37		
		14	50	57		
		21	50	50		
		28	57	73		
		35	68	70		
		42	75	93		
647535	10	3	36	37	GalNAc ₃ -1a	Ad
		7	39	47		

		14	40	45		
		21	41	41		
		28	42	62		
		35	69	69		
		42	85	102		
663083	10	3	24	18	GalNAc ₃ -3a	A _d
		7	28	23		
		14	25	27		
		21	28	28		
		28	37	44		
		35	55	57		
		42	60	78		
674449	10	3	29	26	GalNAc ₃ -7a	A _d
		7	32	31		
		14	38	41		
		21	44	44		
		28	53	63		
		35	69	77		
		42	78	99		
674450	10	3	33	30	GalNAc ₃ -10a	A _d
		7	35	34		
		14	31	34		
		21	44	44		
		28	56	61		
		35	68	70		
		42	83	95		
674451	10	3	35	33	GalNAc ₃ -13a	A _d
		7	24	32		
		14	40	34		
		21	48	48		
		28	54	67		
		35	65	75		
		42	74	97		

Пример 80. Антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, направленных на альфа-1 антитрипсин (A1AT), содержащих конъюгат GalNAc₃.

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже в табл. 72, испытали в исследовании дозозависимого ингибирования A1AT у мышей.

Таблица 72

Модифицированные ASO, направленные на A1AT

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO
476366	A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _e	н.д.	н.д.	838
656326	A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _{eo} A_{do}'-GalNAc3-1a	GalNAc3-1a	A _d	839
678381	GalNAc3-3a- o' A_{do} A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _e	GalNAc3-3a	A _d	840
678382	GalNAc3-7a- o' A_{do} A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _e	GalNAc3-7a	A _d	840
678383	GalNAc3-10a-o' A _{do} A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _e	GalNAc3-10a	A _d	840
678384	GalNAc3-13a-o' A _{do} A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _e	GalNAc3-13a	A _d	840

Структура GalNAc3-1_a показана ранее в примере 9, GalNAc3-3_a показана в примере 39, GalNAc3-7_a показана в примере 48, GalNAc3-10_a показана в примере 46 и GalNAc3-13_a показана в примере 62.

Лечение.

Шестинедельным самцам мышей C57BL/6 (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) один раз в неделю вводили подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, в целом три дозы олигонуклеотида, перечисленного в табл. 72, или PBS. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей усыпили через 72 ч после последнего введения. Уровни мРНК A1AT в печени определили при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Уровни белка A1AT в плазме определили при помощи твердофазного иммуноферментного анализа для определения мышинового альфа 1-антитрипсина (кат. № 41-A1AMS-E01, Alpcо, Салем, штат Нью-Гэмпшир). Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней мРНК A1AT в печени и белка в плазме для каждой экспериментальной группы, нормализованных к контрольному образцу с PBS.

Как показано в табл. 73, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК A1AT в печени и уровни белка A1AT в плазме дозозависимым образом. Олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc, были значительно более эффективными, чем исходное соединение (ISIS 476366).

Таблица 73

Уровни мРНК A1AT в печени и белка в плазме

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК A1AT в печени (% PBS)	Белок A1AT в плазме (% PBS)	Кластер GalNAc ₃	CM
PBS	н.д.	100	100	н.д.	н.д.
476366	5	86	78	н.д.	н.д.
	15	73	61		
	45	30	38		
656326	0,6	99	90	GalNAc3-1a	A _d
	2	61	70		

	6	15	30		
	18	6	10		
678381	0,6	105	90	GalNAc ₃ -3a	A _d
	2	53	60		
	6	16	20		
	18	7	13		
678382	0,6	90	79	GalNAc ₃ -7a	A _d
	2	49	57		
	6	21	27		
	18	8	11		
678383	0,6	94	84	GalNAc ₃ -10a	A _d
	2	44	53		
	6	13	24		
	18	6	10		
678384	0,6	106	91	GalNAc ₃ -13a	A _d
	2	65	59		
	6	26	31		
	18	11	15		

Во время умерщвления измерили уровни трансаминазы в печени и АМК в плазме по стандартным протоколам. Измерили также массы тела и массы органов. Результаты представлены ниже в табл. 74. Масса тела представлена как% относительно исходного значения. Массы органов представлены как% от массы тела относительно контрольной группы с PBS.

Таблица 74

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	АМК (мг/дл)	Масса тела (% от исходного значения)	Масса печени (% отн. массы тела)	Масса почек (% отн. массы тела)	Масса селезенки (% отн. массы тела)
PBS	н.д.	25	51	37	119	100	100	100
47636 6	5	34	68	35	116	91	98	106
	15	37	74	30	122	92	101	128
	45	30	47	31	118	99	108	123
65632 6	0,6	29	57	40	123	100	103	119
	2	36	75	39	114	98	111	106
	6	32	67	39	125	99	97	122
	18	46	77	36	116	102	109	101
67838 1	0,6	26	57	32	117	93	109	110
	2	26	52	33	121	96	106	125
	6	40	78	32	124	92	106	126
	18	31	54	28	118	94	103	120

67838 2	0,6	26	42	35	114	100	103	103
	2	25	50	31	117	91	104	117
	6	30	79	29	117	89	102	107
	18	65	112	31	120	89	104	113
67838 3	0,6	30	67	38	121	91	100	123
	2	33	53	33	118	98	102	121
	6	32	63	32	117	97	105	105
	18	36	68	31	118	99	103	108
67838 4	0,6	36	63	31	118	98	103	98
	2	32	61	32	119	93	102	114
	6	34	69	34	122	100	100	96
	18	28	54	30	117	98	101	104

Пример 81. Продолжительность действия *in vivo* олигонуклеотидов, направленных на A1AT, содержащих кластер GalNAc₃.

Олигонуклеотиды, перечисленные в табл. 72, испытали в исследовании однократной дозы на продолжительность действия у мышей.

Лечение.

Шестинедельным самцам мышей C57BL/6 ввели однократную подкожную инъекцию олигонуклеотида, перечисленного в табл. 72, или PBS. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Образцы крови брали за день до введения дозы для определения исходного значения, а также на 5, 12, 19 и 25 день после введения дозы. Уровни белка A1AT в плазме измеряли при помощи твердофазного иммуноферментного анализа (см. пример 80). Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней белка A1AT в плазме для каждой экспериментальной группы, нормализованных к исходным уровням. Результаты демонстрируют, что олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc, были более эффективными и имели более продолжительное действие, чем исходное соединение без конъюгата GalNAc (ISIS 476366). Кроме того, олигонуклеотиды, содержащие 5'-GalNAc конъюгат (ISIS 678381, 678382, 678383 и 678384), были, в целом, еще более эффективными с еще более продолжительным действием, чем олигонуклеотид, содержащий 3'-GalNAc конъюгат (ISIS 656326).

Таблица 75

Уровни белка A1AT в плазме мышей

ISIS №	Доза (мг/кг)	Временные точки (дни после введения дозы)	A1AT (% от исходного значения)	Кластер GalNAc ₃	СМ
PBS	н.д.	5	93	н.д.	н.д.
		12	93		
		19	90		

		25	97		
476366	100	5	38	н.д.	н.д.
		12	46		
		19	62		
		25	77		
656326	18	5	33	GalNAc ₃ -1a	Ad
		12	36		
		19	51		
		25	72		
678381	18	5	21	GalNAc ₃ -3a	Ad
		12	21		
		19	35		
		25	48		
678382	18	5	21	GalNAc ₃ -7a	Ad
		12	21		
		19	39		
		25	60		
678383	18	5	24	GalNAc ₃ -10a	Ad
		12	21		
		19	45		
		25	73		
678384	18	5	29	GalNAc ₃ -13a	Ad
		12	34		
		19	57		
		25	76		

Пример 82. Антисмысловое ингибирование *in vitro* под действием олигонуклеотидов, направленных на SRB-1, содержащих конъюгат GalNAc₃.

Первичные гепатоциты печени мышей высевали в 96-луночные планшеты при 15000 клеток на лунку за 2 ч до обработки. Олигонуклеотиды, перечисленные в табл. 76, добавили в концентрации 2, 10, 50 или 250 нМ в среде Уильяма Е, и инкубировали клетки в течение ночи при 37°C в 5% CO₂. Клетки лизировали через 16 ч после добавления олигонуклеотида, а общую РНК очистили при помощи RNease 3000 BioRobot (Qiagen). Уровни мРНК SRB-1 определили при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Значения IC₅₀ определили при помощи программы Prism 4 (GraphPad). Результаты демонстрируют, что олигонуклеотиды, содержащие множество различных групп конъюгата GalNAc и множество различных расщепляемых фрагментов, являются значительно более эффективными в *in vitro* эксперименте свободного поглощения, чем исходные олигонуклеотиды, не содержащие группу конъюгата GalNAc (ISIS 353382 и 666841).

Таблица 76

Ингибирование экспрессии SRB-1 in vitro

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Связи	Кластер GalNAc	CM	IC ₅₀ (нМ)	SEQ ID NO
353382	G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	PS	н.д.	н.д.	250	829
655861	G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{eo} A_{do}'- GalNAc₃-1_a	PS	GalNAc 3-1 _a	A _d	40	830
661161	GalNAc₃-3_a- o'A_{do} G ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	PS	GalNAc 3-3 _a	A _d	40	831
661162	GalNAc₃-3_a- o'A_{do} G ^m _{es} C ^m _{eo} T ^m _{eo} T ^m _{eo} C ^m _{eo} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds}	PO/PS	GalNAc 3-3 _a	A _d	8	831

	$\text{}^m\text{C}_{ds}\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}\text{G}_{ds}\text{A}_{ds} \text{}^m\text{C}_{ds}\text{T}_{ds} \text{}^m\text{C}_{eo} \text{}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_e$					
664078	$\text{G}_{es} \text{}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es} \text{}^m\text{C}_{es}\text{A}_{ds}\text{G}_{ds}\text{T}_{ds} \text{}^m\text{C}_{ds}\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}\text{G}_{ds}$ $\text{A}_{ds} \text{}^m\text{C}_{ds}\text{T}_{ds} \text{}^m\text{C}_{es} \text{}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_{eo}\textbf{Ado}'-$ GalNac3-9_a	PS	GalNac 3-9 _a	A _d	20	830
665001	GalNac3-8_a- $\text{o}'\textbf{AdoG}_{es} \text{}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es} \text{}^m\text{C}_{es}\text{A}_{ds}\text{G}_{ds}\text{T}_{ds} \text{}^m\text{C}_{ds}-$ $\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}\text{G}_{ds}\text{A}_{ds} \text{}^m\text{C}_{ds}\text{T}_{ds} \text{}^m\text{C}_{es} \text{}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_e$	PS	GalNac 3-8 _a	A _d	70	831
666224	GalNac3-5_a- $\text{o}'\textbf{AdoG}_{es} \text{}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{}^m\text{C}_{es}\text{A}_{ds}\text{G}_{ds}\text{T}_{ds}$ $\text{}^m\text{C}_{ds}\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}\text{G}_{ds}\text{A}_{ds} \text{}^m\text{C}_{ds}\text{T}_{ds} \text{}^m\text{C}_{es} \text{}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_e$	PS	GalNac 3-5 _a	A _d	80	831
666841	$\text{G}_{es} \text{}^m\text{C}_{eo}\text{T}_{eo}\text{}^m\text{C}_{es}\text{A}_{ds}\text{G}_{ds}\text{T}_{ds} \text{}^m\text{C}_{ds}\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}\text{G}_{ds}$ $\text{A}_{ds} \text{}^m\text{C}_{ds}\text{T}_{ds} \text{}^m\text{C}_{eo} \text{}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_e$	PO/PS	н.д.	н.д.	>250	829
666881	GalNac3-10_a- $\text{o}'\textbf{AdoG}_{es} \text{}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{}^m\text{C}_{es}\text{A}_{ds}\text{G}_{ds}\text{T}_{ds}$ $\text{}^m\text{C}_{ds}\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}\text{G}_{ds}\text{A}_{ds} \text{}^m\text{C}_{ds}\text{T}_{ds} \text{}^m\text{C}_{es} \text{}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_e$	PS	GalNac 3-10 _a	A _d	30	831
666904	GalNac3-3_a- $\text{o}'\text{G}_{es} \text{}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{}^m\text{C}_{es}\text{A}_{ds}\text{G}_{ds}\text{T}_{ds} \text{}^m\text{C}_{ds}$ $\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}\text{G}_{ds}\text{A}_{ds} \text{}^m\text{C}_{ds}\text{T}_{ds} \text{}^m\text{C}_{es} \text{}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_e$	PS	GalNac 3-3 _a	PO	9	829
666924	GalNac3-3_a- $\text{o}'\textbf{TdoG}_{es} \text{}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{}^m\text{C}_{es}\text{A}_{ds}\text{G}_{ds}\text{T}_{ds}$ $\text{}^m\text{C}_{ds}\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}\text{G}_{ds}\text{A}_{ds} \text{}^m\text{C}_{ds}\text{T}_{ds} \text{}^m\text{C}_{es} \text{}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_e$	PS	GalNac 3-3 _a	T _d	15	834
666961	GalNac3-6_a- $\text{o}'\textbf{AdoG}_{es} \text{}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{}^m\text{C}_{es}\text{A}_{ds}\text{G}_{ds}\text{T}_{ds}$ $\text{}^m\text{C}_{ds}\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}\text{G}_{ds}\text{A}_{ds} \text{}^m\text{C}_{ds}\text{T}_{ds} \text{}^m\text{C}_{es} \text{}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{T}_e$	PS	GalNac 3-6 _a	A _d	150	831
666981	GalNac3-7_a- $\text{o}'\textbf{AdoG}_{es} \text{}^m\text{C}_{es}\text{T}_{es}\text{}^m\text{C}_{es}\text{A}_{ds}\text{G}_{ds}\text{T}_{ds}$	PS	GalNac 3-7 _a	A _d	20	831

[illegible]

	${}^m\text{C}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{}^m\text{C}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{es}}\text{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{e}}$					
673501	GalNAc₃-7_a- $\text{o}'\text{A}_{\text{do}}\text{G}_{\text{es}}\text{}^m\text{C}_{\text{eo}}\text{T}_{\text{eo}}\text{T}_{\text{eo}}\text{}^m\text{C}_{\text{eo}}\text{A}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}$ ${}^m\text{C}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{}^m\text{C}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{eo}}\text{}^m\text{C}_{\text{eo}}\text{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{e}}$	PO/PS	GalNAc _{3-7_a}	Ad	30	831
673502	GalNAc₃-10_a- $\text{o}'\text{A}_{\text{do}}\text{G}_{\text{es}}\text{}^m\text{C}_{\text{eo}}\text{T}_{\text{eo}}\text{T}_{\text{eo}}\text{}^m\text{C}_{\text{eo}}\text{A}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}$ ${}^m\text{C}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{}^m\text{C}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{eo}}\text{}^m\text{C}_{\text{eo}}\text{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{e}}$	PO/PS	GalNAc _{3-10_a}	Ad	8	831
675441	GalNAc₃-17_a- $\text{o}'\text{A}_{\text{do}}\text{G}_{\text{es}}\text{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{A}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}$ ${}^m\text{C}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{}^m\text{C}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{es}}\text{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{e}}$	PS	GalNAc _{3-17_a}	Ad	30	831
675442	GalNAc₃-18_a- $\text{o}'\text{A}_{\text{do}}\text{G}_{\text{es}}\text{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{A}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}$ ${}^m\text{C}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{}^m\text{C}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{es}}\text{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{e}}$	PS	GalNAc _{3-18_a}	Ad	20	831
677841	$\text{G}_{\text{es}}\text{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{A}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{}^m\text{C}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}$ $\text{A}_{\text{ds}}\text{}^m\text{C}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{es}}\text{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{eo}}\text{A}_{\text{do}}\text{'-}$ GalNAc₃-19_a	PS	GalNAc _{3-19_a}	Ad	40	830
677842	$\text{G}_{\text{es}}\text{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{A}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{}^m\text{C}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}$ $\text{A}_{\text{ds}}\text{}^m\text{C}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{es}}\text{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{eo}}\text{A}_{\text{do}}\text{'-}$ GalNAc₃-20_a	PS	GalNAc _{3-20_a}	Ad	30	830
677843	GalNAc₃-23_a- $\text{o}'\text{A}_{\text{do}}\text{G}_{\text{es}}\text{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{A}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}$ ${}^m\text{C}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{}^m\text{C}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{es}}\text{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{}^m\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{e}}$	PS	GalNAc _{3-23_a}	Ad	40	831

Структура GalNAc₃-1_a показана ранее в примере 9, GalNAc₃-3_a показана в примере 39, GalNAc₃-5_a показана в примере 49, GalNAc₃-6_a показана в примере 51, GalNAc₃-7_a показана в примере 48, GalNAc₃-8_a показана в примере 47, GalNAc₃-9_a показана в примере 52, GalNAc₃-10_a показана в примере 46, GalNAc₃-12_a показана в примере 61, GalNAc₃-13_a показана в примере 62, GalNAc₃-14_a показана в примере 63, GalNAc₃-15_a показана в примере 64, GalNAc₃-17_a показана в примере 68, GalNAc₃-18_a показана в примере 69, GalNAc₃-19_a показана в примере 70, GalNAc₃-20_a показана в примере 71 и GalNAc₃-23_a показана в примере 76.

Пример 83. Антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, направленных на фактор XI, содержащих кластер GalNAc₃.

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже в табл. 77, испытали в исследовании дозозависимого ингибирования фактора XI у мышей.

Таблица 77

Модифицированные олигонуклеотиды, направленные на фактор XI

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc	CM	SEQ ID NO
404071	T _{es} G _{es} G _{es} T _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{es} G _{es} A _{es} G _{es} G _{es}	н.д.	н.д.	832
656173	T _{es} G _{eo} G _{eo} T _{eo} A _{eo} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} G _{eo} A _{es} G _{es} G _{eo} Ado'-GalNAc3-1a	GalNAc3-1a	Ad	833
663086	GalNAc3-3a- o' Ado T _{es} G _{eo} G _{eo} T _{eo} A _{eo} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} G _{eo} A _{es} G _{es} G _{es}	GalNAc3-3a	Ad	841
678347	GalNAc3-7a- o' Ado T _{es} G _{eo} G _{eo} T _{eo} A _{eo} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} G _{eo} A _{es} G _{es} G _{es}	GalNAc3-7a	Ad	841
678348	GalNAc3-10a- o' Ado T _{es} G _{eo} G _{eo} T _{eo} A _{eo} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} G _{eo} A _{es} G _{es} G _{es}	GalNAc3-10a	Ad	841
678349	GalNAc3-13a- o' Ado T _{es} G _{eo} G _{eo} T _{eo} A _{eo} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} G _{eo} A _{es} G _{es} G _{es}	GalNAc3-13a	Ad	841
	T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} G _{eo} A _{es} G _{es} G _{es}			

Структура GalNAc3-1_a показана ранее в примере 9, GalNAc3-3_a показана в примере 39, GalNAc3-7_a показана в примере 48, GalNAc3-10_a показана в примере 46 и GalNAc3-13_a показана в примере 62.

Лечение.

Шести-восьминедельным мышам один раз в неделю вводили подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, в целом три дозы олигонуклеотида, перечисленного ниже, или PBS. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей усыпили через 72 ч после последней дозы. Уровни мРНК фактора XI в печени измерили при помощи ПЦР в реальном времени и нормализовали к циклофилу по стандартным протоколам. Измерили также трансаминазы в печени, АМК и билирубин. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент для каждой экспериментальной группы, нормализованный к контролю с PBS.

Как показано в табл. 78, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК фактора XI в печени дозозависимым образом. Результаты демонстрируют, что олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc, были более эффективными, чем исходное соединение без конъюгата GalNAc (ISIS 404071). Кроме того, олигонуклеотиды, содержащие 5'-GalNAc конъюгат (ISIS 663086, 678347, 678348 и 678349), были еще более эффективными, чем олигонуклеотид, содержащий 3'-GalNAc конъюгат (ISIS 656173).

Таблица 78

Уровни мРНК фактора XI в печени, трансаминазы в печени, АМК и билирубина

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК фактора XI (% от PBS)	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	АМК (мг/дл)	Билирубин (мг/дл)	Кластер GalNAc3	SEQ ID NO
PBS	н.д.	100	63	70	21	0,18	н.д.	н.д.
404071	3	65	41	58	21	0,15	н.д.	832
	10	33	49	53	23	0,15		
	30	17	43	57	22	0,14		

656173	0,7	43	90	89	21	0,16	GalNAc ₃ -1a	833
	2	9	36	58	26	0,17		
	6	3	50	63	25	0,15		
663086	0,7	33	91	169	25	0,16	GalNAc ₃ -3a	841
	2	7	38	55	21	0,16		
	6	1	34	40	23	0,14		
678347	0,7	35	28	49	20	0,14	GalNAc ₃ -7a	841
	2	10	180	149	21	0,18		
	6	1	44	76	19	0,15		
678348	0,7	39	43	54	21	0,16	GalNAc ₃ -10a	841
	2	5	38	55	22	0,17		
	6	2	25	38	20	0,14		
678349	0,7	34	39	46	20	0,16	GalNAc ₃ -13a	841
	2	8	43	63	21	0,14		
	6	2	28	41	20	0,14		

Пример 84. Продолжительность действия *in vivo* олигонуклеотидов, направленных на фактор XI, содержащих конъюгат GalNAc₃.

Олигонуклеотиды, перечисленные в табл. 77, испытали в исследовании однократной дозы на продолжительность действия у мышей.

Лечение.

Шести-восьминедельным мышам ввели однократную подкожную инъекцию олигонуклеотида, перечисленного в табл. 77, или PBS. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Образцы крови брали из хвостовой вены за день до введения дозы для определения исходного значения, а также на 3, 10 и 17 день после введения дозы. Уровни белка фактора XI в плазме определяли твердофазным иммуноферментным анализом, используя иммобилизованные и биотинилированные детекторные антитела для фактора XI производства R & D Systems, Миннеаполис, штат Миннесота (кат. № AF2460 и № BAF2460, соответственно), а также реагент OptEIA, набор В (кат. № 550534, BD Biosciences, Сан-Хосе, штат Калифорния). Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней белка фактора XI в плазме для каждой экспериментальной группы, нормализованных к исходным уровням. Результаты демонстрируют, что олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc, были более эффективными и имели более продолжительное действие, чем исходное соединение без конъюгата GalNAc (ISIS 404071). Кроме того, олигонуклеотиды, содержащие 5'-GalNAc конъюгат (ISIS 663086, 678347, 678348 и 678349), были еще более эффективными с еще более продолжительным действием, чем олигонуклеотид, содержащий 3'-GalNAc конъюгат (ISIS 656173).

Таблица 79

Уровни белка фактора XI в плазме мышей

ISIS №	Доза (мг/кг)	Временные точки (дни после введения дозы)	Фактор XI (% от исходного значения)	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO
PBS	н.д.	3	123	н.д.	н.д.	н.д.
		10	56			
		17	100			
404071	30	3	11	н.д.	н.д.	832
		10	47			
		17	52			
656173	6	3	1	GalNAc ₃ -1a	Ad	833
		10	3			
		17	21			
663086	6	3	1	GalNAc ₃ -3a	Ad	841
		10	2			
		17	9			
678347	6	3	1	GalNAc ₃ -7a	Ad	841
		10	1			
		17	8			
678348	6	3	1	GalNAc ₃ -10a	Ad	841
		10	1			
		17	6			
678349	6	3	1	GalNAc ₃ -13a	Ad	841
		10	1			
		17	5			

Пример 85. Антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, направленных на SRB-1, содержащих конъюгат GalNAc₃.

Олигонуклеотиды, перечисленные в табл. 76, испытали в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования SRB-1 у мышей.

Лечение.

Шести-восьминедельным мышам C57BL/6 один раз в неделю вводили подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, в целом три дозы олигонуклеотида, перечисленного в табл. 76, или солевого раствора. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей усыпили через 48 ч после последнего введения для определения уровней мРНК SRB-1 при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней мРНК SRB-1 в печени для каждой экспериментальной группы, нормализованных к контрольному образцу, обработанному солевым раствором.

Как показано в табл. 80 и 81, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК SRB-1 дозозависимым образом.

Таблица 80

МРНК SRB-1 в печени

ISIS №	Доза (мг/кг)	МРНК SRB-1 (% от солевого раствора)	Кластер GalNAc ₃	СМ
Солевой раствор	н.д.	100	н.д.	н.д.
655861	0,1	94	GalNAc ₃ -1a	Ad
	0,3	119		
	1	68		
	3	32		
661161	0,1	120	GalNAc ₃ -3a	Ad
	0,3	107		
	1	68		
	3	26		
666881	0,1	107	GalNAc ₃ -10a	Ad
	0,3	107		
	1	69		
	3	27		
666981	0,1	120	GalNAc ₃ -7a	Ad
	0,3	103		
	1	54		
	3	21		
670061	0,1	118	GalNAc ₃ -13a	Ad
	0,3	89		
	1	52		
	3	18		
677842	0,1	119	GalNAc ₃ -20a	Ad
	0,3	96		
	1	65		
	3	23		

Таблица 81

МРНК SRB-1 в печени

ISIS №	Доза (мг/кг)	МРНК SRB-1 (% от солевого раствора)	Кластер GalNAc ₃	СМ
661161	0,1	107	GalNAc ₃ -3a	Ad
	0,3	95		
	1	53		
	3	18		
677841	0,1	110	GalNAc ₃ -19a	Ad
	0,3	88		
	1	52		
	3	25		

Измерили также уровни трансаминазы в печени, общего билирубина, АМК и массы тела по стандартным протоколам. Средние значения для каждой экспериментальной группы представлены ниже в

табл. 82.

Таблица 82

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Билирубин (мг/дл)	АМК (мг/дл)	Масса тела (% от исходного значения)	Кластер GalNAc ₃	СМ
Солевой раствор	н.д.	19	39	0,17	26	118	н.д.	н.д.
655861	0,1	25	47	0,17	27	114	GalNAc ₃ -1a	Ad
	0,3	29	56	0,15	27	118		
	1	20	32	0,14	24	112		
	3	27	54	0,14	24	115		
661161	0,1	35	83	0,13	24	113	GalNAc ₃ -3a	Ad
	0,3	42	61	0,15	23	117		
	1	34	60	0,18	22	116		
	3	29	52	0,13	25	117		
666881	0,1	30	51	0,15	23	118	GalNAc ₃ -10a	Ad
	0,3	49	82	0,16	25	119		
	1	23	45	0,14	24	117		
	3	20	38	0,15	21	112		
666981	0,1	21	41	0,14	22	113	GalNAc ₃ -7a	Ad
	0,3	29	49	0,16	24	112		
	1	19	34	0,15	22	111		
	3	77	78	0,18	25	115		
670061	0,1	20	63	0,18	24	111	GalNAc ₃ -13a	Ad
	0,3	20	57	0,15	21	115		
	1	20	35	0,14	20	115		
	3	27	42	0,12	20	116		
677842	0,1	20	38	0,17	24	114	GalNAc ₃ -20a	Ad
	0,3	31	46	0,17	21	117		
	1	22	34	0,15	21	119		
	3	41	57	0,14	23	118		

Пример 86. Антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, направленных на TTR, содержащих кластер GalNAc₃.

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже в табл. 83, испытали в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования человеческого транстиретина (TTR) у трансгенных мышей, экспрессирующих человеческий TTR ген.

Лечение.

Восьминедельным TTR трансгенным мышам один раз в неделю в течение трех недель, в целом три дозы, вводили подкожную инъекцию олигонуклеотида и дозы, перечисленных в представленных ниже таблицах, или PBS. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей усыпили через 72 ч после последнего введения. В течение эксперимента в различных временных точках брали образцы крови из хвостовой вены и измеряли уровни белка TTR в плазме, ALT и AST, которые представлены в табл. 85-87. После усыпления животных измерили уровни ALT, AST и человеческого TTR в плазме, а

также массы тела, массы органов и уровни мРНК человеческого TTR в печени. Уровни белка TTR измеряли при помощи клинического анализатора (AU480, Beckman Coulter, штат Калифорния). ПЦР в реальном времени и реагент для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Юджин, штат Орегон) использовали по стандартным протоколам для определения уровней мРНК человеческого TTR в печени. Результаты, показанные в табл. 84-87, представляют собой средние значения для каждой экспериментальной группы. Уровни мРНК представляют собой средние значения относительно среднего значения для PBS группы. Уровни белка в плазме представляют собой средние значения относительно среднего значения для PBS группы в исходном состоянии. Массы тела представляют собой среднее процентное изменение массы от исходного значения до умерщвления для каждой отдельной экспериментальной группы. Представленные массы органов нормализованы к массе тела животного, а затем представлена средняя нормализованная масса органов для каждой экспериментальной группы относительно средней нормализованной массы органов для PBS группы.

В табл. 84-87 "BL" означает исходные значения измерений, выполненных непосредственно перед введением первой дозы. Как показано в табл. 84 и 85, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни экспрессии TTR дозозависимым образом. Олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc, были более эффективными, чем исходное соединение без конъюгата GalNAc (ISIS 420915). Кроме того, олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc и смешанные PS/PO межнуклеозидные линкеры, были еще более эффективными, чем олигонуклеотид, содержащий конъюгат GalNAc и только PS линкеры.

Таблица 83

Олигонуклеотиды, направленные на человеческий TTR

Isis №	Последовательность от 5' к 3'	Связи	Кластер GalNAc	CM	SEQ ID NO
420915	T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS	н.д.	н.д.	842
660261	T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e Ado'-GalNAc3-1a	PS	GalNAc3-1a	Ad	843
682883	GalNAc3-3a- o'T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS/PO	GalNAc3-3a	PO	842
682884	GalNAc3-7a- o'T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS/PO	GalNAc3-7a	PO	842
682885	GalNAc3-10a- o'T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS/PO	GalNAc3-10a	PO	842
682886	GalNAc3-13a- o'T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS/PO	GalNAc3-13a	PO	842
684057	T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _d sA _{ds} A _{eo} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e Ado'-GalNAc3-19a	PS/PO	GalNAc3-19a	Ad	843

Легенда для табл. 85 представлена в примере 74. Структура GalNAc3-1 показана в примере 9. Структура GalNAc3-3a показана в примере 39. Структура GalNAc3-7a показана в примере 48. Структура GalNAc3-10a показана в примере 46. Структура GalNAc3-13a показана в примере 62. Структура GalNAc3-19a показана в примере 70.

Таблица 84

Антисмысловое ингибирование человеческого TTR in vivo

Isis №	Доза (мг/кг)	мРНК TTR (% PBS)	Белок TTR в плазме (% PBS)	Кластер GalNAc	CM	SEQ ID NO
PBS	н.д.	100	100	н.д.	н.д.	
420915	6	99	95	н.д.	н.д.	842
	20	48	65			
	60	18	28			
660261	0,6	113	87	GalNAc ₃ -1a	Ad	843
	2	40	56			
	6	20	27			
	20	9	11			

Таблица 85

Антисмысловое ингибирование человеческого TTR in vivo

Isis №	Доза (мг/кг)	мРНК TTR (% PBS)	Белок TTR в плазме (% PBS при BL)				Кластер GalNAc	CM	SEQ ID NO
			BL	3 день	10 день	17 день (после усыпления)			
PBS	н.д.	100	100	96	90	114	н.д.	н.д.	
420915	6	74	106	86	76	83	н.д.	н.д.	842
	20	43	102	66	61	58			
	60	24	92	43	29	32			
682883	0,6	60	88	73	63	68	GalNAc ₃ -3a	PO	842
	2	18	75	38	23	23			
	6	10	80	35	11	9			
682884	0,6	56	88	78	63	67	GalNAc ₃ -7a	PO	842
	2	19	76	44	25	23			
	6	15	82	35	21	24			
682885	0,6	60	92	77	68	76	GalNAc ₃ -10a	PO	842
	2	22	93	58	32	32			
	6	17	85	37	25	20			
682886	0,6	57	91	70	64	69	GalNAc ₃ -13a	PO	842
	2	21	89	50	31	30			
	6	18	102	41	24	27			
684057	0,6	53	80	69	56	62	GalNAc ₃ -	Ad	843
	2	21	92	55	34	30	19a		
	6	11	82	50	18	13			

Таблица 86

Уровни трансаминазы, изменение массы тела и относительные массы органов

Isis №	До за (мг /кг)	ALT (ед./л)				AST (ед./л)				Масса тела (% BL)	Печень (% PBS)	Селезенка (% PBS)	Почки (% PBS)	SE Q ID NO
		BL	3 де нь	10 де нь	17 де нь	BL	3 де нь	10 де нь	17 де нь					
PBS	н.д.	33	34	33	24	58	62	67	52	105	100	100	100	н.д.
420915	6	34	33	27	21	64	59	73	47	115	99	89	91	842
	20	34	30	28	19	64	54	56	42	111	97	83	89	
	60	34	35	31	24	61	58	71	58	113	102	98	95	
660261	0,6	33	38	28	26	70	71	63	59	111	96	99	92	843
	2	29	32	31	34	61	60	68	61	118	100	92	90	
	6	29	29	28	34	58	59	70	90	114	99	97	95	
	20	33	32	28	33	64	54	68	95	114	101	106	92	

Таблица 87

Уровни трансаминазы, изменение массы тела и относительные массы органов

Isis №	До за (мг /кг)	ALT (ед./л)				AST (ед./л)				Масса тела (% BL)	Печень (% PBS)	Селезенка (% PBS)	Почки (% PBS)	SE Q ID NO
		BL	3 де нь	10 де нь	17 де нь	BL	3 ден ь	10 ден ь	17 ден ь					
PBS	н.д.	32	34	37	41	62	78	76	77	104	100	100	100	н.д.
420915	6	32	30	34	34	61	71	72	66	102	103	102	105	842
	20	41	34	37	33	80	76	63	54	106	107	135	101	
	60	36	30	32	34	58	81	57	60	106	105	104	99	
682883	0,6	32	35	38	40	53	81	74	76	104	101	112	95	842
	2	38	39	42	43	71	84	70	77	107	98	116	99	
	6	35	35	41	38	62	79	103	65	105	103	143	97	
682884	0,6	33	32	35	34	70	74	75	67	101	100	130	99	842
	2	31	32	38	38	63	77	66	55	104	103	122	100	
	6	38	32	36	34	65	85	80	62	99	105	129	95	
682885	0,6	39	26	37	35	63	63	77	59	100	109	109	112	842
	2	30	26	38	40	54	56	71	72	102	98	111	102	
	6	27	27	34	35	46	52	56	64	102	98	113	96	
682886	0,6	30	40	34	36	58	87	54	61	104	99	120	101	842
	2	27	26	34	36	51	55	55	69	103	91	105	92	
	6	40	28	34	37	107	54	61	69	109	100	102	99	
684057	0,6	35	26	33	39	56	51	51	69	104	99	110	102	843
	2	33	32	31	40	54	57	56	87	103	100	112	97	
	6	39	33	35	40	67	52	55	92	98	104	121	108	

Пример 87. Продолжительность действия *in vivo* однократных доз олигонуклеотидов, направленных на TTR, содержащих кластер GalNAc₃.

ISIS № 420915 и 660261 (см. табл. 83), испытывали в исследовании однократной дозы на продолжительность действия у мышей. ISIS № 420915, 682883 и 682885 (см. табл. 83) также испытывали в исследо-

вании однократной дозы на продолжительность действия у мышей.

Лечение.

Восьминедельным самцам трансгенных мышей, которые экспрессируют человеческий TTR, ввели однократную подкожную инъекцию 100 мг/кг ISIS № 420915 или 13,5 мг/кг ISIS № 660261. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Образцы крови из хвостовой вены брали до введения дозы для определения исходных показателей и на 3, 7, 10, 17, 24 и 39 день после введения дозы. Уровни белка TTR в плазме измеряли так, как описано в примере 86. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней TTR в плазме для каждой экспериментальной группы, нормализованных к исходным уровням.

Таблица 88

Уровни белка TTR в плазме

ISIS №	Доза (мг/кг)	Временные точки (дни после введения дозы)	TTR (% от исходного значения)	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO
420915	100	3	30	н.д.	н.д.	842
		7	23			
		10	35			
		17	53			
		24	75			
		39	100			
660261	13,5	3	27	GalNAc ₃ -1a	Ad	843
		7	21			
		10	22			
		17	36			
		24	48			
		39	69			

Лечение.

Восьминедельным самкам трансгенных мышей, которые экспрессируют человеческий TTR, ввели однократную подкожную инъекцию 100 мг/кг ISIS № 420915, 10,0 мг/кг ISIS № 682883 или 10,0 мг/кг 682885. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Образцы крови из хвостовой вены брали до введения дозы для определения исходных показателей и на 3, 7, 10, 17, 24 и 39 день после введения дозы.

Уровни белка.

TTR в плазме измеряли так, как описано в примере 86. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней TTR в плазме для каждой экспериментальной группы, нормализованных к исходным уровням.

Таблица 89

Уровни белка TTR в плазме

ISIS №	Доза (мг/кг)	Временные точки (дни после введения дозы)	TTR (% от исходного значения)	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO
420915	100	3	48	н.д.	н.д.	842
		7	48			
		10	48			
		17	66			
		31	80			
682883	10,0	3	45	GalNAc ₃ -3a	PO	842
		7	37			
		10	38			
		17	42			
		31	65			
682885	10,0	3	40	GalNAc ₃ -10a	PO	842
		7	33			
		10	34			
		17	40			
		31	64			

Результаты в табл. 88 и 89 демонстрируют, что олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc, являются более эффективными и имеют более продолжительное действие, чем исходный олигонуклеотид без конъюгата (ISIS 420915).

Пример 88. Сплайсинг-модулирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, направленных на SMN, содержащих конъюгат GalNAc₃.

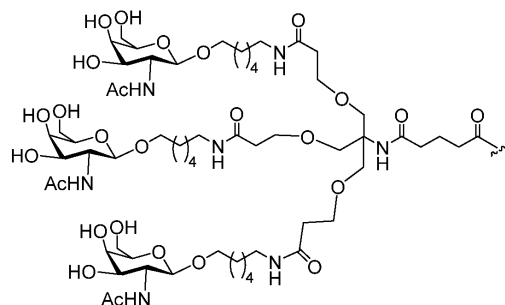
Олигонуклеотиды, перечисленные в табл. 90, испытали на сплайсинг-модулирование человеческих генов выживаемости мотонейронов (SMN) у мышей.

Таблица 90

Модифицированные ASO, направленные на SMN

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO
387954	A _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{es} A _{es} A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} G _e	н.д.	н.д.	844
699819	GalNAc₃-7a- o'A _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{es} A _{es} A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} G _e	GalNAc ₃ -7a	PO	844
699821	GalNAc₃-7a- o'A _{es} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{eo} T _{eo} A _{eo} A _{eo} T _{eo} G _{eo} ^m C _{eo} T _{es} G _{es} G _e	GalNAc ₃ -7a	PO	844
700000	A _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{es} A _{es} A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} G _{eo} Ado'-GalNAc₃-1a	GalNAc ₃ -1a	Ad	845
703421	X-ATT ^m CA ^m CTTT ^m CATAATG ^m CTGG	н.д.	н.д.	844
703422	GalNAc₃-7b-X-ATT^mCA^mCTTT^mCATAATG^mCTGG	GalNAc ₃ -7b	н.д.	844

Структура GalNAc₃-7_a показана ранее в примере 48. "X" означает 5'-первичный амин, полученный компанией Gene Tools (Филомат, штат Орегон), а GalNAc₃-7_b означает структуру GalNAc₃-7_a, не содержащую часть -NH-C₆-O линкера, как показано ниже:



ISIS № 703421 и 703422 представляют собой морфолино-олигонуклеотиды, при этом каждый нуклеотид из двух олигонуклеотидов представляет собой морфолино-нуклеотид.

Лечение.

Шестинедельным трансгенным мышам, экспрессирующим человеческий SMN, ввели однократную подкожную инъекцию олигонуклеотида, перечисленного в табл. 91, или солевого раствора. Каждая экспериментальная группа состояла из 2 самцов и 2 самок. Мышей усыпили через 3 дня после введения дозы для определения уровней мРНК человеческого SMN в печени с экзон 7 и без него, используя ПЦР в реальном времени по стандартным протоколам. Общую РНК измерили при помощи реагента Ribogreen. Уровни мРНК SMN нормализовали к общей мРНК, а затем нормализовали к средним значениям в группе, обработанной солевым раствором. Полученные средние отношения мРНК SMN, содержащей экзон 7, к мРНК SMN, не содержащей экзон 7, представлены в табл. 91. Результаты демонстрируют, что полностью модифицированные олигонуклеотиды, которые модулируют сплайсинг и содержат конъюгат GalNAc, являются значительно более эффективными для изменения сплайсинга в печени, чем исходные олигонуклеотиды, не содержащие конъюгат GalNAc. Кроме того, эта тенденция сохраняется для химизма многократных модификаций, включая 2'-МОЕ и морфолино-модифицированные олигонуклеотиды.

Таблица 91

Действие олигонуклеотидов, направленных на человеческий SMN, in vivo

ISIS №	Доза (мг/кг)	+экзон 7 / -экзон 7	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO
Солевой раствор	н.д.	1,00	н.д.	н.д.	н.д.
387954	32	1,65	н.д.	н.д.	844
387954	288	5,00	н.д.	н.д.	844
699819	32	7,84	GalNAc ₃ -7a	PO	844
699821	32	7,22	GalNAc ₃ -7a	PO	844
700000	32	6,91	GalNAc ₃ -1a	Ad	845
703421	32	1,27	н.д.	н.д.	844
703422	32	4,12	GalNAc ₃ -7b	н.д.	844

Пример 89. Антисмысловое ингибирование in vivo под действием олигонуклеотидов, направленных на аполипопротеин А (Апо(а)), содержащих конъюгат GalNAc₃.

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже в табл. 92, испытали в исследовании дозозависимого ингибирования Апо(а) у трансгенных мышей.

Таблица 92

Модифицированные ASO, направленные на Апо(а)

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO
494372	T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} T _{es} ^m C _e	н.д.	н.д.	847
681257	GalNAc₃-7a -o-T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	847

Структура GalNAc₃-7_a показана ранее в примере 48.

Лечение.

Восьминедельным самкам мышей C57BL/6 (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) один раз в неделю вводили подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, в целом шесть доз олигонуклеотида, перечисленного в табл. 92, или PBS. Каждая экспериментальная группа состояла из 3-4 животных. Об-

разцы крови из хвостовой вены брали за день до введения первой дозы и еженедельно после введения каждой дозы для определения уровней белка Apo(a) в плазме. Мышей усыпили через два дня после последнего введения. Уровни мРНК Apo(a) в печени определили при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Юджин, штат Орегон) по стандартным протоколам. Уровни белка Apo(a) в плазме определили при помощи твердофазного иммуноферментного анализа, и определили уровни трансаминазы в печени. Результаты анализа мРНК и белка в плазме в табл. 93 представлены как среднее процентное значение для экспериментальной группы относительно группы, обработанной PBS. Уровни белка в плазме дополнительно нормализовали к исходному значению (BL) для группы с PBS. Средние абсолютные уровни трансаминазы и массы тела (% относительно среднего исходного значения) представлены в табл. 94.

Как показано в табл. 93, лечение олигонуклеотидами снижает уровни мРНК Apo(a) в печени и уровни белка в плазме дозозависимым образом. Кроме того, олигонуклеотид, содержащий конъюгат GalNAc, был значительно более эффективным с более продолжительным действием, чем исходный олигонуклеотид, не содержащий конъюгат GalNAc. Как показано в табл. 94, представленные олигонуклеотиды не влияют на уровни трансаминазы и массы тела, что указывает на хорошую переносимость олигонуклеотидов.

Таблица 93

Уровни мРНК Apo(a) в печени и белка в плазме

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК Apo(a) (% PBS)	Белок Apo(a) в плазме (% PBS)						
			BL	Неделя 1	Неделя 2	Неделя 3	Неделя 4	Неделя 5	Неделя 6
PBS	н.д.	100	100	120	119	113	88	121	97
494372	3	80	84	89	91	98	87	87	79
	10	30	87	72	76	71	57	59	46
	30	5	92	54	28	10	7	9	7
681257	0,3	75	79	76	89	98	71	94	78
	1	19	79	88	66	60	54	32	24
	3	2	82	52	17	7	4	6	5
	10	2	79	17	6	3	2	4	5

Таблица 94

ISIS №	Доза (мг/кг)	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Масса тела (% от исходного значения)
PBS	н.д.	37	54	103
494372	3	28	68	106
	10	22	55	102
	30	19	48	103
681257	0,3	30	80	104
	1	26	47	105
	3	29	62	102
	10	21	52	107

Пример 90. Антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, направленных на TTR, содержащих кластер GalNAc₃.

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже в табл. 95, испытали в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования человеческого транстиретина (TTR) у трансгенных мышей, экспрессирующих человеческий TTR ген.

Лечение.

TTR трансгенным мышам один раз в неделю в течение трех недель, в целом три дозы, вводили подкожную инъекцию олигонуклеотида и дозы, перечисленных в табл. 96, или PBS. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Перед введением первой дозы взяли образец крови из хвостовой

вены для определения уровней белка TTR в плазме в исходном состоянии (BL). Мышей усыпили через 72 ч после последнего введения. Уровни белка TTR измерили при помощи клинического анализатора (AU480, Beckman Coulter, штат Калифорния). При помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Юджин, штат Орегон) использовали по стандартным протоколам для определения уровней мРНК человеческого TTR в печени. Результаты, показанные в табл. 96, представляют собой средние значения для каждой экспериментальной группы. Уровни мРНК представляют собой средние значения относительно среднего значения для PBS группы. Уровни белка в плазме представляют собой средние значения относительно среднего значения для PBS группы в исходном состоянии. "BL" означает исходные значения измерений, выполненных непосредственно перед введением первой дозы. Как показано в табл. 96, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни экспрессии TTR дозозависимым образом. Олигонуклеотид, содержащий конъюгат GalNAc, был более эффективным, чем исходное соединение без конъюгата GalNAc (ISIS 420915), а олигонуклеотиды, содержащие фосфодиэфирный или дезоксиаденозиновый расщепляемый фрагмент, демонстрировали значительное усиление эффективности, по сравнению с исходным соединением, не содержащим конъюгата (см. ISIS № 682883 и 666943 по сравнению с 420915, а также см. примеры 86 и 87).

Таблица 95

Олигонуклеотиды, направленные на человеческий TTR

Isis №	Последовательность от 5' к 3'	Связи	Кластер GalNAc	СМ	SEQ ID NO
420915	T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS	н.д.	н.д.	842
682883	GalNAc3-3a- o'T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS/PO	GalNAc3-3a	PO	842
666943	GalNAc3-3a- o'A _{do} T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS/PO	GalNAc3-3a	A _d	846
682887	GalNAc3-7a- o'A _{do} T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS/PO	GalNAc3-7a	A _d	846
682888	GalNAc3-10a- o'A _{do} T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS/PO	GalNAc3-10a	A _d	846
682889	GalNAc3-13a- o'A _{do} T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS/PO	GalNAc3-13a	A _d	846

Легенда для табл. 95 представлена в примере 74. Структура GalNAc3-3_a показана в примере 39. Структура GalNAc3-7_a показана в примере 48. Структура GalNAc3-10_a показана в примере 46. Структура GalNAc3-13_a показана в примере 62.

Таблица 96

Антисмысловое ингибирование человеческого TTR in vivo

Isis №	Доза (мг/кг)	мРНК TTR (% PBS)	Белок TTR (% BL)	Кластер GalNAc	CM
PBS	н.д.	100	124	н.д.	н.д.
420915	6	69	114	н.д.	н.д.
	20	71	86		
	60	21	36		
682883	0,6	61	73	GalNAc ₃ -3a	PO
	2	23	36		
	6	18	23		
666943	0,6	74	93	GalNAc ₃ -3a	A _d
	2	33	57		
	6	17	22		
682887	0,6	60	97	GalNAc ₃ -7a	A _d
	2	36	49		
	6	12	19		
682888	0,6	65	92	GalNAc ₃ -10a	A _d
	2	32	46		
	6	17	22		
682889	0,6	72	74	GalNAc ₃ -13a	A _d
	2	38	45		
	6	16	18		

Пример 91. Антисмысловое ингибирование in vivo под действием олигонуклеотидов, направленных на фактор VII, содержащих конъюгат GalNAc₃, у приматов, не являющихся человеком.

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже в табл. 97, испытывали в нетерминальном исследовании повышения дозы на антисмысловое ингибирование фактора VII у обезьян.

Лечение.

Обезьянам, ранее не подверженным экспериментам, на 0, 15 и 29 день вводили подкожные инъекции повышающихся доз олигонуклеотидов, перечисленных в табл. 97, или PBS. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 самцов и 1 самки. Перед введением первой дозы и в различные временные точки после нее брали образцы крови для определения уровней белка фактора VII в плазме. Уровни белка фактора VII определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа. Результаты, показанные в табл. 98, представляют собой средние значения для каждой экспериментальной группы относительно среднего значения для группы PBS в исходном состоянии (BL), измерения выполнены непосредственно перед введением первой дозы. Как показано в табл. 98, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни экспрессии фактора VII дозозависимым образом, и олигонуклеотид, содержащий конъюгат GalNAc, был значительно более эффективным у обезьян, чем олигонуклеотид, не содержащий конъюгата GalNAc.

Таблица 97

Олигонуклеотиды, направленные на фактор VII

Isis №	Последовательность от 5' к 3'	Связи	Кластер GalNAc	CM	SEQ ID NO
40793 5	A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _d sT _{ds} T _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} A _e	PS	н.д.	н.д.	848
68689 2	GalNAc₃-10a- o'A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} A _e	PS	GalNAc ₃ - 10a	PO	848

Легенда для табл. 97 представлена в примере 74. Структура GalNAc₃-10a показана в примере 46.

Таблица 98

Уровни белка фактора VII в плазме

ISIS №	День	Доза (мг/кг)	Фактор VII (% BL)
407935	0	н.д.	100
	15	10	87
	22	н.д.	92
	29	30	77
	36	н.д.	46
	43	н.д.	43
686892	0	3	100
	15	10	56
	22	н.д.	29
	29	30	19
	36	н.д.	15
	43	н.д.	11

Пример 92. Антисмысловое ингибирование в первичных гепатоцитах под действием олигонуклеотидов, направленных на Apo-CIII, содержащих конъюгат GalNAc₃

Первичные мышинные гепатоциты высевали в 96-луночные планшеты при 15000 клеток на лунку и добавляли олигонуклеотиды, перечисленные в табл. 99, направленные на мышинный ApoC III в концентрации 0,46, 1,37, 4,12 или 12,35, 37,04, 111,11 или 333,33 нМ, или 1,00 мкМ. После инкубации с олигонуклеотидами в течение 24 ч клетки лизировали и очистили общую РНК при помощи RNeasy (Qiagen). Уровни мРНК ApoC III определили при помощи ПЦР в реальном времени и реагента для количественного определения РНК RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc.) по стандартным протоколам. Значения IC₅₀ определили при помощи программы Prism 4 (GraphPad). Результаты демонстрируют, что независимо от того, является ли расщепляемый фрагмент фосфодиэфиром или фосфодиэфир-связанным дезоксиаденозином, олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc, были значительно более эффективными, чем исходный олигонуклеотид, не содержащий конъюгата.

Таблица 99

Ингибирование экспрессии мышиногено АРОС-III в первичных гепатоцитах мышей

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	CM	IC ₅₀ (нМ)	SEQ ID NO
440670	^m CesAesGes ^m CesT _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m CesAesGes ^m C _{es} A _e	н.д.	13,20	849
661180	^m CesAesGes ^m CesT _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m Ces A _{es} G _{es} ^m CesA _{eo} A _{do} '-GalNac3-1a	Ad	1,40	850
680771	GalNac3-3a- o' ^m CesAesGes ^m CesT _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m Ces A _{es} G _{es} ^m CesA _e	PO	0,70	849
680772	GalNac3-7a- o' ^m CesAesGes ^m CesT _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m Ces A _{es} G _{es} ^m CesA _e	PO	1,70	849
680773	GalNac3-10a- o' ^m CesAesGes ^m CesT _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m Ces A _{es} G _{es} ^m CesA _e	PO	2,00	849
680774	GalNac3-13a- o' ^m CesAesGes ^m CesT _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m Ces A _{es} G _{es} ^m CesA _e	PO	1,50	849
681272	GalNac3-3a- o' ^m CesA _{eo} G _{eo} ^m CesT _{eo} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{eo} A _{eo} G _{es} ^m CesA _e	PO	< 0,46	849
681273	GalNac3-3a- o'A _{do} ^m CesA _{es} G _{es} ^m CesT _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m CesA _{es} G _{es} ^m CesA _e	Ad	1,10	851
683733	^m CesAesGes ^m CesT _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m Ces A _{es} G _{es} ^m CesA _{eo} A _{do} '-GalNac3-19a	Ad	2,50	850

Структура GalNac3-1_a показана ранее в примере 9, GalNac3-3_a показана в примере 39, GalNac3-7_a показана в примере 48, GalNac3-10_a показана в примере 46, GalNac3-13_a показана в примере 62 и GalNac3-19_a показана в примере 70.

Пример 93. Антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, направленных на SRB-1, содержащих смешанные крылья и 5'-GalNac3 конъюгат.

Олигонуклеотиды, перечисленные в табл. 100, испытывали в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования SRB-1 у мышей.

Таблица 100

Модифицированные ASO, направленные на SRB-1

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO
449093	T _{ks} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _k	н.д.	н.д.	852
699806	GalNAc₃-3a-o ·T _{ks} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -3a	PO	852
699807	GalNAc₃-7a-o ·T _{ks} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -7a	PO	852
699809	GalNAc₃-7a-o ·T _{ks} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	852
699811	GalNAc₃-7a-o ·T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -7a	PO	852
699813	GalNAc₃-7a-o ·T _{ks} T _{ds} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ds} ^m C _k	GalNAc ₃ -7a	PO	852
699815	GalNAc₃-7a-o ·T _{es} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	852

Структура GalNAc₃-3_a показана ранее в примере 39, а структура GalNAc₃-7_a показана ранее в примере 48. Нижние индексы: "e" означает 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид; "d" означает β-D-2'-дезоксирибонуклеозид; "k" означает 6'-(S)-CH₃ бициклический нуклеозид (сEt); "s" означает тифосфатные межнуклеозидные линкеры (PS); "o" означает фосфодиэфирные межнуклеозидные линкеры (PO). Верхний индекс "т" означает 5-метилцитозины.

Лечение.

Шести-восьминедельным мышам C57bl6 (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) ввели однократную подкожную инъекцию дозы, представленной ниже, олигонуклеотида, перечисленного в табл. 100, или солевого раствора. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей усыпили через 72 ч после последнего введения. Уровни мРНК SRB-1 в печени измерили при помощи ПЦР в реальном времени. Уровни мРНК SRB-1 нормализовали к уровням мРНК циклофилина по стандартным протоколам. Результаты, показанные ниже, представлены как средний процент уровней мРНК SRB-1 для каждой экспериментальной группы, по сравнению с контрольной группой, обработанной солевым раствором. Как показано в табл. 101, лечение бессмысленными олигонуклеотидами снижает уровни мРНК SRB-1 дозозависимым образом, а гзпмерные олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc и имеющие крылья, которые представляют собой либо полностью сEt, либо смешанные сахарные модификации, были существенно более эффективными, чем исходный олигонуклеотид, не содержащий конъюгата и содержащий полностью сEt модифицированные крылья.

Измерили также массы тела, уровни трансаминазы в печени, общий билирубин и АМК, а средние значения для каждой экспериментальной группы представлены в табл. 101. Масса тела показана как средний процент массы тела относительно исходной массы тела (% BL), измеренный непосредственно перед введением дозы олигонуклеотида.

Таблица 101

Уровни мРНК SRB-1, ALT, AST, АМК и общего билирубина, а также массы тела

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% PBS)	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Билирубин	АМК	Масса тела (% BL)
PBS	н.д.	100	31	84	0,15	28	102
449093	1	111	18	48	0,17	31	104

	3	94	20	43	0,15	26	103
	10	36	19	50	0,12	29	104
699806	0,1	114	23	58	0,13	26	107
	0,3	59	21	45	0,12	27	108
	1	25	30	61	0,12	30	104
699807	0,1	121	19	41	0,14	25	100
	0,3	73	23	56	0,13	26	105
	1	24	22	69	0,14	25	102
699809	0,1	125	23	57	0,14	26	104
	0,3	70	20	49	0,10	25	105
	1	33	34	62	0,17	25	107
699811	0,1	123	48	77	0,14	24	106
	0,3	94	20	45	0,13	25	101
	1	66	57	104	0,14	24	107
699813	0,1	95	20	58	0,13	28	104
	0,3	98	22	61	0,17	28	105
	1	49	19	47	0,11	27	106
699815	0,1	93	30	79	0,17	25	105
	0,3	64	30	61	0,12	26	105
	1	24	18	41	0,14	25	106

Пример 94. Антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, направленных на SRB-1, содержащих 2'-сахарные модификации и 5'-GalNAc₃ конъюгат.

Олигонуклеотиды, перечисленные в табл. 102, испытывали в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования SRB-1 у мышей.

Таблица 102

Модифицированные ASO, направленные на SRB-1

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO
35338 2	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	н.д.	н.д.	829
70098 9	G _{ms} C _{ms} U _{ms} U _{ms} C _{ms} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} U _{ms} C _{ms} C _{ms} U _{ms} U _m	н.д.	н.д.	853
66690 4	GalNAc₃-3a- o [•] G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ - 3a	PO	829
70099 1	GalNAc₃-7a-o [•] G _{ms} C _{ms} U _{ms} U _{ms} C _{ms} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} U _{ms} C _{ms} C _{ms} U _{ms} U _m	GalNAc ₃ - 7a	PO	853

Верхний индекс "m" означает 2'-О-метил-модифицированный нуклеозид. Полная легенда к таблице представлена в примере 74. Структура GalNAc₃-3_a показана ранее в примере 39, а структура GalNAc₃-7_a показана ранее в примере 48.

Лечение.

Исследование проводили по протоколу, описанному в примере 93. Результаты представлены ниже в табл. 103 и демонстрируют, что и 2'-МОЕ, и 2'-ОМЕ-модифицированные олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc, были значительно более эффективными, чем соответствующие исходные олигонуклеотиды, не содержащие конъюгата. Результаты измерений массы тела, трансаминазы в печени, общего билирубина и АМК демонстрируют, что эти соединения хорошо переносятся.

Таблица 103

мРНК SRB-1		
ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% PBS)
PBS	н.д.	100
353382	5	116
	15	58
	45	27
700989	5	120
	15	92
	45	46
666904	1	98
	3	45
	10	17
700991	1	118
	3	63
	10	14

Пример 95. Антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, направленных на SRB-1, содержащих бициклические нуклеозиды и 5'-GalNAc₃ конъюгат.

Олигонуклеотиды, перечисленные в табл. 104, испытаны в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования SRB-1 у мышей.

Таблица 104

Модифицированные ASO, направленные на SRB-1

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID No
440762	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	н.д.	н.д.	823
666905	GalNAc₃-3a- o [•] T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -3 _a	PO	823
699782	GalNAc₃-7a- o [•] T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -7 _a	PO	823
699783	GalNAc₃-3a- o [•] T _{ls} ^m C _{ls} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ls} ^m C _l	GalNAc ₃ -3 _a	PO	823
653621	T _{ls} ^m C _{ls} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ls} ^m C _l Ado[•]-GalNAc₃-1a	GalNAc ₃ -1 _a	Ad	824
439879	T _{gs} ^m C _{gs} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _d G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{gs} ^m C _g	н.д.	н.д.	823
699789	GalNAc₃-3a-o[•] T _{gs} ^m C _{gs} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _d G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{gs} ^m C _g	GalNAc ₃ -3 _a	PO	823

Нижний индекс "g" означает фтор-ГНК нуклеозид, нижний индекс "l" означает закрытый нуклеозид, содержащий мостик 2'-O-CH₂-4'. Другие сокращения представлены в легенде таблицы примера 74. Структура GalNAc₃-1_a показана ранее в примере 9, структура GalNAc₃-3_a показана ранее в примере 39, а структура GalNAc₃-7_a показана ранее в примере 48.

Лечение.

Исследование проводили по протоколу, описанному в примере 93. Результаты представлены ниже в табл. 105 и демонстрируют, что олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc и различные бициклические нуклеозидные модификации, были значительно более эффективными, чем исходный олигонуклеотид, не содержащий конъюгата и содержащий бициклические нуклеозидные модификации. Кроме того, олигонуклеотид, содержащий конъюгат GalNAc и фтор-ГНК модификации, был существенно более эффективным, чем исходное соединение, не содержащее конъюгата и содержащее фтор-ГНК модификации. Результаты измерений массы тела, трансаминазы в печени, общего билирубина и АМК демонстрируют, что эти соединения хорошо переносятся.

Таблица 105

Уровни мРНК SRB-1, ALT, AST, АМК и общего билирубина, а также массы тела

ISIS №	Доза (мг/кг)	мРНК SRB-1 (% PBS)
PBS	н.д.	100
440762	1	104
	3	65
	10	35
666905	0,1	105
	0,3	56
	1	18
699782	0,1	93
	0,3	63
	1	15
699783	0,1	105
	0,3	53
	1	12
653621	0,1	109
	0,3	82
	1	27
439879	1	96
	3	77
	10	37
699789	0,1	82
	0,3	69
	1	26

Пример 96. Связывание белка плазмы антисмысловыми олигонуклеотидами, содержащими группу конъюгата GalNAc₃.

Олигонуклеотиды, перечисленные в табл. 70, направленные на ApoC III, и олигонуклеотиды в табл. 106, направленные на Apo(a), испытывали в анализе ультрафильтрации для оценки связывания белка в плазме.

Таблица 106

Модифицированные олигонуклеотиды, направленные на Apo(a)

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID No
494372	T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} T _{es} ^m C _e	н.д.	н.д.	847
693401	T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _e oT _{es} T _{es} ^m C _e	н.д.	н.д.	847
681251	GalNAc₃-7a- oT _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ - 7 _a	PO	847
681257	GalNAc₃-7a- oT _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ - 7 _a	PO	847

Легенда таблицы представлена в примере 74. Структура GalNAc₃-7a показана ранее в примере 48.

Элементы для ультрафильтрации Ultrafree-MC (номинальное ограничение молекулярной массы 30000, слабосвязывающая регенерированная целлюлозная мембрана, Millipore, Бедфорд, штат Массачусетс).

сетс) предварительно кондиционировали с 300 мкл 0,5% Tween 80 и центрифугировали при 2000 g в течение 10 мин, затем с 300 мкл 300 мкг/мл раствора контрольного олигонуклеотида в H₂O и центрифугировали при 2000 g в течение 16 мин. Для оценки неспецифического связывания с фильтрами каждого исследуемого олигонуклеотида из табл. 70 и 106, используемых в испытаниях, 300 мкл 250 нг/мл раствора олигонуклеотида в H₂O при pH 7,4 поместили в предварительно кондиционированные фильтры и центрифугировали при 2000 g в течение 16 мин. Нефильтрованные и фильтрованные образцы анализировали твердофазным иммуоферментным анализом для определения концентраций олигонуклеотидов. Для получения средней концентрации для каждого образца использовали три экземпляра. Среднюю концентрацию фильтрованного образца относительно нефильтрованного образца использовали для определения процента олигонуклеотида, прошедшего через фильтр без плазмы (% выделения).

Замороженные образцы цельной плазмы, собранные в КЗ-ЭДТК и полученные от здоровых, не принимающих лекарства людей-добровольцев, яванских макаков и мышей CD-1, приобрели у компании Bioreclamation LLC (Вестбери, штат Нью-Йорк). Исследуемые олигонуклеотиды добавляли к 1,2 мл аликватам плазмы в двух концентрациях (5 и 150 мкг/мл). Аликвоту (300 мкл) каждого маркированного образца плазмы поместили на предварительно кондиционированный фильтровальный элемент и инкубировали при 37°C в течение 30 мин, затем сразу выполнили центрифугирование при 2000 g в течение 16 мин. Аликвоты фильтрованных и нефильтрованных маркированных образцов плазмы анализировали твердофазным иммуоферментным анализом для определения концентрации олигонуклеотида в каждом образце. Использовали три экземпляра каждой концентрации для определения среднего процента связанного и несвязанного олигонуклеотида в каждом образце. Среднюю концентрацию фильтрованного образца относительно концентрации нефильтрованного образца использовали для определения процента олигонуклеотида в плазме, не связанного с белками плазмы (% несвязанного). Окончательные значения несвязанного олигонуклеотида корректировали на неспецифическое связывание путем деления % несвязанного на % выделения для каждого олигонуклеотида. Окончательные значения % связанного олигонуклеотида определили вычитанием окончательных значений % несвязанного из 100. Результаты показаны в табл. 107 для двух концентраций испытанного олигонуклеотида (5 и 150 мкг/мл) в плазме каждого вида. Результаты демонстрируют, что группы конъюгата GalNAc не оказывают существенного влияния на связывание белка плазмы. Кроме того, олигонуклеотиды, содержащие только PS межнуклеозидные линкеры и смешанные PO/PS линкеры, - оба варианта связывают белки плазмы, при этом олигонуклеотиды, содержащие только PS линкеры, связывают белки плазмы в несколько большей степени, чем олигонуклеотиды, содержащие смешанные PO/PS линкеры.

Таблица 107

Процент модифицированного олигонуклеотида, связанного с белками плазмы

ISIS №	Плазма человека		Плазма обезьян		Плазма мышей	
	5 мкг/мл	150 мкг/мл	5 мкг/мл	150 мкг/мл	5 мкг/мл	150 мкг/мл
304801	99,2	98,0	99,8	99,5	98,1	97,2
663083	97,8	90,9	99,3	99,3	96,5	93,0
674450	96,2	97,0	98,6	94,4	94,6	89,3
494372	94,1	89,3	98,9	97,5	97,2	93,6
693401	93,6	89,9	96,7	92,0	94,6	90,2
681251	95,4	93,9	99,1	98,2	97,8	96,1
681257	93,4	90,5	97,6	93,7	95,6	92,7

Пример 97. Модифицированные олигонуклеотиды, направленные на TTR, содержащие группу конъюгата GalNAc₃.

Олигонуклеотиды, представленные в табл. 108, содержащие конъюгат GalNAc, предназначены для воздействия на TTR.

Таблица 108

Модифицированные олигонуклеотиды, направленные на TTR

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID No
666941	GalNAc3-3a-o'-Ado T _{es} mC _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} mC _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} mC _{es} mC _{es} mC _e	GalNAc3-3	Ad	846
666942	T _{es} mC _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} mC _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} mC _{es} mC _{es} mC _{eo} Ado'-GalNAc3-3a	GalNAc3-1	Ad	843
682876	GalNAc3-3a-o'-T_{es} mC _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} mC _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} mC _{es} mC _{es} mC _e	GalNAc3-3	PO	842
682877	GalNAc3-7a-o'-T_{es} mC _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} mC _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} mC _{es} mC _{es} mC _e	GalNAc3-7	PO	842
682878	GalNAc3-10a-o'-T_{es} mC _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} mC _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} mC _{es} mC _{es} mC _e	GalNAc3-10	PO	842
682879	GalNAc3-13a-o'-T_{es} mC _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} mC _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} mC _{es} mC _{es} mC _e	GalNAc3-13	PO	842
682880	GalNAc3-7a-o'-Ado T _{es} mC _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} mC _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} mC _{es} mC _{es} mC _e	GalNAc3-7	Ad	846
682881	GalNAc3-10a-o'-Ado T _{es} mC _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} mC _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} mC _{es} mC _{es} mC _e	GalNAc3-10	Ad	846
682882	GalNAc3-13a-o'-Ado T _{es} mC _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} mC _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} mC _{es} mC _{es} mC _e	GalNAc3-13	Ad	846
684056	T _{es} mC _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} mC _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} mC _{es} mC _{es} mC _{eo} Ado'-GalNAc3-19a	GalNAc3-19	Ad	846

Легенда для табл. 108 представлена в примере 74. Структура GalNAc3-1 показана в примере 9. Структура GalNAc3-3a показана в примере 39. Структура GalNAc3-7a показана в примере 48. Структура GalNAc3-10a показана в примере 46. Структура GalNAc3-13a показана в примере 62. Структура GalNAc3-19a показана в примере 70.

Пример 98. Оценка провоспалительного действия олигонуклеотидов, содержащих конъюгат GalNAc, в анализе hPMBC.

Олигонуклеотиды, перечисленные в табл. 109, исследовали на провоспалительное действие в анализе hPMBC, описанном в примерах 23 и 24. (См. табл. 30, 83, 95 и 108, где представлено описание олигонуклеотидов). ISIS 353512 обладает высоким ответом, и его использовали в качестве положительного контроля, а другие олигонуклеотиды описаны в табл. 83, 95 и 108. Результаты, представленные в табл. 109, получены с использованием крови, полученной от одного донора-добровольца. Результаты демонстрируют, что олигонуклеотиды, содержащие смешанные PO/PS межнуклеозидные линкеры, вызывают значительно более слабые провоспалительные реакции, по сравнению с теми же олигонуклеотидами, содержащими только PS линкеры. Кроме того, в этом анализе группа конъюгата GalNAc не оказывает существенного влияния.

Таблица 109

ISIS №	E _{max} /EC ₅₀	Кластер GalNAc ₃	Связи	CM
353512	3630	н.д.	PS	н.д.
420915	802	н.д.	PS	н.д.
682881	1311	GalNAc3-10	PS	Ad
682888	0,26	GalNAc3-10	PO/PS	Ad
684057	1,03	GalNAc3-19	PO/PS	Ad

Пример 99. Связывающие аффинности олигонуклеотидов, содержащих конъюгат GalNAc, в отношении асиалогликопротеинового рецептора.

Связывающие аффинности олигонуклеотидов, перечисленных в табл. 110 (см. табл. 76, в которой представлено описание олигонуклеотидов), в отношении асиалогликопротеинового рецептора испытывали в анализе конкурентного связывания рецепторов. Конкурирующий лиганд, α 1-кислый гликопротеин (AGP), инкубировали в 50 мМ ацетатно-натриевом буфере (pH 5) с 1 ед. нейраминидазы-агарозы в течение 16 ч при 37°C, а > 90% дезаилирование подтвердили анализом с сиаловой кислотой или эксклюзионной хроматографией (SEC). Для йодирования АГФ использовали монохлорид йода по способу, описанному авторами Atsma et al. (см. J Lipid Res. январь 1991 г.; 32(1): 173-81.) В этом способе дезаилированный α 1-кислый гликопротеин (de-AGP) добавляли к 10 мМ хлориду йода, Na^{125}I и 1 М глицина в 0,25 М NaOH. После инкубации в течение 10 мин при комнатной температуре, ^{125}I -меченный de-AGP отделили от свободного ^{125}I двукратным концентрированием смеси с использованием спин-колонки с номинальным отсечением по молекулярной массе 3 кДа. Белок испытывали на эффективность мечения и чистоту на системе ВЭЖХ, оснащенной колонкой Agilent SEC-3 (7,8×300 мм) и счетчиком β -RAM. Конкурентные исследования с использованием ^{125}I -меченного de-AGP и ASO, содержащих различные GalNAc-кластеры, выполняли следующим образом. Человеческие клетки HepG2 (10^6 клеток/мл) поместили на 6-луночные планшеты в 2 мл соответствующей питательной среды. Использовали среду MEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 2 мМ L-глутамин и 10 мМ HEPES. Клетки выращивали в течение 16-20 часов при 37°C с 5% и 10% CO_2 , соответственно. Перед экспериментом клетки промыли средой без FBS. Клетки выращивали в течение 30 мин при 37°C с 1 мл конкурентной смеси, содержащей соответствующую питательную среду с 2% FBS, 10^{-8} М ^{125}I -меченным de-AGP и ASO, содержащим GalNAc-кластер в концентрациях в диапазоне от 10^{-11} до 10^{-5} М. Неспецифическое связывание определили в присутствии 10^{-2} М GalNAc сахара. Клетки дважды промыли средой без FBS для удаления несвязанного ^{125}I -меченного de-AGP и конкурирующего GalNAc ASO. Клетки лизировали с использованием буфера RLT производства компании Qiagen, содержащего 1% β -меркаптоэтанола. Лизаты перенесли в круглодонные аналитические пробирки после быстрого 10-минутного цикла замораживания/оттаивания, и анализировали на γ -счетчике. Неспецифическое связывание вычли, а затем разделили импульсы белка ^{125}I на значение импульсов при самой низкой концентрации GalNAc-ASO. Кривые ингибирования построили по уравнению моносайтового конкурентного связывания, используя алгоритм нелинейной регрессии для расчета связывающей аффинности (K_D).

Результаты в табл. 110 были получены в экспериментах, выполненных в пять разных дней. Результаты для олигонуклеотидов, отмеченных верхним индексом "a", представляют собой средние значения экспериментов, выполненных в два разных дня. Результаты демонстрируют, что олигонуклеотиды, содержащие группу конъюгата GalNAc у 5'-конца, связывают асиалогликопротеиновый рецептор человеческих клеток HepG2 с аффинностью, которая в 1,5-16 раз больше, чем для олигонуклеотидов, содержащих группу конъюгата GalNAc у 3'-конца.

Таблица 110

Результаты анализа связывания асиалогликопротеинового рецептора

ISIS №	Конъюгат GalNAc	Конец олигонуклеотида, к которому присоединен конъюгат GalNAc	K_D (нМ)
661161 ^a	GalNAc ₃ -3	5'	3,7
666881 ^a	GalNAc ₃ -10	5'	7,6
666981	GalNAc ₃ -7	5'	6,0
670061	GalNAc ₃ -13	5'	7,4
655861 ^a	GalNAc ₃ -1	3'	11,6
677841 ^a	GalNAc ₃ -19	3'	60,8

Пример 100. Антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, содержащих группу конъюгата GalNAc, направленных на Apo(a), *in vivo*.

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже в табл. 111а, испытывали в исследовании однократной дозы на продолжительность действия у мышей.

Таблица 111a

Модифицированные ASO, направленные на APO(a)

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO
681251	GalNAc₃-7_a-o'T_{es}G_{es}^mC_{es}T_{es}^mC_{es}^mC_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds} T_{ds}G_{ds}^mC_{ds}T_{ds}T_{es}G_{es}T_{es}T_{es}^mC_e	GalNAc ₃ -7a	PO	847
681257	GalNAc₃-7_a-o'T_{es}G_{eo}^mC_{eo}T_{eo}^mC_{eo}^mC_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds} T_{ds}G_{ds}^mC_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}T_{es}^mC_e	GalNAc ₃ -7a	PO	847

Структура GalNAc₃-7_a показана ранее в примере 48.

Лечение.

Каждой самке трансгенных мышей, экспрессирующих человеческий Apo(a), один раз в неделю, в целом 6 доз, вводили подкожную инъекцию олигонуклеотида и дозы, перечисленной в табл. 111b, или PBS. Каждая экспериментальная группа состояла из 3 животных. Образцы крови брали за день до введения дозы для определения исходных уровней белка Apo(a) в плазме, а также через 72 ч, 1 неделю и 2 недели после введения первой дозы. Дополнительные пробы крови брали через 3 недели, 4 недели, 5 недель и 6 недель после введения первой дозы. Уровни белка Apo(a) в плазме измеряли при помощи твердофазного иммуноферментного анализа. Результаты в табл. 111b представлены как средний процент от уровней белка Apo(a) в плазме для каждой экспериментальной группы, нормализованных к исходным уровням (% BL). Результаты показывают, что олигонуклеотиды, содержащие группу конъюгата GalNAc, демонстрируют эффективное снижение экспрессии Apo(a). Этот мощный эффект наблюдали для олигонуклеотида, содержащего только PS межнуклеозидные линкеры, и для олигонуклеотида, содержащего смешанные PO и PS линкеры.

Таблица 111b

Уровни белка Apo(a) в плазме

ISIS №	Доза (мг/кг)	Apo(a) через 72 часа (% BL)	Apo(a) через 1 неделю (% BL)	Apo(a) через 3 недели (% BL)
PBS	н.д.	116	104	107
681251	0,3	97	108	93
	1,0	85	77	57
	3,0	54	49	11
	10,0	23	15	4
681257	0,3	114	138	104
	1,0	91	98	54
	3,0	69	40	6
	10,0	30	21	4

Пример 101. Антисмысловое ингибирование олигонуклеотидами, содержащими кластер GalNAc, связанный через стабильный фрагмент.

Олигонуклеотиды, перечисленные в табл. 112, испытали на ингибирование экспрессии мышиногo APOC-III in vivo. Мышам C57B1/6 ввели однократную подкожную инъекцию олигонуклеотида, перечисленного в табл. 112, или PBS. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Каждой мыши, обработанной ISIS 440670, вводили дозу 2, 6, 20 или 60 мг/кг. Каждой мыши, обработанной 680772 или 696847, вводили 0,6, 2, 6 или 20 мг/кг. Группа конъюгата GalNAc в ISIS 696847 связана через стабильный фрагмент, тиофосфатную связь, вместо легко расщепляемой фосфодиэфир-содержащей связи. Животных усыпили через 72 ч после введения дозы. Уровни мРНК APOC-III в печени измерили при помощи ПЦР в реальном времени. Уровни мРНК APOC-III нормализовали к уровням мРНК циклофилина по стандартным протоколам. Результаты представлены в табл. 112 как средний процент уровней мРНК APOC-III для каждой экспериментальной группы, по сравнению с контрольной группой, обработанной солевым раствором. Результаты демонстрируют, что олигонуклеотиды, содержащие группу конъюгата GalNAc, были существенно более эффективными, чем олигонуклеотид, не содержащий группу конъюгата. Кроме того, олигонуклеотид, содержащий группу конъюгата GalNAc, связанную с олигонуклеотидом через расщепляемый фрагмент (ISIS 680772), был еще более эффективным, чем олигонуклеотид, содержащий группу конъюгата GalNAc, связанную с олигонуклеотидом через стабильный фрагмент (ISIS 696847).

Таблица 112

Модифицированные олигонуклеотиды, направленные на мышинный АРОС-III

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	СМ	Доза (мг/кг)	мПНК АРОС-III (% PBS)	SEQ ID NO
	^m CesAesGes ^m CesTdsTdsA _{ds} TdsTdsA _{ds}	н.д.	2	92	849
440670	G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m CesAesGes ^m CesAe		6	86	
			20	59	
			60	37	
680772	GalNAc3-7a-_o ^m CesAesGes ^m CesTdsTdsA _{ds} TdsTdsA _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m CesAesGes ^m CesAe	PO	0,6	79	849
			2	58	
			6	31	
			20	13	
696847	GalNAc3-7a-_s ^m CesAesGes ^m CesTdsTdsA _{ds} TdsTdsA _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m CesAesGes ^m CesAe	н.д. (PS)	0,6	83	849
			2	73	
			6	40	
			20	28	

Структура GalNAc3-7_a показана ранее в примере 48.

Пример 102. Распределение в печени антисмысловых олигонуклеотидов, содержащих конъюгат GalNAc.

Оценили распределение в печени ISIS 353382 (см. табл. 36), который не содержит конъюгата GalNAc, и ISIS 655861 (см. табл. 36), который содержит конъюгат GalNAc. Самцам мышей balb/c ввели однократную подкожную инъекцию ISIS 353382 или 655861 в дозе, перечисленной в табл. 113. Каждая экспериментальная группа состояла из 3 животных, за исключением группы с дозой 18 мг/кг для ISIS 655861, которая состояла из 2 животных. Животных усыпили через 48 ч после введения дозы для определения распределения олигонуклеотидов в печени. Для измерения количества молекул антисмыслового олигонуклеотида на клетку, метку трис-бипиридина рутения (II) (MSD TAG, Meso Scale Discovery) конъюгировали с олигонуклеотидным образцом, используемым для обнаружения антисмысловых олигонуклеотидов. Результаты, представленные в табл. 113, представляют собой средние концентрации олигонуклеотида для каждой экспериментальной группы в единицах измерения миллионов молекул олигонуклеотида на клетку. Результаты демонстрируют, что при равных дозах олигонуклеотид, содержащий конъюгат GalNAc, содержался в более высоких концентрациях в целом в печени и в гепатоцитах, чем олигонуклеотид, не содержащий конъюгата GalNAc. Кроме того, олигонуклеотид, содержащий конъюгат GalNAc, содержался в более низких концентрациях в непаренхиматозных клетках печени, чем олигонуклеотид, не содержащий конъюгата GalNAc. И тогда как концентрации ISIS 655861 в гепатоцитах и непаренхиматозных клетках печени были одинаковыми в расчете на одну клетку, содержание гепатоцитов в печени составляет приблизительно 80% по объему. Следовательно, основная часть олигонуклеотида ISIS 655861, содержащегося в печени, находилась в гепатоцитах, тогда как основная часть олигонуклеотида ISIS 353382, содержащегося в печени, находилась в непаренхиматозных клетках печени.

Таблица 113

ISIS №	Доза (мг/кг)	Концентрация в печени в целом (молекул*10 ⁶⁰ на клетку)	Концентрация в гепатоцитах (молекул*10 ⁶⁰ на клетку)	Концентрация в непаренхиматозных клетках печени (молекул*10 ⁶⁰ на клетку)
353382	3	9,7	1,2	37,2
	10	17,3	4,5	34,0
	20	23,6	6,6	65,6
	30	29,1	11,7	80,0
	60	73,4	14,8	98,0
	90	89,6	18,5	119,9
655861	0,5	2,6	2,9	3,2
	1	6,2	7,0	8,8
	3	19,1	25,1	28,5
	6	44,1	48,7	55,0
	18	76,6	82,3	77,1

Пример 103. Продолжительность действия in vivo олигонуклеотидов, направленных на АРОС-III, содержащих конъюгат GalNAc₃.

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже в табл. 114, испытаны в исследовании однократной дозы на продолжительность действия у мышей.

Таблица 114

Модифицированные ASO, направленные на АРОС-III

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO
304801	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	н.д.	н.д.	821
663084	GalNAc₃-3a- o'AdoA _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{eo} T _{eo} T _{es} A _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	A _d	837
679241	A _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{eo} T _{eo} T _{es} A _{es} T _{eo} Ado'-GalNAc₃-19a	GalNAc ₃ -19a	A _d	822

Структура GalNAc₃-3a показана в примере 39, а GalNAc₃-19a показана в примере 70.

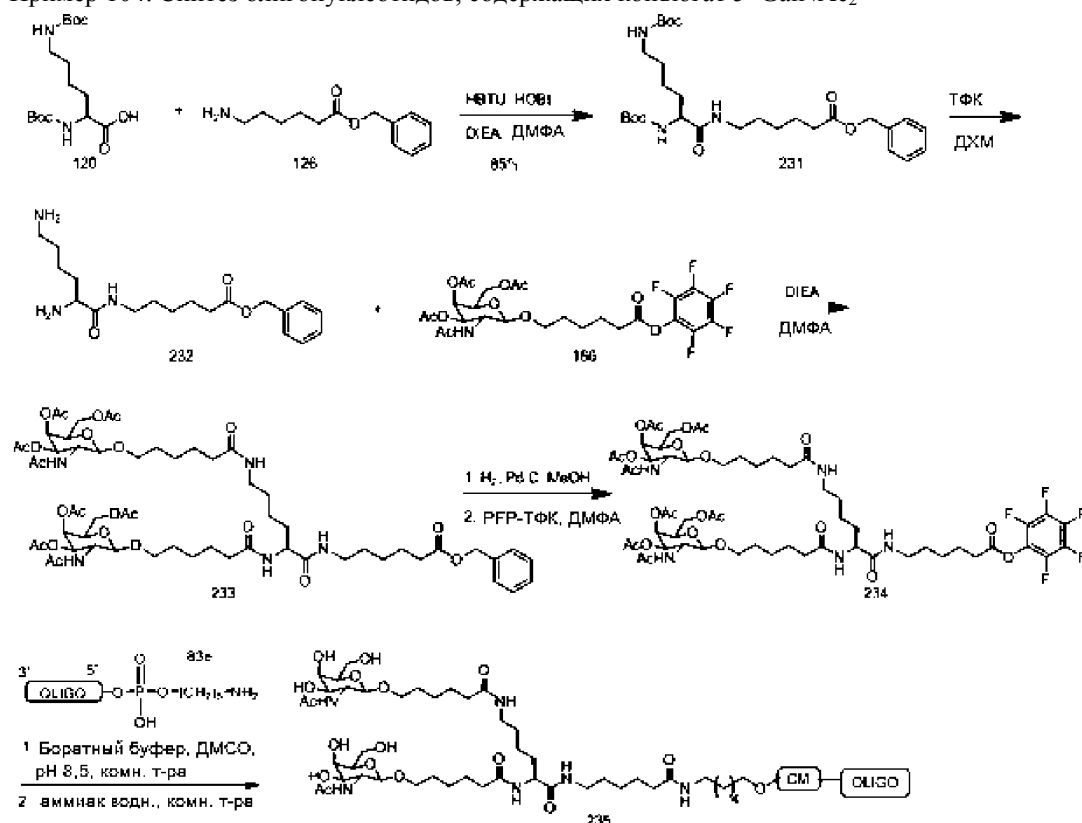
Лечение.

Самкам трансгенных мышей, экспрессирующим человеческий АРОС-III, ввели однократную подкожную инъекцию олигонуклеотида, перечисленного в табл. 114, или PBS. Каждая экспериментальная группа состояла из 3 животных. Образцы крови брали до введения дозы для определения исходных показателей и на 3, 7, 14, 21, 28, 35 и 42 день после введения дозы. Уровни триглицеридов и белка АРОС-III в плазме измеряли так, как описано в примере 20. Результаты в табл. 115 представлены как средний процент уровней триглицеридов и АРОС-III в плазме для каждой экспериментальной группы, нормализованных к исходным уровням. Сравнение результатов в табл. 71 примера 79 с результатами, представленными ниже в табл. 115, демонстрирует, что олигонуклеотиды, содержащие смесь фосфодиэфирных и тиофосфатных межнуклеозидных линкеров, обладают увеличенной продолжительностью действия, чем эквивалентные олигонуклеотиды, содержащие только тиофосфатные межнуклеозидные линкеры.

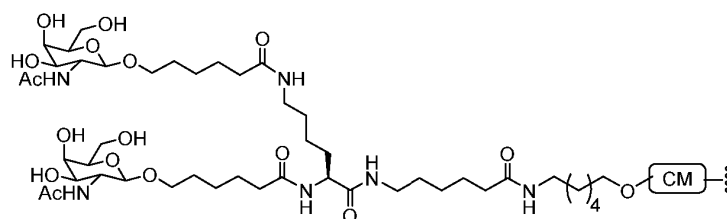
Таблица 115

Уровни триглицеридов и белка АРОС-III в плазме трансгенных мышей

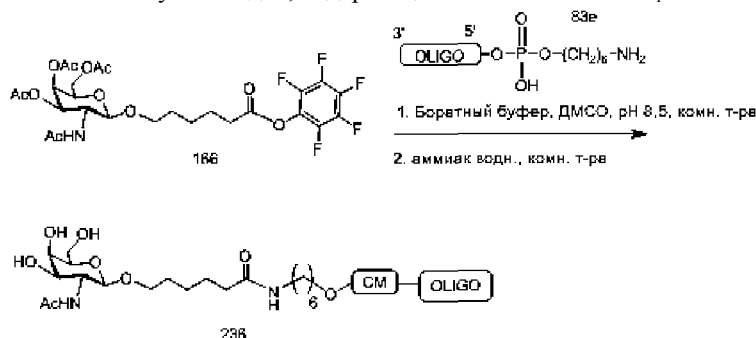
ISIS №	Доза (мг/кг)	Временные точки (дни после введения дозы)	Триглицериды (% от исходного значения)	Белок АРОС-III (% от исходного значения)	Кластер GalNAc ₃	СМ
PBS	н.д.	3	96	101	н.д.	н.д.
		7	88	98		
		14	91	103		
		21	69	92		
		28	83	81		
		35	65	86		
		42	72	88		
304801	30	3	42	46	н.д.	н.д.
		7	42	51		
		14	59	69		
		21	67	81		
		28	79	76		
		35	72	95		
		42	82	92		
663084	10	3	35	28	GalNAc ₃ - 3a	Ad
		7	23	24		
		14	23	26		
		21	23	29		
		28	30	22		
		35	32	36		
		42	37	47		
679241	10	3	38	30	GalNAc ₃ - 19a	Ad
		7	31	28		
		14	30	22		
		21	36	34		
		28	48	34		
		35	50	45		
		42	72	64		

Пример 104. Синтез олигонуклеотидов, содержащих конъюгат 5'-GalNAc₂

Соединение 120 имеется в продаже, а синтез соединения 126 описан в примере 49. Соединение 120 (1 г, 2,89 ммоль), HBTU (0,39 г, 2,89 ммоль) и HOBT (1,64 г, 4,33 ммоль) растворили в ДМФА (10 мл) и добавили N,N-диизопропилэтиламин (1,75 мл, 10,1 ммоль). Примерно через 5 мин в реакционную смесь добавили бензиловый эфир аминоксепановой кислоты (1,36 г, 3,46 ммоль). Через 3 ч реакционную смесь вылили в 100 мл 1 М раствора NaHSO₄ и экстрагировали 2 × 50 мл этилацетата. Органические слои объединили и промыли 3 × 40 мл насыщенного раствора NaHCO₃ и 2 × насыщенным соевым раствором, высушили при помощи Na₂SO₄, отфильтровали и концентрировали. Продукт очистили силикагелевой колоночной хроматографией (ДХМ:ЕА:гексаны, 1:1:1) с получением соединения 231. Данные ЖХМС и ЯМР согласовались с указанной структурой. Соединение 231 (1,34 г, 2,438 ммоль) растворили в дихлорметане (10 мл) и добавили трифторуксусную кислоту (10 мл). После перемешивания при комнатной температуре в течение 2 ч, реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и выпарили вместе с толуолом (3 × 10 мл). Остаток высушили при пониженном давлении с получением соединения 232 в виде трифторацетатной соли. Синтез соединения 166 описан в примере 54. Соединение 166 (3,39 г, 5,40 ммоль) растворили в ДМФА (3 мл). Раствор соединения 232 (1,3 г, 2,25 ммоль) растворили в ДМФА (3 мл) и добавили N,N-диизопропилэтиламин (1,55 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин, затем вылили в воду (80 мл), а водный слой экстрагировали EtOAc (2 × 100 мл). Органическую фазу отделили и промыли насыщенным водным раствором NaHCO₃ (3 × 80 mL), 1 М NaHSO₄ (3 × 80 мл) и насыщенным соевым раствором (2 × 80 мл), затем высушили (Na₂SO₄), отфильтровали и концентрировали. Остаток очистили силикагелевой колоночной хроматографией с получением соединения 233. Данные ЖХМС и ЯМР согласовались с указанной структурой. Соединение 233 (0,59 г, 0,48 ммоль) растворили в метаноле (2,2 мл) и этилацетате (2,2 мл). Добавили палладий на углеводе (10 мас.% Pd/C, влажный, 0,07 г) и перемешивали реакционную смесь в атмосфере водорода в течение 3 ч. Реакционную смесь отфильтровали через слой целита и концентрировали с получением карбоновой кислоты. Карбоновую кислоту (1,32 г, 1,15 ммоль, не содержащая кластера кислота) растворили в ДМФА (3,2 мл). К ней добавили N,N-диизопропилэтиламин (0,3 мл, 1,73 ммоль) и PFP-TFA (0,30 мл, 1,73 ммоль). Через 30 мин перемешивания при комнатной температуре реакционную смесь вылили в воду (40 мл) и экстрагировали EtOAc (2 × 50 мл). Выполнили стандартную процедуру выделения продукта, как описано выше, с получением соединения 234. Данные ЖХМС и ЯМР согласовались с указанной структурой. Олигонуклеотид 235 получили по общему способу, описанному в примере 46. Кластерная часть GalNAc₂ (GalNAc₂-24_a) группы конъюгата GalNAc₂-24 может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом с получением различных групп конъюгата. Структура GalNAc₂-24 (GalNAc₂-24_a-CM) представлена ниже:

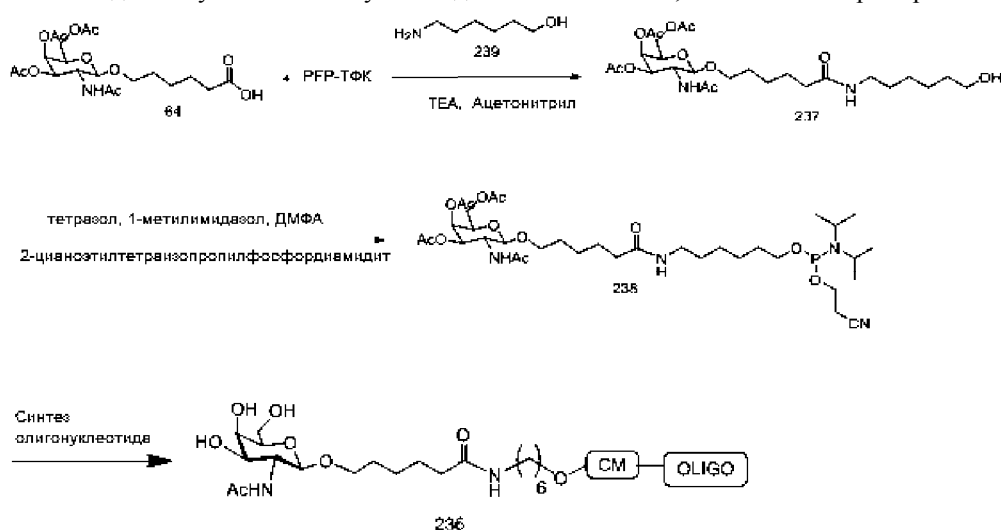


Пример 105. Синтез олигонуклеотидов, содержащих конъюгат GalNAc₁-25

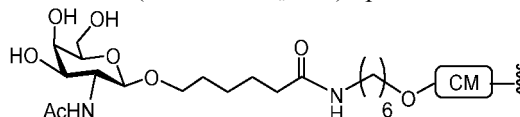


Синтез соединения 166 описан в примере 54. Олигонуклеотид 236 получили по общему способу, описанному в примере 46.

Альтернативно, олигонуклеотид 236 синтезировали по схеме, изображенной ниже, а соединение 238 использовали для получения олигонуклеотида 236 по способам, описанным в примере 10.



Кластерная часть GalNAc₁ (GalNAc₁-25_a) группы конъюгата GalNAc₁-25 может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом, присутствующим в олигонуклеотиде, с получением различных групп конъюгата. Структура GalNAc₁-25 (GalNAc₁-25_a-CM) представлена ниже:



Пример 106. Антисмысловое ингибирование in vivo олигонуклеотидами, направленными на SRB-1, содержащими конъюгат 5'-GalNAc₂ или 5'-GalNAc₃.

Олигонуклеотиды, перечисленные в табл. 116 и 117, испытали в дозозависимых исследованиях антисмыслового ингибирования SRB-1 у мышей.

Лечение.

Шестинедельным самцам мышей C57BL/6 (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) ввели однократную подкожную инъекцию 2, 7 или 20 мг/кг ISIS № 440762; или 0,2, 0,6, 2, 6 или 20 мг/кг ISIS № 686221, 686222 или 708561; или солевого раствора. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей усыпили через 72 ч после последнего введения. Уровни мРНК SRB-1 в печени измерили при помощи ПЦР в реальном времени. Уровни мРНК SRB-1 нормализовали к уровням мРНК циклофилина по стандартным протоколам. Антисмысловые олигонуклеотиды, снижающие уровни мРНК SRB-1 дозозависимым образом, а также результаты ED₅₀ представлены в табл. 116 и 117. Хотя в предыдущих исследованиях показано, что трехвалентные GalNAc-сопряженные олигонуклеотиды существенно более эффективны, чем двухвалентные GalNAc-сопряженные олигонуклеотиды, которые в свою очередь суще-

ственно более эффективны, чем одновалентные GalNAc-сопряженные олигонуклеотиды (см., например, Khorev et al., Bioorg. & Med. Chem., т. 16, 5216-5231 (2008)), обработка антисмысловыми олигонуклеотидами, содержащими одновалентные, двухвалентные и трехвалентные кластеры GalNAc, приводит к снижению уровней мРНК SRB-1 с одинаковой эффективностью, как показано в табл. 116 и 117.

Таблица 116

Модифицированные олигонуклеотиды, направленные на SRB-1

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc	ED ₅₀ (мг/кг)	SEQ ID No
44076 2	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	н.д.	4,7	823
68622 1	GalNAc₂-24a- o'-A _{do} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	GalNAc ₂ -24a	0,39	827
68622 2	GalNAc₃-13a- o'-A _{do} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -13a	0,41	827

Легенда к таблице представлена в примере 93. Структура GalNAc₃-13a показана в примере 62, а структура GalNAc₂-24 показана в примере 104.

Таблица 117

Модифицированные олигонуклеотиды, направленные на SRB-1

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc	ED ₅₀ (мг/кг)	SEQ ID No
44076 2	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	н.д.	5	823
70856 1	GalNAc₁-25a-o' T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	GalNAc ₁ -25a	0,4	823

Легенда к таблице представлена в примере 93. Структура GalNAc₁-25a показана в примере 105.

Оценили также концентрации олигонуклеотидов, представленных в табл. 116 и 117, в печени, используя способы, описанные в примере 75. Результаты, показанные ниже в табл. 117a и 117b, представляют собой средние значения общего содержания антисмысловых олигонуклеотидов в тканях для каждой экспериментальной группы, измеренные по УФ, в единицах измерения мкг олигонуклеотида на грамм ткани печени. Результаты демонстрируют, что олигонуклеотиды, содержащие группу конъюгата GalNAc, накапливаются в печени в существенно более высоких количествах, чем при той же дозе олигонуклеотида, не содержащего группу конъюгата GalNAc. Кроме того, антисмысловые олигонуклеотиды, содержащие один, два или три лиганда GalNAc в своих соответствующих группах конъюгата, накапливаются в печени в равных количествах. Этот результат является неожиданным с учетом данных, представленных выше в литературном источнике Khorev et al., и он согласуется с данными активности, представленными выше в табл. 116 и 117.

Таблица 117a

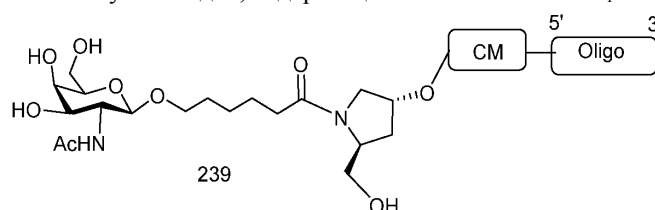
Концентрации в печени олигонуклеотидов, содержащих группу конъюгата GalNAc₂ или GalNAc₃

ISIS №	Доза (мг/кг)	[Антисмысловый олигонуклеотид] (мкг/г)	Кластер GalNAc	СМ
440762	2	2,1	н.д.	н.д.
	7	13,1		
	20	31,1		
686221	0,2	0,9	GalNAc ₂ -24a	A _d
	0,6	2,7		
	2	12,0		
	6	26,5		
686222	0,2	0,5	GalNAc ₃ -13a	A _d
	0,6	1,6		
	2	11,6		
	6	19,8		

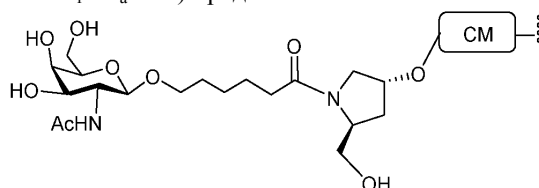
Таблица 117b

Концентрации в печени олигонуклеотидов, содержащих группу конъюгата GalNAc₁

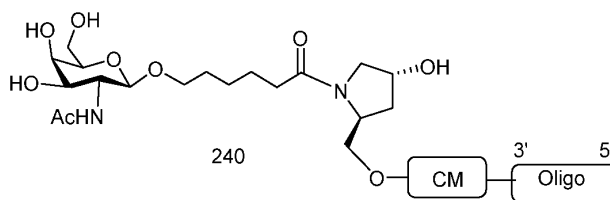
ISIS №	Доза (мг/кг)	[Антисмысловый олигонуклеотид] (мкг/г)	Кластер GalNAc	СМ
440762	2	2,3	н.д.	н.д.
	7	8,9		
	20	23,7		
708561	0,2	0,4	GalNAc ₁ -25 _a	PO
	0,6	1,1		
	2	5,9		
	6	23,7		
	20	53,9		

Пример 107. Синтез олигонуклеотидов, содержащих конъюгат GalNAc₁-26 или GalNAc₁-27

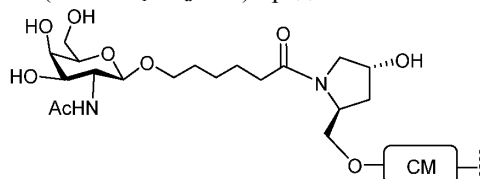
Олигонуклеотид 239 синтезировали связыванием соединения 47 (см. пример 15) с кислотой 64 (см. пример 32), используя HBTU и DIEA в ДМФА. Полученное амид-содержащее соединение фосфитилировали, затем присоединили к 5'-концу олигонуклеотида по способам, описанным в примере 10. Кластерная часть GalNAc₁ (GalNAc₁-26_a) группы конъюгата GalNAc₁-26 может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом, содержащимся в олигонуклеотиде, с получением различных групп конъюгата. Структура GalNAc₁-26 (GalNAc₁-26_a-CM) представлена ниже:



Для присоединения группы конъюгата GalNAc₁ к 3'-концу олигонуклеотида амид, образованный по реакции соединений 47 и 64, присоединили к твердой подложке по способам, описанным в примере 7. Затем выполнили синтез олигонуклеотида по способам, описанным в примере 9, с получением олигонуклеотида 240.



Кластерная часть GalNAc₁ (GalNAc₁-27_a) группы конъюгата GalNAc₁-27 может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом, содержащимся в олигонуклеотиде, с получением различных групп конъюгата. Структура GalNAc₁-27 (GalNAc₁-27_a-CM) представлена ниже:



Пример 108. Антисмысловое ингибирование in vivo под действием олигонуклеотидов, содержащих группу конъюгата GalNAc, направленных на Apo(a), in vivo.

Олигонуклеотиды, перечисленные ниже в табл. 118, испытали в исследовании однократной дозы на мышах.

Таблица 118

Модифицированные ASO, направленные на APO(a)

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO
494372	T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} ^m C _e	н.д.	н.д.	847
681251	GalNAc₃-7a -o'-T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	847
681255	GalNAc₃-3a -o'-T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -3a	PO	847
681256	GalNAc₃-10a -o'-T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -10a	PO	847
681257	GalNAc₃-7a -o'-T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	847
681258	GalNAc₃-13a -o'-T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -13a	PO	847
681260	T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e Ado'-GalNAc₃-19	GalNAc ₃ -19a	Ad	854

Структура GalNAc₃-7_a показана ранее в примере 48.

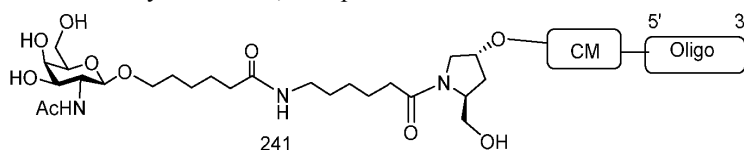
Лечение.

Самцам трансгенных мышей, экспрессирующим человеческий Apo(a), ввели однократную подкожную инъекцию олигонуклеотида и дозы, перечисленных в табл. 119, или PBS. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Образцы крови брали за день до введения дозы для определения исходных уровней белка Apo(a) в плазме, а также через 1 неделю после введения первой дозы. Образцы крови брали дополнительно еженедельно в течение около 8 недель. Уровни белка Apo(a) в плазме измеряли при помощи твердофазного иммуноферментного анализа. Результаты в табл. 119 представлены как средний процент от уровней белка Apo(a) в плазме для каждой экспериментальной группы, нормализованных к исходным уровням (% BL). Результаты показывают, что антисмысловые олигонуклеотиды снижают экспрессию белка Apo(a). Кроме того, олигонуклеотиды, содержащие группу конъюгата GalNAc, демонстрируют еще более эффективное снижение экспрессии Apo(a), чем олигонуклеотид не содержащий группу конъюгата.

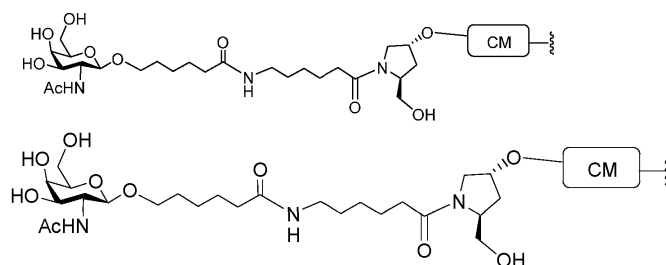
Таблица 119

Уровни белка Apo(a) в плазме

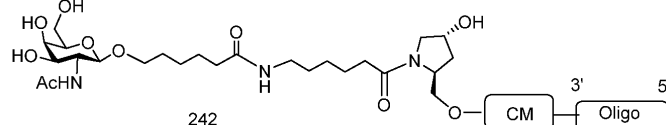
ISIS №	Доза (мг/кг)	Apo(a) через 1 неделю (% BL)
PBS	н.д.	143
494372	50	58
681251	10	15
681255	10	14
681256	10	17
681257	10	24
681258	10	22
681260	10	26

Пример 109. Синтез олигонуклеотидов, содержащих конъюгат GalNAc₁-28 или GalNAc₁-29

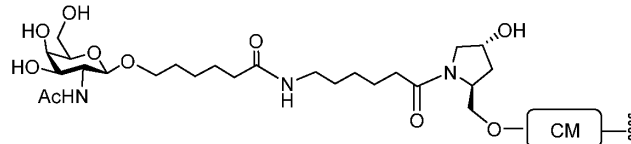
Олигонуклеотид 241 синтезировали по таким же способам, как описаны в примере 71, с получением фосфорамидитного промежуточного соединения, после чего выполнили приемы, описанные в примере 10, для синтеза олигонуклеотида. Кластерная часть GalNAc₁ (GalNAc₁-28_a) группы конъюгата GalNAc₁-28 может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом, содержащимся в олигонуклеотиде, с получением различных групп конъюгата. Структура GalNAc₁-28 (GalNAc₁-28_a-CM) представлена ниже:



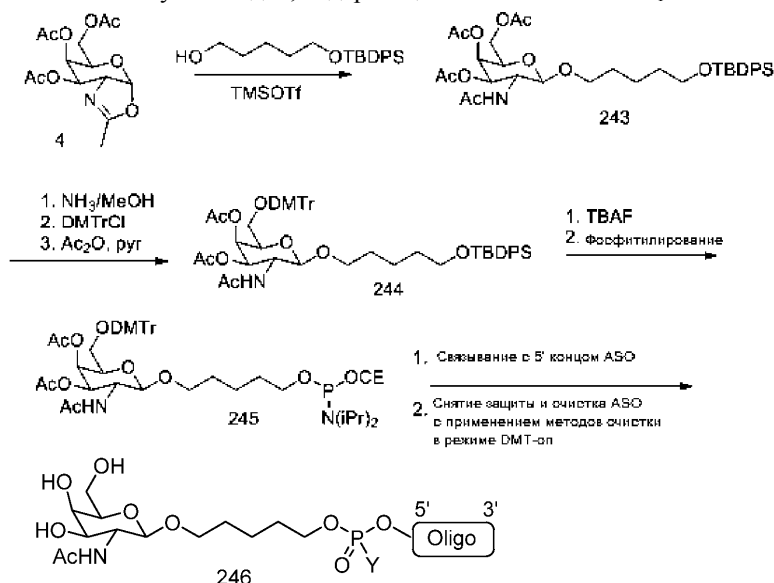
Для присоединения группы конъюгата GalNAc₁ к 3'-концу олигонуклеотида использовали такие же способы, как описаны в примере 71, с получение гидроксильного промежуточного соединения, которое затем присоединили к твердой подложке по способам, описанным в примере 7. Затем выполнили синтез олигонуклеотида по способам, описанным в примере 9, с получением олигонуклеотида 242.



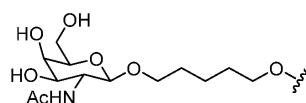
Кластерная часть GalNAc₁ (GalNAc_{1-29a}) группы конъюгата GalNAc₁₋₂₉ может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом, содержащимся в олигонуклеотиде, с получением различных групп конъюгата. Структура GalNAc₁₋₂₉ (GalNAc_{1-29a}-CM) представлена ниже:



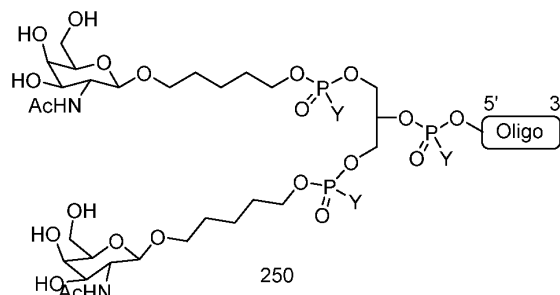
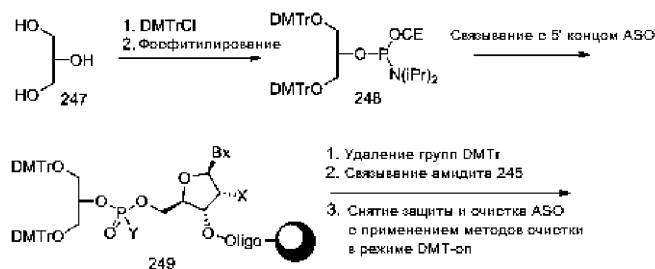
Пример 110. Синтез олигонуклеотидов, содержащих конъюгат GalNAc₁₋₃₀



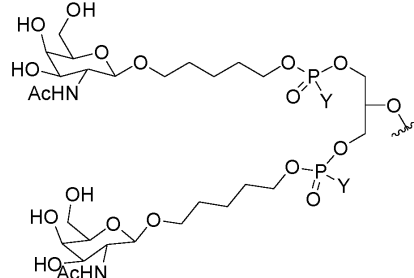
Олигонуклеотид 246, содержащий группу конъюгата GalNAc₁₋₃₀, где Y выбран из O, S, замещенного или незамещенного C₁-C₁₀-алкила, amino, замещенного amino, азидо, алкенила или алкинила, синтезировали так, как показано выше. Кластерная часть GalNAc₁ (GalNAc_{1-30a}) группы конъюгата GalNAc₁₋₃₀ может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом, содержащимся в олигонуклеотиде, с получением различных групп конъюгата. В некоторых вариантах реализации Y представляет собой часть расщепляемого фрагмента. В некоторых вариантах реализации Y представляет собой часть стабильного фрагмента, а расщепляемый фрагмент находится в олигонуклеотиде. Структура GalNAc_{1-30a} представлена ниже:



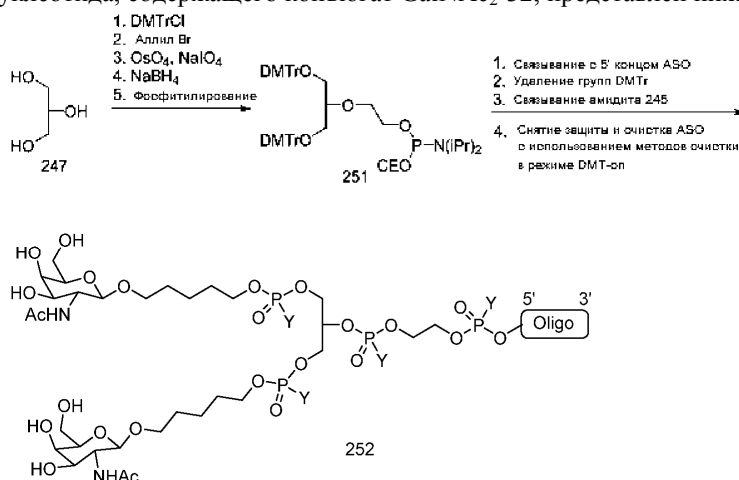
Пример 111. Синтез олигонуклеотидов, содержащих конъюгат GalNAc₂₋₃₁ или GalNAc₂₋₃₂



Олигонуклеотид 250, содержащий группу конъюгата GalNAc₂-31, где Y выбран из O, S, замещенного или незамещенного C₁-C₁₀-алкила, amino, замещенного amino, азида, алкенила или алкинила, синтезировали так, как показано выше. Кластерная часть GalNAc₂ (GalNAc₂-31_a) группы конъюгата GalNAc₂-31 может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом, содержащимся в олигонуклеотиде, с получением различных групп конъюгата. В некоторых вариантах реализации Y-содержащая группа, которая находится непосредственно возле 5'-конца олигонуклеотида, представляет собой часть расщепляемого фрагмента. В некоторых вариантах реализации Y-содержащая группа, которая находится непосредственно возле 5'-конца олигонуклеотида, представляет собой часть стабильного фрагмента, а расщепляемый фрагмент находится в олигонуклеотиде. Структура GalNAc₂-31_a представлена ниже:

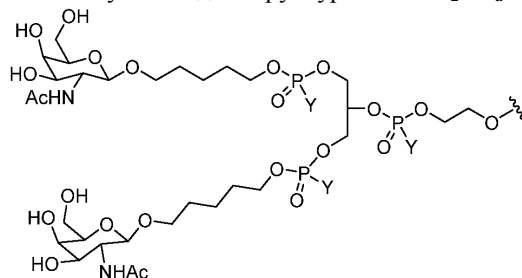


Синтез олигонуклеотида, содержащего конъюгат GalNAc₂-32, представлен ниже.



Олигонуклеотид 252, содержащий группу конъюгата GalNAc₂-32, где Y выбран из O, S, замещенного или незамещенного C₁-C₁₀-алкила, amino, замещенного amino, азида, алкенила или алкинила, синтезировали так, как показано выше. Кластерная часть GalNAc₂ (GalNAc₂-32_a) группы конъюгата GalNAc₂-32 может быть комбинирована с любым расщепляемым фрагментом, содержащимся в олигонуклеотиде, с получением различных групп конъюгата. В некоторых вариантах реализации Y-содержащая группа, которая находится непосредственно возле 5'-конца олигонуклеотида, представляет собой часть расщеп-

ляемого фрагмента. В некоторых вариантах реализации Y-содержащая группа, которая находится непосредственно возле 5'-конца олигонуклеотида, представляет собой часть стабильного фрагмента, а расщепляемый фрагмент находится в олигонуклеотиде. Структура GalNAc₂-32_a представлена ниже:



Пример 112: Модифицированные олигонуклеотиды, содержащие конъюгат GalNAc₁

Олигонуклеотиды в табл. 120, направленные на SRB-1, были синтезированы с группой конъюгата GalNAc₁ для дополнительной проверки эффективности олигонуклеотидов, содержащих группы конъюгата, которые содержат один лиганд GalNAc.

Таблица 120

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc	CM	SEQ ID NO
711461	GalNAc₁-25_a-o'-Ado G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₁ -25 _a	Ad	831
711462	GalNAc₁-25_a-o'-G_{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₁ -25 _a	PO	829
711463	GalNAc₁-25_a-o'-G_{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₁ -25 _a	PO	829
711465	GalNAc₁-26_a-o'-Ado G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₁ -26 _a	Ad	831
711466	GalNAc₁-26_a-o'-G_{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₁ -26 _a	PO	829
711467	GalNAc₁-26_a-o'-G_{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₁ -26 _a	PO	829
711468	GalNAc₁-28_a-o'-Ado G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₁ -28 _a	Ad	831
711469	GalNAc₁-28_a-o'-G_{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₁ -28 _a	PO	829
711470	GalNAc₁-28_a-o'-G_{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₁ -28 _a	PO	829
713844	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} • GalNAc₁-27_a	GalNAc ₁ -27 _a	PO	829

713845	G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} ·GalNAc1-27 _a	GalNAc1-27 _a	PO	829
713846	G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} ·Ado·GalNAc1-27 _a	GalNAc1-27 _a	Ad	830
713847	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} ·GalNAc1-29 _a	GalNAc1-29 _a	PO	829
713848	G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} ·GalNAc1-29 _a	GalNAc1-29 _a	PO	829
713849	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} ·Ado·GalNAc1-29 _a	GalNAc1-29 _a	Ad	830
713850	G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} ·Ado·GalNAc1-29 _a	GalNAc1-29 _a	Ad	830

Пример 113. Антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, направленных на CFB.

Олигонуклеотиды, перечисленные в табл. 121, испытывали в дозозависимом исследовании антисмыслового ингибирования человеческого фактора комплемента В (CFB) у мышей.

Таблица 121

Модифицированные ASO, направленные на CFB

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	SEQ ID NO
588540	A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} A _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{es} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _e	н.д.	н.д.	440
687301	GalNAc ₃ -3a·A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} A _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{es} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -3a	PO	440

Структура GalNAc₃-3_a показана ранее в примере 39.

Лечение.

Каждой трансгенной мыши, экспрессирующей человеческий CFB (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн), один раз в неделю в течение 3 недель (в целом 4 дозы) вводили подкожную инъекцию олигонуклеотида, перечисленного в табл. 122, или солевого раствора. Четырем экспериментальным группам, которым вводили ISIS № 588540, вводили 6, 12, 25 или 50 мг/кг на дозу. Четырем экспериментальным группам, которым вводили ISIS № 687301, вводили 0,25, 0,5, 2 или 6 мг/кг на дозу. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 животных. Мышей усыпили через 2 дня после последнего введения дозы для определения уровней человеческого CFB и мРНК циклофилина в печени и почках, используя ПЦР в реальном времени по стандартным протоколам. Уровни мРНК CFB нормализовали к уровням циклофилина, а средние значения для каждой экспериментальной группы использовали для определения дозы, которая обеспечивает достижение 50% ингибирования экспрессии транскрипта человеческого CFB (ED₅₀). Результаты представляют собой средние значения для четырех экспериментов, проведенных с двумя разными наборами праймерных зондов, и представлены в табл. 122.

Таблица 122

Эффективность олигонуклеотидов, направленных на человеческий CFB, *in vivo*

ISIS №	ED ₅₀ в печени (мг/кг)	ED ₅₀ в почках (мг/кг)	Кластер GalNAc ₃	CM
588540	7,9	11,7	н.д.	н.д.
687301	0,49	0,35	GalNAc ₃ -3a	PO

Уровни трансаминазы в печени, аланин-аминотрансферазы (ALT) и аспартат-аминотрансферазы (AST) в сыворотке измеряли относительно мышей, инъецированных солевым раствором, используя стандартные протоколы. Оценили также общий билирубин, азот мочевины крови (АМК) и массу тела. Результаты демонстрируют, что экспериментальные группы не демонстрируют существенных отличий от группы, обработанной солевым раствором (данные не показаны), что указывает на хорошую переносимость обоих олигонуклеотидов.

Пример 114. Антисмысловое ингибирование *in vivo* под действием олигонуклеотидов, направленных на CFB.

Олигонуклеотиды, перечисленные в табл. 123, испытывали в дозозависимом исследовании антисмы-

слового ингибирования человеческого CFB у мышей.

Лечение.

Каждой трансгенной мыши, экспрессирующей человеческий CFB (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн), ввели однократную подкожную инъекцию 0,6, 1, 6 или 18 мг/кг олигонуклеотида, перечисленного в табл. 123, или солевого раствора. Каждая экспериментальная группа состояла из 4 или 5 животных. Мышей усыпили через 72 ч после введения дозы для определения уровней человеческого CFB и мРНК циклофилина в печени, используя ПЦР в реальном времени по стандартным протоколам. Уровни мРНК CFB нормализовали к уровням циклофилина, а средние значения для каждой экспериментальной группы использовали для определения дозы, которая обеспечивает достижение 50% ингибирования экспрессии транскрипта человеческого CFB (ED₅₀). Результаты представлены в табл. 123.

Таблица 123

Модифицированные ASO, направленные на CFB

ISIS №	Последовательность (от 5' к 3')	Кластер GalNAc ₃	CM	ED ₅₀ в печени (мг/кг)	SEQ ID NO
69684 4	GalNAc₃-7a- o'A_{es}T_{es}^mC_{es}^mC_{es}^mC_{es}A_{ds}^mC_{ds}G_{ds} ^mC_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{es}^mC_{es}A_{es}G_{es} ^mC_e	GalNAc ₃ -7a	PO	0,86	440
69684 5	GalNAc₃-7a- o'A_{es}T_{eo}^mC_{eo}^mC_{eo}^mC_{eo}A_{ds}^mC_{ds}G_{ds} ^mC_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{eo}^mC_{eo}A_{es}G_{es} ^mC_e	GalNAc ₃ -7a	PO	0,71	440
69896 9	GalNAc₃-7a- o'A_{es}T_{eo}^mC_{eo}^mC_{eo}^mC_{es}A_{ds}^mC_{ds}G_{ds} ^mC_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds} ^mC_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{eo}^mC_{eo}A_{es}G_{es}^mC_e	GalNAc ₃ -7a	PO	0,51	440
69897 0	GalNAc₃-7a- o'A_{es}T_{es}^mC_{eo}^mC_{eo}^mC_{eo}A_{ds}^mC_{ds}G_{ds}^mC_{ds} ^mC_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{eo}^mC_{eo}A_{es}G_{es}^mC_e	GalNAc ₃ -7a	PO	0,55	440

Структура GalNAc₃-7a показана ранее в примере 48.

Пример 115. Антисмысловое ингибирование человеческого фактора комплемента В (CFB) в HepG2 клетках МОЕ гэмперами.

Были сконструированы антисмысловые олигонуклеотиды, направленные на нуклеиновую кислоту человеческого фактора комплемента В (CFB), и были протестированы на их воздействие in vitro на мРНК CFB. Антисмысловые олигонуклеотиды были протестированы в серии экспериментов, которые имели аналогичные условия культивирования. Результаты для каждого эксперимента представлены в отдельных таблицах, показанных ниже. Культивированные клетки HepG2 с плотностью 20000 клеток на лунку трансфицировали с использованием электропорации с 4500 нМ антисмыслового олигонуклеотида. После периода обработки в течение около 24 ч, РНК выделяли из клеток и уровни мРНК CFB измеряли методом количественной ПЦР в реальном времени. Набор человеческих праймерных зондов RTS3459 (прямая последовательность AGTCTCTGTGGCATGGTTTG, обозначенная в настоящем документе как SEQ ID NO: 810; обратная последовательность GGGCGAATGACTGAGATCTTG, обозначенная в настоящем документе как SEQ ID NO: 811; последовательность зонда TACCGATTACCACAAGCAACCATGGCA, обозначенная в настоящем документе как SEQ ID NO: 812) был использован для измерения уровней мРНК. Уровни мРНК CFB были скорректированы в соответствии с содержанием суммарной РНК, измеренным с помощью RIBOGREEN®. Результаты представлены как процентное ингибирование CFB относительно необработанных контрольных клеток.

Впервые сконструированные химерные антисмысловые олигонуклеотиды, указанные в представленных ниже таблицах, были сконструированы как 5-10-5 МОЕ гэмперами. Гэмперы 5-10-5 МОЕ имеют 20

нуклеозидов в длину, причем центральный гэп состоит из десяти 2'-дезоксинуклеозидов и окружен крыльями с 5' конца и в 3' конца, содержащими по пять нуклеозидов каждое. Каждый нуклеозид 5'-крыла и нуклеозид 3'-крыла имеет 2'-МОЕ модификации. Межнуклеозидные связи в каждом гэпере представляют собой тиофосфатные (P=S) связи. Все остатки цитозина в каждом гэпере представляют собой 5-метилцитозины. "Сайт инициации" обозначает самый крайний 5' нуклеозид, на который направлен гэпер в последовательности гена человека. "Сайт терминации" обозначает самый крайний 3' нуклеозид, на который направлен гэпер в последовательности гена человека. Каждый гэпер, перечисленный в представленных ниже таблицах, направлен на мРНК CFB человека, обозначенную в данном описании как SEQ ID NO: 1 (с номером доступа GENBANK NM_001710.5) или на геномную последовательность CFB человека, обозначенную в настоящем документе как SEQ ID NO: 2 (с номером доступа GENBANK NT_007592.15, усеченную с нуклеотида 31852000 по 31861000), или на обе последовательности, "н/д" означает, что антисмысловый олигонуклеотид не направлен на указанную конкретную последовательность гена с 100% комплементарностью.

Таблица 124

Ингибирование мРНК CFB 5-10-5 МОЕ гэперами, направленными на SEQ ID NO: 1 и 2

ISIS №	SEQ ID NO: 1 сайт инициации	SEQ ID NO: 1 сайт терминации	Область - мишень	Последовательность	% ингибирования	SEQ ID NO: 2 сайт инициации	SEQ ID NO: 2 сайт терминации	SEQ ID NO:
532608	20	39	Экзон 1	GCTGAGCTG CCAGTCAAG GA	36	1741	1760	6
532609	26	45	Экзон 1	GGCCCCGCT GAGCTGCCA GT	16	1747	1766	7
532610	45	64	Экзон 1	CGGAACATC CAAGCGGGA GG	11	1766	1785	8
532611	51	70	Экзон 1	CTTCCCGG AACATCCAA GC	26	1772	1791	9
532612	100	119	Экзон 1	ATCTGTGTT CTGGCACCT GC	25	1821	1840	10
532613	148	167	Экзон 1	GTCACATTC CCTTCCCCT GC	39	1869	1888	11
532614	154	173	Экзон 1	GACCTGGTC ACATTCCT TC	71	1875	1894	12
532615	160	179	Экзон 1	GACCTAGAC CTGGTCACA TT	35	1881	1900	13
532616	166	185	Экзон 1	ACTCCAGAC CTAGACCTG GT	39	1887	1906	14
532617	172	191	Экзон 1	GCTGAAACT CCAGACCTA GA	27	1893	1912	15
532618	178	197	Экзон 1	GTCCAAGCT	29	1899	1918	16

8				GAAACTCCA GA				
53261 9	184	203	Экзон 1	CTCAGTGTC CAAGCTGAA AC	21	1905	1924	17
53262 0	246	265	Экзон 1	AGGAGAGAA GCTGGGCCT GG	31	1967	1986	18
53262 1	252	271	Экзон 1	GAAGGCAGG AGAGAAGCT GG	25	1973	1992	19
53262 2	336	355	Сочле ние экзона 1-2	GTGGTGGTC ACACCTCCA GA	28	н.д.	н.д.	20
53262 3	381	400	Экзон 2	CCCTCCAGA GAGCAGGAT CC	22	2189	2208	21
53262 4	387	406	Экзон 2	TCTACCCCC TCCAGAGAG CA	37	2195	2214	22
53262 5	393	412	Экзон 2	TTGATCTCT ACCCCTCC AG	30	2201	2220	23
53262 6	417	436	Экзон 2	TGGAGAAGT CGGAAGGAG CC	35	2225	2244	24
53262 7	423	442	Экзон 2	CCCTCTTGG AGAAGTCGG AA	37	2231	2250	25
53262 8	429	448	Экзон 2	GCCTGGCCC TCTTGGAGA AG	0	2237	2256	26
53262 9	435	454	Экзон 2	TCCAGTGCC TGGCCCTCT TG	26	2243	2262	27
53263	458	477	Экзон 2	AGAAGCCAG	30	2266	2285	28

0				AAGGACACA CG				
53263 1	464	483	Экзон 2	ACGGGTAGA AGCCAGAAG GA	43	2272	2291	29
53263 2	480	499	Экзон 2	CGTGTCTGC ACAGGGTAC GG	57	2288	2307	30
53263 3	513	532	Экзон 2	AGGGTGCTC CAGGACCCC GT	27	2321	2340	31
53263 4	560	579	Сочле- нение экзона 2-3	TTGCTCTGC ACTCTGCCT TC	41	н.д.	н.д.	32
53263 5	600	619	Экзон 3	TATTCCTCG TTCTCGAAG TC	67	2808	2827	33
53263 6	626	645	Экзон 3	CATTGTAGT AGGGAGACC GG	24	2834	2853	34
53263 7	632	651	Экзон 3	CACTCACAT TGTAGTAGG GA	49	2840	2859	35
53263 8	638	657	Экзон 3	TCTCATCAC TCACATTGT AG	50	2846	2865	36
53263 9	644	663	Экзон 3	AAGAGATCT CATCACTCA CA	52	2852	2871	37
53264 0	650	669	Экзон 3	AGTGGAAG AGATCTCAT CA	34	2858	2877	38
53264 1	656	675	Экзон 3	CATAGCAGT GGAAAGAGA TC	32	2864	2883	39
53264	662	681	Экзон 3	AACCGTCAT	45	2870	2889	40

2				AGCAGTGGAA AA				
53264 3	668	687	Экзон 3	GAGTGTAAC CGTCATAGC AG	36	2876	2895	41
53264 4	674	693	Экзон 3	CCCGGAGAG TGTAACCGT CA	30	2882	2901	42
53264 5	680	699	Экзон 3	CAGAGCCCC GGAGAGTGT AA	27	2888	2907	43
53264 6	686	705	Экзон 3	GATTGGCAG AGCCCCGGA GA	20	2894	2913	44
53264 7	692	711	Экзон 3	AGGTGCGAT TGGCAGAGC CC	28	2900	2919	45
53264 8	698	717	Экзон 3	CTTGGCAGG TGCATTGG CA	24	2906	2925	46
53264 9	704	723	Экзон 3	CATTCACTT GGCAGGTGC GA	28	2912	2931	47
53265 0	729	748	Экзон 3	ATCGCTGTC TGCCCACTC CA	44	2937	2956	48
53265 1	735	754	Экзон 3	TCACAGATC GCTGTCTGC CC	44	2943	2962	49
53265 2	741	760	Экзон 3	CCGTTGTCA CAGATCGCT GT	27	2949	2968	50
53265 3	747	766	Сочле нение экзона 3-4	CCCGCTCCG TTGTCACAG AT	28	н.д.	н.д.	51
53265	753	772	Сочлен	CAGTACCCC	13	н.д.	н.д.	52

4			ение экзона 3-4	GCTCCGTTG TC				
53265 5	759	778	Сочлен ение экзона 3-4	TTGGAGCAG TACCCCGCT CC	8	н.д.	н.д.	53
53265 6	789	808	Экзон 4	ACCTTCCTT GTGCCAATG GG	40	3152	3171	54
53265 7	795	814	Экзон 4	CTGCCACC TTCCTGTGTC C	41	3158	3177	55
53265 8	818	837	Экзон 4	CGCTGTCTT CAAGGCGGT AC	33	3181	3200	56
53265 9	835	854	Экзон 4	GCTGCAGTG GTAGGTGAC GC	32	3198	3217	57
53266 0	841	860	Экзон 4	CCCCCGGCT GCAGTGGTA GG	17	3204	3223	58
53266 1	847	866	Экзон 4	GGTAAGCCC CCGGCTGCA GT	28	3210	3229	59
53266 2	853	872	Экзон 4	ACGCAGGGT AAGCCCCCG GC	13	3216	3235	60
53266 3	859	878	Экзон 4	GGAGCCACG CAGGGTAAG CC	33	3222	3241	61
53266 4	866	885	Экзон 4	GCCGCTGGG AGCCACGCA GG	10	3229	3248	62
53266 5	891	910	Экзон 4	CAAGAGCCA CCTTCCTGA CA	17	3254	3273	63

53266 6	897	916	Экзон 4	CCGCTCCAA GAGCCACCT TC	25	3260	3279	64
53266 7	903	922	Экзон 4	TCCGTCCCG CTCCAAGAG CC	29	3266	3285	65
53266 8	909	928	Экзон 4	GAAGGCTCC GTCCCGCTC CA	14	3272	3291	66
53266 9	915	934	Экзон 4	TGGCAGGAA GGCTCCGTC CC	18	3278	3297	67
53267 0	921	940	Сочле нение экзона 4-5	GAGTCTTGG CAGGAAGGC TC	20	н.д.	н.д.	68
53267 1	927	946	Сочле нение экзона 4-5	ATGAAGGAG TCTTGGCAG GA	14	н.д.	н.д.	69
53267 2	956	975	Экзон 5	CTTCGGCCA CCTCTTGAG GG	45	3539	3558	70
53267 3	962	981	Экзон 5	GGAAAGCTT CGGCCACCT CT	37	3545	3564	71
53267 4	968	987	Экзон 5	AAGACAGGA AAGCTTCGG CC	28	3551	3570	72
53267 5	974	993	Экзон 5	TCAGGGAAG ACAGGAAAG CT	16	3557	3576	73
53267 6	996	1015	Экзон 5	TCGACTCCT TCTATGGTC TC	31	3579	3598	74
53267 7	1033	1052	Сочле нение	CTTCTGTTGT TCCCCTGGG	36	н.д.	н.д.	75

			экзона 5-6	С				
53267 8	1068	1087	Экзон 6	TTCATGGAG CCTGAAGGG TC	19	3752	3771	76
53267 9	1074	1093	Экзон 6	TAGATGTTC ATGGAGCCT GA	24	3758	3777	77
53268 0	1080	1099	Экзон 6	ACCAGGTAG ATGTTCATG GA	13	3764	3783	78
53268 1	1086	1105	Экзон 6	TCTAGCACC AGGTAGATG TT	20	3770	3789	79
53268 2	1092	1111	Экзон 6	GATCCATCT AGCACCAGG TA	33	3776	3795	80
53268 3	1098	1117	Экзон 6	CTGTCTGAT CCATCTAGC AC	44	3782	3801	81
53268 4	1104	1123	Экзон 6	CCAATGCTG TCTGATCCA TC	29	3788	3807	82
53268 5	1129	1148	Экзон 6	TTTGGCTCCT GTGAAGTTG C	40	3813	3832	83

Таблица 125

Ингибирование мРНК CFB 5-10-5 МОЕ гепмерами, направленными на SEQ ID NO: 1 и 2

ISIS №	SEQ ID NO: 1 сайт иници ации	SEQ ID NO: 1 сайт терми нации	Область - мишень	Последователь ность	% ингиб ирова ния	SEQ ID NO: 2 сайт иници	SEQ ID NO: 2 сайт термина ции	SEQ ID NO:
-----------	---	--	------------------------	------------------------	----------------------------	-------------------------------------	---	---------------

						иаци и		
53268 6	1135	1154	Экзон 6	ACACTTTTGTG GCTCCTGTG A	91	3819	3838	84
53268 7	1141	1160	Экзон 6	GACTAGACA CTTTTGGCT C	77	3825	3844	85
53268 8	1147	1166	Экзон 6	TAAGTTGAC TAGACACTT TT	70	3831	3850	86
53268 9	1153	1172	Экзон 6	CTCAATTAA GTTGACTAG AC	61	3837	3856	87
53269 0	1159	1178	Сочле нение экзона 6-7	CACCTTCTCA ATTAAGTTG A	57	3843	3862	88
53269 1	1165	1184	Сочле нение экзона 6-7	ACTTGCCAC CTTCTCAATT A	56	н.д.	н.д.	89
53269 2	1171	1190	Сочле нение экзона 6-7	ACCATAACT TGCCACCTTC T	56	н.д.	н.д.	90
53269 3	1177	1196	Экзон 7	CTTCACACC ATAACTTGC CA	56	4153	4172	91
53269 4	1183	1202	Экзон 7	TCTTGGCTTC ACACCATAA C	55	4159	4178	92
53269 5	1208	1227	Экзон 7	ATGTGGCAT ATGTCAC TA GA	55	4184	4203	93
53269 6	1235	1254	Экзон 7	CAGACACTT TGACCCAAA	55	4211	4230	94

				ТТ				
53269 7	1298	1317	Сочлен ение экзона 7-8	GGTCTTCAT AATTGATTTC A	53	н.д.	н.д.	95
53269 8	1304	1323	Сочлен ение экзона 7-8	ACTTGTGGT CTTCATAATT G	53	н.д.	н.д.	96
53269 9	1310	1329	Сочлен ение экзона 7-8	ACTTCAACTT GTGGTCTTC A	52	н.д.	н.д.	97
53270 0	1316	1335	Экзон 8	TCCCTGACTT CAACTTGTG G	52	4609	4628	98
53270 1	1322	1341	Экзон 8	TGTTAGTCCC TGA CTTCAA C	52	4615	4634	99
53270 2	1328	1347	Экзон 8	TCTTGGTGTT AGTCCCTGA C	51	4621	4640	100
53270 3	1349	1368	Экзон 8	TGTACACTG CCTGGAGGG CC	51	4642	4661	101
53270 4	1355	1374	Экзон 8	TCATGCTGT ACACTGCCT GG	51	4648	4667	102
53270 5	1393	1412	Экзон 8	GTTCCAGCC TTCAGGAGG GA	50	4686	4705	103
53270 6	1399	1418	Экзон 8	GGTGCGGTT CCAGCCTTC AG	50	4692	4711	104
53270 7	1405	1424	Экзон 8	ATGGCGGGT GCGGTTCCA GC	50	4698	4717	105

53270 8	1411	1430	Экзон 8	GATGACATG GCGGGTGCG GT	49	4704	4723	106
53270 9	1417	1436	Экзон 8	GAGGATGAT GACATGGCG GG	49	4710	4729	107
53271 0	1443	1462	Сочле- ние экзона 8-9	CCCATGTTGT GCAATCCAT C	48	н.д.	н.д.	108
53271 1	1449	1468	Экзон 9	TCCCCGCC ATGTTGTGC AA	48	5023	5042	109
53271 2	1455	1474	Экзон 9	ATTGGGTCC CCGCCCATG TT	48	5029	5048	110
53271 3	1461	1480	Экзон 9	ACAGTAATT GGGTCCCCG CC	48	5035	5054	111
53271 4	1467	1486	Экзон 9	TCAATGACA GTAATTGGG TC	47	5041	5060	112
53271 5	1473	1492	Экзон 9	ATCTCATCA ATGACAGTA AT	47	5047	5066	113
53271 6	1479	1498	Экзон 9	TCCCGGATC TCATCAATG AC	46	5053	5072	114
53271 7	1533	1552	Сочле- ние экзона 9-10	ACATCCAGA TAATCCTCCC T	46	н.д.	н.д.	115
53271 8	1539	1558	Сочле- ние экзона 9-10	ACATAGACA TCCAGATAA TC	46	н.д.	н.д.	116
53271	1545	1564	Сочлен	CCAAACACA	46	н.д.	н.д.	117

9			ение экзона 9-10	TAGACATCC AG				
53272 0	1582	1601	Экзон 10	AGCATTGAT GTTCATTG GT	46	5231	5250	118
53272 1	1588	1607	Экзон 10	AGCCAAAGC ATTGATGTTC A	45	5237	5256	119
53272 2	1594	1613	Экзон 10	CTGGAAGC CAAAGCATT GA	45	5243	5262	120
53272 3	1600	1619	Экзон 10	GTCTTTCTTG GAAGCCAAA G	45	5249	5268	121
53272 4	1606	1625	Экзон 10	CTCATTGTCT TTCTTGGAA G	44	5255	5274	122
53272 5	1612	1631	Экзон 10	ATGTTGCTC ATTGTCTTTC T	44	5261	5280	123
53272 6	1618	1637	Экзон 10	GAACACATG TTGCTCATTG T	44	5267	5286	124
53272 7	1624	1643	Экзон 10	GACTTTGAA CACATGTTG CT	43	5273	5292	125
53272 8	1630	1649	Экзон 10	ATCCTTGACT TTGAACACA T	43	5279	5298	126
53272 9	1636	1655	Экзон 10	TTCCATATCC TTGACTTTGA	43	5285	5304	127
53273 0	1642	1661	Экзон 10	CAGGTTTTCC ATATCCTTG A	42	5291	5310	128
53273 1	1686	1705	Экзон 11	CTCAGAGAC TGGCTTTCAT	42	5827	5846	129

				С				
53273 2	1692	1711	Экзон 11	CAGAGACTC AGAGACTGG CT	42	5833	5852	130
51625 2	1698	1717	Экзон 11	ATGCCACAG AGACTCAGA GA	42	5839	5858	131
53273 3	1704	1723	Экзон 11	CAAACCATG CCACAGAGA CT	41	5845	5864	132
53273 4	1710	1729	Экзон 11	TGTTCCCAA ACCATGCCA CA	41	5851	5870	133
53273 5	1734	1753	Экзон 11	TTGTGGTAA TCGGTACCC TT	41	5875	5894	134
53273 6	1740	1759	Экзон 11	GGTTGCTTGT GGTAATCGG T	40	5881	5900	135
53273 7	1746	1765	Экзон 11	TGCCATGGT TGCTTGTTGT A	40	5887	5906	136
53273 8	1752	1771	Экзон 11	TTGGCCTGC CATGGTTGC TT	40	5893	5912	137
53273 9	1758	1777	Экзон 11	GAGATCTTG GCCTGCCAT GG	38	5899	5918	138
53274 0	1803	1822	Экзон 12	ACAGCCCCC ATACAGCTC TC	38	6082	6101	139
53274 1	1809	1828	Экзон 12	GACACCACA GCCCCCATA CA	38	6088	6107	140
53274 2	1815	1834	Экзон 12	TACTCAGAC ACCACAGCC CC	38	6094	6113	141

53274 3	1821	1840	Экзон 12	ACAAAGTAC TCAGACACC AC	37	6100	6119	142
53274 4	1827	1846	Экзон 12	GTCAGCACA AAGTACTCA GA	37	6106	6125	143
53274 5	1872	1891	Экзон 12	TTGATTGAG TGTTCCCTGT C	36	6151	6170	144
53274 6	1878	1897	Экзон 12	CTGACCTTG ATTGAGTGT TC	35	6157	6176	145
53274 7	1909	1928	Экзон 13	TATCTCCAG GTCCCGCTTC T	35	6403	6422	146
53274 8	1967	1986	Экзон 13	GAATTCCTG CTTCTTTTT C	32	6461	6480	147
53274 9	1973	1992	Экзон 13	ATTCAGGAA TTCCTGCTTC T	32	6467	6486	148
53275 0	1979	1998	Экзон 13	CATAAAATT CAGGAATTC CT	32	6473	6492	149
53275 1	1985	2004	Экзон 13	CATAGTCAT AAAATTCAG GA	31	6479	6498	150
53275 2	2006	2025	Экзон 13	TGAGCTTGA TCAGGGCAA CG	30	6500	6519	151
53275 3	2012	2031	Экзон 13	TATTCTTGAG CTTGATCAG G	30	6506	6525	152
53275 4	2048	2067	Сочле нение экзона 13-14	GACAAATGG GCCTGATAG TC	30	н.д.	н.д.	153

53275 5	2070	2089	Экзон 14	GTTGTTCCCT CGGTGCAGG G	29	6659	6678	154
53275 6	2076	2095	Экзон 14	GCTCGAGTT GTTCCCTCG GT	28	6665	6684	155
53275 7	2082	2101	Экзон 14	CTCAAAGCT CGAGTTGTT CC	28	6671	6690	156
53275 8	2088	2107	Экзон 14	GGAAGCCTC AAAGCTCGA GT	25	6677	6696	157
53275 9	2094	2113	Экзон 14	GTTGGAGGA AGCCTCAAA GC	23	6683	6702	158
53276 0	2100	2119	Экзон 14	GTGGTAGTT GGAGGAAGC CT	23	6689	6708	159
53276 1	2106	2125	Экзон 14	TGGCAAGTG GTAGTTGGA GG	18	6695	6714	160
53276 2	2112	2131	Экзон 14	TGTTGCTGG CAAGTGGTA GT	14	6701	6720	161

Таблица 126

Ингибирование мРНК CFB 5-10-5 МОЕ гэнмерами, направленными на SEQ ID NO: 1 и 2

ISIS №	SEQ ID NO: 1 сайт инициации	SEQ ID NO: 1 сайт термации	Область - мишень	Последовательность	% ингибирования	SEQ ID NO: 2 сайт инициации	SEQ ID NO: 2 сайт термации	SEQ ID NO:
532812	н.д.	н.д.	Экзон 1	TCCAGCTCA CTCCCCTGTT G	19	1593	1612	162
532813	н.д.	н.д.	Экзон 1	TAAGGATCC AGCTCACTC CC	40	1599	1618	163
532814	н.д.	н.д.	Экзон 1	CAGAAATAA GGATCCAGC TC	39	1605	1624	164
532815	н.д.	н.д.	Экзон 1	AGGGACCAG AAATAAGGA TC	0	1611	1630	165
532816	н.д.	н.д.	Экзон 1	CCACTTAGG GACCAGAAA TA	27	1617	1636	166
532817	н.д.	н.д.	Экзон 1	TCCAGGACT CTCCCCTTCA G	39	1682	1701	167
532818	н.д.	н.д.	Экзон 1	AAGTCCCAC CCTTTGCTGC C	15	1707	1726	168
532819	н.д.	н.д.	Экзон 1	CTGCAGAAG TCCCACCCTT T	26	1713	1732	169
532820	н.д.	н.д.	Экзон 1	CAGAAACTG CAGAAGTCC CA	8	1719	1738	170
532821	н.д.	н.д.	Эзон 2 - интрон 2	AACCTCTGC ACTCTGCCTT C	39	2368	2387	171
532822	н.д.	н.д.	Эзон 2 - интрон 2	CCCTCAAAC CTCTGCACTC T	3	2374	2393	172
532823	н.д.	н.д.	Эзон 2 - интрон 2	TCATTGCCCT CAAACCTCT G	19	2380	2399	173
53282	н.д.	н.д.	Интрон	CCACACTCA	37	2386	2405	174

4			2	TTGCCCTCA AA				
53282 5	н.д.	н.д.	Инtron 2	CACTGCCCA CACTCATTG CC	23	2392	2411	175
53282 6	н.д.	н.д.	Инtron 2	TTAGGCCAC TGCCCACAC TC	15	2398	2417	176
53282 7	н.д.	н.д.	Инtron 2	CTAGTCCTG ACCTTGCTG CC	28	2436	2455	177
53282 8	н.д.	н.д.	Инtron 2	CTCATCCTA GTCCTGACC TT	25	2442	2461	178
53282 9	н.д.	н.д.	Инtron 2	CCTAGTCTC ATCCTAGTC CT	23	2448	2467	179
53283 0	н.д.	н.д.	Инtron 2	ACCCTGCCT AGTCTCATC CT	30	2454	2473	180
53283 1	н.д.	н.д.	Инtron 2	CTTGTCACCC TGCCTAGTCT	34	2460	2479	181
53283 2	н.д.	н.д.	Инtron 2	GCCCACCTT GTCACCCTG CC	36	2466	2485	182
53283 3	н.д.	н.д.	Инtron 2	CCTAAAACT GCTCCTACTC C	9	2492	2511	183
53283 4	н.д.	н.д.	Инtron 4	GAGTCAGAA ATGAGGTCA AA	19	3494	3513	184
53283 5	н.д.	н.д.	Инtron 11	CCCTACTCCC ATTTCACCTT	16	5971	5990	185
53283 6	н.д.	н.д.	Инtron 8 - экзон 9	TGTTGTGCA ATCCTGCAG AA	25	5013	5032	186
53283	н.д.	н.д.	Инtron	AAAGGCTGA	18	2123	2142	187

7			1	TGAAGCCTG GC				
53283 8	н.д.	н.д.	Инtron 7	CCTTTGACC ACAAAGTGG CC	21	4461	4480	188
53283 9	н.д.	н.д.	Инtron 12	AGGTACCAC CTCTTTGTGG G	29	6362	6381	189
53284 0	н.д.	н.д.	Инtron 1 - экзон 2	TGGTGGTCA CACCTGAAG AG	34	2143	2162	190
53276 3	2133	2152	Сочлен ение экзона 14-15	GCAGGGAGC AGCTCTTCCT T	40	н.д.	н.д.	191
53276 4	2139	2158	Экзон 15	TCCTGTGCA GGGAGCAGC TC	28	6927	6946	192
53276 5	2145	2164	Экзон 15	TTGATATCCT GTGCAGGGA G	41	6933	6952	193
53276 6	2151	2170	Экзон 15	AGAGCTTTG ATATCCTGTG C	36	6939	6958	194
53276 7	2157	2176	Экзон 15	ACAAACAGA GCTTTGATAT C	33	6945	6964	195
53276 8	2163	2182	Экзон 15	TCAGACACA AACAGAGCT TT	41	6951	6970	196
53276 9	2169	2188	Экзон 15	TCCTCCTCAG ACACAAACA G	49	6957	6976	197
53277 0	2193	2212	Экзон 15	ACCTCCTTCC GAGTCAGCT T	61	6981	7000	198
53277	2199	2218	Экзон	ATGTAGACC	39	6987	7006	199

1			15	TCCTTCCGA GT				
53277 2	2205	2224	Экзон 15	TTCTTGATGT AGACCTCCT T	30	6993	7012	200
53277 3	2211	2230	Экзон 15	TCCCCATTCT TGATGTAGA C	31	6999	7018	201
53277 4	2217	2236	Сочлен ение экзона 15-16	TTCTTATCCC CATTCTTGAT	36	н.д.	н.д.	202
53277 5	2223	2242	Сочлен ение экзона 15-16	CTGCCTTTCT TATCCCCATT	56	н.д.	н.д.	203
53277 6	2229	2248	Сочлен ение экзона 15-16	TCACAGCTG CCTTTCTTAT C	33	н.д.	н.д.	204
53277 7	2235	2254	Экзон 16	TCTCTCTCAC AGCTGCCTTT	38	7119	7138	205
53277 8	2241	2260	Экзон 16	TGAGCATCT CTCTCACAG CT	51	7125	7144	206
53277 9	2247	2266	Экзон 16	GCAATATTGA GCATCTCTCT C	39	7131	7150	207
53278 0	2267	2286	Экзон 16	TGACTTTGTC ATAGCCTGG G	56	7151	7170	208
53278 1	2273	2292	Экзон 16	TGTCCTTGAC TTTGTCATAG	36	7157	7176	209
53278 2	2309	2328	Экзон 16	CAGTACAAA GGAACCGAG GG	30	7193	7212	210
53278	2315	2334	Экзон	CTCCTCCAGT	21	7199	7218	211

3			16	ACAAAGGAA C				
53278 4	2321	2340	Экзон 16	GACTCACTC CTCCAGTAC AA	31	7205	7224	212
53278 5	2327	2346	Экзон 16	CATAGGGAC TCACTCCTCC A	30	7211	7230	213
53278 6	2333	2352	Экзон 16	GGTCAGCAT AGGGACTCA CT	31	7217	7236	214
53278 7	2352	2371	Сочлен ение экзона 16-17	TCACCTCTGC AAGTATTGG G	42	7236	7255	215
53278 8	2358	2377	Сочлен ение экзона 16-17	CCAGAATCA CCTCTGCAA GT	32	н.д.	н.д.	216
53278 9	2364	2383	Сочлен ение экзона 16-17	GGGCCGCCA GAATCACCT CT	35	н.д.	н.д.	217
53279 0	2382	2401	Экзон 17	CTCTTGTA CTATCAAGG G	33	7347	7366	218
53279 1	2388	2407	Экзон 17	CGACTTCTCT TGTGAAC T	52	7353	7372	219
53279 2	2394	2413	Экзон 17	ATGAAACGA CTTCTCTTGT G	16	7359	7378	220
53279 3	2400	2419	Сочлен ение экзона 17-18	ACTTGAATG AAACGACTT CT	45	7365	7384	221
53279	2406	2425	Сочлен	ACACCAACT	18	н.д.	н.д.	222

4			ение экзона 17-18	TGAATGAAA CG				
53279 5	2427	2446	Экзон 18	TCCACTACTC CCCAGCTGA T	30	7662	7681	223
53279 6	2433	2452	Экзон 18	CAGACATCC ACTACTCCC CA	38	7668	7687	224
53279 7	2439	2458	Экзон 18	TTTTTGCAGA CATCCACTA C	35	7674	7693	225
53279 8	2445	2464	Экзон 18	TTCTGGTTT TGCAGACAT C	45	7680	7699	226
53279 9	2451	2470	Экзон 18	TGCCGCTTCT GGTTTTTGCA	47	7686	7705	227
53280 0	2457	2476	Экзон 18	TGCTTTTGCC GCTTCTGGTT	61	7692	7711	228
53280 1	2463	2482	Экзон 18	GGTACCTGC TTTTGCCGCT T	47	7698	7717	229
53280 2	2469	2488	Экзон 18	TGAGCAGGT ACCTGCTTTT G	31	7704	7723	230
53280 3	2517	2536	Экзон 18	TTCAGCCAG GGCAGCACT TG	41	7752	7771	231
53280 4	2523	2542	Экзон 18	TTCTCCTTCA GCCAGGGCA G	44	7758	7777	232
53280 5	2529	2548	Экзон 18	TGGAGTTTCT CCTTCAGCC A	46	7764	7783	233
53280 6	2535	2554	Экзон 18	TCATCTTGGA GTTTCTCCTT	49	7770	7789	234
53280	2541	2560	Экзон	AAATCCTCA	30	7776	7795	235
7			18	TCTTGGAGTT T				
53280 8	2547	2566	Экзон 18	AAACCCAAA TCCTCATCTT G	20	7782	7801	236
53280 9	2571	2590	Экзон 18	GTCCAGCAG GAAACCCCT TA	65	7806	7825	237
53281 0	2577	2596	Экзон 18	GCCCCTGTC CAGCAGGAA AC	74	7812	7831	238
53281 1	2599	2618	Экзон 18	AGCTGTTTTA ATTCAATCC C	96	7834	7853	239

Таблица 127

Ингибирование мРНК CFB 5-10-5 МОЕ гэлмерами, направленными на SEQ ID NO: 1 и 2

ISIS №	SEQ ID NO: 1 сайт инициации	SEQ ID NO: 1 сайт термминации	Область - мишень	Последовательность	SEQ ID NO: 2 сайт инициации	SEQ ID NO: 2 сайт термминации	% ингибирования	SEQ ID NO:
53284 1	н.д.	н.д.	Интрон 6 - экзон 7	AACTTGCCA CCTGTGGGT GA	4142	4161	11	240
53284 2	н.д.	н.д.	Эхон 15 - Intron 15	TCACCTTAT CCCCATTCT TG	7007	7026	16	241
53284 3	н.д.	н.д.	Интрон 11	TCAACTTTC ACAAACCAC CA	6015	6034	19	242
53284 4	н.д.	н.д.	Интрон 16 -	CCGCCAGAA TCACCTGCA	7326	7345	33	243

			экзон 17	AG				
53284 5	н.д.	н.д.	Инtron 10	AGGAGGAAT GAAGAAGG CTT	5431	5450	29	244
53284 6	н.д.	н.д.	Инtron 13	GCCTTTCCT CAGGGATCT GG	6561	6580	26	245
53284 7	н.д.	н.д.	Инtron 4	AAATGTCTG GGAGTGTCA GG	3477	3496	18	246
53284 8	н.д.	н.д.	Инtron 15	GCCTAGAGT GCCTCCTTA GG	7038	7057	20	247
53284 9	н.д.	н.д.	Инtron 17	GGCATCTCC CCAGATAGG AA	7396	7415	16	248
53285 0	н.д.	н.д.	Инtron 6	AGGGAGCTA GTCCTGGAA GA	3906	3925	14	249
53285 1	н.д.	н.д.	Инtron 1 - экзон 2	ACACCTGAA GAGAAAGG CTG	2135	2154	6	250
53285 2	н.д.	н.д.	Инtron 7	CCCTTTGAC CACAAAGTG GC	4462	4481	25	251
53285 3	н.д.	н.д.	Инtron 7	GCCCTCAAG GTAGTCTCA TG	4354	4373	26	252
53285 4	н.д.	н.д.	Инtron 6	AAGGGAAG GAGGACAG AATA	3977	3996	18	253
53285 5	н.д.	н.д.	Инtron 1	AAAGGCCAA GGAGGGATG CT	2099	2118	9	254
53285 6	н.д.	н.д.	Экзон 8 -	AGAGGTCCC TTCTGACCA	4736	4755	4	255

			интрон 8	TC				
53285 7	н.д.	н.д.	Интрон 8	GCTGGGACA GGAGAGAG GTC	4749	4768	0	256
53285 8	н.д.	н.д.	Интрон 4	TCAAATGTC TGGGAGTGT CA	3479	3498	13	257
53285 9	н.д.	н.д.	Интрон 10	AGAAGGAG AATGTGCTG AAA	5801	5820	20	258
53286 0	н.д.	н.д.	Интрон 17	TGCTGACCA CTTGGCATC TC	7408	7427	20	259
53286 1	н.д.	н.д.	Интрон 11	CAACTTTCA CAAACCACC AT	6014	6033	18	260
53286 2	н.д.	н.д.	Интрон 10	AGCTCTGTG ATTCTAAGG TT	5497	5516	15	261
53286 3	н.д.	н.д.	Интрон 6 - экзон 7	CCACCTGTG GGTGAGGAG AA	4136	4155	16	262
53286 4	н.д.	н.д.	Экзон 17 - интрон 17	GAGGACTCA CTTGAATGA AA	7373	7392	21	263
53286 5	н.д.	н.д.	Интрон 6	TGGAATGAT CAGGGAGCT AG	3916	3935	30	264
53286 6	н.д.	н.д.	Интрон 5	GTCCCTTCT CCATTTTCC CC	3659	3678	26	265
53286 7	н.д.	н.д.	Интрон 7	TCAACTTTT TAAGTTAAT CA	4497	4516	14	266
53286	н.д.	н.д.	Интрон	GGGTGAGGA	4128	4147	21	267

8			6	GAACAAGGC GC				
53286 9	н.д.	н.д.	Инtron 7	CTTCCAAGC CATCTTTTA AC	4553	4572	5	268
53287 0	н.д.	н.д.	Экзон 17 - инtron 17	AGGACTCAC TTGAATGAA AC	7372	7391	18	269
53287 1	н.д.	н.д.	Инtron 10	TTCCAGGCA ACTAGAGCT TC	5412	5431	15	270
53287 2	н.д.	н.д.	Экзон 1	CAGAGTCCA GCCACTGTT TG	1557	1576	13	271
53287 3	н.д.	н.д.	Инtron 17 - экзон 18	CCAACCTGC AGAGGCAGT GG	7638	7657	23	272
53287 4	н.д.	н.д.	Инtron 16	TGCAAGGAG AGGAGAAG CTG	7312	7331	10	273
53287 5	н.д.	н.д.	Экзон 9 - инtron 9	CTAGGCAGG TТАCTCACC CA	5120	5139	21	274
53287 6	н.д.	н.д.	Инtron 6 - экзон 7	CACCATAAC TTGCCACCT GT	4148	4167	41	275
53287 7	н.д.	н.д.	Инtron 12	TAGGTACCA CCTCTTTGT GG	6363	6382	27	276
53287 8	н.д.	н.д.	Инtron 11	CTTGACCTC ACCTCCCC AA	5954	5973	13	277
53287 9	н.д.	н.д.	Инtron 12	CCACCTCTT TGTGGGCAG	6357	6376	33	278

				СТ				
53288 0	н.д.	н.д.	Инtron 11	TTCACAAAC CACCATCTC TT	6009	6028	8	279
53288 1	н.д.	н.д.	Экзон 3 - инtron 3	TTCTCACCT CCGTTGTCA CA	2958	2977	17	280
53288 2	н.д.	н.д.	Инtron 12	GAAAGTGGG AGGTGTTGC CT	6225	6244	19	281
53288 3	н.д.	н.д.	Инtron 1	ACAGCAGGA AGGGAAGGT TA	2075	2094	34	282
53288 4	н.д.	н.д.	Инtron 17	CATGCTGAC CACTTGGCA TC	7410	7429	18	283
53288 5	н.д.	н.д.	Экзон 4 - инtron 4	GGTCACCTT GGCAGGAA GGC	3286	3305	0	284
53288 6	н.д.	н.д.	Инtron 8	GTATAGTGT TACAAGTGG AC	4804	4823	13	285
53288 7	н.д.	н.д.	Инtron 7	GGACTTCCC TTTGACCAC AA	4468	4487	18	286
53288 8	н.д.	н.д.	Инtron 11	TCACCTTGA CCTCACCTC CC	5958	5977	20	287
53288 9	н.д.	н.д.	Инtron 15	TAGAGTGCC TCCTTAGGA TG	7035	7054	27	288
53289 0	н.д.	н.д.	Инtron 7	TGACTTCAA CTTGTGGTC TG	4605	4624	16	289
53289	н.д.	н.д.	Инtron	CAGAGAAG	5804	5823	25	290

1			10	GAGAATGTG CTG				
53289 2	н.д.	н.д.	Инtron 14 - экзон 15	AGGGAGCA GCTCTTCCT CTG	6919	6938	47	291
53289 3	н.д.	н.д.	Инtron 5 - экзон 6	TGTTCCCCT GGGTGCCAG GA	3710	3729	24	292
53289 4	н.д.	н.д.	Инtron 10	GGCCTGGCT GTTTCAAG CC	5612	5631	15	293
53289 5	н.д.	н.д.	Инtron 10 - экзон 11	GACTGGCTT TCATCTGGC AG	5821	5840	25	294
53289 6	н.д.	н.д.	Инtron 10	GAAGGCTTT CCAGGCAAC TA	5419	5438	19	295
53289 7	н.д.	н.д.	Экзон 17 - инtron 17	TCACTTGAA TGAAACGAC TT	7367	7386	11	296
53289 8	н.д.	н.д.	Инtron 1	GGCCCCAAA AGGCCAAGG AG	2106	2125	5	297
53289 9	н.д.	н.д.	Инtron 16 - экзон 17	AATCACCTG CAAGGAGA GGA	7319	7338	19	298
53290 0	н.д.	н.д.	Инtron 12	GACCTTCAG TTGCATCCT TA	6183	6202	25	299
53290 1	н.д.	н.д.	Инtron 1	TGATGAAGC CTGGCCCCA AA	2117	2136	0	300
53290	н.д.	н.д.	Инtron	TAGAAAGTG	6227	6246	0	301

2			12	GGAGGTGTT GC				
53290 3	н.д.	н.д.	Инtron 12	CCCATCCCT GACTGGTCT GG	6295	6314	14	302
53290 4	н.д.	н.д.	Инtron 8	CCATGGGTA TAGTGTTAC AA	4810	4829	13	303
53290 5	н.д.	н.д.	Инtron 2	GTGTTCTCT TGACTTCCA GG	2586	2605	23	304
53290 6	н.д.	н.д.	Инtron 13	GGCCTGCTC CTCACCCCA GT	6597	6616	27	305
53290 7	н.д.	н.д.	Инtron 10	GAGGCCTGG CTGTTTTCA AG	5614	5633	32	306
53290 8	н.д.	н.д.	Экзон 1	GACTCTCCC CTTCAGTAC CT	1677	1696	16	307
53290 9	н.д.	н.д.	Инtron 8	CATGGGTAT AGTGTTACA AG	4809	4828	10	308
53291 0	н.д.	н.д.	Инtron 10	GAAGGAGA ATGTGCTGA AAA	5800	5819	0	309
53291 1	н.д.	н.д.	Инtron 7	TCACCTGGT CTTCCAAGC CA	4562	4581	0	310
53291 2	н.д.	н.д.	Инtron 17	CTCCCCAGA TAGGAAAGG GA	7391	7410	0	311
53291 3	н.д.	н.д.	Экзон 17 - инtron 17	GGACTCACT TGAATGAAA CG	7371	7390	0	312
53291	н.д.	н.д.	Инtron	GGCCGCCAG	7328	7347	30	313

4			16 - экзон 17	AATCACCTG CA				
53291 5	н.д.	н.д.	Экзон 17 - интрон 17	CTCACTTGA ATGAAACGA CT	7368	7387	22	314
53291 6	н.д.	н.д.	Интрон 13	CTTTCCCAG CCTTTCCTC AG	6569	6588	28	315
53291 8	н.д.	н.д.	Интрон 12	AGAAAGTGG GAGGTGTTG CC	6226	6245	3	316
53291 7	2604	2623	Экзон 18	GTCGCAGCT GTTTAAATT CA	7839	7858	90	317

Таблица 128

Ингибирование мРНК CFB 5-10-5 МОЕ гэлпмерами, направленными на SEQ ID NO: 1 и 2

ISIS №	SEQ ID NO: 1 сайт иници и	SEQ ID NO: 1 сайт терми нации	Область - мишень	Последова тельность	SEQ ID NO: 2 сайт инициа ции	SEQ ID NO: 2 сайт терм инац ии	% ингиби рования	SEQ ID NO:
53291 9	н.д.	н.д.	Экзон 1	CCAGGACT CTCCCCTT CAGT	1681	1700	4	318
53292 0	н.д.	н.д.	Интрон 6	AGGGAAG GAGGACAG	3976	3995	25	319

				AATAG				
53292 1	н.д.	н.д.	Инtron 4	GAAATGAG GTCAAATG TCTG	3488	3507	30	320
53292 2	н.д.	н.д.	Инtron 4	GGAGAGTC AGAAATGA GGTC	3497	3516	25	321
53292 3	н.д.	н.д.	Инtron 12	GTAGAAAG TGGGAGGT GTTG	6228	6247	26	322
53292 4	н.д.	н.д.	Инtron 10	TAGAAAGA TCTCTGAA GTGC	5521	5540	24	323
53292 5	н.д.	н.д.	Инtron 13	CTGCTCCT CACCCCAG TCCT	6594	6613	26	324
53292 6	н.д.	н.д.	Инtron 11	CTACTGGG ATTCTGTG CTTA	5927	5946	30	325
53292 7	н.д.	н.д.	Инtron 1	CCCAAAAG GCCAAGGA GGGA	2103	2122	13	326
53292 8	н.д.	н.д.	Инtron 17	TGACCACT TGGCATCT CCCC	7405	7424	27	327
53292 9	н.д.	н.д.	Инtron 16 - экзон 17	CCTGCAAG GAGAGGA GAAGC	7314	7333	29	328

53293 0	н.д.	н.д.	Экзон 16 - интрон 16	CTCTCACC TCTGCAAG TATT	7239	7258	44	329
53293 1	н.д.	н.д.	Интрон 1	CCCCAAAA GGCCAAGG AGGG	2104	2123	21	330
53293 2	н.д.	н.д.	Интрон 7	GTCTTCCA AGCCATCT TTTA	4555	4574	20	331
53293 3	н.д.	н.д.	Интрон 8	GTTACAAG TGGACTTA AGGG	4797	4816	30	332
53293 4	н.д.	н.д.	Интрон 8 - экзон 9	CCCATGTT GTGCAATC CTGC	5017	5036	30	333
53293 5	н.д.	н.д.	Интрон 15	GAGGTGGG AAGCATGG AGAA	7091	7110	17	334
53293 6	н.д.	н.д.	Интрон 14	TGCTCCCA CCTGTGTC ATCT	6874	6893	21	335
53293 7	н.д.	н.д.	Экзон 9 - интрон 9	AGGCAGGT TACTCACC CAGA	5118	5137	18	336
53293 8	н.д.	н.д.	Интрон 11	TACTGGGA TTCTGTGC TTAC	5926	5945	15	337

53293 9	н.д.	н.д.	Инtron 13	GCCTTTCC CAGCCTTT CCTC	6571	6590	27	338
53294 0	н.д.	н.д.	Инtron 8 - эксон 9	GTGCAATC CTGCAGAA GAGA	5009	5028	21	339
53294 1	н.д.	н.д.	Инtron 8	ACAGGAGA GAGGTCCC TTCT	4743	4762	20	340
53294 2	н.д.	н.д.	Инtron 10	CCCAAAAG GAGAAAG GGAAA	5717	5736	14	341
53294 3	н.д.	н.д.	Инtron 2	AAGCCCAG GGTAAATG CTTA	2557	2576	32	342
53294 4	н.д.	н.д.	Инtron 1	GATGAAGC CTGGCCCC AAAA	2116	2135	22	343
53294 5	н.д.	н.д.	Инtron 10	TGGCAGAG AAGGAGA ATGTG	5807	5826	22	344
53294 6	н.д.	н.д.	Инtron 13	TTCCCAGC CTTTCCTC AGGG	6567	6586	35	345
53294 7	н.д.	н.д.	Инtron 10	GGCAGAGA AGGAGAAT GTGC	5806	5825	30	346
53294 8	н.д.	н.д.	Инtron 10	ACAGTGCC AGGAAACA	5471	5490	25	347

				AGAA				
53294 9	н.д.	н.д.	Экзон 9 - интрон 9	TAGGCAGG TТАCTCAC CCAG	5119	5138	22	348
53295 0	н.д.	н.д.	Интрон 2	TTCTCTTG ACTTCCAG GGCT	2583	2602	22	349
53295 1	н.д.	н.д.	Интрон 13	CCTGCTCC TCACCCCA GTCC	6595	6614	16	350
53295 3	н.д.	н.д.	Интрон 7	TCCCACTA ACCTCCAT TGCC	4422	4441	14	351
53295 4	н.д.	н.д.	Интрон 7	TTCCCTTT GACCACAA AGTG	4464	4483	16	352
53295 5	н.д.	н.д.	Интрон 9	CTGGGTCC TAGGCAGG TTAC	5127	5146	30	353
53295 6	н.д.	н.д.	Интрон 10	TCCAGGCA ACTAGAGC TTCA	5411	5430	20	354
53295 7	н.д.	н.д.	Интрон 8 - экзон 9	GCCCATGT TGTGCAAT CCTG	5018	5037	45	355
53295 8	н.д.	н.д.	Интрон 7	GGTTCCCA CTAACCTC CATT	4425	4444	18	356

53295 9	н.д.	н.д.	Инtron 3	AGGTAGAG AGCAAGAG TTAC	3052	3071	26	357
53296 0	н.д.	н.д.	Инtron 7	CCACTAAC CTCCATTG CCCA	4420	4439	10	358
53296 1	н.д.	н.д.	Инtron 11	TCACAAAC CACCATCT CTTA	6008	6027	40	359
53296 2	н.д.	н.д.	Экзон 9 - инtron 9	TACTCACC CAGATAAT CCTC	5110	5129	27	360
53296 3	н.д.	н.д.	Инtron 13	TGCTCCTC ACCCCAGT CCTC	6593	6612	24	361
53296 4	н.д.	н.д.	Инtron 15 - экзон 16	TCTCACAG CTGCCTTT CTGT	7115	7134	25	362
53296 5	н.д.	н.д.	Экзон 17 - инtron 17	GAAAGGG AGGACTCA CTGA	7379	7398	11	363
53296 6	н.д.	н.д.	Инtron 7	CCATCTTT TAACCCCA GAGA	4545	4564	18	364
53296 7	н.д.	н.д.	Инtron 13	TCCTCACC CCAGTCCT	6590	6609	27	365

				CCAG				
53296 8	н.д.	н.д.	Инtron 10	CTGGCAGA GAAGGAG AATGT	5808	5827	15	366
53296 9	н.д.	н.д.	Инtron 17	TCTCCCCA GATAGGAA AGGG	7392	7411	23	367
53297 0	н.д.	н.д.	Инtron 14	ACTTCAGC TGCTCCCA CCAC	6882	6901	18	368
53297 1	н.д.	н.д.	Инtron 1	GACAGCAG GAAGGGA AGGTT	2076	2095	13	369
53297 2	н.д.	н.д.	Инtron 13- экзон 14	GGAGACAA ATGGGCCT ATAA	6640	6659	33	370
53297 3	н.д.	н.д.	Инtron 14	CTGCTCCC ACCACTGT CATC	6875	6894	11	371
53297 4	н.д.	н.д.	Инtron 10	AGGAATGA AGAAGGCT TTCC	5428	5447	21	372
53297 5	н.д.	н.д.	Инtron 14	GGGATCTC ATCCTTAT CCTC	6741	6760	31	373
53297 6	н.д.	н.д.	Инtron 9	GTGCTGGG TCCTAGGC AGGT	5130	5149	16	374

53297 7	н.д.	н.д.	Инtron 1	CAAAAGGC CAAGGAGG GATG	2101	2120	14	375
53297 8	н.д.	н.д.	Инtron 17	CCATGCTG ACCACTTG GCAT	7411	7430	20	376
53297 9	н.д.	н.д.	Инtron 8	GGAGGCTG GGACAGGA GAGA	4753	4772	25	377
53298 0	н.д.	н.д.	Инtron 14 - экзон 15	GGAGCAGC TCTTCCTCT GGA	6917	6936	36	378
53298 1	н.д.	н.д.	Экзон 3 - инtron 3	TCTCACCT CCGTTGTC ACAG	2957	2976	20	379
53298 2	н.д.	н.д.	Инtron 13	CAGTCCTC CAGCCTTT CCCA	6581	6600	21	380
53298 3	н.д.	н.д.	Инtron 13	AGTCCTCC AGCCTTTC CCAG	6580	6599	22	381
53298 4	н.д.	н.д.	Инtron 4 - экзон 5	TGAAGGAG TCTGGGAG AGTC	3509	3528	12	382
53298 5	н.д.	н.д.	Инtron 16 - экзон	CAGAATCA CCTGCAAG GAGA	7322	7341	20	383

			17					
53298 6	н.д.	н.д.	Экзон 17 - интрон 17	TAGGAAAG GGAGGACT CACT	7382	7401	3	384
53298 7	н.д.	н.д.	Экзон 4 - интрон 4	ACCTTGGC AGGAAGGC TCCG	3282	3301	12	385
53298 8	н.д.	н.д.	Интрон 13- экзон 14	GAGACAAA TGGGCCTA TAAA	6639	6658	15	386
53298 9	н.д.	н.д.	Интрон 1	CTGAAGAG AAAGGCTG ATGA	2131	2150	17	387
53299 0	н.д.	н.д.	Интрон 6	AATGATCA GGGAGCTA GTCC	3913	3932	30	388
53299 1	н.д.	н.д.	Интрон 17	CTTAGCTG ACCTAAAG GAAT	7557	7576	22	389
53299 2	н.д.	н.д.	Интрон 8	TGGGTATA GTGTTACA AGTG	4807	4826	17	390
53299 3	н.д.	н.д.	Интрон 1	TGAAGAGA AAGGCTGA TGAA	2130	2149	19	391
53299	н.д.	н.д.	Интрон	GTGTTACA	4799	4818	25	392

4			8	AGTGGACT TAAG				
53299 5	н.д.	н.д.	Инtron 6	ACCTGTGG GTGAGGAG AACA	4134	4153	24	393
53299 6	н.д.	н.д.	Экзон 9 - интрон 9	TCACCCAG ATAATCCT CCCT	5107	5126	36	394
53295 2	2608	2627	Экзон 18	TGTTGTCTG CAGCTGTT TTAA	7843	7862	90	395

Пример 116. Антисмысловое ингибирование человеческого фактора комплемента В (CFB) в HepG2 клетках МОЕ гэмперами.

Были сконструированы дополнительные антисмысловые олигонуклеотиды, направленные на нуклеиновую кислоту человеческого фактора комплемента В (CFB), и были протестированы на их воздействие *in vitro* на мРНК CFB. Культивированные клетки HepG2 с плотностью 20000 клеток на лунку трансфицировали с использованием электропорации с 4500 нМ антисмыслового олигонуклеотида. После периода обработки в течение около 24 ч, РНК выделяли из клеток и уровни мРНК CFB измеряли методом количественной ПЦР в реальном времени. Набор человеческих праймерных зондов RTS3460_MGB (прямая последовательность CGAAGCAGCTCAATGAAATCAA, обозначенная в настоящем документе как SEQ ID NO: 813; обратная последовательность TGCCTGGAGGGCCTTCTT, обозначенная в настоящем документе как SEQ ID NO: 814; последовательность зонда AGACCACAAGTTGAAGTC, обозначенная в настоящем документе как SEQ ID NO: 815) был использован для измерения уровней мРНК. Уровни мРНК CFB были скорректированы в соответствии с содержанием суммарной РНК, измеренным с помощью RIBOGREEN®. Результаты представлены как процентное ингибирование CFB относительно необработанных контрольных клеток.

Впервые сконструированные химерные антисмысловые олигонуклеотиды, указанные в представленных ниже таблицах, были сконструированы как 5-10-5 МОЕ гэмперы. Гэмперы 5-10-5 МОЕ имеют 20 нуклеозидов в длину, причем центральный гэм состоит из десяти 2'-дезоксинуклеозидов и окружен крыльями с 5' конца и в 3' конца, содержащими по пять нуклеозидов каждое. Каждый нуклеозид 5'-крыла и нуклеозид 3'-крыла имеет 2'-МОЕ модификации. Межнуклеозидные связи в каждом гэмпере представляют собой тиофосфатные (P=S) связи. Все остатки цитозина в каждом гэмпере представляют собой 5-метилцитозины. "Сайт инициации" обозначает самый крайний 5' нуклеозид, на который направлен гэмпер в последовательности гена человека. "Сайт терминации" обозначает самый крайний 3' нуклеозид, на который направлен гэмпер в последовательности гена человека. Каждый гэмпер, перечисленный в представленных ниже таблицах, направлен на мРНК CFB человека, обозначенную в данном описании как SEQ ID NO: 1 (с номером доступа GENBANK NM_001710.5) или на геномную последовательность CFB человека, обозначенную в настоящем документе как SEQ ID NO: 2 (с номером доступа GENBANK NT_007592.15, усеченную с нуклеотида 31852000 по 31861000), или на обе последовательности, "н/д" означает, что антисмысловый олигонуклеотид не направлен на указанную конкретную последовательность гена с 100% комплементарностью.

Таблица 129

Ингибирование мРНК CFB 5-10-5 МОЕ гэнпмерами, направленными на SEQ ID NO: 1 и 2

ISIS №	SEQ ID NO: 1 сайт инициации	SEQ ID NO:1 сайт терминации	Область - мишень	Последовательность	% ингибирования	SEQ ID NO: 2 сайт инициации	SEQ ID NO: 2 сайт терминации	SEQ ID NO :
532686	1135	1154	Экзон 6	ACACTTT TTGGCTC CTGTGA	48	3819	3838	84
532687	1141	1160	Экзон 6	GACTAG ACACTTT TTGGCTC	63	3825	3844	85
532688	1147	1166	Экзон 6	TAAGTT GACTAG ACACTTT T	47	3831	3850	86
532689	1153	1172	Экзон 6	CTCAATT AAGTTG ACTAGA C	57	3837	3856	87
532690	1159	1178	Сочленение экзона 6-7	CACCTTC TCAATT AAGTTG A	49	3843	3862	88
532691	1165	1184	Сочленение экзона 6-7	ACTTGC CACCTTC TCAATT A	33	н.д.	н.д.	89
532692	1171	1190	Сочленение экзона 6-7	ACCATA ACTTGC CACCTTC T	67	н.д.	н.д.	90
532693	1177	1196	Экзон 7	CTTCAC ACCATA ACTTGC CA	56	4153	4172	91
532694	1183	1202	Экзон 7	TCTTGGC TTCACA CCATAA C	50	4159	4178	92
532695	1208	1227	Экзон 7	ATGTGG CATATG TCACTA	53	4184	4203	93

				GA				
53269 6	1235	1254	Экзон 7	CAGACA CTTTGAC CCAAAT T	52	4211	4230	94
53269 7	1298	1317	Сочле ение экзона 7-8	GGTCTTC ATAATT GATTTC A	59	н.д.	н.д.	95
53269 8	1304	1323	Сочле ение экзона 7-8	ACTTGT GGTCTTC ATAATT G	52	н.д.	н.д.	96
53269 9	1310	1329	Сочле ение экзона 7-8	ACTTCA ACTTGT GGTCTTC A	85	н.д.	н.д.	97
53270 0	1316	1335	Экзон 8	TCCCTG ACTTCA ACTTGT GG	96	4609	4628	98
53270 1	1322	1341	Экзон 8	TGTTAGT CCCTGA CTTCAA C	56	4615	4634	99
53270 2	1328	1347	Экзон 8	TCTTGGT GTTAGT CCCTGA C	86	4621	4640	100
53270 3	1349	1368	Экзон 8	TGTACA CTGCCT GGAGGG CC	35	4642	4661	101
53270 4	1355	1374	Экзон 8	TCATGCT GTACAC TGCCTG G	12	4648	4667	102

53270 5	1393	1412	Экзон 8	GTTCCA GCCTTC AGGAGG GA	27	4686	4705	103
53270 6	1399	1418	Экзон 8	GGTGCG GTTCCA GCCTTC AG	67	4692	4711	104
53270 7	1405	1424	Экзон 8	ATGGCG GGTGCG GTTCCA GC	26	4698	4717	105
53270 8	1411	1430	Экзон 8	GATGAC ATGGCG GGTGCG GT	28	4704	4723	106
53270 9	1417	1436	Экзон 8	GAGGAT GATGAC ATGGCG GG	6	4710	4729	107
53271 0	1443	1462	Сочле- ние экзона 8-9	CCCATG TTGTGC AATCCA TC	35	н.д.	н.д.	108
53271 1	1449	1468	Экзон 9	TCCCCG CCCATG TTGTGC AA	28	5023	5042	109
53271 2	1455	1474	Экзон 9	ATTGGG TCCCCG CCCATG TT	19	5029	5048	110
53271 3	1461	1480	Экзон 9	ACAGTA ATTGGG TCCCCG CC	29	5035	5054	111
53271	1467	1486	Экзон 9	TCAATG	49	5041	5060	112

4				ACAGTA ATTGGG TC				
53271 5	1473	1492	Экзон 9	ATCTCAT CAATGA CAGTAA T	45	5047	5066	113
53271 6	1479	1498	Экзон 9	TCCCGG ATCTCAT CAATGA C	54	5053	5072	114
53271 7	1533	1552	Сочле- ние экзона 9-10	ACATCC AGATAA TCCTCCC T	22	н.д.	н.д.	115
53271 8	1539	1558	Сочле- ние экзона 9-10	ACATAG ACATCC AGATAA TC	8	н.д.	н.д.	116
53271 9	1545	1564	Сочле- ние экзона 9-10	CCAAAC ACATAG ACATCC AG	30	н.д.	н.д.	117
53272 0	1582	1601	Экзон 10	AGCATT GATGTT CACTTG GT	62	5231	5250	118
53272 1	1588	1607	Экзон 10	AGCCAA AGCATT GATGTT CA	46	5237	5256	119
53272 2	1594	1613	Экзон 10	CTTGGA AGCCAA AGCATT GA	35	5243	5262	120
53272 3	1600	1619	Экзон 10	GTCTTTC TTGGAA	43	5249	5268	121

				GCCAAA G				
53272 4	1606	1625	Экзон 10	CTCATTG TCTTTCT TGGAAG	40	5255	5274	122
53272 5	1612	1631	Экзон 10	ATGTTG CTCATTG TCTTTCT	49	5261	5280	123
53272 6	1618	1637	Экзон 10	GAACAC ATGTTG CTCATTG T	68	5267	5286	124
53272 7	1624	1643	Экзон 10	GACTTT GAACAC ATGTTG CT	54	5273	5292	125
53272 8	1630	1649	Экзон 10	ATCCTTG ACTTTG AACACA T	61	5279	5298	126
53272 9	1636	1655	Экзон 10	TTCCATA TCCTTGA CTTTGA	55	5285	5304	127
53273 0	1642	1661	Экзон 10	CAGGTT TTCCATA TCCTTGA	51	5291	5310	440
53273 1	1686	1705	Сочлен ение экзона 10-11	CTCAGA GACTGG CTTTCAT C	41	5827	5846	129
53273 2	1692	1711	Экзон 11	CAGAGA CTCAGA GACTGG CT	59	5833	5852	130
51625 2	1698	1717	Экзон 11	ATGCCA CAGAGA CTCAGA	57	5839	5858	131

				GA				
53273 3	1704	1723	Экзон 11	CAAACC ATGCCA CAGAGA CT	34	5845	5864	132
53273 4	1710	1729	Экзон 11	TGTTCCC AAACCA TGCCAC A	51	5851	5870	133
53273 5	1734	1753	Экзон 11	TTGTGGT AATCGG TACCCTT	50	5875	5894	134
53273 6	1740	1759	Экзон 11	GGTTGC TTGTGGT AATCGG T	64	5881	5900	135
53273 7	1746	1765	Экзон 11	TGCCAT GGTTGC TTGTGGT A	40	5887	5906	136
53273 8	1752	1771	Экзон 11	TTGGCCT GCCATG GTTGCTT	49	5893	5912	137
53273 9	1758	1777	Экзон 11	GAGATC TTGGCCT GCCATG G	47	5899	5918	138
53274 0	1803	1822	Экзон 12	ACAGCC CCCATA CAGCTC TC	48	6082	6101	139
53274 1	1809	1828	Экзон 12	GACACC ACAGCC CCCATA CA	40	6088	6107	140
53274 2	1815	1834	Экзон 12	TACTCA GACACC	33	6094	6113	141

				ACAGCC CC				
53274 3	1821	1840	Экзон 12	ACAAAG TACTCA GACACC AC	39	6100	6119	142
53274 4	1827	1846	Экзон 12	GTCAGC ACAAAG TACTCA GA	45	6106	6125	143
53274 5	1872	1891	Экзон 12	TTGATTG AGTGTT CCTTGTC	42	6151	6170	144
53274 6	1878	1897	Экзон 12	CTGACC TTGATTG AGTGTT C	53	6157	6176	145
53274 7	1909	1928	Экзон 13	TATCTCC AGGTCC CGCTTCT	31	6403	6422	146
53274 8	1967	1986	Экзон 13	GAATTC CTGCTTC TTTTTTC	30	6461	6480	147
53274 9	1973	1992	Экзон 13	ATTCAG GAATTC CTGCTTC T	40	6467	6486	148
53275 0	1979	1998	Экзон 13	CATAAA ATTCAG GAATTC CT	45	6473	6492	149
53275 1	1985	2004	Экзон 13	CATAGT CATAAA ATTCAG GA	43	6479	6498	150
53275 2	2006	2025	Экзон 13	TGAGCT TGATCA	61	6500	6519	151

				GGGCAA CG				
53275 3	2012	2031	Экзон 13	TATTCTT GAGCTT GATCAG G	47	6506	6525	152
53275 4	2048	2067	Сочлен ение экзона 13-14	GACAAA TGGGCC TGATAG TC	35	н.д.	н.д.	153
53275 5	2070	2089	Экзон 14	GTTGTTC CCTCGG TGCAGG G	43	6659	6678	154
53275 6	2076	2095	Экзон 14	GCTCGA GTTGTTC CCTCGG T	51	6665	6684	155
53275 7	2082	2101	Экзон 14	CTCAAA GCTCGA GTTGTTC C	36	6671	6690	156
53275 8	2088	2107	Экзон 14	GGAAGC CTCAAA GCTCGA GT	54	6677	6696	157
53275 9	2094	2113	Экзон 14	GTTGGA GGAAGC CTCAAA GC	52	6683	6702	158
53276 0	2100	2119	Экзон 14	GTGGTA GTTGGA GGAAGC CT	22	6689	6708	159
53276 1	2106	2125	Экзон 14	TGGCAA GTGGTA GTTGGA	34	6695	6714	160
				GG				
53276 2	2112	2131	Экзон 14	TGTTGCT GGCAAG TGGTAG T	52	6701	6720	161

Пример 117. Антисмысловое ингибирование человеческого фактора комплемента В (CFB) в HepG2 клетках МОЕ гепатома.

Были сконструированы дополнительные антисмысловые олигонуклеотиды, направленные на нуклеиновую кислоту человеческого фактора комплемента В (CFB), и были протестированы на их воздействие *in vitro* на мРНК CFB. Антисмысловые олигонуклеотиды были протестированы в серии экспериментов, которые имели аналогичные условия культивирования. Результаты для каждого эксперимента представлены в отдельных таблицах, показанных ниже. Культивированные клетки HepG2 с плотностью 20000 клеток на лунку были трансфицированы с использованием электропорации с 5000 нМ антисмыслового олигонуклеотида. После периода обработки в течение около 24 ч, РНК выделяли из клеток и уровни мРНК CFB измеряли методом количественной ПЦР в реальном времени. Набор человеческих праймеров RTS3459 был использован для измерения уровней мРНК. Уровни мРНК CFB были скоррек-

тированы в соответствии с содержанием суммарной РНК, измеренным с помощью RIBOGREEN®. Результаты представлены как процентное ингибирование CFB относительно необработанных контрольных клеток.

Впервые сконструированные химерные антисмысловые олигонуклеотиды, указанные в представленных ниже таблицах, были сконструированы как 5-10-5 МОЕ гэммеры. Гэммеры имеют 20 нуклеозидов в длину, причем центральный гэм состоит из десяти 2'-дезоксинуклеозидов и окружен крыльями с 5' конца и в 3' конца, содержащими по пять нуклеозидов каждое. Каждый нуклеозид 5'-крыла и нуклеозид 3'-крыла имеет 2'-МОЕ модификации. Межнуклеозидные связи в каждом гэммере представляют собой тиофосфатные (P=S) связи. Все остатки цитозина в каждом гэммере представляют собой 5-метилцитозины. "Сайт инициации" обозначает самый крайний 5' нуклеозид, на который направлен гэммер в последовательности гена человека. "Сайт терминации" обозначает самый крайний 3' нуклеозид, на который направлен гэммер в последовательности гена человека. Каждый гэммер, перечисленный в представленных ниже таблицах, направлен на мРНК CFB человека, обозначенную в данном описании как SEQ ID NO: 1 (с номером доступа GENBANK NM_001710.5) или на геномную последовательность CFB человека, обозначенную в настоящем документе как SEQ ID NO: 2 (с номером доступа GENBANK NT_007592.15, усеченную с нуклеотида 31852000 по 31861000), или на обе последовательности, "н/д" означает, что антисмысловый олигонуклеотид не направлен на указанную конкретную последовательность гена с 100% комплементарностью. Если в определенной таблице не показано выравнивание последовательности к гену-мишени, то следует понимать, что ни один из олигонуклеотидов, представленных в указанной таблице, не выравнивается со 100% комплементарностью с указанным геном-мишенью.

Таблица 130

Ингибирование мРНК CFB 5-10-5 МОЕ гэммерами, направленными на SEQ ID NO: 1

ISIS №	SEQ ID NO: 1 сайт инициации	SEQ ID NO: 1 сайт терминации	Область -мишень	Последовательность	% ингибирования	SEQ ID NO
588570	150	169	Экзон 1	TGGTCACATTCCCTTCCCT	54	396
588571	152	171	Экзон 1	CCTGGTCACATTCCCTTCCC	63	397
532614	154	173	Экзон 1	GACCTGGTCACATTCCCTTC	64	12
588572	156	175	Экзон 1	TAGACCTGGTCACATTCCCT	62	398
588573	158	177	Экзон 1	CCTAGACCTGGTCACATTCC	53	399
588566	2189	2208	Экзон 15	CCTTCCGAGTCAGCTTTTTC	60	400

5885 67	2191	2210	Экзон 15	CTCCTTCCGAGTCAGCT TTT	61	401
5327 70	2193	2212	Экзон 15	ACCTCCTTCCGAGTCA GCTT	77	198
5885 68	2195	2214	Экзон 15	AGACCTCCTTCCGAGT CAGC	72	402
5885 69	2197	2216	Экзон 15	GTAGACCTCCTTCCGA GTCA	46	403
5885 74	2453	2472	Экзон 18	TTTGCCGCTTCTGGTTT TTG	46	404
5885 75	2455	2474	Экзон 18	CTTTTGCCGCTTCTGGT TTT	41	405
5328 00	2457	2476	Экзон 18	TGCTTTTGCCGCTTCTG GTT	69	228
5885 76	2459	2478	Экзон 18	CCTGCTTTTGCCGCTTC TGG	61	406
5885 77	2461	2480	Экзон 18	TACCTGCTTTTGCCGCT TCT	51	407
5163 50	2550	2569	Экзон 18	AGAAAACCCAAATCCT CATC	71	408
5885 09	2551	2570	Экзон 18	TAGAAAACCCAAATCC TCAT	58	409
5885 10	2552	2571	Экзон 18	ATAGAAAACCCAAATC CTCA	57	410
5885 11	2553	2572	Экзон 18	TATAGAAAACCCAAAT CCTC	57	411
5885 12	2554	2573	Экзон 18	TTATAGAAAACCCAAA TCCT	44	412
5885 13	2555	2574	Экзон 18	CTTATAGAAAACCCAA ATCC	37	413
5885 14	2556	2575	Экзон 18	CCTTATAGAAAACCCA AATC	50	414
5885 15	2557	2576	Экзон 18	CCCTTATAGAAAACCC AAAT	45	415
5885 16	2558	2577	Экзон 18	CCCCTTATAGAAAACC CAAA	60	416
5885	2559	2578	Экзон	ACCCCTTATAGAAAAC	67	417

17			18	CCAA		
5885 18	2560	2579	Экзон 18	AACCCCTTATAGAAAA CCCA	57	418
5885 19	2561	2580	Экзон 18	AAACCCCTTATAGAAA ACCC	61	419
5885 20	2562	2581	Экзон 18	GAAACCCCTTATAGAA AACC	27	420
5885 21	2563	2582	Экзон 18	GGAAACCCCTTATAGA AAAC	25	421
5885 22	2564	2583	Экзон 18	AGGAAACCCCTTATAG AAAA	36	422
5885 23	2565	2584	Экзон 18	CAGGAAACCCCTTATA GAAA	36	423
5885 24	2566	2585	Экзон 18	GCAGGAAACCCCTTAT AGAA	46	424
5885 25	2567	2586	Экзон 18	AGCAGGAAACCCCTTA TAGA	38	425
5885 26	2568	2587	Экзон 18	CAGCAGGAAACCCCTT ATAG	47	426
5885 27	2569	2588	Экзон 18	CCAGCAGGAAACCCCT TATA	68	427
5885 28	2570	2589	Экзон 18	TCCAGCAGGAAACCCC TTAT	63	428
5328 09	2571	2590	Экзон 18	GTCCAGCAGGAAACCC CTTA	85	237
5885 29	2572	2591	Экзон 18	TGTCCAGCAGGAAACC CCTT	76	429
5885 30	2573	2592	Экзон 18	CTGTCCAGCAGGAAAC CCCT	74	430
5885 31	2574	2593	Экзон 18	CCTGTCCAGCAGGAAA CCCC	75	431
5885 32	2575	2594	Экзон 18	CCCTGTCCAGCAGGAA ACCC	73	432
5885 33	2576	2595	Экзон 18	CCCCTGTCCAGCAGGA AACC	82	433
5328 10	2577	2596	Экзон 18	GCCCCTGTCCAGCAGG AAAC	88	238

5885 34	2578	2597	Экзон 18	CGCCCCTGTCCAGCAG GAAA	86	434
5885 35	2579	2598	Экзон 18	ACGCCCCTGTCCAGCA GGAA	86	435
5885 36	2580	2599	Экзон 18	CACGCCCCTGTCCAGC AGGA	93	436
5885 37	2581	2600	Экзон 18	CCACGCCCCTGTCCAG CAGG	92	437
5885 38	2582	2601	Экзон 18	CCCACGCCCCTGTCCA GCAG	94	438
5885 39	2583	2602	Экзон 18	TCCCACGCCCCTGTCCA GCA	96	439
5885 40	2584	2603	Экзон 18	ATCCCACGCCCCTGTCC AGC	88	440
5885 41	2585	2604	Экзон 18	AATCCCACGCCCCTGT CCAG	79	441
5885 42	2586	2605	Экзон 18	CAATCCCACGCCCCTG TCCA	83	442
5885 43	2587	2606	Экзон 18	TCAATCCCACGCCCCT GTCC	86	443
5885 44	2588	2607	Экзон 18	TTCAATCCCACGCCCCT GTC	90	444
5885 45	2589	2608	Экзон 18	ATTCAATCCCACGCCC CTGT	92	445
5885 46	2590	2609	Экзон 18	AATTCAATCCCACGCC CCTG	92	446
5885 47	2591	2610	Экзон 18	TAATTCAATCCCACGC CCCT	88	447
5885 48	2592	2611	Экзон 18	TTAATTCAATCCCACGC CCC	93	448
5885 49	2593	2612	Экзон 18	TTTAATTCAATCCCACG CCC	88	449
5885 50	2594	2613	Экзон 18	TTTAATTCAATCCCAC GCC	89	450
5885 51	2595	2614	Экзон 18	GTTTAAATTCAATCCCA CGC	94	451
5885	2596	2615	Экзон	TGTTTAAATTCAATCCC	93	452

52			18	ACG		
5885 53	2597	2616	Экзон 18	CTGTTTTAATTCAATCC CAC	96	453
5885 54	2598	2617	Экзон 18	GCTGTTTTAATTCAATC CCA	98	454
5328 11	2599	2618	Экзон 18	AGCTGTTTTAATTCAAT CCC	97	239
5328 11	2599	2618	Экзон 18	AGCTGTTTTAATTCAAT CCC	95	239
5885 55	2600	2619	Экзон 18	CAGCTGTTTTAATTCAA TCC	93	455
5885 56	2601	2620	Экзон 18	GCAGCTGTTTTAATTCA ATC	96	456
5885 57	2602	2621	Экзон 18	CGCAGCTGTTTTAATTC AAT	98	457
5885 58	2603	2622	Экзон 18	TCGCAGCTGTTTTAATT CAA	95	458
5329 17	2604	2623	Экзон 18	GTCGCAGCTGTTTTAAT TCA	97	317
5885 59	2605	2624	Экзон 18	TGTCGCAGCTGTTTTAA TTC	95	459
5885 60	2606	2625	Экзон 18	TTGTCGCAGCTGTTTTA ATT	92	460
5885 61	2607	2626	Экзон 18	GTTGTCGCAGCTGTTTT AAT	93	461
5329 52	2608	2627	Экзон 18	TGTTGTCGCAGCTGTTT TAA	88	395
5885 62	2609	2628	Экзон 18 / повтор	TTGTTGTCGCAGCTGTT TTA	90	462
5885 63	2610	2629	Экзон 18 / повтор	TTTGTGTCGCAGCTGT TTT	89	463
5885 64	2611	2630	Экзон 18 / повтор	TTTTGTTGTCGCAGCTG TTT	92	464
5885	2612	2631	Экзон	TTTTGTTGTCGCAGCT	88	465
65			18 / повтор	GTT		

Ингибирование мРНК CFB 5-10-5 МОЕ гепмерами, направленными на SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2

ISIS №	SEQ ID NO: 1 сайт инициации	SEQ ID NO: 1 сайт терминации	Область - мишень	Последовательность	% ингибирования	SEQ ID NO: 2: сайт инициации	SEQ ID NO: 2: сайт терминации	SEQ ID NO:
588685	н.д.	н.д.	Экзон 1	GGATCCAGCTC ACTCCCCTG	48	1596	1615	466
588686	н.д.	н.д.	Экзон 1	AAATAAGGATC CAGCTCACT	29	1602	н.д.	467
588688	н.д.	н.д.	Экзон 1	GACCAGAAATA AGGATCCAG	58	1608	1627	468
588690	н.д.	н.д.	Экзон 1	CTTAGGGACCA GAAATAAGG	45	1614	1633	469
588692	н.д.	н.д.	Экзон 1	CACCCACTTAG GGACCAGAA	36	1620	1639	470
588694	н.д.	н.д.	Экзон 1	ACCACCCACTT AGGGACCAG	47	1622	1641	471
588696	н.д.	н.д.	Экзон 1	AGGTCCAGGAC TCTCCCCTT	96	1685	1704	472
588698	н.д.	н.д.	Экзон 1	AAGGTCCAGGA CTCTCCCCT	96	1686	1705	473
588700	н.д.	н.д.	Экзон 1	AAACTGCAGAA GTCCCACCC	2	1716	1735	474
588586	30	49	Экзон 1	GGAGGGCCCCG CTGAGCTGC	59	1751	1770	475
588587	48	67	Экзон 1	TCCCGGAACAT CCAAGCGGG	45	1769	1788	476

58858 8	56	75	Экзон 1	CATCACTTTCC CGGAACATC	39	1777	н.д.	477
58858 9	151	170	Экзон 1	CTGGTCACATT CCCTTCCCC	29	1872	1891	478
58859 0	157	176	Экзон 1	CTAGACCTGGT CACATTCCC	47	1878	1897	479
58859 1	339	358	Сочле- ение экзона 1-2	GGAGTGGTGGT CACACCTCC	44	н.д.	н.д.	480
58859 2	384	403	Экзон 2	ACCCCCTCCAG AGAGCAGGA	43	2192	2211	481
58859 3	390	409	Экзон 2	ATCTCTACCCC CTCCAGAGA	34	2198	2217	482
58859 4	467	486	Экзон 2	GGTACGGGTAG AAGCCAGAA	17	2275	2294	483
58859 5	671	690	Экзон 3	GGAGAGTGTA CCGTCATAG	37	2879	2898	484
58859 6	689	708	Экзон 3	TGCGATTGGCA GAGCCCCGG	18	2897	2916	485
58859 7	695	714	Экзон 3	GGCAGGTGCGA TTGGCAGAG	32	2903	2922	486
58859 8	707	726	Экзон 3	GGCCATTCACT TGGCAGGTG	45	2915	2934	487
58859 9	738	757	Экзон 3	TTGTCACAGAT CGCTGTCTG	52	2946	2965	488
58860 0	924	943	Сочле- ение экзона 4-5	AAGGAGTCTTG GCAGGAAGG	39	н.д.	н.д.	489
58860 1	931	950	Сочле- ение экзона 4-5	GTACATGAAGG AGTCTTGGC	37	н.д.	н.д.	490
58860 2	959	978	Экзон 5	AAGCTTCGGCC ACCTCTTGA	21	3542	3561	491
58860	1089	1108	Экзон 6	CCATCTAGCAC	22	3773	3792	492

3				CAGGTAGAT				
58860 4	1108	1127	Экзон 6	GGCCCCAATGC TGTCTGATC	21	3792	3811	493
58860 6	1150	1169	Экзон 6	AATTAAGTTGA CTAGACACT	56	3834	3853	494
58860 8	1162	1181	Сочле- ние экзона 6-7	TGCCACCTTCT CAATTAAGT	50		19	495
58857 8	1167	1186	Сочле- ние экзона 6-7	TAACTTGCCAC CTTCTCAAT	23	н.д.	н.д.	496
58857 9	1169	1188	Сочле- ние экзона 6-7	CATAACTTGCC ACCTTCTCA	23	н.д.	н.д.	497
53269 2	1171	1190	Сочле- ние экзона 6-7	ACCATAACTTG CCACCTTCT	15	н.д.	н.д.	90
58858 0	1173	1192	Сочле- ние экзона 6-7	ACACCATAACT TGCCACCTT	16	н.д.	н.д.	498
58858 1	1175	1194	Сочле- ние экзона 6-7	TCACACCATAA CTTGCCACC	14	4151	4170	499
58861 0	1319	1338	Экзон 8	TAGTCCCTGAC TTCAACTTG	50	4612	4631	500
58861 2	1325	1344	Экзон 8	TGGTGTTAGTC CCTGACTTC	47	4618	4637	501
58861 4	1396	1415	Экзон 8	GCGGTTCCAGC CTTCAGGAG	47	4689	4708	502
58861 6	1421	1440	Экзон 8	TCATGAGGATG ATGACATGG	51	4714	4733	503

58861 8	1446	1465	Экзон 9	CCGCCCATGTT GTGCAATCC	18	5020	5039	504
58862 0	1458	1477	Экзон 9	GTAATTGGGTC CCCGCCCAT	40	5032	5051	505
58862 3	1482	1501	Экзон 9	AAGTCCCGGAT CTCATCAAT	40	5056	5075	506
58862 4	1542	1561	Сочле- ние экзона 9-10	AACACATAGAC ATCCAGATA	45	н.д.	н.д.	507
58862 6	1585	1604	Экзон 10	CAAAGCATTGA TGTTCACCT	43	5234	5253	508
58862 8	1621	1640	Экзон 10	TTTGAACACAT GTTGCTCAT	45	5270	5289	509
58863 1	1646	1665	Экзон 10	CTTCCAGGTTT TCCATATCC	53	5295	5314	510
58863 2	1647	1666	Экзон 10	TCTTCCAGGTT TTCCATATC	56	5296	5315	511
58863 4	1689	1708	Экзон 11	AGACTCAGAGA CTGGCTTTC	35	5830	5849	512
58863 6	1749	1768	Экзон 11	GCCTGCCATGG TTGCTTGTG	55	5890	5909	513
58863 8	1763	1782	Экзон 11	TGACTGAGATC TTGGCCTGC	78	5904	5923	514
58864 0	1912	1931	Экзон 13	TTCTATCTCCA GGTCCCGCT	95	6406	6425	515
58864 2	1982	2001	Экзон 13	AGTCATAAAAT TCAGGAATT	44	6476	6495	516
58864 5	2073	2092	Экзон 14	CGAGTTGTTCC CTCGGTGCA	40	6662	6681	517
58864 6	2085	2104	Экзон 14	AGCCTCAAAGC TCGAGTTGT	57	6674	6693	518
58864 8	2091	2110	Экзон 14	GGAGGAAGCCT CAAAGCTCG	48	6680	6699	519
58865 1	2097	2116	Экзон 14	GTAGTTGGAGG AAGCCTCAA	40	6686	6705	520
58865	2103	2122	Экзон	CAAGTGGTAGT	43	6692	6711	521

2			14	TGGAGGAAG				
58865 4	2166	2185	Экзон 15	TCCTCAGACAC AAACAGAGC	13	6954	6973	522
58865 6	2172	2191	Экзон 15	TTCTCCTCCTCA GACACAAA	55	6960	6979	523
58865 8	2196	2215	Экзон 15	TAGACCTCCTT CCGAGTCAG	44	6984	7003	524
58866 0	2202	2221	Экзон 15	TTGATGTAGAC CTCCTTCCG	50	6990	7009	525
58858 2	2219	2238	Сочле ение экзона 15-16	CTTTCTTATCCC CATTCTTG	19	н.д.	н.д.	526
58858 3	2221	2240	Сочле ение экзона 15-16	GCCTTTCTTATC CCCATTCT	14	н.д.	н.д.	527
53277 5	2223	2242	Сочле ение экзона 15-16	CTGCCTTTCTTA TCCCCATT	3	н.д.	н.д.	203
58858 4	2225	2244	Сочле ение экзона 15-16	AGCTGCCTTTC TTATCCCCA	18	н.д.	н.д.	528
58866 2	2226	2245	Сочле ение экзона 15-16	CAGCTGCCTTT CTTATCCCC	27	н.д.	н.д.	529
58858 5	2227	2246	Сочле ение экзона 15-16	ACAGCTGCCTT TCTTATCCC	59	н.д.	н.д.	530
58866 4	2238	2257	Экзон 16	GCATCTCTCTC ACAGCTGCC	49	7122	7141	531
58866 6	2276	2295	Экзон 16	AGATGTCCTTG ACTTTGTCA	41	7160	7179	532

58866 8	2330	2349	Экзон 16	CAGCATAGGGA CTCACTCCT	41	7214	7233	533
58867 0	2361	2380	Сочлен ение экзона 16-17	CCGCCAGAATC ACCTCTGCA	43	н.д.	н.д.	534
58867 2	2397	2416	Экзон 17	TGAATGAAACG ACTTCTCTT	52	7362	7381	535
58867 4	2430	2449	Экзон 18	ACATCCACTAC TCCCCAGCT	39	7665	7684	536
58867 6	2448	2467	Экзон 18	CGCTTCTGGTT TTTGCAGAC	69	7683	7702	537
58867 8	2454	2473	Экзон 18	TTTTGCCGCTTC TGGTTTTT	46	7689	7708	538
58868 0	2466	2485	Экзон 18	GCAGGTACCTG CTTTTGCCG	47	7701	7720	539
58868 2	2532	2551	Экзон 18	TCTTGGAGTTT CTCCTTCAG	58	7767	7786	540
53281 1	2599	2618	Экзон 18	AGCTGTTTAA TTCAATCCC	10	7834	7853	239
53291 7	2604	2623	Экзон 18	GTCGCAGCTGT TTTAATTCA	11	7839	7858	317

Пример 118. Антисмысловое ингибирование человеческого фактора комплемента В (CFB) в HepG2 клетках МОЕ гэмперами.

Были сконструированы антисмысловые олигонуклеотиды, направленные на нуклеиновую кислоту человеческого фактора комплемента В (CFB), и были протестированы на их воздействие *in vitro* на мРНК CFB. Антисмысловые олигонуклеотиды были протестированы в серии экспериментов, которые имели аналогичные условия культивирования. Результаты для каждого эксперимента представлены в отдельных таблицах, показанных ниже. Культивированные клетки HepG2 с плотностью 20000 клеток на лунку были трансфицированы с использованием электропорации с 3000 нМ антисмыслового олигонуклеотида. После периода обработки в течение около 24 ч, РНК выделяли из клеток и уровни мРНК CFB измеряли методом количественной ПЦР в реальном времени. Набор человеческих праймеров RTS3459 был использован для измерения уровней мРНК. Уровни мРНК CFB были скорректированы в соответствии с содержанием суммарной РНК, измеренным с помощью RIBOGREEN®. Результаты представлены как процентное ингибирование CFB относительно необработанных контрольных клеток.

Впервые сконструированные химерные антисмысловые олигонуклеотиды в представленных ниже таблицах были сконструированы как 4-8-5 МОЕ, 5-9-5 МОЕ, 5-10-5 МОЕ, 3-10-4 МОЕ, 3-10-7 МОЕ, 6-7-6- МОЕ, 6-8-6 МОЕ или 5-7-5 МОЕ гэмперы, или как дезокси, МОЕ и (S)-cEt олигонуклеотиды.

Гэмперы 4-8-5 МОЕ имеют 17 нуклеозидов в длину, причем центральный гэм состоит из восьми 2'-дезоксинуклеозидов и окружен крыльями с 5' конца и в 3' конца, содержащими четыре и пять нуклеозидов соответственно. Гэмперы 5-9-5 МОЕ имеют 19 нуклеозидов в длину, причем центральный гэм состоит из девяти 2'-дезоксинуклеозидов и окружен крыльями с 5' конца и в 3' конца, содержащими по пять нуклеозидов каждое. Гэмперы 5-10-5 МОЕ имеют 20 нуклеозидов в длину, причем центральный гэм состоит из десяти 2'-дезоксинуклеозидов и окружен крыльями с 5' конца и в 3' конца, содержащими по пять нуклеозидов каждое. Гэмперы 5-7-5 МОЕ имеют 17 нуклеозидов в длину, причем центральный гэм состоит из семи 2'-дезоксинуклеозидов и окружен крыльями с 5' конца и в 3' конца, содержащими по пять нуклеозидов каждое. Гэмперы 3-10-4 МОЕ имеют 17 нуклеозидов в длину, причем центральный гэм состоит из десяти 2'-дезоксинуклеозидов и окружен крыльями с 5' конца и в 3' конца, содержащими три и четыре нуклеозида соответственно. Гэмперы 3-10-7 МОЕ имеют 20 нуклеозидов в длину, причем центральный гэм состоит из десяти 2'-дезоксинуклеозидов и окружен крыльями с 5' конца и в 3' конца, содержащими три и семь нуклеозидов соответственно. Гэмперы 6-7-6 МОЕ имеют 19 нуклеозидов в длину, причем центральный гэм состоит из семи 2'-дезоксинуклеозидов и окружен крыльями с 5' конца и в 3' конца, содержащими по шесть нуклеозидов каждое. Гэмперы 6-8-6 МОЕ имеют 20 нуклеозидов в длину, причем центральный гэм состоит из восьми 2'-дезоксинуклеозидов и окружен крыльями с 5' конца и в 3' конца, содержащими по шесть нуклеозидов каждое. Межнуклеозидные связи в каждом гэмпере представляют собой тиофосфатные (P=S) связи. Все остатки цитозина в каждом гэмпере представляют собой 5-метилцитозины.

Дезокси, МОЕ и (S)-cEt олигонуклеотиды имеют 16 нуклеозидов в длину, причем нуклеозид содер-

жит либо модификацию сахара MOE, либо модификацию сахара (S)-cEt, либо дезокси модификацию. В колонке "Химизм" описаны модификации сахара для каждого олигонуклеотида. "k" означает (S)-cEt модификацию сахара; "d" означает дезоксирибозу; и "e" означает модификацию MOE.

"Сайт инициации" обозначает самый крайний 5' нуклеотид, на который направлен гэлмер в последовательности гена человека. "Сайт терминации" обозначает самый крайний 3' нуклеотид, на который направлен гэлмер в последовательности гена человека. Каждый гэлмер, перечисленный в представленных ниже таблицах, направлен на мРНК CFB человека, обозначенную в данном описании как SEQ ID NO: 1 (с номером доступа GENBANK NM_001710.5) или на геномную последовательность CFB человека, обозначенную в настоящем документе как SEQ ID NO: 2 (с номером доступа GENBANK NT_007592.15, усеченную с нуклеотида 31852000 по 31861000), или на обе последовательности, "н/д" означает, что антисмысловый олигонуклеотид не направлен на указанную конкретную последовательность гена с 100% комплементарностью.

Таблица 132

Ингибирование мРНК CFB дезокси, MOE и (S)-cEt олигонуклеотидами, направленными на SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2

ISIS №	SEQ ID NO: 1 Сайт	SEQ ID NO: 1 сайт терм	Область-мишень	Последовательность	% ингибирования	SEQ ID NO: 2 Сайт инициации	SEQ ID NO: 2 Сайт терминации	Мотив	SEQ ID NO:
	инициация	инации							
532811	2599	2618	Экзон 18	AGCTGTTTAAATTC AATCCC	10	7834	7853	eeeeeddddddd ddeeeee	239
588884	48	63	Экзон 1	GGAACATCCAAGC GGG	79	1769	1784	eekeeeeeeeee kke	541
588872	154	169	Экзон 1	TGGTCACATTCCC TTC	91	1875	1890	eekeeeeeeeee kke	542
588873	156	171	Экзон 1	CCTGGTCACATTC CCT	91	1877	1892	eekeeeeeeeee kke	543
588874	158	173	Экзон 1	GACCTGGTCACAT TCC	91	1879	1894	eekeeeeeeeee kke	544
588878	1171	1186	Сочленение экзона 6-7	TAACCTGCCACCT TCT	92	н.д.	н.д.	eekeeeeeeeee kke	545
588879	1173	1188	Сочленение экзона 6-7	CATAACTTGCCAC CTT	94	н.д.	н.д.	eekeeeeeeeee kke	546
588880	1175	1190	Сочленение экзона 6-7	ACCATAACTTGCC ACC	89	4151	4166	eekeeeeeeeee kke	547
588869	2193	2208	Экзон 15	CCTCCGAGTCAG CTT	17	6981	6996	eekeeeeeeeee kke	548
588870	2195	2210	Экзон 15	CTCCTCCGAGTC AGC	78	6983	6998	eekeeeeeeeee kke	549
588871	2197	2212	Экзон 15	ACCTCCTCCGAG TCA	80	6985	7000	eekeeeeeeeee kke	550
588881	2223	2238	Сочленение экзона 15-16	CTTCTTATCCCCA TT	93	н.д.	н.д.	eekeeeeeeeee kke	551
588882	2225	2240	Сочленение	GCCTTCTTATCCC CA	88	н.д.	н.д.	eekeeeeeeeee kke	552

			Экзона 15-16						
58888 3	2227	2242	Сочле нение Экзона 15-16	CTGCCTTTCTTATC CC	90	н.д.	н.д.	eekeeeeeee kke	553
58887 5	2457	2472	Экзон 18	TTTGCCGCTTCTGG TT	81	7692	7707	eekeeeeeee kke	554
58887 6	2459	2474	Экзон 18	CTTTTGCCGCTTCT GG	95	7694	7709	eekeeeeeee kke	555
58887 7	2461	2476	Экзон 18	TGCTTTTGCCGCTT CT	91	7696	7711	eekeeeeeee kke	556
58880 7	2551	2566	Экзон 18	AAACCCAAATCCT CAT	82	7786	7801	eekeeeeeee kke	557
58880 8	2553	2568	Экзон 18	GAAAACCCAAATC CTC	69	7788	7803	eekeeeeeee kke	558
58880 9	2555	2570	Экзон 18	TAGAAAACCCAAA TCC	51	7790	7805	eekeeeeeee kke	559
58881 0	2556	2571	Экзон 18	ATAGAAAACCCAA ATC	23	7791	7806	eekeeeeeee kke	560
58881 1	2559	2574	Экзон 18	CTTATAGAAAACC CAA	13	7794	7809	eekeeeeeee kke	561
58881 2	2560	2575	Экзон 18	CCTTATAGAAAAC CCA	29	7795	7810	eekeeeeeee kke	562
58881 3	2561	2576	Экзон 18	CCCTTATAGAAAA CCC	53	7796	7811	eekeeeeeee kke	563
58881 4	2562	2577	Экзон 18	CCCCTTATAGAAA ACC	86	7797	7812	eekeeeeeee kke	564
58881 5	2563	2578	Экзон 18	ACCCCTTATAGAA AAC	76	7798	7813	eekeeeeeee kke	565
58881 6	2564	2579	Экзон 18	AACCCCTTATAGA AAA	33	7799	7814	eekeeeeeee kke	566
58881 7	2565	2580	Экзон 18	AAACCCCTTATAG AAA	48	7800	7815	eekeeeeeee kke	567
58881 8	2566	2581	Экзон 18	GAAACCCCTTATA GAA	44	7801	7816	eekeeeeeee kke	568
58881	2567	2582	Экзон	GGAAACCCCTTAT	74	7802	7817	eekeeeeeee	569

9			18	AGA				kke	
588820	2568	2583	ЭКОН 18	AGGAAACCCCTTA TAG	68	7803	7818	eeekddddddddd kke	570
588821	2569	2584	ЭКОН 18	CAGGAAACCCCTT ATA	45	7804	7819	eeekddddddddd kke	571
588822	2570	2585	ЭКОН 18	GCAGGAAACCCCT TAT	50	7805	7820	eeekddddddddd kke	572
588823	2571	2586	ЭКОН 18	AGCAGGAAACCCC TTA	54	7806	7821	eeekddddddddd kke	573
588824	2572	2587	ЭКОН 18	CAGCAGGAAACCC CTT	35	7807	7822	eeekddddddddd kke	574
588825	2573	2588	ЭКОН 18	CCAGCAGGAAACC CCT	11	7808	7823	eeekddddddddd kke	575
588826	2574	2589	ЭКОН 18	TCCAGCAGGAAAC CCC	19	7809	7824	eeekddddddddd kke	576
588827	2575	2590	ЭКОН 18	GTCCAGCAGGAAA CCC	42	7810	7825	eeekddddddddd kke	577
588828	2576	2591	ЭКОН 18	TGTCCAGCAGGAA ACC	0	7811	7826	eeekddddddddd kke	578
588829	2577	2592	ЭКОН 18	CTGTCCAGCAGGA AAC	49	7812	7827	eeekddddddddd kke	579
588830	2578	2593	ЭКОН 18	CCTGTCCAGCAGG AAA	11	7813	7828	eeekddddddddd kke	580
588831	2579	2594	ЭКОН 18	CCCTGTCCAGCAG GAA	20	7814	7829	eeekddddddddd kke	581
588832	2580	2595	ЭКОН 18	CCCCTGTCCAGCA GGA	19	7815	7830	eeekddddddddd kke	582
588833	2581	2596	ЭКОН 18	GCCCCTGTCCAGC AGG	12	7816	7831	eeekddddddddd kke	583
588834	2582	2597	ЭКОН 18	CGCCCCTGTCCAG CAG	10	7817	7832	eeekddddddddd kke	584
588835	2583	2598	ЭКОН 18	ACGCCCTGTCCA GCA	13	7818	7833	eeekddddddddd kke	585
588836	2584	2599	ЭКОН 18	CACGCCCTGTCC AGC	13	7819	7834	eeekddddddddd kke	586
588837	2585	2600	ЭКОН 18	CCACGCCCTGTC CAG	39	7820	7835	eeekddddddddd kke	587

58883 8	2586	2601	ЭКОН 18	CCCACGCCCTGT CCA	54	7821	7836	eekeeeeeee kke	588
58883 9	2587	2602	ЭКОН 18	TCCCACGCCCTG TCC	51	7822	7837	eekeeeeeee kke	589
58884 0	2588	2603	ЭКОН 18	ATCCCACGCCCT GTC	65	7823	7838	eekeeeeeee kke	590
58884 1	2589	2604	ЭКОН 18	AATCCCACGCCCC TGT	59	7824	7839	eekeeeeeee kke	591
58884 2	2590	2605	ЭКОН 18	CAATCCCACGCC CTG	70	7825	7840	eekeeeeeee kke	592
58884 3	2591	2606	ЭКОН 18	TCAATCCCACGCC CCT	0	7826	7841	eekeeeeeee kke	593
58884 4	2592	2607	ЭКОН 18	TTCAATCCCACGC CCC	48	7827	7842	eekeeeeeee kke	594
58884 5	2593	2608	ЭКОН 18	ATTCAATCCCACG CCC	46	7828	7843	eekeeeeeee kke	595
58884 6	2594	2609	ЭКОН 18	AATCAATCCCAC GCC	67	7829	7844	eekeeeeeee kke	596
58884 7	2595	2610	ЭКОН 18	TAATTCAATCCCA CGC	75	7830	7845	eekeeeeeee kke	597
58884 8	2596	2611	ЭКОН 18	TTAATTCAATCCC ACG	76	7831	7846	eekeeeeeee kke	598
58884 9	2597	2612	ЭКОН 18	TTTAATTCAATCCC AC	94	7832	7847	eekeeeeeee kke	599
58885 0	2598	2613	ЭКОН 18	TTTTAATTCAATCC CA	91	7833	7848	eekeeeeeee kke	600
58885 1	2599	2614	ЭКОН 18	GTTTAAATTCAATC CC	91	7834	7849	eekeeeeeee kke	601
58885 2	2600	2615	ЭКОН 18	TGTTTAAATTCAAT CC	78	7835	7850	eekeeeeeee kke	602
58885 3	2601	2616	ЭКОН 18	CTGTTTAAATTCAA TC	81	7836	7851	eekeeeeeee kke	603
58885 4	2602	2617	ЭКОН 18	GCTGTTTAAATTCA AT	63	7837	7852	eekeeeeeee kke	604
58885 5	2603	2618	ЭКОН 18	AGCTGTTTAAATTC AA	65	7838	7853	eekeeeeeee kke	605
58885	2604	2619	ЭКОН	CAGCTGTTTAAATT	76	7839	7854	eekeeeeeee	606

6			18	CA				kke	
58885 7	2605	2620	Экзон 18	GCAGCTGTTTAA TTC	89	7840	7855	eekddddddddd kke	607
58885 8	2606	2621	Экзон 18	CGCAGCTGTTTA ATT	89	7841	7856	eekddddddddd kke	608
58885 9	2607	2622	Экзон 18	TCGCAGCTGTTT AAT	89	7842	7857	eekddddddddd kke	609
58886 0	2608	2623	Экзон 18	GTCGCAGCTGTT TAA	76	7843	7858	eekddddddddd kke	610
58886 1	2609	2624	Экзон 18	TGTCGCAGCTGT TTA	87	7844	7859	eekddddddddd kke	611
58886 2	2610	2625	Экзон 18	TTGTCGCAGCTG TTT	85	7845	7860	eekddddddddd kke	612
58886 3	2611	2626	Экзон 18	GTTGTCGCAGCT TTT	87	7846	7861	eekddddddddd kke	613
58886 4	2612	2627	Экзон 18	TGTTGTCGCAGC GTT	67	7847	7862	eekddddddddd kke	614
58886 5	2613	2628	Экзон 18	TTGTTGTCGCAG TGT	51	н.д.	н.д.	eekddddddddd kke	615
58886 6	2614	2629	Экзон 18	TTGTTGTCGCAG CTG	95	н.д.	н.д.	eekddddddddd kke	616
58886 7	2615	2630	Экзон 18	TTTTGTTGTCGCAG CT	92	н.д.	н.д.	eekddddddddd kke	617
58886 8	2616	2631	Экзон 18	TTTTGTTGTCGCA GC	66	н.д.	н.д.	eekddddddddd kke	618

Ингибирование мРНК CFB 5-10-5 МОЕ гепмерами, направленными на SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2

ISIS №	SEQ ID NO: 1 сайт инициации	SEQ ID NO: 1 сайт термации	Область-мишень	Последовательность	% ингибирования	SEQ ID NO: 2 сайт инициации	SEQ ID NO: 2 сайт термации	SEQ ID NO:
							инации	
588685	н.д.	н.д.	Экзон 1	GGATCCAGCTC ACTCCCCTG	14	1596	1615	466
588686	н.д.	н.д.	Экзон 1	AAATAAGGATC CAGCTCACT	2	1602	1621	467
588688	н.д.	н.д.	Экзон 1	GACCAGAAATA AGGATCCAG	3	1608	1627	468
588690	н.д.	н.д.	Экзон 1	CTTAGGGACCA GAAATAAGG	10	1614	1633	469
588692	н.д.	н.д.	Экзон 1	CACCCACTTAG GGACCAGAA	23	1620	1639	470
588694	н.д.	н.д.	Экзон 1	ACCACCCACTT AGGGACCAG	23	1622	1641	471
588696	н.д.	н.д.	Экзон 1	AGGTCCAGGAC TCTCCCCTT	15	1685	1704	472
588698	н.д.	н.д.	Экзон 1	AAGGTCCAGGA CTCTCCCCT	19	1686	1705	473
588700	н.д.	н.д.	Экзон 1	AAACTGCAGAA GTCCCACCC	16	1716	1735	474
588586	30	49	Экзон 1	GGAGGGCCCCG CTGAGCTGC	11	1751	1770	475
588587	48	67	Экзон 1	TCCCGGAACAT CCAAGCGGG	14	1769	1788	476
588588	56	75	Экзон 1	CATCACTTCCCC GGAACATC	18	1777	1796	477
588589	151	170	Экзон 1	CTGGTCACATTC CCTTCCCC	59	1872	1891	478
588590	157	176	Экзон 1	CTAGACCTGGT CACATTCCT	59	1878	1897	479
588591	339	358	Сочленение экзона 1-2	GGAGTGGTGGT CACACCTCC	45	н.д.	н.д.	480
588592	384	403	Экзон 2	ACCCCCTCCAG	39	2192	2211	48

				AGAGCAGGA				1
588593	390	409	Экзон 2	ATCTCTACCCCC TCCAGAGA	29	2198	2217	48 2
588594	467	486	Экзон 2	GGTACGGGTAG AAGCCAGAA	47	2275	2294	48 3
588595	671	690	Экзон 3	GGAGAGTGTA CCGTCATAG	44	2879	2898	48 4
588596	689	708	Экзон 3	TGCGATTGGCA GAGCCCCGG	43	2897	2916	63 8
588597	695	714	Экзон 3	GGCAGGTGCGA TTGGCAGAG	34	2903	2922	48 6
588598	707	726	Экзон 3	GGCCATTCACTT GGCAGGTG	17	2915	2934	48 7
588599	738	757	Экзон 3	TTGTCACAGAT CGCTGTCTG	37	2946	2965	48 8
588600	924	943	Сочле ние экзона 3- 4	AAGGAGTCTTG GCAGGAAGG	18	н.д.	н.д.	48 9
588601	931	950	Сочле ние экзона 3- 4	GTACATGAAGG AGTCTTGGC	32	н.д.	н.д.	49 0
588602	959	978	Экзон 5	AAGCTTCGGCC ACCTCTTGA	45	3542	3561	49 1
588603	1089	1108	Экзон 6	CCATCTAGCAC CAGGTAGAT	52	3773	3792	49 2
588604	1108	1127	Экзон 6	GGCCCCAATGC TGTCTGATC	39	3792	3811	49 3
588606	1150	1169	Экзон 6	AATTAAGTTGA CTAGACACT	37	3834	3853	49 4
588608	1162	1181	Сочле ние экзона 6- 7	TGCCACCTTCTC AATTAAGT	21	н.д.	н.д.	64 8
588578	1167	1186	Сочле ние	ТААСТТGCCAC СТТСТСААТ	22	н.д.	н.д.	49 6

			экзона 6-7					
588579	1169	1188	Сочленение экзона 6-7	CATAACTTGCC ACCTTCTCA	21	н.д.	н.д.	497
532692	1171	1190	Сочленение экзона 6-7	ACCATAACTTG CCACCTTCT	56	н.д.	н.д.	90
588580	1173	1192	Сочленение экзона 6-7	ACACCATAACT TGCCACCTT	50	н.д.	н.д.	498
588581	1175	1194	Экзон 7	TCACACCATAA CTTGCCACC	50	4151	4170	499
588610	1319	1338	Экзон 8	TAGTCCCTGACT TCAACTTG	47	4612	4631	500
588612	1325	1344	Экзон 8	TGGTGTAGTCC CTGACTTC	47	4618	4637	501
588614	1396	1415	Экзон 8	GCGGTTCCAGC CTTCAGGAG	51	4689	4708	502
588616	1421	1440	Экзон 8	TCATGAGGATG ATGACATGG	18	4714	4733	503
588618	1446	1465	Экзон 9	CCGCCCATGTT GTGCAATCC	40	5020	5039	504
588620	1458	1477	Экзон 9	GTAATTGGGTC CCCGCCCAT	40	5032	5051	505
588623	1482	1501	Экзон 9	AAGTCCCGGAT CTCATCAAT	45	5056	5075	506
588624	1542	1561	Сочленение экзона 9-10	AACACATAGAC ATCCAGATA	43	н.д.	н.д.	507
588626	1585	1604	Экзон 10	CAAAGCATTGA TGTTCACTT	45	5234	5253	508
588628	1621	1640	Экзон 10	TTTGAACACAT	53	5270	5289	50

				GTTGCTCAT				9
588631	1646	1665	Экзон 10	CTTCCAGGTTTT CCATATCC	56	5295	5314	51 0
588632	1647	1666	Экзон 10	TCTTCCAGGTTT TCCATATC	35	5296	5315	51 1
588634	1689	1708	Экзон 11	AGACTCAGAGA CTGGCTTTC	55	5830	5849	51 2
588636	1749	1768	Экзон 11	GCCTGCCATGG TTGCTTGTG	78	5890	5909	51 3
588638	1763	1782	Экзон 11	TGACTGAGATC TTGGCCTGC	95	5904	5923	51 4
588640	1912	1931	Экзон 13	TTCTATCTCCAG GTCCCGCT	44	6406	6425	51 5
588642	1982	2001	Экзон 13	AGTCATAAAAT TCAGGAATT	40	6476	6495	51 6
588645	2073	2092	Экзон 14	CGAGTTGTTCCC TCGGTGCA	57	6662	6681	51 7
588646	2085	2104	Экзон 14	AGCCTCAAAGC TCGAGTTGT	48	6674	6693	51 8
588648	2091	2110	Экзон 14	GGAGGAAGCCT CAAAGCTCG	40	6680	6699	51 9
588651	2097	2116	Экзон 14	GTAGTTGGAGG AAGCCTCAA	43	6686	6705	52 0
588652	2103	2122	Экзон 14	CAAGTGGTAGT TGGAGGAAG	13	6692	6711	52 1
588654	2166	2185	Экзон 15	TCCTCAGACAC AAACAGAGC	55	6954	6973	52 2
588656	2172	2191	Экзон 15	TTCTCCTCCTCA GACACAAA	44	6960	6979	52 3
588658	2196	2215	Экзон 15	TAGACCTCCTTC CGAGTCAG	50	6984	7003	52 4
588660	2202	2221	Экзон 15	TTGATGTAGAC CTCCTTCCG	27	6990	7009	52 5
588582	2219	2238	Соче- ние экзона 15-16	CTTTCTTATCCC CATTCCTG	49	н.д.	н.д.	52 6

588583	2221	2240	Сочлене ние экзона 15-16	GCCTTTCTTATC CCCATTCT	41	н.д.	н.д.	52 7
532775	2223	2242	Сочлене ние экзона 15-16	CTGCCTTTCTTA TCCCCATT	41	н.д.	н.д.	20 3
588584	2225	2244	Сочлене ние экзона 15-16	AGCTGCCTTTCT TATCCCCA	43	н.д.	н.д.	52 8
588662	2226	2245	Сочлене ние экзона 15-16	CAGCTGCCTTTC TTATCCCC	52	н.д.	н.д.	52 9
588585	2227	2246	Сочлене ние экзона 15-16	ACAGCTGCCTTT CTTATCCC	39	н.д.	н.д.	53 0
588664	2238	2257	Экзон 16	GCATCTCTCTCA CAGCTGCC	69	7122	7141	53 1
588666	2276	2295	Экзон 16	AGATGTCCTTG ACTTTGTCA	46	7160	7179	53 2
588668	2330	2349	Экзон 16	CAGCATAGGGA CTCACTCCT	47	7214	7233	53 3
588670	2361	2380	Сочлене ние экзона 16-17	CCGCCAGAATC ACCTCTGCA	58	н.д.	н.д.	53 4
588672	2397	2416	Экзон 17	TGAATGAAACG ACTTCTCTT	48	7362	7381	53 5
588674	2430	2449	Экзон 18	ACATCCACTAC TCCCCAGCT	29	7665	7684	53 6
588676	2448	2467	Экзон 18	CGCTTCTGGTTT TTGCAGAC	58	7683	7702	53 7
588678	2454	2473	Экзон 18	TTTTGCCGCTTC	45	7689	7708	53
				TGGTTTTT				8
588680	2466	2485	Экзон 18	GCAGGTACCTG CTTTGCCG	36	7701	7720	53 9
588682	2532	2551	Экзон 18	TCTTGGAGTTTC TCCTTCAG	47	7767	7786	54 0
532811	2599	2618	Экзон 18	AGCTGTTTAAAT TCAATCCC	96	7834	7853	23 9
532917	2604	2623	Экзон 18	GTCGCAGCTGT TTTAATTCA	96	7839	7858	31 7

Ингибирование мРНК CFB МОЕ гэнмерами, направленными на SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2

ISIS №	SEQ ID NO: 1 сайт инициации	SEQ ID NO: 1 сайт терминации	Область - мишень	Последовательность	% ингибирования	SEQ ID NO: 2 сайт инициации	SEQ ID NO: 2 сайт терминации	Мотив	SEQ ID NO:
598973	2552	2568	Экзон 18	GAAAACCC AAATCCTC A	40	7787	7803	3-10-4	619
599036	2552	2568	Экзон 18	GAAAACCC AAATCCTC A	18	7787	7803	5-7-5	619
598974	2553	2569	Экзон 18	AGAAAACC CAAATCCTC	28	7788	7804	3-10-4	620
599037	2553	2569	Экзон 18	AGAAAACC CAAATCCTC	19	7788	7804	5-7-5	620
598975	2554	2570	Экзон 18	TAGAAAAC CCAAATCCT	15	7789	7805	3-10-4	621
599038	2554	2570	Экзон 18	TAGAAAAC CCAAATCCT	32	7789	7805	5-7-5	621
598976	2555	2571	Экзон	ATAGAAAA	12	7790	7806	3-10-	62

			18	CCCAAATC C				4	2
599039	2555	2571	Экзон 18	ATAGAAAA CCCAAATC C	7	7790	7806	5-7-5	62 2
598977	2557	2573	Экзон 18	TTATAGAA AACCCAAA T	13	7792	7808	3-10- 4	62 3
599040	2557	2573	Экзон 18	TTATAGAA AACCCAAA T	13	7792	7808	5-7-5	62 3
598978	2558	2574	Экзон 18	CTTATAGA AAACCCAA A	0	7793	7809	3-10- 4	62 4
599041	2558	2574	Экзон 18	CTTATAGA AAACCCAA A	0	7793	7809	5-7-5	62 4
598979	2559	2575	Экзон 18	CCTTATAGA AAACCCAA	8	7794	7810	3-10- 4	62 5
599042	2559	2575	Экзон 18	CCTTATAGA AAACCCAA	19	7794	7810	5-7-5	62 5
598980	2560	2576	Экзон 18	CCCTTATAG AAAACCCA	42	7795	7811	3-10- 4	62 6
599043	2560	2576	Экзон 18	CCCTTATAG AAAACCCA	10	7795	7811	5-7-5	62 6
598981	2561	2577	Экзон 18	CCCCTTATA GAAAACCC	20	7796	7812	3-10- 4	62 7
599044	2561	2577	Экзон 18	CCCCTTATA GAAAACCC	12	7796	7812	5-7-5	62 7
598982	2562	2578	Экзон 18	ACCCCTTAT AGAAAACC	10	7797	7813	3-10- 4	62 8
599045	2562	2578	Экзон 18	ACCCCTTAT AGAAAACC	3	7797	7813	5-7-5	62 8
598983	2563	2579	Экзон 18	AACCCCTTA TAGAAAAC	0	7798	7814	3-10- 4	62 9
599046	2563	2579	Экзон 18	AACCCCTTA TAGAAAAC	18	7798	7814	5-7-5	62 9

598984	2564	2580	Экзон 18	AAACCCCTT ATAGAAAA	0	7799	7815	3-10- 4	63 0
599047	2564	2580	Экзон 18	AAACCCCTT ATAGAAAA	7	7799	7815	5-7-5	63 0
598985	2565	2581	Экзон 18	GAAACCCC TTATAGAA A	0	7800	7816	3-10- 4	63 1
599048	2565	2581	Экзон 18	GAAACCCC TTATAGAA A	9	7800	7816	5-7-5	63 1
598986	2566	2582	Экзон 18	GGAAACCC CTTATAGA A	0	7801	7817	3-10- 4	63 2
599049	2566	2582	Экзон 18	GGAAACCC CTTATAGA A	18	7801	7817	5-7-5	63 2
598988	2567	2583	Экзон 18	AGGAAACC CCTTATAGA	0	7802	7818	3-10- 4	63 3
599050	2567	2583	Экзон 18	AGGAAACC CCTTATAGA	8	7802	7818	5-7-5	63 3
598989	2568	2584	Экзон 18	CAGGAAAC CCCTTATAG	0	7803	7819	3-10- 4	63 4
598990	2569	2585	Экзон 18	GCAGGAAA CCCCTTATA	8	7804	7820	3-10- 4	63 5
598991	2570	2586	Экзон 18	AGCAGGAA ACCCCTTAT	25	7805	7821	3-10- 4	63 6
598992	2571	2587	Экзон 18	CAGCAGGA AACCCCTTA	12	7806	7822	3-10- 4	63 7
598993	2572	2588	Экзон 18	CCAGCAGG AAACCCCTT	37	7807	7823	3-10- 4	63 8
598994	2573	2589	Экзон 18	TCCAGCAG GAAACCCC T	29	7808	7824	3-10- 4	63 9
598995	2574	2590	Экзон 18	GTCCAGCA GGAAACCC C	42	7809	7825	3-10- 4	64 0
598996	2575	2591	Экзон	TGTCCAGC	36	7810	7826	3-10-	64

			18	AGGAAACC C				4	1
598997	2576	2592	Экзон 18	CTGTCCAGC AGGAAACC	18	7811	7827	3-10- 4	64 2
598998	2577	2593	Экзон 18	CCTGTCCAG CAGGAAAC	27	7812	7828	3-10- 4	64 3
598999	2578	2594	Экзон 18	CCCTGTCCA GCAGGAAA	61	7813	7829	3-10- 4	64 4
599000	2580	2596	Экзон 18	GCCCCCTGTC CAGCAGGA	71	7815	7831	3-10- 4	64 5
599001	2581	2597	Экзон 18	CGCCCCCTGT CCAGCAGG	80	7816	7832	3-10- 4	64 6
599002	2582	2598	Экзон 18	ACGCCCCCT GTCCAGCA G	68	7817	7833	3-10- 4	64 7
599003	2583	2599	Экзон 18	CACGCCCCCT GTCCAGCA	71	7818	7834	3-10- 4	64 8
599004	2584	2600	Экзон 18	CCACGCCC CTGTCCAGC	76	7819	7835	3-10- 4	64 9
599005	2585	2601	Экзон 18	CCCACGCC CCTGTCCAG	70	7820	7836	3-10- 4	65 0
599006	2586	2602	Экзон 18	TCCCACGCC CCTGTCCA	65	7821	7837	3-10- 4	65 1
599007	2587	2603	Экзон 18	ATCCCACG CCCCTGTCC	60	7822	7838	3-10- 4	65 2
599008	2588	2604	Экзон 18	AATCCCAC GCCCCCTGTC	72	7823	7839	3-10- 4	65 3
599009	2589	2605	Экзон 18	CAATCCCA CGCCCCCTGT	79	7824	7840	3-10- 4	65 4
599010	2590	2606	Экзон 18	TCAATCCCA CGCCCCCTG	73	7825	7841	3-10- 4	65 5
599011	2591	2607	Экзон 18	TTCAATCCC ACGCCCCCT	79	7826	7842	3-10- 4	65 6
599012	2592	2608	Экзон 18	ATTCAATCC CACGCCCC	67	7827	7843	3-10- 4	65 7
599013	2593	2609	Экзон 18	AATTCAATC CCACGCCC	65	7828	7844	3-10- 4	65 8

599014	2594	2610	Экзон 18	TAATTCAAT CCCACGCC	74	7829	7845	3-10- 4	65 9
599015	2595	2611	Экзон 18	TTAATTCAA TCCCACGC	71	7830	7846	3-10- 4	66 0
599016	2596	2612	Экзон 18	TTTAATTCA ATCCCACG	48	7831	7847	3-10- 4	66 1
599017	2597	2613	Экзон 18	TTTTAATTC AATCCCAC	34	7832	7848	3-10- 4	66 2
599018	2598	2614	Экзон 18	GTTTTAATT CAATCCCA	56	7833	7849	3-10- 4	66 3
599019	2599	2615	Экзон 18	TGTTTTAAT TCAATCCC	60	7834	7850	3-10- 4	66 4
599020	2600	2616	Экзон 18	CTGTTTAA TTCAATCC	0	7835	7851	3-10- 4	66 5
599021	2601	2617	Экзон 18	GCTGTTTAA ATTCAATC	33	7836	7852	3-10- 4	66 6
599022	2602	2618	Экзон 18	AGCTGTTT AATTCAAT	17	7837	7853	3-10- 4	66 7
599023	2603	2619	Экзон 18	CAGCTGTT TAATTCAA	52	7838	7854	3-10- 4	66 8
532917	2604	2623	Экзон 18	GTCGCAGC TGTTTAAAT TCA	86	7839	7858	5-10- 5	31 7
599024	2604	2620	Экзон 18	GCAGCTGTT TTAATTCA	88	7839	7855	3-10- 4	66 9
599025	2605	2621	Экзон 18	CGCAGCTG TTTAAATTC	85	7840	7856	3-10- 4	67 0
599026	2606	2622	Экзон 18	TCGCAGCT GTTTTAATT	69	7841	7857	3-10- 4	67 1
599027	2607	2623	Экзон 18	GTCGCAGC TGTTTAAAT	77	7842	7858	3-10- 4	67 2
599028	2608	2624	Экзон 18	TGTCGCAG CTGTTTAA	73	7843	7859	3-10- 4	67 3
599029	2609	2625	Экзон 18	TTGTCGCAG CTGTTTTA	78	7844	7860	3-10- 4	67 4
599030	2610	2626	Экзон 18	GTTGTCGCA GCTGTTTT	75	7845	7861	3-10- 4	67 5
599031	2611	2627	Экзон 18	TGTTGTCGC AGCTGTTT	77	7846	7862	3-10- 4	67 6
599032	2612	2628	Экзон 18 / повтор	TTGTTGTCG CAGCTGTT	79	н.д.	н.д.	3-10- 4	67 7
599033	2613	2629	Экзон 18 / повтор	TTTGTGTC GCAGCTGT	80	н.д.	н.д.	3-10- 4	67 8
599034	2614	2630	Экзон 18 / повтор	TTTTGTGT CGCAGCTG	78	н.д.	н.д.	3-10- 4	67 9
599035	2615	2631	Экзон 18 / повтор	TTTTGTGTG TCGCAGCT	63	н.д.	н.д.	3-10- 4	68 0

Ингибирование мРНК CFB МОЕ гепмерами, направленными на SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2

ISIS №	SEQ ID NO: 1 сайт инициации	SEQ ID NO: 1 сайт терминации	Область-мишень	Последовательность	% ингибирования	SEQ ID NO: 2 сайт инициации	SEQ ID NO: 2 сайт терминации	Мотив	SEQ ID NO:
599098	2552	2568	Экзон 18	GAAAACC CAAATCCT CA	57	7787	7803	4-8-5	619
599099	2553	2569	Экзон 18	AGAAAAC CCAAATCC TC	33	7788	7804	4-8-5	620
599100	2554	2570	Экзон 18	TAGAAAA CCCAAATC CT	32	7789	7805	4-8-5	621
599101	2555	2571	Экзон 18	ATAGAAA ACCCAAAT CC	47	7790	7806	4-8-5	622
599102	2557	2573	Экзон 18	TTATAGAA AACCCAA AT	59	7792	7808	4-8-5	623
599103	2558	2574	Экзон 18	CTTATAGA AAACCCA AA	10	7793	7809	4-8-5	624
599104	2559	2575	Экзон 18	CCTTATAG AAAACCC AA	3	7794	7810	4-8-5	625
599105	2560	2576	Экзон 18	CCCTTATA GAAAACC CA	45	7795	7811	4-8-5	626
599106	2561	2577	Экзон 18	CCCCTTAT AGAAAAC CC	49	7796	7812	4-8-5	627
599107	2562	2578	Экзон 18	ACCCCTTA TAGAAAA CC	35	7797	7813	4-8-5	628
599108	2563	2579	Экзон 18	AACCCCTT ATAGAAA AC	17	7798	7814	4-8-5	629
599109	2564	2580	Экзон 18	AAACCCCT TATAGAA AA	36	7799	7815	4-8-5	630
599110	2565	2581	Экзон 18	GAAACCC CTTATAGA AA	20	7800	7816	4-8-5	631
599111	2566	2582	Экзон 18	GGAAACC CCTTATAG AA	20	7801	7817	4-8-5	632
599112	2567	2583	Экзон 18	AGGAAAC CCCTTATA GA	15	7802	7818	4-8-5	633
599113	2568	2584	Экзон 18	CAGGAAA CCCCTTAT AG	19	7803	7819	4-8-5	634
59905	2568	2584	Экзон 18	CAGGAAA	26	7803	7819	5-7-	63

1				CCCCTTAT AG				5	4
59911 4	2569	2585	Экзон 18	GCAGGAA ACCCCTTA TA	18	7804	7820	4-8- 5	63 5
59905 2	2569	2585	Экзон 18	GCAGGAA ACCCCTTA TA	21	7804	7820	5-7- 5	63 5
59911 5	2570	2586	Экзон 18	AGCAGGA AACCCTT AT	31	7805	7821	4-8- 5	63 6
59905 3	2570	2586	Экзон 18	AGCAGGA AACCCTT AT	25	7805	7821	5-7- 5	63 6
59911 6	2571	2587	Экзон 18	CAGCAGG AAACCCCT TA	39	7806	7822	4-8- 5	63 7
59905 4	2571	2587	Экзон 18	CAGCAGG AAACCCCT TA	36	7806	7822	5-7- 5	63 7
59911 7	2572	2588	Экзон 18	CCAGCAG GAAACCC CTT	46	7807	7823	4-8- 5	63 8
59905 5	2572	2588	Экзон 18	CCAGCAG GAAACCC CTT	22	7807	7823	5-7- 5	63 8
59911 8	2573	2589	Экзон 18	TCCAGCAG GAAACCC CT	40	7808	7824	4-8- 5	63 9
59905 6	2573	2589	Экзон 18	TCCAGCAG GAAACCC CT	32	7808	7824	5-7- 5	63 9
59911 9	2574	2590	Экзон 18	GTCCAGCA GGAAACC CC	50	7809	7825	4-8- 5	64 0
59905 7	2574	2590	Экзон 18	GTCCAGCA GGAAACC	46	7809	7825	5-7- 5	64 0

				CC					
59912 0	2575	2591	Экзон 18	TGTCCAGC AGGAAAC CC	30	7810	7826	4-8- 5	64 1
59905 8	2575	2591	Экзон 18	TGTCCAGC AGGAAAC CC	52	7810	7826	5-7- 5	64 1
59912 1	2576	2592	Экзон 18	CTGTCCAG CAGGAAA CC	31	7811	7827	4-8- 5	64 2
59905 9	2576	2592	Экзон 18	CTGTCCAG CAGGAAA CC	24	7811	7827	5-7- 5	64 2
59912 2	2577	2593	Экзон 18	CCTGTCCA GCAGGAA AC	23	7812	7828	4-8- 5	64 3
59906 0	2577	2593	Экзон 18	CCTGTCCA GCAGGAA AC	37	7812	7828	5-7- 5	64 3
59912 3	2578	2594	Экзон 18	CCCTGTCC AGCAGGA AA	51	7813	7829	4-8- 5	64 4
59906 1	2578	2594	Экзон 18	CCCTGTCC AGCAGGA AA	34	7813	7829	5-7- 5	64 4
59912 4	2580	2596	Экзон 18	GCCCCTGT CCAGCAG GA	56	7815	7831	4-8- 5	64 5
59906 2	2580	2596	Экзон 18	GCCCCTGT CCAGCAG GA	51	7815	7831	5-7- 5	64 5
59912 5	2581	2597	Экзон 18	CGCCCCTG TCCAGCAG G	70	7816	7832	4-8- 5	64 6
59906 3	2581	2597	Экзон 18	CGCCCCTG TCCAGCAG G	56	7816	7832	5-7- 5	64 6

59912 6	2582	2598	Экзон 18	ACGCCCCT GTCCAGCA G	76	7817	7833	4-8- 5	64 7
59906 4	2582	2598	Экзон 18	ACGCCCCT GTCCAGCA G	61	7817	7833	5-7- 5	64 7
59912 7	2583	2599	Экзон 18	CACGCCCC TGTCAGC A	67	7818	7834	4-8- 5	64 8
59906 5	2583	2599	Экзон 18	CACGCCCC TGTCAGC A	64	7818	7834	5-7- 5	64 8
59906 6	2584	2600	Экзон 18	CCACGCCC CTGTCCAG C	40	7819	7835	5-7- 5	64 9
59906 7	2585	2601	Экзон 18	CCCACGCC CCTGTCCA G	37	7820	7836	5-7- 5	65 0
59906 8	2586	2602	Экзон 18	TCCCACGC CCCTGTCC A	31	7821	7837	5-7- 5	65 1
59906 9	2587	2603	Экзон 18	ATCCCACG CCCCTGTC C	39	7822	7838	5-7- 5	65 2
59907 0	2588	2604	Экзон 18	AATCCCAC GCCCCTGT C	59	7823	7839	5-7- 5	65 3
59907 1	2589	2605	Экзон 18	CAATCCCA CGCCCCTG T	63	7824	7840	5-7- 5	65 7
59907 2	2590	2606	Экзон 18	TCAATCCC ACGCCCCT G	74	7825	7841	5-7- 5	65 5
59907 3	2591	2607	Экзон 18	TTCAATCC CACGCCCC T	53	7826	7842	5-7- 5	65 6
59907	2592	2608	Экзон 18	ATTCAATC	56	7827	7843	5-7-	65

4				CCACGCC C				5	7
59907 5	2593	2609	Экзон 18	AATTCAAT CCCACGCC C	49	7828	7844	5-7- 5	65 8
59907 6	2594	2610	Экзон 18	TAATTCAA TCCCACGC C	54	7829	7845	5-7- 5	65 9
59907 7	2595	2611	Экзон 18	TTAATTCA ATCCCACG C	79	7830	7846	5-7- 5	66 0
59907 8	2596	2612	Экзон 18	TTTAATTC AATCCCAC G	67	7831	7847	5-7- 5	66 1
59907 9	2597	2613	Экзон 18	TTTAAATT CAATCCCA C	69	7832	7848	5-7- 5	66 2
59908 0	2598	2614	Экзон 18	GTTTAAAT TCAATCCC A	79	7833	7849	5-7- 5	66 3
59908 1	2599	2615	Экзон 18	TGTTTAA TTCAATCC C	57	7834	7850	5-7- 5	66 4
59908 2	2600	2616	Экзон 18	CTGTTTA ATTCAATC C	50	7835	7851	5-7- 5	66 5
59908 3	2601	2617	Экзон 18	GCTGTTT AATTCAAT C	67	7836	7852	5-7- 5	66 6
59908 4	2602	2618	Экзон 18	AGCTGTT TAATTCAA T	60	7837	7853	5-7- 5	66 7
59908 5	2603	2619	Экзон 18	CAGCTGTT TTAATTCA A	71	7838	7854	5-7- 5	66 8
53291 7	2604	2623	Экзон 18	GTCGCAGC TGTTTAA	82	7839	7858	5- 10-5	31 7

				TTCA					
59908 6	2604	2620	Экзон 18	GCAGCTGT TTTAATTC A	81	7839	7855	5-7- 5	66 9
59908 7	2605	2621	Экзон 18	CGCAGCTG TTTAATT C	88	7840	7856	5-7- 5	67 0
59908 8	2606	2622	Экзон 18	TCGCAGCT GTTTAAT T	84	7841	7857	5-7- 5	67 1
59908 9	2607	2623	Экзон 18	GTCGCAGC TGTTTAA T	81	7842	7858	5-7- 5	67 2
59909 0	2608	2624	Экзон 18	TGTCGCAG CTGTTTA A	77	7843	7859	5-7- 5	67 3
59909 1	2609	2625	Экзон 18	TTGTCGCA GCTGTTT A	74	7844	7860	5-7- 5	67 4
59909 2	2610	2626	Экзон 18	GTTGTCGC AGCTGTT T	66	7845	7861	5-7- 5	67 5
59909 3	2611	2627	Экзон 18	TGTTGTCG CAGCTGT T	89	7846	7862	5-7- 5	67 6
59909 4	2612	2628	Экзон 18 / повтор	TTGTTGTC GCAGCTGT T	82	н.д.	н.д.	5-7- 5	67 7
59909 5	2613	2629	Экзон 18 / повтор	TTTGTGT CGCAGCTG T	87	н.д.	н.д.	5-7- 5	67 8
59909 6	2614	2630	Экзон 18 / повтор	TTTTGTTG TCGCAGCT G	85	н.д.	н.д.	5-7- 5	67 9
59909 7	2615	2631	Экзон 18 / повтор	TTTTTGTT GTCGCAGC T	78	н.д.	н.д.	5-7- 5	68 0

Ингибирование мРНК CFV МОЕ гепмерами, направленными на SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2

ISIS №	SEQ ID NO: 1 сайт инициации	SEQ ID NO: 1 сайт терминации	Область-мишень	Последовательность	% ингибирования	SEQ ID NO: 2 сайт инициации	SEQ ID NO: 2 сайт терминации	Мотив	SEQ ID NO:
599510	2552	2570	Экзон 18	TAGAAAACC CAAATCCTC A	45	7787	7805	5-9-5	681
599331	2553	2571	Экзон 18	ATAGAAAAC CCAAATCCT C	46	7788	7806	5-9-5	682
599332	2554	2572	Экзон 18	TATAGAAAA CCCAAATCC T	38	7789	7807	5-9-5	683
599333	2556	2574	Экзон 18	CTTATAGAA AACCCAAAT C	1	7791	7809	5-9-5	684
599334	2557	2575	Экзон 18	CCTTATAGA AAACCCAAA T	5	7792	7810	5-9-5	685
599335	2558	2576	Экзон 18	CCCTTATAG AAAACCCAA A	34	7793	7811	5-9-5	686
599336	2559	2577	Экзон 18	CCCCTTATA GAAAACCCA A	40	7794	7812	5-9-5	687
599337	2560	2578	Экзон 18	ACCCCTTAT AGAAAACCC A	39	7795	7813	5-9-5	688

599338	2561	2579	Экзон 18	AACCCCTTA TAGAAAACC C	57	7796	7814	5-9- 5	68 9
599339	2562	2580	Экзон 18	AAACCCCTT ATAGAAAAC C	26	7797	7815	5-9- 5	69 0
599281	2562	2580	Экзон 18	AAACCCCTT ATAGAAAAC C	15	7797	7815	6-7- 6	69 0
599340	2563	2581	Экзон 18	GAAACCCCT TATAGAAAA C	17	7798	7816	5-9- 5	69 1
599282	2563	2581	Экзон 18	GAAACCCCT TATAGAAAA C	12	7798	7816	6-7- 6	69 1
599341	2564	2582	Экзон 18	GGAAACCCC TTATAGAAA A	23	7799	7817	5-9- 5	69 2
599283	2564	2582	Экзон 18	GGAAACCCC TTATAGAAA A	18	7799	7817	6-7- 6	69 2
599342	2565	2583	Экзон 18	AGGAAACCC CTTATAGAA A	10	7800	7818	5-9- 5	69 3
599284	2565	2583	Экзон 18	AGGAAACCC CTTATAGAA A	14	7800	7818	6-7- 6	69 3
599343	2566	2584	Экзон 18	CAGGAAACC CCTTATAGA A	10	7801	7819	5-9- 5	69 4
599285	2566	2584	Экзон 18	CAGGAAACC CCTTATAGA A	13	7801	7819	6-7- 6	69 4
599344	2567	2585	Экзон 18	GCAGGAAA CCCCTTATA GA	22	7802	7820	5-9- 5	69 5
599286	2567	2585	Экзон 18	GCAGGAAA	31	7802	7820	6-7-	69

				CCCCTTATA GA				6	5
599345	2568	2586	Экзон 18	AGCAGGAA ACCCCTTAT AG	19	7803	7821	5-9- 5	69 6
599287	2568	2586	Экзон 18	AGCAGGAA ACCCCTTAT AG	12	7803	7821	6-7- 6	69 6
599346	2569	2587	Экзон 18	CAGCAGGA AACCCCTTA TA	30	7804	7822	5-9- 5	69 7
599288	2569	2587	Экзон 18	CAGCAGGA AACCCCTTA TA	28	7804	7822	6-7- 6	69 7
599347	2570	2588	Экзон 18	CCAGCAGGA AACCCCTTA T	46	7805	7823	5-9- 5	69 8
599289	2570	2588	Экзон 18	CCAGCAGGA AACCCCTTA T	32	7805	7823	6-7- 6	69 8
599348	2571	2589	Экзон 18	TCCAGCAGG AAACCCCTT A	44	7806	7824	5-9- 5	69 9
599290	2571	2589	Экзон 18	TCCAGCAGG AAACCCCTT A	24	7806	7824	6-7- 6	69 9
599349	2572	2590	Экзон 18	GTCCAGCAG GAAACCCCT T	60	7807	7825	5-9- 5	70 0
599291	2572	2590	Экзон 18	GTCCAGCAG GAAACCCCT T	38	7807	7825	6-7- 6	70 0
599350	2573	2591	Экзон 18	TGTCCAGCA GGAAACCCC T	49	7808	7826	5-9- 5	70 1
599292	2573	2591	Экзон 18	TGTCCAGCA GGAAACCCC	35	7808	7826	6-7- 6	70 1

				T					
599351	2575	2593	Экзон 18	CCTGTCCAG CAGGAAACC C	46	7810	7828	5-9- 5	70 2
599293	2575	2593	Экзон 18	CCTGTCCAG CAGGAAACC C	12	7810	7828	6-7- 6	70 2
599352	2576	2594	Экзон 18	CCCTGTCCA GCAGGAAA CC	49	7811	7829	5-9- 5	70 3
599294	2576	2594	Экзон 18	CCCTGTCCA GCAGGAAA CC	38	7811	7829	6-7- 6	70 3
599353	2577	2595	Экзон 18	CCCCTGTCC AGCAGGAA AC	64	7812	7830	5-9- 5	70 4
599295	2577	2595	Экзон 18	CCCCTGTCC AGCAGGAA AC	33	7812	7830	6-7- 6	70 4
599354	2578	2596	Экзон 18	GCCCCTGTC CAGCAGGA AA	56	7813	7831	5-9- 5	70 5
599296	2578	2596	Экзон 18	GCCCCTGTC CAGCAGGA AA	13	7813	7831	6-7- 6	70 5
599355	2580	2598	Экзон 18	ACGCCCTG TCCAGCAGG A	81	7815	7833	5-9- 5	70 6
599297	2580	2598	Экзон 18	ACGCCCTG TCCAGCAGG A	57	7815	7833	6-7- 6	70 6
599356	2581	2599	Экзон 18	CACGCCCT GTCCAGCAG G	64	7816	7834	5-9- 5	70 7
599298	2581	2599	Экзон 18	CACGCCCT GTCCAGCAG G	39	7816	7834	6-7- 6	70 7

599299	2582	2600	Экзон 18	CCACGCCCC TGTCCAGCA G	55	7817	7835	6-7- 6	70 8
599300	2583	2601	Экзон 18	CCCACGCCC CTGTCCAGC A	45	7818	7836	6-7- 6	70 9
599301	2584	2602	Экзон 18	TCCCACGCC CCTGTCCAG C	39	7819	7837	6-7- 6	71 0
599302	2585	2603	Экзон 18	ATCCCACGC CCCTGTCCA G	27	7820	7838	6-7- 6	71 1
599303	2586	2604	Экзон 18	AATCCCACG CCCCTGTCC A	35	7821	7839	6-7- 6	71 2
599304	2587	2605	Экзон 18	CAATCCCAC GCCCCTGTC C	16	7822	7840	6-7- 6	71 3
599305	2588	2606	Экзон 18	TCAATCCCA CGCCCCTGT C	41	7823	7841	6-7- 6	71 4
599306	2589	2607	Экзон 18	TTCAATCCC ACGCCCCTG T	70	7824	7842	6-7- 6	71 5
599307	2590	2608	Экзон 18	ATTCAATCC CACGCCCT G	66	7825	7843	6-7- 6	71 6
599308	2591	2609	Экзон 18	AATTCAATC CCACGCCCC T	68	7826	7844	6-7- 6	71 7
599309	2592	2610	Экзон 18	TAATTCAAT CCCACGCCC C	52	7827	7845	6-7- 6	71 8
599310	2593	2611	Экзон 18	TTAATTCAA TCCCACGCC C	39	7828	7846	6-7- 6	71 9
599311	2594	2612	Экзон 18	TTTAATTCA	83	7829	7847	6-7-	72

				ATCCCACGC C				6	0
599312	2595	2613	Экзон 18	TTTAAATTC AATCCCACG C	72	7830	7848	6-7- 6	72 1
599313	2596	2614	Экзон 18	GTTTAAATT CAATCCCAC G	86	7831	7849	6-7- 6	72 2
599314	2597	2615	Экзон 18	TGTTTAAAT TCAATCCCA C	91	7832	7850	6-7- 6	72 3
599315	2598	2616	Экзон 18	CTGTTTAA TTCAATCCC A	71	7833	7851	6-7- 6	72 4
599316	2599	2617	Экзон 18	GCTGTTTAA ATTCAATCC C	89	7834	7852	6-7- 6	72 5
599317	2600	2618	Экзон 18	AGCTGTTT AATTCAATC C	87	7835	7853	6-7- 6	72 6
599318	2601	2619	Экзон 18	CAGCTGTT TAATTCAAT C	81	7836	7854	6-7- 6	72 7
599319	2602	2620	Экзон 18	GCAGCTGT TTAATTCAA T	75	7837	7855	6-7- 6	72 8
599320	2603	2621	Экзон 18	CGCAGCTGT TTAATTCA A	84	7838	7856	6-7- 6	72 9
532917	2604	2623	Экзон 18	GTCGCAGCT GTTTAAATT CA	92	7839	7858	5- 10-5	31 7
599321	2604	2622	Экзон 18	TCGCAGCTG TTTAAATTC A	90	7839	7857	6-7- 6	73 0
599322	2605	2623	Экзон 18	GTCGCAGCT GTTTAAATT	89	7840	7858	6-7- 6	73 1

				C					
599323	2606	2624	Экзон 18	TGTCGCAGC TGTTTAAAT T	81	7841	7859	6-7- 6	73 2
599324	2607	2625	Экзон 18	TTGTCGCAG CTGTTTAA T	68	7842	7860	6-7- 6	73 3
599325	2608	2626	Экзон 18	GTTGTCGCA GCTGTTTA A	71	7843	7861	6-7- 6	73 4
599326	2609	2627	Экзон 18	TGTTGTCGC AGCTGTTT A	52	7844	7862	6-7- 6	73 5
599327	2610	2628	Экзон 18 / повтор	TTGTTGTCG CAGCTGTT T	88	н.д.	н.д.	6-7- 6	73 6
599328	2611	2629	Экзон 18 / повтор	TTTGTGTC GCAGCTGT T	87	н.д.	н.д.	6-7- 6	73 7
599329	2612	2630	Экзон 18 / повтор	TTTTGTTGT CGCAGCTGT T	84	н.д.	н.д.	6-7- 6	73 8
599330	2613	2631	Экзон 18 / повтор	TTTTGTTGT CGCAGCTGT	87	н.д.	н.д.	6-7- 6	73 9

Ингибирование мРНК CFB МОЕ гэлмерами, направленными на SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2

ISIS №	SEQ ID NO: 1 сайт инициации	SEQ ID NO: 1 сайт терминации	Область-мишень	Последовательность	% ингибирования	SEQ ID NO: 2 сайт инициации	SEQ ID NO: 2 сайт терминации	Мотив	SEQ ID NO:
599512	2552	2571	Экзон 18	ATAGAAAACCCAAATCCTCA	74	7787	7806	3-10-7	410
599449	2553	2572	Экзон 18	TATAGAAAACCCAAATCCTC	43	7788	7807	3-10-7	411
599450	2554	2573	Экзон 18	TTATAGAAAACCCAAATCCT	51	7789	7808	3-10-7	412
599451	2555	2574	Экзон 18	CTTATAGAAAACCCAAATCC	35	7790	7809	3-10-7	413
599452	2556	2575	Экзон 18	CCTTATAGAAAACCCAAATC	34	7791	7810	3-10-7	414
599453	2557	2576	Экзон 18	CCCTTATAGAAAACCCAAAT	44	7792	7811	3-10-7	415
599454	2558	2577	Экзон 18	CCCCTTATAGAAAACCCAAA	54	7793	7812	3-10-7	416
599455	2559	2578	Экзон 18	ACCCCTTATAGAAAACCCAA	53	7794	7813	3-10-7	417
599456	2560	2579	Экзон 18	AACCCCTTATAGAAAACCCA	69	7795	7814	3-10-7	418
599457	2561	2580	Экзон 18	AAACCCCTTATAGAAAACCC	46	7796	7815	3-10-7	419
599458	2562	2581	Экзон 18	GAAACCCCTTATAGAAAACC	0	7797	7816	3-10-7	420
599459	2563	2582	Экзон 18	GGAAACCCCTTATAGAAAAC	12	7798	7817	3-10-7	421
599460	2564	2583	Экзон 18	AGGAAACCCCTTATAGAAAA	17	7799	7818	3-10-7	422
599461	2565	2584	Экзон 18	CAGGAAACCCCTTATAGAAA	24	7800	7819	3-10-7	423
599462	2566	2585	Экзон 18	GCAGGAAACCCCTTATAGAA	33	7801	7820	3-10-7	424
599463	2567	2586	Экзон 18	AGCAGGAAACCCCTTATAGA	38	7802	7821	3-10-7	425
599464	2568	2587	Экзон 18	CAGCAGGAAACCCCTTATAG	33	7803	7822	3-10-7	426
599465	2569	2588	Экзон 18	CCAGCAGGAAACCCCTTATA	49	7804	7823	3-10-7	427
59946	2570	2589	Экзон	TCCAGCAGGA	45	7805	7824	3-10-	42

6			18	AACCCCTTAT				7	8
59946 7	2571	2590	Экзон 18	GTCCAGCAGG AAACCCCTTA	60	7806	7825	3-10- 7	23 7
59946 8	2572	2591	Экзон 18	TGTCCAGCAGG AAACCCCTT	61	7807	7826	3-10- 7	42 9
59946 9	2573	2592	Экзон 18	CTGTCCAGCAG GAAACCCCT	52	7808	7827	3-10- 7	43 0
59947 0	2574	2593	Экзон 18	CCTGTCCAGCA GGAAACCCC	45	7809	7828	3-10- 7	43 1
59947 1	2575	2594	Экзон 18	CCCTGTCCAGC AGGAAACCC	67	7810	7829	3-10- 7	43 2
59947 2	2576	2595	Экзон 18	CCCCTGTCCAG CAGGAAACC	79	7811	7830	3-10- 7	43 3
59947 3	2577	2596	Экзон 18	GCCCCGTGTTCA GCAGGAAAC	72	7812	7831	3-10- 7	23 8
59947 4	2578	2597	Экзон 18	CGCCCCTGTCC AGCAGGAAA	87	7813	7832	3-10- 7	43 4
59947 5	2579	2598	Экзон 18	ACGCCCCTGTC CAGCAGGAA	76	7814	7833	3-10- 7	43 5
59947 6	2580	2599	Экзон 18	CACGCCCCTGT CCAGCAGGA	81	7815	7834	3-10- 7	43 6
59947 7	2581	2600	Экзон 18	CCACGCCCCTG TCCAGCAGG	83	7816	7835	3-10- 7	43 7
59947 8	2582	2601	Экзон 18	CCCACGCCCCT GTCCAGCAG	72	7817	7836	3-10- 7	43 8
59947 9	2583	2602	Экзон 18	TCCCACGCCCC TGTCCAGCA	81	7818	7837	3-10- 7	43 9
59948 0	2584	2603	Экзон 18	ATCCCACGCCC CTGTCCAGC	77	7819	7838	3-10- 7	44 0
59948 1	2585	2604	Экзон 18	AATCCCACGCC CCTGTCCAG	83	7820	7839	3-10- 7	44 1
59948 2	2586	2605	Экзон 18	CAATCCCACGC CCCTGTCCA	87	7821	7840	3-10- 7	44 2
59948 3	2587	2606	Экзон 18	TCAATCCCACG CCCCTGTCC	90	7822	7841	3-10- 7	44 3
59948 4	2588	2607	Экзон 18	TTCAATCCCAC GCCCCTGTC	72	7823	7842	3-10- 7	44 4

59948 5	2589	2608	Экзон 18	ATTCAATCCCA CGCCCCCTGT	82	7824	7843	3-10- 7	44 5
59948 6	2590	2609	Экзон 18	AATTCAATCCC ACGCCCCCTG	84	7825	7844	3-10- 7	44 6
59948 7	2591	2610	Экзон 18	TAATTCAATCC CACGCCCCCT	84	7826	7845	3-10- 7	44 7
59948 8	2592	2611	Экзон 18	TTAATTCAATC CCACGCCCC	87	7827	7846	3-10- 7	44 8
59948 9	2593	2612	Экзон 18	TTTAATTCAAT CCCACGCCC	87	7828	7847	3-10- 7	44 9
59949 0	2594	2613	Экзон 18	TTTTAATTCAA TCCCACGCC	86	7829	7848	3-10- 7	45 0
59949 1	2595	2614	Экзон 18	GTTTTAATTCA ATCCCACGC	87	7830	7849	3-10- 7	45 1
59949 2	2596	2615	Экзон 18	TGTTTTAATTC AATCCCACG	88	7831	7850	3-10- 7	45 2
59949 3	2597	2616	Экзон 18	CTGTTTTAATT CAATCCCAC	75	7832	7851	3-10- 7	45 3
59943 3	2597	2616	Экзон 18	CTGTTTTAATT CAATCCCAC	89	7832	7851	6-8-6	45 3
59949 4	2598	2617	Экзон 18	GCTGTTTTAAT TCAATCCCA	90	7833	7852	3-10- 7	45 4
59943 4	2598	2617	Экзон 18	GCTGTTTTAAT TCAATCCCA	89	7833	7852	6-8-6	45 4
59949 5	2599	2618	Экзон 18	AGCTGTTTTAA TTCAATCCC	88	7834	7853	3-10- 7	23 9
59943 5	2599	2618	Экзон 18	AGCTGTTTTAA TTCAATCCC	91	7834	7853	6-8-6	23 9
59949 6	2600	2619	Экзон 18	CAGCTGTTTTA ATTCAATCC	89	7835	7854	3-10- 7	45 5
59943 6	2600	2619	Экзон 18	CAGCTGTTTTA ATTCAATCC	89	7835	7854	6-8-6	45 5
59949 7	2601	2620	Экзон 18	GCAGCTGTTTT AATTCAATC	89	7836	7855	3-10- 7	45 6
59943 7	2601	2620	Экзон 18	GCAGCTGTTTT AATTCAATC	91	7836	7855	6-8-6	45 6
59949	2602	2621	Экзон	CGCAGCTGTTT	88	7837	7856	3-10-	45

8			18	TAATTCAAT				7	7
59943 8	2602	2621	Экзон 18	CGCAGCTGTTT TAATTCAAT	90	7837	7856	6-8-6	45 7
59949 9	2603	2622	Экзон 18	TCGCAGCTGTT TTAATTCAA	81	7838	7857	3-10- 7	45 8
59943 9	2603	2622	Экзон 18	TCGCAGCTGTT TTAATTCAA	88	7838	7857	6-8-6	45 8
53291 7	2604	2623	Экзон 18	GTCGCAGCTGT TTTAATTCA	90	7839	7858	5-10- 5	31 7
59950 0	2604	2623	Экзон 18	GTCGCAGCTGT TTTAATTCA	88	7839	7858	3-10- 7	31 7
59944 0	2604	2623	Экзон 18	GTCGCAGCTGT TTTAATTCA	88	7839	7858	6-8-6	31 7
59950 1	2605	2624	Экзон 18	TGTCGCAGCTG TTTTAATTC	78	7840	7859	3-10- 7	45 9
59944 1	2605	2624	Экзон 18	TGTCGCAGCTG TTTTAATTC	90	7840	7859	6-8-6	45 9
59950 2	2606	2625	Экзон 18	TTGTCGCAGCT GTTTTAATT	87	7841	7860	3-10- 7	46 0
59944 2	2606	2625	Экзон 18	TTGTCGCAGCT GTTTTAATT	76	7841	7860	6-8-6	46 0
59950 3	2607	2626	Экзон 18	GTTGTCGCAGC TGTTTTAAT	83	7842	7861	3-10- 7	46 1
59944 3	2607	2626	Экзон 18	GTTGTCGCAGC TGTTTTAAT	77	7842	7861	6-8-6	46 1
59950 4	2608	2627	Экзон 18	TGTTGTCGCAG CTGTTTTAA	89	7843	7862	3-10- 7	39 5
59944 4	2608	2627	Экзон 18	TGTTGTCGCAG CTGTTTTAA	69	7843	7862	6-8-6	39 5
59950 5	2609	2628	Экзон 19 / повтор	TTGTTGTCGCA GCTGTTTTA	83	н.д.	н.д.	3-10- 7	46 2
59944 5	2609	2628	Экзон 19 / повтор	TTGTTGTCGCA GCTGTTTTA	85	н.д.	н.д.	6-8-6	46 2
59950 6	2610	2629	Экзон 19 /	TTTGTTGTCGC AGCTGTTTT	89	н.д.	н.д.	3-10- 7	46 3
			повтор						
59944 6	2610	2629	Экзон 19 / повтор	TTTGTTGTCGC AGCTGTTTT	85	н.д.	н.д.	6-8-6	46 3
59950 7	2611	2630	Экзон 19 / повтор	TTTTGTTGTCG CAGCTGTTT	82	н.д.	н.д.	3-10- 7	46 4
59944 7	2611	2630	Экзон 19 / повтор	TTTTGTTGTCG CAGCTGTTT	83	н.д.	н.д.	6-8-6	46 4
59950 8	2612	2631	Экзон 19 / повтор	TTTTTGTGTC GCAGCTGTT	90	н.д.	н.д.	3-10- 7	46 5
59944 8	2612	2631	Экзон 19 / повтор	TTTTTGTGTC GCAGCTGTT	87	н.д.	н.д.	6-8-6	46 5

Пример 119. Антисмысловое ингибирование человеческого фактора комплемента В (CFB) в HepG2 клетках МОЕ гэмперами.

Были сконструированы дополнительные антисмысловые олигонуклеотиды, направленные на нуклеиновую кислоту человеческого фактора комплемента В (CFB), и были протестированы на их воздействие *in vitro* на мРНК CFB. Антисмысловые олигонуклеотиды были протестированы в серии экспериментов, которые имели аналогичные условия культивирования. Результаты для каждого эксперимента представлены в отдельных таблицах, показанных ниже. Культивированные клетки HepG2 с плотностью 20000 клеток на лунку были трансфицированы с использованием электропорации с 2000 нМ антисмыслового олигонуклеотида. После периода обработки в течение около 24 ч, РНК выделяли из клеток и уровни мРНК CFB измеряли методом количественной ПЦР в реальном времени. Набор человеческих праймеров RTS3459 был использован для измерения уровней мРНК. Уровни мРНК CFB были скорректированы в соответствии с содержанием суммарной РНК, измеренным с помощью RIBOGREEN®.

Результаты представлены как процентное ингибирование CFB относительно необработанных контрольных клеток.

Впервые сконструированные химерные антисмысловые олигонуклеотиды в представленных ниже таблицах были сконструированы как 4-8-5 МОЕ, 5-8-5 МОЕ, 5-9-5 МОЕ, 5-10-5 МОЕ, 6-7-6- МОЕ, 3-10-5 МОЕ или 6-8-6 МОЕ гэмперы.

Гэмперы 4-8-5 МОЕ имеют 17 нуклеозидов в длину, причем центральный гэм состоит из восьми 2'-дезоксинуклеозидов и окружен крыльями с 5' конца и в 3' конца, содержащими четыре и пять нуклеозидов соответственно. Гэмперы 5-8-5 МОЕ имеют 18 нуклеозидов в длину, причем центральный гэм состоит из восьми 2'-дезоксинуклеозидов и окружен крыльями с 5' конца и в 3' конца, содержащими по пять нуклеозидов каждое. Гэмперы 5-9-5 МОЕ имеют 19 нуклеозидов в длину, причем центральный гэм состоит из девяти 2'-дезоксинуклеозидов и окружен крыльями с 5' конца и в 3' конца, содержащими по пять нуклеозидов каждое. Гэмперы 5-10-5 МОЕ имеют 20 нуклеозидов в длину, причем центральный гэм состоит из десяти 2'-дезоксинуклеозидов и окружен крыльями с 5' конца и в 3' конца, содержащими по пять нуклеозидов каждое. Гэмперы 3-10-5 МОЕ имеют 18 нуклеозидов в длину, причем центральный гэм состоит из десяти 2'-дезоксинуклеозидов и окружен крыльями с 5' конца и в 3' конца, содержащими три и пять нуклеозидов соответственно. Гэмперы 6-7-6 МОЕ имеют 19 нуклеозидов в длину, причем центральный гэм состоит из семи 2'-дезоксинуклеозидов и окружен крыльями с 5' конца и в 3' конца, содержащими по шесть нуклеозидов каждое. Гэмперы 6-8-6 МОЕ имеют 20 нуклеозидов в длину, причем центральный гэм состоит из восьми 2'-дезоксинуклеозидов и окружен крыльями с 5' конца и в 3' конца, содержащими по шесть нуклеозидов каждое. Каждый нуклеозид 5'-крыла и нуклеозид 3'-крыла имеет 2'-МОЕ модификации. Межнуклеозидные связи в каждом гэмпере представляют собой тиофосфатные (P=S) связи. Все остатки цитозина в каждом гэмпере представляют собой 5-метилцитозины.

"Сайт инициации" обозначает самый крайний 5' нуклеозид, на который направлен гэмпер в последовательности гена человека. "Сайт терминации" обозначает самый крайний 3' нуклеозид, на который направлен гэмпер в последовательности гена человека.

Каждый гэмпер, перечисленный в представленных ниже таблицах, направлен на мРНК CFB человека, обозначенную в данном описании как SEQ ID NO: 1 (с номером доступа GENBANK NM_001710.5) или на геномную последовательность CFB человека, обозначенную в настоящем документе как SEQ ID NO: 2 (с номером доступа GENBANK NT_007592.15, усеченную с нуклеотида 31852000 по 31861000), или на обе последовательности, "н/д" означает, что антисмысловый олигонуклеотид не направлен на указанную конкретную последовательность гена с 100% комплементарностью.

Ингибирование мРНК CFB МОЕ гэлмерами, направленными на SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2

ISI S №	SEQ ID NO: 1 сайт иници ации	SEQ ID NO: 1 сайт терми нации	Обла сть- миш ень	Последовательно сть	% ингибир ования	SEQ ID NO: 2 сайт иници ации	SEQ ID NO: 2 сайт терми нации	Мо тив	S E Q ID N O:
599 160	2560	2577	Экзо н 18	CCCCTTATAGA AAACCCA	26	7795	7812	5- 8-5	74 0
599 161	2561	2578	Экзо н 18	ACCCCTTATAG AAAACCC	20	7796	7813	5- 8-5	74 1
599 162	2562	2579	Экзо н 18	AACCCCTTATA GAAAACC	12	7797	7814	5- 8-5	74 2
599 163	2563	2580	Экзо н 18	AAACCCCTTAT AGAAAAC	11	7798	7815	5- 8-5	74 3
599 164	2564	2581	Экзо н 18	GAAACCCCTTA TAGAAAA	11	7799	7816	5- 8-5	74 4
599 165	2566	2583	Экзо н 18	AGGAAACCCCT TATAGAA	0	7801	7818	5- 8-5	74 5
599 166	2567	2584	Экзо н 18	CAGGAAACCCC TTATAGA	12	7802	7819	5- 8-5	74 6
599 167	2568	2585	Экзо н 18	GCAGGAAACCC CTTATAG	14	7803	7820	5- 8-5	74 7
599	2569	2586	Экзо	AGCAGGAAACC	16	7804	7821	5-	74

168			н 18	CCTTATA				8-5	8
599 169	2570	2587	Эк30 н 18	CAGCAGGAAAC CCCTTAT	24	7805	7822	5- 8-5	74 9
599 170	2571	2588	Эк30 н 18	CCAGCAGGAAA CCCCTTA	37	7806	7823	5- 8-5	75 0
599 171	2572	2589	Эк30 н 18	TCCAGCAGGAA ACCCCTT	30	7807	7824	5- 8-5	75 1
599 172	2573	2590	Эк30 н 18	GTCCAGCAGGA AACCCCT	43	7808	7825	5- 8-5	75 2
599 173	2574	2591	Эк30 н 18	TGTCCAGCAGG AAACCCC	47	7809	7826	5- 8-5	75 3
599 174	2575	2592	Эк30 н 18	CTGTCCAGCAG GAAACCC	27	7810	7827	5- 8-5	75 4
599 175	2576	2593	Эк30 н 18	CCTGTCCAGCA GGAAACC	30	7811	7828	5- 8-5	75 5
599 176	2577	2594	Эк30 н 18	CCCTGTCCAGC AGGAAAC	34	7812	7829	5- 8-5	75 6
599 177	2578	2595	Эк30 н 18	CCCCTGTCCAG CAGGAAA	41	7813	7830	5- 8-5	75 7
599 178	2580	2597	Эк30 н 18	CGCCCCTGTCC AGCAGGA	67	7815	7832	5- 8-5	75 8
599 179	2581	2598	Эк30 н 18	ACGCCCCTGTC CAGCAGG	61	7816	7833	5- 8-5	75 9
599 180	2582	2599	Эк30 н 18	CACGCCCCTGT CCAGCAG	62	7817	7834	5- 8-5	76 0
599 181	2583	2600	Эк30 н 18	CCACGCCCCTG TCCAGCA	63	7818	7835	5- 8-5	76 1
599 128	2584	2600	Эк30 н 18	CCACGCCCCTG TCCAGC	55	7819	7835	4- 8-5	64 9
599 182	2584	2601	Эк30 н 18	CCCACGCCCCT GTCCAGC	58	7819	7836	5- 8-5	76 2
599 129	2585	2601	Эк30 н 18	CCCACGCCCCT GTCCAG	41	7820	7836	4- 8-5	65 0
599 183	2585	2602	Эк30 н 18	TCCCACGCCCC TGTCCAG	43	7820	7837	5- 8-5	76 3
599 130	2586	2602	Эк30 н 18	TCCCACGCCCC TGTCCA	46	7821	7837	4- 8-5	65 1

599 184	2586	2603	Эк30 н 18	ATCCCACGCCC CTGTCCA	32	7821	7838	5- 8-5	76 4
599 131	2587	2603	Эк30 н 18	ATCCCACGCCC CTGTCC	30	7822	7838	4- 8-5	65 2
599 185	2587	2604	Эк30 н 18	AATCCCACGCC CCTGTCC	35	7822	7839	5- 8-5	76 5
599 132	2588	2604	Эк30 н 18	AATCCCACGCC CCTGTC	52	7823	7839	4- 8-5	65 3
599 186	2588	2605	Эк30 н 18	CAATCCCACGC CCCTGTC	55	7823	7840	5- 8-5	76 6
599 133	2589	2605	Эк30 н 18	CAATCCCACGC CCCTGT	66	7824	7840	4- 8-5	65 4
599 187	2589	2606	Эк30 н 18	TCAATCCCACG CCCCTGT	72	7824	7841	5- 8-5	76 7
599 134	2590	2606	Эк30 н 18	TCAATCCCACG CCCCTG	80	7825	7841	4- 8-5	65 5
599 188	2590	2607	Эк30 н 18	TTCAATCCCAC GCCCCTG	92	7825	7842	5- 8-5	76 8
599 135	2591	2607	Эк30 н 18	TTCAATCCCAC GCCCCT	61	7826	7842	4- 8-5	65 6
599 189	2591	2608	Эк30 н 18	ATTCAATCCCA CGCCCCT	52	7826	7843	5- 8-5	76 9
599 136	2592	2608	Эк30 н 18	ATTCAATCCCA CGCCCC	68	7827	7843	4- 8-5	65 7
599 190	2592	2609	Эк30 н 18	AATTCAATCCC ACGCCCC	62	7827	7844	5- 8-5	77 0
599 137	2593	2609	Эк30 н 18	AATTCAATCCC ACGCCC	51	7828	7844	4- 8-5	65 8
599 191	2593	2610	Эк30 н 18	TAATTCAATCC CACGCCC	54	7828	7845	5- 8-5	77 1
599 138	2594	2610	Эк30 н 18	TAATTCAATCC CACGCC	71	7829	7845	4- 8-5	65 9
599 192	2594	2611	Эк30 н 18	TTAATTCAATC CCACGCC	66	7829	7846	5- 8-5	77 2
599 139	2595	2611	Эк30 н 18	TTAATTCAATC CCACGC	80	7830	7846	4- 8-5	66 0
599	2595	2612	Эк30	TTAATTCAAT	74	7830	7847	5-	77

193			н 18	CCCACGC				8-5	3
599 140	2596	2612	Эк30 н 18	TTTAATTCAAT CCCACG	66	7831	7847	4- 8-5	78 6
599 194	2596	2613	Эк30 н 18	TTTTAATTCAA TCCCACG	66	7831	7848	5- 8-5	77 4
599 141	2597	2613	Эк30 н 18	TTTTAATTCAA TCCCAC	63	7832	7848	4- 8-5	66 2
599 195	2597	2614	Эк30 н 18	GTTTAAATTCA ATCCCAC	86	7832	7849	5- 8-5	77 5
599 142	2598	2614	Эк30 н 18	GTTTAAATTCA ATCCCA	69	7833	7849	4- 8-5	66 3
599 196	2598	2615	Эк30 н 18	TGTTTAAATTC AATCCCA	82	7833	7850	5- 8-5	77 6
599 143	2599	2615	Эк30 н 18	TGTTTAAATTC AATCCC	59	7834	7850	4- 8-5	66 4
599 197	2599	2616	Эк30 н 18	CTGTTTAAATTC AATCCC	79	7834	7851	5- 8-5	77 7
599 144	2600	2616	Эк30 н 18	CTGTTTAAATTC AATCC	52	7835	7851	4- 8-5	66 5
599 198	2600	2617	Эк30 н 18	GCTGTTTAAAT TCAATCC	86	7835	7852	5- 8-5	77 8
599 145	2601	2617	Эк30 н 18	GCTGTTTAAAT TCAATC	53	7836	7852	4- 8-5	66 6
599 199	2601	2618	Эк30 н 18	AGCTGTTTAA TTCAATC	72	7836	7853	5- 8-5	77 9
599 146	2602	2618	Эк30 н 18	AGCTGTTTAA TTCAAT	42	7837	7853	4- 8-5	66 7
599 200	2602	2619	Эк30 н 18	CAGCTGTTTAA ATTCAAT	76	7837	7854	5- 8-5	78 0
599 147	2603	2619	Эк30 н 18	CAGCTGTTTAA ATTCAA	55	7838	7854	4- 8-5	66 8
599 201	2603	2620	Эк30 н 18	GCAGCTGTTTT AATTCAA	87	7838	7855	5- 8-5	78 1
532 917	2604	2623	Эк30 н 18	GTCGCAGCTGT TTTAATTCA	93	7839	7858	5- 10- 5	31 7
599	2604	2620	Эк30	GCAGCTGTTTT	84	7839	7855	4-	66

148			н 18	AATTCA				8-5	9
599 202	2604	2621	Экзо н 18	CGCAGCTGTTT TAATTCA	89	7839	7856	5- 8-5	78 2
599 149	2605	2621	Экзо н 18	CGCAGCTGTTT TAATTC	92	7840	7856	4- 8-5	67 0
599 203	2605	2622	Экзо н 18	TCGCAGCTGTT TTAATTC	90	7840	7857	5- 8-5	78 3
599 150	2606	2622	Экзо н 18	TCGCAGCTGTT TTAATT	75	7841	7857	4- 8-5	67 1
599 151	2607	2623	Экзо н 18	GTCGCAGCTGT TTTAAT	80	7842	7858	4- 8-5	67 2
599 152	2608	2624	Экзо н 18	TGTCGCAGCTG TTTAA	76	7843	7859	4- 8-5	67 3
599 153	2609	2625	Экзо н 18	TTGTCGCAGCT GTTTA	56	7844	7860	4- 8-5	67 4
599 154	2610	2626	Экзо н 18	GTTGTCGCAGC TGTTTT	85	7845	7861	4- 8-5	67 5
599 155	2611	2627	Экзо н 18	TGTTGTCGCAG CTGTTT	89	7846	7862	4- 8-5	67 6
599 156	2612	2628	Экзо н 18 / повт ор	TTGTTGTCGCA GCTGTT	83	н.д.	н.д.	4- 8-5	81 3
599 157	2613	2629	Экзо н 18 / повт ор	TTTGTTGTCGC AGCTGT	78	н.д.	н.д.	4- 8-5	67 8
599 158	2614	2630	Экзо н 18 / повт ор	TTTTGTTGTCGC AGCTG	83	н.д.	н.д.	4- 8-5	67 9
599 159	2615	2631	Экзо н 18 / повт ор	TTTTGTTGTCG CAGCT	65	н.д.	н.д.	4- 8-5	68 0
			повт ор						
599 204	2606	2623	Экзо н 18	GTCGCAGCTGT TTTAATT	83	7841	7858	5- 8-5	78 4

Ингибирование мРНК CFV МОЕ гепмерами, направленными на SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2

ISI S №	SEQ ID NO: 1 сайт инициации	SEQ ID NO: 1 сайт термации	Область-мишень	Последовательность	% ингибирования	SEQ ID NO: 2 сайт инициации	SEQ ID NO: 2 сайт термации	Мотив	SEQ ID NO:
599 509	2552	2570	Экзон 18	TAGAAAACCCA AATCCTCA	45	7787	7805	6-7-6	681
599 213	2553	2570	Экзон 18	TAGAAAACCCA AATCCTC	89	7788	7805	3-10-5	785
599 273	2553	2571	Экзон 18	ATAGAAAACCC AAATCCTC	85	7788	7806	6-7-6	682
599 214	2554	2571	Экзон 18	ATAGAAAACCC AAATCCT	79	7789	7806	3-10-5	786
599 274	2554	2572	Экзон 18	TATAGAAAACC CAAATCCT	75	7789	7807	6-7-6	683
599 215	2555	2572	Экзон 18	TATAGAAAACC CAAATCC	81	7790	7807	3-10-5	787
599 216	2556	2573	Экзон 18	TTATAGAAAAC CCAAATC	87	7791	7808	3-10-5	788
599 275	2556	2574	Экзон 18	CTTATAGAAAA CCCAAATC	84	7791	7809	6-7-6	684
599 217	2557	2574	Экзон 18	CTTATAGAAAA CCCAAAT	84	7792	7809	3-10-	789

								5	
599 276	2557	2575	Эк30 н 18	CCTTATAGAAA ACCCAAAT	68	7792	7810	6- 7-6	68 5
599 218	2558	2575	Эк30 н 18	CCTTATAGAAA ACCCAAA	82	7793	7810	3- 10- 5	79 0
599 277	2558	2576	Эк30 н 18	CCCTTATAGAA AACCCAAA	82	7793	7811	6- 7-6	68 6
599 219	2559	2576	Эк30 н 18	CCCTTATAGAA AACCCAA	81	7794	7811	3- 10- 5	79 1
599 278	2559	2577	Эк30 н 18	CCCCTTATAGA AAACCCAA	84	7794	7812	6- 7-6	68 7
599 220	2560	2577	Эк30 н 18	CCCCTTATAGA AAACCCA	92	7795	7812	3- 10- 5	74 0
599 279	2560	2578	Эк30 н 18	ACCCCTTATAG AAAACCCA	92	7795	7813	6- 7-6	68 8
599 221	2561	2578	Эк30 н 18	ACCCCTTATAG AAAACCC	93	7796	7813	3- 10- 5	74 1
599 280	2561	2579	Эк30 н 18	AACCCCTTATA GAAAACCC	90	7796	7814	6- 7-6	68 9
599 222	2562	2579	Эк30 н 18	AACCCCTTATA GAAAACC	95	7797	7814	3- 10- 5	74 2
599 223	2563	2580	Эк30 н 18	AAACCCCTTAT AGAAAAC	93	7798	7815	3- 10- 5	74 3
599 224	2564	2581	Эк30 н 18	GAAACCCCTTA TAGAAAA	90	7799	7816	3- 10- 5	74 4
599 225	2566	2583	Эк30 н 18	AGGAAACCCCT TATAGAA	93	7801	7818	3- 10- 5	74 5
599 226	2567	2584	Эк30 н 18	CAGGAAACCCC TTATAGA	95	7802	7819	3- 10-	74 6

								5	
599 227	2568	2585	Экзо н 18	GCAGGAAACCC CTTATAG	94	7803	7820	3- 10- 5	74 7
599 228	2569	2586	Экзо н 18	AGCAGGAAAC CCCTTATA	96	7804	7821	3- 10- 5	74 8
599 229	2570	2587	Экзо н 18	CAGCAGGAAA CCCCTTAT	92	7805	7822	3- 10- 5	74 9
599 230	2571	2588	Экзо н 18	CCAGCAGGAA ACCCCTTA	88	7806	7823	3- 10- 5	75 0
599 231	2572	2589	Экзо н 18	TCCAGCAGGAA ACCCCTT	83	7807	7824	3- 10- 5	75 1
599 232	2573	2590	Экзо н 18	GTCCAGCAGGA AACCCCT	89	7808	7825	3- 10- 5	75 2
599 233	2574	2591	Экзо н 18	TGTCCAGCAGG AAACCCC	83	7809	7826	3- 10- 5	75 3
599 234	2575	2592	Экзо н 18	CTGTCCAGCAG GAAACCC	88	7810	7827	3- 10- 5	75 4
599 235	2576	2593	Экзо н 18	CCTGTCCAGCA GGAAACC	91	7811	7828	3- 10- 5	75 5
599 236	2577	2594	Экзо н 18	CCCTGTCCAGC AGGAAAC	90	7812	7829	3- 10- 5	75 6
599 237	2578	2595	Экзо н 18	CCCCTGTCCAG CAGGAAA	34	7813	7830	3- 10- 5	75 7
599 238	2580	2597	Экзо н 18	CGCCCCTGTCC AGCAGGA	14	7815	7832	3- 10- 5	75 8

599 239	2581	2598	Экзо н 18	ACGCCCCTGTC CAGCAGG	10	7816	7833	3- 10- 5	75 9
599 240	2582	2599	Экзо н 18	CACGCCCCTGT CCAGCAG	26	7817	7834	3- 10- 5	76 0
599 241	2583	2600	Экзо н 18	CCACGCCCCTG TCCAGCA	11	7818	7835	3- 10- 5	76 1
599 242	2584	2601	Экзо н 18	CCCACGCCCCT GTCCAGC	24	7819	7836	3- 10- 5	76 2
599 243	2585	2602	Экзо н 18	TCCCACGCCCC TGTCCAG	23	7820	7837	3- 10- 5	76 3
599 244	2586	2603	Экзо н 18	ATCCCACGCCC CTGTCCA	29	7821	7838	3- 10- 5	76 4
599 245	2587	2604	Экзо н 18	AATCCCACGCC CCTGTCC	11	7822	7839	3- 10- 5	76 5
599 246	2588	2605	Экзо н 18	CAATCCCACGC CCCTGTC	0	7823	7840	3- 10- 5	76 6
599 247	2589	2606	Экзо н 18	TCAATCCCACG CCCCTGT	21	7824	7841	3- 10- 5	76 7
599 248	2590	2607	Экзо н 18	TTCAATCCCAC GCCCCTG	0	7825	7842	3- 10- 5	76 8
599 249	2591	2608	Экзо н 18	ATTCAATCCCA CGCCCCT	9	7826	7843	3- 10- 5	76 9
599 250	2592	2609	Экзо н 18	AATTCAATCCC ACGCCCC	4	7827	7844	3- 10- 5	77 0
599	2593	2610	Экзо	TAATTCAATCC	12	7828	7845	3-	77

251			н 18	CACGCCC				10-5	1
599 252	2594	2611	Экзо н 18	TTAATTCAATC CCACGCC	2	7829	7846	3-10-5	77 2
599 253	2595	2612	Экзо н 18	TTTAATTCAAT CCCACGC	28	7830	7847	3-10-5	77 3
599 254	2596	2613	Экзо н 18	TTTTAATTCAA TCCCACG	27	7831	7848	3-10-5	77 4
599 255	2597	2614	Экзо н 18	GTTTAAATTCA ATCCCAC	38	7832	7849	3-10-5	77 5
599 256	2598	2615	Экзо н 18	TGTTTAAATTC AATCCCA	36	7833	7850	3-10-5	77 6
599 257	2599	2616	Экзо н 18	CTGTTTAAATT CAATCCC	48	7834	7851	3-10-5	77 7
599 258	2600	2617	Экзо н 18	GCTGTTTAAAT TCAATCC	19	7835	7852	3-10-5	77 8
599 259	2601	2618	Экзо н 18	AGCTGTTTAA TTCAATC	36	7836	7853	3-10-5	77 9
599 260	2602	2619	Экзо н 18	CAGCTGTTTAA ATTCAAT	58	7837	7854	3-10-5	78 0
599 261	2603	2620	Экзо н 18	GCAGCTGTTTT AATTCAA	35	7838	7855	3-10-5	78 1
532 917	2604	2623	Экзо н 18	GTCGCAGCTGT TTTAATTCA	96	7839	7858	5-10-5	31 7
599 262	2604	2621	Экзо н 18	CGCAGCTGTTT TAATTCA	52	7839	7856	3-10-	78 2

								5	
599 263	2605	2622	Экзо н 18	TCGCAGCTGTT TTAATTC	66	7840	7857	3- 10- 5	78 3
599 264	2606	2623	Экзо н 18	GTCGCAGCTGT TTTAATT	48	7841	7858	3- 10- 5	78 4
599 265	2607	2624	Экзо н 18	TGTCGCAGCTG TTTTAAT	46	7842	7859	3- 10- 5	79 2
599 205	2607	2624	Экзо н 18	TGTCGCAGCTG TTTTAAT	83	7842	7859	5- 8-5	79 2
599 266	2608	2625	Экзо н 18	TTGTCGCAGCT GTTTTAA	76	7843	7860	3- 10- 5	79 3
599 206	2608	2625	Экзо н 18	TTGTCGCAGCT GTTTTAA	90	7843	7860	5- 8-5	79 3
599 267	2609	2626	Экзо н 18	GTTGTCGCAGC TGTTTTA	53	7844	7861	3- 10- 5	79 4
599 207	2609	2626	Экзо н 18	GTTGTCGCAGC TGTTTTA	82	7844	7861	5- 8-5	79 4
599 268	2610	2627	Экзо н 18	TGTTGTCGCAG CTGTTTT	58	7845	7862	3- 10- 5	79 5
599 208	2610	2627	Экзо н 18	TGTTGTCGCAG CTGTTTT	70	7845	7862	5- 8-5	79 5
599 269	2611	2628	Экзо н 18 / повт ор	TTGTTGTCGCA GCTGTTT	38	н.д.	н.д.	3- 10- 5	79 6
599 209	2611	2628	Экзо н 18 / повт ор	TTGTTGTCGCA GCTGTTT	50	н.д.	н.д.	5- 8-5	79 6

599 270	2612	2629	Экзо н 18 / повт ор	TTTGTTGTCGC AGCTGTT	46	н.д.	н.д.	3- 10- 5	79 7
599 210	2612	2629	Экзо н 18 / повт ор	TTTGTTGTCGC AGCTGTT	76	н.д.	н.д.	5- 8-5	79 7
599 271	2613	2630	Экзо н 18 / повт ор	TTTTGTTGTCG CAGCTGT	64	н.д.	н.д.	3- 10- 5	79 8
599 211	2613	2630	Экзо н 18 / повт ор	TTTTGTTGTCG CAGCTGT	78	н.д.	н.д.	5- 8-5	79 8
599 272	2614	2631	Экзо н 18 / повт ор	TTTTGTTGTCG CAGCTG	89	н.д.	н.д.	3- 10- 5	79 9
599 212	2614	2631	Экзо н 18 / повт ор	TTTTGTTGTCG CAGCTG	84	н.д.	н.д.	5- 8-5	79 9

Ингибирование мРНК CFB МОЕ гэлмерами, направленными на SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2

ISI S №	SEQ ID NO: 1 сайт иници ации	SEQ ID NO: 1 сайт терми нации	Обла сть- миш ень	Последовательнос ть	% ингибир ования	SEQ ID NO: 2 сайт иници ации	SEQ ID NO: 2 сайт терми нации	Мо тив	S E Q ID N O:
599 511	2552	2571	Экзо н 18	ATAGAAAACCC AAATCCTCA	38	7787	7806	6- 8-6	41 0
599 389	2553	2572	Экзо н 18	TATAGAAAACC CAAATCCTC	80	7788	7807	6- 8-6	41 1
599 390	2554	2573	Экзо н 18	TTATAGAAAAC CCAAATCCT	92	7789	7808	6- 8-6	41 2
599 391	2555	2574	Экзо н 18	CTTATAGAAAA CCCAAATCC	90	7790	7809	6- 8-6	41 3
599 392	2556	2575	Экзо н 18	CCTTATAGAAA ACCCAAATC	87	7791	7810	6- 8-6	41 4
599 393	2557	2576	Экзо н 18	CCCTTATAGAA AACCCAAAT	87	7792	7811	6- 8-6	41 5
599 394	2558	2577	Экзо н 18	CCCCTTATAGA AAACCCAAA	74	7793	7812	6- 8-6	41 6
599 395	2559	2578	Экзо н 18	ACCCCTTATAG AAAACCCAA	78	7794	7813	6- 8-6	41 7
599 396	2560	2579	Экзо н 18	AACCCCTTATA GAAAACCCA	77	7795	7814	6- 8-6	41 8
599 397	2561	2580	Экзо н 18	AAACCCCTTAT AGAAAACCC	89	7796	7815	6- 8-6	41 9
599 398	2562	2581	Экзо н 18	GAAACCCCTTA TAGAAAACC	90	7797	7816	6- 8-6	42 0
599 399	2563	2582	Экзо н 18	GGAAACCCCTT ATAGAAAAC	91	7798	7817	6- 8-6	42 1
599 400	2564	2583	Экзо н 18	AGGAAACCCCT TATAGAAAA	88	7799	7818	6- 8-6	42 2
599 401	2565	2584	Экзо н 18	CAGGAAACCCC TTATAGAAA	85	7800	7819	6- 8-6	42 3
599 402	2566	2585	Экзо н 18	GCAGGAAACCC CTTATAGAA	77	7801	7820	6- 8-6	42 4
599	2567	2586	Экзо	AGCAGGAAACC	85	7802	7821	6-	42

403			н 18	CCTTATAGA				8-6	5
599 404	2568	2587	Эк30 н 18	CAGCAGGAAAC CCCTTATAG	90	7803	7822	6- 8-6	42 6
599 405	2569	2588	Эк30 н 18	CCAGCAGGAAA CCCCTTATA	89	7804	7823	6- 8-6	42 7
599 406	2570	2589	Эк30 н 18	TCCAGCAGGAA ACCCCTTAT	72	7805	7824	6- 8-6	42 8
599 407	2571	2590	Эк30 н 18	GTCCAGCAGGA AACCCCTTA	87	7806	7825	6- 8-6	23 7
599 408	2572	2591	Эк30 н 18	TGTCCAGCAGG AAACCCCTT	87	7807	7826	6- 8-6	42 9
599 409	2573	2592	Эк30 н 18	CTGTCCAGCAG GAAACCCCT	83	7808	7827	6- 8-6	43 0
599 410	2574	2593	Эк30 н 18	CCTGTCCAGCA GGAAACCCC	88	7809	7828	6- 8-6	43 1
599 411	2575	2594	Эк30 н 18	CCCTGTCCAGC AGGAAACCC	45	7810	7829	6- 8-6	43 2
599 412	2576	2595	Эк30 н 18	CCCCTGTCCAG CAGGAAACC	66	7811	7830	6- 8-6	43 3
599 413	2577	2596	Эк30 н 18	GCCCCTGTCCA GCAGGAAAC	92	7812	7831	6- 8-6	23 8
599 414	2578	2597	Эк30 н 18	CGCCCCTGTCC AGCAGGAAA	92	7813	7832	6- 8-6	43 4
599 415	2579	2598	Эк30 н 18	ACGCCCCTGTC CAGCAGGAA	87	7814	7833	6- 8-6	43 5
599 416	2580	2599	Эк30 н 18	CACGCCCCTGT CCAGCAGGA	91	7815	7834	6- 8-6	43 6
599 417	2581	2600	Эк30 н 18	CCACGCCCCTG TCCAGCAGG	84	7816	7835	6- 8-6	43 7
599 357	2582	2600	Эк30 н 18	CCACGCCCCTG TCCAGCAG	88	7817	7835	5- 9-5	70 8
599 418	2582	2601	Эк30 н 18	CCCACGCCCCT GTCCAGCAG	85	7817	7836	6- 8-6	43 8
599 358	2583	2601	Эк30 н 18	CCCACGCCCCT GTCCAGCA	86	7818	7836	5- 9-5	70 9
599 419	2583	2602	Эк30 н 18	TCCCACGCCCCT GTCCAGCA	91	7818	7837	6- 8-6	83 3

599 359	2584	2602	Экзо н 18	TCCCACGCCCCT GTCCAGC	85	7819	7837	5- 9-5	83 4
599 420	2584	2603	Экзо н 18	ATCCCACGCCC CTGTCCAGC	91	7819	7838	6- 8-6	44 0
599 360	2585	2603	Экзо н 18	ATCCCACGCCC CTGTCCAG	89	7820	7838	5- 9-5	71 1
599 421	2585	2604	Экзо н 18	AATCCCACGCC CCTGTCCAG	87	7820	7839	6- 8-6	44 1
599 361	2586	2604	Экзо н 18	AATCCCACGCC CCTGTCCA	89	7821	7839	5- 9-5	71 2
599 422	2586	2605	Экзо н 18	CAATCCCACGC CCCTGTCCA	90	7821	7840	6- 8-6	44 2
599 362	2587	2605	Экзо н 18	CAATCCCACGC CCCTGTCC	94	7822	7840	5- 9-5	71 3
599 423	2587	2606	Экзо н 18	TCAATCCCACG CCCCTGTCC	85	7822	7841	6- 8-6	84 1
599 363	2588	2606	Экзо н 18	TCAATCCCACG CCCCTGTC	88	7823	7841	5- 9-5	71 4
599 424	2588	2607	Экзо н 18	TTCAATCCCAC GCCCCTGTC	88	7823	7842	6- 8-6	44 4
599 364	2589	2607	Экзо н 18	TTCAATCCCAC GCCCCTGT	88	7824	7842	5- 9-5	71 5
599 425	2589	2608	Экзо н 18	ATTCAATCCCA CGCCCCTGT	68	7824	7843	6- 8-6	44 5
599 365	2590	2608	Экзо н 18	ATTCAATCCCA CGCCCCTG	48	7825	7843	5- 9-5	71 6
599 426	2590	2609	Экзо н 18	AATTCAATCCC ACGCCCCTG	55	7825	7844	6- 8-6	44 6
599 366	2591	2609	Экзо н 18	AATTCAATCCC ACGCCCCT	28	7826	7844	5- 9-5	71 7
599 427	2591	2610	Экзо н 18	TAATTCAATCCC ACGCCCCT	13	7826	7845	6- 8-6	84 9
599 367	2592	2610	Экзо н 18	TAATTCAATCCC ACGCCCC	21	7827	7845	5- 9-5	71 8
599 428	2592	2611	Экзо н 18	TTAATTCAATCC CACGCCCC	39	7827	7846	6- 8-6	44 8
599	2593	2611	Экзо	TTAATTCAATCC	20	7828	7846	5-	71

368			н 18	CACGCCC				9-5	9
599 429	2593	2612	Эк30 н 18	TTTAATTCAATC CCACGCCC	18	7828	7847	6- 8-6	44 9
599 369	2594	2612	Эк30 н 18	TTTAATTCAATC CCACGCC	78	7829	7847	5- 9-5	72 0
599 430	2594	2613	Эк30 н 18	TTTAATTCAAT CCCACGCC	24	7829	7848	6- 8-6	45 0
599 370	2595	2613	Эк30 н 18	TTTAATTCAAT CCCACGC	25	7830	7848	5- 9-5	72 1
599 431	2595	2614	Эк30 н 18	GTTTTAATTCAA TCCCACGC	30	7830	7849	6- 8-6	45 1
599 371	2596	2614	Эк30 н 18	GTTTTAATTCAA TCCCACG	84	7831	7849	5- 9-5	72 2
599 432	2596	2615	Эк30 н 18	TGTTTAATTCA ATCCCACG	29	7831	7850	6- 8-6	45 2
599 372	2597	2615	Эк30 н 18	TGTTTAATTCA ATCCCAC	83	7832	7850	5- 9-5	72 3
599 373	2598	2616	Эк30 н 18	CTGTTTAATTC AATCCCA	81	7833	7851	5- 9-5	72 4
599 374	2599	2617	Эк30 н 18	GCTGTTTAATT CAATCCC	26	7834	7852	5- 9-5	72 5
599 375	2600	2618	Эк30 н 18	AGCTGTTTAAT TCAATCC	26	7835	7853	5- 9-5	72 6
599 376	2601	2619	Эк30 н 18	CAGCTGTTTAA TTCAATC	62	7836	7854	5- 9-5	72 7
599 377	2602	2620	Эк30 н 18	GCAGCTGTTTA ATTCAAT	21	7837	7855	5- 9-5	72 8
599 378	2603	2621	Эк30 н 18	CGCAGCTGTTT AATTCAA	90	7838	7856	5- 9-5	72 9
532 917	2604	2623	Эк30 н 18	GTCGCAGCTGT TTTAATTCA	95	7839	7858	5- 10- 5	86 7
599 379	2604	2622	Эк30 н 18	TCGCAGCTGTT TAATTCA	88	7839	7857	5- 9-5	73 0
599 380	2605	2623	Эк30 н 18	GTCGCAGCTGT TTTAATTC	37	7840	7858	5- 9-5	86 9
599	2606	2624	Эк30	TGTCGCAGCTG	33	7841	7859	5-	73

381			н 18	TTTTAATT				9-5	2
599 382	2607	2625	Экзо н 18	TTGTCGCAGCT GTTTAAAT	81	7842	7860	5- 9-5	73 3
599 383	2608	2626	Экзо н 18	GTTGTCGCAGC TGTTTAA	54	7843	7861	5- 9-5	73 4
599 384	2609	2627	Экзо н 18	TGTTGTCGCAG CTGTTTAA	85	7844	7862	5- 9-5	87 3
599 385	2610	2628	Экзо н 18 / повт ор	TTGTTGTCGCAG CTGTTTT	59	н.д.	н.д.	5- 9-5	73 6
599 386	2611	2629	Экзо н 18 / повт ор	TTTGTGTCGCA GCTGTTT	81	н.д.	н.д.	5- 9-5	73 7
599 387	2612	2630	Экзо н 18 / повт ор	TTTTGTGTCGC AGCTGTT	80	н.д.	н.д.	5- 9-5	73 8
599 388	2613	2631	Экзо н 18 / повт ор	TTTTGTGTCG CAGCTGT	84	н.д.	н.д.	5- 9-5	73 9

Пример 120. Антисмысловое ингибирование человеческого фактора комплемента В (CFB) в HepG2 клетках МОЕ гэмперами.

Были сконструированы дополнительные антисмысловые олигонуклеотиды, направленные на нуклеиновую кислоту человеческого фактора комплемента В (CFB), и были протестированы на их воздействие *in vitro* на мРНК CFB. Культивированные клетки HepG2 с плотностью 20000 клеток на лунку были трансфицированы с использованием электропорации с 1000 нМ антисмыслового олигонуклеотида. После периода обработки в течение около 24 ч, РНК выделяли из клеток и уровни мРНК CFB измеряли методом количественной ПЦР в реальном времени. Набор человеческих праймеров RTS3459 был использован для измерения уровней мРНК. Уровни мРНК CFB были скорректированы в соответствии с содержанием суммарной РНК, измеренным с помощью RIBOGREEN®. Результаты представлены как процентное ингибирование CFB относительно необработанных контрольных клеток.

Впервые сконструированные химерные антисмысловые олигонуклеотиды в представленных ниже таблицах были сконструированы как дезокси, МОЕ и (S)-cEt олигонуклеотиды. Дезокси, МОЕ и (S)-cEt олигонуклеотиды имеют 16 нуклеозидов в длину, причем нуклеозид содержит либо модификацию сахара МОЕ, либо модификацию сахара (S)-cEt, либо дезокси модификацию. В колонке "Химизм" описаны модификации сахара для каждого олигонуклеотида. "k" означает (S)-cEt модификацию сахара; "d" означает дезоксирибозу; и "e" означает модификацию МОЕ.

"Сайт инициации" обозначает самый крайний 5' нуклеозид, на который направлен гэмпер в последовательности гена человека. "Сайт терминации" обозначает самый крайний 3' нуклеозид, на который направлен гэмпер в последовательности гена человека. Каждый гэмпер, перечисленный в представленных ниже таблицах, направлен на мРНК CFB человека, обозначенную в данном описании как SEQ ID NO: 1 (с номером доступа GENBANK NM_001710.5) или на геномную последовательность CFB человека, обозначенную в настоящем документе как SEQ ID NO: 2 (с номером доступа GENBANK NT_007592.15, усеченную с нуклеотида 31852000 по 31861000), или на обе последовательности, "н/д" означает, что антисмысловый олигонуклеотид не направлен на указанную конкретную последовательность гена с 100% комплементарностью.

Таблица 141

Ингибирование мРНК CFB дезокси, МОЕ и (S)-cEt олигонуклеотидами, направленными на SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2

ISIS №	SEQ ID NO: 1 сайт иннициации	SEQ ID NO: 1 сайт терминации	Область мишень	Последовательность	% ингибирования	SEQ ID NO: 2 сайт иннициации	SEQ ID NO: 2 сайт терминации	Мотив	SEQ ID NO:
599513	2551	2566	Экзон 18	AAACCCAAATCCTCAT	11	7786	7801	ekkeekkddddddkk	557
599514	2553	2568	Экзон 18	GAAAACCCAAATCCTC	13	7788	7803	ekkeekkddddddkk	801
599515	2555	2570	Экзон 18	TAGAAAACCCAAATCC	54	7790	7805	ekkeekkddddddkk	559
599516	2559	2574	Экзон 18	CTTATAGAAAACCCAA	16	7794	7809	ekkeekkddddddkk	561
599517	2560	2575	Экзон 18	CCTTATAGAAAACCCA	29	7795	7810	ekkeekkddddddkk	562
599518	2561	2576	Экзон 18	CCCTTATAGAAAACCC	55	7796	7811	ekkeekkddddddkk	563
599519	2562	2577	Экзон 18	CCCCTTATAGAAAAACC	31	7797	7812	ekkeekkddddddkk	564
599520	2563	2578	Экзон 18	ACCCCTTATAGAAAAC	14	7798	7813	ekkeekkddddddkk	565
599521	2564	2579	Экзон 18	AACCCCTTATAGAAA	9	7799	7814	ekkeekkddddddkk	566
599522	2565	2580	Экзон 18	AAACCCCTTATAGAAA	8	7800	7815	ekkeekkddddddkk	567
599523	2566	2581	Экзон 18	GAAACCCCTTATAGAAA	6	7801	7816	ekkeekkddddddkk	568
599524	2567	2582	Экзон 18	GGAAACCCCTTATAGAA	14	7802	7817	ekkeekkddddddkk	569
599525	2568	2583	Экзон 18	AGGAAACCCCTTATAG	6	7803	7818	ekkeekkddddddkk	570

59952	256	258	Экзон	CAGGAAACCCCTTA	16	780	7819	ekkeekkdddd	
6	9	4	18	TA		4		ddkk	571
59952	257	258	Экзон	GCAGGAAACCCCTT	0	780	7820	ekkeekkdddd	
7	0	5	18	AT		5		ddkk	572
59952	257	258	Экзон	AGCAGGAAACCCCT	6	780	7821	ekkeekkdddd	
8	1	6	18	TA		6		ddkk	573
59952	257	258	Экзон	CAGCAGGAAACCCC	6	780	7822	ekkeekkdddd	
9	2	7	18	TT		7		ddkk	574
59953	257	258	Экзон	TCCAGCAGGAAACC	29	780	7824	ekkeekkdddd	
0	4	9	18	CC		9		ddkk	576
59953	257	259	Экзон	GTCCAGCAGGAAAC	64	781	7825	ekkeekkdddd	
1	5	0	18	CC		0		ddkk	577
59953	257	259	Экзон	TGTCCAGCAGGAAA	43	781	7826	ekkeekkdddd	
2	6	1	18	CC		1		ddkk	578
59953	257	259	Экзон	CTGTCCAGCAGGAA	25	781	7827	ekkeekkdddd	
3	7	2	18	AC		2		ddkk	820
59953	257	259	Экзон	CCTGTCCAGCAGGA	12	781	7828	ekkeekkdddd	
4	8	3	18	AA		3		ddkk	580
59953	258	259	Экзон	CCCCTGTCCAGCAG	16	781	7830	ekkeekkdddd	
5	0	5	18	GA		5		ddkk	582
59953	258	259	Экзон	CGCCCCTGTCCAGC	27	781	7832	ekkeekkdddd	
6	2	7	18	AG		7		ddkk	584
59953	258	259	Экзон	ACGCCCCTGTCCAG	35	781	7833	ekkeekkdddd	
7	3	8	18	CA		8		ddkk	585
59953	258	259	Экзон	CACGCCCCTGTCCA	26	781	7834	ekkeekkdddd	
8	4	9	18	GC		9		ddkk	586
59953	258	260	Экзон	CCACGCCCCTGTCC	33	782	7835	ekkeekkdddd	
9	5	0	18	AG		0		ddkk	587
59954	258	260	Экзон	CCCACGCCCCTGTC	27	782	7836	ekkeekkdddd	
0	6	1	18	CA		1		ddkk	588
59954	258	260	Экзон	TCCCACGCCCCTGT	52	782	7837	ekkeekkdddd	
1	7	2	18	CC		2		ddkk	589
59954	258	260	Экзон	ATCCCACGCCCCTG	16	782	7838	ekkeekkdddd	
2	8	3	18	TC		3		ddkk	590
59954	258	260	Экзон	AATCCCACGCCCCT	19	782	7839	ekkeekkdddd	
3	9	4	18	GT		4		ddkk	591
59954	259	260	Экзон	CAATCCCACGCCCC	33	782	7840	ekkeekkdddd	831

4	0	5	18	TG		5		ddkk	
59954	259	260	ЭкзОН	TCAATCCCACGCCC	24	782	7841	ekkeekkkddddd	
5	1	6	18	CT		6		ddkk	593
59954	259	260	ЭкзОН	TTCAATCCCACGCC	54	782	7842	ekkeekkkddddd	
6	2	7	18	CC		7		ddkk	594
59954	259	260	ЭкзОН	ATTCAATCCCACGC	87	782	7843	ekkeekkkddddd	
7	3	8	18	CC		8		ddkk	595
59954	259	260	ЭкзОН	AATTCAATCCCACG	79	782	7844	ekkeekkkddddd	
8	4	9	18	CC		9		ddkk	596
59954	259	261	ЭкзОН	TAATTCAATCCCAC	62	783	7845	ekkeekkkddddd	
9	5	0	18	GC		0		ddkk	597
59955	259	261	ЭкзОН	TTAATTCAATCCCA	52	783	7846	ekkeekkkddddd	
0	6	1	18	CG		1		ddkk	598
59955	259	261	ЭкзОН	TTTAATTCAATCCC	27	783	7847	ekkeekkkddddd	
1	7	2	18	AC		2		ddkk	599
59957	259	261	ЭкзОН	TTTTAATTCAATCC	90	783	7848	eeekkkddddd	
7	7	3	18	CAC		2		kkeee	662
59955	259	261	ЭкзОН	TTTTAATTCAATCC	92	783	7848	ekkeekkkddddd	
2	8	3	18	CA		3		ddkk	600
59957	259	261	ЭкзОН	GTTTTAATTCAATC	88	783	7849	eeekkkddddd	
8	8	4	18	CCA		3		kkeee	663
59955	259	261	ЭкзОН	GTTTTAATTCAATC	91	783	7849	ekkeekkkddddd	
3	9	4	18	CC		4		ddkk	601
59957	259	261	ЭкзОН	TGTTTTAATTCAAT	79	783	7850	eeekkkddddd	
9	9	5	18	CCC		4		kkeee	664
59955	260	261	ЭкзОН	TGTTTTAATTCAAT	90	783	7850	ekkeekkkddddd	
4	0	5	18	CC		5		ddkk	602
59958	260	261	ЭкзОН	CTGTTTTAATTCAA	79	783	7851	eeekkkddddd	
0	0	6	18	TCC		5		kkeee	665
59955	260	261	ЭкзОН	CTGTTTTAATTCAA	79	783	7851	ekkeekkkddddd	
5	1	6	18	TC		6		ddkk	846
59958	260	261	ЭкзОН	GCTGTTTTAATTCA	90	783	7852	eeekkkddddd	
1	1	7	18	ATC		6		kkeee	666
59955	260	261	ЭкзОН	GCTGTTTTAATTCA	47	783	7852	ekkeekkkddddd	
6	2	7	18	AT		7		ddkk	604
59958	260	261	ЭкзОН	AGCTGTTTTAATTC	89	783	7853	eeekkkddddd	
2	2	8	18	AAT		7		kkeee	849

59955	260	261	ЭКОН	AGCTGTTTAAATTC	67	783	7853	ekkeekkkddddd	
7	3	8	18	AA		8		ddkk	850
59958	260	261	ЭКОН	CAGCTGTTTAAATT	49	783	7854	eeekkkddddd	
3	3	9	18	CAA		8		kkeee	668
53291	260	262	ЭКОН	GTCGCAGCTGTTTT	78	783	7858	eeeeedddddd	
7	4	3	18	AATCA		9		ddeeeee	317
59955	260	261	ЭКОН	CAGCTGTTTAAATT	80	783	7854	ekkeekkkddddd	
8	4	9	18	CA		9		ddkk	606
59958	260	262	ЭКОН	GCAGCTGTTTAAAT	66	783	7855	eeekkkddddd	
4	4	0	18	TCA		9		kkeee	669
59955	260	262	ЭКОН	GCAGCTGTTTAAAT	38	784	7855	ekkeekkkddddd	
9	5	0	18	TC		0		ddkk	607
59958	260	262	ЭКОН	CGCAGCTGTTTAA	80	784	7856	eeekkkddddd	
5	5	1	18	TTC		0		kkeee	670
59956	260	262	ЭКОН	CGCAGCTGTTTAA	16	784	7856	ekkeekkkddddd	
0	6	1	18	TT		1		ddkk	608
59958	260	262	ЭКОН	TCGCAGCTGTTTAA	78	784	7857	eeekkkddddd	
6	6	2	18	ATT		1		kkeee	671
59956	260	262	ЭКОН	TCGCAGCTGTTTAA	58	784	7857	ekkeekkkddddd	
1	7	2	18	AT		2		ddkk	609
59958	260	262	ЭКОН	GTCGCAGCTGTTTT	81	784	7858	eeekkkddddd	
7	7	3	18	AAT		2		kkeee	672
58886	260	262	ЭКОН	GTCGCAGCTGTTTT	92	784	7858	eeekkkddddd	
0	8	3	18	AA		3		dkke	610
59956	260	262	ЭКОН	GTCGCAGCTGTTTT	78	784	7858	ekkeekkkddddd	
2	8	3	18	AA		3		ddkk	610
59958	260	262	ЭКОН	TGTCGCAGCTGTTT	81	784	7859	eeekkkddddd	
8	8	4	18	TAA		3		kkeee	673
59956	260	262	ЭКОН	TGTCGCAGCTGTTT	86	784	7859	ekkeekkkddddd	
3	9	4	18	TA		4		ddkk	611
59958	260	262	ЭКОН	TTGTCGCAGCTGTT	75	784	7860	eeekkkddddd	
9	9	5	18	TTA		4		kkeee	674
59956	261	262	ЭКОН	TTGTCGCAGCTGTT	75	784	7860	ekkeekkkddddd	
4	0	5	18	TT		5		ddkk	612
59959	261	262	ЭКОН	GTTGTCGCAGCTGT	88	784	7861	eeekkkddddd	
0	0	6	18	TTT		5		kkeee	675
59956	261	262	ЭКОН	GTTGTCGCAGCTGT	65	784	7861	ekkeekkkddddd	
									613

5	1	6	18	TT		6		ddkk	
59959	261	262	Экзон	TGTTGTCGCAGCTG	94	784	7862	eeekkkdddddd	
1	1	7	18	TTT		6		kkeee	676
59956	261	262	Экзон	TGTTGTCGCAGCTG	72	784	7862	ekkeekkkdddd	
6	2	7	18	TT		7		ddkk	614
59959	261	262	Экзон	TTGTTGTCGCAGCT	90	н.д.	н.д.	eeekkkdddddd	
2	2	8	18 / повто р	GTT				kkeee	677
59956	261	262	Экзон	TTGTTGTCGCAGCT	82	н.д.	н.д.	ekkeekkkdddd	
7	3	8	18 / повто р	GT				ddkk	615
59959	261	262	Экзон	TTTGTGTCGCAGC	95	н.д.	н.д.	eeekkkdddddd	
3	3	9	18 / повто р	TGT				kkeee	678
59956	261	262	Экзон	TTTGTGTCGCAGC	92	н.д.	н.д.	ekkeekkkdddd	
8	4	9	18 / повто р	TG				ddkk	616
59959	261	263	Экзон	TTTTGTGTCGCAG	86	н.д.	н.д.	eeekkkdddddd	
4	4	0	18 / повто р	CTG				kkeee	679
59956	261	263	Экзон	TTTTGTGTCGCAG	89	н.д.	н.д.	ekkeekkkdddd	
9	5	0	18 / повто р	CT				ddkk	617
59959	261	263	Экзон	TTTTGTGTCGCA	76	н.д.	н.д.	eeekkkdddddd	
5	5	1	18 / повто р	GCT				kkeee	680
59957	261	263	Экзон	TTTTGTGTCGCA	95	н.д.	н.д.	ekkeekkkdddd	
0	6	1	18 / повто р	GC				ddkk	618

Пример 121. Антисмысловое ингибирование человеческого фактора комплемента В (CFB) в HepG2 клетках МОЕ гэмперами.

Были сконструированы дополнительные антисмысловые олигонуклеотиды, направленные на нуклеиновую кислоту человеческого фактора комплемента В (CFB), и были протестированы на их воздействие *in vitro* на мРНК CFB. Антисмысловые олигонуклеотиды были протестированы в серии экспериментов, которые имели аналогичные условия культивирования. Результаты для каждого эксперимента представлены в отдельных таблицах, показанных ниже. Культивированные клетки HepG2 с плотностью 20000 клеток на лунку трансфицировали с использованием электропорации с 500 нМ антисмыслового олигонуклеотида. После периода обработки в течение около 24 ч, РНК выделяли из клеток и уровни мРНК CFB измеряли методом количественной ПЦР в реальном времени. Набор человеческих праймеров RTS3459 был использован для измерения уровней мРНК. Уровни мРНК CFB были скорректированы в соответствии с содержанием суммарной РНК, измеренным с помощью RIBOGREEN®. Результаты представлены как процентное ингибирование CFB относительно необработанных контрольных клеток.

Впервые сконструированные химерные антисмысловые олигонуклеотиды в представленных ниже таблицах были сконструированы как дезокси, МОЕ и (S)-cEt олигонуклеотиды или как 5-8-5 МОЕ, 5-9-5 МОЕ, 5-10-5 МОЕ, 6-7-6 МОЕ, 3-10-5 МОЕ или 6-8-6 МОЕ гэмперы.

Дезокси, МОЕ и (S)-cEt олигонуклеотиды имеют 16 нуклеозидов в длину, причем нуклеозид содержит либо модификацию сахара МОЕ, либо модификацию сахара (S)-cEt, либо дезокси модификацию. В колонке "Химизм" описаны модификации сахара для каждого олигонуклеотида. "к" означает (S)-cEt мо-

дификацию сахара; "d" означает дезоксирибозу; и "e" означает модификацию МОЕ.

Гэпмеры 5-8-5 МОЕ имеют 18 нуклеозидов в длину, причем центральный гэп состоит из восьми 2'-дезоксинуклеозидов и окружен крыльями с 5' конца и в 3' конца, содержащими по пять нуклеозидов каждое. Гэпмеры 5-9-5 МОЕ имеют 19 нуклеозидов в длину, причем центральный гэп состоит из девяти 2'-дезоксинуклеозидов и окружен крыльями с 5' конца и в 3' конца, содержащими по пять нуклеозидов каждое. Гэпмеры 5-10-5 МОЕ имеют 20 нуклеозидов в длину, причем центральный гэп состоит из десяти 2'-дезоксинуклеозидов и окружен крыльями с 5' конца и в 3' конца, содержащими по пять нуклеозидов каждое. Гэпмеры 3-10-5 МОЕ имеют 18 нуклеозидов в длину, причем центральный гэп состоит из десяти 2'-дезоксинуклеозидов и окружен крыльями с 5' конца и в 3' конца, содержащими три и пять нуклеозидов соответственно. Гэпмеры 6-7-6 МОЕ имеют 19 нуклеозидов в длину, причем центральный гэп состоит из семи 2'-дезоксинуклеозидов и окружен крыльями с 5' конца и в 3' конца, содержащими по шесть нуклеозидов каждое. Гэпмеры 6-8-6 МОЕ имеют 20 нуклеозидов в длину, причем центральный гэп состоит из восьми 2'-дезоксинуклеозидов и окружен крыльями с 5' конца и в 3' конца, содержащими по шесть нуклеозидов каждое. Каждый нуклеозид 5'-крыла и нуклеозид 3'-крыла имеет 2'-МОЕ модификации. Межнуклеозидные связи в каждом гэпере представляют собой тиофосфатные (P=S) связи. Все остатки цитозина в каждом гэпере представляют собой 5-метилцитозины.

"Сайт инициации" обозначает самый крайний 5' нуклеозид, на который направлен гэпмер в последовательности гена человека. "Сайт терминации" обозначает самый крайний 3' нуклеозид, на который направлен гэпмер в последовательности гена человека. Каждый гэпмер, перечисленный в представленных ниже таблицах, направлен на мПНК CFB человека, обозначенную в данном описании как SEQ ID NO: 1 (с номером доступа GENBANK NM_001710.5) или на геномную последовательность CFB человека, обозначенную в настоящем документе как SEQ ID NO: 2 (с номером доступа GENBANK NT_007592.15, усеченную с нуклеотида 31852000 по 31861000), или на обе последовательности, "н/д" означает, что антисмысловый олигонуклеотид не направлен на указанную конкретную последовательность гена с 100% комплементарностью.

Ингибирование мРНК CFB дезокси, МОЕ и (S)-сEt олигонуклеотидами, направленными на SEQ ID NO: 1
или SEQ ID NO: 2

ISIS №	SEQ ID NO: 1 сайт иниц иации	SEQ ID NO: 1 сайт терм инации	Область- мишень	Последовательность	% ингибир ования	SEQ ID NO: 2 сайт иниц иации	SEQ ID NO: 2 сайт терм инации	Мотив	SEQ ID NO:
601152	2551	2566	Экзон 18	AAACCCAAATCCTC AT	22	7786	7801	eekkkkkkkkkkkee	557
601218	2551	2566	Экзон 18	AAACCCAAATCCTC AT	21	7786	7801	ekkkkkkkkkkkee	557
601153	2552	2567	Экзон 18	AAAACCCAAATCCT CA	27	7787	7802	eekkkkkkkkkkkee	800
601219	2552	2567	Экзон 18	AAAACCCAAATCCT CA	19	7787	7802	ekkkkkkkkkkkee	800
601154	2553	2568	Экзон 18	GAAAACCCAAATCC TC	23	7788	7803	eekkkkkkkkkkkee	558
601220	2553	2568	Экзон 18	GAAAACCCAAATCC TC	24	7788	7803	ekkkkkkkkkkkee	558
601155	2554	2569	Экзон 18	AGAAAACCCAAATC CT	20	7789	7804	eekkkkkkkkkkkee	801
601221	2554	2569	Экзон 18	AGAAAACCCAAATC CT	0	7789	7804	ekkkkkkkkkkkee	801
601156	2555	2570	Экзон 18	TAGAAAACCCAAAT CC	11	7790	7805	ekkkkkkkkkkkcc	559
601222	2555	2570	Экзон 18	TAGAAAACCCAAAT CC	23	7790	7805	ekkkkkkkkkkkee	559
601157	2556	2571	Экзон 18	ATAGAAAACCCAAA TC	9	7791	7806	eekkkkkkkkkkkee	560
601223	2556	2571	Экзон 18	ATAGAAAACCCAAA TC	0	7791	7806	ekkkkkkkkkkkee	560
601158	2557	2572	Экзон 18	TATAGAAAACCCAA AT	0	7792	7807	eekkkkkkkkkkkee	802
601224	2557	2572	Экзон 18	TATAGAAAACCCAA	0	7792	7807	ekkkkkkkkkkkee	802

				AT					
601159	2558	2573	Экзон 18	TTATAGAAAACCCA AA	2	7793	7808	eekkkkkkkkkkkee	803
601225	2558	2573	Экзон 18	TTATAGAAAACCCA AA	0	7793	7808	ekkkkkkkkkkkee	803
601160	2559	2574	Экзон 18	CTTATAGAAAACCC AA	0	7794	7809	eekkkkkkkkkkkee	561
601226	2559	2574	Экзон 18	CTTATAGAAAACCC AA	0	7794	7809	ekkkkkkkkkkkee	561
601161	2560	2575	Экзон 18	CCTTATAGAAAACC CA	1	7795	7810	eekkkkkkkkkkkee	562
601227	2560	2575	Экзон 18	CCTTATAGAAAACC CA	14	7795	7810	ekkkkkkkkkkkee	562
601162	2561	2576	Экзон 18	CCCTTATAGAAAAC CC	9	7796	7811	eekkkkkkkkkkkee	563
601228	2561	2576	Экзон 18	CCCTTATAGAAAAC CC	9	7796	7811	ekkkkkkkkkkkee	563
601163	2562	2577	Экзон 18	CCCCTTATAGAAAA CC	0	7797	7812	eekkkkkkkkkkkee	564
601164	2563	2578	Экзон 18	ACCCCTTATAGAAA AC	3	7798	7813	eekkkkkkkkkkkee	565
601165	2564	2579	Экзон 18	AACCCCTTATAGAA AA	0	7799	7814	eekkkkkkkkkkkee	566
601166	2565	2580	Экзон 18	AAACCCCTTATAGA AA	0	7800	7815	eekkkkkkkkkkkee	567
601167	2566	2581	Экзон 18	GAAACCCCTTATAG AA	0	7801	7816	eekkkkkkkkkkkee	568
601168	2567	2582	Экзон 18	GGAAACCCCTTATA GA	0	7802	7817	eekkkkkkkkkkkee	569
601169	2568	2583	Экзон 18	AGGAAACCCCTTAT AG	0	7803	7818	eekkkkkkkkkkkee	570
601170	2569	2584	Экзон 18	CAGGAAACCCCTTA TA	10	7804	7819	eekkkkkkkkkkkee	571
601171	2570	2585	Экзон 18	GCAGGAAACCCCTT AT	9	7805	7820	eekkkkkkkkkkkee	572
601172	2571	2586	Экзон 18	AGCAGGAAACCCCT TA	15	7806	7821	eekkkkkkkkkkkee	573

601173	2572	2587	Экзон 18	CAGCAGGAAACCCC TT	29	7807	7822	eekkkkkkkkkkkee	574
601174	2573	2588	Экзон 18	CCAGCAGGAAACCC CT	25	7808	7823	eekkkkkkkkkkkee	575
601175	2574	2589	Экзон 18	TCCAGCAGGAAACC CC	15	7809	7824	eekkkkkkkkkkkee	576
601176	2575	2590	Экзон 18	GTCCAGCAGGAAAC CC	18	7810	7825	eekkkkkkkkkkkee	577
601177	2576	2591	Экзон 18	TGTCCAGCAGGAAA CC	10	7811	7826	eekkkkkkkkkkkee	578
601178	2577	2592	Экзон 18	CTGTCCAGCAGGAA AC	11	7812	7827	eekkkkkkkkkkkee	579
601179	2578	2593	Экзон 18	CCTGTCCAGCAGGA AA	19	7813	7828	eekkkkkkkkkkkee	580
601180	2579	2594	Экзон 18	CCCTGTCCAGCAGG AA	7	7814	7829	eekkkkkkkkkkkee	581
601181	2580	2595	Экзон 18	CCCCTGTCCAGCAG GA	3	7815	7830	eekkkkkkkkkkkee	582
601182	2581	2596	Экзон 18	GCCCCTGTCCAGCA GG	0	7816	7831	eekkkkkkkkkkkee	583
601183	2582	2597	Экзон 18	CGCCCCTGTCCAGCA G	4	7817	7832	eekkkkkkkkkkkee	584
601184	2583	2598	Экзон 18	ACGCCCCTGTCCAGC A	14	7818	7833	eekkkkkkkkkkkee	585
601185	2584	2599	Экзон 18	CACGCCCCTGTCCAG C	26	7819	7834	eekkkkkkkkkkkee	586
601186	2585	2600	Экзон 18	CCACGCCCCTGTCCA G	8	7820	7835	eekkkkkkkkkkkee	587
601187	2586	2601	Экзон 18	CCCACGCCCCTGTCC A	18	7821	7836	eekkkkkkkkkkkee	588
601188	2587	2602	Экзон 18	TCCCACGCCCCTGTC C	20	7822	7837	eekkkkkkkkkkkee	589
601189	2588	2603	Экзон 18	ATCCCACGCCCCTGT C	12	7823	7838	eekkkkkkkkkkkee	590
601190	2589	2604	Экзон 18	AATCCCACGCCCCTG T	33	7824	7839	eekkkkkkkkkkkee	591
601191	2590	2605	Экзон 18	CAATCCCACGCCCCT	52	7825	7840	eekkkkkkkkkkkee	592

				G					
601192	2591	2606	Экзон 18	TCAATCCCACGCCCC T	46	7826	7841	eekkkkkkkkkkee	593
601193	2592	2607	Экзон 18	TTCAATCCCACGCCC C	30	7827	7842	eekkkkkkkkkkee	594
601194	2593	2608	Экзон 18	ATTCAATCCCACGCC C	41	7828	7843	eekkkkkkkkkkee	595
601195	2594	2609	Экзон 18	AATTCAATCCCACGC C	40	7829	7844	eekkkkkkkkkkee	596
601196	2595	2610	Экзон 18	TAATTCAATCCCACG C	71	7830	7845	eekkkkkkkkkkee	597
601197	2596	2611	Экзон 18	TTAATTCAATCCCAC G	42	7831	7846	eekkkkkkkkkkee	598
601198	2597	2612	Экзон 18	TTTAATTCAATCCCA C	63	7832	7847	eekkkkkkkkkkee	599
601199	2598	2613	Экзон 18	TTTTAATTCAATCCC A	51	7833	7848	eekkkkkkkkkkee	600
601200	2599	2614	Экзон 18	GTTTAATTCAATCC C	65	7834	7849	eekkkkkkkkkkee	601
601201	2600	2615	Экзон 18	TGTTTAATTCAATC C	49	7835	7850	eekkkkkkkkkkee	602
601202	2601	2616	Экзон 18	CTGTTTAAATTCAT C	33	7836	7851	eekkkkkkkkkkee	603
601203	2602	2617	Экзон 18	GCTGTTTAAATTCAA T	63	7837	7852	eekkkkkkkkkkee	604
601204	2603	2618	Экзон 18	AGCTGTTTAAATTC A	69	7838	7853	eekkkkkkkkkkee	605
532917	2604	2623	Экзон 18	GTCGAGCTGTTTAA ATTCA	73	7839	7858	eeeeedddddddde eeee	317
601205	2604	2619	Экзон 18	CAGCTGTTTAAATTC A	51	7839	7854	eekkkkkkkkkkee	606
601206	2605	2620	Экзон 18	GCAGCTGTTTAAAT C	43	7840	7855	eekkkkkkkkkkee	607
601207	2606	2621	Экзон 18	CGCAGCTGTTTAAAT T	52	7841	7856	eekkkkkkkkkkee	608
601208	2607	2622	Экзон 18	TCGCAGCTGTTTAA T	61	7842	7857	eekkkkkkkkkkee	609

588860	2608	2623	Экзон 18	GTCGCAGCTGTTTТА А	75	7843	7858	eeekkkkkkkkkkk е	610
601209	2608	2623	Экзон 18	GTCGCAGCTGTTTТА А	73	7843	7858	eeekkkkkkkkkkk	610
601210	2609	2624	Экзон 18	TGTCGCAGCTGTTT А	80	7844	7859	eeekkkkkkkkkkk	611
601211	2610	2625	Экзон 18	TTGTCGCAGCTGTT Т	64	7845	7860	eeekkkkkkkkkkk	612
601212	2611	2626	Экзон 18	GTTGTCGCAGCTGTT Т	86	7846	7861	eeekkkkkkkkkkk	613
601213	2612	2627	Экзон 18	TGTTGTCGCAGCTGT Т	87	7847	7862	eeekkkkkkkkkkk	614
601214	2613	2628	Экзон 18 / повтор	TTGTTGTCGCAGCTG Т	84	н.д.	н.д.	eeekkkkkkkkkkk	615
601215	2614	2629	Экзон 18 / повтор	TTTGTTGTCGCAGCT G	78	н.д.	н.д.	eeekkkkkkkkkkk	616
601216	2615	2630	Экзон 18 / повтор	TTTTGTTGTCGCAGC Т	73	н.д.	н.д.	eeekkkkkkkkkkk	617
601217	2616	2631	Экзон 18 / повтор	TTTTTGTTGTCGCAG С	66	н.д.	н.д.	eeekkkkkkkkkkk	618

Таблица 143

Ингибирование мРНК CFB дезокси, МОЕ и (S)-cEt олигонуклеотидами, направленными на SEQ ID NO: 1
или SEQ ID NO: 2

ISIS №	SEQ ID NO: 1 сайт иниц иации	SEQ ID NO: 1 сайт терм инации	Область- мишень	Последовательность	% ингибир ования	SEQ ID NO: 2 сайт иниц иации	SEQ ID NO: 2 сайт терм инации	Мотив	SEQ ID NO:
601284	2551	2566	Экзон 18	AAACCCAAATCCTCA Т	8	7786	7801	eeekkkkkkkkkkk	557
601285	2552	2567	Экзон 18	AAAACCCAAATCCTC А	15	7787	7802	eeekkkkkkkkkkk	800

601286	2553	2568	Экзон 18	GAAAACCCAAATCC TC	21	7788	7803	ekkkkkkkkkkeee	558
601287	2554	2569	Экзон 18	AGAAAACCCAAATC CT	9	7789	7804	ekkkkkkkkkkeee	801
601288	2555	2570	Экзон 18	TAGAAAACCCAAAT CC	0	7790	7805	ekkkkkkkkkkeee	559
601289	2556	2571	Экзон 18	ATAGAAAACCCAAA TC	40	7791	7806	ekkkkkkkkkkeee	560
601290	2557	2572	Экзон 18	TATAGAAAACCCAA AT	16	7792	7807	ekkkkkkkkkkeee	802
601291	2558	2573	Экзон 18	TTATAGAAAACCCA AA	15	7793	7808	ekkkkkkkkkkeee	803
601292	2559	2574	Экзон 18	CTTATAGAAAACCCA A	5	7794	7809	ekkkkkkkkkkeee	561
601293	2560	2575	Экзон 18	CCTTATAGAAAACCC A	15	7795	7810	ekkkkkkkkkkeee	562
601294	2561	2576	Экзон 18	CCCTTATAGAAAACC C	3	7796	7811	ekkkkkkkkkkeee	563
601229	2562	2577	Экзон 18	CCCCTTATAGAAAAC C	15	7797	7812	ekkkkkkkkkkeee	564
601295	2562	2577	Экзон 18	CCCCTTATAGAAAAC C	5	7797	7812	ekkkkkkkkkkeee	564
601230	2563	2578	Экзон 18	ACCCCTTATAGAAAA C	14	7798	7813	ekkkkkkkkkkeee	565
601296	2563	2578	Экзон 18	ACCCCTTATAGAAAA C	0	7798	7813	ekkkkkkkkkkeee	565
601231	2564	2579	Экзон 18	AACCCCTTATAGAAA A	14	7799	7814	ekkkkkkkkkkeee	566
601297	2564	2579	Экзон 18	AACCCCTTATAGAAA A	14	7799	7814	ekkkkkkkkkkeee	566
601232	2565	2580	Экзон 18	AAACCCCTTATAGAA A	15	7800	7815	ekkkkkkkkkkeee	567
601298	2565	2580	Экзон 18	AAACCCCTTATAGAA A	7	7800	7815	ekkkkkkkkkkeee	567
601233	2566	2581	Экзон 18	GAAACCCCTTATAGA A	0	7801	7816	ekkkkkkkkkkeee	568
601299	2566	2581	Экзон 18	GAAACCCCTTATAGA	0	7801	7816	ekkkkkkkkkkeee	568

				A					
601234	2567	2582	Экзон 18	GGAAACCCCTTATAG A	0	7802	7817	ekkkddddddkkee	569
601300	2567	2582	Экзон 18	GGAAACCCCTTATAG A	9	7802	7817	ekkkddddddkkee	569
601235	2568	2583	Экзон 18	AGGAAACCCCTTATA G	3	7803	7818	ekkkddddddkkee	570
601301	2568	2583	Экзон 18	AGGAAACCCCTTATA G	14	7803	7818	ekkkddddddkkee	570
601236	2569	2584	Экзон 18	CAGGAAACCCCTTAT A	0	7804	7819	ekkkddddddkkee	571
601302	2569	2584	Экзон 18	CAGGAAACCCCTTAT A	0	7804	7819	ekkkddddddkkee	571
601237	2570	2585	Экзон 18	GCAGGAAACCCCTT AT	16	7805	7820	ekkkddddddkkee	572
601303	2570	2585	Экзон 18	GCAGGAAACCCCTT AT	16	7805	7820	ekkkddddddkkee	572
601238	2571	2586	Экзон 18	AGCAGGAAACCCCT TA	11	7806	7821	ekkkddddddkkee	573
601304	2571	2586	Экзон 18	AGCAGGAAACCCCT TA	10	7806	7821	ekkkddddddkkee	573
601239	2572	2587	Экзон 18	CAGCAGGAAACCCC TT	21	7807	7822	ekkkddddddkkee	574
601305	2572	2587	Экзон 18	CAGCAGGAAACCCC TT	7	7807	7822	ekkkddddddkkee	574
601240	2573	2588	Экзон 18	CCAGCAGGAAACCC CT	6	7808	7823	ekkkddddddkkee	575
601241	2574	2589	Экзон 18	TCCAGCAGGAAACC CC	10	7809	7824	ekkkddddddkkee	576
601242	2575	2590	Экзон 18	GTCCAGCAGGAAAC CC	19	7810	7825	ekkkddddddkkee	577
601243	2576	2591	Экзон 18	TGTCCAGCAGGAAA CC	10	7811	7826	ekkkddddddkkee	578
601244	2577	2592	Экзон 18	CTGTCCAGCAGGAA AC	28	7812	7827	ekkkddddddkkee	579
601245	2578	2593	Экзон 18	CCTGTCCAGCAGGA AA	5	7813	7828	ekkkddddddkkee	580

601246	2579	2594	Экзон 18	CCCTGTCCAGCAGGA A	18	7814	7829	ekkkdddddddkkee	581
601247	2580	2595	Экзон 18	CCCCTGTCCAGCAGG A	4	7815	7830	ekkkdddddddkkee	582
601248	2581	2596	Экзон 18	GCCCCTGTCCAGCAG G	6	7816	7831	ekkkdddddddkkee	583
601249	2582	2597	Экзон 18	CGCCCCTGTCCAGCA G	18	7817	7832	ekkkdddddddkkee	584
601250	2583	2598	Экзон 18	ACGCCCCTGTCCAGC A	26	7818	7833	ekkkdddddddkkee	585
601251	2584	2599	Экзон 18	CACGCCCCTGTCCAG C	27	7819	7834	ekkkdddddddkkee	586
601252	2585	2600	Экзон 18	CCACGCCCCTGTCCA G	21	7820	7835	ekkkdddddddkkee	587
601253	2586	2601	Экзон 18	CCCACGCCCCTGTCC A	0	7821	7836	ekkkdddddddkkee	588
601254	2587	2602	Экзон 18	TCCCACGCCCCTGTC C	31	7822	7837	ekkkdddddddkkee	589
601255	2588	2603	Экзон 18	ATCCCACGCCCCTGT C	3	7823	7838	ekkkdddddddkkee	590
601256	2589	2604	Экзон 18	AATCCCACGCCCCTG T	21	7824	7839	ekkkdddddddkkee	591
601257	2590	2605	Экзон 18	CAATCCCACGCCCCT G	47	7825	7840	ekkkdddddddkkee	592
601258	2591	2606	Экзон 18	TCAATCCCACGCCCC T	48	7826	7841	ekkkdddddddkkee	593
601259	2592	2607	Экзон 18	TTCAATCCCACGCCC C	38	7827	7842	ekkkdddddddkkee	594
601260	2593	2608	Экзон 18	ATTCAATCCCACGCC C	33	7828	7843	ekkkdddddddkkee	595
601261	2594	2609	Экзон 18	AATTCAATCCCACGC C	17	7829	7844	ekkkdddddddkkee	596
601262	2595	2610	Экзон 18	TAATTCAATCCCACG C	40	7830	7845	ekkkdddddddkkee	597
601263	2596	2611	Экзон 18	TTAATTCAATCCCAC G	31	7831	7846	ekkkdddddddkkee	598
601264	2597	2612	Экзон 18	TTTAATTCAATCCCA	72	7832	7847	ekkkdddddddkkee	599

				C					
601265	2598	2613	Экзон 18	TTTTAATCAATCCC A	48	7833	7848	ekkkddddddkkeee	600
601266	2599	2614	Экзон 18	GTTTTAATCAATCC C	64	7834	7849	ekkkddddddkkeee	601
601267	2600	2615	Экзон 18	TGTTTTAATCAATC C	43	7835	7850	ekkkddddddkkeee	602
601268	2601	2616	Экзон 18	CTGTTTTAATCAAT C	44	7836	7851	ekkkddddddkkeee	603
601269	2602	2617	Экзон 18	GCTGTTTTAATTCAA T	66	7837	7852	ekkkddddddkkeee	604
601270	2603	2618	Экзон 18	AGCTGTTTTAATTCA A	47	7838	7853	ekkkddddddkkeee	605
532917	2604	2623	Экзон 18	GTCGCAGCTGTTTAA ATTCA	3	7839	7858	eeeeeeeeeeee eeee	317
601271	2604	2619	Экзон 18	CAGCTGTTTTAATTC A	26	7839	7854	ekkkddddddkkeee	606
601272	2605	2620	Экзон 18	GCAGCTGTTTTAATT C	33	7840	7855	ekkkddddddkkeee	607
601273	2606	2621	Экзон 18	CGCAGCTGTTTTAAT T	34	7841	7856	ekkkddddddkkeee	608
601274	2607	2622	Экзон 18	TCGCAGCTGTTTAA T	39	7842	7857	ekkkddddddkkeee	609
588860	2608	2623	Экзон 18	GTCGCAGCTGTTTAA A	72	7843	7858	eeekkkkkkkkk e	610
601275	2608	2623	Экзон 18	GTCGCAGCTGTTTAA A	65	7843	7858	ekkkddddddkkeee	610
601276	2609	2624	Экзон 18	TGTCGCAGCTGTTTT A	65	7844	7859	ekkkddddddkkeee	611
601277	2610	2625	Экзон 18	TTGTCGCAGCTGTTT T	51	7845	7860	ekkkddddddkkeee	612
601278	2611	2626	Экзон 18	GTTGTCGCAGCTGTT T	78	7846	7861	ekkkddddddkkeee	613
601279	2612	2627	Экзон 18	TGTTGTCGCAGCTGT T	79	7847	7862	ekkkddddddkkeee	614
601280	2613	2628	Экзон 18 / повтор	TTGTTGTCGCAGCTG T	70	н.д.	н.д.	ekkkddddddkkeee	615
601281	2614	2629	Экзон 18 / повтор	TTTGTGTCGCAGCT G	78	н.д.	н.д.	ekkkddddddkkeee	616
601282	2615	2630	Экзон 18 / повтор	TTTTGTGTCGCAGC T	68	н.д.	н.д.	ekkkddddddkkeee	617
601283	2616	2631	Экзон 18 / повтор	TTTTGTGTCGCAG C	61	н.д.	н.д.	ekkkddddddkkeee	618

Таблица 144

Ингибирование мРНК CFB дезокси, MOE и (S)-cEt олигонуклеотидами, направленными на SEQ ID NO: 1
или SEQ ID NO: 2

ISIS №	SEQ ID NO: 1 сайт иннициации	SEQ ID NO: 1 сайт терминации	Область - мишень	Последовательность	% ингибирования	SEQ ID NO: 2 сайт иннициации	SEQ ID NO: 2 сайт терминации	Мотив	SEQ ID NO:
601306	2573	2588	Экзон 18	CCAGCAGGAAACCCCT	22	7808	7823	ekkkddddddkk eee	575
601307	2574	2589	Экзон 18	TCCAGCAGGAAACC	22	7809	7824	ekkkddddddkk eee	576
601308	2575	2590	Экзон 18	GTCCAGCAGGAAACCC	33	7810	7825	ekkkddddddkk eee	577
601309	2576	2591	Экзон 18	TGTCCAGCAGGAAAAC	33	7811	7826	ekkkddddddkk eee	578
601310	2577	2592	Экзон 18	CTGTCCAGCAGGAAC	28	7812	7827	ekkkddddddkk eee	579
601311	2578	2593	Экзон 18	CCTGTCCAGCAGGAAC	33	7813	7828	ekkkddddddkk eee	580
601312	2579	2594	Экзон 18	CCCTGTCCAGCAGGAAC	13	7814	7829	ekkkddddddkk eee	581
601313	2580	2595	Экзон 18	CCCCTGTCCAGCAGGAAC	32	7815	7830	ekkkddddddkk eee	582
601314	2581	2596	Экзон 18	GCCCCGTGTCCAGCAAC	0	7816	7831	ekkkddddddkk eee	583
601315	2582	2597	Экзон	CGCCCCGTGTCCAGC	36	7817	7832	ekkkddddddkk	584

			18	AG				eee	
601316	2583	2598	Экзон 18	ACGCCCTGTCCAG CA	39	7818	7833	ekkkkkkkkk eee	585
601317	2584	2599	Экзон 18	CACGCCCTGTCCA GC	33	7819	7834	ekkkkkkkkk eee	586
601356	2584	2599	Экзон 18	CACGCCCTGTCCA GC	27	7819	7834	kkkkkkkkkk eee	586
601318	2585	2600	Экзон 18	CCACGCCCTGTCC AG	35	7820	7835	ekkkkkkkkk eee	587
601357	2585	2600	Экзон 18	CCACGCCCTGTCC AG	26	7820	7835	kkkkkkkkkk eee	587
601319	2586	2601	Экзон 18	CCCACGCCCTGTCC A	33	7821	7836	ekkkkkkkkk eee	588
601358	2586	2601	Экзон 18	CCCACGCCCTGTCC A	26	7821	7836	kkkkkkkkkk eee	588
601320	2587	2602	Экзон 18	TCCCACGCCCTGTC C	25	7822	7837	ekkkkkkkkk eee	589
601359	2587	2602	Экзон 18	TCCCACGCCCTGTC C	23	7822	7837	kkkkkkkkkk eee	589
601321	2588	2603	Экзон 18	ATCCCACGCCCTGT C	50	7823	7838	ekkkkkkkkk eee	590
601360	2588	2603	Экзон 18	ATCCCACGCCCTGT C	33	7823	7838	kkkkkkkkkk eee	590
601322	2589	2604	Экзон 18	AATCCCACGCCCT GT	52	7824	7839	ekkkkkkkkk eee	591
601361	2589	2604	Экзон 18	AATCCCACGCCCT GT	48	7824	7839	kkkkkkkkkk eee	591
601323	2590	2605	Экзон 18	CAATCCCACGCCCC TG	67	7825	7840	ekkkkkkkkk eee	592
601362	2590	2605	Экзон 18	CAATCCCACGCCCC TG	51	7825	7840	kkkkkkkkkk eee	592
601324	2591	2606	Экзон 18	TCAATCCCACGCCC CT	42	7826	7841	ekkkkkkkkk eee	593
601363	2591	2606	Экзон 18	TCAATCCCACGCCC CT	42	7826	7841	kkkkkkkkkk eee	593
601325	2592	2607	Экзон 18	TTCAATCCCACGCCC C	52	7827	7842	ekkkkkkkkk eee	594

601364	2592	2607	Экзон 18	TTCAATCCCACGCC C	48	7827	7842	kkkkkkkkkkke eee	594
601326	2593	2608	Экзон 18	ATTCAATCCCACGC CC	27	7828	7843	ekkkkkkkkkkk eee	595
601365	2593	2608	Экзон 18	ATTCAATCCCACGC CC	36	7828	7843	kkkkkkkkkkke eee	595
601327	2594	2609	Экзон 18	AATTCAATCCCACG CC	66	7829	7844	ekkkkkkkkkkk eee	596
601366	2594	2609	Экзон 18	AATTCAATCCCACG CC	49	7829	7844	kkkkkkkkkkke eee	596
601328	2595	2610	Экзон 18	TAATTCAATCCCAC GC	55	7830	7845	ekkkkkkkkkkk eee	597
601367	2595	2610	Экзон 18	TAATTCAATCCCAC GC	57	7830	7845	kkkkkkkkkkke eee	597
601329	2596	2611	Экзон 18	TTAATTCAATCCCAC G	69	7831	7846	ekkkkkkkkkkk eee	598
601368	2596	2611	Экзон 18	TTAATTCAATCCCAC G	68	7831	7846	kkkkkkkkkkke eee	598
601330	2597	2612	Экзон 18	TTTAATTCAATCCCA C	58	7832	7847	ekkkkkkkkkkk eee	599
601369	2597	2612	Экзон 18	TTTAATTCAATCCCA C	65	7832	7847	kkkkkkkkkkke eee	599
601331	2598	2613	Экзон 18	TTTAATTCAATCCC A	45	7833	7848	ekkkkkkkkkkk eee	600
601370	2598	2613	Экзон 18	TTTAATTCAATCCC A	42	7833	7848	kkkkkkkkkkke eee	600
601332	2599	2614	Экзон 18	GTTTAATTCAATCC C	84	7834	7849	ekkkkkkkkkkk eee	601
601371	2599	2614	Экзон 18	GTTTAATTCAATCC C	79	7834	7849	kkkkkkkkkkke eee	601
601333	2600	2615	Экзон 18	TGTTTAATTCAATC C	61	7835	7850	ekkkkkkkkkkk eee	602
601372	2600	2615	Экзон 18	TGTTTAATTCAATC C	71	7835	7850	kkkkkkkkkkke eee	602
601334	2601	2616	Экзон 18	CTGTTTAATTCAAT C	61	7836	7851	ekkkkkkkkkkk eee	603
601373	2601	2616	Экзон	CTGTTTAATTCAAT	57	7836	7851	kkkkkkkkkkke	603

			18	C				eee	
601335	2602	2617	Экзон 18	GCTGTTTTAATTCAA T	73	7837	7852	ekkkkkkkkkkk eee	604
601374	2602	2617	Экзон 18	GCTGTTTTAATTCAA T	66	7837	7852	kkkkkkkkkkkk eee	604
601336	2603	2618	Экзон 18	AGCTGTTTTAATTCA A	64	7838	7853	ekkkkkkkkkkk eee	605
601375	2603	2618	Экзон 18	AGCTGTTTTAATTCA A	61	7838	7853	kkkkkkkkkkkk eee	605
532917	2604	2623	Экзон 18	GTCGCAGCTGTTTTA ATTCA	66	7839	7858	eeeeeeeeeeee deeeee	317
601337	2604	2619	Экзон 18	CAGCTGTTTTAATTC A	53	7839	7854	ekkkkkkkkkkk eee	606
601376	2604	2619	Экзон 18	CAGCTGTTTTAATTC A	39	7839	7854	kkkkkkkkkkkk eee	606
601338	2605	2620	Экзон 18	GCAGCTGTTTTAATT C	67	7840	7855	ekkkkkkkkkkk eee	607
601377	2605	2620	Экзон 18	GCAGCTGTTTTAATT C	67	7840	7855	kkkkkkkkkkkk eee	607
601339	2606	2621	Экзон 18	CGCAGCTGTTTTAAT T	63	7841	7856	ekkkkkkkkkkk eee	608
601378	2606	2621	Экзон 18	CGCAGCTGTTTTAAT T	60	7841	7856	kkkkkkkkkkkk eee	608
601340	2607	2622	Экзон 18	TCGCAGCTGTTTAA T	40	7842	7857	ekkkkkkkkkkk eee	609
601379	2607	2622	Экзон 18	TCGCAGCTGTTTAA T	36	7842	7857	kkkkkkkkkkkk eee	609
588860	2608	2623	Экзон 18	GTCGCAGCTGTTTTA A	84	7843	7858	ekkkkkkkkkkk kke	610
601341	2608	2623	Экзон 18	GTCGCAGCTGTTTTA A	74	7843	7858	ekkkkkkkkkkk eee	610
601380	2608	2623	Экзон 18	GTCGCAGCTGTTTTA A	78	7843	7858	kkkkkkkkkkkk eee	610
601342	2609	2624	Экзон 18	TGTCGCAGCTGTTTT A	68	7844	7859	ekkkkkkkkkkk eee	611
601381	2609	2624	Экзон 18	TGTCGCAGCTGTTTT A	66	7844	7859	kkkkkkkkkkkk eee	611

601343	2610	2625	Экзон 18	TTGTCGCAGCTGTT T	71	7845	7860	ekkkkkkkkk eee	612
601382	2610	2625	Экзон 18	TTGTCGCAGCTGTT T	84	7845	7860	kkkkkkkkkk eee	612
601344	2611	2626	Экзон 18	GTTGTCGCAGCTGTT T	87	7846	7861	ekkkkkkkkk eee	613
601383	2611	2626	Экзон 18	GTTGTCGCAGCTGTT T	85	7846	7861	kkkkkkkkkk eee	613
601345	2612	2627	Экзон 18	TGTTGTCGCAGCTGT T	82	7847	7862	ekkkkkkkkk eee	614
601384	2612	2627	Экзон 18	TGTTGTCGCAGCTGT T	79	7847	7862	kkkkkkkkkk eee	614
601346	2613	2628	Экзон 18 / повтор	TTGTTGTCGCAGCTG T	73	н.д.	н.д.	ekkkkkkkkk eee	615
601385	2613	2628	Экзон 18 / повтор	TTGTTGTCGCAGCTG T	84	н.д.	н.д.	kkkkkkkkkk eee	615
601347	2614	2629	Экзон 18 / повтор	TTTGTGTCGCAGCT G	70	н.д.	н.д.	ekkkkkkkkk eee	616
601386	2614	2629	Экзон 18 / повтор	TTTGTGTCGCAGCT G	71	н.д.	н.д.	kkkkkkkkkk eee	616
601348	2615	2630	Экзон 18 / повтор	TTTTGTTGTCGCAGC T	71	н.д.	н.д.	ekkkkkkkkk eee	617
601387	2615	2630	Экзон 18 / повтор	TTTTGTTGTCGCAGC T	76	н.д.	н.д.	kkkkkkkkkk eee	617
601349	2616	2631	Экзон 18 / повтор	TTTTGTTGTCGCAG C	71	н.д.	н.д.	ekkkkkkkkk eee	618
601388	2616	2631	Экзон 18 / повтор	TTTTGTTGTCGCAG C	67	н.д.	н.д.	kkkkkkkkkk eee	618

Ингибирование мРНК CFB МОЕ гэлмерами, направленными на SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2

ISI S №	SEQ ID NO: 1 сайт иници ации	SEQ ID NO: 1 сайт терми нации	Обла сть- миш ень	Последовательнос ть	% ингибир ования	SEQ ID NO: 2 сайт иници ации	SEQ ID NO: 2 сайт терми нации	Мо тив	S E Q ID N O:
599 357	2582	2600	Экзо н 18	CCACGCCCCTG TCCAGCAG	26	7817	7835	5- 9-5	70 8
599 358	2583	2601	Экзо н 18	CCCACGCCCCT GTCCAGCA	22	7818	7836	5- 9-5	70 9
599 359	2584	2602	Экзо н 18	TCCCACGCCCCT GTCCAGC	13	7819	7837	5- 9-5	71 0
599 360	2585	2603	Экзо н 18	ATCCCACGCCC CTGTCCAG	7	7820	7838	5- 9-5	71 1
599 361	2586	2604	Экзо н 18	AATCCCACGCC CCTGTCCA	11	7821	7839	5- 9-5	71 2
599 362	2587	2605	Экзо н 18	CAATCCCACGC CCCTGTCC	14	7822	7840	5- 9-5	71 3
599 363	2588	2606	Экзо н 18	TCAATCCCACG CCCCTGTC	17	7823	7841	5- 9-5	71 4
599 364	2589	2607	Экзо н 18	TTCAATCCCAC GCCCCTGT	20	7824	7842	5- 9-5	71 5
599 365	2590	2608	Экзо н 18	ATTCAATCCCA CGCCCCTG	22	7825	7843	5- 9-5	71 6
599 366	2591	2609	Экзо н 18	AATTCAATCCC ACGCCCCT	13	7826	7844	5- 9-5	71 7
599 367	2592	2610	Экзо н 18	TAATTCAATCCC ACGCCCC	11	7827	7845	5- 9-5	71 8
599 368	2593	2611	Экзо н 18	TTAATTCAATCC CACGCCC	10	7828	7846	5- 9-5	71 9
599 369	2594	2612	Экзо н 18	TTAATTCAATC CCACGCC	19	7829	7847	5- 9-5	72 0

599 370	2595	2613	Экзо н 18	TTTTAATTCAAT CCCACGC	23	7830	7848	5- 9-5	72 1
599 371	2596	2614	Экзо н 18	GTTTAAATTCAA TCCCACG	4	7831	7849	5- 9-5	72 2
599 372	2597	2615	Экзо н 18	TGTTTAAATTCA ATCCCAC	16	7832	7850	5- 9-5	72 3
599 373	2598	2616	Экзо н 18	CTGTTTAAATTC AATCCCA	3	7833	7851	5- 9-5	72 4
599 374	2599	2617	Экзо н 18	GCTGTTTAAATT CAATCCC	10	7834	7852	5- 9-5	72 5
599 375	2600	2618	Экзо н 18	AGCTGTTTAAAT TCAATCC	17	7835	7853	5- 9-5	72 6
599 376	2601	2619	Экзо н 18	CAGCTGTTTAA TTCAATC	18	7836	7854	5- 9-5	72 7
599 377	2602	2620	Экзо н 18	GCAGCTGTTTAA ATTCAAT	22	7837	7855	5- 9-5	72 8
599 378	2603	2621	Экзо н 18	CGCAGCTGTTTT AATTCAA	11	7838	7856	5- 9-5	72 9
599 511	2552	2571	Экзо н 18	ATAGAAAACCC AAATCCTCA	7	7787	7806	6- 8-6	41 0
599 389	2553	2572	Экзо н 18	TATAGAAAACC CAAATCCTC	22	7788	7807	6- 8-6	41 1
599 390	2554	2573	Экзо н 18	TTATAGAAAAC CCAAATCCT	21	7789	7808	6- 8-6	41 2
599 391	2555	2574	Экзо н 18	CTTATAGAAAA CCCAAATCC	27	7790	7809	6- 8-6	41 3
599 392	2556	2575	Экзо н 18	CCTTATAGAAA ACCCAAATC	30	7791	7810	6- 8-6	41 4
599 393	2557	2576	Экзо н 18	CCCTTATAGAA AACCCTAAT	30	7792	7811	6- 8-6	41 5
599 394	2558	2577	Экзо н 18	CCCCTTATAGA AAACCCAAA	28	7793	7812	6- 8-6	41 6
599 395	2559	2578	Экзо н 18	ACCCCTTATAG AAAACCCAA	23	7794	7813	6- 8-6	41 7
599 396	2560	2579	Экзо н 18	AACCCCTTATA GAAAACCCA	53	7795	7814	6- 8-6	41 8
599	2561	2580	Экзо	AAACCCCTTAT	33	7796	7815	6-	41

397			н 18	AGAAAACCC				8-6	9
599 398	2562	2581	Экзо н 18	GAAACCCCTTA TAGAAAACC	58	7797	7816	6- 8-6	42 0
599 399	2563	2582	Экзо н 18	GGAAACCCCTT ATAGAAAAC	23	7798	7817	6- 8-6	42 1
599 400	2564	2583	Экзо н 18	AGGAAACCCCT TATAGAAAA	54	7799	7818	6- 8-6	42 2
599 401	2565	2584	Экзо н 18	CAGGAAACCCC TTATAGAAA	30	7800	7819	6- 8-6	42 3
599 402	2566	2585	Экзо н 18	GCAGGAAACCC CTTATAGAA	25	7801	7820	6- 8-6	42 4
599 403	2567	2586	Экзо н 18	AGCAGGAAACC CCTTATAGA	17	7802	7821	6- 8-6	42 5
599 404	2568	2587	Экзо н 18	CAGCAGGAAAC CCCTTATAG	20	7803	7822	6- 8-6	42 6
599 405	2569	2588	Экзо н 18	CCAGCAGGAAA CCCCTTATA	12	7804	7823	6- 8-6	42 7
599 406	2570	2589	Экзо н 18	TCCAGCAGGAA ACCCCTTAT	51	7805	7824	6- 8-6	42 8
599 407	2571	2590	Экзо н 18	GTCCAGCAGGA AACCCCTTA	39	7806	7825	6- 8-6	23 7
599 408	2572	2591	Экзо н 18	TGTCCAGCAGG AAACCCCTT	53	7807	7826	6- 8-6	42 9
599 409	2573	2592	Экзо н 18	CTGTCCAGCAG GAAACCCCT	65	7808	7827	6- 8-6	43 0
599 410	2574	2593	Экзо н 18	CCTGTCCAGCA GGAAACCCC	56	7809	7828	6- 8-6	43 1
599 411	2575	2594	Экзо н 18	CCCTGTCCAGC AGGAAACCC	60	7810	7829	6- 8-6	43 2
599 412	2576	2595	Экзо н 18	CCCCTGTCCAG CAGGAAACC	61	7811	7830	6- 8-6	43 3
599 413	2577	2596	Экзо н 18	GCCCCTGTCCA GCAGGAAAC	40	7812	7831	6- 8-6	23 8
599 414	2578	2597	Экзо н 18	CGCCCCTGTCC AGCAGGAAA	41	7813	7832	6- 8-6	43 4
599 415	2579	2598	Экзо н 18	ACGCCCCTGTC CAGCAGGAA	37	7814	7833	6- 8-6	43 5

599 416	2580	2599	Экзо н 18	CACGCCCCTGT CCAGCAGGA	54	7815	7834	6- 8-6	43 6
599 417	2581	2600	Экзо н 18	CCACGCCCCTG TCCAGCAGG	36	7816	7835	6- 8-6	43 7
599 418	2582	2601	Экзо н 18	CCCACGCCCCT GTCCAGCAG	53	7817	7836	6- 8-6	43 8
599 419	2583	2602	Экзо н 18	TCCCACGCCCCT GTCCAGCA	54	7818	7837	6- 8-6	43 9
599 420	2584	2603	Экзо н 18	ATCCCACGCCC CTGTCCAGC	50	7819	7838	6- 8-6	44 0
599 421	2585	2604	Экзо н 18	AATCCCACGCC CCTGTCCAG	48	7820	7839	6- 8-6	44 1
599 422	2586	2605	Экзо н 18	CAATCCCACGC CCCTGTCCA	55	7821	7840	6- 8-6	44 2
599 423	2587	2606	Экзо н 18	TCAATCCCACG CCCCTGTCC	75	7822	7841	6- 8-6	44 3
599 424	2588	2607	Экзо н 18	TTCAATCCCAC GCCCCTGTC	69	7823	7842	6- 8-6	44 4
599 425	2589	2608	Экзо н 18	ATTCAATCCCA CGCCCCTGT	77	7824	7843	6- 8-6	44 5
599 426	2590	2609	Экзо н 18	AATTCAATCCC ACGCCCCTG	60	7825	7844	6- 8-6	44 6
599 427	2591	2610	Экзо н 18	TAATTCAATCCC ACGCCCCT	72	7826	7845	6- 8-6	44 7
599 428	2592	2611	Экзо н 18	TTAATTCAATCC CACGCCCC	81	7827	7846	6- 8-6	44 8
599 429	2593	2612	Экзо н 18	TTTAATTCAATC CCACGCCC	68	7828	7847	6- 8-6	44 9
599 430	2594	2613	Экзо н 18	TTTTAATTCAAT CCCACGCC	58	7829	7848	6- 8-6	45 0
599 431	2595	2614	Экзо н 18	GTTTCAATTCAA TCCCACGC	70	7830	7849	6- 8-6	45 1
599 432	2596	2615	Экзо н 18	TGTTTCAATTCA ATCCCACG	85	7831	7850	6- 8-6	45 2
532 917	2604	2623	Экзо н 18	GTCGCAGCTGT TTTAATTCA	85	7839	7858	5- 10- 5	31 7

599 379	2604	2622	Экзо н 18	TCGCAGCTGTTT TAATTCA	73	7839	7857	5- 9-5	73 0
599 380	2605	2623	Экзо н 18	GTCGCAGCTGT TTTAATTC	77	7840	7858	5- 9-5	73 1
599 381	2606	2624	Экзо н 18	TGTCGCAGCTG TTTAATT	69	7841	7859	5- 9-5	73 2
599 382	2607	2625	Экзо н 18	TTGTCGCAGCT GTTTAAAT	58	7842	7860	5- 9-5	73 3
599 383	2608	2626	Экзо н 18	GTTGTCGCAGC TGTTTAA	52	7843	7861	5- 9-5	73 4
599 384	2609	2627	Экзо н 18	TGTTGTCGCAG CTGTTTAA	63	7844	7862	5- 9-5	73 5
599 385	2610	2628	Экзо н 18 / повт ор	TTGTTGTCGCAG CTGTTTT	53	н.д.	н.д.	5- 9-5	73 6
599 386	2611	2629	Экзо н 18 / повт ор	TTTGTTGTCGCA GCTGTTT	63	н.д.	н.д.	5- 9-5	73 7
599 387	2612	2630	Экзо н 18 / повт ор	TTTTGTTGTCGC AGCTGTT	64	н.д.	н.д.	5- 9-5	43 8
599 388	2613	2631	Экзо н 18 / повт ор	TTTTTGTTGTCG CAGCTGT	66	н.д.	н.д.	5- 9-5	73 9

Ингибирование мРНК CFB МОЕ гэлмерами, направленными на SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2

ISIS №	SEQ ID NO: 1 сайт инициации	SEQ ID NO: 1 сайт терминации	Область - мишень	Последовательность	% ингибирования	SEQ ID NO: 2 сайт инициации	SEQ ID NO: 2 сайт терминации	Мотив	SEQ ID NO:
599213	2553	2570	Экзон 18	TAGAAAA CCCAAATC CTC	0	7788	7805	3-10-5	785
599214	2554	2571	Экзон 18	ATAGAAA ACCCAAA TCCT	0	7789	7806	3-10-5	786
599215	2555	2572	Экзон 18	TATAGAA AACCCAA ATCC	36	7790	7807	3-10-5	787
599216	2556	2573	Экзон 18	TTATAGAA AACCCAA ATC	8	7791	7808	3-10-5	788
599217	2557	2574	Экзон 18	CTTATAGA AAACCCA AAT	5	7792	7809	3-10-5	789
599218	2558	2575	Экзон 18	CCTTATAG AAAACCC AAA	0	7793	7810	3-10-5	790
599219	2559	2576	Экзон 18	CCCTTATA GAAAACC CAA	8	7794	7811	3-10-5	791
599220	2560	2577	Экзон 18	CCCCTTAT AGAAAAC CCA	0	7795	7812	3-10-5	740
599221	2561	2578	Экзон 18	ACCCCTTA TAGAAAA CCC	54	7796	7813	3-10-5	741
599222	2562	2579	Экзон 18	AACCCCTT ATAGAAA	3	7797	7814	3-10-5	742

				ACC					
599223	2563	2580	Экзон 18	AAACCCCT TATAGAA AAC	0	7798	7815	3-10- 5	743
599224	2564	2581	Экзон 18	GAAACCC CTTATAGA AAA	0	7799	7816	3-10- 5	744
599225	2566	2583	Экзон 18	AGGAAAC CCCTTATA GAA	60	7801	7818	3-10- 5	745
599226	2567	2584	Экзон 18	CAGGAAA CCCCTTAT AGA	0	7802	7819	3-10- 5	746
599227	2568	2585	Экзон 18	GCAGGAA ACCCCTTA TAG	37	7803	7820	3-10- 5	747
599228	2569	2586	Экзон 18	AGCAGGA AACCCCTT ATA	0	7804	7821	3-10- 5	748
599229	2570	2587	Экзон 18	CAGCAGG AAACCCCT TAT	39	7805	7822	3-10- 5	749
599230	2571	2588	Экзон 18	CCAGCAG GAAACCC CTTA	10	7806	7823	3-10- 5	750
599231	2572	2589	Экзон 18	TCCAGCA GGAAACC CCTT	16	7807	7824	3-10- 5	751
599232	2573	2590	Экзон 18	GTCCAGC AGGAAAC CCCT	9	7808	7825	3-10- 5	752
599233	2574	2591	Экзон 18	TGTCCAGC AGGAAAC CCC	44	7809	7826	3-10- 5	753
599234	2575	2592	Экзон 18	CTGTCCAG CAGGAAA CCC	14	7810	7827	3-10- 5	754

599235	2576	2593	Экзон 18	CCTGTCCA GCAGGAA ACC	0	7811	7828	3-10- 5	755
599236	2577	2594	Экзон 18	CCCTGTCC AGCAGGA AAC	43	7812	7829	3-10- 5	756
599237	2578	2595	Экзон 18	CCCCTGTC CAGCAGG AAA	0	7813	7830	3-10- 5	757
599238	2580	2597	Экзон 18	CGCCCCCTG TCCAGCA GGA	9	7815	7832	3-10- 5	758
599239	2581	2598	Экзон 18	ACGCCCCCT GTCCAGC AGG	36	7816	7833	3-10- 5	759
599240	2582	2599	Экзон 18	CACGCCCC TGTCCAGC AG	11	7817	7834	3-10- 5	760
599241	2583	2600	Экзон 18	CCACGCCC CTGTCCAG CA	51	7818	7835	3-10- 5	761
599242	2584	2601	Экзон 18	CCCACGCC CCTGTCCA GC	7	7819	7836	3-10- 5	762
599243	2585	2602	Экзон 18	TCCCACGC CCCTGTCC AG	47	7820	7837	3-10- 5	763
599244	2586	2603	Экзон 18	ATCCCACG CCCCTGTC CA	37	7821	7838	3-10- 5	764
599245	2587	2604	Экзон 18	AATCCCAC GCCCCTGT CC	35	7822	7839	3-10- 5	765
599246	2588	2605	Экзон 18	CAATCCCA CGCCCCCTG TC	21	7823	7840	3-10- 5	766
599247	2589	2606	Экзон	TCAATCCC	61	7824	7841	3-10-	767

			18	ACGCCCCT GT				5	
599248	2590	2607	Экзон 18	TTCAATCC CACGCCCC TG	51	7825	7842	3-10- 5	768
599249	2591	2608	Экзон 18	ATTCAATC CCACGCCC CT	58	7826	7843	3-10- 5	769
599250	2592	2609	Экзон 18	AATTCAAT CCCACGCC CC	49	7827	7844	3-10- 5	770
599251	2593	2610	Экзон 18	TAATTCAA TCCCACGC CC	46	7828	7845	3-10- 5	771
599252	2594	2611	Экзон 18	TAAATCA ATCCCACG CC	32	7829	7846	3-10- 5	772
599253	2595	2612	Экзон 18	TTAATTC AATCCCAC GC	23	7830	7847	3-10- 5	773
599254	2596	2613	Экзон 18	TTTAAAT CAATCCCA CG	0	7831	7848	3-10- 5	774
599255	2597	2614	Экзон 18	GTTTAAAT TCAATCCC AC	61	7832	7849	3-10- 5	775
599256	2598	2615	Экзон 18	TGTTTAA TTCAATCC CA	64	7833	7850	3-10- 5	776
599257	2599	2616	Экзон 18	CTGTTTAA ATTCAATC CC	66	7834	7851	3-10- 5	777
599258	2600	2617	Экзон 18	GCTGTTT AATTCAAT CC	59	7835	7852	3-10- 5	778
599259	2601	2618	Экзон 18	AGCTGTTT TAATCAA	40	7836	7853	3-10- 5	779

				TC					
599260	2602	2619	Экзон 18	CAGCTGTT TTAATTCA AT	38	7837	7854	3-10- 5	780
599261	2603	2620	Экзон 18	GCAGCTGT TTTAATTC AA	54	7838	7855	3-10- 5	781
599509	2552	2570	Экзон 18	TAGAAAA CCCAAATC CTCA	54	7787	7805	6-7-6	681
599273	2553	2571	Экзон 18	ATAGAAA ACCCAAA TCCTC	0	7788	7806	6-7-6	682
599274	2554	2572	Экзон 18	TATAGAA AACCCAA ATCCT	57	7789	7807	6-7-6	683
599275	2556	2574	Экзон 18	CTTATAGA AAACCCA AATC	0	7791	7809	6-7-6	684
599276	2557	2575	Экзон 18	CCTTATAG AAAACCC AAAT	44	7792	7810	6-7-6	685
599277	2558	2576	Экзон 18	CCCTTATA GAAAACC CAAA	0	7793	7811	6-7-6	686
599278	2559	2577	Экзон 18	CCCCTTAT AGAAAAC CCAA	0	7794	7812	6-7-6	687
599279	2560	2578	Экзон 18	ACCCCTTA TAGAAAA CCCA	20	7795	7813	6-7-6	688
599280	2561	2579	Экзон 18	AACCCCTT ATAGAAA ACCC	70	7796	7814	6-7-6	689
532917	2604	2623	Экзон 18	GTCGCAG CTGTTTA ATTCA	85	7839	7858	5-10- 5	317

599262	2604	2621	Экзон 18	CGCAGCT GTTTTAAT TCA	49	7839	7856	3-10- 5	782
599263	2605	2622	Экзон 18	TCGCAGCT GTTTTAAT TC	49	7840	7857	3-10- 5	783
599264	2606	2623	Экзон 18	GTCGCAG CTGTTTAA ATT	62	7841	7858	3-10- 5	784
599265	2607	2624	Экзон 18	TGTCGCAG CTGTTTAA AT	63	7842	7859	3-10- 5	792
599266	2608	2625	Экзон 18	TTGTCGCA GCTGTTT AA	41	7843	7860	3-10- 5	793
599267	2609	2626	Экзон 18	GTTGTCGC AGCTGTT TA	52	7844	7861	3-10- 5	794
599268	2610	2627	Экзон 18	TGTTGTCG CAGCTGTT TT	51	7845	7862	3-10- 5	795
599269	2611	2628	Экзон 18 / повтор	TTGTGTC GCAGCTGT TT	58	н.д.	н.д.	3-10- 5	796
599270	2612	2629	Экзон 18 / повтор	TTTGTGT CGCAGCT GTT	69	н.д.	н.д.	3-10- 5	797
599271	2613	2630	Экзон 18 / повтор	TTTGTGTG TCGCAGCT GT	69	н.д.	н.д.	3-10- 5	798
599272	2614	2631	Экзон 18 / повтор	TTTTGTG GTCGCAG CTG	72	н.д.	н.д.	3-10- 5	799
599205	2607	2624	Экзон 18	TGTCGCAG CTGTTTAA AT	54	7842	7859	5-8-5	792
599206	2608	2625	Экзон	TTGTCGCA	62	7843	7860	5-8-5	793

			18	GCTGTTT AA					
599207	2609	2626	Экзон 18	GTTGTCGC AGCTGTTT TA	62	7844	7861	5-8-5	794
599208	2610	2627	Экзон 18	TGTTGTCG CAGCTGTT TT	66	7845	7862	5-8-5	795
599209	2611	2628	Экзон 18 / повтор	TTGTTGTC GCAGCTGT TT	60	н.д.	н.д.	5-8-5	796
599210	2612	2629	Экзон 18 / повтор	TTTGTGTG CGCAGCT GTT	62	н.д.	н.д.	5-8-5	797
599211	2613	2630	Экзон 18 / повтор	TTTTGTTG TCGCAGCT GT	65	н.д.	н.д.	5-8-5	798
599212	2614	2631	Экзон 18 / повтор	TTTTTGTT GTCGCAG CTG	67	н.д.	н.д.	5-8-5	799

Таблица 147

Ингибирование мРНК CFB 5-10-5 МОЕ гэлпмерами, направленными на SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2

ISIS №	SEQ ID NO: 1 сайт инициац ии	SEQ ID NO: 1 сайт термина ции	Область - мишень	Последовател ьность	% ингибир ования	SEQ ID NO: 2 сайт инициа ции	SEQ ID NO: 2 сайт терми нации	SEQ ID NO:
58857 0	150	169	Экзон 1	TGGTCACAT TCCCTTCCC CT	72	1871	1890	39 6
58857 1	152	171	Экзон 1	CCTGGTCAC ATTCCCTTC CC	80	1873	1892	39 7

53261 4	154	173	Экзон 1	GACCTGGT CACATTCCC TTC	65	1875	1894	12
58857 2	156	175	Экзон 1	TAGACCTG GTCACATTC CCT	74	1877	1896	39 8
58857 3	158	177	Экзон 1	CCTAGACCT GGTCACATT CC	72	1879	1898	39 9
58856 6	2189	2208	Экзон 15	CCTTCCGAG TCAGCTTTT TC	66	6977	6996	40 0
58856 7	2191	2210	Экзон 15	CTCCTTCCG AGTCAGCTT TT	66	6979	6998	40 1
53277 0	2193	2212	Экзон 15	ACCTCCTTC CGAGTCAG CTT	64	6981	7000	19 8
58856 8	2195	2214	Экзон 15	AGACCTCCT TCCGAGTC AGC	78	6983	7002	40 2
58856 9	2197	2216	Экзон 15	GTAGACCT CCTTCCGAG TCA	74	6985	7004	40 3
58857 4	2453	2472	Экзон 18	TTTGCCGCT TCTGGTTTT TG	71	7688	7707	40 4
58857 5	2455	2474	Экзон 18	CTTTTGCCG CTTCTGGTT TT	72	7690	7709	40 5
53280 0	2457	2476	Экзон 18	TGCTTTTGC CGCTTCTGG TT	71	7692	7711	22 8
58857 6	2459	2478	Экзон 18	CCTGCTTTT GCCGCTTCT GG	59	7694	7713	40 6
58857	2461	2480	Экзон	TACCTGCTT	76	7696	7715	40

7			18	TTGCCGCTT CT				7
51635 0	2550	2569	Экзон 18	AGAAAACC CAAATCCTC ATC	58	7785	7804	40 8
58850 9	2551	2570	Экзон 18	TAGAAAAC CCAAATCCT CAT	6	7786	7805	40 9
58851 0	2552	2571	Экзон 18	ATAGAAAA CCCAAATC CTCA	10	7787	7806	41 0
58851 1	2553	2572	Экзон 18	TATAGAAA ACCCAAAT CCTC	9	7788	7807	41 1
58851 2	2554	2573	Экзон 18	TTATAGAA AACCCAAA TCCT	80	7789	7808	41 2
58851 3	2555	2574	Экзон 18	CTTATAGA AAACCCAA ATCC	70	7790	7809	41 3
58851 4	2556	2575	Экзон 18	CCTTATAGA AAACCCAA ATC	71	7791	7810	41 4
58851 5	2557	2576	Экзон 18	CCCTTATAG AAAACCCA AAT	78	7792	7811	41 5
58851 6	2558	2577	Экзон 18	CCCCTTATA GAAAACCC AAA	72	7793	7812	41 6
58851 7	2559	2578	Экзон 18	ACCCCTTAT AGAAAACC CAA	80	7794	7813	41 7
58851 8	2560	2579	Экзон 18	AACCCCTTA TAGAAAAC CCA	80	7795	7814	41 8
58851 9	2561	2580	Экзон 18	AAACCCCTT ATAGAAAA	62	7796	7815	41 9

				CCC				
58852 0	2562	2581	Экзон 18	GAAACCCC TTATAGAA AACC	59	7797	7816	42 0
58852 1	2563	2582	Экзон 18	GGAAACCC CTTATAGA AAAC	40	7798	7817	42 1
58852 2	2564	2583	Экзон 18	AGGAAACC CCTTATAGA AAA	66	7799	7818	42 2
58852 3	2565	2584	Экзон 18	CAGGAAAC CCCTTATAG AAA	63	7800	7819	42 3
58852 4	2566	2585	Экзон 18	GCAGGAAA CCCCTTATA GAA	70	7801	7820	42 4
58852 5	2567	2586	Экзон 18	AGCAGGAA ACCCCTTAT AGA	67	7802	7821	42 5
58852 6	2568	2587	Экзон 18	CAGCAGGA AACCCCTTA TAG	0	7803	7822	42 6
58852 7	2569	2588	Экзон 18	CCAGCAGG AAACCCCTT ATA	11	7804	7823	42 7
58852 8	2570	2589	Экзон 18	TCCAGCAG GAAACCCC TTAT	15	7805	7824	42 8
53280 9	2571	2590	Экзон 18	GTCCAGCA GGAAACCC CTTA	75	7806	7825	23 7
58852 9	2572	2591	Экзон 18	TGTCCAGC AGGAAACC CCTT	16	7807	7826	42 9
58853 0	2573	2592	Экзон 18	CTGTCCAGC AGGAAACC CCT	16	7808	7827	43 0

58853 1	2574	2593	Экзон 18	CCTGTCCAG CAGGAAAC CCC	19	7809	7828	43 1
58853 2	2575	2594	Экзон 18	CCCTGTCCA GCAGGAAA CCC	15	7810	7829	43 2
58853 3	2576	2595	Экзон 18	CCCCTGTCC AGCAGGAA ACC	29	7811	7830	43 3
53281 0	2577	2596	Экзон 18	GCCCCTGTC CAGCAGGA AAC	74	7812	7831	23 8
58853 4	2578	2597	Экзон 18	CGCCCCTGT CCAGCAGG AAA	21	7813	7832	43 4
58853 5	2579	2598	Экзон 18	ACGCCCCT GTCCAGCA GGAA	16	7814	7833	43 5
58853 6	2580	2599	Экзон 18	CACGCCCCT GTCCAGCA GGA	0	7815	7834	43 6
58853 7	2581	2600	Экзон 18	CCACGCCC CTGTCCAGC AGG	8	7816	7835	43 7
58853 8	2582	2601	Экзон 18	CCCACGCC CCTGTCCAG CAG	10	7817	7836	43 8
58853 9	2583	2602	Экзон 18	TCCCACGCC CCTGTCCAG CA	23	7818	7837	43 9
58854 0	2584	2603	Экзон 18	ATCCCACG CCCCTGTCC AGC	16	7819	7838	44 0
58854 1	2585	2604	Экзон 18	AATCCCAC GCCCCTGTC CAG	16	7820	7839	44 1
58854	2586	2605	Экзон	CAATCCCA	12	7821	7840	44

2			18	CGCCCCTGT CCA				2
58854 3	2587	2606	Экзон 18	TCAATCCCA CGCCCCTGT CC	26	7822	7841	44 3
58854 4	2588	2607	Экзон 18	TTCAATCCC ACGCCCCT GTC	26	7823	7842	44 4
58854 5	2589	2608	Экзон 18	ATTCAATCC CACGCCCT GT	31	7824	7843	44 5
58854 6	2590	2609	Экзон 18	AATTCAATC CCACGCC CTG	22	7825	7844	44 6
58854 7	2591	2610	Экзон 18	TAATTCAAT CCCACGCC CCT	12	7826	7845	44 7
58854 8	2592	2611	Экзон 18	TTAATTCAA TCCCACGCC CC	20	7827	7846	44 8
58854 9	2593	2612	Экзон 18	TTTAATTCA ATCCCACG CCC	26	7828	7847	44 9
58855 0	2594	2613	Экзон 18	TTTTAATTC AATCCCAC GCC	32	7829	7848	45 0
58855 1	2595	2614	Экзон 18	GTTTTAATT CAATCCCA CGC	48	7830	7849	45 1
58855 2	2596	2615	Экзон 18	TGTTTTAAT TCAATCCCA CG	57	7831	7850	45 2
58855 3	2597	2616	Экзон 18	CTGTTTTAA TTCAATCCC AC	49	7832	7851	45 3
58855 4	2598	2617	Экзон 18	GCTGTTTTA ATTCAATCC	64	7833	7852	45 4

				CA				
53281 1	2599	2618	Экзон 18	AGCTGTTTT AATTCATC CC	78	7834	7853	23 9
58855 5	2600	2619	Экзон 18	CAGCTGTTT TAATTCAT CC	48	7835	7854	45 5
58855 6	2601	2620	Экзон 18	GCAGCTGTT TTAATTCAA TC	55	7836	7855	45 6
58855 7	2602	2621	Экзон 18	CGCAGCTG TTTTAATTC AAT	51	7837	7856	45 7
58855 8	2603	2622	Экзон 18	TCGCAGCT GTTTAAATT CAA	51	7838	7857	45 8
53291 7	2604	2623	Экзон 18	GTCGCAGC TGTTTAAAT TCA	82	7839	7858	31 7
58855 9	2605	2624	Экзон 18	TGTCGCAG CTGTTTAA TTC	58	7840	7859	45 9
58856 0	2606	2625	Экзон 18	TTGTCGCAG CTGTTTAA TT	72	7841	7860	46 0
58856 1	2607	2626	Экзон 18	GTTGTCGCA GCTGTTTAA AT	75	7842	7861	46 1
53295 2	2608	2627	Экзон 18	TGTTGTCGC AGCTGTTTT AA	39	7843	7862	39 5
58856 2	2609	2628	Экзон 18 / повтор	TTGTTGTCG CAGCTGTTT TA	53	н.д.	н.д.	46 2
58856 3	2610	2629	Экзон 18 / повтор	TTTGTTGTC GCAGCTGTT TT	62	н.д.	н.д.	46 3
58856 4	2611	2630	Экзон 18 / повтор	TTTTGTTGT CGCAGCTG TTT	63	н.д.	н.д.	46 4
58856 5	2612	2631	Экзон 18 / повтор	TTTTTGTTG TCGCAGCT GTT	64	н.д.	н.д.	46 5

Пример 122. Дозозависимое антисмысловое ингибирование человеческого CFB в клетках HepG2 5-10-5 МОЕ гепатома.

Гепмеры из исследований, описанных выше, демонстрирующие значительное *in vitro* ингибирование мРНК CFB, были выбраны и испытаны в различных дозах в клетках HepG2. Клетки были высеваны с плотностью 20000 клеток на лунку и трансфицированы с использованием электропорации с концентрациями антисмыслового олигонуклеотида, равными 0,313 мкМ, 0,625 мкМ, 1,25 мкМ, 2,50 мкМ, 5,00 мкМ или 10,00 мкМ, как указано в представленной ниже таблице. После периода обработки в течение около 16 ч, РНК выделяли из клеток и измеряли уровни мРНК CFB методом количественной ПЦР в реальном времени. Набор человеческих праймеров RTS3459 был использован для измерения уровней мРНК. Уровни мРНК CFB были скорректированы в соответствии с содержанием суммарной РНК, измеренным с

помощью RIBOGREEN®. Результаты представлены как процентное ингибирование CFB относительно необработанных контрольных клеток.

Указана также полумаксимальная ингибирующая концентрация (IC_{50}) каждого олигонуклеотида. Обработка антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК CFB в клетках дозозависимым образом.

Таблица 148

ISIS №	0,313 мкМ	0,625 мкМ	1,25 мкМ	2,50 мкМ	5,00 мкМ	10,00 мкМ	IC_{50} (мкМ)
532614	7	13	43	72	65	71	2,2
532635	12	0	3	28	0	0	>10
532692	26	0	12	52	55	74	3,7
532770	21	18	32	73	64	88	1,8
532775	8	0	26	35	47	59	6,2
532800	0	5	30	65	50	75	3,1
532809	12	30	28	40	46	66	4,6
532810	28	44	32	69	84	95	1,2
532811	66	83	90	94	97	99	<0,3
532917	64	85	88	96	97	99	<0,3
532952	50	53	68	80	91	94	0,4

Пример 123. Дозозависимое антисмысловое ингибирование человеческого CFB в клетках HerG2

Гэпмеры из исследований, описанных выше, демонстрирующие значительное *in vitro* ингибирование мРНК CFB, были выбраны и испытаны в различных дозах в клетках HerG2. Антисмысловые олигонуклеотиды были протестированы в серии экспериментов с аналогичными условиями культивирования. Результаты для каждого эксперимента представлены в отдельных таблицах, показанных ниже. Клетки были высеваны с плотностью 20000 клеток на лунку и трансфицированы с использованием электропорации с концентрациями антисмыслового олигонуклеотида, равными 0,08 мкМ, 0,25 мкМ, 0,74 мкМ, 2,22 мкМ, 6,67 мкМ и 20,00 мкМ, как указано в представленной ниже таблице. После периода обработки в течение около 16 ч, РНК выделяли из клеток и измеряли уровни мРНК CFB методом количественной ПЦР в реальном времени. Набор человеческих праймеров RTS3459 был использован для измерения уровней мРНК. Уровни мРНК CFB были скорректированы в соответствии с содержанием суммарной РНК, измеренным с помощью RIBOGREEN®. Результаты представлены как процентное ингибирование CFB относительно необработанных контрольных клеток.

Указана также полумаксимальная ингибирующая концентрация (IC_{50}) каждого олигонуклеотида. Обработка антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК CFB в клетках дозозависимым образом.

Таблица 149

ISIS №	0,08 мкМ	0,25 мкМ	0,74 мкМ	2,22 мкМ	6,67 мкМ	20,00 мкМ	IC_{50} (мкМ)
532811	19	53	81	87	96	97	0,2
588834	7	42	64	92	98	98	0,5
588835	11	30	66	89	97	97	0,5
588836	14	40	61	91	97	97	0,5
588837	6	39	67	89	96	97	0,5
588838	0	27	41	81	87	97	1,0
588842	17	51	68	86	93	95	0,3
588843	21	38	72	90	95	96	0,4
588870	9	31	56	88	95	97	0,6
588871	14	25	47	79	93	97	0,7
588872	18	28	59	84	92	97	0,6

Таблица 150

ISIS №	0,08 мкМ	0,25 мкМ	0,74 мкМ	2,22 мкМ	6,67 мкМ	20,00 мкМ	IC ₅₀ (мкМ)
532811	31	70	89	94	97	97	0,1
588844	31	60	77	91	95	96	0,1
588846	32	52	78	89	95	97	0,2
588847	22	52	77	91	95	97	0,2
588848	20	40	73	91	96	98	0,3
588851	40	52	82	94	97	97	0,1
588854	17	55	59	84	94	96	0,4
588855	10	32	56	82	93	96	0,6
588856	13	46	75	90	96	97	0,3
588857	11	52	73	94	96	97	0,3
588858	19	48	75	94	97	98	0,3

Таблица 151

ISIS №	0,08 мкМ	0,25 мкМ	0,74 мкМ	2,22 мкМ	6,67 мкМ	20,00 мкМ	IC ₅₀ (мкМ)
532811	42	66	88	96	97	98	0,1
588859	18	46	66	90	96	97	0,4
588860	55	80	94	97	97	97	<0,1
588861	24	61	86	93	96	97	0,2
588862	25	64	85	94	96	98	0,1
588863	50	73	89	96	96	98	<0,1
588864	52	80	92	96	98	98	<0,1
588865	46	72	91	96	96	99	<0,1
588866	47	76	88	96	97	98	<0,1
588867	43	69	83	92	96	99	0,1
588868	43	56	65	84	93	97	0,1

Таблица 152

ISIS №	0,08 мкМ	0,25 мкМ	0,74 мкМ	2,22 мкМ	6,67 мкМ	20,00 мкМ	IC ₅₀ (мкМ)
532810	0	14	38	72	89	96	1,2
532811	18	54	79	93	96	97	0,3
532952	19	34	73	87	94	96	0,4
588534	17	13	44	77	93	97	0,9
588544	12	43	69	86	89	93	0,4
588545	17	55	67	86	91	93	0,3
588546	10	32	67	85	91	93	0,6
588552	27	54	76	90	94	97	0,2
588553	32	68	87	93	95	97	0,1
588560	16	54	76	90	94	96	0,3
588561	18	45	68	85	93	96	0,4

Таблица 153

ISIS №	0,08 мкМ	0,25 мкМ	0,74 мкМ	2,22 мкМ	6,67 мкМ	20,00 мкМ	IC ₅₀ (мкМ)
532811	22	60	82	94	97	98	0,2
588536	2	38	65	90	96	97	0,6
588537	12	38	63	87	94	97	0,5
588547	19	35	61	86	93	97	0,5
588548	19	36	75	88	95	96	0,4
588554	0	76	92	95	97	97	<0,1
588555	31	61	89	96	97	98	0,1
588556	33	56	82	95	94	97	0,1
588562	12	39	71	87	94	97	0,4
588563	25	48	72	86	94	96	0,3
588564	15	33	63	89	91	97	0,5

Таблица 154

ISIS №	0,08 мкМ	0,25 мкМ	0,74 мкМ	2,22 мкМ	6,67 мкМ	20,00 мкМ	IC ₅₀ (мкМ)
532811	39	68	86	96	98	98	0,1
588538	0	40	82	94	97	98	0,3
588539	34	65	88	95	98	98	0,1
588540	30	51	81	91	97	98	0,2
588549	31	57	82	95	96	98	0,1
588550	34	65	88	96	98	98	0,1
588551	47	66	87	96	98	99	<0,1
588557	40	84	95	98	98	98	<0,1
588558	45	73	93	97	98	99	<0,1
588559	51	69	83	96	98	99	<0,1
588565	19	56	81	92	96	98	0,2

Пример 124. Дозозависимое антисмысловое ингибирование человеческого CFB в клетках HepG2

Гэпмеры из исследований, описанных выше, демонстрирующие значительное *in vitro* ингибирование мРНК CFB, были выбраны и испытаны в различных дозах в клетках HepG2. Антисмысловые олигонуклеотиды были протестированы в серии экспериментов с аналогичными условиями культивирования. Результаты для каждого эксперимента представлены в отдельных таблицах, показанных ниже. Клетки были высеяны с плотностью 20000 клеток на лунку и трансфицированы с использованием электропорации с концентрациями антисмыслового олигонуклеотида, равными 0,06 мкМ, 0,25 мкМ, 1,00 и 4,00 мкМ, как указано в представленной ниже таблице. После периода обработки в течение около 16 ч, РНК выделяли из клеток и измеряли уровни мРНК CFB методом количественной ПЦР в реальном времени. Набор человеческих праймеров RTS3459 был использован для измерения уровней мРНК. Уровни мРНК CFB были скорректированы в соответствии с содержанием суммарной РНК, измеренным с помощью RIBOGREEN®.

Результаты представлены как процентное ингибирование CFB относительно необработанных контрольных клеток.

Указана также полумаксимальная ингибирующая концентрация (IC₅₀) каждого олигонуклеотида. Обработка антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК CFB в клетках дозозависимым образом.

Таблица 155

ISIS №	0,06 мкМ	0,25 мкМ	1,00 мкМ	4,00 мкМ	IC ₅₀ (мкМ)
532917	31	58	87	92	0,2
588860	18	50	79	93	0,3
599001	16	28	69	90	0,5
599024	14	32	74	90	0,4
599025	0	31	56	92	0,7
599032	28	44	62	88	0,3
599033	28	46	80	92	0,2
599077	8	20	59	80	0,8
599080	9	33	48	76	0,9
599086	7	22	53	83	0,8
599087	21	31	74	87	0,4
599088	13	37	69	82	0,5
599089	3	36	55	79	0,7
599093	25	59	79	88	0,2
599094	19	29	75	89	0,4
599095	29	43	67	87	0,3
599096	23	51	70	88	0,3
599149	20	53	82	92	0,3
599188	0	21	62	85	0,8

Таблица 156

ISIS №	0,06 мкМ	0,25 мкМ	1,00 мкМ	4,00 мкМ	IC ₅₀ (мкМ)
532917	0	42	81	91	0,4
588860	17	49	74	92	0,3
599155	29	52	67	87	0,3
599198	3	25	64	89	0,6
599201	13	26	67	91	0,5
599202	0	44	72	87	0,5
599203	22	41	75	88	0,3
599314	12	34	71	84	0,5
599316	7	37	66	88	0,5
599317	8	1	54	83	1,0
599321	8	33	70	85	0,5
599322	24	38	66	87	0,4
599327	22	32	66	89	0,4
599328	0	31	59	88	0,7
599330	5	43	67	84	0,5
599374	23	42	80	91	0,3
599378	21	57	80	93	0,2
599380	23	56	82	93	0,2
599432	17	37	73	93	0,4

Таблица 157

ISIS №	0,06 мкМ	0,25 мкМ	1,00 мкМ	4,00 мкМ	IC ₅₀ (мкМ)
532917	23	65	76	93	0,2
588860	17	60	76	90	0,3
601282	48	68	81	88	0,1
601269	18	59	80	94	0,2
601276	34	64	81	91	0,1
601275	14	39	78	90	0,4
601344	52	84	92	94	<0,06
601383	53	81	86	94	<0,06
601382	41	76	88	94	0,1
601385	52	74	89	91	<0,06
601332	41	69	86	94	0,1
601345	36	75	86	95	0,1
601371	34	72	91	93	0,1
601384	50	78	91	95	<0,06
601380	28	57	83	92	0,2
601387	48	61	82	88	0,1
601341	28	65	83	91	0,2
601346	31	69	82	93	0,1
601335	24	56	85	92	0,2

Таблица 158

ISIS №	0,06 мкМ	0,25 мкМ	1,00 мкМ	4,00 мкМ	IC ₅₀ (мкМ)
532917	31	66	86	93	0,1
588860	28	62	85	94	0,2
599208	24	50	71	89	0,3
599261	31	49	81	94	0,2
599267	41	48	80	88	0,2
599268	28	56	75	92	0,2
599313	14	24	71	92	0,5
599441	24	57	80	87	0,2
599494	13	55	86	94	0,3
599552	30	69	93	95	0,1
599553	34	71	93	96	0,1
599554	30	74	93	96	0,1
599568	40	77	90	97	0,1
599570	61	82	93	96	<0,06
599577	18	62	81	93	0,2
599581	27	60	80	94	0,2
599591	49	74	93	96	<0,06
599592	46	76	90	94	0,1
599593	44	72	91	95	0,1

Таблица 159

ISIS №	0,06 мкМ	0,25 мкМ	1,00 мкМ	4,00 мкМ	IC ₅₀ (мкМ)
532917	25	56	84	92	0,2
588860	11	51	80	92	0,3
599547	23	60	82	90	0,2
599569	42	73	85	88	0,1
599578	29	49	82	89	0,2
599582	21	56	78	91	0,2
599590	24	62	80	90	0,2
601209	21	49	85	88	0,3
601210	34	64	86	92	0,1
601212	46	68	88	90	0,1
601213	54	80	90	92	<0,06
601214	38	77	88	95	0,1
601215	42	64	85	92	0,1
601216	45	57	76	89	0,1
601264	29	58	86	95	0,2
601278	51	82	83	93	<0,06
601279	44	80	92	96	0,1
601280	44	73	87	94	0,1
601281	51	80	91	94	<0,06

Пример 125. Дозозависимое антисмысловое ингибирование человеческого CFB в клетках HepG2

Гэпмеры из исследований, описанных выше, демонстрирующие значительное *in vitro* ингибирование мРНК CFB, были выбраны и испытаны в различных дозах в клетках HepG2. Дополнительно был сконструирован дезокси, MOE и (S)-cEt олигонуклеотид, ISIS 594430, имеющий такую же последовательность (CTCCTTCCGAGTCAGC, SEQ ID NO: 549) и область-мишень (целевой сайт инициации 2195 в SEQ ID NO: 1 и целевой сайт инициации 6983 в SED ID NO: 2), как ISIS 588870, другой дезокси, MOE и (S)-cEt олигонуклеотид. ISIS 594430 представляет собой 3-10-3 (S)-cEt гэпмер.

Клетки были высеяны с плотностью 20000 клеток на лунку и трансфицированы с использованием электропорации с концентрациями антисмыслового олигонуклеотида, равными 0,01 мкМ, 0,04 мкМ, 0,12 мкМ, 0,37 мкМ, 1,11 мкМ, 3,33 мкМ и 10,00 мкМ, как указано в представленной ниже таблице. После периода обработки в течение около 16 ч, РНК выделяли из клеток и измеряли уровни мРНК CFB методом количественной ПЦР в реальном времени. Набор человеческих праймеров RTS3459 был использован для измерения уровней мРНК. Уровни мРНК CFB были скорректированы в соответствии с содержанием суммарной РНК, измеренным с помощью RIBOGREEN®. Результаты представлены как процентное ингибирование CFB относительно необработанных контрольных клеток.

Указана также полумаксимальная ингибирующая концентрация (IC₅₀) каждого олигонуклеотида. Обработка антисмысловыми олигонуклеотидами снижает уровни мРНК CFB в клетках дозозависимым образом.

Таблица 160

ISIS №	0,01 мкМ	0,04 мкМ	0,12 мкМ	0,37 мкМ	1,11 мкМ	3,33 мкМ	10,00 мкМ	IC ₅₀ (мкМ)
588536	0	0	0	5	45	73	94	1,4
588548	0	0	0	19	52	78	90	1,2
588553	0	0	9	42	76	85	94	0,6
588555	0	52	23	58	78	83	95	0,3
588847	4	1	18	45	67	84	96	0,5
588848	0	3	13	38	67	83	95	0,6
594430	0	0	10	34	50	55	84	1,4

Пример 126: Переносимость MOE гэпмеров, направленных на человеческий CFB, у мышей CD1

Мыши CD1® (Чарльз Ривер, штат Массачусетс) представляют собой многоцелевую мышиную модель, часто используемую для испытаний безопасности и эффективности. Мышей лечили антисмысловыми олигонуклеотидами ISIS, выбранными из описанных выше исследований, и оценивали изменения уровней различных химических маркеров в плазме.

Испытание 1 (с 5-10-5 МОЕ гэмперами).

Группам семинедельных мышей CD1 один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции 100 мг/кг олигонуклеотида ISIS. Одной группе самцов мышей CD1 один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции PBS. Одной группе мышей один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции 100 мг/кг контрольного олигонуклеотида ISIS 141923 (CCTTCCCTGAAGGTTCCCTCC, в настоящем документе обозначена как SEQ ID NO: 809, 5-10-5 МОЕ гэмпер, не имеющий известной мышью мишени). Мышей усыпляли через 48 ч после введения последней дозы и собирали органы и плазму для дальнейших анализов.

Химические маркеры в плазме.

Для оценки влияния олигонуклеотида ISIS на функцию печени и почек измеряли уровни трансаминаз и АМК в плазме с использованием автоматического клинического анализатора химического состава (Hitachi Olympus AU400е, Мелвилл, штат Нью-Йорк). Результаты представлены ниже в таблице. Олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали изменения уровней любых маркеров функции печени или почек за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали для дальнейших исследований.

Таблица 161

Химические маркеры в плазме мышей CD1 на 40 день

	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	АМК (мг/дл)
PBS	25	46	20
ISIS 532614	513	407	22
ISIS 532692	131	130	24
ISIS 532770	36	53	25
ISIS 532775	193	158	23
ISIS 532800	127	110	25
ISIS 532809	36	42	22
ISIS 532810	229	286	26
ISIS 532811	197	183	21
ISIS 532917	207	204	27
ISIS 532952	246	207	25
ISIS 141923	39	67	23

Масса.

Перед усыплением мышей на 40 день измерили также массу тела мышей. После усыпления мышей измерили также массу органов, печени, почек и селезенки. Результаты представлены ниже в таблице. Олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали изменения массы за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали в дальнейших исследованиях.

Таблица 162

Масса (г) мышей CD1 на 40 день

	Тело	Почки	Печень	Селезенка
PBS	44	0,8	2,0	0,1
ISIS 532614	43	0,7	4,3	0,2
ISIS 532692	42	0,7	2,6	0,2
ISIS 532770	42	0,6	2,3	0,2
ISIS 532775	42	0,7	2,5	0,2
ISIS 532800	43	0,6	2,8	0,3
ISIS 532809	42	0,6	2,2	0,1
ISIS 532810	43	0,6	2,3	0,2
ISIS 532811	41	0,7	2,4	0,2
ISIS 532917	42	0,7	3,0	0,2
ISIS 532952	44	0,8	2,5	0,3
ISIS 141923	41	0,6	2,0	0,1

Испытание 2 (с 5-10-5 МОЕ гэмперами).

Группам шести-восьминедельных самцов мышей CD1 один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции 100 мг/кг олигонуклеотида ISIS. Двум группам самцов мышей CD1 один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции PBS. Одной группе мышей один раз в неделю в

течение 6 недель вводили подкожные инъекции 100 мг/кг контрольного олигонуклеотида ISIS 141923. Мышей усыпляли через 48 ч после введения последней дозы и собирали органы и плазму для дальнейших анализов.

Химические маркеры в плазме.

Для оценки влияния олигонуклеотидов ISIS на функцию печени и почек измеряли уровни трансаминаз, альбумина и АМК в плазме, используя автоматизированный клинический анализатор химического состава (Hitachi Olympus AU400e, Мелвилл, штат Нью-Йорк). Результаты представлены ниже в таблице. Олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали изменения уровней любых маркеров функции печени или почек за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали для дальнейших исследований.

Таблица 163

Химические маркеры в плазме мышей CD1 на 45 день

	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Альбумин (г/дл)	АМК (мг/дл)
PBS	39	53	2,9	29
PBS	50	97	2,9	30
ISIS 141923	163	174	4,1	25
ISIS 532810	321	297	2,5	26
ISIS 532952	182	199	2,7	27
ISIS 588534	276	248	2,6	29
ISIS 588536	48	60	2,9	31
ISIS 588537	72	79	4,0	25
ISIS 588538	63	67	4,5	29
ISIS 588539	238	177	3,9	28
ISIS 588545	496	256	4,4	24
ISIS 588547	323	210	4,4	25
ISIS 588548	61	63	4,2	27
ISIS 588549	127	132	4,1	23
ISIS 588551	302	282	4,2	22
ISIS 588552	76	98	4,0	30
ISIS 588558	1066	521	3,9	27
ISIS 588559	76	94	4,1	26
ISIS 588561	502	500	4,4	26
ISIS 588563	50	99	4,4	28

Масса.

Массу тела мышей измерили на 42 день. После усыпления мышей на 45 день измерили также массу органов, печени, почек и селезенки. Результаты представлены ниже в таблице. Олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали изменения массы за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали в дальнейших исследованиях.

Таблица 164

Масса (г) мышей CD1 на 40 день

	Тело	Почки	Печень	Селезенка
PBS	44	0,7	2,4	0,1
PBS	43	0,7	2,4	0,2
ISIS 141923	43	0,6	2,4	0,2
ISIS 532810	41	0,6	1,9	0,1
ISIS 532952	43	0,6	2,4	0,2
ISIS 588534	44	0,7	2,8	0,2
ISIS 588536	43	0,7	2,7	0,2
ISIS 588537	43	0,7	2,4	0,2
ISIS 588538	44	0,7	2,8	0,2
ISIS 588539	44	0,6	2,7	0,2
ISIS 588545	44	0,8	3,3	0,3
ISIS 588547	42	0,6	3,3	0,3
ISIS 588548	43	0,6	2,8	0,2
ISIS 588549	42	0,6	2,8	0,3
ISIS 588551	39	0,6	2,2	0,2
ISIS 588552	41	0,6	2,2	0,2
ISIS 588558	44	0,7	3,3	0,3
ISIS 588559	43	0,6	2,7	0,3
ISIS 588561	40	0,7	2,4	0,3
ISIS 588563	41	0,7	2,4	0,2

Испытание 3 (с 5-10-5 МОЕ гэмперами).

Группам шести-восьминедельных самцов мышей CD1 один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции 100 мг/кг олигонуклеотида ISIS. Двум группам самцов мышей CD1 один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции PBS. Мышей усыпляли через 48 ч после введения последней дозы и собирали органы и плазму для дальнейших анализов.

Химические маркеры в плазме.

Для оценки влияния олигонуклеотидов ISIS на функцию печени и почек измеряли уровни трансаминаз, альбумина и АМК в плазме, используя автоматизированный клинический анализатор химического состава (Hitachi Olympus AU400e, Мелвилл, штат Нью-Йорк). Результаты представлены ниже в таблице. Олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали изменения уровней любых маркеров функции печени или почек за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали для дальнейших исследований.

Таблица 165

Химические маркеры в плазме мышей CD1 на 42 день

	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Альбумин (г/дл)	АМК (мг/дл)
PBS	37	108	3,1	30
PBS	45	51	3,0	27
ISIS 588544	209	168	2,9	26
ISIS 588546	526	279	3,0	22
ISIS 588550	82	136	2,7	25
ISIS 588553	79	105	3,0	24
ISIS 588554	112	220	3,2	19
ISIS 588555	95	162	2,8	25
ISIS 588556	345	236	3,0	26
ISIS 588557	393	420	2,8	24
ISIS 588560	109	148	2,7	27
ISIS 588562	279	284	2,8	22
ISIS 588564	152	188	3,0	23
ISIS 588565	247	271	2,8	28

Масса.

Массу тела мышей измерили на 42 день. После усыпления мышей на 42 день измерили также массу органов, печени, почек и селезенки. Результаты представлены ниже в таблице. Олигонуклеотиды ISIS,

которые вызывали изменения массы за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали в дальнейших исследованиях.

Таблица 166
Масса (г) мышей CD1 на 40 день

	Тело	Почки	Печень	Селезенка
PBS	42	0,7	2,4	0,1
PBS	41	0,7	2,4	0,2
ISIS 588544	44	0,6	1,9	0,1
ISIS 588546	43	0,6	2,4	0,2
ISIS 588550	41	0,7	2,8	0,2
ISIS 588553	44	0,7	2,7	0,2
ISIS 588554	40	0,7	2,4	0,2
ISIS 588555	44	0,7	2,8	0,2
ISIS 588556	39	0,6	2,7	0,2
ISIS 588557	41	0,8	3,3	0,3
ISIS 588560	38	0,6	3,2	0,3
ISIS 588562	41	0,6	2,8	0,2
ISIS 588564	40	0,6	2,8	0,3
ISIS 588565	39	0,6	2,2	0,2

Испытание 4 (с (S)-cEt гэнперами и дезокси, MOE и (S)-cEt олигонуклеотидами).

Группам десятидневных самцов мышей CD1 один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции 50 мг/кг олигонуклеотида ISIS из исследований, описанных выше. Кроме того, были сконструированы два олигонуклеотида, ISIS 594431 и ISIS 594432, сконструированные как 3-10-3 (S)-cEt гэнперы, и они также были испытаны в данном исследовании. ISIS 594431(ACCTCCTTCCGAGTCA, SEQ ID NO: 550) направлен на ту же область, что и ISIS 588871, дезокси, MOE и (S)-cEt гэнпер (целевой сайт инициации 2197 в SEQ ID NO: 1 и целевой сайт инициации 6985 в SEQ ID NO: 2). ISIS 594432 (TGGTCACATTCCTTC, SEQ ID NO: 542) направлен на ту же область, что и ISIS 588872, дезокси, MOE и (S)-cEt гэнпер (целевой сайт инициации 154 в SEQ ID NO: 1 и целевой сайт инициации 1875 в SEQ ID NO: 2).

Двум группам самцов мышей CD1 один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции PBS. Мышей усыпляли через 48 ч после введения последней дозы и собирали органы и плазму для дальнейших анализов.

Химические маркеры в плазме.

Для оценки влияния олигонуклеотидов ISIS на функцию печени и почек измеряли уровни трансаминаз, альбумина, креатинина и АМК в плазме с помощью автоматизированного клинического анализатора химического состава (Hitachi Olympus AU400e, Мелвилл, штат Нью-Йорк). Результаты представлены ниже в таблице. Олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали изменения уровней любых маркеров функции печени или почек за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали для дальнейших исследований.

Таблица 167

Химические маркеры в плазме мышей CD1 на 42 день

	Химизм	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Альбумин (г/дл)	Креатинин (мг/дл)	АМК (мг/дл)
PBS	-	71	77	2,7	0,2	29
PBS	-	30	36	2,7	0,2	26
ISIS 588834	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	436	510	2,8	0,2	25
ISIS 588835	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	70	98	3,0	0,2	27
ISIS 588836	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	442	312	2,7	0,2	27
ISIS 588846	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	50	75	2,5	0,1	28
ISIS 588847	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	44	71	2,6	0,1	24
ISIS 588848	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	47	70	2,4	0,1	27
ISIS 588857	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	1287	655	2,7	0,2	26
ISIS 588858	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	1169	676	2,5	0,2	26
ISIS 588859	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	1036	1300	3,2	0,2	25
ISIS 588861	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	749	466	3,1	0,1	24
ISIS 588862	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	1564	1283	2,9	0,2	22
ISIS 588863	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	477	362	2,8	0,1	23
ISIS 588864	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	118	165	2,9	0,2	27
ISIS 588866	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	843	784	3,2	0,2	25
ISIS 594430	3-10-3 (S)-cEt	89	99	2,4	0,1	28
ISIS 594431	3-10-3 (S)-cEt	590	433	3,0	0,2	24
ISIS 594432	3-10-3 (S)-cEt	2595	2865	2,4	0,1	25

Масса.

На 39 день измерили массу тела мышей. После усыпления мышей на 42 день измерили также массу органов, печени, почек и селезенки. Результаты представлены ниже в таблице. Олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали изменения массы за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали в дальнейших исследованиях.

Таблица 168

Масса (г) мышей CD1

	Химизм	Тело	Почки	Печень	Селезенка
PBS	-	37	0,6	2,1	0,1
PBS	-	45	0,7	2,5	0,2
ISIS 588834	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	40	0,6	3,2	0,2
ISIS 588835	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	38	0,7	2,8	0,3
ISIS 588836	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	41	0,7	2,3	0,2
ISIS	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	38	0,6	2,4	0,3

588837	cEt				
ISIS 588846	Дезокси, МОЕ и (S)- cEt	39	0,6	2,3	0,2
ISIS 588847	Дезокси, МОЕ и (S)- cEt	40	0,7	2,5	0,2
ISIS 588848	Дезокси, МОЕ и (S)- cEt	43	0,7	2,6	0,3
ISIS 588857	Дезокси, МОЕ и (S)- cEt	39	0,6	3,3	0,2
ISIS 588858	Дезокси, МОЕ и (S)- cEt	37	0,6	3,4	0,2
ISIS 588859	Дезокси, МОЕ и (S)- cEt	41	0,7	2,5	0,3
ISIS 588861	Дезокси, МОЕ и (S)- cEt	39	0,6	2,6	0,4
ISIS 588862	Дезокси, МОЕ и (S)- cEt	34	0,6	2,5	0,4
ISIS 588863	Дезокси, МОЕ и (S)- cEt	40	0,6	2,7	0,3
ISIS 588864	Дезокси, МОЕ и (S)- cEt	40	0,7	2,3	0,2
ISIS 588866	Дезокси, МОЕ и (S)- cEt	45	0,7	3,0	0,2
ISIS 594430	3-10-3 (S)-cEt	39	0,6	2,2	0,2
ISIS 594431	3-10-3 (S)-cEt	36	0,6	3,2	0,2
ISIS 594432	3-10-3 (S)-cEt	31	0,4	1,9	0,1

Испытание 5 (с МОЕ гэнмерами, (S)-cEt гэнмерами и дезокси, МОЕ и (S)-cEt олигонуклеотидами).

Группам восьми-девятидневных самцов мышей CD1 один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции 50 мг/кг олигонуклеотида ISIS. Двум группам самцов мышей CD1 один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции PBS. Мышей усыпляли через 48 ч после введения последней дозы и собирали органы и плазму для дальнейших анализов.

Химические маркеры в плазме.

Для оценки влияния олигонуклеотидов ISIS на функцию печени и почек измеряли уровни трансаминаз, альбумина, креатинина и АМК в плазме с помощью автоматизированного клинического анализатора химического состава (Hitachi Olympus AU400e, Мелвилл, штат Нью-Йорк). Результаты представлены ниже в таблице. Олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали изменения уровней любых маркеров функции печени или почек за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали для дальнейших исследований.

Таблица 169

Химические маркеры в плазме мышей CD1 на 42 день

	Химизм	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Альбумин (г/дл)	Креатинин (мг/дл)	АМК (мг/дл)
PBS	-	33	84	2,9	0,2	28
PBS	-	32	65	2,5	0,1	27
ISIS 532692	5-10-5 MOE	363	281	3,0	0,2	30
ISIS 532770	5-10-5 MOE	69	100	2,9	0,1	28
ISIS 532775	5-10-5 MOE	371	333	2,6	0,1	29
ISIS 532800	5-10-5 MOE	104	106	2,7	0,1	31
ISIS 532809	5-10-5 MOE	69	127	2,8	0,1	26
ISIS 588540	5-10-5 MOE	66	110	2,8	0,1	26
ISIS 588838	3-10-3 (S)-cEt	391	330	2,9	0,1	25
ISIS 588842	Дезокси, MOE и (S)-cEt	224	264	2,6	0,1	26
ISIS 588843	3-10-3 (S)-cEt	185	160	2,8	0,1	24
ISIS 588844	Дезокси, MOE и (S)-cEt	304	204	2,7	0,1	25
ISIS 588851	Дезокси, MOE и (S)-cEt	186	123	2,7	0,1	31
ISIS 588854	Дезокси, MOE и (S)-cEt	1232	925	2,7	0,1	25
ISIS 588855	Дезокси, MOE и (S)-cEt	425	321	2,7	0,1	28
ISIS 588856	Дезокси, MOE и (S)-cEt	78	101	2,4	0,1	31
ISIS 588865	Дезокси, MOE и (S)-cEt	126	145	2,5	0,1	23
ISIS 588867	Дезокси, MOE и (S)-cEt	108	112	2,5	0,1	32
ISIS 588868	Дезокси, MOE и (S)-cEt	61	124	2,5	0,1	28
ISIS 588870	Дезокси, MOE и (S)-cEt	48	69	2,4	0,1	31
ISIS 588871	Дезокси, MOE и (S)-cEt	723	881	2,5	0,1	24
ISIS 588872	Дезокси, MOE и (S)-cEt	649	654	2,7	0,1	26

Масса.

На 40 день измерили массу тела мышей. После усыпления мышей на 42 день измерили также массу органов, печени, почек и селезенки. Результаты представлены ниже в таблице. Олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали изменения массы за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали в дальнейших исследованиях.

Таблица 170

Масса (г) мышей CD1

	Химизм	Тело	Почки	Печень	Селезенка
PBS	-	46	0,7	2,3	0,2
PBS	-	44	0,7	2,3	0,2
ISIS 532692	5-10-5 MOE	44	0,6	2,8	0,2
ISIS 532770	5-10-5 MOE	43	0,6	2,2	0,2
ISIS 532775	5-10-5 MOE	43	0,6	2,8	0,2

ISIS 532800	5-10-5 MOE	47	0,7	2,9	0,2
ISIS 532809	5-10-5 MOE	44	0,7	2,6	0,2
ISIS 588540	5-10-5 MOE	44	0,7	2,5	0,2
ISIS 588838	3-10-3 (S)-cEt	45	0,7	3,1	0,2
ISIS 588842	Дезокси, MOE и (S)-cEt	41	0,6	2,6	0,2
ISIS 588843	3-10-3 (S)-cEt	43	0,7	2,9	0,2
ISIS 588844	Дезокси, MOE и (S)-cEt	43	0,7	2,8	0,2
ISIS 588851	Дезокси, MOE и (S)-cEt	46	0,6	2,6	0,2
ISIS 588854	Дезокси, MOE и (S)-cEt	45	0,7	4,1	0,2
ISIS 588855	Дезокси, MOE и (S)-cEt	44	0,7	2,9	0,3
ISIS 588856	Дезокси, MOE и (S)-cEt	44	0,7	3,2	0,2
ISIS 588865	Дезокси, MOE и (S)-cEt	45	0,7	2,6	0,3
ISIS 588867	Дезокси, MOE и (S)-cEt	46	0,7	3,2	0,3
ISIS 588868	Дезокси, MOE и (S)-cEt	42	0,7	2,9	0,3
ISIS 588870	Дезокси, MOE и (S)-cEt	43	0,6	2,2	0,2
ISIS 588871	Дезокси, MOE и (S)-cEt	41	0,7	3,1	0,2
ISIS 588872	Дезокси, MOE и (S)-cEt	39	0,6	3,2	0,3

Испытание 6 (с дезокси, MOE и (S)-cEt олигонуклеотидами).

Группам восьми-девятидневных самцов мышей CD1 один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции 50 мг/кг дезокси, MOE и (S)-cEt олигонуклеотидов. Двум группам самцов мышей CD1 один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции PBS. Мышей усыпляли через 48 ч после введения последней дозы и собирали органы и плазму для дальнейших анализов.

Химические маркеры в плазме.

Для оценки влияния олигонуклеотидов ISIS на функцию печени и почек измеряли уровни трансаминаз, альбумина, креатинина, билирубина и АМК в плазме, используя автоматический клинический анализатор химического состава (Hitachi Olympus AU400e, Мелвилл, штат Нью-Йорк). Результаты представлены ниже в таблице. Олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали изменения уровней любых маркеров функции печени или почек за пределами ожидаемого диапазона для бессмысленных олигонуклеотидов, не использовали для дальнейших исследований.

Таблица 171

Химические маркеры в плазме мышей CD1 на 45 день

	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Альбумин (г/дл)	Креатинин (мг/дл)	Билирубин (мг/дл)	АМК (мг/дл)
PBS	39	78	3,4	0,2	0,2	31
PBS	37	59	2,9	0,1	0,2	27
ISIS 599552	167	208	3,0	0,1	0,2	32
ISIS 599553	43	86	2,9	0,1	0,2	28
ISIS 599554	57	101	2,2	0,2	0,2	31
ISIS 599569	469	530	3,5	0,2	0,3	27
ISIS 599577	37	84	2,9	0,1	0,1	31
ISIS 599578	45	104	2,8	0,1	0,2	30
ISIS 599581	54	88	3,1	0,1	0,2	31
ISIS 599590	1741	1466	3,1	0,1	0,3	25
ISIS 599591	2230	1183	3,2	0,1	0,3	27
ISIS 601209	68	104	2,9	0,1	0,2	30
ISIS 601212	1795	968	3,2	0,1	0,3	22
ISIS 601215	424	385	3,1	0,1	0,4	25
ISIS 601216	90	125	2,9	0,1	0,2	29
ISIS 601276	946	366	2,9	0,1	0,5	31
ISIS 601282	831	540	3,3	0,2	0,2	32

Масса.

На 40 день измерили массу тела мышей. После усыпления мышей на 45 день измерили также массу органов, печени, почек и селезенки. Результаты представлены ниже в таблице. Олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали изменения массы за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали в дальнейших исследованиях.

Таблица 172

Масса (г) мышей CD1

	Тело	Почки	Печень	Селезенка
PBS	40	0,7	2,1	0,2
PBS	42	0,8	2,3	0,2
ISIS 599552	38	0,6	2,3	0,2
ISIS 599553	39	0,7	2,2	0,2
ISIS 599554	39	0,7	2,4	0,2
ISIS 599569	39	0,7	2,2	0,2
ISIS 599577	41	0,7	2,5	0,2
ISIS 599578	37	0,6	2,0	0,2
ISIS 599581	40	0,6	2,5	0,2
ISIS 599590	34	0,6	3,5	0,2
ISIS 599591	38	0,8	2,7	0,2
ISIS 601209	42	0,7	2,6	0,3
ISIS 601212	38	0,6	2,9	0,2
ISIS 601215	36	0,7	2,6	0,2
ISIS 601216	42	0,6	2,7	0,2
ISIS 601276	42	0,7	3,2	0,2
ISIS 601282	38	0,7	3,2	0,2

Испытание 7 (с MOE гэмперами и дезокси, MOE и (S)-cEt олигонуклеотидами)

Группами восьми-девятидневных самцов мышей CD1 один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции 100 мг/кг олигонуклеотидов ISIS. Одной группе самцов мышей CD1 один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции PBS. Мышей усыпляли через 48 ч после введения последней дозы и собирали органы и плазму для дальнейших анализов.

Химические маркеры в плазме.

Для оценки влияния олигонуклеотидов ISIS на функцию печени и почек измеряли уровни трансаминаз, альбумина, креатинина и АМК в плазме с помощью автоматизированного клинического анализа.

тора химического состава (Hitachi Olympus AU400e, Мелвилл, штат Нью-Йорк). Результаты представлены ниже в таблице. Олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали изменения уровней любых маркеров функции печени или почек за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали для дальнейших исследований.

Таблица 173

Химические маркеры в плазме мышей CD1 на 45 день

	Химизм	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Альбумин (г/дл)	Креатинин (мг/дл)	АМК (мг/дл)
PBS	-	120	102	2,7	0,2	26
ISIS 588842	Дезокси, MOE и (S)-cEt	177	164	2,7	0,1	23
ISIS 588843	Дезокси, MOE и (S)-cEt	98	194	2,7	0,1	24
ISIS 588851	Дезокси, MOE и (S)-cEt	91	142	2,6	0,1	23
ISIS 588856	Дезокси, MOE и (S)-cEt	78	110	2,7	0,1	23
ISIS 599024	3-10-4 MOE	91	108	2,7	0,1	23
ISIS 599087	5-7-5 MOE	198	183	2,6	0,2	28
ISIS 599093	5-7-5 MOE	3285	2518	2,6	0,2	24
ISIS 599149	4-8-5 MOE	30	64	2,9	0,2	25
ISIS 599155	4-8-5 MOE	145	189	2,6	0,2	25
ISIS 599202	5-8-5 MOE	150	128	2,8	0,2	23
ISIS 599203	5-8-5 MOE	111	127	2,8	0,2	24
ISIS 599208	5-8-5 MOE	146	178	2,9	0,2	22
ISIS 599261	3-10-5 MOE	144	165	2,8	0,2	26
ISIS 599267	3-10-5 MOE	96	132	2,6	0,2	27
ISIS 599268	3-10-5 MOE	87	115	2,6	0,1	23
ISIS 599322	6-7-6 MOE	115	138	2,7	0,1	22
ISIS 599374	5-9-5 MOE	375	271	2,6	0,1	21
ISIS 599378	5-9-5 MOE	77	99	2,7	0,1	23
ISIS 599441	6-8-6 MOE	150	250	2,9	0,1	23

Масса.

На 44 день измерили массу тела мышей. На 49 день, после усыпления мышей измерили также массу органов, печени, почек и селезенки. Результаты представлены ниже в таблице. Олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали изменения массы за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали в дальнейших исследованиях.

Таблица 174

Масса (г) мышей CD1

	Химизм	Тело	Почки	Печень	Селезенка
PBS	-	39	0,6	1,9	0,1
ISIS 588842	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	38	0,5	2,1	0,1
ISIS 588843	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	41	0,6	2,4	0,2
ISIS 588851	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	42	0,6	2,2	0,2
ISIS 588856	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	42	0,7	2,6	0,2
ISIS 599024	3-10-4 MOE	41	0,6	4,0	0,2
ISIS 599087	5-7-5 MOE	44	0,8	2,6	0,3
ISIS 599093	5-7-5 MOE	39	0,6	2,3	0,2
ISIS 599149	4-8-5 MOE	42	0,7	2,8	0,2
ISIS 599155	4-8-5 MOE	41	0,7	2,1	0,2
ISIS 599202	5-8-5 MOE	43	0,6	2,6	0,2
ISIS 599203	5-8-5 MOE	42	0,6	2,6	0,2
ISIS 599208	5-8-5 MOE	40	0,6	2,1	0,2
ISIS 599261	3-10-5 MOE	39	0,7	3,4	0,3
ISIS 599267	3-10-5 MOE	42	0,8	2,5	0,3
ISIS 599268	3-10-5 MOE	41	0,7	2,1	0,2
ISIS 599322	6-7-6 MOE	43	0,6	2,2	0,2
ISIS 599374	5-9-5 MOE	37	0,6	2,2	0,2
ISIS 599378	5-9-5 MOE	43	0,7	2,7	0,2
ISIS 599441	6-8-6 MOE	42	0,6	2,5	0,3

Испытания 8 (с MOE гэнмерами, дезокси, МОЕ и (S)-cEt олигонуклеотидами и (S)-cEt гэнмерами)

Группам восьми-девятидневных самцов мышей CD1 один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции 10 мг/кг MOE гэнмеров или 50 мг/кг дезокси и (S)-cEt олигонуклеотидов, или (S)-cEt гэнмеров. Одной группе самцов мышей CD1 один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции PBS. Мышей усыпляли через 48 ч после введения последней дозы и собирали органы и плазму для дальнейших анализов.

Химические маркеры в плазме.

Для оценки влияния олигонуклеотидов ISIS на функцию печени и почек измеряли уровни трансаминаз, альбумина, креатинина и АМК в плазме с помощью автоматизированного клинического анализатора химического состава (Hitachi Olympus AU400e, Мелвилл, штат Нью-Йорк). Результаты представлены ниже в таблице.

Таблица 175

Химические маркеры в плазме мышей CD1 на 43 день

	Химизм	Доза (мг/кг/неделю)	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Альбумин (г/дл)	Креатинин (мг/дл)	АМК (мг/дл)
PBS	-	-	37	57	2,5	0,08	26
ISIS 532770	5-10-5 MOE	100	57	73	2,5	0,07	24
ISIS 532800	5-10-5 MOE	100	74	126	2,8	0,10	26
ISIS 532809	5-10-5 MOE	100	83	73	2,5	0,07	23
ISIS 588540	5-10-5 MOE	100	106	102	2,7	0,09	27
ISIS 588544	5-10-5 MOE	100	66	62	2,6	0,10	24
ISIS 588548	5-10-5 MOE	100	48	67	2,6	0,08	23
ISIS 588550	5-10-5 MOE	100	65	106	2,5	0,10	25
ISIS 588553	5-10-5 MOE	100	78	90	2,6	0,09	25
ISIS 588555	5-10-5 MOE	100	94	89	2,5	0,08	23
ISIS 588848	Дезокси , MOE и (S)- cEt	50	38	54	2,3	0,07	25
ISIS 594430	3-10-3 (S)-cEt	50	63	72	2,5	0,10	27

Масса.

Массу тела мышей измеряли на 36 день. После усыпления мышей, на 43 день измеряли также массу органов, печени, почек и селезенки. Результаты измерений массы органов выражены как соотношение к массе тела и нормализованы к соотношению контрольной группы с PBS.

Таблица 176

Масса органов/масса тела (BW) мышей CD1

	Химизм	Доза (мг/кг/неделю)	Почки/BW	Печень/BW	Селезенка/BW
PBS	-	-	1,0	1,0	1,0
ISIS 532770	5-10-5 MOE	100	1,4	1,1	1,0
ISIS 532800	5-10-5 MOE	100	1,5	1,1	0,9
ISIS 532809	5-10-5 MOE	100	1,3	1,2	0,9
ISIS 588540	5-10-5 MOE	100	1,3	1,2	1,0
ISIS 588544	5-10-5 MOE	100	1,6	1,1	1,0
ISIS 588548	5-10-5 MOE	100	1,7	1,2	1,0
ISIS 588550	5-10-5 MOE	100	1,5	1,2	1,0
ISIS 588553	5-10-5 MOE	100	1,5	1,0	0,8

ISIS 588555	5-10-5 MOE	100	1,8	1,2	1,0
ISIS 588848	Дезокси, MOE и (S)-cEt	50	1,3	1,0	0,9
ISIS 594430	3-10-3 (S)-cEt	50	1,4	1,1	0,9

Анализ цитокинов.

Кровь, собранную во всех группах мышей, направили в компанию Antech Diagnostics для измерения уровней различных цитокинов, таких как IL-6, MDC, MIP1 β , IP-10, MCP1, MIP-1 α и RANTES. Результаты представлены в табл. 54.

Таблица 177

Уровни цитокинов (пг/мл) в плазме мышей CD1

	Химизм	IL-6	MDC	MIP1 β	IP-10	MCP1	MIP-1 α	RANTES
PBS	-	70	16	23	20	17	6	2
ISIS 532770	5-10-5 MOE	101	18	146	116	101	24	6
ISIS 532800	5-10-5 MOE	78	17	83	53	105	1	3
ISIS 532809	5-10-5 MOE	66	19	60	32	55	20	4
ISIS 588540	5-10-5 MOE	51	18	126	70	75	4	3
ISIS 588544	5-10-5 MOE	157	14	94	34	102	1	3
ISIS 588548	5-10-5 MOE	164	12	90	66	84	10	4
ISIS 588550	5-10-5 MOE	58	21	222	124	157	3	5
ISIS 588553	5-10-5 MOE	62	14	183	60	103	9	4
ISIS 588555	5-10-5 MOE	70	19	172	171	178	16	9
ISIS 588848	Дезокси, MOE и (S)- cEt	59	13	61	27	63	12	4
ISIS 594430	3-10-3 (S)- cEt	48	14	56	38	85	10	3

Гематологический анализ.

Кровь, собранную во всех группах мышей, направили в компанию Antech Diagnostics для измерения гематокрита (HCT), а также различных кровяных клеток, таких как белые кровяные тельца, красные кровяные тельца и тромбоциты, а также общего содержания гемоглобина (Hb). Результаты представлены в табл. 55.

Таблица 178

Гематологические маркеры в плазме мышей CD1

	Химизм	НСТ (%)	Нб (г/дл)	Белые кровяные тельца (10 ³ /мкл)	Красные кровяные тельца (10 ⁶ /мкл)	Тромбоциты (10 ³ /мкл)
PBS	-	46	15	7	9	960
ISIS 532770	5-10-5 MOE	45	14	5	9	879
ISIS 532800	5-10-5 MOE	45	14	5	9	690
ISIS 532809	5-10-5 MOE	46	14	6	9	1005
ISIS 588540	5-10-5 MOE	49	15	6	10	790
ISIS 588544	5-10-5 MOE	36	11	7	7	899
ISIS 588548	5-10-5 MOE	46	14	6	9	883
ISIS 588550	5-10-5 MOE	42	13	8	8	721
ISIS 588553	5-10-5 MOE	45	14	6	9	719
ISIS 588555	5-10-5 MOE	43	13	8	9	838
ISIS 588848	Дезокси, MOE и (S)-cEt	40	15	8	10	840
ISIS 594430	3-10-3 (S)-cEt	45	14	8	9	993

Пример 127. Переносимость антисмысловых олигонуклеотидов, направленных на человеческий CFB, у крыс Спрага-Дуоли.

Крысы Спрага-Дуоли представляют собой многоцелевую модель, используемую для оценки безопасности и эффективности. Крыс лечили антисмысловыми олигонуклеотидами ISIS из исследований, описанных выше в примерах, и оценивали на изменения уровней различных химических маркеров в крови.

Испытание 1 (с 5-10-5 MOE гэмперами).

Самцов крыс Спрага-Дуоли возрастом от семи до восьми недель выдерживали при 12-часовом цикле освещения/темноты и обеспечивали свободный доступ к нормальному корму для крыс Purina, рацион 5001. Группам по 4 крысы Спрага-Дуоли один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции 100 мг/кг 5-10-5 MOE гэмперов. Одной контрольной группе из 6 крыс один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции PBS. Через 48 ч после введения последней дозы крыс усыпили и собрали органы и плазму для дальнейших анализов.

Функция печени.

Для оценки влияния олигонуклеотидов ISIS на функцию печени измеряли уровни трансаминаз в плазме с помощью автоматизированного клинического анализатора химического состава (Hitachi Olympus AU400e, Мелвилл, штат Нью-Йорк). Измерили уровни ALT (аланин-трансаминазы) и AST (аспартат-трансаминазы) и представили результаты в следующей таблице, выраженные в МЕ/л. Олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали в печени изменения любых маркеров функции печени за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали в дальнейших исследованиях.

Таблица 179
Маркеры функции печени у крыс Спрага-Дуули

	ALT (ед./л)	AST (ед./л)
PBS	66	134
ISIS 588544	101	329
ISIS 588550	69	157
ISIS 588553	88	304
ISIS 588554	202	243
ISIS 588555	94	113
ISIS 588556	102	117
ISIS 588560	206	317
ISIS 588564	292	594

Функция почек.

Для оценки влияния олигонуклеотидов ISIS на функцию почек измеряли уровни азота мочевины крови (АМК) и креатинина с помощью автоматизированного клинического анализатора химического состава (Hitachi Olympus AU400e, Мелвилл, штат Нью-Йорк). Результаты, выраженные в мг/дл, представлены в следующей таблице. Олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали изменения уровней любых маркеров функции почек за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали в дальнейших исследованиях.

Таблица 180
Маркеры функции печени (мг/дл) у крыс Спрага-Дуули

	АМК	Креатинин
PBS	18	3,5
ISIS 588544	21	3,1
ISIS 588550	21	3,0
ISIS 588553	22	2,8
ISIS 588554	23	3,0
ISIS 588555	22	3,5
ISIS 588556	21	3,2
ISIS 588560	26	2,4
ISIS 588564	24	2,7

Масса.

На 39 день измеряли массу тела. Массу печени, сердца, селезенки и почек измеряли по окончании исследования на 42 день, и результаты представлены в следующей таблице. Олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали изменения массы органов за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали в дальнейших исследованиях.

Таблица 181

Масса (г)

	Тело	Печень	Селезенка	Почки
PBS	422	16	1,2	3,9
ISIS 588544	353	15	1,7	2,9
ISIS 588550	321	14	2,1	3,2
ISIS 588553	313	15	2,3	3,2
ISIS 588554	265	11	1,6	2,7
ISIS 588555	345	14	1,4	3,3
ISIS 588556	328	13	1,7	3,1
ISIS 588560	270	13	2,4	3,0
ISIS 588564	253	12	2,9	3,0

Испытание 2 (с дезокси, МОЕ и (S)-сEt олигонуклеотидами).

Самцов крыс Спрага-Дули возрастом от девяти до десяти недель выдерживали при 12-часовом цикле освещения/темноты и обеспечивали свободный доступ к нормальному корму для крыс Purina, рацион 5001. Группам по 4 крысы Спрага-Дули один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции 100 мг/кг дезокси, МОЕ и (S)-сEt олигонуклеотидов. Двум контрольным группам по 3 крысы один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции PBS. Через 48 ч после введения последней дозы крыс усыпили и собрали органы и плазму для дальнейших анализов.

Функция печени.

Для оценки влияния олигонуклеотидов ISIS на функцию печени измеряли уровни трансаминаз в плазме на 42 день, используя автоматизированный клинический анализатор химического состава (Hitachi Olympus AU400e, Мелвилл, штат Нью-Йорк). Измерили уровни ALT (аланинтрансаминазы) и AST (аспартаттрансаминазы), и альбумина в сыворотке, и результаты представлены ниже в таблице. Олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали в печени изменения любых маркеров функции печени за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали в дальнейших исследованиях.

Таблица 182
Маркеры функции печени у крыс Спрага-Дули

	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Альбумин (г/дл)
PBS	55	150	3,4
PBS	64	91	3,5
ISIS 588554	52	92	3,2
ISIS 588835	971	844	4,1
ISIS 588842	317	359	3,8
ISIS 588843	327	753	2,9
ISIS 588846	70	111	3,2
ISIS 588847	65	100	3,0
ISIS 588864	91	109	3,0
ISIS 594430	85	106	3,7

Функция почек.

Для оценки влияния олигонуклеотидов ISIS на функцию почек измеряли уровни азота мочевины крови (АМК) и креатинина с помощью автоматизированного клинического анализатора химического состава (Hitachi Olympus AU400e, Мелвилл, штат Нью-Йорк). Результаты, выраженные в мг/дл, представлены в следующей таблице. Олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали изменения уровней любых маркеров функции почек за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали в дальнейших исследованиях.

Таблица 183
Маркеры функции печени (мг/дл) у крыс Спрага-Дули

	АМК	Креатинин
PBS	17	0,4
PBS	21	0,4
ISIS 588554	20	0,4
ISIS 588835	23	0,5
ISIS 588842	22	0,4
ISIS 588843	51	0,4
ISIS 588846	25	0,5
ISIS 588847	23	0,5
ISIS 588864	23	0,4
ISIS 594430	22	0,5

Масса.

На 39 день измеряли массу тела. Массу печени, сердца, селезенки и почек измеряли по окончании исследования на 42 день, и результаты представлены в следующей таблице. Олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали изменения массы органов за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали в дальнейших исследованиях.

Таблица 184

Масса (г)				
	Тело	Печень	Селезенка	Почки
PBS	466	16	0,9	3,8
PBS	485	16	0,9	3,6
ISIS 588554	393	15	2,3	2,6
ISIS 588835	387	16	1,0	3,3
ISIS 588842	414	22	1,5	3,7
ISIS 588843	427	20	2,5	4,2
ISIS 588846	366	16	2,1	3,3
ISIS 588847	402	15	1,6	3,1
ISIS 588864	364	15	2,1	3,8
ISIS 594430	420	16	1,2	3,6

Испытание 3 (с МОЕ гэмперами).

Самцов крыс Спрага-Дули возрастом от девяти до десяти недель выдерживали при 12-часовом цикле освещения/темноты и обеспечивали свободный доступ к нормальному корму для крыс Purina, рацион 5001. Группам по 4 крысы Спрага-Дули один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции 100 мг/кг МОЕ гэмперов. Одной контрольной группе из 6 крыс один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции PBS. Через 48 ч после введения последней дозы крыс усыпили и собрали органы и плазму для дальнейших анализов.

Функция печени.

Для оценки влияния олигонуклеотидов ISIS на функцию печени измеряли уровни трансаминаз в плазме на 43 день, используя автоматизированный клинический анализатор химического состава (Hitachi Olympus AU400e, Мелвилл, штат Нью-Йорк). Измерили уровни ALT (аланин-трансаминазы) и AST (аспартат-трансаминазы) и представили результаты в следующей таблице, выраженные в МЕ/л. Олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали в печени изменения любых маркеров функции печени за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали в дальнейших исследованиях.

Таблица 185

Маркеры функции печени у крыс Спрага-Дули

	Химизм	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Альбумин (г/дл)
PBS	-	52	110	3,7
ISIS 588563	5-10-5 МОЕ	175	291	2,9
ISIS 599024	3-10-4 МОЕ	139	173	1,4
ISIS 599093	5-7-5 МОЕ	116	238	2,6
ISIS 599149	4-8-5 МОЕ	232	190	3,4
ISIS 599155	4-8-5 МОЕ	108	215	2,5

ISIS 599202	5-8-5 MOE	65	86	3,5
ISIS 599203	5-8-5 MOE	71	97	3,1
ISIS 599208	5-8-5 MOE	257	467	1,9
ISIS 599261	3-10-5 MOE	387	475	1,5
ISIS 599267	3-10-5 MOE	201	337	2,7

Функция почек.

Для оценки влияния олигонуклеотидов ISIS на функцию почек измеряли уровни азота мочевины крови (АМК) и креатинина с помощью автоматизированного клинического анализатора химического состава (Hitachi Olympus AU400e, Мелвилл, штат Нью-Йорк). Результаты, выраженные в мг/дл, представлены в следующей таблице. Олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали изменения уровней любых маркеров функции почек за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали в дальнейших исследованиях.

Таблица 186
Маркеры функции печени (мг/дл) у крыс Спрага-Дули

	Химизм	АМК	Креатинин
PBS	-	16	0,3
ISIS 588563	5-10-5 MOE	26	0,4
ISIS 599024	3-10-4 MOE	135	1,2
ISIS 599093	5-7-5 MOE	29	0,4
ISIS 599149	4-8-5 MOE	23	0,4
ISIS 599155	4-8-5 MOE	29	0,4
ISIS 599202	5-8-5 MOE	19	0,4
ISIS 599203	5-8-5 MOE	22	0,4
ISIS 599208	5-8-5 MOE	26	0,3
ISIS 599261	3-10-5 MOE	228	1,6
ISIS 599267	3-10-5 MOE	24	0,4

Масса.

На 39 день измеряли массу тела. Массу печени, сердца, селезенки и почек измеряли по окончании исследования на 42 день, и результаты представлены в следующей таблице. Олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали изменения массы органов за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали в дальнейших исследованиях.

Таблица 187

Масса (г)					
	Химизм	Тело	Печень	Селезенка	Почки
PBS	-	471	16	1,0	4,1
ISIS 588563	5-10-5 MOE	311	16	3,4	4,1
ISIS 599024	3-10-4 MOE	297	11	1,0	3,5
ISIS 599093	5-7-5 MOE	332	18	4,1	5,0
ISIS 599149	4-8-5 MOE	388	16	2,3	3,7
ISIS 599155	4-8-5 MOE	290	15	2,9	4,5
ISIS 599202	5-8-5 MOE	359	13	1,3	3,2
ISIS 599203	5-8-5 MOE	334	14	1,8	3,3
ISIS 599208	5-8-5 MOE	353	29	4,7	4,6
ISIS 599261	3-10-5 MOE	277	10	0,9	3,2
ISIS 599267	3-10-5 MOE	344	21	3,9	4,7

Испытание 4 (с MOE гэмперами).

Самцов крыс Спрага-Дуули возрастом от девяти до десяти недель выдерживали при 12-часовом цикле освещения/темноты и обеспечивали свободный доступ к нормальному корму для крыс Purina, рацион 5001. Группам по 4 крысы Спрага-Дуули один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции 100 мг/кг MOE гэмперов. Одной контрольной группе из 6 крыс один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции PBS. Через 48 ч после введения последней дозы крыс усыпили и собрали органы и плазму для дальнейших анализов.

Функция печени.

Для оценки влияния олигонуклеотидов ISIS на функцию печени измеряли уровни трансаминаз в плазме на 42 день, используя автоматизированный клинический анализатор химического состава (Hitachi Olympus AU400e, Мелвилл, штат Нью-Йорк). Измерили уровни ALT (аланинтрансаминазы) и AST (аспартаттрансаминазы) и представили результаты в следующей таблице, выраженные в МЕ/л. Олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали в печени изменения любых маркеров функции печени за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали в дальнейших исследованиях.

Таблица 188

Маркеры функции печени у крыс Спрага-Дуули

	Химизм	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Альбумин (г/дл)
PBS	-	48	77	3,9
ISIS 532800	5-10-5 MOE	72	111	3,4
ISIS 532809	5-10-5 MOE	59	89	3,8
ISIS 588540	5-10-5 MOE	146	259	3,8
ISIS 599268	3-10-5 MOE	175	206	2,7
ISIS 599322	6-7-6 MOE	523	567	3,3
ISIS 599374	5-9-5 MOE	114	176	3,0
ISIS 599378	5-9-5 MOE	124	116	3,2
ISIS 599380	5-9-5 MOE	148	210	3,4
ISIS 599441	6-8-6 MOE	51	91	2,6

Функция почек.

Для оценки влияния олигонуклеотидов ISIS на функцию почек измеряли уровни азота мочевины крови (АМК) и креатинина с помощью автоматизированного клинического анализатора химического состава (Hitachi Olympus AU400e, Мелвилл, штат Нью-Йорк). Результаты, выраженные в мг/дл, представлены в следующей таблице. Олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали изменения уровней любых маркеров функции почек за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали в дальнейших исследованиях.

Таблица 189

Маркеры функции печени (мг/дл) у крыс Спрага-Дуули

	Химизм	АМК	Креатинин
PBS	-	15	0,4
ISIS 532800	5-10-5 MOE	26	0,5
ISIS 532809	5-10-5 MOE	18	0,5
ISIS 588540	5-10-5 MOE	22	0,5
ISIS 599268	3-10-5 MOE	28	0,5
ISIS 599322	6-7-6 MOE	24	0,5
ISIS 599374	5-9-5 MOE	29	0,5
ISIS 599378	5-9-5 MOE	22	0,4
ISIS 599380	5-9-5 MOE	26	0,5
ISIS 599441	6-8-6 MOE	24	0,4

Масса.

На 39 день измеряли массу тела. Массу печени, сердца, селезенки и почек измеряли по окончании исследования на 42 день, и результаты представлены в следующей таблице. Олигонуклеотиды ISIS, ко-

торые вызывали изменения массы органов за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали в дальнейших исследованиях.

Таблица 190

Масса (г)					
	Химизм	Тело	Печень	Селезенка	Почки
PBS	-	502	16	0,9	3,7
ISIS 532800	5-10-5 MOE	376	16	2,0	3,4
ISIS 532809	5-10-5 MOE	430	16	1,4	3,4
ISIS 588540	5-10-5 MOE	391	16	1,8	3,5
ISIS 599268	3-10-5 MOE	332	16	3,6	3,6
ISIS 599322	6-7-6 MOE	348	13	2,1	3,4
ISIS 599374	5-9-5 MOE	302	12	2,0	3,3
ISIS 599378	5-9-5 MOE	332	11	1,1	2,8
ISIS 599380	5-9-5 MOE	350	11	1,5	3,3
ISIS 599441	6-8-6 MOE	368	16	2,5	3,3

Испытание 5 (с MOE гэлперами и дезокси, MOE и (S)-cEt олигонуклеотидами).

Самцов крыс Спрага-Дуули возрастом от девяти до десяти недель выдерживали при 12-часовом цикле освещения/темноты и обеспечивали свободный доступ к нормальному корму для крыс Purina, рацион 5001. Группам по 4 крысы Спрага-Дуули один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции 100 мг/кг MOE гэлпера или 50 мг/кг дезокси, MOE и (S)-cEt олигонуклеотидов. Одной контрольной группе из 4 крыс один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции PBS. Через 48 ч после введения последней дозы крыс усыпили и собрали органы и плазму для дальнейших анализов.

Функция печени.

Для оценки влияния олигонуклеотидов ISIS на функцию печени измеряли уровни трансаминаз в плазме на 42 день, используя автоматизированный клинический анализатор химического состава (Hitachi Olympus AU400e, Мелвилл, штат Нью-Йорк). Измерили уровни ALT (аланин-трансаминазы) и AST (аспартат-трансаминазы) и представили результаты в следующей таблице, выраженные в МЕ/л. Олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали в печени изменения любых маркеров функции печени за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали в дальнейших исследованиях.

Таблица 191

Маркеры функции печени у крыс Спрага-Дуули

	Химизм	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Альбумин (г/дл)
PBS	-	49	74	3,3
ISIS 532770	5-10-5 MOE	95	132	3,3
ISIS 588851	Дезокси, MOE и (S)- cEt	47	72	3,1
ISIS 588856	Дезокси, MOE и (S)- cEt	56	75	3,0
ISIS 588865	Дезокси, MOE и (S)- cEt	62	84	2,9
ISIS 588867	Дезокси, MOE и (S)- cEt	73	214	2,9
ISIS 588868	Дезокси, MOE и (S)- cEt	59	83	3,1
ISIS 588870	Дезокси, MOE и (S)- cEt	144	144	3,4

Функция почек.

Для оценки влияния олигонуклеотидов ISIS на функцию почек измеряли уровни азота мочевины крови (АМК) и креатинина в плазме и моче при помощи автоматизированного клинического анализатора химического состава (Hitachi Olympus AU400e, Мелвилл, штат Нью-Йорк). Результаты, выраженные в мг/дл, представлены ниже в таблицах. Олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали изменения уровней любых маркеров функции почек за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали в дальнейших исследованиях.

Таблица 192

Маркеры функции почек (мг/дл) в плазме крыс Спрага-Дуули

	Химизм	АМК	Креатинин
PBS	-	18	0,3
ISIS 532770	5-10-5 MOE	20	0,4
ISIS 588851	Дезокси, MOE и (S)-cEt	20	0,4
ISIS 588856	Дезокси, MOE и (S)-cEt	22	0,4
ISIS 588865	Дезокси, MOE и (S)-cEt	24	0,5
ISIS 588867	Дезокси, MOE и (S)-cEt	22	0,4
ISIS 588868	Дезокси, MOE и (S)-cEt	19	0,4
ISIS 588870	Дезокси, MOE и (S)-cEt	20	0,5

Таблица 193

Маркеры функции почек (мг/дл) в моче крыс Спрага-Дуули

	Химизм	Общий белок	Креатинин
PBS	-	80	92
ISIS 532770	5-10-5 MOE	466	69
ISIS 588851	Дезокси, MOE и (S)-cEt	273	64
ISIS	Дезокси, MOE и (S)-cEt	259	68

588856			
ISIS 588865	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	277	67
ISIS 588867	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	337	68
ISIS 588868	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	326	75
ISIS 588870	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	388	82

Масса.

На 39 день измеряли массу тела. Массу печени, сердца, селезенки и почек измеряли по окончании исследования на 42 день, и результаты представлены в следующей таблице. Олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали изменения массы органов за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали в дальнейших исследованиях.

Таблица 194

Масса (г)					
	Химизм	Тело	Печень	Селезенка	Почки
PBS	-	489	16	0,9	3,5
ISIS 532770	5-10-5 МОЕ	372	15	1,7	3,1
ISIS 588851	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	285	14	1,4	3,2
ISIS 588856	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	415	15	1,1	3,3
ISIS 588865	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	362	14	2,0	3,3
ISIS 588867	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	406	15	2,4	3,4
ISIS 588868	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	399	15	1,5	3,4
ISIS 588870	Дезокси, МОЕ и (S)-cEt	446	14	1,4	3,3

Испытание 6 (с МОЕ гэнперами, дезокси, МОЕ и (S)-cEt олигонуклеотидами и (S)-cEt гэнперами)

Самцов крыс выдерживали при 12-часовом цикле освещения/темноты и обеспечивали свободный доступ к нормальному корму для крыс Purina, рацион 5001. Группам по 4 крысы Спрага-Дули один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции 100 мг/кг МОЕ гэнперов или 50 мг/кг дезокси, МОЕ и (S)-cEt олигонуклеотида, или (S)-cEt гэнпера. Одной контрольной группе из 4 крыс один раз в неделю в течение 6 недель вводили подкожные инъекции PBS. Через 48 ч после введения последней дозы крыс усыпили и собрали органы и плазму для дальнейших анализов.

Функция печени.

Для оценки влияния олигонуклеотидов ISIS на функцию печени измеряли уровни трансаминаз в плазме на 42 день, используя автоматизированный клинический анализатор химического состава (Hitachi Olympus AU400e, Мелвилл, штат Нью-Йорк). Измерили уровни ALT (аланин-трансаминазы) и AST (аспартат-трансаминазы) и представили результаты в следующей таблице, выраженные в МЕ/л.

Таблица 195

Маркеры функции печени					
	Химизм	Доза (мг/кг/неделю)	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Альбумин (г/дл)
PBS	-	-	54	73	4,3
ISIS 532770	5-10-5 MOE	100	57	114	4,4
ISIS 532800	5-10-5 MOE	100	176	180	4,3
ISIS 532809	5-10-5 MOE	100	71	132	4,1
ISIS 588540	5-10-5 MOE	100	89	202	4,4
ISIS 588544	5-10-5 MOE	100	75	152	3,9
ISIS 588548	5-10-5 MOE	100	50	71	4,1
ISIS 588550	5-10-5 MOE	100	80	133	3,6
ISIS 588553	5-10-5 MOE	100	59	112	3,9
ISIS 588555	5-10-5 MOE	100	97	142	3,8
ISIS 588848	Дезокси, MOE и	50	53	82	3,9
	(S)-cEt				
ISIS 594430	3-10-3 (S)-cEt	50	198	172	4,4

Функция почек.

Для оценки влияния олигонуклеотидов ISIS на функцию почек измеряли уровни общего белка и креатинина в моче, используя автоматизированный клинический анализатор химического состава (Hitachi Olympus AU400e, Мелвилл, штат Нью-Йорк). Результаты представлены ниже в таблице. Олигонуклеотиды ISIS, которые вызывали изменения уровней любых маркеров функции почек за пределами ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов, не использовали в дальнейших исследованиях.

Таблица 196

Соотношение общего белка/креатинина в моче крыс

	Химизм	Доза (мг/кг/неделю)	Соотношение Р/С
PBS	-	-	1,1
ISIS 532770	5-10-5 MOE	100	8,3
ISIS 532800	5-10-5 MOE	100	6,5
ISIS 532809	5-10-5 MOE	100	6,1
ISIS 588540	5-10-5 MOE	100	10,1
ISIS 588544	5-10-5 MOE	100	7,9
ISIS 588548	5-10-5 MOE	100	6,6
ISIS 588550	5-10-5 MOE	100	7,6
ISIS 588553	5-10-5 MOE	100	7,0
ISIS 588555	5-10-5 MOE	100	6,2
ISIS 588848	Дезокси, MOE и (S)- cEt	50	5,2
ISIS 594430	3-10-3 (S)- cEt	50	5,3

Масса.

На 39 день измеряли массу тела. Массу печени, сердца, селезенки и почек измеряли по окончании исследования на 42 день, и результаты представлены в следующей таблице.

Результаты измерений массы органов выражены как соотношение к массе тела и нормализованы к соотношению контрольной группы с PBS.

Таблица 197

Соотношения массы органа/массы тела (BW)

	Химизм	Доза (мг/кг/неделю)	Селезенка/BW	Печень/BW	Почки/BW
PBS	-	-	1,0	1,0	1,0
ISIS 532770	5-10-5 MOE	100	2,0	1,2	1,0
ISIS 532800	5-10-5 MOE	100	2,8	1,3	1,0
ISIS 532809	5-10-5 MOE	100	2,2	1,1	1,0
ISIS 588540	5-10-5 MOE	100	2,2	1,4	1,0
ISIS 588544	5-10-5 MOE	100	2,5	1,3	1,1
ISIS 588548	5-10-5 MOE	100	2,1	1,3	1,1
ISIS 588550	5-10-5 MOE	100	3,9	1,4	1,1
ISIS 588553	5-10-5 MOE	100	4,1	1,4	1,4
ISIS 588555	5-10-5 MOE	100	1,8	1,3	1,0
ISIS 588848	Дезокси, MOE и (S)-cEt	50	3,1	1,3	1,1
ISIS 594430	3-10-3 (S)-cEt	50	1,7	1,0	1,1

Пример 128. Эффективность антисмысловых олигонуклеотидов против мРНК CFB у мышей hCFB.

Выбранные соединения были протестированы на эффективность у трансгенных мышей с человеческим CFB, линия-основатель №6. Ген человеческого CFB расположен на хромосоме 6: положение 31913721-31919861. Выбрали фосмиду (ABC14-50933200C23), содержащую последовательность CFB, для получения трансгенных мышей, экспрессирующих ген человеческого CFB. Использовали рестрикционные ферменты Cla I (31926612) и Age I (31926815) для получения фрагмента размером 22127 п.о., содержащего ген CFB, для проницательной инъекции. ДНК подтвердили анализом рестрикционного фермента, используя Pvu I. Фрагмент ДНК размером 22127 п.о. инъектировали в эмбрионы C57BL/6NTac. Вывели 6 положительных основателей. Основатель №6 экспрессировали в мРНК CFB печени человека и скрестили с 3^{им} поколением. Потомство 3^{го} поколения мышей использовали для оценки влияния ASO человеческого CFB на восстановление мРНК человеческого CFB.

Лечение.

Группам по 3 крысы два раза в неделю в течение первой недели вводили подкожные инъекции 50 мг/кг олигонуклеотидов ISIS, затем один раз в неделю дозу 50 мг/кг олигонуклеотидов ISIS в течение еще трех недель. Одной контрольной группе из 4 мышей два раза в неделю в течение первой недели вводили подкожные инъекции PBS, затем один раз в неделю в течение дополнительных трех недель. Через 48 ч после введения последней дозы мышей усыпили и собрали органы и плазму для дальнейших анализов.

Анализ РНК.

По окончании периода введения доз выделили РНК из печени и почек для анализа ПЦР в реальном времени для определения уровней мРНК CFB. Уровни мРНК человеческого CFB измеряли с помощью набора человеческих праймерных зондов RTS3459. Уровни мРНК CFB нормализовали к RIBOGREEN®, а также к конститутивному гену, циклофилу. Результаты рассчитывали как процентное ингибирование экспрессии мРНК CFB по сравнению с контролем. Все антисмысловые олигонуклеотиды вызывали ингибирование уровней мРНК человеческого CFB в печени.

Таблица 198

Процентное уменьшение уровней мРНК CFB у мышей hCFB

ISIS №	Нормализовано к RIBOGREEN	Нормализовано к циклофилину
532770	86	87
532800	88	87
532809	69	69
588540	95	94
588544	91	91
588548	78	77
588550	89	88
588553	94	94
588555	94	94
588848	83	82
594430	78	76

Пример 129. In vivo антисмысловое ингибирование мышинного CFB.

Сконструировали несколько антисмысловых олигонуклеотидов, направленных на мРНК мышинного CFB (номер доступа GENBANK NM_008198.2, включенная в настоящий документ как SEQ ID NO: 5). Целевые сайты инициации и последовательности каждого олигонуклеотида описаны в представленных ниже таблицах. Химерные антисмысловые олигонуклеотиды в представленной ниже таблице сконструированы как 5-10-5 МОЕ гэммеры. Гэммеры имеют 20 нуклеозидов в длину, причем центральный гэм состоит из 10 2'-дезоксинуклеозидов и с обеих сторон (в направлениях 5' и 3') окружен крыльями, содержащими по 5 нуклеозидов каждое. Каждый нуклеозид 5'-крыла и нуклеозид 3'-крыла имеет 2'-МОЕ модификации. Межнуклеозидные связи в каждом гэммере представляют собой тиофосфатные (P=S) связи. Все остатки цитозина в каждом гэммере представляют собой 5-метилцитозины.

Таблица 199

Гэммеры, направленные на мышинный CFB

ISIS №	Последовательность	Целевой сайт инициации в SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO
516269	GCATAAGAGGGTACCAGCTG	2593	804
516272	GTCTTTAGCCAGGGCAGCA	2642	805
516323	TCCACCCATGTTGTGCAAGC	1568	806
516330	CCACACCATGCCACAGAGAC	1826	807
516341	TTCCGAGTCAGGCTCTTCCC	2308	808

Лечение.

Группам по четыре мыши C57BL/6 вводили подкожные инъекции 50 мг/кг ISIS 516269, ISIS 516272, ISIS 516323, ISIS 516330 или ISIS 516341, один раз в неделю в течение 3 недель. Контрольной группе мышей вводили инъекцию с фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) один раз в неделю в течение 3 недель.

Анализ РНК CFB.

По окончании исследования из печеночной ткани выделили РНК для анализа CFB с помощью ПЦР в реальном времени, используя набор праймерных зондов RTS3430 (прямая последовательность GGG-CAAACAGCAATTTGTGA, обозначенная в настоящем документе как SEQ ID NO: 816; обратная последовательность TGGCTACCCACCTTCCTTGT, обозначенная в настоящем документе как SEQ ID NO: 817; последовательность зонда CTGGATACTGTCCCAATCCCGGTATTCCX, обозначенная в настоящем документе как SEQ ID NO: 818). Уровни мРНК нормализовали с помощью RIBOGREEN®. Как показано в представленной ниже таблице, некоторые антисмысловые олигонуклеотиды обеспечивали снижение мышинного CFB по сравнению с контрольным образцом с PBS. Результаты представлены как процент ингибирования CFB относительно контрольного образца.

Таблица 200

Процентное ингибирование мРНК мышиногo CFB у мышей C57BL/6

ISIS №	%
516269	29
516272	72
516323	77
516330	62
516341	72

Анализ белка.

Уровни белка CFB измеряли в почках, печени, плазме и глазах с помощью вестерн-блоттинга, используя козье анти-CFB антитело (Sigma-Aldrich). Результаты представлены как процент ингибирования CFB относительно контрольного образца с PBS. "н.д." означает, что для указанного образца измерения не проводили. Как показано в представленной ниже таблице, антисмысловое ингибирование CFB олигонуклеотидами ISIS приводит к снижению белка CFB в различных тканях. Как показано в представленной ниже таблице, системное введение олигонуклеотидов ISIS эффективно для снижения уровней CFB в глазах.

Таблица 201

Процентное ингибирование белка мышиногo CFB у мышей C57BL/6

ISIS №	Почки	Печень	Плазма	Глаза
516269	20	58	н.д.	70
516272	48	74	н.д.	99
516323	73	85	90	93
516330	77	80	н.д.	н.д.
516341	80	88	68	н.д.

Пример 130. Дозозависимое антисмысловое ингибирование мышиногo CFB.

Группам по четыре крысы C57BL/6 один раз в неделю в течение 6 недель вводили инъекции 25 мг/кг, 50 мг/кг или 100 мг/кг ISIS 516272 и ISIS 516323. Другим двум группам мышей один раз в неделю в течение 6 недель вводили инъекции 100 мг/кг ISIS 516330 или ISIS 516341. Двум контрольным группам мышей один раз в неделю в течение 6 недель вводили инъекции фосфатно-солевого буферного раствора (PBS).

Анализ РНК CFB.

Выделили РНК из тканей печени и почек для анализа CFB с помощью ПЦР в реальном времени с использованием набора праймерных зондов RTS3430. Уровни мРНК нормализовали с помощью RIBOGREEN®. Как показано в представленной ниже таблице, антисмысловые олигонуклеотиды обеспечивали дозозависимое снижение мышиногo CFB по сравнению с контрольным образцом с PBS. Результаты представлены как процент ингибирования CFB относительно контрольного образца.

Таблица 202

Процентное ингибирование мРНК мышиногo CFB у мышей C57BL/6

ISIS №	Доза (мг/кг/неделю)	Печень	Почки
516272	25	39	32
	50	73	36
	100	87	42
516323	25	36	41
	50	65	47
	100	79	71
516330	100	85	45
516341	200	89	65

Анализ белка.

Уровни белка CFB измеряли в плазме с помощью вестерн-блоттинга, используя козье анти-CFB антитело (Sigma-Aldrich). Как показано в представленной ниже таблице, антисмысловое ингибирование CFB олигонуклеотидами ISIS приводит к снижению белка CFB. Результаты представлены как процент ингибирования CFB относительно контрольного образца с PBS. "н.д." означает, что для указанного образца измерения не проводили.

Уровни белка CFB в глазах также измеряли с помощью вестерн-блоттинга. Все экспериментальные группы демонстрировали ингибирование CFB на 95%, при этом значения некоторых образцов были ни-

же предела обнаружения анализа.

Таблица 203

Процентное ингибирование белка мышиногo CFB у мышей C57BL/6

ISIS №	Доза (мг/кг/неделю)	Печень
516272	25	32
	50	70
	100	83
516323	25	43
	50	80
	100	90
516330	100	н.д.
516341	200	н.д.

Пример 131. Влияние антисмыслового ингибирования CFB в мышинной модели NZB/W F1

NZB/W F1 представляет собой старейшую классическую модель волчанки, в которой у мышей развивается тяжелый волчаночный фенотип, сравнимый с фенотипом пациентов с волчанкой (Theofilopoulos, A.N. и Dixon, F.J. *Advances in Immunology*, т. 37, сс. 269-390, 1985). Такой волчаночный фенотип включает лимфаденопатию, спленомегалию, повышенное содержание антинуклеарных аутоантител в сыворотке (ANA), включая анти-дцДНК IgG, большинство из которых представляют собой IgG2a и IgG3, и иммунокомплексный гломерулонефрит (GN), который становится очевидным в возрасте 5-6 месяцев, что приводит к почечной недостаточности и гибели в возрасте 10-12 месяцев.

Испытание 1.

Испытание проводили для демонстрации того, что лечение антисмысловыми олигонуклеотидами, направленными на CFB, облегчает почечную патологию в мышинной модели. Самок мышей NZB/W F1 возрастом 17 недель приобрели у компании Jackson Laboratories. Группам из 16 мышей вводили дозы 100 мг/кг/неделю ISIS 516272 или ISIS 516323 в течение 20 недель. Другой группе из 16 мышей вводили дозы 100 мг/кг/неделю контрольного олигонуклеотида ISIS 141923 в течение 20 недель. Другой группе из 10 мышей вводили дозы PBS в течение 20 недель и использовали в качестве контрольной группы, с которой сравнивали все остальные группы. Конечные значения получили через 48 ч после инъекции последней дозы.

Анализ РНК CFB.

Выделили РНК из тканей печени и почек для анализа CFB с помощью ПЦР в реальном времени с использованием набора праймерных зондов RTS3430. Уровни мРНК нормализовали с помощью RIBOGREEN®. Как показано в представленной ниже таблице, некоторые антисмысловые олигонуклеотиды обеспечивали снижение мышиногo CFB по сравнению с контрольным образцом с PBS. Результаты представлены как процент ингибирования CFB относительно контрольного образца.

Таблица 204

Процентное ингибирование мРНК мышиногo CFB у мышей NZB/W F1

ISIS №	Печень	Почки
516272	55	25
516323	63	43
141923	0	0

Протеинурия.

Протеинурия ожидается у 60% животных в указанной мышинной модели. Кумулятивную частоту случаев возникновения тяжелой протеинурии измеряли расчетом соотношения общего белка к креатинину, используя клинический анализатор. Результаты представлены в следующей таблице и демонстрируют, что лечение антисмысловыми олигонуклеотидами, направленными на CFB, обеспечивает снижение протеинурии у мышей, по сравнению с контрольной группой с PBS и мышами, обработанными контрольным олигонуклеотидом.

Таблица 205

Процентная кумулятивная частота случаев тяжелой протеинурии у мышей NZB/W F1

	%
PBS	40
ISIS 516272	6
ISIS 516323	0
ISIS 141923	25

Выживаемость.

Выживаемость мышей контролировали, подсчитывая количество мышей в начале лечения, затем на 20 неделе. Результаты представлены в следующей таблице и демонстрируют, что лечение антисмысловыми олигонуклеотидами, направленными на CFB, увеличивает выживаемость мышей, по сравнению с контрольной группой с PBS и мышами, обработанными контрольным олигонуклеотидом.

Таблица 206

Количество выживших мышей и % выживаемости

	Неделя 1	Неделя 20	% выживания на 20 неделе
PBS	10	6	60
ISIS 516272	16	15	94
ISIS 516323	16	16	100
ISIS 141923	16	12	75

Гломерулярное отложение.

Количество отложения C3, а также отложения IgG в гломерулах почек измеряли посредством иммуногистохимии с анти-C3 антителом. Результаты представлены в следующей таблице и демонстрируют, что лечение антисмысловыми олигонуклеотидами, направленными на CFB, обеспечивает снижение отложений C3 и IgG в гломерулах почек, по сравнению с контрольным образцом с PBS и мышами, обработанными контрольным олигонуклеотидом.

Таблица 207

Процентное ингибирование отложений в гломерулах у мышей NZB/W F1

ISIS №	C3	IgG
516272	45	20
516323	48	2
141923	0	0

Испытание 2

Самок мышей NZB/W F1 возрастом 16 недель приобрели у компании Jackson Laboratories. Группе из 10 мышей вводили дозы 100 мкг/кг/неделю ISIS 516323 в течение 12 недель. Другой группе из 10 мышей вводили дозы 100 мкг/кг/неделю контрольного олигонуклеотида ISIS 141923 в течение 12 недель. Другой группе из 10 мышей вводили дозы PBS в течение 12 недель и использовали в качестве контрольной группы, с которой сравнивали все остальные группы. Конечные значения получили через 48 ч после инъекции последней дозы.

Анализ РНК CFB.

Выделили РНК из тканей печени и почек для анализа CFB с помощью ПЦР в реальном времени с использованием набора праймерных зондов RTS3430. Как показано в представленной ниже таблице, лечение с ISIS 516323 обеспечивает снижение мышинного CFB по сравнению с контрольным образцом с PBS. Результаты представлены как процент ингибирования CFB относительно контрольного образца.

Таблица 208

Процентное ингибирование мРНК мышинного CFB у мышей NZB/W F1

ISIS №	Печень	Почки
516323	75	46
141923	0	6

Протеинурия.

Кумулятивную частоту возникновения тяжелой протеинурии оценивали путем измерения соотно-

шения общего белка в моче к креатинину, а также путем измерения общего уровня микроальбумина. Результаты представлены в следующих таблицах и демонстрируют, что лечение антисмысловыми олигонуклеотидами, направленными на CFB, снижает протеинурии у мышей, по сравнению с контрольным образцом с PBS и мышами, обработанными контрольным олигонуклеотидом.

Таблица 209

Протеинурию у мышей NZB/W F1 измеряли как уровни микроальбумина в моче (мг/дл)

ISIS №	Неделя 0	Неделя 6	Неделя 8	Неделя 10
516323	0	0	5,4	0,4
141923	0	8,28	8,6	5,6

Таблица 210

Протеинурию у мышей NZB/W F1 измеряли как соотношение общего белка к креатинину

ISIS №	Неделя 0	Неделя 6	Неделя 8	Неделя 10
516323	5,5	7,8	8,6	7,2
141923	6,9	10,0	13,5	7,2

Выживаемость.

Выживаемость мышей контролировали путем подсчета количества мышей в начале лечения, а затем на 12 неделе. Результаты представлены в следующей таблице и демонстрируют, что лечение антисмысловыми олигонуклеотидами, направленными на CFB, увеличивает выживаемость мышей, по сравнению с контрольной группой с PBS и мышами, обработанными контрольным олигонуклеотидом.

Таблица 211

Количество выживших мышей

	Неделя 1	Неделя 12
PBS	10	9
ISIS 516323	10	10
ISIS 141923	10	9

Пример 132. Влияние антисмыслового ингибирования CFB в мышинной модели MRL.

В мышинной модели волчаночного нефрита MRL/lpr развивается волчаночный фенотип, характеризующийся лимфаденопатией в результате накопления двойных отрицательных ($CD4^+ CD8^-$) и $B220^+$ Т-клеток. Указанные мыши демонстрируют ускоренную смертность. Кроме того, мыши имеют более высокие концентрации циркулирующих иммуноглобулинов, включая повышенные уровни аутоантител, таких как ANA, анти-оцДНК, анти-дцДНК, анти-iSm и ревматоидные факторы, что приводит к большому количеству иммунных комплексов (Andrews, B. et al., J. Exp. Med. 148: 1198-1215, 1978).

Лечение.

Проводили испытание для изучения того, вызывает ли лечение антисмысловыми олигонуклеотидами, направленными на CFB, регресс почечной патологии в мышинной модели. Самок мышей MRL/lpr возрастом 14 недель приобрели у компании Jackson Laboratories. Группе из 10 мышей вводили дозы 50 мкг/кг/неделю ISIS 516323 в течение 7 недель. Другой группе из 10 мышей вводили дозы 50 мкг/кг/неделю контрольного олигонуклеотида ISIS 141923 в течение 7 недель. Другой группе из 10 мышей вводили дозы PBS в течение 7 недель и использовали в качестве контрольной группы, с которой сравнивали все остальные группы. Конечные значения получили через 48 ч после инъекции последней дозы.

Анализ РНК CFB.

Выделили РНК из тканей печени для анализа CFB с помощью ПЦР в реальном времени с использованием набора праймерных зондов RTS3430. Как показано в представленной ниже таблице, ISIS 516323 обеспечивает снижение CFB по сравнению с контрольным образцом с PBS. Результаты представлены как процент ингибирования CFB относительно контрольного образца.

Таблица 212

Процентное ингибирование мРНК мышинного CFB у мышей MRL/lpr

ISIS №	%
516323	68
141923	4

Почечная патология.

Почечную патологию оценивали двумя способами. Гистологические срезы почек окрашивали гематоксилином и эозином. Контрольный образец с PBS демонстрировал наличие мультигломерулярных

серповидных трубчатых цилиндров, что является симптомом гломерулосклероза. Напротив, срезы от мышей, обработанных ISIS 516323, демонстрировали отсутствие серповидных трубчатых цилиндров с минимальными фибротическими изменениями боуеновой капсулы, от умеренного до сильного расширение сегментарных мезангиальных клеток и утолщение гломерулярной базальной мембраны.

Накопление C3 в почках также оценивали с помощью иммуногистохимии с анти-C3 антителами. Иммуногистохимическую оценку интенсивности C3 в целой почке рассчитывали по балльной системе интенсивности, которую рассчитывали отбором 10 гломерул на почку и подсчетом интенсивности положительного окрашивания C3. Результаты представлены в следующей таблице и демонстрируют, что лечение с ISIS 516323 снижает накопление C3 в почках, по сравнению с контрольными группами.

Таблица 213
Накопление C3 в почках мышей MRL/lpr

	Оценка интенсивности	Количественное определение C3
	C3 в целой почке	(площадь/общая площадь), % от PBS среднего
PBS	2,5	100
ISIS 516323	1,6	68
ISIS 141923	2,2	99

Уровни C3 в плазме.

Снижение CFB ингибирует активацию альтернативного пути комплемента, препятствуя поглощению C3 и приводя к заметному повышению уровней C3 в плазме. Уровни C3 в плазме терминальной крови измеряли с помощью клинического анализатора. Результаты представлены в следующей таблице и демонстрируют, что лечение с ISIS 516323 повышает уровни C3 ($p < 0,001$) в плазме, по сравнению с контрольными группами.

Таблица 214
Уровни C3 в плазме (мг/дл) мышей MRL/lpr

ISIS №	C3
516323	28
141923	16

Результаты демонстрируют, что лечение антисмысловыми олигонуклеотидами, направленными на CFB, реверсирует почечную патологию в мышинной модели волчанки.

Пример 133. Влияние антисмыслового ингибирования CFB в мышинной модели CFH Het.

CFH гетерозиготная (CFH Het, CFH^{+/-}) мышинная модель экспрессирует мутантный белок фактора H в комбинации с мышинным белком полной длины (Pickering, M.C. et al., J. Exp. Med. 2007. 204: 1249-56). Почечная гистология у этих мышей остается нормальной до шестимесячного возраста. Испытание 1

Группам по 8 мышей CFH^{+/-} возрастом 6 недель вводили дозы 75 мг/кг/неделю ISIS 516323 или ISIS 516341 в течение 6 недель. Другой группе из 8 мышей вводили дозы 75 мг/кг/неделю контрольного олигонуклеотида ISIS 141923 в течение 6 недель. Другой группе из 8 мышей вводили дозы PBS в течение 6 недель и использовали в качестве контрольной группы, с которой сравнивали все остальные группы. Конечные значения получили через 48 ч после инъекции последней дозы.

Анализ РНК CFB.

Выделили РНК из тканей печени и почек для анализа CFB с помощью ПЦР в реальном времени с использованием набора праймерных зондов RTS3430. Как показано в представленной ниже таблице, антисмысловые олигонуклеотиды обеспечивают снижение CFB по сравнению с контрольным образцом с PBS. Результаты представлены как процент ингибирования CFB относительно контрольного образца.

Таблица 215
Процентное ингибирование мРНК мышинного CFB у мышей CFH^{+/-}

ISIS №	Печень	Почки
516323	80	38
516341	90	44
141923	0	17

Уровни C3 в плазме.

Снижение CFB ингибирует активацию альтернативного пути комплемента, препятствуя поглощению C3 и приводя к заметному повышению уровней C3 в плазме. Уровни C3 в плазме терминальной крови измеряли с помощью клинического анализатора. Результаты представлены в следующей таблице и

демонстрируют, что лечение с ISIS 516323 повышает уровни C3 в плазме до нормальных уровней.

Таблица 216

Уровни C3 в плазме (мг/дл) мышей CFH^{+/-}

ISIS №	C3
516323	15
516341	17
141923	8

Испытание 2.

Группам по 5 мышей CFH^{+/-} вводили дозы 12,5 мг/кг/неделю, 25 мг/кг/неделю, 50 мг/кг/неделю, 75 мг/кг/неделю или 100 мг/кг/неделю ISIS 516323 или ISIS 516341 в течение 6 недель. Другой группе из 5 мышей вводили дозы 75 мкг/кг/неделю контрольного олигонуклеотида ISIS 141923 в течение 6 недель. Другой группе из 5 мышей вводили дозы PBS в течение 6 недель и использовали в качестве контрольной группы, с которой сравнивали все остальные группы. Конечные значения получили через 48 ч после инъекции последней дозы.

Анализ РНК CFB.

Выделили РНК из тканей печени и почек для анализа CFB с помощью ПЦР в реальном времени с использованием набора праймерных зондов RTS3430. Как показано в представленной ниже таблице, антисмысловые олигонуклеотиды обеспечивают снижение CFB по сравнению с контрольным образцом с PBS дозозависимым образом. Результаты представлены как процент ингибирования CFB относительно контрольного образца.

Таблица 217

Процентное ингибирование мРНК мышинного CFB в печени мышей CFH^{+/-}

ISIS №	Доза (мг/кг/неделю)	%
516323	12,5	34
	25	51
	50	72
	75	79
	100	92
516341	12,5	38
	25	57
	50	89
	75	92
	100	90
141923	75	13

Уровни C3 в плазме.

Снижение CFB ингибирует активацию альтернативного пути комплемента, препятствуя поглощению C3 и приводя к заметному повышению уровней C3 в плазме. Уровни C3 в плазме терминальной крови измеряли с помощью клинического анализатора. Результаты представлены в следующей таблице и демонстрируют, что лечение олигонуклеотидами ISIS, направленными на CFB, повышает уровни C3 в плазме.

Таблица 218
Уровни СЗ в плазме (мг/дл) мышей CFH⁺

	Доза (мг/кг/неделю)	СЗ
PBS	-	10,1
516323	12,5	11,4
	25	15,5
	50	17,0
	75	18,3
	100	18,8
516341	12,5	12,1
	25	16,3
	50	18,6
	75	22,1
	100	19,1
141923	75	8,9

Пример 134. Влияние антисмысловых олигонуклеотидов ISIS, направленных на CFB человека, у яванских макаков.

Яванских макаков лечили антисмысловыми олигонуклеотидами ISIS, отобранными в исследованиях, описанных в представленных выше примерах. Оценивали эффективность и переносимость антисмысловых олигонуклеотидов, а также их фармакокинетический профиль в печени и почках.

Во время проведения испытаний геномная последовательность яванских макаков отсутствовала в базе данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI); поэтому перекрестная реактивность с последовательностью гена яванских макаков не может быть подтверждена. Вместо этого последовательности антисмысловых олигонуклеотидов ISIS, использованные на яванских макаках, сравнивали с последовательностью резус-макака на предмет гомологии. Предполагается, что олигонуклеотиды ISIS с гомологией к последовательности резус-макака, являются также полностью перекрестно реактивными с последовательностью яванских макаков. Испытанные человеческие антисмысловые олигонуклеотиды являются перекрестно реактивными с геномной последовательностью резуса (номер доступа GENBANK NW_001116486.1, усеченной по нуклеотидам с 536000 по 545000, обозначенной в настоящем документе как SEQ ID NO: 3). Чем выше комплементарность между человеческим олигонуклеотидом и последовательностью макаки резус, тем вероятнее, что человеческий олигонуклеотид может перекрестно реагировать с последовательностью макаков резус. Сайты инициации и терминции каждого олигонуклеотида, направленного на SEQ ID NO: 3, представлены в следующей таблице. "Сайт инициации" обозначает самый крайний 5' нуклеотид, на который направлен гэмпер в последовательности гена резус-макаки. "Рассогласование" указывает на количество азотистых оснований в человеческом олигонуклеотиде, которые не соответствуют геномной последовательности резуса.

Таблица 219
Антисмысловые олигонуклеотиды, комплементарные
геномной последовательности CFB резуса (SEQ ID NO: 3)

ISIS №	Целевой сайт инициации	Рассогласования	Химизм	SEQ ID NO
532770	6788	0	5-10-5 MOE	198
532800	7500	0	5-10-5 MOE	228
532809	7614	0	5-10-5 MOE	237
588540	7627	1	5-10-5 MOE	440
588544	7631	1	5-10-5 MOE	444
588548	7635	1	5-10-5 MOE	448
588550	7637	1	5-10-5 MOE	450
588553	7640	1	5-10-5 MOE	453
588555	7643	0	5-10-5 MOE	455
588848	7639	1	Дезокси, MOE и cEt	598
594430	6790	0	3-10-3 cEt	549

Лечение.

Перед началом исследования обезьян выдерживали на карантине в течение по меньшей мере 30 дней, в течение которых ежедневно следили за общим состоянием здоровья животных. Возраст обезьян составлял 2-4 года, а масса от 2 до 4 кг. Одиннадцати группам по 4-6 случайным образом распределенных самцов яванских макак вводили подкожные инъекции олигонуклеотида ISIS или PBS в четырех местах на спине по часовой стрелке (т.е. слева, сверху, справа и снизу), по одному месту на дозу. Обезьянам вводили четыре насыщающие дозы PBS или 40 мг/кг ISIS 532800, ISIS 532809, ISIS 588540, ISIS 588544, ISIS 588548, ISIS 588550, ISIS 588553, ISIS 588555, ISIS 588848 или ISIS 594430 в течение первой недели (1, 3, 5 и 7 день), а затем вводили дозы один раз в неделю в течение 12 недель (14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 и 84 день) PBS или 40 мг/кг олигонуклеотидов ISIS. ISIS 532770 испытывали в отдельном исследовании с аналогичными условиями на двух самцах и двух самках яванских макак в одной группе.

Снижение печеночной мишени.

Анализ РНК.

На 86 день собрали образцы печени и почек в двух экземплярах (примерно по 250 мг каждый) для анализа мРНК CFB. После вскрытия образцы быстро заморозили в жидком азоте в течение около 10 мин после усыпления.

Выделили РНК из тканей печени и почек для анализа экспрессии мРНК CFB с помощью ПЦР в реальном времени. Результаты представлены как процентное изменение мРНК относительно контрольного образца с PBS, нормализованное по RIBOGREEN®. Уровни РНК нормализовали также по конститутивному гену, циклофилину А. Уровни РНК измеряли с помощью наборов праймерных зондов RTS3459, описанных выше, или RTS4445_MGB (прямая последовательность CGAAGAAGCTCAGTGAAATCAA, обозначенная в настоящем документе как SEQ ID NO: 819; обратная последовательность TGCCTG-GAGGGCCCTCTT, обозначенная в настоящем документе как SEQ ID NO: 820; последовательность зонда AGACCACAAGTTGAAGTC, обозначенная в настоящем документе как SEQ ID NO: 815).

Как показано в представленных ниже таблицах, лечение антисмысловыми олигонуклеотидами ISIS приводит к снижению мРНК CFB по сравнению с контрольным образцом с PBS. Анализ уровней мРНК CFB показал, что некоторые олигонуклеотиды ISIS снижают уровни CFB в печени и/или почках. "0" означает, что уровни экспрессии не были ингибированы. "*" означает, что олигонуклеотид испытывали в отдельном исследовании с аналогичными условиями.

Таблица 220

Процентное ингибирование мРНК CFB в печени яванских макак относительно контрольного образца с PBS

ISIS №	RTS3459/ циклофиллин А	RTS3459/ RIBOGREEN	RTS445_MGB/ циклофиллин А	RTS445_MGB / RIBOGREEN
532770*	12	37	24	45
532800	54	45	56	46
588540	31	27	28	24
588548	68	67	68	67
588550	53	39	51	37
588553	74	59	74	59
588555	73	71	71	69
588848	9	0	6	0
594430	24	26	23	25

Таблица 221

Процентное ингибирование мРНК CFB в почках яванских макак относительно контрольного образца с PBS

ISIS №	RTS3459/ циклофилин A	RTS3459/ RIBOGREEN	RTS445_MGB/ циклофилин A	RTS445_MGB / RIBOGREEN
532770*	34	56	2	31
532800	36	30	43	37
588540	70	71	67	69
588548	83	84	82	83
588550	81	77	78	74
588553	86	84	86	85
588555	32	34	48	50
588848	89	91	87	90
594430	33	37	19	23

Анализ белка.

Около 1 мл крови взяли у всех доступных животных на 85 день и поместили в пробирки, содержащие калиевую соль ЭДТК. Образцы крови сразу поместили на влажный лед или Kryoack и центрифугировали (3000 об/мин в течение 10 мин при 4°C) с получением плазмы (0,4 мл) в течение 60 мин после сбора. Уровни CFB в плазме измеряли в плазме радиальной иммунодиффузией (RID), используя поликлональное антитело анти-фактор В. Результаты представлены ниже в таблице. ISIS 532770 испытывали в отдельном исследовании, и в этой группе уровни белка в плазме измеряли на 91 или 92 день.

Анализ CFB в плазме показал, что некоторые олигонуклеотиды ISIS устойчиво снижают уровни белка. ISIS 532770, который испытывали в отдельном исследовании, обеспечил снижение белка CFB на 91/92 день на 50% относительно исходных значений. Снижение уровней белка CFB в плазме хорошо коррелирует со снижением уровней мРНК CFB в печени в соответствующих группах животных.

Таблица 222

Уровни белка в плазме (% от исходного значения) у яванских макак

	День 1	День 30	День 58	День 72	День 86
PBS	113	115	95	83	86
ISIS 532800	117	68	52	39	34
ISIS 532809	104	121	100	80	71
ISIS 588540	108	72	61	40	38
ISIS 588544	118	74	53	33	29
ISIS 588548	110	41	28	20	16
ISIS 588550	104	64	54	38	37
ISIS 588553	97	42	35	18	16
ISIS 588555	107	35	37	18	18
ISIS 588848	116	95	92	69	71
ISIS 594430	104	64	59	45	46

Исследования переносимости.

Измерения массы тела.

Для оценки влияния олигонуклеотидов ISIS на общее состояние здоровья животных измеряли массу тела и органов, и результаты представлены в следующей таблице. "*" означает, что олигонуклеотид испытывали в отдельном исследовании с аналогичными условиями, и значение является средним для измерений у самцов и самок обезьян. Результаты демонстрируют, что влияние лечения антисмысловыми олигонуклеотидами на массу тела и органов находится в пределах ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов.

Таблица 223

Конечная масса тела (г) яванских макак

	День 1	День 14	День 28	День 42	День 56	День 70	День 84
PBS	2887	2953	3028	3094	3125	3143	3193
ISIS 532770*	2963	2947	2966	3050	3097	3138	3160
ISIS 532800	2886	2976	3072	3149	3220	3269	3265
ISIS 532809	2755	2836	2927	2983	3019	3071	3098
ISIS 588540	2779	2834	2907	2934	2981	3034	3057
ISIS 588544	2837	2896	3009	3064	3132	3163	3199
ISIS 588548	2694	2816	2882	2990	3073	3149	3161
ISIS 588550	2855	2988	3062	3188	3219	3282	3323
ISIS 588553	3033	3156	3256	3335	3379	3372	3442
ISIS 588555	2757	2863	2965	3022	3075	3088	3158
ISIS 588848	2850	3018	3032	3187	3230	3212	3291
ISIS 594430	2884	2963	2953	3149	3187	3204	3256

Таблица 224

Конечная масса органов (г) яванских макак

	Селезенка	Сердце	Почки	Печень
PBS	2,8	11,6	11,9	55,8
ISIS 532770*	5,0	11,3	20,6	77,9
ISIS 532800	6,2	11,9	18,6	94,4
ISIS 588540	4,0	11,4	13,5	67,1
ISIS 588548	4,1	11,7	17,3	72,0
ISIS 588550	5,8	10,9	18,5	81,8
ISIS 588553	5,0	12,7	17,2	85,9
ISIS 588555	4,7	11,8	15,9	88,3
ISIS 588848	5,0	12,7	14,4	75,7
ISIS 594430	3,9	11,9	14,8	69,9

Функция печени.

Для оценки влияния олигонуклеотидов ISIS на функцию печени из всех экспериментальных групп взяли образцы крови. Образцы крови брали из головной, подкожной или бедренной вены через 48 ч после введения дозы. Обезьяны не принимали пищу в течение ночи до сбора крови. Кровь (1,5 мл) собирали в пробирки без антикоагулянта для отделения сыворотки. Пробирки выдерживали при комнатной температуре в течение не менее 90 мин, а затем центрифугировали (около 3000 об/мин в течение 10 мин) для получения сыворотки. Уровни различных маркеров функции печени измеряли с помощью анализатора химического состава Toshiba 200FR NEO (Toshiba Co., Япония).

Измеряли уровни ALT и AST в плазме, и результаты, выраженные в МЕ/л, представлены в следующей таблице. Таким же образом измеряли билирубин, маркер функции печени, и результаты, выраженные в мг/дл, представлены в следующей таблице. "*" означает, что олигонуклеотид испытывали в отдельном исследовании с аналогичными условиями, и значение является средним для измерений у самцов и самок обезьян. Результаты демонстрируют, что большинство антисмысловых олигонуклеотидов не оказывают воздействия на функцию печени, выходящего за пределы ожидаемого диапазона для антисмысловых олигонуклеотидов.

Таблица 225

Уровни химических маркеров печени в плазме яванских макак на 86 день

	ALT (ед./л)	AST (ед./л)	Билирубин (мг/дл)
PBS	71	57	0,3
ISIS 532770*	59	58	0,1
ISIS 532800	65	86	0,1
ISIS 532809	35	58	0,1
ISIS 588540	70	88	0,2
ISIS 588544	55	97	0,2
ISIS 588548	61	85	0,2
ISIS 588550	94	84	0,2
ISIS 588553	44	65	0,2
ISIS 588555	63	84	0,2
ISIS 588848	69	65	0,2
ISIS 594430	86	53	0,2

Функция почек.

Для оценки влияния олигонуклеотидов ISIS на функцию почек из всех экспериментальных групп взяли образцы крови. Образцы крови брали из головной, подкожной или бедренной вены через 48 ч после введения дозы. Обезьяны не принимали пищу в течение ночи до сбора крови. Кровь собирали в пробирки без антикоагулянта для отделения сыворотки. Пробирки выдерживали при комнатной температуре в течение не менее 90 мин, а затем центрифугировали (около 3000 об/мин в течение 10 мин) для получения сыворотки. Уровни АМК и креатинина измеряли с помощью анализатора химического состава Toshiba 200FR NEO (Toshiba Co., Япония). Результаты, выраженные в мг/дл, представлены в следующей таблице. "*" означает, что олигонуклеотид испытывали в отдельном исследовании с аналогичными условиями, и значение является средним для измерений у самцов и самок обезьян.

Для анализа мочи свежую мочу всех животных собирали утром, используя чистый лоток для клетки на мокром льду. За день до сбора мочи животным в течение ночи не давали пищу, оставив только воду. Образцы мочи (около 1 мл) анализировали на соотношение белка к креатинину (P/C) с помощью автоматизированного анализатора химического состава Toshiba 200FR NEO (Toshiba Co., Япония), "н.д." означает, что уровень белка в моче ниже предела обнаружения анализатора.

Данные химического анализа плазмы и мочи показывают, что большинство олигонуклеотидов ISIS не оказывало какого-либо влияния на почечную функцию за пределами ожидаемого для антисмысловых олигонуклеотидов диапазона.

Таблица 226

Уровни химических маркеров почек (мг/дл) в плазме яванских макак на 86 день

	АМК	Креатинин	Общий белок
PBS	28	0,9	8,0
ISIS 532770*	20	0,9	6,9
ISIS 532800	25	0,9	7,5
ISIS 532809	23	0,8	7,4
ISIS 588540	30	0,8	7,5
ISIS 588544	26	0,9	7,4
ISIS 588548	25	0,9	7,6
ISIS 588550	24	0,9	7,2
ISIS 588553	25	0,8	7,2
ISIS 588555	25	0,8	7,6
ISIS 588848	24	0,9	7,5
ISIS 594430	25	0,8	7,2

Таблица 227

Уровни химических маркеров почек в моче яванских макак на 44 день и 86 день

	День 44	День 86
PBS	0,03	н.д.
ISIS 532800	0,01	н.д.
ISIS 532809	0,01	н.д.
ISIS 588540	0,03	н.д.
ISIS 588544	0,01	0,09
ISIS 588548	0,01	0,01
ISIS 588550	0,04	0,01
ISIS 588553	0,05	н.д.
ISIS 588555	0,03	0,03
ISIS 588848	0,09	н.д.
ISIS 594430	0,03	н.д.

Гематология.

Чтобы оценить влияние олигонуклеотидов ISIS на гематологические параметры яванских макак, образцы крови объемом около 0,5 мл крови отбирали у каждого из доступных экспериментальных животных в пробирки, содержащие K_2 -ЭДТА. Образцы анализировали на содержание красных кровяных телец (RBC), содержание белых кровяных телец (WBC), количество отдельных белых кровяных телец, таких как моноциты, нейтрофилы, лимфоциты, а также на количество тромбоцитов, содержание гемоглобина и гематокрита, используя анализатор гематологии ADVIA120 (Bayer, США). Данные представлены в следующих таблицах. "*" означает, что олигонуклеотид испытывали в отдельном исследовании с аналогичными условиями, и значение является средним для измерений у самцов и самок обезьян.

Данные показывают, что олигонуклеотиды не вызывали каких-либо изменений гематологических параметров за пределами ожидаемого для антисмысловых олигонуклеотидов диапазона.

Таблица 228

Количество кровяных клеток у яванских макак

	RBC ($\times 10^6$ /мкл)	Тромбоциты ($\times 10^3$ /мкл)	WBC ($\times 10^3$ /мкл)	Нейтрофилы (% WBC)	Лимфоциты (общий %)	Моноциты (общий %)
PBS	5,8	347	9,4	42,7	53,1	3,0
ISIS 532770*	5,4	386	10,8	22,3	71,7	3,3
ISIS 532800	5,6	360	13,1	29,5	61,1	6,5
ISIS 532809	5,2	400	11,5	56,6	38,2	2,5
ISIS 588540	5,5	367	11,7	50,9	42,7	2,1
ISIS 588544	5,2	373	14,3	56,6	37,6	4,3
ISIS 588548	5,1	373	9,7	40,4	54,3	3,9
ISIS 588550	6,1	343	9,9	32,1	61,7	4,6
ISIS 588553	5,2	424	9,3	41,7	53,2	3,6
ISIS 588555	5,1	411	9,6	45,1	49,7	3,5
ISIS 588848	5,7	370	10,0	39,8	55,8	3,1
ISIS 594430	5,7	477	10,6	47,3	47,8	3,6

Таблица 229

Гематологические параметры у яванских макак

	Гемоглобин (г/дл)	НСТ (%)
PBS	14,1	46,6
ISIS 532770*	12,4	40,9
ISIS 532800	12,3	40,5
ISIS 532809	12,2	40,4
ISIS 588540	12,5	41,5
ISIS 588544	11,9	38,1
ISIS 588548	12,3	39,6
ISIS 588550	13,4	45,0
ISIS 588553	12,6	39,8
ISIS 588555	11,6	38,1
ISIS 588848	13,2	42,7
ISIS 594430	13,4	43,1

Измерение концентрации олигонуклеотида.

Концентрацию олигонуклеотида полной длины измеряли в тканях почек и печени. Используемые способы представляют собой модификацию ранее опубликованных способов (Leeds et al., 1996; Geary et al., 1999), которые состоят из экстракции фенолом-хлороформом (жидкость-жидкость) с последующей твердофазной экстракцией. Концентрации в образце ткани рассчитывали с помощью калибровочных кривых, где нижний предел количественного обнаружения (LLOQ) составляет около 1,14 мкг/г. Результаты, выраженные в мкг/г ткани печени или почек, представлены в следующей таблице.

Таблица 230

Распределение антисмысловых олигонуклеотидов

	Почки (мкг/г)	Печень (мкг/г)	Соотношение почки/печень
ISIS 532800	3881	1633	2,4
ISIS 588540	3074	1410	2,2
ISIS 588548	3703	1233	3,0
ISIS 588550	4242	860	4,9
ISIS 588553	3096	736	4,2
ISIS 588555	4147	1860	2,2
ISIS 588848	2235	738	3,0
ISIS 594430	1548	752	2,1

Пример 135. 6-Недельное испытание эффективности несопряженных и 5'-THA-GalNAc₃ сопряженных антисмысловых олигонуклеотидов, направленных на человеческий CFB, у трансгенных мышей.

Два антисмысловых олигонуклеотида, имеющих одинаковую последовательность азотистых оснований: несопряженный антисмысловый олигонуклеотид ISIS 588540 и 5'-THA-GalNAc₃-сопряженный антисмысловый олигонуклеотид ISIS 696844, испытывали у трансгенных мышей с человеческим CFB (hCFB-Tg мыши).

Мышам подкожно вводили ISIS 696844 в дозах 0,1, 1,25, 0,5, 2,0, 6,0 или 12,0 мг/кг/неделю или ISIS 588540 в дозах 2, 6, 12, 25 или 50 мг/кг/неделю в течение 6 недель. Контрольной группе мышей подкожно вводили PBS в течение 6 недель. Мышей усыпили через 48 ч после введения последней дозы. Уровни мРНК в печени анализировали с помощью количественной ПЦР в реальном времени.

Испытание 1.

Результаты представлены в следующей таблице и демонстрируют, что 5'-THA-GalNAc₃-сопряженный антисмысловый олигонуклеотид, направленный на CFB, более эффективен, чем несопряженный антисмысловый олигонуклеотид с такой же последовательностью.

Таблица 231

Эффективность антисмысловых олигонуклеотидов, направленных на CFB

	ED ₅₀ (мг/кг)	ED ₇₅ (мг/кг)
ISIS 588540	4,52	9,26
ISIS 696844	0,52	1,12

Испытание 2.

Уровни мРНК в печени измеряли с двумя различными наборами праймерных зондов, направленными на разные области мРНК, и нормализовали по RIBOGREEN® (RGB) или циклофилу. Наборы праймерных зондов представляли собой RTS3459, описанный выше, и RTS3460 (прямая последовательность CGAAGCAGCTCAATGAAATCAA, обозначенная в настоящем документе как SEQ ID NO: 813; обратная последовательность TGCCTGGAGGGCCTTCTT, обозначенная в настоящем документе как SEQ ID NO: 814; последовательность зонда AGACCACAAGTTGAAGTC, обозначенная в настоящем документе как SEQ ID NO: 815). Результаты представлены в следующей таблице и демонстрируют, что 5'-THA-GalNAc₃-сопряженный антисмысловый олигонуклеотид, направленный на CFB, более эффективен, чем несопряженный антисмысловый олигонуклеотид с такой же последовательностью, независимо от используемого набора праймерных зондов.

Таблица 232

Эффективность антисмысловых олигонуклеотидов, направленных на CFB

	ED ₅₀ RTS34 59 (RGB)	ED ₅₀ RTS34 60 (RGB)	ED ₅₀ RTS3459 (циклофил ин)	ED ₅₀ RTS3460 (циклофил ин)	ED ₇₅ RTS34 59 (RGB)	ED ₇₅ RTS34 60 (RGB)	ED ₇₅ RTS3459 (циклофил ин)	ED ₇₅ RTS3460 (циклофил ин)
ISIS 58854 0	4,5	4,1	5,2	5,4	9,3	10,0	10,0	9,3
ISIS 69684 4	0,5	0,5	0,6	0,5	1,1	1,3	1,2	0,9

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

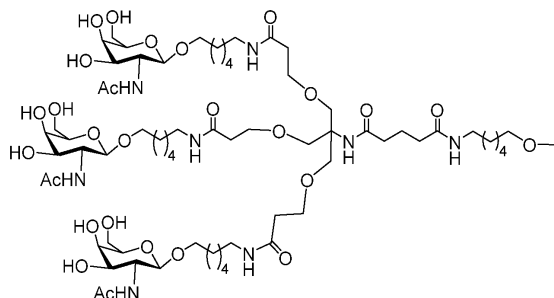
1. Соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид и группу конъюгата, причем модифицированный олигонуклеотид состоит из 16-30 связанных нуклеозидов и имеет последовательность азотистых оснований, содержащую любую из SEQ ID NO: 440, 198, 228, 237, 444, 448, 450, 453, 455, 549 и 598, причем модифицированный олигонуклеотид имеет

сегмент гэта, состоящий из связанных дезоксинуклеозидов;

сегмент 5'-крыла, состоящий из связанных нуклеозидов; и

сегмент 3'-крыла, состоящий из связанных нуклеозидов;

при этом сегмент гэта расположен между сегментом 5'-крыла и сегментом 3'-крыла, и при этом каждый нуклеозид каждого сегмента крыла содержит модифицированный сахар, и при этом группа конъюгата содержит:



2. Соединение по п.1, причем модифицированный олигонуклеотид состоит из 20 связанных нуклеозидов и имеет последовательность азотистых оснований, состоящую из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 440, 198, 228, 237, 444, 448, 450, 453 или 455, при этом модифицированный олигонуклеотид имеет

сегмент гэта, состоящий из десяти связанных дезоксинуклеозидов;

сегмент 5'-крыла, состоящий из пяти связанных нуклеозидов; и

сегмент 3'-крыла, состоящий из пяти связанных нуклеозидов;

при этом сегмент гэта расположен между сегментом 5'-крыла и сегментом 3'-крыла, причем каждый нуклеозид каждого сегмента крыла содержит 2'-О-метоксиэтильный сахар;

где каждая межнуклеозидная связь модифицированного олигонуклеотида представляет собой тиофосфатную связь и где каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

3. Соединение по п.1, причем модифицированный олигонуклеотид состоит из 16 связанных нуклеозидов и имеет последовательность азотистых оснований, состоящую из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 598, при этом модифицированный олигонуклеотид имеет

сегмент гэта, состоящий из десяти связанных дезоксирибонуклеозидов;

сегмент 5'-крыла, состоящий из трех связанных нуклеозидов; и

сегмент 3'-крыла, состоящий из трех связанных нуклеозидов;

при этом сегмент гэта расположен между сегментом 5'-крыла и сегментом 3'-крыла; где сегмент 5'-крыла содержит 2'-О-метоксиэтильный сахар, 2'-О-метоксиэтильный сахар и сахар со стерически затрудненным этилом в направлении от 5' к 3'; где сегмент 3'-крыла содержит сахар со стерически затрудненным этилом, сахар со стерически затрудненным этилом и 2'-О-метоксиэтильный сахар в направлении от 5' к 3'; где каждая межнауклеозидная связь модифицированного олигонуклеотида представляет собой тиофосфатную связь; и где каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

4. Соединение по п.1, причем модифицированный олигонуклеотид состоит из 16 связанных нуклеозидов и имеет последовательность азотистых оснований, состоящую из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 549, где модифицированный олигонуклеотид имеет

сегмент гэта, состоящий из десяти связанных дезоксирибонуклеозидов;

сегмент 5'-крыла, состоящий из трех связанных нуклеозидов; и

сегмент 3'-крыла, состоящий из трех связанных нуклеозидов;

при этом сегмент гэта расположен между сегментом 5'-крыла и сегментом 3'-крыла; причем каждый нуклеозид каждого сегмента крыла содержит сахар со стерически затрудненным этилом; где каждая межнауклеозидная связь модифицированного олигонуклеотида представляет собой тиофосфатную связь; и где каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

5. Соединение по п.1, отличающееся тем, что модифицированный олигонуклеотид по меньшей мере на 80, 85, 90, 95 или на 100% комплементарен равной по длине части азотистых оснований SEQ ID NO: 1 или 2.

6. Соединение по п.1 или 5, отличающееся тем, что модифицированный олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну модифицированную межнауклеозидную связь или по меньшей мере одно модифицированное азотистое основание.

7. Соединение по п.6, отличающееся тем, что модифицированная межнауклеозидная связь представляет собой тиофосфатную межнауклеозидную связь.

8. Соединение по п.7, отличающееся тем, что модифицированный олигонуклеотид содержит:

а) по меньшей мере 1 фосфодиэфирную межнауклеозидную связь;

б) по меньшей мере 2 фосфодиэфирные межнауклеозидные связи;

с) по меньшей мере 3 фосфодиэфирные межнауклеозидные связи;

д) по меньшей мере 4 фосфодиэфирные межнауклеозидные связи;

е) по меньшей мере 5 фосфодиэфирных межнауклеозидных связей;

ф) по меньшей мере 6 фосфодиэфирных межнауклеозидных связей или

г) по меньшей мере 7 фосфодиэфирных межнауклеозидных связей.

9. Соединение по п.8, отличающееся тем, что каждая межнауклеозидная связь модифицированного олигонуклеотида выбрана из фосфодиэфирной межнауклеозидной связи и тиофосфатной межнауклеозидной связи.

10. Соединение по п.7, отличающееся тем, что каждая межнауклеозидная связь модифицированного олигонуклеотида представляет собой тиофосфатную межнауклеозидную связь.

11. Соединение по любому из пп.1 или 5-10, отличающееся тем, что модифицированный сахар представляет собой:

а) бициклический сахар, при этом бициклический сахар необязательно выбран из группы сахаров, включающей 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA) и 4'-CH(CH₃)-O-2' (стерически затрудненный этил), или

б) модифицированный сахар представляет собой 2'-О-метоксиэтильный сахар.

12. Соединение по любому из пп.6-11, отличающееся тем, что модифицированное азотистое основание представляет собой 5-метилцитозин.

13. Соединение по любому из пп.1-12, отличающееся тем, что соединение является:

а) одноцепочечным или

б) двухцепочечным.

14. Соединение по любому из пп.1-13, отличающееся тем, что соединение содержит:

а) рибонуклеотиды или

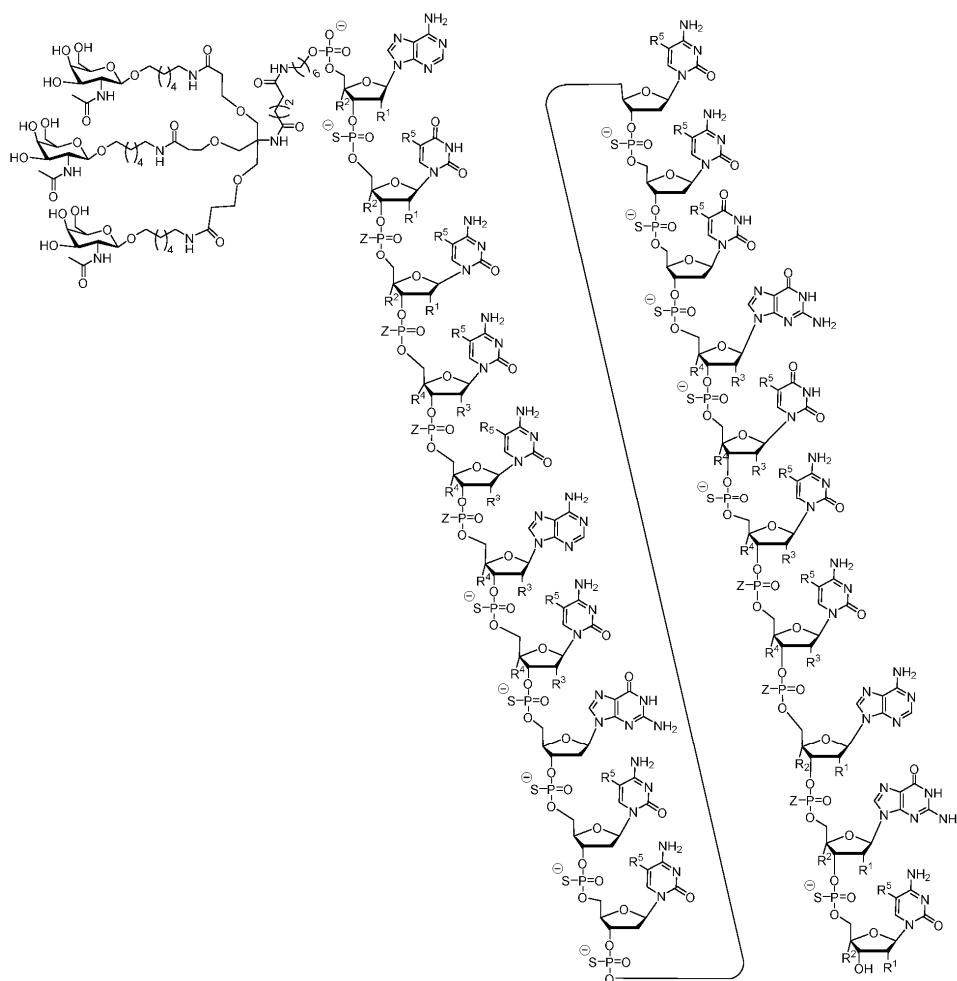
б) дезоксирибонуклеотиды.

15. Соединение по любому из пп.1-14, отличающееся тем, что группа конъюгата связана с модифицированным олигонуклеотидом:

а) на 5' конце модифицированного олигонуклеотида или

б) на 3' конце модифицированного олигонуклеотида.

16. Соединение, характеризующееся формулой



где либо R^1 представляет собой $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ и R^2 представляет собой H; либо R^1 и R^2 вместе образуют мостик, где R^1 представляет собой $-\text{O}-$ и R^2 представляет собой $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ или $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, и R^1 и R^2 напрямую связаны так, что полученный мостик выбран из $-\text{O}-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ и $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$;

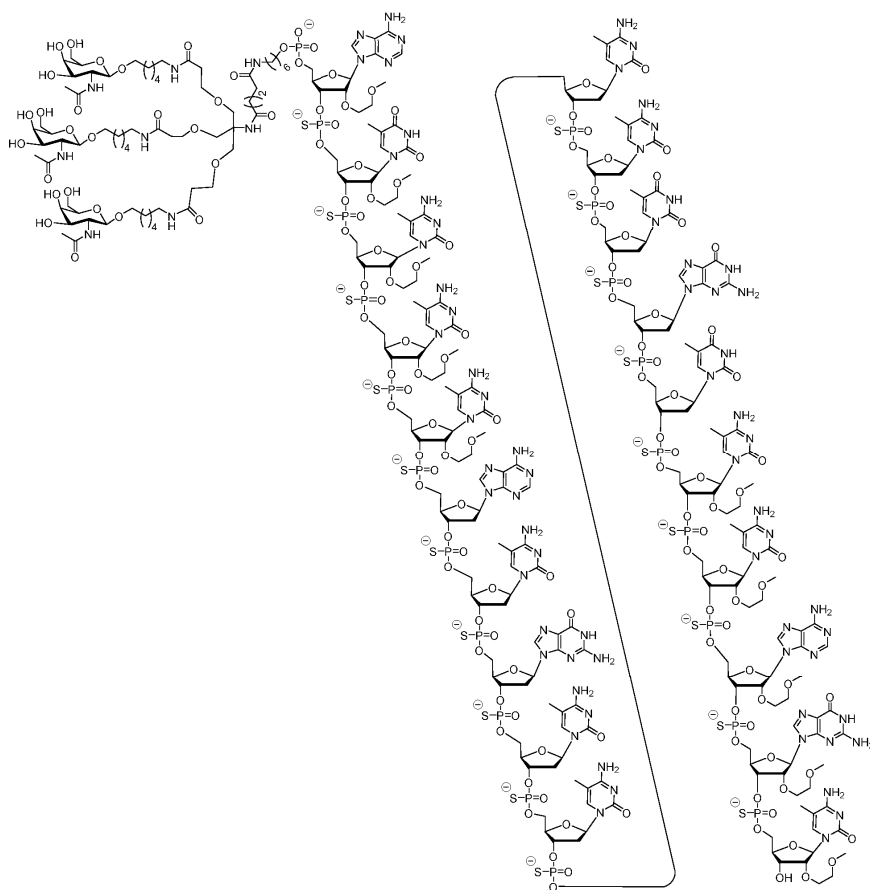
и для каждой пары R^3 и R^4 в одном кольце, независимо для каждого кольца: либо R^3 выбран из H и $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ и R^4 представляет собой H; либо R^3 и R^4 вместе образуют мостик, где R^3 представляет собой $-\text{O}-$, и R^4 представляет собой $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ или $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ и R^3 и R^4 напрямую связаны так, что полученный мостик выбран из $-\text{O}-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ и $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$; и

R^5 выбран из H и $-\text{CH}_3$; и

Z выбран из S^- и O^- ,

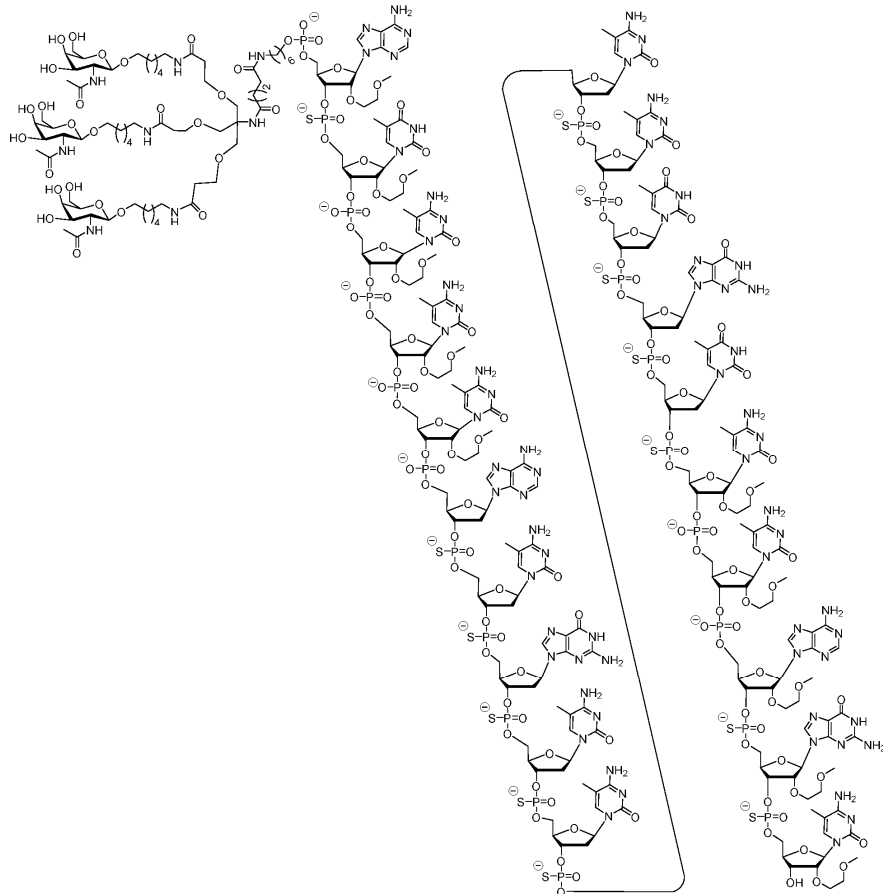
или его соль.

17. Соединение, характеризующееся формулой



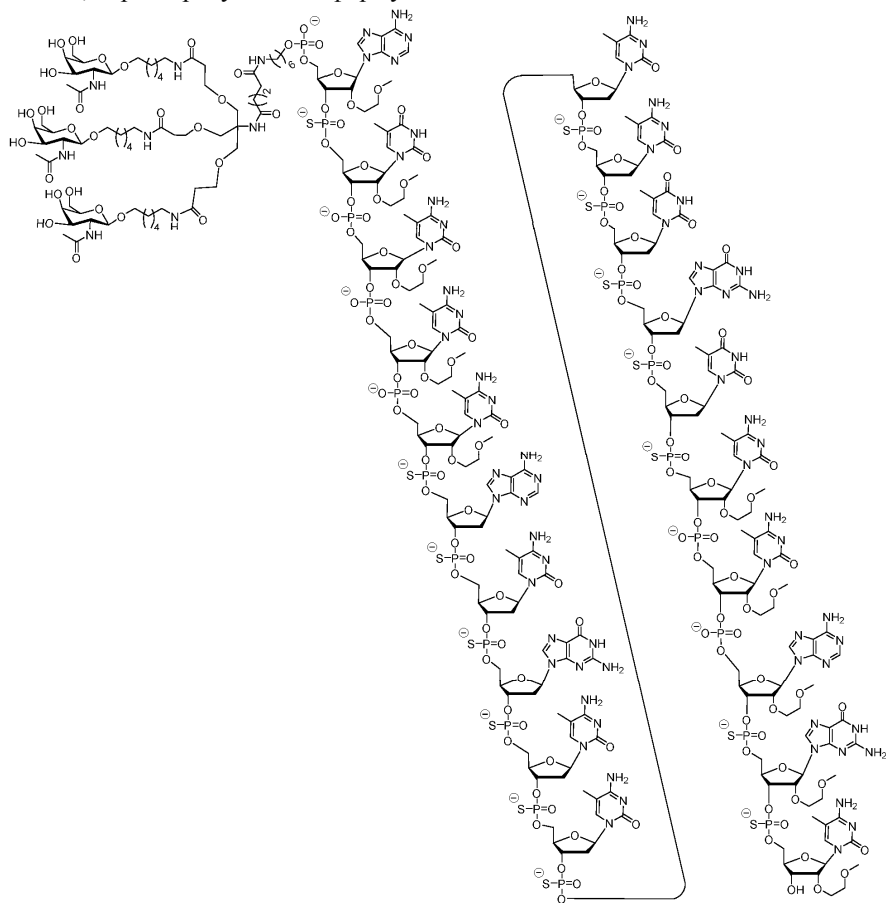
или его соль.

18. Соединение, характеризующееся формулой



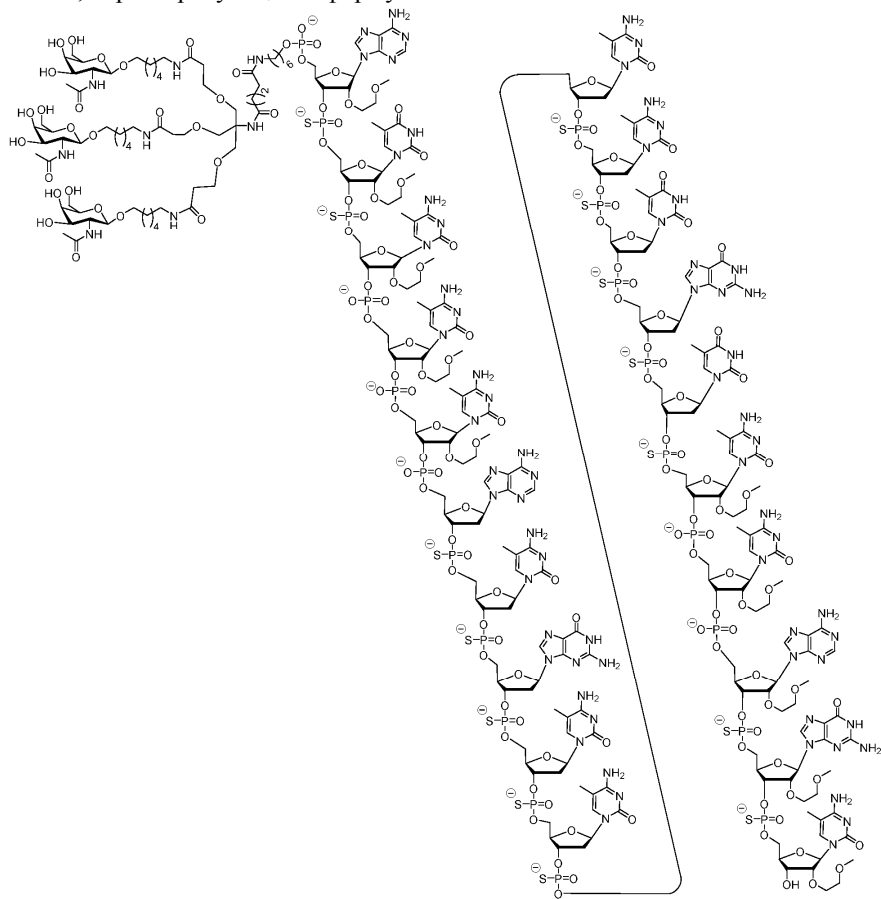
или его соль.

19. Соединение, характеризующееся формулой



или его соль.

20. Соединение, характеризующееся формулой



или его соль.

21. Композиция для лечения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, содержащая соединение по любому из пп.1-20 или его соль и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

22. Способ лечения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента, у субъекта, включающий введение субъекту соединения по любому из пп.1-20, тем самым обеспечивая лечение заболевания.

23. Способ по п.22, отличающийся тем, что заболевание представляет собой дегенерацию желтого пятна, возрастную дегенерацию желтого пятна (AMD), влажную AMD, сухую AMD или географическую атрофию.

24. Способ по п.22, отличающийся тем, что заболевание представляет собой болезнь почек.

25. Способ по п.24, отличающийся тем, что болезнь почек представляет собой волчаночный нефрит, системную красную волчанку (SLE), болезнь плотного осадка (DDD), C3 гломерулонефрит (C3GN), CFHR5 нефропатию или атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS).

26. Применение соединения по любому из пп.1-20 для лечения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента.

27. Применение по п.26, отличающееся тем, что заболевание представляет собой дегенерацию желтого пятна, возрастную дегенерацию желтого пятна (AMD), влажную AMD, сухую AMD или географическую атрофию.

28. Применение по п.26, отличающееся тем, что заболевание представляет собой болезнь почек.

29. Применение по п.28, отличающееся тем, что болезнь почек представляет собой волчаночный нефрит, болезнь плотного осадка (DDD), C3 гломерулонефрит (C3GN), CFHR5 нефропатию или атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS).

30. Применение соединения по любому из пп.1-20 в производстве лекарственного средства для лечения заболевания, связанного с дисрегуляцией альтернативного пути комплемента.

31. Применение по п.30, отличающееся тем, что заболевание представляет собой дегенерацию желтого пятна, возрастную дегенерацию желтого пятна (AMD), влажную AMD, сухую AMD или географическую атрофию.

32. Применение по п.30, отличающееся тем, что заболевание представляет собой болезнь почек.

33. Применение по п.32, отличающееся тем, что болезнь почек представляет собой волчаночный нефрит, болезнь плотного осадка (DDD), C3 гломерулонефрит (C3GN), CFHR5 нефропатию или атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS).

