

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090720 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.07.07

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)
A61K 47/26 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.09.14

(54) ПРОИЗВОДНЫЕ GalNAc

(31) 62/558,773

(32) 2017.09.14

(33) US

(86) PCT/IB2018/057082

(87) WO 2019/053661 2019.03.21

(88) 2019.05.02

(71) Заявитель:
ЯНССЕН БАЙОФАРМА, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Грязнов Сергей, Хун Цзинь,
Раджванши Вивек Кумар, Пандей
Раджендра К. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Раскрыты модифицированные олигонуклеотиды, содержащие функциональную группу GalNAc настоящего изобретения, а также способы их изготовления и применения, например против ВГВ.

202090720 A1

202090720

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-562016RU/017

ПРОИЗВОДНЫЕ GalNAc

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА СМЕЖНЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка является заявкой США, испрашивающей преимущество приоритета по предварительной заявке США № 62/558,773, поданной 14 сентября 2017 года, которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Рассматривается возможность использования терапии антисмысловыми олигонуклеотидами для лечения или профилактики различных заболеваний и состояний, таких как вирусные заболевания, неврологические заболевания, нейродегенеративные заболевания, фиброзные заболевания, гиперпролиферативные заболевания.

[0003] Определенные вирусные заболевания, такие как вирус гепатита В (ВГВ), по-прежнему недоступны для традиционной терапии, при этом они продолжают инфицировать около 240 миллионов человек (определяемых как поверхностный антиген ВГВ в течение как минимум 6 месяцев) и являются одной из причин смерти более 686 000 человек ежегодно. Стандартные способы терапии, включая пероральное противовирусное введение аналогов нуклеотида, таких как тенофовир или энтекавир, только подавляют репликацию вируса и не излечивают инфекцию ВГВ. Таким образом, даже те, кто лечатся доступными средствами терапии ВГВ, должны продолжать лечение на протяжении всей жизни.

[0004] Олигонуклеотиды могут связываться с комплементарной последовательностью РНК или ДНК. Эта особенность позволяет олигонуклеотидам связывать специфические мишени нуклеиновых кислот, вовлеченные в определенные аспекты клеточных процессов, таких как метаболизм, дифференцировка, пролиферация и репликация, а также репликация вируса, такая как репликация ВГВ.

[0005] N-ацетилгалактозамин (GalNAc) конъюгирован с олигонуклеотидами либо непосредственно, либо посредством линкера, чтобы способствовать направлению олигонуклеотида к его предполагаемой клеточной мишени и улучшить его поглощение клеткой.

[0006] В данной области техники существует потребность в обнаружении и разработке новых способов лечения, обладающих улучшенной специфичностью и эффективностью при введении.

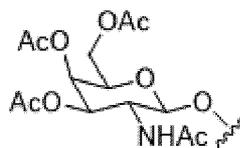
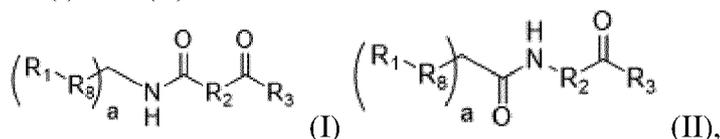
ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Настоящее описание относится к фрагментам GalNAc, способам получения и способам применения при нацеливании на олигонуклеотиды, с которыми они конъюгированы с клетками, такими как гепатоциты.

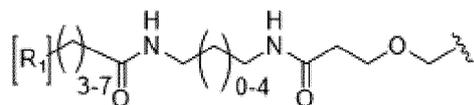
[0008] Настоящее описание относится к конструкции, содержащей по меньшей мере одну олигонуклеотидную цепь, имеющую по меньшей мере одну функциональную группу GalNAc, присоединенный к указанной цепи, где каждая функциональная группа

GalNAc независимо выбрана из групп от GalNAc 1 до GalNAc 13. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа GalNAc представляет собой GalNAc-2. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа GalNAc представляет собой GalNAc-6. В некоторых вариантах по меньшей мере одна функциональная группа GalNAc конъюгирована с по меньшей мере одной из олигонуклеотидных цепей посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой линкер C6-NH₂. В некоторых вариантах воплощения олигонуклеотидная последовательность имеет аффинность к транскрипту РНК ВГВ или является по существу комплементарной этому транскрипту. В некоторых вариантах осуществления указанная конструкция содержит одну олигонуклеотидную цепь. В некоторых вариантах осуществления указанная конструкция содержит две олигонуклеотидные цепи. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа GalNAc химически присоединена к 3'- и 5'-концам цепи олигонуклеотида.

[0009] Настоящее описание также относится к соединению, имеющему структуру формулы (I) или (II):



где R₁ представляет собой алкильную группу, C₃-C₁₀ алкилоксидную группу, имеющую 1-5 атомов кислорода или

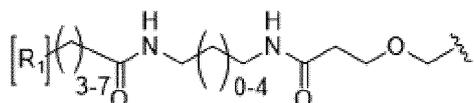


; R₂ представляет собой C₃-C₁₀ алкильную группу или C₃-C₁₀ алкилоксидную группу, имеющую 1-5 атомов кислорода; R₃ представляет собой H,

PG', $\left(\text{L} \right)_{0-1}$ или $\text{N} \begin{array}{l} \text{R}_4 \\ | \\ \text{R}_5 \end{array}$, где PG' представляет собой защитную группу; R₄

представляет собой H; R₅ представляет собой $\text{---} \text{C} \begin{array}{l} \text{OR}_7 \\ | \\ \text{C} \end{array} \text{---} \text{OR}_8$, где R₆ представляет собой защитную группу или связь с олигонуклеотидом посредством необязательного линкера и/или фосфорамидатной связи или связи на основе сложного фосфодиэфира; R₇ представляет собой H, линкер на твердой подложке (например, сукцинат) или -PH(O)CH₂CH₂CN; или R₄ и R₅ вместе образуют 5- или 6-членное кольцо, необязательно замещенное CH₂OPG; PG представляет собой спиртозащитную группу; L представляет собой линкерную функциональную группу; a представляет собой целое число 1-3; и b представляет собой целое число 1-4. В некоторых вариантах осуществления R₂

представляет собой C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 или C10 алкил. В некоторых вариантах осуществления R_8 представляет собой C3-C10 алкилоксидную группу, которая содержит 2-5 этиленоксидных групп. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой линкер C6-NH₂. В некоторых вариантах осуществления a равно 1. В некоторых вариантах осуществления a равно 3. В некоторых вариантах осуществления b равно 2 или 3. В некоторых вариантах осуществления PG представляет собой DMTr. В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой соединение формулы (I). В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой соединение формулы (II). В некоторых вариантах осуществления R_8 представляет собой:

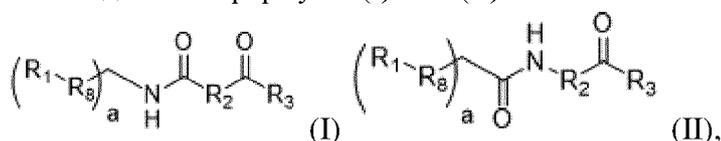


В некоторых вариантах осуществления PG выбран из трет-бутилдиметилсилилового эфира (TBMDS), трет-бутилдифенилсилила (TBDPS), триизопропилсилилового эфира (TIPS), монометокситритила (MMTr), 4,4'-диметокситритила (DMTr) или тритолила. В некоторых вариантах осуществления R_6 представляет собой связь с олигонуклеотидом посредством линкера и/или фосфорамидатной связи или связи на основе сложного фосфодиэфира. В некоторых вариантах R_6 включает фосфорамидатную связь. В некоторых вариантах осуществления R_6 включает связь на основе сложного фосфодиэфира.

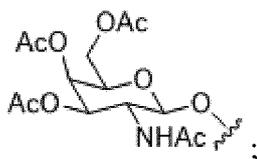
ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0010] Настоящее изобретение относится к одной или нескольким группам GalNAc, конъюгированным с олигонуклеотидом. Настоящее описание дополнительно направлено на способы использования и получения фрагментов GalNAc и их конъюгирования с олигонуклеотидами.

[0011] Некоторые варианты осуществления функциональной группы GalNAc включают соединение формулы (I) или (II):

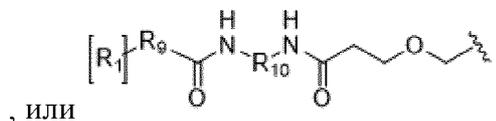
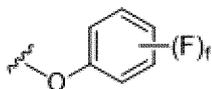
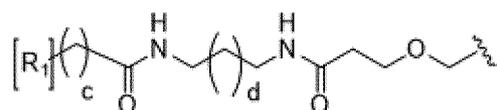


где

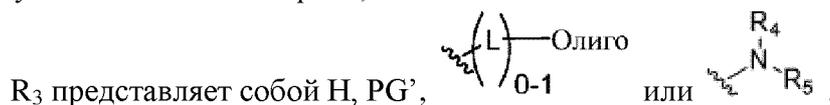


R_1 представляет собой

R_8 представляет собой C₂-C₁₀ алкильную группу, C₃-C₁₀ алкилоксидную группу, имеющую 1-5 атомов кислорода,



R_2 представляет собой C_2 - C_{10} алкильную группу или C_3 - C_{10} алкилоксидную группу, имеющую 1-5 атомов кислорода;



R_4 представляет собой H;



R_6 представляет собой защитную группу или линкер с олигонуклеотидом через необязательный линкер и/или фосфорамидатную связь или связь на основе сложного фосфодиэфира;

R_7 обозначает H, линкер на твердой подложке (например, сукцинат) или $-PH(O)CH_2CH_2CN$;

R_9 представляет собой C_2 - C_{10} -алкильную группу или C_3 - C_{10} -алкилоксидную группу, имеющую 1-5 атомов кислорода;

R_{10} представляет собой C_2 - C_{10} -алкильную группу или C_3 - C_{10} -алкилоксидную группу, имеющую 1-5 атомов кислорода;

или R_4 и R_5 вместе образуют 5- или 6-членное кольцо, необязательно замещенное CH_2OPG ;

PG представляет собой спиртозащитную группу;

PG' представляет собой защитную группу;

L представляет собой линкерную функциональную группу;

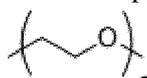
a представляет собой целое число 1-3;

b представляет собой целое число 1-4;

c представляет собой целое число 3-7; и

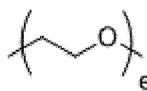
d представляет собой целое число 0-4.

[0012] В некоторых вариантах изобретения, R_2 , R_9 и/или R_{10} представляют собой C_2 , C_3 , C_4 , C_5 , C_6 , C_7 , C_8 , C_9 или C_{10} алкил. В некоторых вариантах осуществления C_3 - C_{10} алкилоксидная группа содержит 2-5 этиленоксидных групп. Например, C_3 - C_{10} алкилоксидная группа может содержать следующую повторяющуюся группу:



и необязательно дополнительные алкиленовые группы, где e равно 1-5.

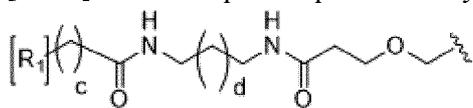
В некоторых вариантах осуществления e представляет собой 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления, R_8 представляет собой C_2 , C_3 , C_4 , C_5 , C_6 , C_7 , C_8 , C_9 или C_{10} алкил. В некоторых вариантах осуществления C_3 - C_{10} алкилоксидная группа содержит 2-5 этиленоксидных групп. Например, C_3 - C_{10} алкилоксидная группа может содержать следующую повторяющуюся группу:



и необязательно дополнительные алкиленовые группы, где e равно 1-5.

В некоторых вариантах осуществления a равно 1. В некоторых вариантах осуществления a равно 3. В некоторых вариантах осуществления b равно 2 или 3. В некоторых вариантах осуществления e представляет собой 1, 2, 3, 4 или 5.

[0013] В некоторых вариантах осуществления R_8 представляет собой:

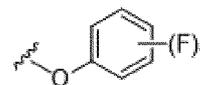


, где алкиленовые цепи содержат следующее

число атомов углерода (c,d): (3,0), (3,1), (3,2), (3,3), (3,4), (4,0), (4,1), (4,2), (4,3), (4,4), (5,0), (5,1), (5,2), (5,3), (5,4), (6,0), (6,1), (6,2), (6,3), (6,4), (7,0), (7,1), (7,2), (7,3) или (7,4).

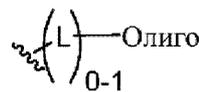
[0014] В некоторых вариантах осуществления PG может включать спиртозащитную группу, такую как силильную защитную группу (например, трет-бутилдиметилсилиловый эфир (TBMDS), трет-бутилдифенилсилан (TBDPS), триизопропилсилиловый эфир (TIPS)) или монометокситритил (MMTr) или 4,4'-диметокситритил (DMTr) или тритолил или любые другие подходящие защитные группы, такие как описанные в Wuts, Peter GM и Theodora W. Greene. Greene's protective groups in organic synthesis. John Wiley & Sons, 2006.

[0015] В некоторых вариантах осуществления PG' представляет собой защитную



группу, например, в некоторых случаях PG' может включать , где f представляет собой целое число 1-5. В некоторых вариантах, f представляет собой 1, 2, 3, 4 или 5.

[0016] В некоторых вариантах R_3 представляет собой

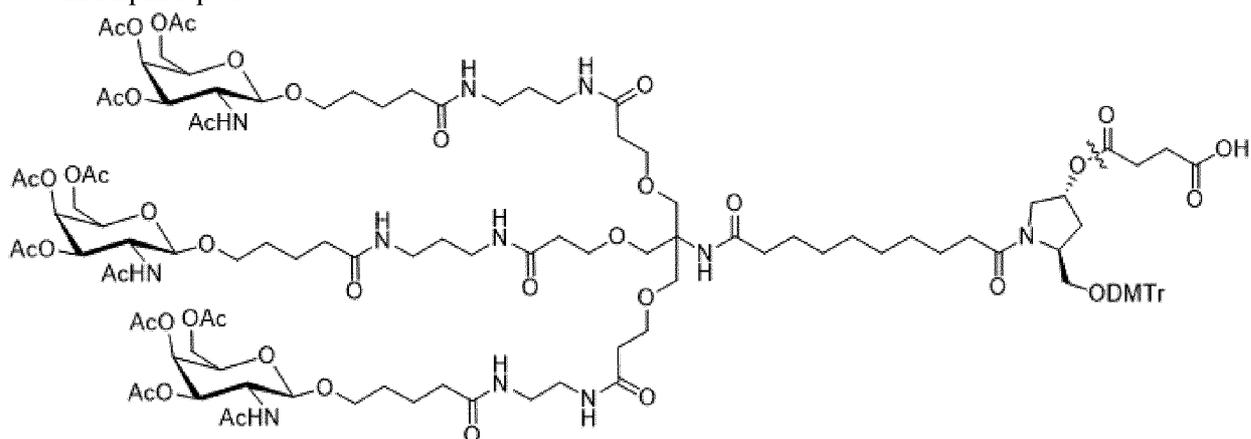


Олигонуклеотид конкретно не ограничен и может представлять собой любой олигонуклеотид, такой как антисмысловый олигонуклеотид или миРНК-олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления необязательный линкер представляет собой линкер C_1 - C_8 - NH_2 , например линкер C_6 - NH_2 .

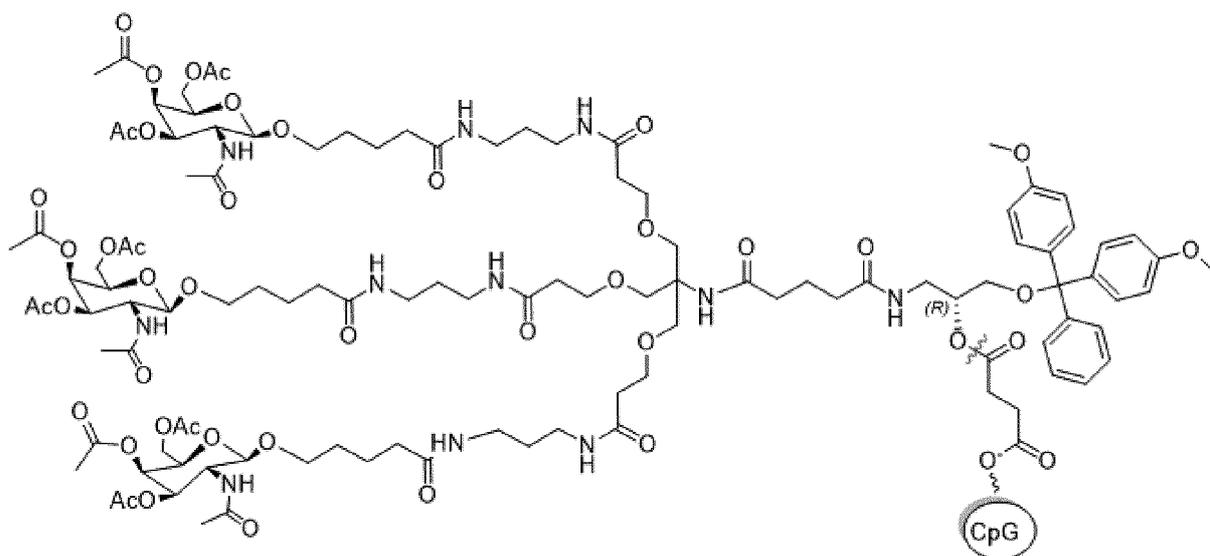
[0017] В некоторых вариантах осуществления R_6 представляет собой связь с олигонуклеотидом посредством линкера и/или фосфорамидатной связи или связи на

основе сложного фосфодиэфира. В некоторых вариантах R_6 включает фосфорамидатную связь. В некоторых вариантах осуществления R_6 включает связь на основе сложного фосфодиэфира.

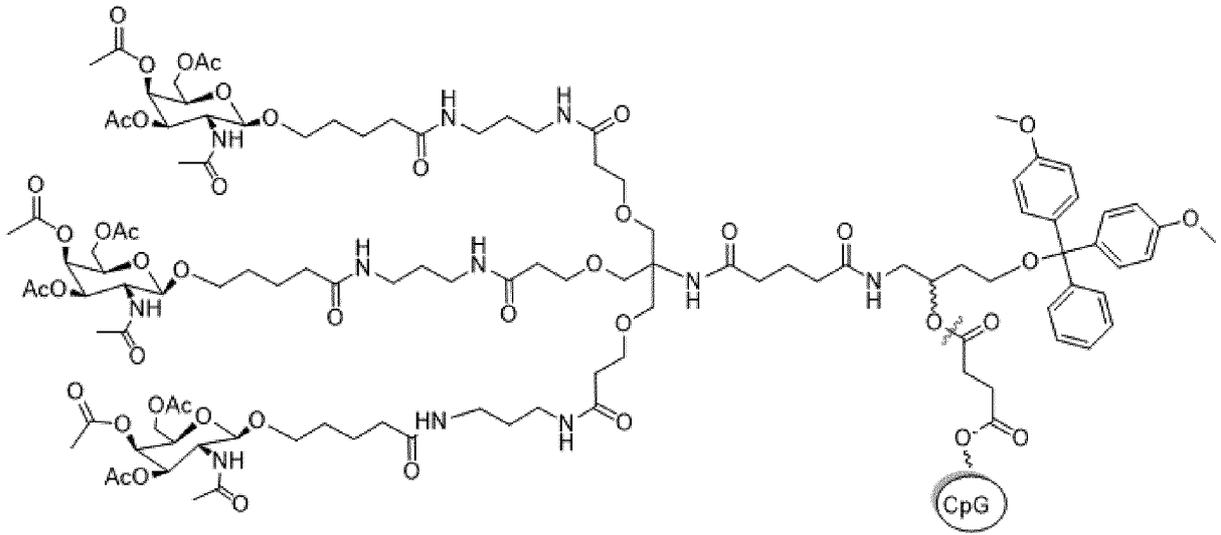
[0018] В некоторых вариантах осуществления функциональная группа GalNAc является одной из следующих. На данном изображении заштрихованная линия представляет конечную точку расщепления после связывания с нуклеотидом или олигонуклеотидом, и, таким образом, оставшаяся часть соединения не будет присутствовать в конечном GalNAc-замещенном олигонуклеотиде. Это иллюстрируется в рабочих примерах:



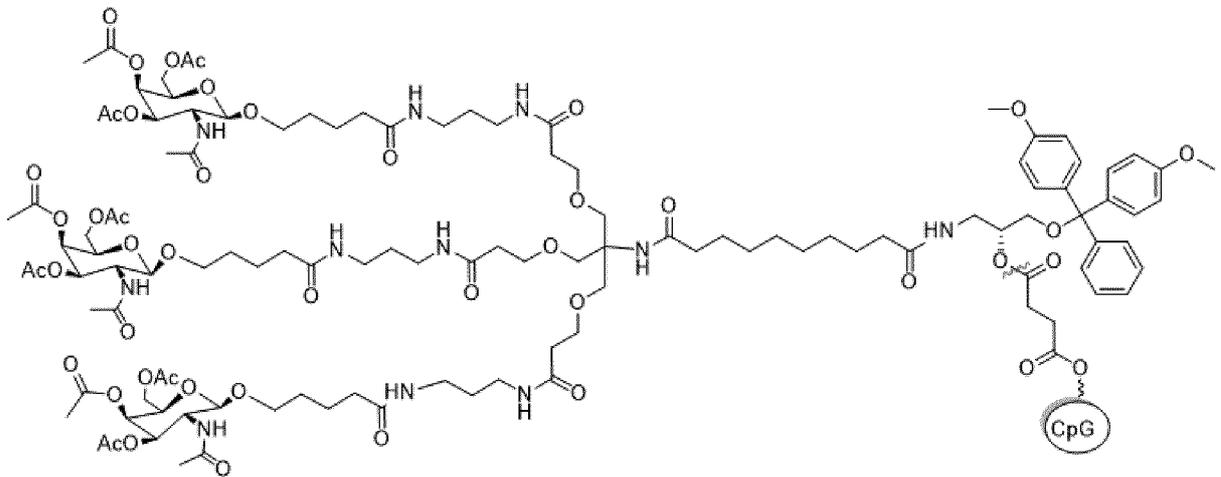
GalNAc-1



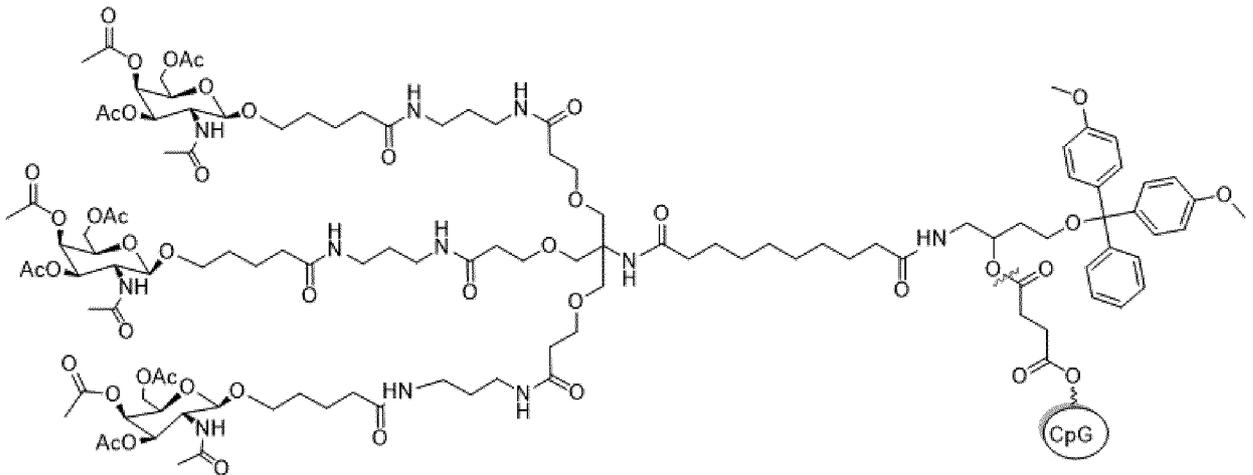
GalNAc-2-CPG



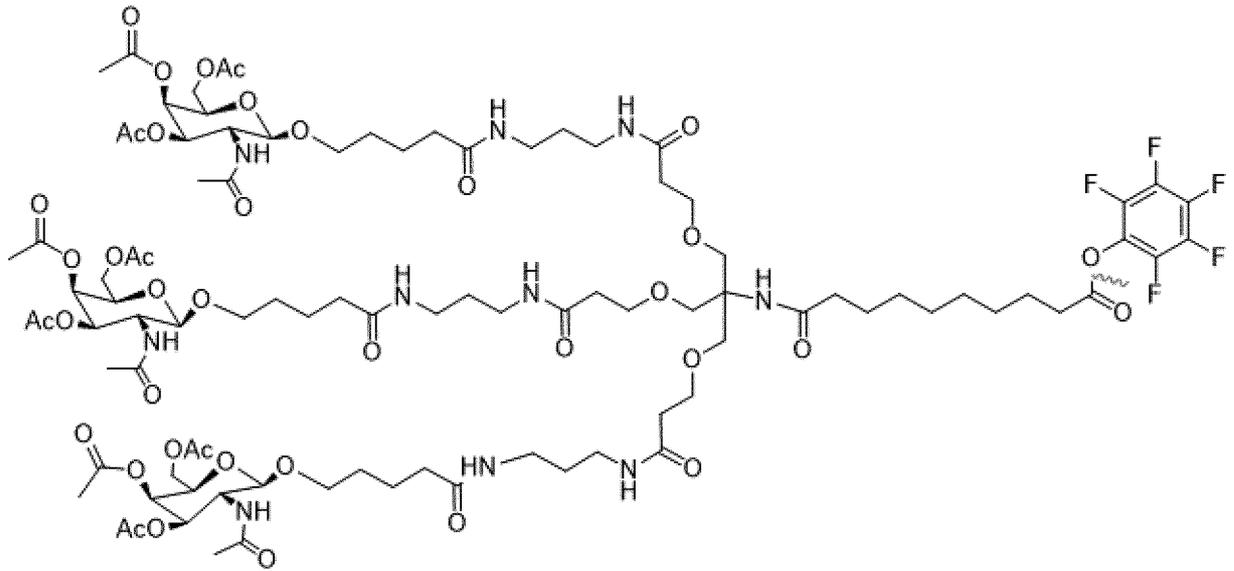
GalNAc-3



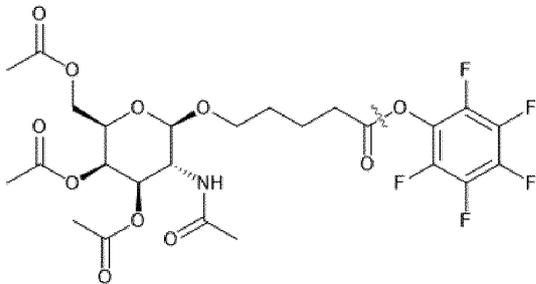
GalNAc-4



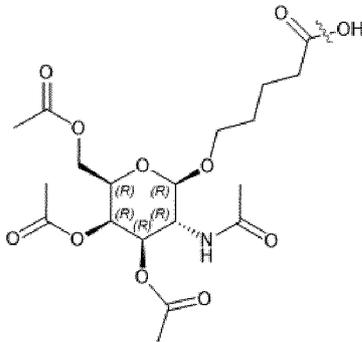
GalNAc-5



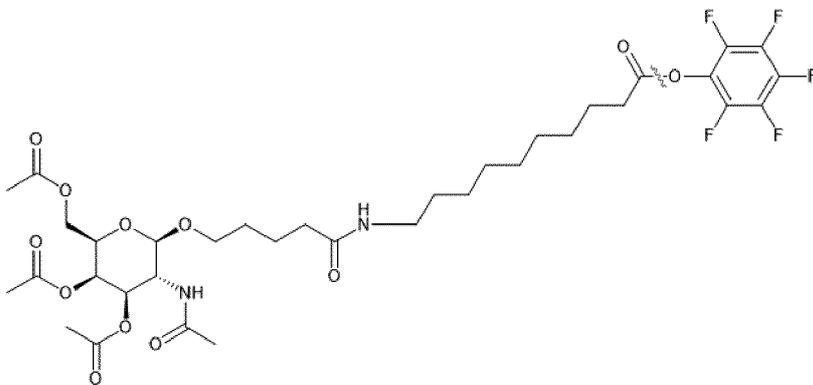
GalNAc-6



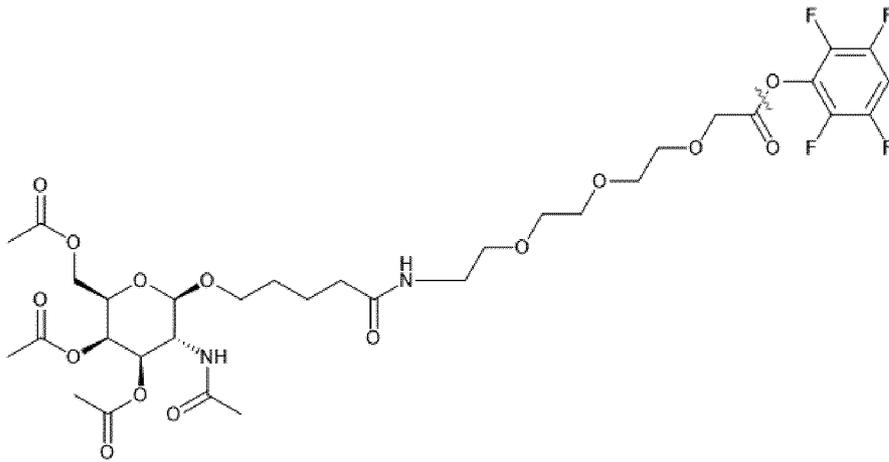
GalNAc-7



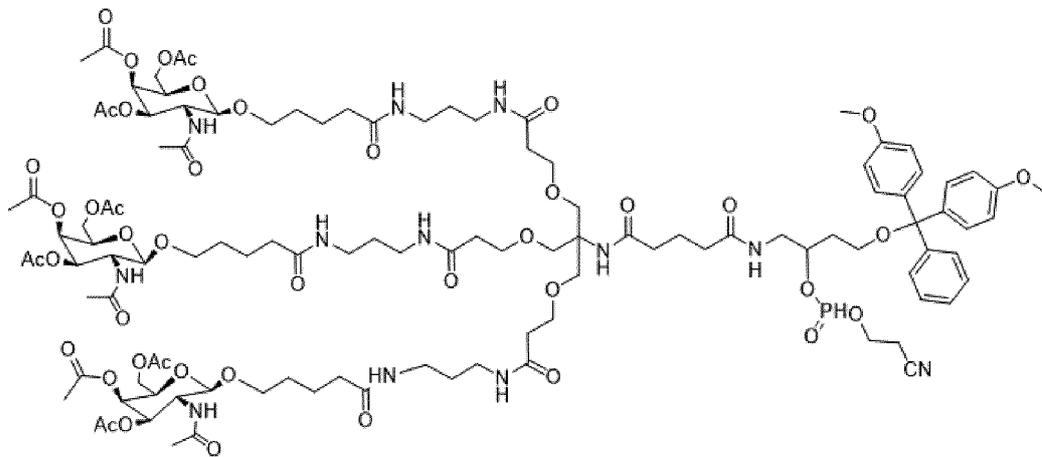
GalNAc-8



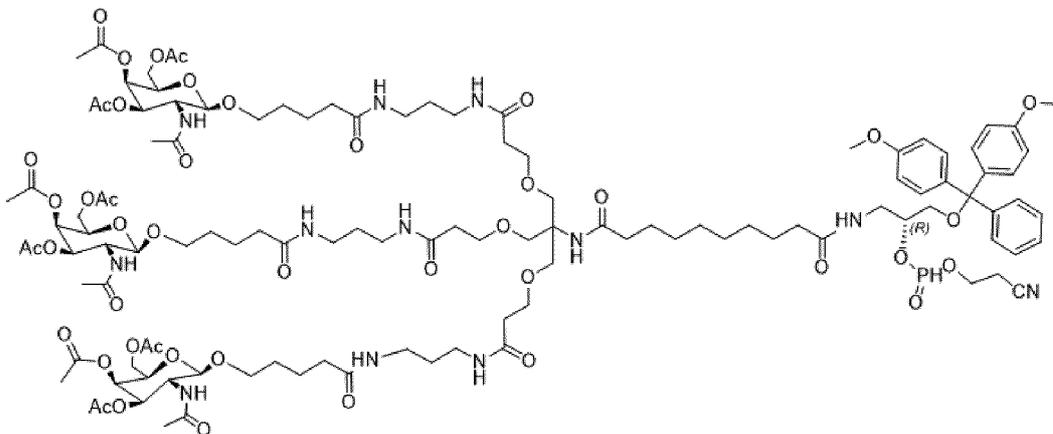
GalNAc-9



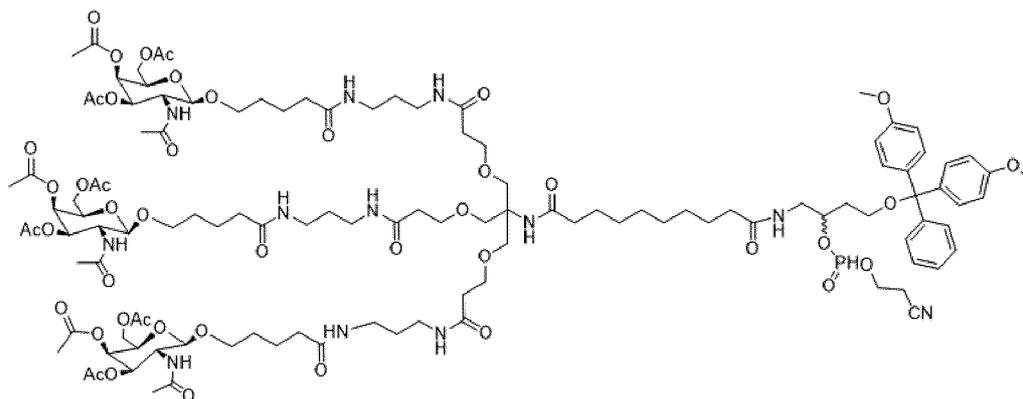
GalNAc-10



GalNAc-11



GalNAc-12

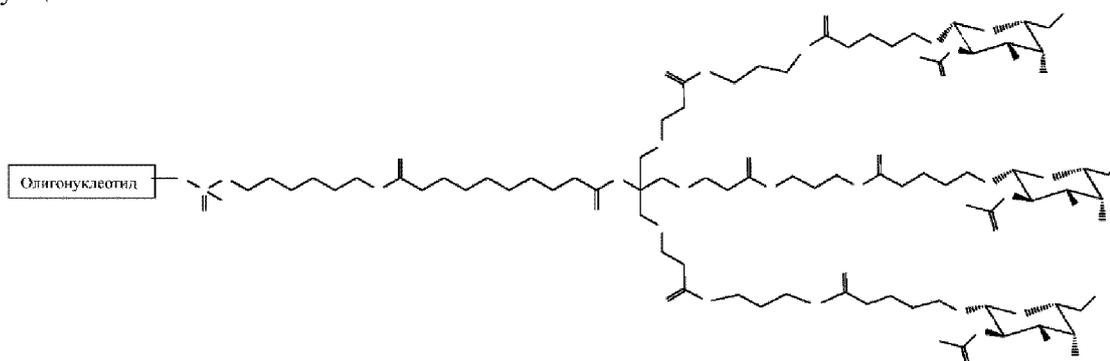


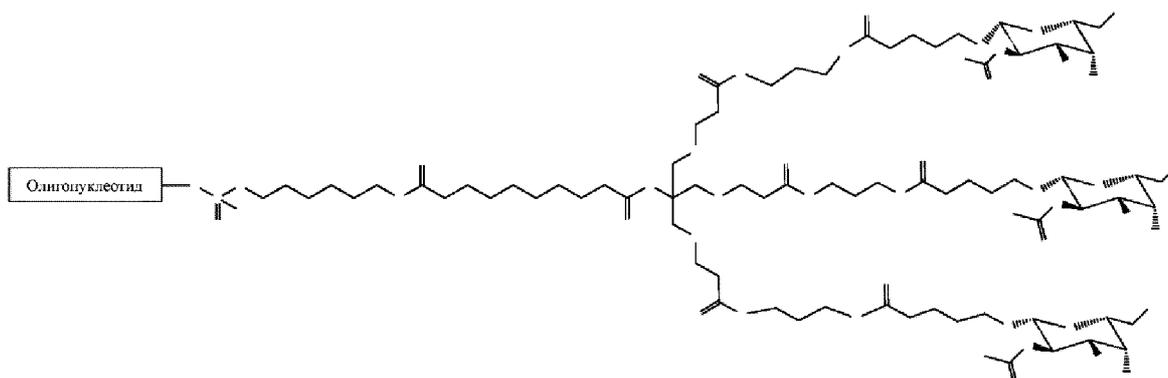
GalNAc-13

[0019] В некоторых вариантах осуществления группа GalNAc содержит сукцинатную функциональную группу или линкер на твердой подложке. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа GalNAc включает фторфениловый сложный эфир (например, пентафторфениловый сложный эфир), где 3'- или 5'-конец олигонуклеотида может быть присоединен химически. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа GalNAc включает Н-фосфонат, где 3'- или 5'-конец олигонуклеотида может быть присоединен химически. Дальнейшее подробное раскрытие таких функциональных групп может быть найдена в рабочих примерах.

Конъюгированный GalNAc

[0020] В вариантах осуществления изобретения олигонуклеотид связан с целевой группой посредством линкера, такого как аминокалькильный линкер (например, C₆-NH₂). Например, GalNAc1-13 или формула (I) или (II) могут быть связаны с олигонуклеотидом посредством линкера этого типа. Например, в вариантах осуществления 3'-конец олигонуклеотида присоединяется посредством фосфорамидатной связи или связи на основе сложного фосфодиэфира к C₆-аминолинкеру, дополнительно связанному с GalNAc, таким как GalNAc-1-13, или формулой (I) или (II), как указано выше в следующих конструкциях:





[0021] Олигонуклеотиды, содержащие функциональную группу GalNAc настоящего изобретения, также могут включать модифицированную или немодифицированную олигонуклеотидную последовательность, такую как последовательность, описанную в WO 2018/053185, которая включена в качестве ссылки во всей своей полноте.

[0022] Примерные олигонуклеотиды, содержащие функциональную группу GalNAc настоящего изобретения, включают те, которые перечислены в примерах.

[0023] В одном аспекте описания раскрытые в данном документе олигонуклеотидные последовательности конъюгированы или модифицированы на одном или обоих концах функциональной группой GalNAc настоящего изобретения, необязательно присоединенной посредством линкерной группы. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотидная цепь содержит функциональную группу GalNAc настоящего изобретения, конъюгированную на 5'- и/или 3'-конце посредством необязательного линкера. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа GalNAc настоящего изобретения конъюгирована на 3'-конце цепи олигонуклеотида. Связывающие фрагменты настоящего изобретения могут также включать HEG-линкер или C6-амиолинкер.

[0024] В некоторых вариантах осуществления функциональная группа GalNAc усиливает активность, клеточное распределение или клеточное поглощение олигонуклеотида клетками определенного типа, например гепатоцитами.

[0025] В некоторых вариантах осуществления композиций и способов настоящего изобретения лиганд представляет собой одно или несколько связанных производных GalNAc, таких как два или три производных GalNAc, связанных с олигонуклеотидом посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера соответственно.

Композиции

[0026] Настоящее описание также охватывает фармацевтические композиции, содержащие GalNAc-замещенные олигонуклеотиды настоящего описания. Один вариант осуществления представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую олигонуклеотид настоящего раскрытия и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

[0027] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая GalNAc-замещенный олигонуклеотид настоящего изобретения, составлена

для системного введения посредством парентеральной доставки. Парентеральный способ введения включает внутривенное, внутриартериальное, подкожное, внутривентральное или внутримышечное введение, или инъекцию, или инфузию; кроме того, подкожное введение, например посредством имплантированного устройства. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая олигонуклеотид настоящего описания, составлена для подкожной (п/к) или внутривенной (в/в) доставки. Составы для парентерального введения могут включать в себя стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферные растворы, разбавители и другие фармацевтически приемлемые добавки, как будет понятно специалисту в данной области. При внутривенном применении можно контролировать общую концентрацию растворенных веществ, чтобы обеспечить изотоничность препарата.

[0028] Фармацевтические композиции, содержащие GalNAc-замещенный олигонуклеотид настоящего изобретения, применимы для лечения заболевания или расстройства, например связанных с экспрессией или активностью гена ВГВ.

Способы применения

[0029] Один аспект настоящей технологии включает в себя способы лечения субъекта, у которого диагностировано наличие, предполагается наличие или имеется риск развития инфекции ВГВ и/или ВГВ-ассоциированного расстройства. В терапевтических сферах применения композиции, содержащие GalNAc-замещенные олигонуклеотиды настоящей технологии, вводят субъекту с подозрением или уже страдающему от такого заболевания (такого как, например, наличие поверхностного антигена ВГВ и антигенов оболочки (например, HBsAg и/или HBeAg) в сыворотке и/или печени субъекта или повышение концентрации ДНК ВГВ или уровня вирусной нагрузки ВГВ) в количестве, достаточном для лечения или по меньшей мере частичного прекращения симптомов заболевания, включая его осложнения и промежуточные патологические фенотипы при развитии заболевания.

[0030] В некоторых вариантах воплощения GalNAc-замещенные олигонуклеотиды настоящей технологии демонстрируют аффинность к по меньшей мере одной из следующих областей или РНК-транскриптов ВГВ из таблицы А.

Таблица А

Область	Целевые транскрипты ВГВ	РНК-Затронутые белки ВГВ
Pol/S	Pre-Core, Pg, Pre-S1, Pre-S2	HBeAg, HBcAg, полимеразы, большой HBsAg, средний HBsAg, малый HBsAg
Pol	Pre-Core, Pg, Pre-S1, Pre-S2	HBeAg, HBcAg, полимеразы, большой HBsAg, средний HBsAg, малый HBsAg
Pol/X	Pre-Core, Pg, Pre-S1, Pre-S2, X	HBeAg, HBcAg, полимеразы, большой HBsAg, средний HBsAg, малый HBsAg, HBxAg
DR1	Pre-Core, Pg, Pre-S1, Pre-	HBeAg, HBcAg, полимеразы, большой

	S2, X	HBsAg, средний HBsAg, малый HBsAg, HBxAg
DR2	Pre-Core, Pg, Pre-S1, Pre-S2, X	HBeAg, HBcAg, полимераза, большой HBsAg, средний HBsAg, малый HBsAg, HBxAg
Pre-PolyA	Pre-Core, Pg, Pre-S1, Pre-S2, X	HBeAg, HBcAg, полимераза, большой HBsAg, средний HBsAg, малый HBsAg, HBxAg

[0031] Субъекты, страдающие инфекцией ВГВ и/или ВГВ-ассоциированным расстройством, могут быть идентифицированы с помощью любого из диагностических или прогностических анализов, известных в данной области, или их комбинации. Например, типичные симптомы инфекции ВГВ и/или ВГВ-ассоциированного расстройства включают в себя, без ограничений, наличие сывороточного и/или печеночного антигена ВГВ (например, HBsAg и/или HBeAg), повышение АЛТ, повышение АСТ, отсутствие или низкую концентрацию антител к ВГВ, поражение печени, цирроз печени, гепатит дельта, острый гепатит В, острый молниеносный гепатит В, хронический гепатит В, фиброз печени, заболевание печени в конечной стадии, гепатоцеллюлярную карциному, сывороточно-подобный синдром, анорексию, тошноту, рвоту, субфебрильную температуру тела, миалгию, утомляемость, нарушение остроты вкуса и обоняния (отвращение к пище и сигаретам), боль в правом верхнем квадранте и эпигастрии (перемежающаяся, слабая или умеренная), печеночную энцефалопатию, сонливость, нарушения структуры сна, спутанность сознания, кому, асцит, желудочно-кишечное кровотечение, коагулопатию, желтуху, гепатомегалию (слегка увеличенная, мягкая печень), спленомегалию, ладонную эритему, звездчатые невусы, мышечную атрофию, звездчатые гемангиомы, васкулит, варикозное кровотечение, периферический отек, гинекомастию, атрофию яичек, коллатеральные вены на животе (голова медузы), высокие концентрации аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) (в пределах диапазона 1000-2000 Ед/мл), концентрации АЛТ больше концентраций АСТ, повышение концентраций гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТ) и/или щелочной фосфатазы (ЩФ), снижение концентрации альбумина, повышение концентрации сывороточного железа, лейкопению (т. е. гранулоцитопению), лимфоцитоз, увеличение скорости оседания эритроцитов (СОЭ), сокращение времени жизни эритроцитов, гемолиз, тромбоцитопению, удлинение международного нормализованного отношения (МНО), наличие ДНК ВГВ в сыворотке, повышение аминотрансфераз (< 5 раз по отношению к верхней границе нормы), увеличение концентрации билирубина, увеличение протромбинового времени (ПТ), гиперглобулинемию, наличие тканеспецифических антител, таких как антитела к гладким мышцам (ASMA) или антитела к ядрам (ANA), наличие тканеспецифических антител, таких как антитела к щитовидной железе, повышение концентрации ревматоидного фактора (РФ), гипербилирубинемия, снижение количества тромбоцитов и лейкоцитов, концентрация АСТ больше концентрации АЛТ,

лобулярный гепатит, сопровождающийся дегенеративными и регенеративными изменениями печеночных клеток, и преимущественно центролобулярный некроз печени.

[0032] В некоторых вариантах осуществления у субъектов, по отношению к которым проводили лечение содержащей нуклеотид композицией настоящей технологии, будет наблюдаться облегчение или исчезновение одного или более из следующих состояний или симптомов: наличие сывороточного и/или печеночного антигена ВГВ (например, HBsAg и/или HBeAg), отсутствие или низкая концентрация антител к ВГВ, поражение печени, цирроз печени, гепатит дельта, острый гепатит В, острый молниеносный гепатит В, хронический гепатит В, фиброз печени, заболевание печени в конечной стадии, гепатоцеллюлярная карцинома, сывороточно-подобный синдром, анорексия, тошнота, рвота, субфебрильная температура тела, миалгия, утомляемость, нарушение остроты вкуса и обоняния (отвращение к пище и сигаретам), боль в правом верхнем квадранте и эпигастрии (перемежающаяся, слабая или умеренная), печеночная энцефалопатия, сонливость, нарушения структуры сна, спутанность сознания, кома, асцит, желудочно-кишечное кровотечение, коагулопатия, желтуха, гепатомегалия (слегка увеличенная, мягкая печень), спленомегалия, ладонная эритема, звездчатые невусы, мышечная атрофия, звездчатые гемангиомы, васкулит, варикозное кровотечение, периферический отек, гинекомастия, атрофия яичек, коллатеральные вены на животе (голова медузы), концентрации АЛТ больше концентраций АСТ, лейкопения (т. е. гранулоцитопения), снижение концентрации альбумина, повышение концентрации сывороточного железа, лимфоцитоз, увеличение скорости оседания эритроцитов (СОЭ), сокращение времени жизни эритроцитов, гемолиз, тромбоцитопения, увеличение международного нормализованного отношения (МНО), наличие ДНК ВГВ в сыворотке, увеличение протромбинового времени (ПТ), гиперглобулинемия, наличие тканеспецифических антител, таких как антитела к гладким мышцам (ASMA) или антитела к ядрам (ANA), наличие тканеспецифических антител, таких как антитела к щитовидной железе, гипербилирубинемия, снижение количества тромбоцитов и лейкоцитов, концентрация АСТ больше концентрации АЛТ, лобулярный гепатит, сопровождающийся дегенеративными и регенеративными изменениями печеночных клеток, и преимущественно центролобулярный некроз печени.

[0033] В некоторых вариантах осуществления у субъектов, по отношению к которым проводили лечение содержащей олигонуклеотид композицией настоящей технологии, будет наблюдаться снижение уровней экспрессии одного или более биомаркеров, выбранных из аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), билирубина и ревматоидного фактора (РФ), по сравнению с субъектами, по отношению к которым не проводили лечение, страдающими инфекцией ВГВ и/или ВГВ-ассоциированным расстройством.

[0034] В настоящем описании предложен способ лечения субъекта, у которого диагностировано или предполагается наличие инфекции ВГВ и/или ВГВ-

ассоциированного расстройства, включающий введение субъекту эффективного количества содержащей олигонуклеотид композиции настоящей технологии.

[0035] Олигонуклеотиды и композиции настоящего изобретения могут использоваться в антисмысловой терапии. Например, олигонуклеотид может содержать последовательность нуклеотидных оснований, которая комплементарна целевой нуклеотидной последовательности известной вирусной ДНК или РНК, например, в ВГВ, или гибридизируется с ней.

[0036] Некоторые варианты осуществления включают способ модулирования экспрессии мишени путем приведения целевой нуклеиновой кислоты в контакт с антисмысловым соединением, содержащим олигонуклеотид настоящего описания. В некоторых вариантах осуществления целевая нуклеиновая кислота находится в клетке, например, в животном, таком как человек.

[0037] Некоторые варианты осуществления включают способ ингибирования экспрессии целевой РНК у животного, включающий введение животному антисмыслового соединения, содержащего олигонуклеотид настоящего описания. Олигонуклеотид может быть комплементарным или гибридизованным с частью целевой РНК.

[0038] Некоторые варианты осуществления включают способ снижения вирусной нагрузки у субъекта, инфицированного вирусом, включающий введение терапевтически эффективного количества олигонуклеотида или композиции настоящего описания нуждающемуся в этом субъекту, тем самым со снижением вирусной нагрузки у субъекта. Олигонуклеотид может быть комплементарным или гибридизованным с частью целевой РНК в вирусе.

[0039] Некоторые варианты осуществления включают способ ингибирования экспрессии вирусного гена в клетке или субъекте, включающий приведение клетки в контакт с олигонуклеотидом или композицией настоящего описания или введение терапевтически эффективного количества олигонуклеотида или композиции настоящего описания нуждающемуся в этом субъекту. Олигонуклеотид может быть комплементарным или гибридизованным с частью целевой РНК в вирусе.

[0040] Другие варианты осуществления включают способ снижения концентрации вирусного антигена у субъекта, инфицированного вирусом, включающий введение терапевтически эффективного количества олигонуклеотида или композиции настоящего описания нуждающемуся в этом субъекту, тем самым со снижением концентрации вирусного антигена у субъекта. Олигонуклеотид может быть комплементарным или гибридизованным с частью целевой РНК в вирусе.

[0041] Олигонуклеотиды и композиции настоящего описания можно применять, например, для ингибирования или снижения экспрессии гена вируса гепатита В (ВГВ), или ингибирования репликации вируса ВГВ, или для лечения субъекта, имеющего ВГВ, или для снижения вирусной нагрузки вирусом гепатита В (ВГВ) у субъекта, инфицированного ВГВ. В вариантах осуществления описанные химерные олигонуклеотиды используются для индуцирования активности РНКазы H в целевом гене.

[0042] Олигонуклеотиды и композиции настоящего описания можно применять, например, для конкуренции за сайт связывания микроРНК с РНК HCV, таким образом ингибируя репликацию.

[0043] Настоящее описание также относится к способам стабилизации олигонуклеотида для доставки субъекту. Стабилизация олигонуклеотида характеризуется [количественно оценивается] в настоящем документе по увеличению температуры плавления или температуры T_m олигонуклеотида.

[0044] Описанные конструкции олигонуклеотида можно вводить отдельно или в комбинации с одним или более дополнительными средствами нацеленной терапии. Описанные конструкции олигонуклеотида можно вводить отдельно или в комбинации с одним или более дополнительными средствами лечения инфекции ВГВ. При комбинированной терапии следует понимать, что конструкции олигонуклеотида и одно или более дополнительных средств лечения инфекции ВГВ можно вводить одновременно в одной или отдельных композициях или вводить отдельно, одновременно или последовательно.

[0045] В некоторых вариантах осуществления описанные конструкции олигонуклеотида вводят в комбинации с ингибиторами репликации ВГВ или иммуномодулирующими агентами или в схемах, которые сочетают олигонуклеотидные агенты к ВГВ как с ингибиторами репликации ВГВ, так и иммуномодулирующими агентами. В вариантах осуществления описанные конструкции олигонуклеотида вводят в комбинации со стандартным средством лечения инфекции ВГВ. Стандартные средства лечения инфекции ВГВ могут включать в себя ингибиторы вирусной полимеразы, такие как нуклеотиды/нуклеотидные аналоги (например, ламивудин, телбувидин, энтекавир, адефовир, тенофовир и клевудин, тенофовира алафенамид (TAF), CMX157 и AGX-1009) и интерфероны (например, Peg-IFN-2a и IFN-a-2b, интерферон лямбда). В вариантах осуществления описанные конструкции олигонуклеотида вводят в комбинации с одним или более олигонуклеотидами после одновременного (совместное введение) или последовательного дозирования. Олигонуклеотиды могут включать в себя миРНК, такие как ALN-HBV, ARB-1467, ARC-520 и ARC-521, антисмысловые олигонуклеотиды, такие как RG6004 (LNA HBV), Ionis-HBV_{Rx} и Ionis-HBV-L_{Rx}, миметики или ингибиторы миРНК, аптамеры, стерические ингибиторы, saRNA, shRNA, иммуномодулирующие и/или ингибирующие высвобождение HBsAg олигонуклеотиды, такие как REP 2139 и REP 2165. В вариантах осуществления описанные конструкции олигонуклеотида вводят в комбинации с одним или более противовирусными агентами, такими как ингибиторы репликации вируса. В вариантах осуществления описанные конструкции олигонуклеотида вводят в комбинации с ингибиторами капсида ВГВ. Ингибиторы капсида ВГВ могут включать в себя NVR 3-778, AB-423, GLS-4, Bayer 41-4109, NAP-1 и AT-1. В вариантах осуществления описанные конструкции олигонуклеотида вводят в комбинации с одним или более иммуномодуляторами, такими как агонисты TLR. Агонисты TLR могут включать в себя GS-9620, ARB-1598, ANA975, RG7795 (ANA773), MEDI9197, PF-3512676

и IMO-2055. В вариантах осуществления описанные конструкции олигонуклеотида вводят в комбинации с ингибиторами вакцины против ВГВ. Вакцины против ВГВ могут включать в себя HepIisIav, ABX203 и INO-1800. В вариантах осуществления описанные конструкции олигонуклеотида вводят в комбинации.

[0046] Некоторые варианты осуществления включают ингибирование экспрессии гена ВГВ в клетке или субъекте, включающий приведение клетки в контакт с олигонуклеотидом или композицией настоящего описания или введение терапевтически эффективного количества олигонуклеотида или композиции настоящего описания нуждающемуся в этом субъекту.

[0047] Некоторые варианты осуществления включают лечение заболевания или расстройства, ассоциированного с экспрессией или активностью гена ВГВ, включающее введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества олигонуклеотида или композиции настоящего описания.

[0048] Некоторые варианты осуществления включают способ снижения вирусной нагрузки вирусом гепатита В (ВГВ) у субъекта, инфицированного ВГВ, включающий введение терапевтически эффективного количества олигонуклеотида или композиции настоящего описания нуждающемуся в этом субъекту, тем самым со снижением вирусной нагрузки ВГВ у субъекта. В некоторых вариантах осуществления также предложены способы снижения вирусной нагрузки вирусом гепатита D (HDV) у субъекта, инфицированного HDV.

[0049] Другие варианты осуществления включают способ снижения концентрации антигена вируса гепатита В (ВГВ) у субъекта, инфицированного ВГВ, включающий введение терапевтически эффективного количества олигонуклеотида или композиции настоящего описания нуждающемуся в этом субъекту, тем самым со снижением концентрации антигена ВГВ у субъекта. В некоторых вариантах осуществления также предложены способы снижения концентрации антигена вируса гепатита D (HDV) у субъекта, инфицированного HDV. В некоторых вариантах осуществления антиген ВГВ представляет собой HBsAg или HBeAg.

[0050] В одном варианте осуществления олигонуклеотид или композицию настоящего описания, нацеленную на ВГВ, вводят субъекту, имеющему инфекцию ВГВ, или инфекцию ВГВ и HDV, и/или ВГВ-ассоциированное заболевание так, что экспрессия одного или более генов ВГВ, концентрация кзк ДНК ВГВ, концентрация антигена ВГВ, уровень вирусной нагрузки ВГВ, концентрация АЛТ и/или АСТ, например, в клетке, ткани, крови или другой ткани или жидкости субъекта уменьшается по меньшей мере на около 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%, 62%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на около 99% или более, или на значение, находящееся между этими числами, при введении

субъекту олигонуклеотида или композиции настоящего описания. В некоторых вариантах осуществления концентрация антигена ВГВ снижена на ранее указанную величину. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой HBsAg или HBeAg. В некоторых вариантах осуществления уровень вирусной нагрузки ВГВ снижен на ранее указанную величину.

[0051] В одном варианте осуществления олигонуклеотид или композицию настоящего описания, нацеленную на ВГВ, вводят субъекту, имеющему инфекцию ВГВ, или инфекцию ВГВ и HDV, и/или ВГВ-ассоциированное заболевание так, что концентрация антител к ВГВ, например, в клетке, ткани, крови или другой ткани или жидкости субъекта увеличивается по меньшей мере на около 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%, 62%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на около 99% или более, или на значение, находящееся между этими числами, при введении субъекту олигонуклеотида или композиции настоящего описания.

[0052] Введение олигонуклеотида или композиции настоящего описания в соответствии со способами и типами применения описания может приводить к снижению тяжести, признаков, симптомов и/или маркеров таких заболеваний или расстройств у пациента с инфекцией ВГВ, или с инфекцией ВГВ и HDV, и/или с ВГВ-ассоциированным заболеванием. Под «снижением» в данном контексте подразумевается статистически значимое снижение такой концентрации. Снижение может составлять, например, по меньшей мере около 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или около 100% или значение между двумя этими величинами.

[0053] Количество олигонуклеотида или композиции настоящего описания может быть определено медицинским специалистом. Суточная доза препаратов может варьироваться в широких пределах, составляющих от 0,001 до 1000 мг/кг в сутки для взрослого пациента или в иных дозах в этих пределах. Для перорального введения композиции предпочтительно предложены в форме таблеток, содержащих 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 150, 200, 250 и 500 миллиграмм активного компонента для симптоматического регулирования дозы у нуждающегося в лечении пациента. Эффективное количество лекарства обычно обеспечивается дозой на уровне приблизительно от 0,01 мг/кг до 100 мг/кг веса тела в сутки или в иных дозах в этих пределах. Предпочтительными являются дозы от около 0,01 до около 50,0 мг/кг веса тела в сутки или в иных дозах в этих пределах. Более предпочтительными являются дозы от около 0,01 до около 10,0 мг/кг веса тела в сутки в иных дозах в этих пределах. Более предпочтительными являются дозы от около 0,01 до около 1,0 мг/кг веса тела в сутки в иных дозах в этих пределах. Олигонуклеотиды можно вводить в режиме от 1 до 4 раз в

сутки. Например, олигонуклеотиды настоящего описания можно вводить в одной или более дозах от около 0,1 мг/кг до около 100 мг/кг. Например, описанные олигонуклеотиды можно вводить в дозе около 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к указанным значениям, также являются частью настоящего описания. Эти значения могут применяться к внутривенной инфузии и/или подкожной доставке. Эти дозы можно использовать также для других форм доставки, описанных в настоящем документе. Дозировки могут варьироваться в зависимости от потребностей пациентов, тяжести заболевания, по отношению к которому осуществляется лечение, и используемых олигонуклеотидов. Можно применять ежедневное введение или периодическую ревизию дозы.

[0054] Олигонуклеотиды настоящего описания можно вводить путем внутривенной инфузии в течение некоторого периода времени, например, в течение 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или в течение около 25 минут. Введение можно повторять, например, на регулярной основе, например еженедельно, дважды в месяц (т. е. каждые две недели) в течение одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев или дольше. После завершения начальной схемы лечение можно проводить реже. Например, после введения еженедельно или один раз в две недели в течение трех месяцев введение можно повторять один раз в месяц, в течение шести месяцев, или в течение года, или дольше.

[0055] Олигонуклеотиды настоящего описания также можно вводить путем подкожной доставки. Введение можно повторять, например, на регулярной основе, например еженедельно, дважды в месяц (т. е. каждые две недели) в течение одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев или дольше. После завершения начальной схемы лечение можно проводить реже. Например, после введения еженедельно или один раз в две недели в течение трех месяцев введение можно повторять один раз в месяц, в течение шести месяцев, или в течение года, или дольше.

[0056] Эффективность лечения или профилактики заболевания можно оценить, например, путем измерения прогрессирования заболевания, ремиссии заболевания, тяжести симптомов, снижения боли, качества жизни, дозы лекарственного средства, необходимой для поддержания терапевтического эффекта, концентрации маркера заболевания или любого другого измеряемого параметра, имеющего отношение к данному заболеванию, лечение или профилактика которого осуществляется. Специалист в данной области вполне способен отслеживать эффективность лечения или профилактики путем

измерения любого одного из таких параметров или любой комбинации параметров. Например, эффективность лечения СНВ можно оценить, например, путем периодического контроля уровня вирусной нагрузки и концентрации трансаминаз. Сравнение последующих показаний с исходными показаниями дает представление о том, является ли лечение эффективным.

Определения

[0057] Следует понимать, что в настоящем документе терминология служит только для цели описания конкретных вариантов осуществления и не должна рассматриваться как ограничивающая объем настоящего изобретения. Если не указано иное, применяются следующие определения.

[0058] При использовании в настоящем документе термины «комплементарный» или «комплементарность» в отношении полинуклеотидов (т. е. последовательности нуклеотидов, такой как олигонуклеотид или целевая нуклеиновая кислота) относятся к правилам спаривания оснований. При использовании в настоящем документе термин «комплементарный нуклеотидной последовательности» относится к олигонуклеотиду, который при выравнивании с нуклеотидной последовательностью так, что 5'-конец одной последовательности объединяется с 3'-концом другого, находится в «антипараллельной ассоциации». Например, последовательность 5'-A-G-T-3' комплементарна последовательности 3'-T-C-A-5. Некоторые основания, редко встречающиеся в нуклеиновых кислотах природного происхождения, могут быть включены в нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем документе. Они включают в себя, например, инозин, 7-дезагуанин, закрытые нуклеиновые кислоты (LNA) и пептидные нуклеиновые кислоты (PNA). Комплементарность не обязательно должна быть идеальной; стабильные дуплексы могут содержать несовпадающие пары оснований, дегенеративные или несоответствующие основания. Специалисты в области технологии нуклеиновых кислот могут определить дуплексную стабильность эмпирически с учетом ряда переменных, включая, например, длину олигонуклеотида, состав основания и последовательность олигонуклеотида, ионную силу и частоту несовпадающих пар оснований. Комплементарная последовательность может также представлять собой последовательность РНК, комплементарную последовательности ДНК или ее комплементарной последовательности, а также может представлять собой кДНК.

[0059] Используемый в настоящем документе термин «гибридизация» относится к способу, в котором две по существу комплементарные цепи нуклеиновых кислот (по меньшей мере приблизительно на 65% комплементарные на протяжении по меньшей мере от 14 до 25 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 75% или по меньшей мере приблизительно на 90% комплементарные) соединяют друг с другом в соответствующих жестких условиях с образованием дуплекса или гетеродрекса путем образования водородных связей между комплементарными парами оснований. Гибридизации, как правило и предпочтительно, проводят с молекулами нуклеиновых кислот длиной зонда, предпочтительно длиной 15-100 нуклеотидов, более предпочтительно длиной 18-50

нуклеотидов. Методики гибридизации нуклеиновых кислот хорошо известны в данной области. См., например, Sambrook, et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. На гибридизацию и прочность гибридизации (т. е. на прочность связи между нуклеиновыми кислотами) влияют такие факторы, как степень комплементарности между нуклеиновыми кислотами, жесткость используемых условий и температура плавления (T_m) образованного гибрида. Специалистам в данной области понятно, как оценить и скорректировать жесткость условий гибридизации так, что последовательности, имеющие по меньшей мере желаемый уровень комплементарности, будут стабильно гибридизироваться, в то время как те, которые имеют меньшую комплементарность, не будут стабильно гибридизироваться. Примеры условий и параметров гибридизации см., например, в Sambrook, et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y.; Ausubel, F. M. et al. 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Secaucus, N.J. В некоторых вариантах осуществления специфическая гибридизация происходит в жестких условиях гибридизации. Олигонуклеотид или полинуклеотид (например, зонд или праймер), специфичный к целевой нуклеиновой кислоте, будет «гибридизироваться» с целевой нуклеиновой кислотой в приемлемых условиях.

[0060] Используемый в настоящем документе термин «жесткие условия гибридизации» относится к условиям гибридизации, по меньшей мере не менее жестким, чем следующие условия: гибридизация в 50%-м формамиде, 5xSSC, 50 mM NaH_2PO_4 , pH 6,8, 0,5% SDS, 0,1 мг/мл обработанной ультразвуком ДНК молока лососевых и 5x раствора Денхардта при 42 °C в течение ночи; промывание 2x SSC, 0,1% SDS при 45 °C; и промывали 0,2x SSC, 0,1% SDS при 45 °C. В другом примере жесткие условия гибридизации не должны обеспечивать гибридизацию двух нуклеиновых кислот, которые отличаются на протяжении 20 смежных нуклеотидов более чем на два основания.

[0061] При использовании в настоящем документе термин «по существу комплементарный» означает, что две последовательности гибридизируются в жестких условиях гибридизации. Специалисту в данной области будет понятно, что по существу комплементарные последовательности не обязательно должны гибридизироваться по всей их длине. В частности, по существу комплементарные последовательности могут содержать непрерывную последовательность оснований, которая не гибридизуется с целевой последовательностью, расположенной к 3'- или к 5'-концу по отношению к непрерывной последовательности оснований, которая гибридизуется в жестких условиях гибридизации с целевой последовательностью.

[0062] Термин «фармацевтически приемлемый» относится к материалу, который не является биологически или иным образом нежелательным, например, материал может быть включен в фармацевтическую композицию, вводимую пациенту, так, чтобы он не вызывал каких-либо нежелательных биологических эффектов или не вступал в негативное взаимодействие с любыми другими компонентами композиции, в состав которой он

входит. Если термин «фармацевтически приемлемый» используется для обозначения фармацевтического носителя или эксципиента, подразумевается, что носитель или эксципиент удовлетворяет необходимым стандартам токсикологического и производственного тестирования или что он включен в руководство по неактивным компонентам, разработанное Управлением по надзору за пищевыми продуктами и медикаментами США.

[0063] «Конструкции» олигонуклеотидов могут относиться к олигонуклеотиду настоящего описания и, например, к (1) конъюгированной группе, такой как описанная в настоящем документе (например, нацеливающие функциональные группы) или (2) доменам модифицированных/немодифицированных нуклеотидов, таким как присутствующие в некоторых химерных олигонуклеотидах.

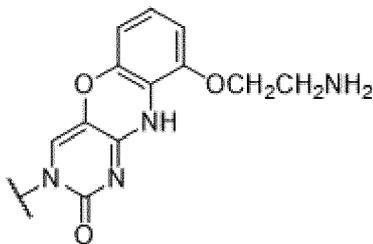
[0064] Термин «химерный олигонуклеотид» означает олигонуклеотид, имеющий более одного домена, например, как показано в формулах (VI) и (VII). Химерный олигонуклеотид может включать в себя дополнительные компоненты, например лигандную нацеливающую группу или фармакофор, или дополнительные нуклеотиды, линкеры и т. п.

[0065] Термин «модифицированный нуклеозид» означает нуклеозид, имеющий независимо модифицированную сахарную функциональную группу и/или модифицированное нуклеотидное основание. Следует понимать, что нуклеозиды могут быть связаны посредством связей между субъединицами, таких как фосфодиэфирные связи между субъединицами, тиофосфатные связи между субъединицами, фосфорамидатные связи между субъединицами и тиофосфорамидатные связи между субъединицами. Термин «модифицированные нуклеотиды» может означать нуклеозид вместе со связью между субъединицами.

[0066] Термин «немодифицированные» или «природные» нуклеотидные основания включает в себя пуриновые основания аденин (A) и гуанин (G) и пиримидиновые основания тимин (T), цитозин (C) и урацил (U). Термин «модифицированные нуклеотидные основания» включает в себя другие синтетические и природные нуклеотидные основания, такие как 5-метилцитозин (5-me-C), 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 ($-C\equiv C-CH_3$) 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, особенно 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-деазагуанин, и 7-дезааденин, и 3-деазагуанин, и 3-дезааденин. Дополнительные модифицированные нуклеотидные основания включают в себя триклические пиримидины, такие как феноксазинцитидин (1H-пиримидо[5,4-b][1,4]бензоксазин-2(3H)-он),

фенотиазинцитидин (1H-пиримидо[5,4-b][1,4]бензотиазин-2(3H)-он), G-зажимы, такие как замещенный феноксазинцитидин (например, 9-(2-ам-оелхокси)-H-пиримидо[5,4-b][1,4]бензоксазин-2(3H)-он), карбазолцитидин (2H-пиримидо[4,5-b]индол-2-он), пиридоиндолцитидин (H-пиридо[3,2,5]пирроло[2,3-d]пиримидин-2-он). Модифицированные нуклеотидные основания также могут включать в себя те, в которых пуриновое или пиримидиновое основание замещено другими гетероциклами, например, 7-дезааденин, 7-дезагуанозин, 2-аминопиридин и 2-пиридон.

[0067] В некоторых вариантах осуществления модифицированное нуклеотидное основание выбрано из группы, состоящей из 5-метилцитозина, 2,6-диаминопурина, 5-метилурацила и G-зажима. В некоторых вариантах осуществления G-зажим представляет собой



[0068] Термин «лигандная нацеливающая группа» означает группу, которая способствует доставке олигонуклеотида к инфицированным ВГВ гепатоцитам посредством связывания с рецептором. Эти группы включают в себя «нацеливающие на рецептор лиганды», такие как GalNAc, которые нацелены на рецептор клеточной поверхности ASGPR и рецептор ЛППП на клеточной поверхности соответственно. Другие нацеливающие на рецептор лиганды, которые связываются с этими рецепторами на клеточной поверхности, также входят в объем настоящего термина.

[0069] Термин «фармакофор» означает последовательность олигонуклеотидного лекарственного средства, которая взаимодействует с молекулами ДНК или РНК ВГВ в клетках, инфицированных HBV/HDV или ВГВ, и запускает противовирусные ответы.

[0070] Термин «конформационно ограниченный нуклеозид» означает нуклеозиды, имеющие мостиковую или бициклическую сахарную структуру, причем конформация нуклеозида может быть фиксирована в конкретной конфигурации. Например, конформационно ограниченные нуклеозиды включают в себя нуклеозиды с фиксированной конформацией сахара C_{3'}-эндо. Примеры осуществления включают в себя мостиковые нуклеиновые кислоты (BNA), например, 2', 4'-BNA нуклеозиды, такие как α-L-метиленокси (4'-CH₂-O-2') LNA, β-D-метиленокси (4'-CH₂-O-2') LNA, этиленокси (4'-(CH₂)₂-O-2') ENA, 2',4'-BNA^{NC}[NH], 2',4'-BNA^{NC}[NMe], 2',4'-BNA^{NC}[NBn], аминоокси (4'-CH₂-O-N(R)-2') BNA и оксиамино (4'-CH₂-N(R)-O-2') BNA. Другие примеры структур BNA включают в себя, без ограничений, олигонуклеотиды, имеющие по меньшей мере один мостик между 4'- и 2'-положениями сахара, причем каждый из мостиков независимо содержит 1 или 2-4 связанные группы, независимо выбранные из -[C(R₁)(R₂)]_n-, -C(R₁)=C(R₂)-, -C(R₁)=N-, -C(=NR₁)-, -C(=O)-, -C(=S)-, -O-, -Si(R₁)₂-, -S(=O)_x- и -N(R₁)-;

где x равно 0, 1 или 2; n равно 1, 2, 3 или 4; каждый R_1 и R_2 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} аминоксил, замещенный C_1 - C_{12} аминоксил или защитную группу. Определенные BNA были получены и описаны в патентной литературе, а также в научной литературе (см., например, публикации патента США № 7,053,207; 6,268,490; 6,770,748; 6,794,499; 7,034,133; 6,525,191; 7,696,345; 7,569,575; 7,314,923; 7,217,805; и 7,084,125, которые полностью включены в настоящий документ путем ссылки. Термин «конформационно ограниченный нуклеотид» относится к конформационно ограниченным нуклеозидам, связанным посредством связи между субъединицами.

[0071] В некоторых вариантах осуществления конформационно ограниченный нуклеозид выбран из необязательно замещенной LNA или необязательно замещенной ENA. Необязательно замещенная LNA или ENA может быть замещена алкильной функциональной группой, например метилом или этилом на одной из групп $-CH_2-$.

[0072] Термин «ингибирование экспрессии» относится к уменьшению или блокированию экспрессии или активности и необязательно указывает на полное исчезновение экспрессии или активности.

[0073] Термин «ингибирование репликации вируса» относится к уменьшению или блокированию репликации вируса и не обязательно означает полное прекращение репликации вируса.

[0074] Термин «субъект» относится к млекопитающим и включает в себя людей и не относящихся к человеку млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления субъект является человеком, например взрослым человеком.

[0075] Термин «лечение» заболевания у субъекта относится к (1) профилактике заболевания у субъекта, который предрасположен к нему или у которого еще не развились симптомы заболевания; (2) подавлению заболевания или прекращению его развития; или (3) облегчению или иницированию обратного развития заболевания.

[0076] Термин «терапевтически эффективное количество» означает количество фармацевтического агента, которое обеспечивает терапевтическое благоприятное воздействие на субъекта.

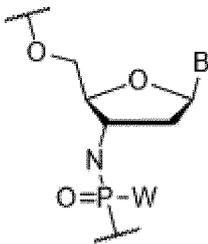
[0077] Термин «фармацевтически приемлемая соль» означает физиологически и фармацевтически приемлемые соли соединений настоящего описания, т. е. соли, которые

сохраняют желаемую биологическую активность исходного олигонуклеотида/соединения и не оказывают нежелательного токсического воздействия.

[0078] В настоящем описании используются следующие аббревиатуры. 2'-Н (дезоксирибозные) нуклеозиды обозначаются заглавной буквой, соответствующей нуклеотидному основанию, например А, С, G и Т. 2'-ОН (рибозные) нуклеозиды обозначаются строчной буквой г и заглавной буквой, соответствующей нуклеотидному основанию, например гА, гС, гG и гU. Нуклеозиды 2'-О-Ме обозначаются строчной буквой m и заглавной буквой, соответствующей нуклеотидному основанию, например mA, mC, mG и mU. Нуклеозиды 2'-МОЕ обозначаются строчными буквами moe и заглавной буквой, соответствующей нуклеотидному основанию, например moeA, moeC, moeG и moeU. Нуклеозиды 2'-рибо-F обозначаются строчной буквой f и заглавной буквой, соответствующей нуклеотидному основанию, например fA, fC, fG и fU. Нуклеозиды 2'-арабино-F обозначаются строчными буквами af и заглавной буквой, соответствующей нуклеотидному основанию, например afA, afC, afG и afU. mA* представляет собой 3'-амино-2'-ОМе-2,6-диаминопурин. А* представляет собой 3'-амино-2'-дезоксидиаминопурин. fA* представляет собой 3'-амино-2'-F-2,6-диаминопурин. Нуклеозиды LNA обозначаются буквой L и заглавной буквой, соответствующей нуклеотидному основанию, например LA, LC, LG, LT.

[0079] Что касается основной цепи и связей между субъединицами нуклеотидов, фосфодиэфирные связи между субъединицами обозначаются как PO или, как правило, не включаются в информацию о последовательности; тиофосфатные связи между субъединицами обозначаются строчными буквами ps; фосфорамидатные связи между субъединицами обозначаются строчными буквами pr; и тиофосфорамидатные связи между субъединицами обозначаются строчными буквами prs;

[0080] N3'→P5' означает модифицированные нуклеотиды, имеющие связи между субъединицами, где 3'-функциональная группа содержит N (например, NH) и связана посредством P. Например, следующая структура имеет связь N3'→P5':



[0081] Следует отметить, что в рамках настоящего документа и формулы изобретения использование формы единственного числа включает объекты во множественном числе, если из контекста явно не следует иное. Следует дополнительно отметить, что формула изобретения может быть составлена с исключением любого необязательного элемента. Таким образом, данное утверждение призвано служить в качестве априорного основания для применения такой исключаящей терминологии, как «исключительно», «только» и т. п., в связи с перечислением элементов формулы

изобретения или применения «негативного» ограничения.

[0082] Термин «около» будет понятен специалистам в данной области, и его значение будет в некоторой степени зависеть от контекста, в котором он применяется. При использовании периода, величина которого не понятна средним специалистам в данной области из контекста, в котором он используется, «около» будет означать до плюс или минус 10% от конкретного периода. Определенные диапазоны представлены в настоящем документе с числовыми значениями, которым предшествует термин «около». В настоящем документе термин «около» используется для буквального подтверждения точного числа, которому оно предшествует, а также какого-либо числа, которое является близким или приблизительно равным числу, которому предшествует данный термин. При определении того, является ли какое-либо число близким или приблизительно равным точно указанному числу, близким или приблизительно равным некомпенсированным может быть число, которое, в контексте его представления, обеспечивает существенный эквивалент точно указанного числа.

[0083] «Линкерная функциональная группа» может включать, например, содержащую 1-5 атомов кислорода C_2-C_{10} алкильную группу или C_3-C_{10} алкилоксидную группу. Этот линкер также может включать одну или несколько аминных групп либо на конце линкера, либо внутри линкера, например в C_2-C_{10} алкильной группе или C_3-C_{10} -алкилоксидной группе.

[0084] Специалисты в данной области техники будут понимать «линкер на твердой подложке» как химическую функциональную группу, которая связывает соединение с твердой подложкой, такой как смола. Линкер на твердой подложке должен быть способен легко расщепляться при определенных условиях в конце синтеза. Обычным линкером является сукцинильный линкер, который легко расщепляется обработкой концентрированным гидроксидом аммония. Термин «линкер на твердой подложке» включает варианты осуществления, в которых химическое вещество присоединено к твердой подложке, и варианты осуществления, в которых линкер на твердой подложке не включает твердую подложку.

[0085] Следует также понимать, что различные режимы лечения или профилактики заболеваний или состояний, описанных в настоящем документе, означают «существенное» лечение или профилактику, что включает в себя полное, но также неполное лечение или профилактику, и при этом достигается некоторый значимый с биологической или медицинской точки зрения результат. Лечение может представлять собой непрерывное длительное лечение хронического заболевания или введение один или несколько раз для лечения острого состояния.

[0086] Если приводится диапазон значений, следует понимать, что каждое промежуточное значение до десятой единицы нижнего предела (если контекстом явно не указывается иное) между верхним и нижним пределами этого диапазона, а также любое другое указанное или промежуточное значение в этом указанном диапазоне охватываются изобретением. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут быть

независимо включены в меньшие диапазоны и также охватываются изобретением, при наличии любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. Если фактический диапазон значений включает один или оба предела, диапазоны, исключающие любой из двух или оба предела сразу, также включены в объем изобретения.

[0087] Настоящее описание не ограничено описанными вариантами осуществления, так как они могут быть изменены. Следует также понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, служит только для цели описания конкретных вариантов осуществления и не является ограничивающей объем настоящего изобретения, который может быть ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

[0088] Как будет очевидно обычным специалистам в данной области после прочтения настоящего описания, каждый из отдельных вариантов осуществления, описанных и показанных в настоящем документе, имеет отдельные составляющие и признаки, которые можно легко отделять от признаков любого из нескольких других вариантов осуществления или же объединять с ними без отступления от объема или сущности настоящего изобретения. Любой упомянутый способ можно осуществлять в порядке следования перечисленных событий или в любом другом логически возможном порядке.

[0089] Все публикации и патенты, процитированные в настоящем описании, включены в настоящий документ путем ссылки, как если бы каждая индивидуальная публикация или патент были конкретно и по отдельности указаны как включаемые путем ссылки, и включены в настоящий документ путем ссылки для раскрытия и описания способов и/или материалов, применительно к которым данные публикации цитируются. Цитирование любой публикации дается для ее описания до даты подачи заявки, и его не следует рассматривать как допущение того, что настоящее изобретение не имеет правомочности предвосхищать такую публикацию путем предшествующего изобретения. Кроме того, приведенные даты публикации могут отличаться от фактических дат публикации, и может потребоваться их подтверждение независимыми агентами.

Примеры

[0090] Следующие примеры демонстрируют определенные варианты осуществления настоящего описания для того, чтобы помочь специалисту в данной области в реализации изобретения. Соответственно, примеры никоим образом не рассматриваются как ограничивающие объем настоящего описания.

Способы получения

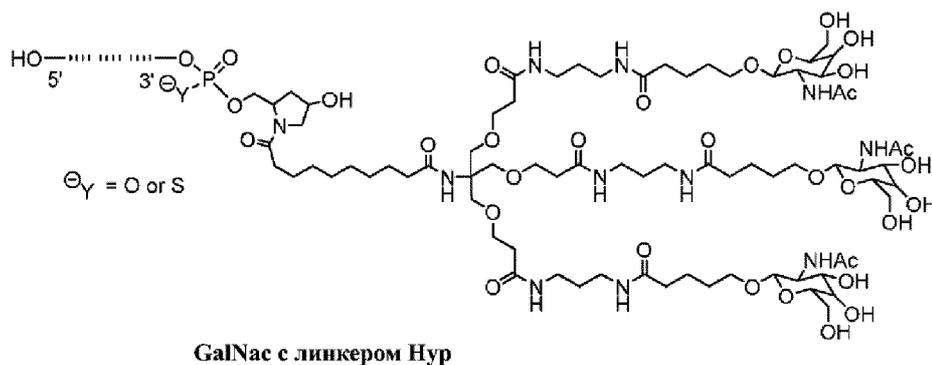
[0091] Все мономеры сушили в вакуумной сушилке с осушителями (КОН и P_2O_5 , комн. темп., 24 ч). Синтез твердых подложек (CPG), присоединенных к первому 5'-остатку, осуществляли с использованием доступных на рынке источников. Все другие реагенты для синтеза и растворители получали из доступных на рынке источников и использовали в качестве таковых. Химические вещества и растворители для постсинтетических работ приобретали у доступных на рынке источников и использовали

без какой-либо очистки или обработки. Растворитель (ацетонитрил) и растворы (амидит и активатор) хранили на молекулярных ситах во время синтеза.

[0092] Контрольные стабилизированные нуклеазой конъюгированные с 3'-GalNAc антисмысловые олигонуклеотиды, использованные в данном исследовании, показаны, например, в таблицах. Антисмысловые олигонуклеотиды синтезировали на синтезаторе ABI-394 с использованием стандартного 93-стадийного цикла, предложенного производителем. Твердая подложка представляла собой стекло с заданным размером пор, а мономеры содержали стандартные защитные группы. Каждый олигонуклеотид синтезировали отдельно с использованием доступных на рынке 5'-O-(4,4'-диметокситриил)-3'-O-(2-цианоэтил-N, N-диизопропил) ДНК и/или 2'-O-Me фосфорамидитных мономеров 6-N-бензоиладенозина (A^{Bz}), 4-N-ацетилцитидина (C^{Ac}), 2-N-изобутирилгуанозина (G^{iBu}) и тимидина (T) согласно стандартным протоколам твердофазного синтеза олигонуклеотида. Фосфорамидиты приобретали у доступных на рынке источников. 2'-O-Me-2,6,диаминопурифосфорамидит приобретали у доступных на рынке источников. DDTT ((диметиламино-метилиден)амино)-3H-1,2,4-дитиазолин-3-тион использовали в качестве агента переноса серы для синтеза фосфоротиоатов олигонуклеотида. Модифицированные олигонуклеотиды получали с помощью расширенной реакции сочетания 0,1 М раствора фосфамидита в CH_3CN в присутствии 5-(этилтио)-1H-тетразольного активатора с твердым связанным олигонуклеотидом с последующим стандартным блокированием, окислением и снятием защиты. Эффективность постадийного связывания всех модифицированных фосфорамидатом составила более 98%. Твердые подложки, несущие олигонуклеотид, нагревали с помощью водного раствора аммиака/этанола (3:1) при 55°C в течение 8 ч для снятия нестабильных в щелочной среде защитных групп.

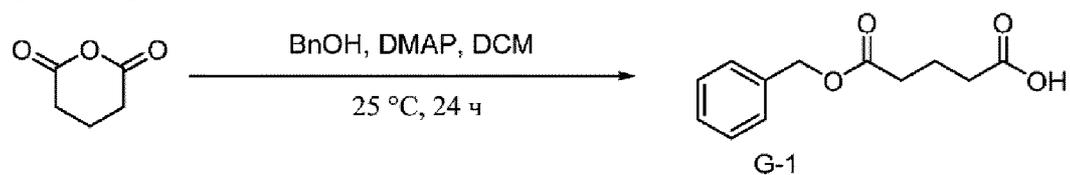
[0093] Конъюгированные с GalNAc ASO синтезировали из твердой подложки гидроксипролинол-GalNAc. GalNAc привязывали к *транс*-4-гидроксипролинолу посредством 6-аминогексаноатной связи с получением функциональной группы гидроксипролинол-GalNAc, которую впоследствии присоединяли к функционализированному стеклу с заданным размером пор (CPG) с получением твердой подложки.

[0094] Неконъюгированные и GalNAc-модифицированные олигонуклеотиды очищали с помощью анионообменной ВЭЖХ. Буферные растворы представляли собой 20 mM фосфат натрия в 10% CH_3CN , pH 8,5 (буферный раствор А) и 20 mM фосфат натрия в 10% CH_3CN , 1,8 М NaBr, pH 8,5 (буферный раствор В). Фракции, содержащие полноразмерные олигонуклеотиды, объединяли, обессоливали и лиофилизировали.



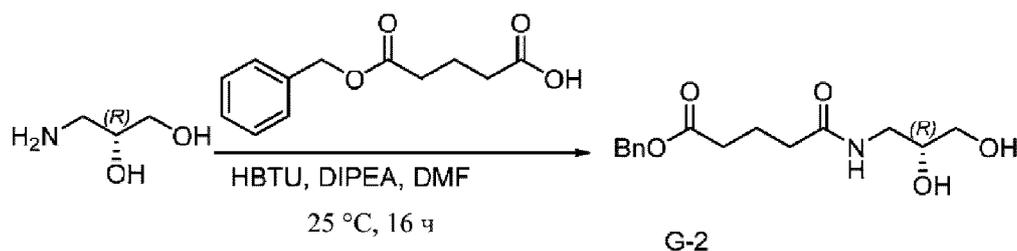
Синтез GalNAc

Синтез G-1



[0095] К раствору оксан-2,6-диона (1000 г, 8,76 моль, 1,00 экв.), 4-диметиламинопиридин (53,5 г, 437,9 ммоль, 0,05 экв.) в дихлорметане (10 000 мл) в инертной атмосфере азота по каплям добавляли фенолметанол (900 г, 8,32 моль, 0,95 экв.) при перемешивании при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Полученную смесь промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия. Показатель pH водной фазы доводили до 1 с помощью 10%-го раствора соляной кислоты. Полученный раствор экстрагировали 3 x 2000 мл этилацетата и органические слои объединяли. Полученную смесь промывали 2x3000 мл насыщенного раствора хлорида натрия. Органический слой сушили безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали под пониженным давлением. В результате получали 1240 г (64%) **G-1** в виде бесцветного масла. МС m/z [M+H]⁺ (ИЭР): 223.

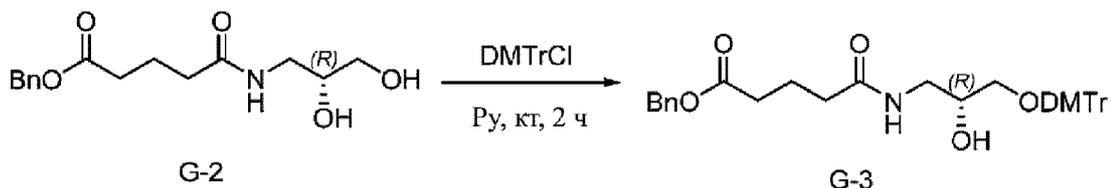
Синтез G-2



[0096] К раствору **G-1** (58,5 г, 263,23 ммоль, 1,20 экв.), N, N-диизопропилэтиламина (34 г, 263,57 ммоль, 1,20 экв.) в N, N-диметилформамиде (600 мл) в инертной атмосфере азота добавляли O-бензотриазол-N, N,N',N'-тетраметилурионийгексафторфосфат (100 г, 263,69 ммоль, 1,20 экв.) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. Впоследствии добавляли (2R)-3-аминопропан-1,2-диол (20 г, 219,52 ммоль, 1,00 экв.) при комнатной температуре. Полученный раствор оставляли для протекания реакции при перемешивании в течение ночи при комнатной температуре. Полученный

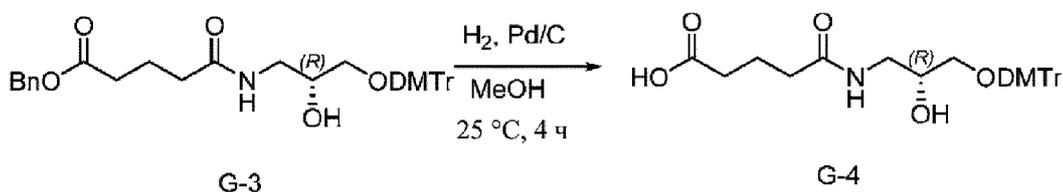
раствор разводили 2000 мл этилацетата. Полученную смесь промывали 2×1000 мл насыщенного раствора бикарбоната натрия. Смесь сушили безводным сульфатом натрия и концентрировали под пониженным давлением. Остаток наносили на колонку с силикагелем. В результате получали 38,7 г (60%) **G-2** в виде светло-желтого твердого вещества. МС m/z [M+H]⁺ (ИЭР): 296.

Синтез G-3



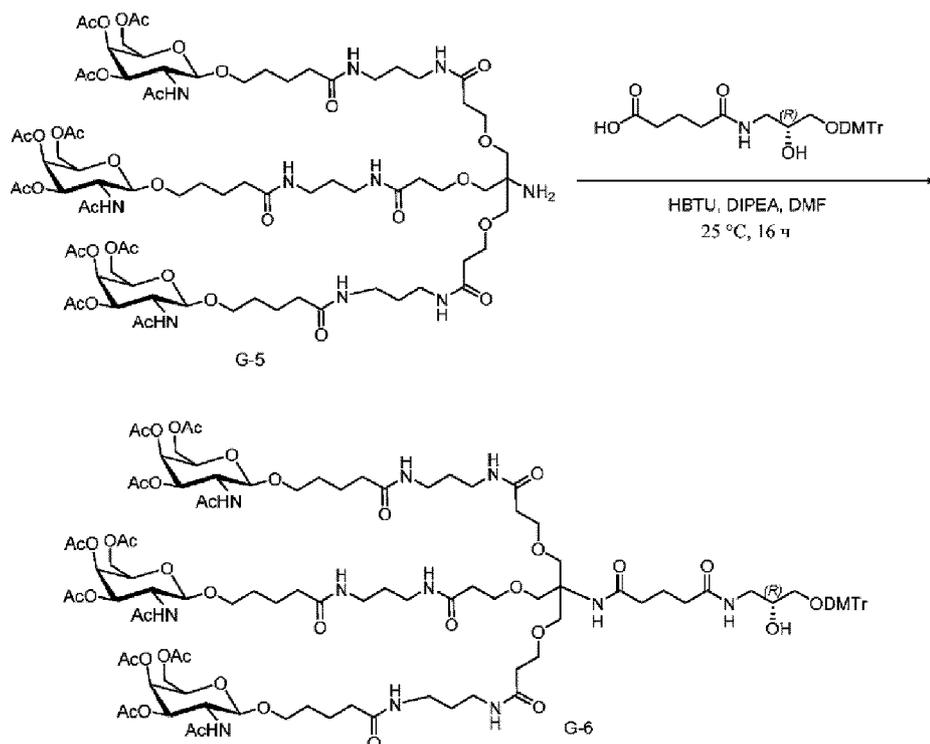
[0097] К раствору **G-2** (10 г, 33,86 ммоль, 1,00 экв.) в пиридине (100 мл) в инертной атмосфере азота при комнатной температуре добавляли 1-[хлор(4-метоксифенил)бензил]-4-метоксибензол (12,63 г, 37,28 ммоль, 1,10 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Впоследствии реакцию гасили добавлением метанола (10 мл). Полученную смесь концентрировали под пониженным давлением. Полученный раствор разводили 1000 мл этилацетата. Полученную смесь промывали 2×500 мл насыщенного раствора бикарбоната натрия. Смесь сушили безводным сульфатом натрия и концентрировали под пониженным давлением. Остаток наносили на колонку с силикагелем. В результате получали 10,2 г (50%) **G-3** в виде светло-желтого масла. МС m/z [M+Na]⁺ (ИЭР): 620.

Синтез G-4



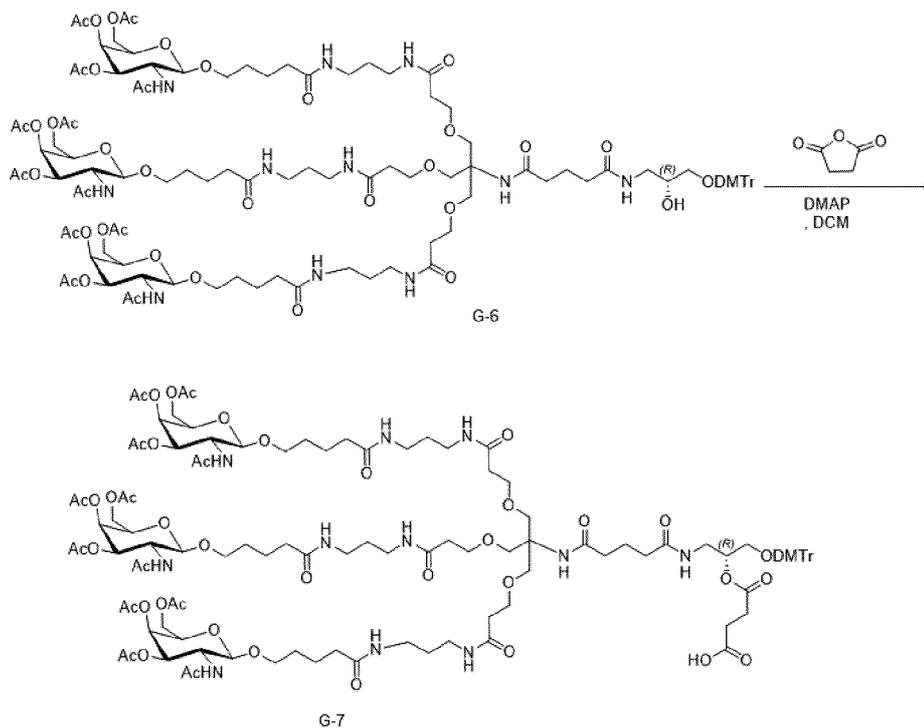
[0098] К раствору **G-3** (10 г, 16,73 ммоль, 1,00 экв.) в метаноле (100 мл) при комнатной температуре добавляли 10%-й палладий на активированном угле (1 г). Колбу вакуумировали и пять раз продували водородом. Полученный раствор перемешивали в течение 4 ч при комнатной температуре. Твердые вещества фильтровали. Полученную смесь концентрировали под пониженным давлением. В результате получали 7,6 г (89%) **G-4** в виде белого твердого вещества. МС m/z [M+Na]⁺ (ИЭР): 530.

Синтез G-5



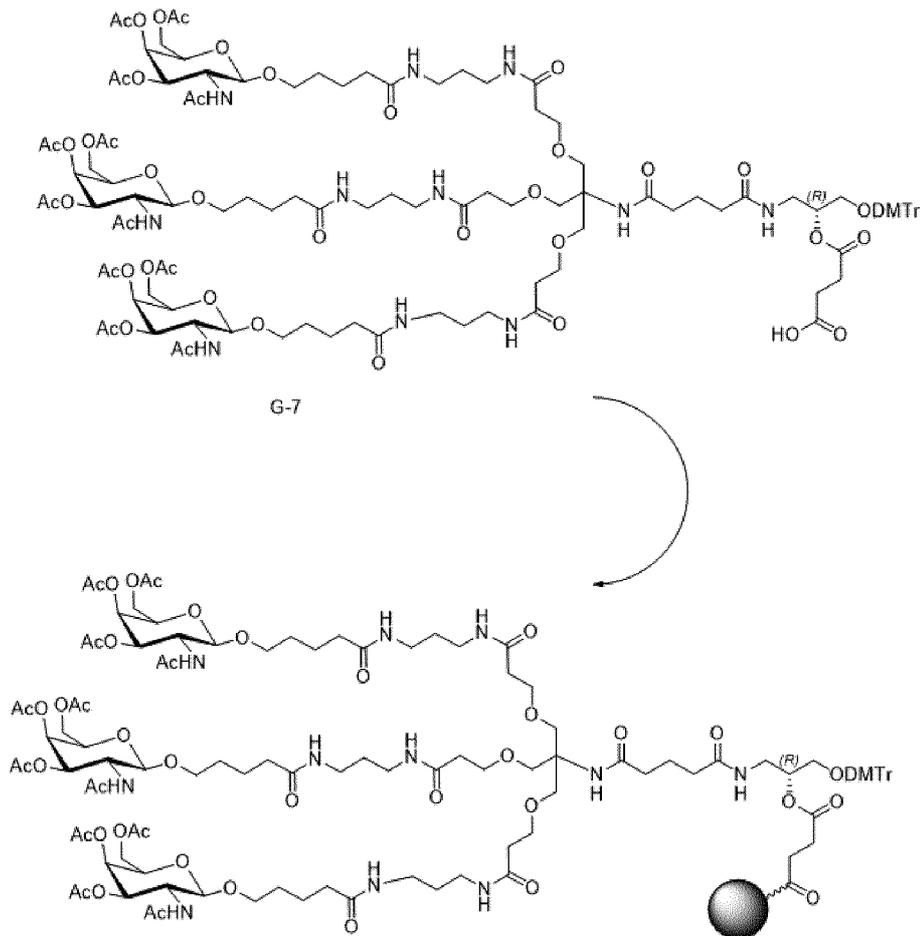
[0099] К раствору **G-4** (8,90 г, 17,53 ммоль, 1,05 экв.) в *N,N*-диметилформамиде (300 мл) в инертной атмосфере азота при комнатной температуре добавляли *N,N*-диизопропилэтиламин (6,47 г, 50,16 ммоль, 3,00 экв.). К этой смеси добавляли *O*-бензотриазол-*N,N,N*-тетраметилурионийгексафторфосфат (7,10 г, 18,73 ммоль, 1,12 экв.) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали в течение 15 мин при комнатной температуре. К смеси добавляли **G-5** Ref (Nucleic Acids Research, 2014, 42, (13) 8796-8807), (30 г, 16,72 ммоль, 1,00 экв.) при комнатной температуре. Полученный раствор оставляли для протекания реакция при перемешивании в течение ночи при комнатной температуре. Полученную смесь концентрировали под пониженным давлением. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной флэш-ВЭЖХ. В результате получали 20,1 г (53%) **G-6** в виде белого твердого вещества. МС m/z $[M+H]^+$ (ИЭР): 2283.

Синтез **G-7**



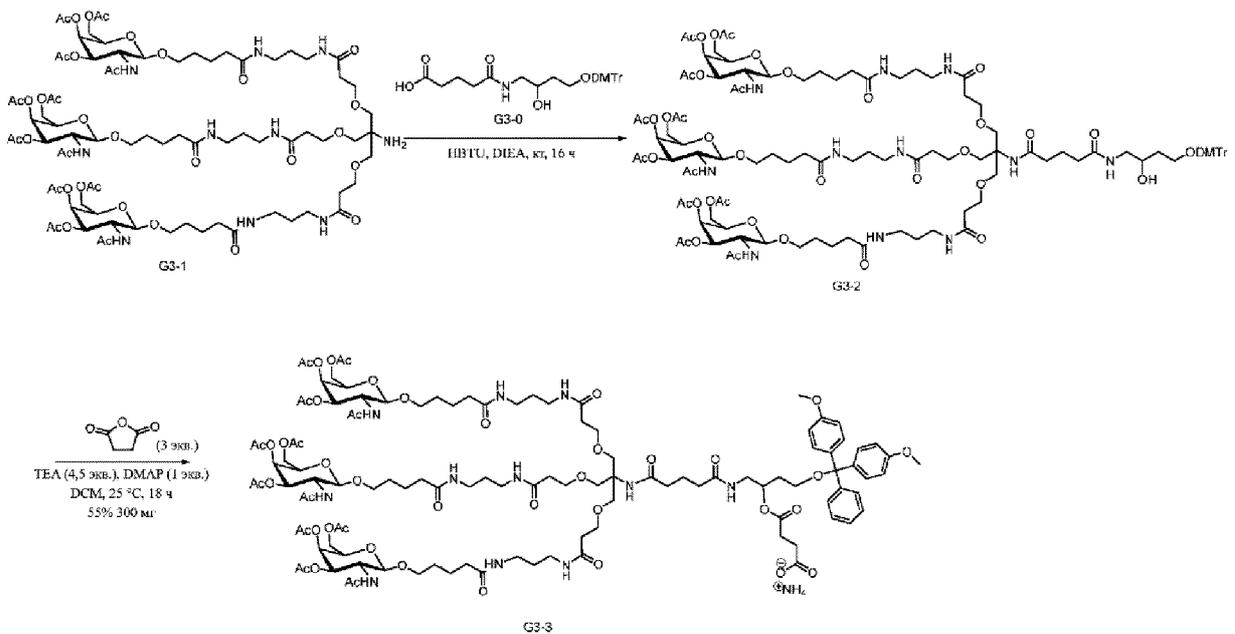
[0100] К раствору **G-6** (25 г, 10,96 ммоль, 1,00 экв.) в дихлорметане (750 мл) в инертной атмосфере азота при комнатной температуре добавляли триэтиламин (4,98 г, 49,21 ммоль, 4,49 экв.). К этой смеси при комнатной температуре добавляли 4-диметиламинопиридин (1,33 г, 10,89 ммоль, 0,99 экв.). К смеси при комнатной температуре добавляли оксолан-2,5-дион (3,29 г, 32,88 ммоль, 3,00 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Полученную смесь концентрировали под пониженным давлением. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной флэш-ВЭЖХ. В результате получали 15,83 г (61%) **G-7** в виде белого твердого вещества в виде аммониевой соли. MS m/z $[M/2+NH_4]^+$ (ИЭР): 1210.

Синтез GalNAc-2-твердая подложка-GPG



[0101] G-7 загружали на CPG в соответствии со следующими процедурами, описанными в публикации *Biotechniques*, 1988 Sep;6(8):768-75, используя HBTU/TEA, с получением GalNAc-2-CPG (53 мкмоль/г).

Синтез GalNAc-3

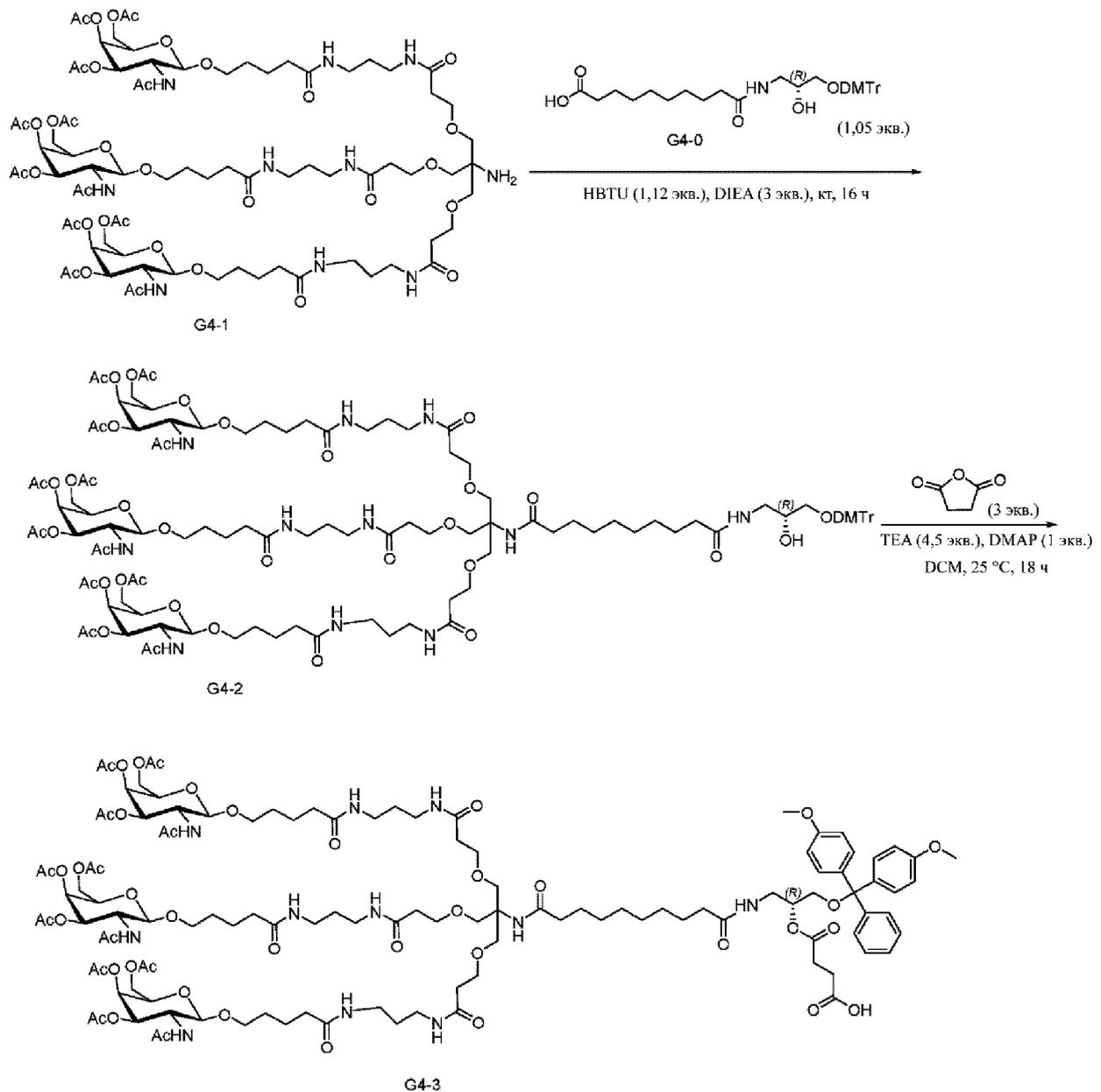


[0102] К раствору **G3-0** (12,8 г, 24,57 ммоль, 1,00 экв.) в N, N-диметилформамиде (500 мл) добавляли N, N-диизопропилэтиламин (9,0 г, 69,64 ммоль, 3,00 экв.), O-

бензотриазол-N, N,N-этраметилюронийгексафторфосфат (9,9 г, 27,03 ммоль, 1,10 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем добавляли **G3-1** (44 г, 24,57 ммоль, 1,00 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре. Полученную смесь концентрировали под пониженным давлением. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной флэш-ВЭЖХ. В результате получали 22 г (41%) **G3-2** в виде светло-желтого твердого вещества. МС m/z [M-H]⁻ (ИЭР): 2295. Н-ЯМР (DMSO, 400 МГц): 7,79-7,83 (м, 6H), 7,70-7,73 (м, 4H), 7,33-7,35 (м, 2H), 7,26-7,30 (м, 2H), 7,19-7,22 (м, 5H), 7,01 (с, 1H), 6,84-6,87 (м, 4H), 5,19-5,20 (д, J=4,0 Гц, 3H), 4,93-4,97 (м, 3H), 4,58-4,59 (д, J=4,0 Гц, 1H), 4,46-4,48 (д, J=8,0 Гц, 3H), 3,95-4,04 (м, 9H), 3,82-3,89 (м, 3H), 3,67-3,71 (м, 9H), 3,45-3,61 (м, 12H), 3,36-3,41 (м, 3H), 2,94-3,09 (м, 16H), 2,24-2,27 (м, 6H), 2,00-2,08 (м, 29H), 1,87 (с, 9H), 1,75 (с, 9H), 1,63-1,69 (м, 3H), 1,41-1,51 (м, 19H).

[0103] К раствору **G3-2** (22 г, 9,58 ммоль, 1,00 экв.), ТЕА (4,4 г, 4,50 экв.), 4-диметиламинопиридина (1,15 г, 1,00 экв.) в дихлорметане (220 мл) добавляли оксолан-2,5-дион (2,87 г, 28,68 ммоль, 3,00 экв.) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали в течение 18 ч при комнатной температуре. Полученную смесь концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной флэш-ВЭЖХ. В результате получили 15,01 г (65%) **G3-3** в виде белого твердого вещества. МС m/z [M-H]⁻ (ESI): 2395. Н-ЯМР (DMSO, 400 МГц): 7,96-8,16 (м, 10H), 7,28-7,36 (м, 4H), 7,21-7,23 (м, 6H), 6,86-6,89 (м, 4H), 5,21-5,22 (д, J=3,2 Гц, 3H), 4,97-5,03 (м, 4H), 4,51-4,53 (д, J=8 Гц, 3H), 4,03 (м, 9H), 3,85-3,92 (м, 3H), 3,69-3,74 (м, 9H), 3,52-3,59 (м, 12H), 3,38-3,44 (м, 4H), 2,95-3,04 (м, 15H), 2,23-2,29 (м, 10H), 2,10 (с, 9H), 2,04-2,07 (м, 9H), 2,00 (с, 9H), 1,89 (с, 9H), 1,78 (с, 10H), 1,63-1,68 (м, 3H), 1,45-1,54 (м, 18H).

Синтез GalNAc-4

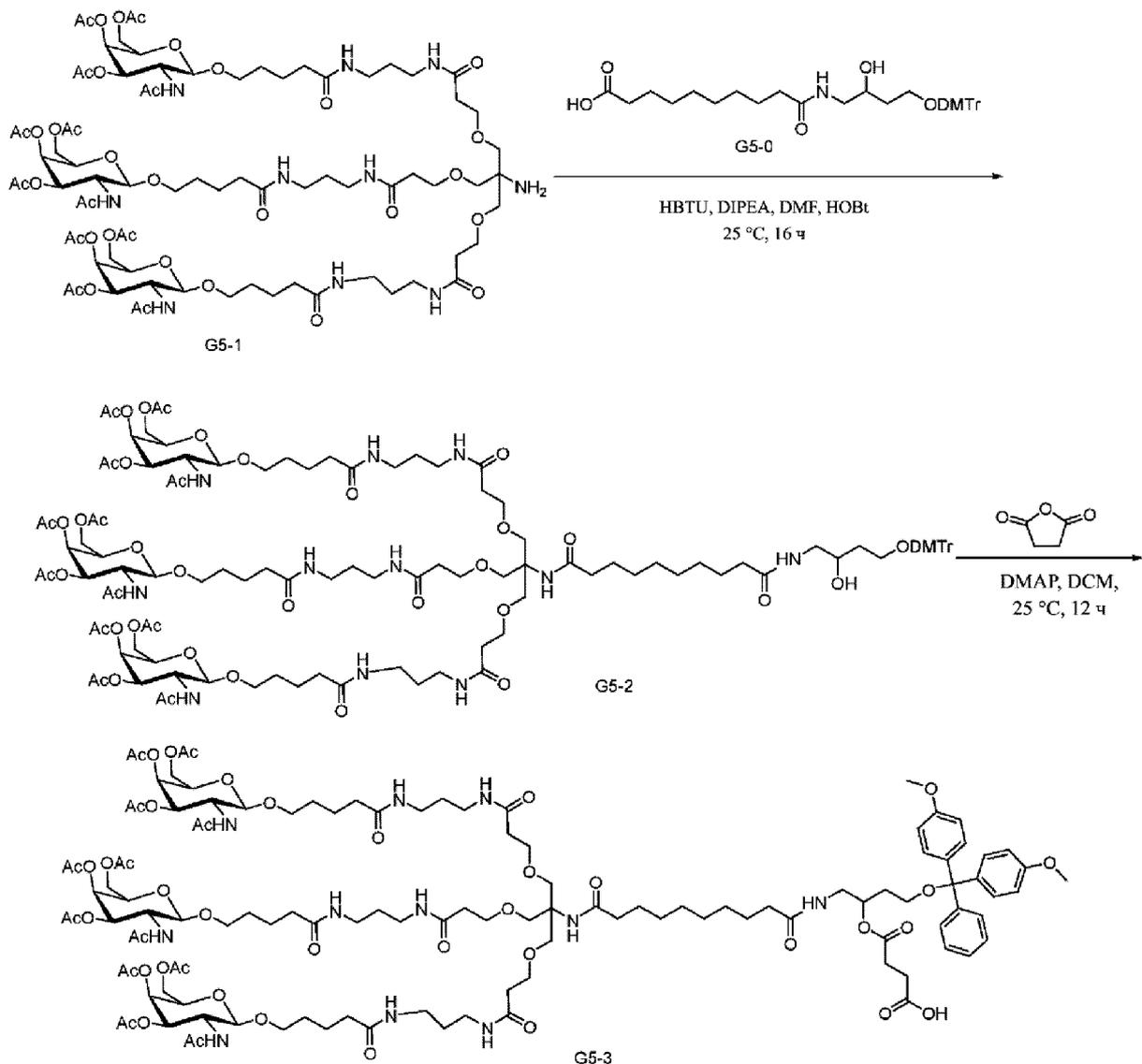


[0104] К раствору **G4-0** (10,13 г, 17,53 ммоль, 1,05 экв.) в N, N-диметилформамиде (300 мл) в инертной атмосфере азота добавляли N, N-диизопропилэтиламин (6,47 г, 50,06 ммоль, 2,99 экв.) при комнатной температуре. К этому добавляли O-бензотриазол-N, N,N-этраметилурунийгексафторфосфат (7,10 г, 18,72 ммоль, 1,12 экв.) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали в течение 15 мин при комнатной температуре. К смеси добавляли **G4-1** (30 г, 16,72 ммоль, 1,00 экв.) при комнатной температуре. Полученный раствор оставляли для протекания реакция при перемешивании в течение ночи при комнатной температуре. Полученную смесь концентрировали под пониженным давлением. Сырой продукт (30 г) очищали с помощью флэш-хроматографии и препаративной ВЭЖХ. В результате получили 22,3 г (57%) **G4-2** в виде белого твердого вещества.

[0105] К раствору **G4-2** (15 г, 6,38 ммоль, 1,00 экв.) в дихлорметане (450 мл) в инертной атмосфере азота добавляли триэтиламин (2,90 г, 28,66 ммоль, 4,49 экв.) при комнатной температуре. К этому добавляли 4-диметиламинопиридин (777 мг, 6,36 ммоль,

1,00 экв.) при комнатной температуре. К смеси добавляли оксолан-2,5-дион (1,91 г, 19,09 ммоль, 2,99 экв.) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Полученную смесь концентрировали под пониженным давлением. Сырой продукт (15 г) очищали с помощью флэш-хроматографии и препаративной ВЭЖХ. В результате получили 10,8047 г (69%) **G4-3** в виде светло-желтого твердого вещества. МС m/z $[M+H]^+$ (ИЭР): 2453. 1H ЯМР ($DMSO-d_6$, 400 Гц, м.д.): 8,10-7,92 (м, 10H), 7,35-7,30 (м, 4H), 7,24-7,22 (м, 5H), 7,10-7,01 (м, 1H), 6,89-6,87 (м, 4H), 5,22-5,21 (д, $J=3,2$ Гц, 3H), 4,00-4,97 (м, 4H), 4,53-4,51 (м, 3H), 4,04-3,90 (м, 9H), 3,87-3,3,80 (м, 3H), 3,74-3,70 (м, 10H), 3,69-3,39 (м, 16H), 3,05-3,02 (м, 16H), 2,51-2,50 (м, 2H), 2,30-2,27 (м, 8H), 2,11-1,99 (м, 29H), 1,89 (с, 9H), 1,77 (с, 9H), 1,52-1,32 (м, 22H), 1,20 (с, 9H).

Синтез GalNAc-5

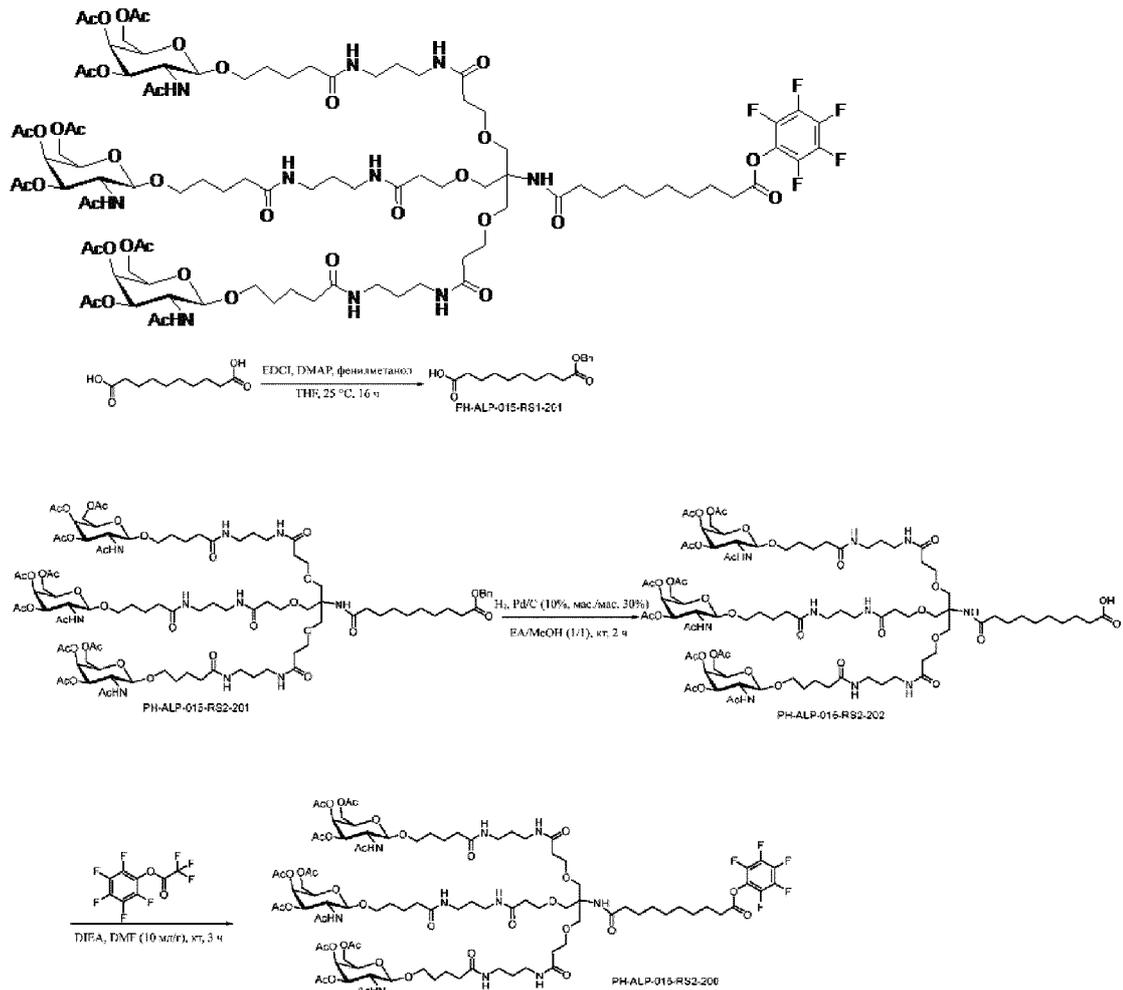


[0106] К раствору **G5-0** (10 г, 16,90 ммоль, 1,06 экв.) в *N,N*-диметилформамиде (300 мл) в инертной атмосфере азота добавляли *N,N*-диизопропилэтиламин (6,18 г, 47,96 ммоль, 3,0 экв.) *O*-бензотриазол-*N,N,N*-этраметилурунийгексафторфосфат (6,84 г, 18,04 ммоль, 1,13 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 5 мин при комнатной

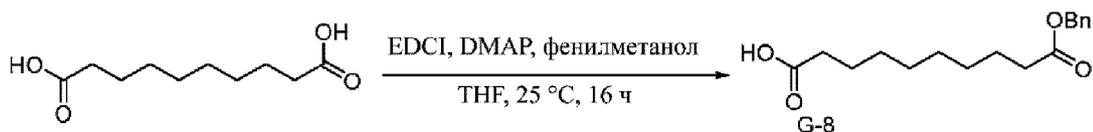
температуре. Затем добавляли раствор **G5-1** (28,68 г, 15,99 ммоль, 1,00 экв.) в N, N-диметилформамиде (300 мл). Полученный раствор оставляли для протекания реакция при перемешивании в течение ночи при комнатной температуре. Полученную смесь концентрировали под пониженным давлением. Сырой продукт (20 г) очищали с помощью флэш-хроматографии и препаративной ВЭЖХ. В результате получили 20,44 г (54%) **G5-2** в виде белого твердого вещества

К раствору **G5-2** (12,5 г, 5,28 ммоль, 1,00 экв.) в дихлорметане (375 мл) в инертной атмосфере азота добавляли 4-диметиламинопиридин (650 мг, 5,32 ммоль, 1,01 экв.), Триэтиламин (2,4 г, 23,76 ммоль, 4,50 экв.) и оксолан-2,5-дион (1,59 г, 15,89 ммоль, 3,01 экв.) по порядку. Полученный раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Полученную смесь концентрировали под пониженным давлением. Сырой продукт (15 г) очищали с помощью флэш-хроматографии и препаративной ВЭЖХ. В результате получили 9,0 г (73%) **G5-3** в виде белого твердого вещества. МС m/z [M-H]⁻ (ИЭР): 2465. ¹H ЯМР (DMSO-d₆, 300 Гц): 8,10-7,90 (м, 10H), 7,36-7,20 (м, 9H), 7,10 (с, 1H), 6,88-6,85 (м, 4H), 5,22-5,20 (д, J=3,0 Гц, 3H), 4,99-4,95 (м, 4H), 4,52-4,49 (м, 3H), 4,02-3,89 (с, 9H), 3,85-3,73 (м, 3H), 3,70-68 (м, 9H), 3,65-3,52 (м, 12H), 3,52-3,38 (м, 6H), 3,02-2,94 (м, 15H), 2,30-2,25 (м, 10H), 2,09-1,99 (м, 29H), 1,88 (с, 9H), 1,77 (с, 11H), 1,52-1,45 (м, 22H), 1,23-1,19 (м, 9H).

Синтез GalNAc-6

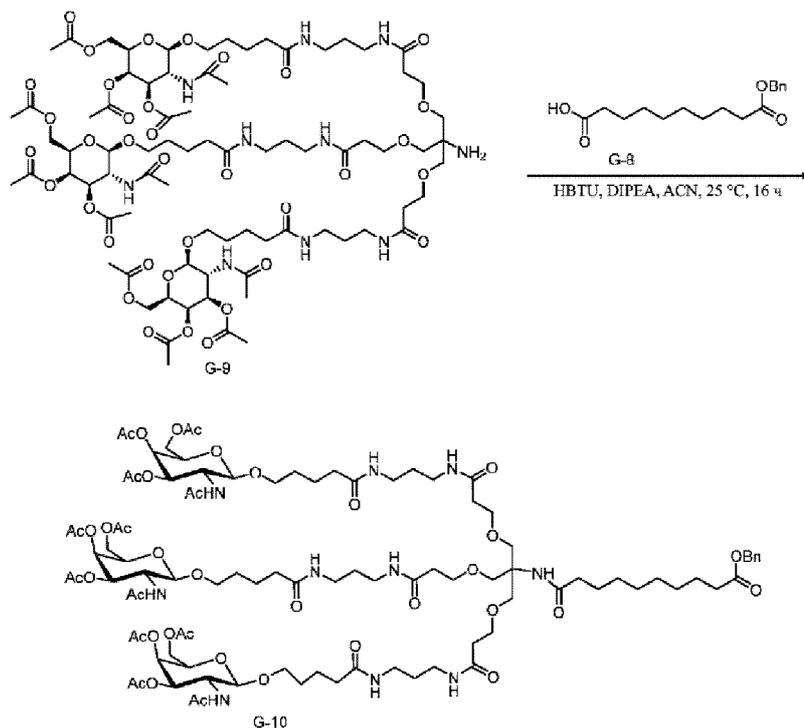


Синтез G-8



[0107] К раствору октандикарбоновой кислоты (100 г, 494,4 ммоль, 1,00 экв.) в дихлорметане (2000 мл) при комнатной температуре добавляли 4-диметиламинопиридин (18,1 г, 148,2 ммоль, 0,30 экв.). К этой смеси при комнатной температуре добавляли N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида гидрохлорид (114 г, 594,7 ммоль, 1,20 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. К смеси по каплям добавляли бензиловый спирт (64,1 г) при перемешивании при 0 °С. Полученный раствор оставляли для протекания реакция при перемешивании в течение ночи при комнатной температуре. Полученную смесь промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия. Смесь сушили безводным сульфатом натрия и концентрировали под пониженным давлением. Неочищенный продукт (100 г) очищали посредством флэш-хроматографии и препаративной ВЭЖХ. В результате получали 60,7 г (42%) **G-8** в виде белого твердого вещества. МС m/z [M+H]⁺ (ИЭР): 293.

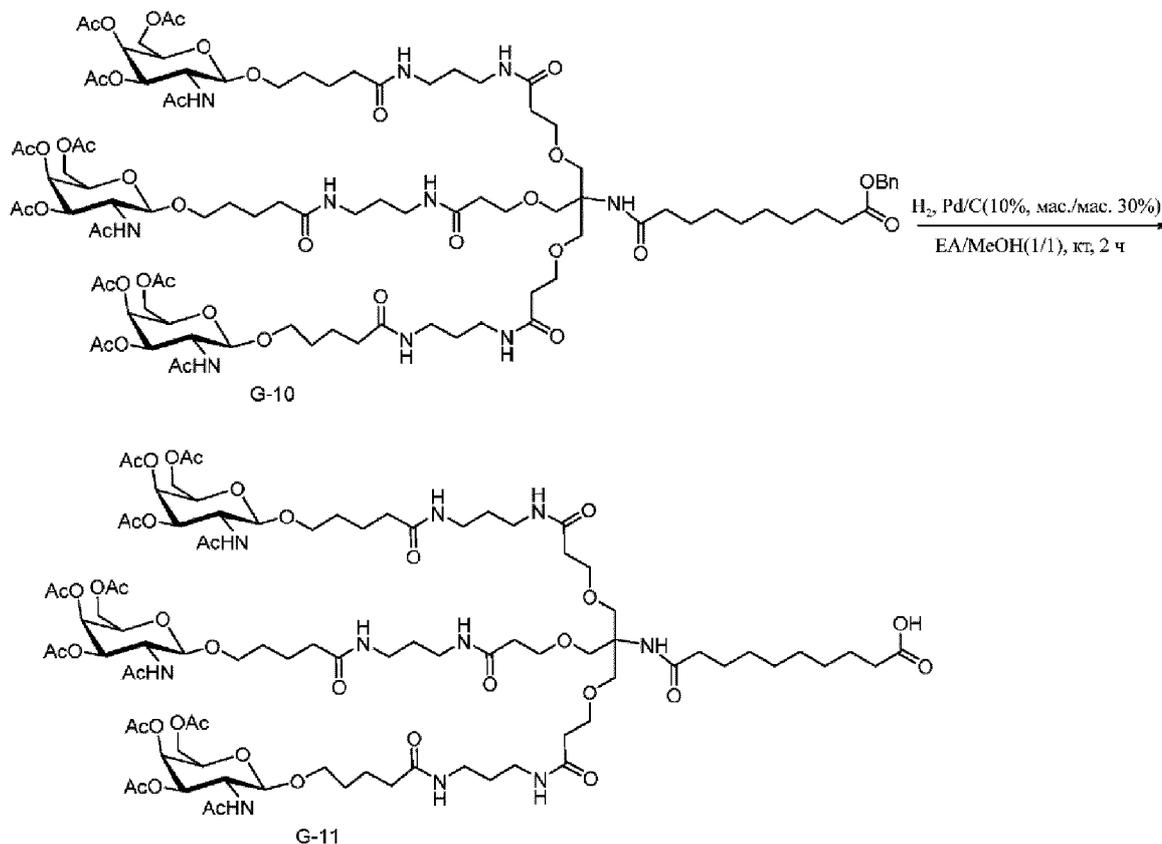
Синтез G-10



[0108] К раствору **G-8** (4,48 г, 15,32 ммоль, 1,50 экв.) в ацетонитриле (320 мл) добавляли O-бензотриазол-N, N,N-тетраметилурионийгексафторфосфат (5,84 г, 15,40 ммоль, 1,50 экв.), N, N-диизопропилэтиламин (3,96 г, 30,64 ммоль, 3,00 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 1 ч при 25 °С. Впоследствии добавляли **G-9** (18,4 г, 10,26 ммоль, 1,00 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 16 ч при 25 °С, а затем концентрировали в вакууме. Сырой продукт очищали с помощью флэш-хроматографии. В результате получали 12 г (57%) **G-10** в виде белого твердого вещества. Н-ЯМР (DMSO,

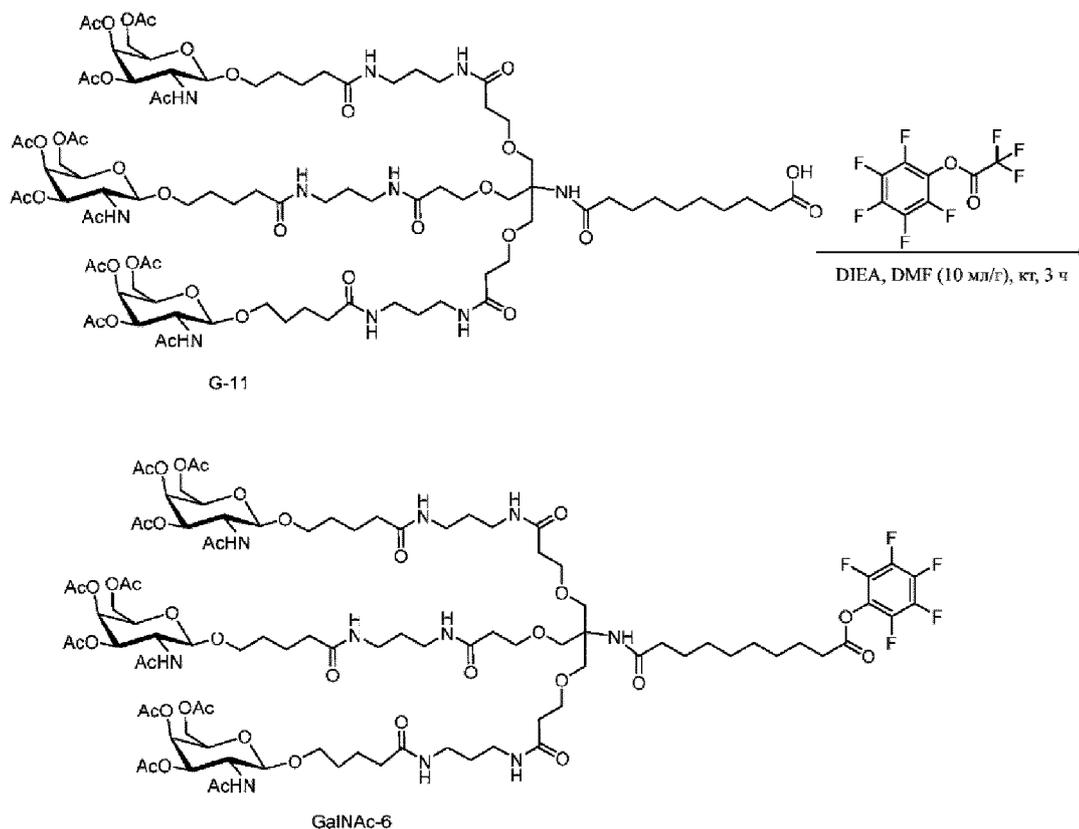
400 МГц, м.д.): 7,74-7,83 (м, 9H), 7,31-7,37 (м, 5H), 6,97 (с, 1H), 5,21 (д, J=3,3 Гц, 3H), 5,07 (с, 2H), 4,98 (дд, J=11,2 Гц, 3,4 Гц, 3H), 4,49 (д, J=8,4 Гц, 3H), 4,04 (с, 9H), 3,83-3,99 (м, 3H), 3,67-3,72 (м, 3H), 3,52-3,55 (м, 12H), 3,37-3,43 (м, 3H), 2,99-3,05 (м, 12H), 2,25-2,35 (м, 8H), 2,12 (с, 9H), 1,99-2,11 (м, 17H), 1,92 (с, 9H), 1,77 (с, 9H), 1,40-1,53 (м, 22H), 1,19-1,25 (м, 8H).

Синтез G-11



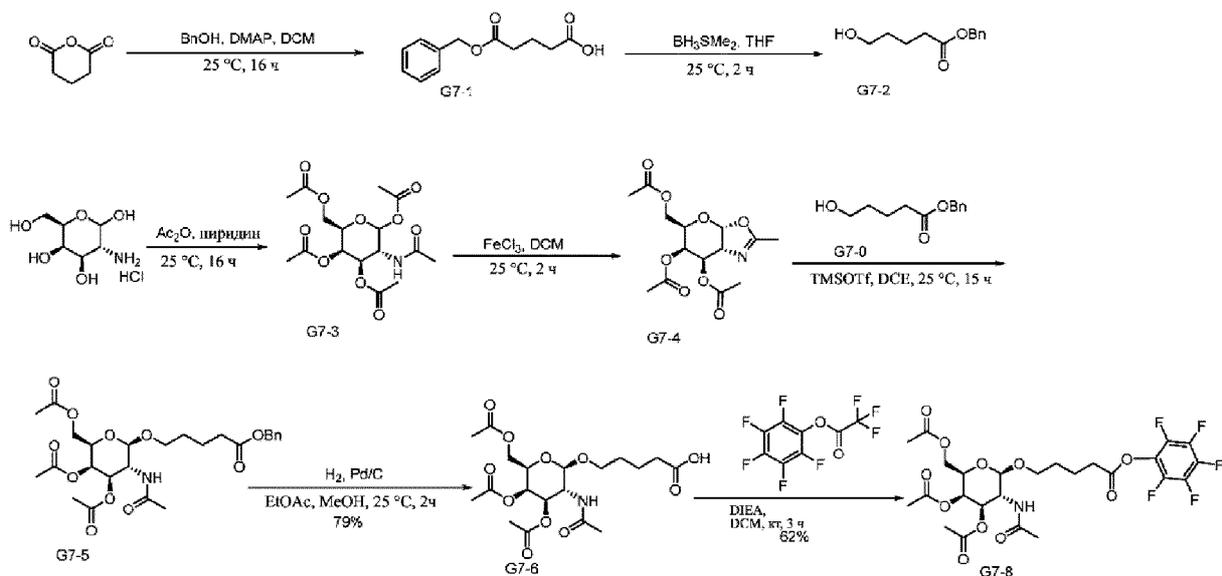
[0109] К раствору **G-10** (5 г, 2,45 ммоль, 1,00 экв.) в метаноле/этилацетате (100 мл, об./об. = 1 : 1) добавляли 10%-й палладиевый углерод (1,5 г, 10%). Колбу вакуумировали и пять раз продували водородом. Смесь перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре в атмосфере водорода. Твердые вещества фильтровали. Полученную смесь концентрировали в вакууме. В результате получали 4 г (82%) **G-11** в виде белого твердого вещества.

Синтез GalNAc-6



[0110] К раствору **G-11** (6,3 г, 3,18 ммоль, 1,00 экв.) в *N, N*-диметилформамиде (63 мл) добавляли *N, N*-диизопропилэтиламин (1,0 г, 7,95 ммоль, 2,50 экв.). За этим следовало добавление пентафторфенил-2,2,2-трифторацетата (1,33 г, 4,77 ммоль, 1,50 экв.) по каплям при перемешивании при 0 °С. Полученный раствор перемешивали в течение 3 ч при 25 °С. Полученную смесь концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством флэш-хроматографии в следующих условиях: колонка с гелем C18, элюент А вода, элюент В ацетонитрил; градиент: 20% до 80% в течение 15 мин, 100% в течение 3 мин; Детектор, УФ 210 нм. В результате получали 5 г (73%) **GalNAc-6** в виде белого твердого вещества. МС m/z $[M/2+H]^+$ (ИЭР): 1073; ¹H-ЯМР (DMSO, 300 МГц, м.д.): 7,71-7,80 (м, 9H), 6,98 (с, 1H), 5,22 (д, $J=3,3$ Гц, 3H), 4,99 (дд, $J=11,1$ Гц, 3,3 Гц, 3H), 4,50 (д, $J=8,4$ Гц, 3H), 4,02 (с, 9H), 3,82-3,92 (м, 3H), 3,69-3,74 (м, 3H), 3,52-3,56 (м, 12H), 3,39-3,44 (м, 3H), 3,03 (с, 12H), 2,75-2,79 (м, 2H), 2,28 (т, $J=6,3$ Гц, 6H), 2,00-2,10 (м, 26H), 1,89 (с, 9H), 1,77 (с, 9H), 1,64-1,68 (м, 2H), 1,25-1,53 (м, 28H); ¹⁹F ЯМР (DMSO, 162 МГц, м.д.): -153,60; -153,67, -153,68, -153,69, -158,05, -158,14, -158,22, -162,53, -162,60, -162,62, -162,69, -162,70.

Синтез GalNAc-7



[0111] В четырехгорлую круглодонную колбу на 5000 мл, продуваемую и поддерживаемую инертной атмосферой азота, поместили раствор оксан-2,6-диона (250 г, 2,19 моль, 1,00 экв.) в дихлорметане (2,5 л), 4-диметиламинопиридин (11,1 г, 90,91 ммоль, 0,05 экв.). После этого по каплям при перемешивании добавляли фенолметанол (225 г, 2,08 моль, 0,95 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 16 ч при 25 °С. Полученный раствор экстрагировали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия и водные слои объединяли. Значение рН раствора довели до 1 хлористым водородом (1 моль/л). Полученный раствор экстрагировали этилацетатом. Органические слои объединяли и сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Это дало 230 г (47%) **G7-1**.

[0112] В 5-литровую трехгорлую круглодонную колбу, продуваемую и поддерживаемую инертной атмосферой азота, помещали раствор **G7-1** (100 г, 449,97 ммоль, 1,00 экв.) в тетрагидрофуране (2,0 л). После этого по каплям при перемешивании добавляли (диметил-3-сульфанил) боранид (41 г, 539,69 ммоль, 1,20 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 3 ч при 25 °С. Затем реакцию гасили добавлением 200 мл метанола и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали перекристаллизацией из гексана. Это дало 58 г (62%) **G7-2**.

[0113] В четырехгорлую колбу на 10 000 мл, продуваемую и поддерживаемую инертной атмосферой азота, помещали раствор (3R,4R,5R,6R)-3-амино-6-(гидроксиметил)оксана-2,4,5-триол гидрохлорид (350 г, 1,62 моль, 1,00 экв.) в пиридине (3500 мл). За этим следовало добавление уксусного ангидрида (1246 г, 12,2 моль, 7,52 экв.) по каплям при 25 °С. Полученный раствор перемешивали 16 ч при 25 °С. Полученную смесь концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали перекристаллизацией из воды/льда. Твердые вещества собирали фильтрованием. Это привело к 507 г (80%) **G7-3**.

[0114] В трехгорлую круглодонную колбу на 50 л, продуваемую и поддерживаемую инертной атмосферой азота, помещали раствор **G7-3** (220 г, 565 ммоль, 1,00 экв.) в дихлорметане (22 л). За этим следовало добавление хлорида железа (275 г)

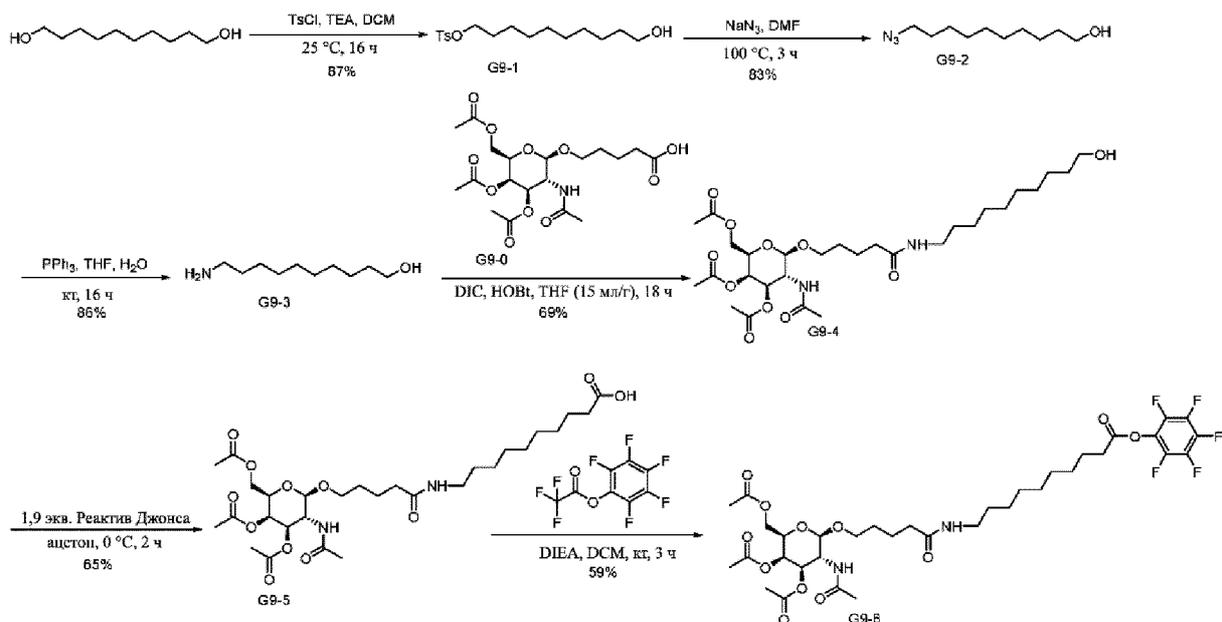
порциями при 25 °С. Полученную смесь перемешивали в течение 2 ч при 25 °С. Затем реакцию гасили добавлением 17 л воды/льда. Полученный раствор промывали водой и насыщенным водным раствором хлорида натрия. Смесь сушили безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Это дало 121 г (65%) **G7-4**.

[0115] В круглодонную колбу объемом 2000 мл, продуваемую и поддерживаемую инертной атмосферой азота, помещали раствор **G7-4** (111 г, 337,1 ммоль, 1,00 экв.) и бензил 5-гидроксипентаноат (70,2 г, 438,2 ммоль, 1,3 экв.) в 1,2-дихлорэтаноле (1100 мл) и 22 г молекулярных сит типа 4А. Полученный раствор перемешивали 30 мин при 25 °С. За этим следовало добавление по каплям при перемешивании триметилсилилтрифторметансульфоната (22,48 г, 101,12 ммоль, 0,3 экв.) в течение 10 минут. Полученный раствор перемешивали в течение 15 ч при 25 °С. Полученный раствор разбавляли дихлорметаном, промывали водой, насыщенным водным раствором бикарбоната натрия и насыщенным водным раствором хлорида натрия соответственно. Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии. Это дало 110 г (57%) **G7-5**.

[0116] В круглодонную колбу на 5000 мл поместили раствор **G7-5** (330 г, 614 ммоль, 1,00 экв.) в этилацетате (3300 мл), 10% безводного палладия на угле (100 г) (30% мас./мас.). Колбу вакуумировали и пять раз продували водородом. Смесь перемешивали 3 ч при комнатной температуре в атмосфере водорода. Твердые вещества отфильтровывали и фильтрат концентрировали в вакууме. Это привело к 184 г (67%) **G7-6**. МС m/z [M+H]⁺ (ИЭР): 448; Н-ЯМР (CD₃Cl, 300 Гц, м.д.): δ 5,99 (д, J=8,7 Гц, 1H), 5,36 (д, J=3,0 Гц, 1H), 5,29 (дд, J=10,6, 3,0 Гц, 1H), 4,69 (д, J=8,4 Гц, 1H) 3,91-4,21 (м, 5H), 3,51-3,56 (м, 1H), 2,31-2,52 (м, 2H), 1,91-2,21 (м, 12H), 1,71 (с, 4H).

[0117] В трехгорлую круглодонную колбу объемом 100 мл, продуваемую и поддерживаемую инертной атмосферой азота, помещали раствор **G7-6** (5 г, 11,17 ммоль, 1,00 экв.), дихлорметан (50 мл), DIEA (2,17 г, 16,79 ммоль, 1,50 экв.). За этим следовало добавление по каплям пентафторфенил-2,2,2-трифторацетата (4,69 г, 16,75 ммоль, 1,50 экв.) при перемешивании при 0 °С. Полученный раствор перемешивали в течение 3 ч при 25 °С. Полученную смесь концентрировали в вакууме. Остаток наносили на колонку с силикагелем. Это привело к 4 г (58%) **G7-8**. МС m/z [M+H]⁺ (ИЭР): 614; Н-ЯМР (DMSO, 400 Гц, м.д.): δ 7,85 (д, J=9,2 Гц, 1H), 5,23 (д, J=3,2 Гц, 1H), 4,99 (дд, J=11,2, 3,2 Гц, 1H), 4,52 (д, J=8,4 Гц, 1H) 4,04 (с, 3H), 3,87-3,94 (м, 1H), 3,74,3,79 (м, 1H), 3,45-3,51 (м, 1H), 2,78-2,81 (м, 2H), 2,11 (с, 3H) 2,06 (с, 3H), 1,90 (с, 3H), 1,84 (с, 3H), 1,66-1,77 (м, 4H); F ЯМР (DMSO, 400 Гц, м.д.): δ -153,61, -153,66, -158,04, -158,16, -162,58, -162,64, -162,71.

Синтез GalNAc-9



[0118] К раствору декан-1,10-диола (125 г, 717,23 ммоль, 5,00 экв.) в дихлорметане/*N,N*-диметилформамиде (250 мл/250 мл) добавляли триэтиламин (21,8 г, 215,44 ммоль, 1,50 экв.). За этим следовало добавление 4-толуолсульфонилхлорида (27,3 г, 143,19 ммоль, 1,00 экв) при 25 °С. Полученный раствор перемешивали в течение 16 ч при 25 °С. Полученную смесь концентрировали в вакууме и разбавляли 500 мл дихлорметана. Твердые вещества фильтровали. Полученный раствор промывали 3 x 500 мл воды и 3 x 500 мл насыщенного хлорида натрия. Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток наносили на колонку с силикагелем. В результате получили 41 г (87%) **G9-1** в виде бесцветного масла.

[0119] К раствору **G9-1** (32,8 г, 99,86 ммоль, 1,00 экв.) в *N,N*-диметилформамиде (150 мл) добавляли азид натрия (13,0 г, 199,97 ммоль, 2,00 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 3 ч при 90 °С на масляной бане. Твердые вещества фильтровали. Полученный раствор разбавляли 500 мл этилацетата и промывали 3 x 500 мл насыщенного бикарбоната натрия и 3 x 500 мл насыщенного хлорида натрия. Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток наносили на колонку с силикагелем. В результате получили 18 г (83%) **G9-2** в виде желтого масла.

[0120] К раствору **G9-2** (10 г, 50,18 ммоль, 1,00 экв.) в тетрагидрофуране (100 мл) добавляли трифенилфосфин (14,4 г, 54,90 ммоль, 1,10 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 16 ч при 25 °С. Полученную смесь концентрировали в вакууме. Полученный раствор разбавляли 50 мл воды и промывали 3 x 50 мл толуола. Водный слой концентрировали в вакууме и наносили на колонку с силикагелем. В результате получили 8 г (86%) **G9-3** в виде светло-желтого твердого вещества.

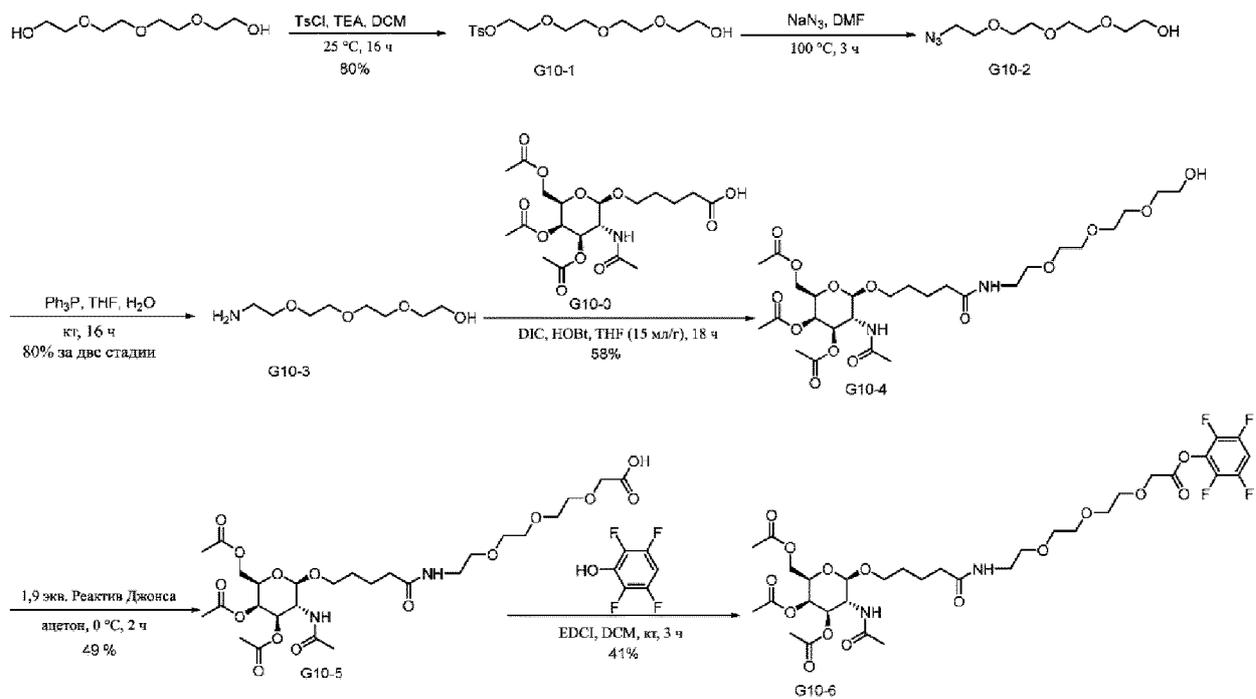
[0121] К раствору **G9-3** (9,9 г, 22,13 ммоль, 1,00 экв.) в тетрагидрофуране (100 мл), 1-гидроксibenзотриазоле (3 г, 22,20 ммоль, 1,00 экв.) добавляли *N,N*-диизопропилкарбодиимид (5,6 г, 44,37 ммоль, 2,00 экв.). За этим следовало добавление 10-

аминодекан-1-ола (5 г, 28,85 ммоль, 1,30 экв.) при перемешивании при 0 °С. Полученный раствор перемешивали в течение 16 ч при 25 °С. Полученную смесь концентрировали в вакууме. Сырой продукт очищали с помощью флэш-хроматографии. В результате получили 9,3 г (69%) **G9-4** в виде белого твердого вещества. МС m/z [M+H]⁺ (ИЭР): 603, 1Н ЯМР (DMSO, 400 Гц, м.д.): δ 7,81 (д, J=9,2 Гц, 1H), 7,69 (т, J=5,6 Гц, 1H), 5,22 (с, 1H), 4,98 (дд, J=11,2 Гц, 3,2 Гц, 1H), 4,49 (д, J=8,4 Гц, 1H), 4,33 (т, J=5,2 Гц, 1H), 4,02 (с, 3H), 3,86-3,88 (м, 1H), 3,69-3,72 (м, 1H), 3,34-3,41 (м, 3H), 2,97-3,02 (м, 2H), 2,11 (с, 3H), 2,00-2,04 (м, 5H), 1,89 (с, 3H), 1,77 (с, 3H), 1,36-1,50 (м, 8H), 1,24 (с, 12H).

[0122] К раствору **G9-4** (3 г, 4,98 ммоль, 1,00 экв.) в ацетоне (30 мл) по каплям добавляли реактив Джонса (3,6 мл, 1,87 экв.) при перемешивании при 0 °С. Полученный раствор перемешивали в течение 2 ч при 0 °С. Значение pH раствора довели до 6 с помощью насыщенного водного раствора бикарбоната натрия. Твердые вещества отфильтровывали и фильтрат промывали 3 x 500 мл насыщенного хлорида натрия. Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Сырой продукт очищали с помощью флэш-хроматографии. В результате получали 2 г (65%) **G9-5** в виде белого твердого вещества.

[0123] К раствору **G9-5** (4 г, 6,49 ммоль, 1,00 экв.) в дихлорметане (40 мл), N, N-диизопропилэтиламине (2,1 г, 16,25 ммоль, 2,00 экв.) добавляли пентафторфенил 2,2,2-трифторацетат (2,73 г, 9,75 ммоль, 1,50 экв.) по каплям при перемешивании при 0 °С. Полученный раствор перемешивали в течение 3 ч при 25 °С. Полученную смесь концентрировали в вакууме. Сырой продукт очищали с помощью флэш-хроматографии. Это привело к 3 г (59%) **G9-6** в виде белого твердого вещества. МС m/z [M+H]⁺ (ИЭР): 783. 1Н ЯМР (DMSO, 400 Гц, м.д.) δ 7,81 (д, J=9,2 Гц, 1H), 7,68 (т, J=5,6 Гц, 1H), 5,21 (с, 1H), 4,98 (дд, J=11,2 Гц, 3,2 Гц, 1H), 4,49 (д, J=8,8 Гц, 1H), 4,02 (с, 3H), 3,83-3,90 (м, 1H), 3,67-3,73 (м, 1H), 3,37-3,43 (м, 1H), 2,97-3,02 (м, 2H), 2,75-2,79 (м, 2H), 2,10 (с, 3H), 1,99-2,04 (м, 5H), 1,89 (с, 3H), 1,77 (с, 3H), 1,62-1,69 (м, 2H), 1,25-1,50 (м, 16H); F ЯМР (DMSO, 400 Гц, м.д.): δ -153,65, -153,66, -153,71, -158,09, -158,15, -158,21, -162,58, -162,63, -162,64, -162,70, -162,71.

Синтез GalNAc-10



[0124] К раствору 2-[2-[2-(2-гидроксиэтокси)этокси]этокси]этан-1-ола (194 г, 998,84 ммоль, 10,00 экв.) в дихлорметане (120 мл) добавляли триэтиламин (15,15 г, 149,72 ммоль, 1,50 экв.). За этим следовало добавление 4-толуолсульфонилхлорида (19,1 г, 100,18 ммоль, 1,00 экв.) при 25 °С. Полученный раствор перемешивали в течение ночи при 16 °С. Полученный раствор разбавляли 100 мл воды. Полученный раствор экстрагировали 3 x 200 мл дихлорметана и органические слои объединяли. Полученную смесь промывали 3 x 100 мл 5% водной лимонной кислоты. Органический слой сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток наносили на колонку с силикагелем. В результате получили 35 г (93%) **G10-1** в виде белого твердого вещества.

[0125] К раствору **G10-1** (34,8 г, 99,88 ммоль, 1,00 экв.) в N, N-диметилформамиде (180 мл) добавляли азид натрия (13,0 г, 199,97 ммоль, 2,00 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 3 ч при 90 °С на масляной бане. Твердые вещества фильтровали. Полученный раствор разбавляли 500 мл этилацетата и промывали 3 x 500 мл насыщенного бикарбоната натрия и 3 x 500 мл насыщенного хлорида натрия. Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток наносили на колонку с силикагелем. В результате получили 17 г (71%) **G10-2** в виде светло-желтого масла.

[0126] К раствору **G10-2** (2,2 г, 10,03 ммоль, 1,00 экв.) в тетрагидрофуране (20 мл) добавляли трифенилфосфин (2,88 г, 10,98 ммоль, 1,10 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 12 ч при 25 °С. Полученный раствор разбавляли 50 мл воды и промывали 3 x 50 мл толуола. Водный слой концентрировали в вакууме. В результате получили 1,7 г (81%) **G10-3** в виде светло-желтого масла.

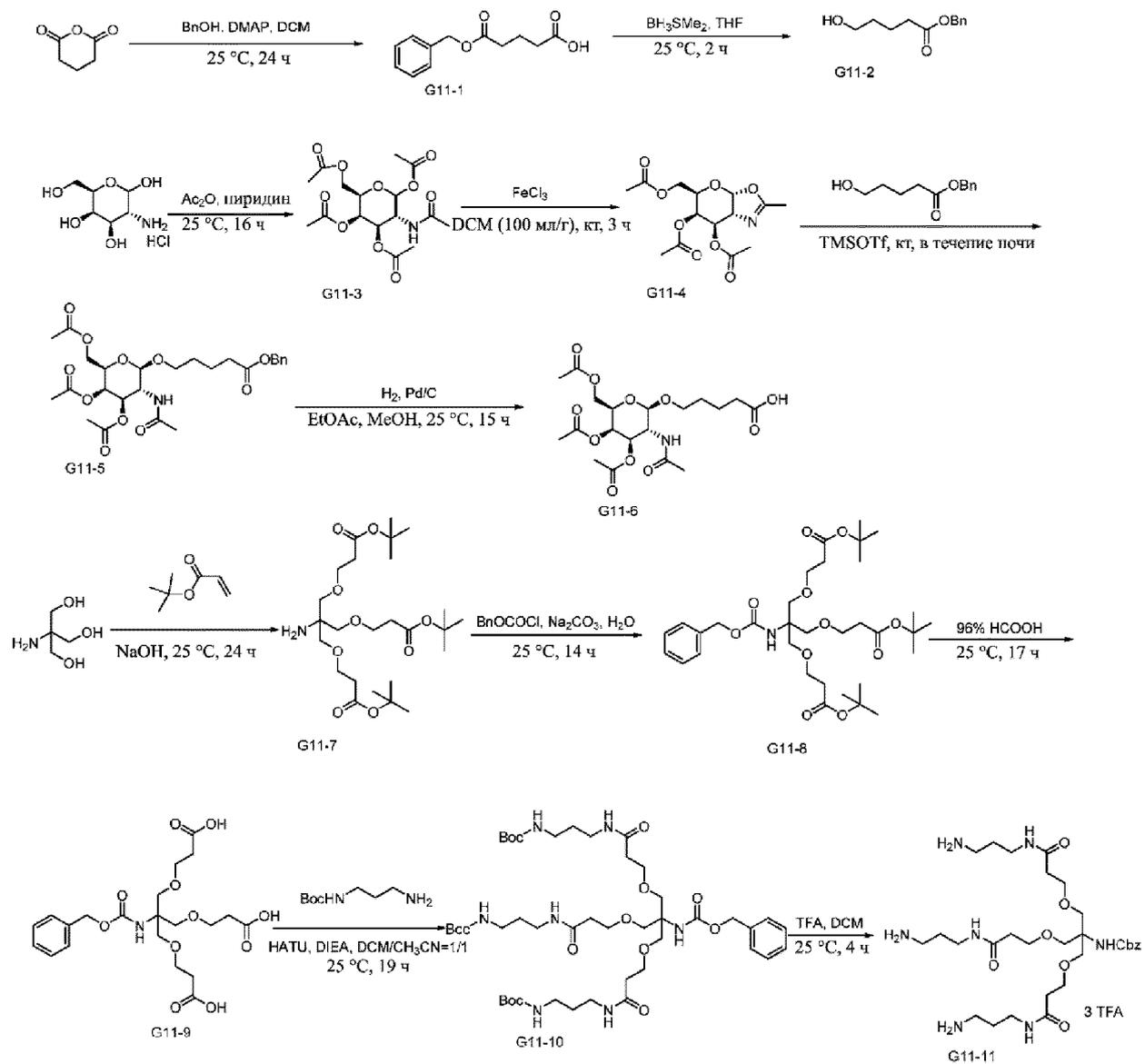
[0127] К раствору **G10-3** (10 г, 22,35 ммоль, 1,00 экв.) в тетрагидрофуране (100 мл) добавляли 1-гидроксибензотриазол (3 г, 22,20 ммоль, 1,00 экв.), N, N-

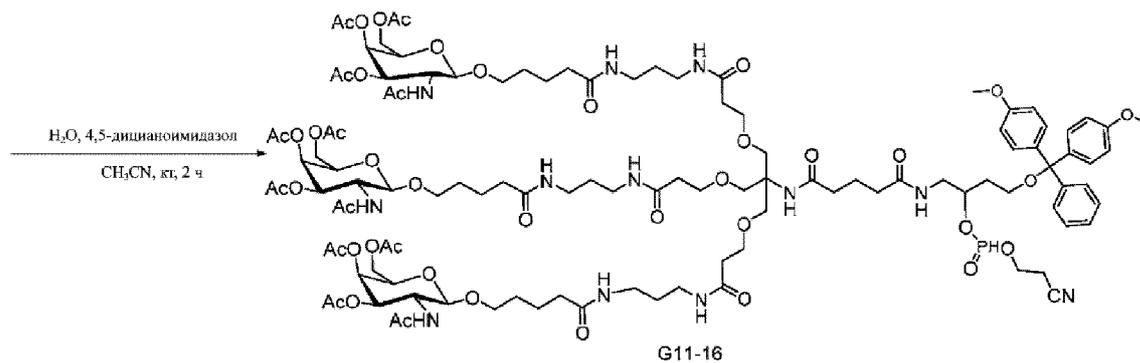
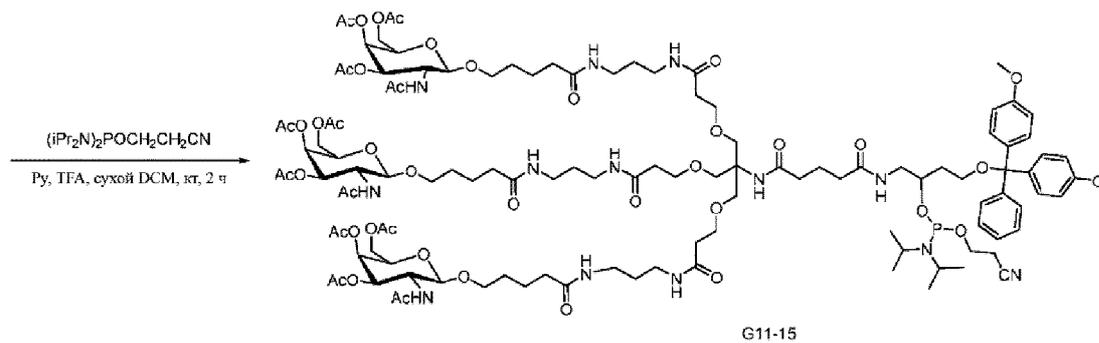
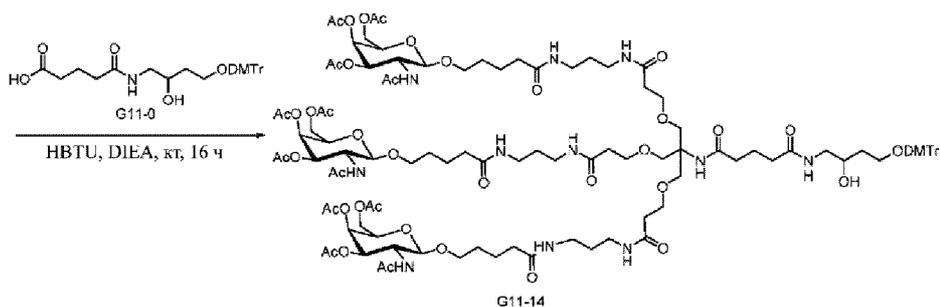
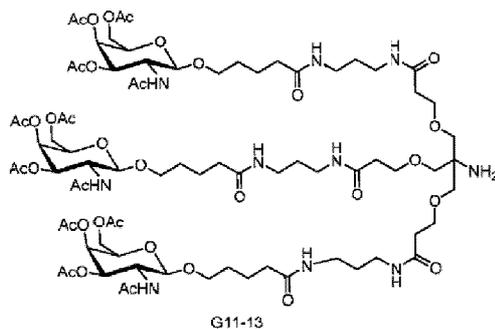
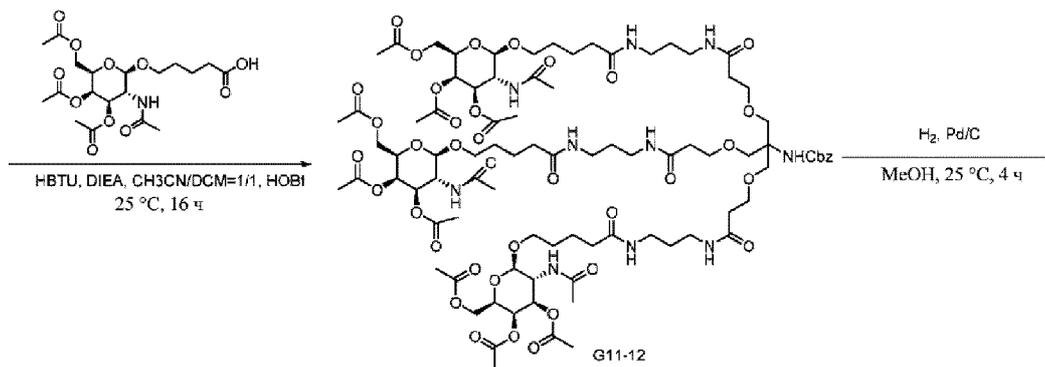
диизопропилкарбодиимид (5,62 г, 44,53 ммоль, 2,00 экв.). За этим следовало добавление 2-[2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]этан-1-ола (5,6 г, 28,98 ммоль, 1,30 экв.) при перемешивании при 0 °С. Полученный раствор перемешивали в течение 16 ч при 25 °С. Полученную смесь концентрировали в вакууме. Остаток наносили на колонку с силикагелем. Сырой продукт очищали с помощью флэш-хроматографии. В результате получили 8 г (58%) **G10-4** в виде светло-желтого масла. МС m/z [M+H]⁺ (ИЭР): 623. 1H ЯМР (DMSO, 400 Гц, м.д.): δ 7,82 (д, J=4,4 Гц, 2H), 5,22 (с, 1H), 4,98 (дд, J=11,2 Гц, 3,6 Гц, 1H), 4,58 (т, J=5,2 Гц, 1H), 4,49 (д, J=8,4 Гц, 1H), 4,01 (с, 3H), 3,83-3,91 (м, 1H), 3,67-3,73 (м, 1H), 3,48-3,51 (м, 10H), 3,37-3,42 (м, 5H) 3,19-3,20 (м, 2H), 2,11 (с, 3H), 2,08-2,10 (м, 2H), 2,08 (с, 3H), 1,89 (с, 3H), 1,77 (с, 3H), 1,40-1,60 (м, 4H).

[0128] К раствору **G10-4** (6 г, 9,64 ммоль, 1,00 экв.) в ацетоне (60 мл) по каплям добавляли реактив Джонса (6,7 мл) при перемешивании при 0 °С. Полученный раствор перемешивали в течение 3 ч при 0 °С. Значение pH раствора доводили до 5 с помощью насыщенного водного раствора бикарбоната натрия. Твердые вещества отфильтровывали и фильтрат промывали 3 x 500 мл насыщенного хлорида натрия. Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Сырой продукт очищали с помощью флэш-хроматографии. В результате получали 3 (49%) **G10-5** в виде твердого вещества.

[0129] К раствору **G10-5** (1 г, 1,57 ммоль, 1,00 экв.) в дихлорметане (10 мл), 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимида гидрохлорид (360 мг, 1,88 ммоль, 1,20 экв.), 2,3,5,6-тетрафторфенол (310 мг, 1,87 ммоль, 1,20 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 3 ч при 25 °С. Полученную смесь концентрировали в вакууме. Сырой продукт очищали с помощью флэш-хроматографии. Полученный раствор экстрагировали хлороформом и органические слои объединяли. Органический слой сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Это привело к тому, что 0,5 г (41%) и другие порционные продукты были объединены с получением 5,0422 г **G10-6** в виде светло-желтого масла. МС m/z [M+H]⁺ (ИЭР): 785. 1H ЯМР (CD₃CN, 400 Гц, м.д.): δ 7,30-7,40 (м, 1H), 6,48-6,60 (м, 2H), 5,30 (с, 1H), 5,04 (дд, J=11,2 Гц, 3,6 Гц, 1H), 4,52-4,59 (м, 3H), 4,08-4,13 (м, 2H), 3,95-3,99 (м, 2H), 3,76-3,78 (м, 3H), 3,60-3,67 (м, 6H), 3,48-3,59 (м, 3H), 3,30-3,48 (м, 2H), 2,14-2,16 (м, 5H), 2,12 (с, 3H), 1,93 (с, 3H), 1,88 (с, 3H), 1,50-1,60 (м, 4H). F ЯМР (CD₃CN, 400 Гц, м.д.): δ -140,76, -140,79, -140,82, -140,84, -154,52, -154,54, -154,57, -154,60.

Синтез GalNAc-11





[0130] К раствору оксан-2,6-диона (1000 г, 8,76 моль, 1,00 экв.), 4-диметиламинопиридин (53,5 г, 437,9 ммоль, 0,05 экв.) в дихлорметане (10 000 мл) в инертной атмосфере азота по каплям добавляли фенолметанол (900 г, 8,32 моль, 0,95 экв.) при перемешивании при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Полученную смесь промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия. Показатель pH водной фазы доводили до 1 с помощью 10%-го раствора соляной кислоты. Полученный раствор экстрагировали этилацетатом и органические слои объединяли. Полученную смесь промывали насыщенным хлоридом натрия. Органический слой сушили безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали под пониженным давлением. В результате получили 1240 г (64%) **G11-1** в виде бесцветного масла. MS m/z [M+H]⁺ (ИЭР): 223.

[0131] К раствору **G11-1** (500 г, 2,24 моль, 1,00 экв.) в тетрагидрофуране (4000 мл) по каплям добавляли комплекс боран-метилсульфида (270 мл, 1,20 экв.) при перемешивании при 0 °С. Полученный раствор перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем реакцию гасили добавлением 200 мл метанола. Полученную смесь концентрировали под пониженным давлением. Остаток наносили на колонку с силикагелем. В результате получили 312 г (67%) **G11-2** в виде желтого масла. MS m/z [M+H]⁺ (ИЭР): 209.

[0132] К раствору (3R,4R,5R,6R)-2,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)оксан-3-аминия хлорида (1000 г, 4,63 моль, 1,00 экв.) в пиридине (10 000 мл) добавляли уксусный ангидрид (3560 г, 34,9 моль, 7,50 экв.) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Полученную смесь концентрировали под пониженным давлением. Неочищенный продукт очищали перекристаллизацией из льда/воды. Это привело к 1450 г (80%) **G11-3** в виде белого твердого вещества. MS m/z [M+H]⁺ (ИЭР): 390.

[0133] К раствору **G11-3** (100 г, 256,84 ммоль, 1,00 экв.) в дихлорметане (10 л) в инертной атмосфере азота добавляли трихлорид железа (125 г, 771,60 ммоль, 3,00 экв.) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. Полученную смесь промывали водой и насыщенным хлоридом натрия. Органический слой сушили безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали под пониженным давлением. В результате получили 52 г (61%) **G11-4** в виде коричневого масла. Продукт использовали на следующей стадии непосредственно без дополнительной очистки.

[0134] К раствору **G11-4** (52 г, 157,91 ммоль, 1,00 экв.) бензил 5-гидроксипентаноата (42,7 г, 205,04 ммоль, 1,30 экв.) в 1,2-дихлорэтаноле (500 мл) в инертной атмосфере азота добавляли триметилсилилтрифторметансульфонат (10,5 г, 47,24 ммоль, 0,30 экв.) по каплям при перемешивании при 0 °С. Полученный раствор перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. Реакцию гасили добавлением льда/воды. Полученный раствор экстрагировали дихлорметаном и органические слои объединяли. Полученную смесь промывали водой и насыщенным хлоридом натрия.

Органический слой сушили безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали под пониженным давлением. Остаток наносили на колонку с силикагелем. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной флэш-ВЭЖХ. В результате получили 46,4 г (55%) **G11-5** в виде светло-желтого масла. MS m/z $[M+H]^+$ (ИЭР): 538.

[0135] К раствору **G11-5** (10 г, 18,60 ммоль, 1,00 экв.) в этилацетате (100 мл) добавляли 10% палладия на активированном угле (1 г). Колбу вакуумировали и пять раз продували водородом. Полученный раствор перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. Твердое вещество отфильтровывали и промывали метанолом и сушат в высоком вакууме в течение ночи. В результате получили 6,82 г (82%) **G11-6** в виде белого твердого вещества.

[0136] К раствору 2-амино-2-(гидроксиметил)пропан-1,3-диола (300 г, 2,48 моль, 1,00 экв.) в ДМСО (500 мл) в инертной атмосфере азота при 15 °С добавляли 5,0 М гидроксида натрия (49,5 мл, 0,248 моль, 0,1 экв.). После этого по каплям при перемешивании добавляли трет-бутилакрилат (1079 г, 8,4 моль, 3,4 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 24 ч при 25 °С. Полученный раствор экстрагировали 4 x 3000 мл этилацетата и органические слои объединяли. Полученную смесь промывали водой и насыщенным хлоридом натрия. Органический слой сушили безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали под пониженным давлением. Остаток наносили на колонку с силикагелем. В результате получили 526 г (42%) **G11-7** в виде светло-желтого масла. MS m/z $[M+H]^+$ (ИЭР): 506,6.

[0137] К раствору **G11-7** (50 г, 99,0 ммоль, 1,00 экв.) в CH_2Cl_2 (750 мл) добавляли 365 мл 25% водного Na_2CO_3 при перемешивании. За этим следовало добавление по каплям бензилхлорформиата (50,5 г, 0,297 моль, 3,00 экв.) при перемешивании при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Полученный раствор экстрагировали дихлорметаном и органические слои объединяли. Органический слой промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали, концентрировали при пониженном давлении. Остаток наносили на колонку с силикагелем. В результате получили 42,4 г (67%) **G11-8** в виде светло-желтого масла. MS m/z $[M+H]^+$ (ИЭР): 640,4.

[0138] К раствору **G11-8** (300 г, 468,9 ммоль, 1,00 экв.) добавляли муравьиную кислоту (3 л, 96%). Полученный раствор перемешивали 16 ч при 25 °С. Реакционную смесь концентрировали под пониженным давлением. Значение рН раствора доводили до 12 с помощью гидроксида натрия (1 моль/л). Полученный раствор экстрагировали 3 x 6 л эфира и водные слои объединяли. Хлористый водород (2 моль/л) использовали для доведения рН водных слоев до 4. Полученный раствор экстрагировали 4 этилацетатом. Органические слои объединяли и сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. В результате получили 198,96 г (90%) **G11-9** в виде желтого масла. MS m/z $[M+H]^+$ (ИЭР): 472.

[0139] К раствору **G11-9** (264 г, 560,51 ммоль, 1,00 экв.) в дихлорметане/ацетонитриле (1400 мл/1400 мл) добавляли N, N-диизопропилэтиламин (578,4 г, 4,484 моль, 8 экв.), O-бензотриазол-N, N,N-этраметилуронийгексафторфосфат (848 г, 2,231 моль, 4,00 экв.) по порядку. Полученный раствор перемешивали в течение 30 мин при 25 °С. За этим следовало добавление трет-бутил N-(3-аминопропил)карбамата (390 г, 2,238 моль, 4,00 экв.) при 25 °С. Полученный раствор перемешивали в течение 6 ч при 25 °С. Полученный раствор концентрировали под пониженным давлением. Остаток разбавляли 3000 мл дихлорметана. Органический слой промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия, насыщенным хлоридом аммония и насыщенным хлоридом натрия соответственно. Органический слой сушили безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали под пониженным давлением. Остаток наносили на колонку с силикагелем. В результате получили 336 г (70%) **G11-10** в виде белой пены. MS m/z [M+H]⁺ (ИЭР): 941.

[0140] К раствору **G11-10** (350 г, 372,3 ммоль, 1,00 экв.) в дихлорметане (1,4 л) добавляли трифторуксусную кислоту (350 мл). Полученный раствор перемешивали в течение 4 ч при 25 °С. Полученную смесь концентрировали под пониженным давлением. В результате получили 470 г (неочищенного) **G11-11** в виде красного масла. MS m/z [M+H]⁺ (ИЭР): 641.

[0141] К раствору **G11-6** (66 г, 147,51 ммоль, 3,50 экв.) и N, N-диизопропилэтиламина (37 г, 286,29 ммоль, 6,78 экв.) в дихлорметане/ацетонитриле (200 мл/200 мл) в инертной атмосфере азота добавляли 1-гидроксибензотризол (24,5 г, 181,48 ммоль, 4,30 экв.) и O-бензотриазол-N, N,N-этраметилуронийгексафторфосфат (56 г, 147,66 ммоль, 3,50 экв.) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре. Впоследствии добавляли **G11-11** (41,4 г, 42,20 ммоль, 1,00 экв.). Полученный раствор оставляли для протекания реакция при перемешивании в течение ночи при комнатной температуре. Полученную смесь концентрировали под пониженным давлением. Полученный раствор разбавляли дихлорметаном. Полученную смесь промывали насыщенным бикарбонатом натрия и насыщенным хлоридом натрия соответственно. Органический слой сушили безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали под пониженным давлением. Сырой продукт очищали с помощью флэш-хроматографии и препаративной ВЭЖХ. В результате получили 41,2 г (51%) **G11-12** в виде светло-желтого твердого вещества. MS m/z [M/2+H]⁺ (ИЭР): 965.

[0142] К раствору **G11-12** (20 г, 10,37 ммоль, 1,00 экв.) в метаноле (200 мл) добавляли 10% палладия на активированном угле (2 г) при комнатной температуре. Колбу вакуумировали и пять раз продували водородом. Полученный раствор перемешивали в течение 4 ч при комнатной температуре. Твердые вещества фильтровали. Полученную смесь концентрировали под пониженным давлением. В результате получили 16,5 г (89%) **G11-13** в виде белого твердого вещества. MS m/z [M/2+H]⁺ (ИЭР): 898.

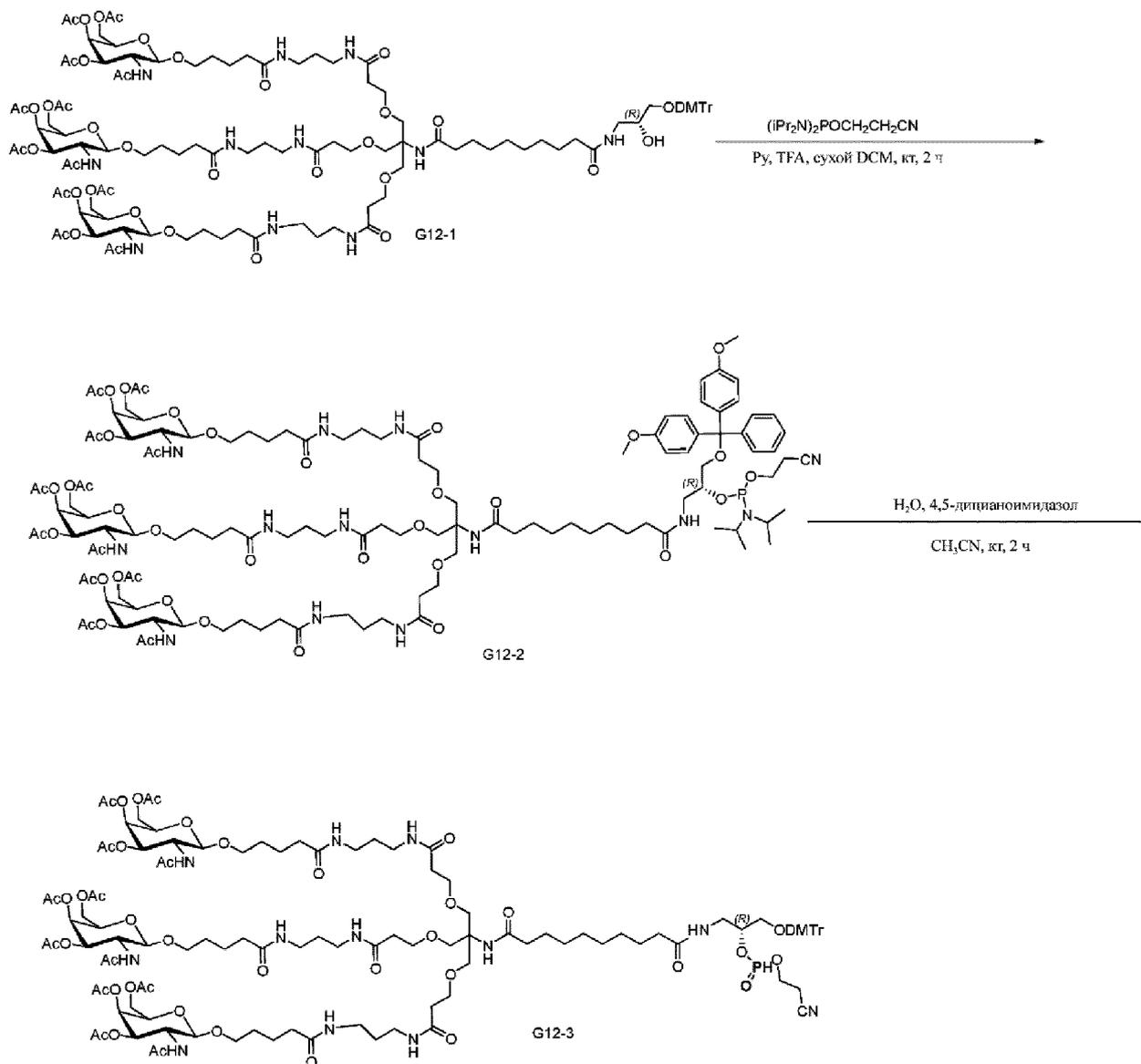
[0143] К раствору **G11-0** (12,8 г, 24,57 ммоль, 1,00 экв.) в N, N-диметилформамиде

(500 мл) добавляли N, N-диизопропилэтиламин (9,0 г, 69,64 ммоль, 3,00 экв.), O-бензотриазол-N, N,N-этраметилюронийгексафторфосфат (9,9 г, 27,03 ммоль, 1,10 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем добавляли **G11-13** (44 г, 24,57 ммоль, 1,00 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре. Полученную смесь концентрировали под пониженным давлением. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной флэш-ВЭЖХ. В результате получили 22 г (41%) **G11-14** в виде светло-желтого твердого вещества. MS m/z [M-H]⁻ (ИЭР): 2295. ¹H ЯМР (DMSO, 400 МГц): 7,79-7,83 (м, 6H), 7,70-7,73 (м, 4H), 7,33-7,35 (м, 2H), 7,26-7,30 (м, 2H), 7,19-7,22 (м, 5H), 7,01 (с, 1H), 6,84-6,87 (м, 4H), 5,19-5,20 (д, J=4,0 Гц, 3H), 4,93-4,97 (м, 3H), 4,58-4,59 (д, J=4,0 Гц, 1H), 4,46-4,48 (д, J=8,0 Гц, 3H), 3,95-4,04 (м, 9H), 3,82-3,89 (м, 3H), 3,67-3,71 (м, 9H), 3,45-3,61 (м, 12H), 3,36-3,41 (м, 3H), 2,94-3,09 (м, 16H), 2,24-2,27 (м, 6H), 2,00-2,08 (м, 29H), 1,87 (с, 9H), 1,75 (с, 9H), 1,63-1,69 (м, 3H), 1,41-1,51 (м, 19H).

[0144] К раствору **G11-14** (2 г, 0,87 ммоль, 1,00 экв.) в дихлорметане (20 мл) в инертной атмосфере азота добавляли бис(диизопропиламино)(2-цианозтокси)фосфин (786,7 мг, 1,62 ммоль, 3,00 экв.) при комнатной температуре. За этим следовало добавление трифторацетата пиридина (336,3 мг, 1,74 ммоль, 2,00 экв.) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Полученную смесь концентрировали под пониженным давлением. В результате получили 2,0 г (неочищенного) **G11-15** в виде желтого масла. Продукт использовали на следующей стадии непосредственно без дополнительной очистки.

[0145] К раствору **G11-15** (2 г, 0,80 ммоль, 1,00 экв.) в ацетонитриле (20 мл) в инертной атмосфере азота добавляли воду (43 мг, 2,4 ммоль, 3,00 экв.) и 4,5-дицианоимидазол (113 мг, 0,96 ммоль, 1,20 экв.) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Полученную смесь концентрировали под пониженным давлением. Сырой продукт очищали с помощью флэш-хроматографии и препаративной ВЭЖХ. Фракцию продукта экстрагировали дихлорметаном. Полученную смесь промывали насыщенным хлоридом натрия. Органический слой сушили безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали под пониженным давлением. В результате получили 1,025 г (53%) **G11-16** в виде белого твердого вещества. MS m/z [M-H]⁻ (ИЭР): 2412. ¹H ЯМР (DMSO-d₆, 400 Гц): 8,10-7,90 (м, 1H), 7,85-7,7,81 (м, 6H), 7,75-7,72 (м, 3H), 7,35-7,22 (м, 9H), 7,05-7,00 (м, 1H), 6,89-6,87 (м, 4H), 5,21-5,20 (д, J=3,2 Гц, 3H), 4,98-4,95 (м, 3H), 4,50 (с, 1H), 4,47-4,40 (м, 3H), 4,04-4,01 (с, 11H), 3,88-3,85 (м, 3H), 3,73-3,69 (м, 9H), 3,55-3,52 (м, 12H), 3,41-3,39 (м, 3H), 3,20 (с, 2H), 3,04-3,00 (м, 14H), 2,85-2,75 (м, 2H), 2,49-2,29 (м, 6H), 2,10-1,99 (м, 28H), 1,89-1,77 (м, 11H), 1,77-1,70 (м, 9H) 1,70-1,65 (м, 2H), 1,52-1,45 (м, 18H). ³¹P NMR (CD₃OD, 400 Гц): 7,957, 7,927.

Синтез GalNAc-12

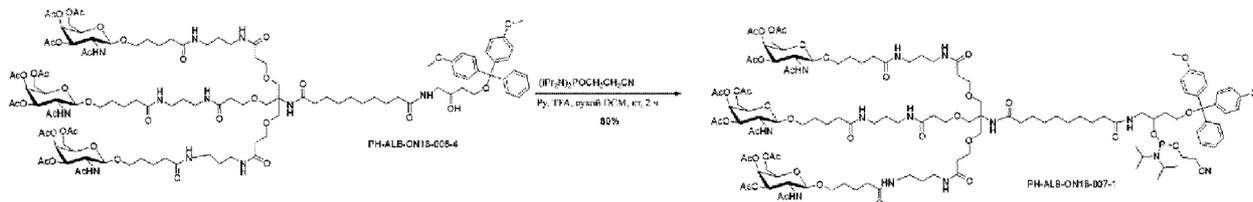


[0146] К раствору **G12-1** (4,0 г, 1,70 ммоль, 1,00 экв.) в дихлорметане (40 мл) в инертной атмосфере азота добавляли бис(диизопропиламино) (2-цианоэтоксифосфин) (922,6 мг, 3,06 ммоль, 1,80 экв.) при комнатной температуре. К этому добавляли трифторацетат пиридина (525 мг, 2,72 ммоль, 1,60 экв.) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. Полученную смесь концентрировали под пониженным давлением. В результате получили 3,0 г (неочищенного) **G12-2** в виде желтого масла.

[0147] К раствору **G12-2** (3,0 г, 1,18 ммоль, 1,00 экв.) в ацетонитриле (30 мл) в инертной атмосфере азота добавляли воду (166 мг, 9,22 ммоль, 7,85 экв.) при комнатной температуре. К этому добавляли 4,5-дицианоимидазол (63,4 мг, 0,54 ммоль, 0,46 экв.) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. Полученную смесь концентрировали под пониженным давлением. Сырой продукт (2,5 г) очищали с помощью флэш-хроматографии и препаративной ВЭЖХ. В результате получили 2,0542 г (71%) **G12-3** в виде белого твердого вещества. МС m/z [M-Н]- (ИЭР): 2468. $^1\text{H ЯМР}$ (DMSO-d_6 , 400 МГц): 7,91-7,80 (м, 7H), 7,74-7,71 (м, 3H), 7,38-

7,31 (м, 4H), 7,29-7,23 (м, 5H), 6,97 (с, 1H), 6,87-6,81 (м, 4H), 5,21 (с, 3H), 4,98-4,94 (м, 3H), 4,60 (с, 1H), 4,49-4,47 (д, J=8,4 Гц, 3H), 4,25-4,10 (м, 2H), 4,02 (с, 9H), 3,88-3,85 (м, 3H), 3,73-3,68 (м, 9H), 3,55-3,52 (м, 11H), 3,52-3,41 (м, 3H), 3,20 (с, 3H), 3,04-2,92 (м, 13H), 2,90-2,89 (м, 2H), 2,29-2,10 (м, 6H), 2,09-1,99 (м, 28H), 1,89-1,80 (м, 9H), 1,77-1,71 (м, 9H), 1,52-1,37 (м, 23H), 1,19 (с, 9H). Р-ЯМР (DMSO-d₆, 400 Гц): 8,456.

Синтез GalNAc-13



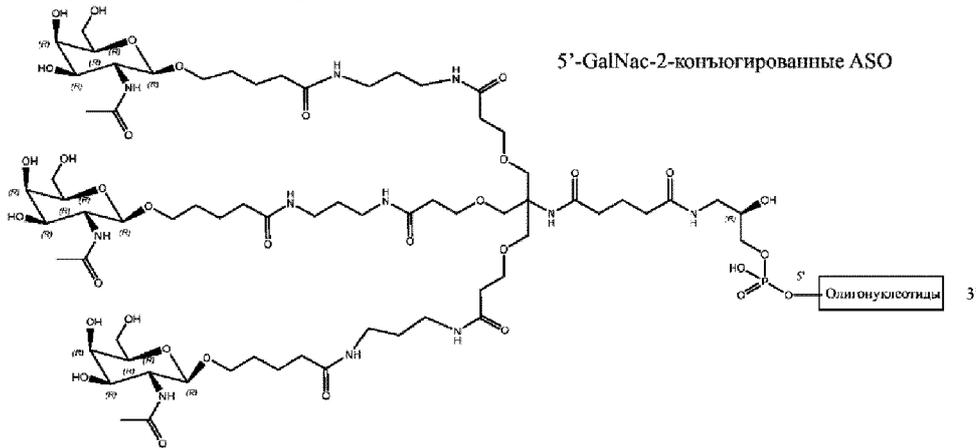
[0148] К раствору **G13-1** (4,0 г, 1,70 ммоль, 1,00 экв.) в дихлорметане (40 мл) в инертной атмосфере азота добавляли бис(диизопропиламино)(2-цианоэтоксифосфин (690 мг, 2,29 ммоль, 1,80 экв.) при комнатной температуре. К этому добавляли трифторацетат пиридина (390 мг, 2,02 ммоль, 1,60 экв.) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Полученную смесь концентрировали под пониженным давлением. В результате получали 2,5 г (неочищенного) **G13-2** в виде желтого масла.

[0149] К раствору **G13-2** (2,3 г, 0,90 ммоль, 1,00 экв.) в ацетонитриле (22 мл) и воде (50 мг, 2,78 ммоль, 3,00 экв.) добавляли 4,5-дицианоимидазол (0,12 г, 101,69 ммоль, 1,20 экв.) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Полученную смесь концентрировали под пониженным давлением. Сырой продукт (2,3 г) очищали с помощью флэш-хроматографии и препаративной ВЭЖХ. В результате получили 2,076 г (94%) **G13-3** в виде грязно-белого твердого вещества. MS m/z [M+Na]⁺ (ИЭР): 2506. 1H ЯМР (DMSO-d₆, 300 Гц): 8,05-7,90 (м, 1H), 7,80-7,71 (м, 9H), 7,38-7,22 (м, 9H), 6,95 (с, 1H), 6,89-6,86 (м, 4H), 5,21 (с, 3H), 4,99-4,94 (м, 3H), 4,65-4,40 (м, 4H), 4,02 (с, 11H), 3,88-3,85 (м, 3H), 3,73-3,68 (м, 9H), 3,56-3,51 (м, 12H), 3,42-3,38 (м, 3H), 3,32 (с, 2H), 3,04 (с, 14H), 2,84-2,82 (м, 2H), 2,29-2,22 (м, 6H), 2,10-1,99 (м, 28H), 1,89 (с, 10H), 1,77 (с, 10H), 1,52-1,45 (м, 22H), 1,22 (с, 9H). Р-ЯМР (DMSO-d₆, 300 Гц): 7,867.

Конъюгация с GalNAc

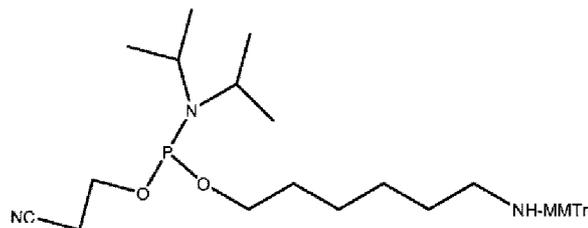
[0150] Для получения 5'-GalNAc-конъюгированного олигомера со следующими модификациями: 2'-F-NPS-PS-2'-F-NPS; 2'-F-NP-PS-2'-F-NP; 2'-OMe-NP-PS-2'-OMe-NP; 2'-OMe-NPS-DNA-PS-2'-OMe-NPS, 2'-OEt-NPS-DNA-PS-2'-OEt-NPS и 2'-MOE-NPS-DNA-PS-2'-MOE-NPS, синтез выполняли в количестве 10-200 мкМ в направлении от 5' к 3' с 5'-фосфорамидитными мономерами, разведенными до концентрации 0,1 М в безводном CH₃CN в присутствии 5-(бензилтио)-1H-тетразольного активатора (время сочетания 2,0-4,0 мин) с получением GalNAc 2-CPG. Выполнение цикла соединения согласно модифицированным протоколам с последующими стандартными блокированием, окислением и снятием защиты приводило к получению

модифицированных олигонуклеотидов. Эффективность поэтапного соединения составляла более 98%. DDTT (диметиламинометилиден)амино)-3Н-1,2,4-дитиазолин-3-тион использовали в качестве агента переноса серы для синтеза фосфоротиоатов олигорибонуклеотида. В качестве сульфитирующего агента при крупномасштабном синтезе использовали 0,2 М фенилацетилдисульфид (PADS) в смеси лутидин : ацетонитрил (1 : 1) (Akta OP-100). Твердые подложки, несущие олигонуклеотиды, выдерживали при комнатной температуре с водным раствором аммиака/метиламина (1 : 1) в течение 3 ч в шейкере для отсоединения от подложки и удаления нестабильных в щелочной среде защитных групп.



Синтез 3'-С6NH₂-NPS-PS-(предшественник)

[0151] Для получения 3'-GalNac-конъюгированных олигомеров со следующими модификациями: 2'-F-NPS-PS-2'-F-NPS; 2'-F-NP-PS-2'-F-NP; 2'-OMe-NP-PS-2'-OMe-NP; 2'-OMe-NPS-DNA-PS-2'-OMe-NPS, 2'-OEt-NPS-DNA-PS-2'-OEt-NPS и 2'-MOE-NPS-DNA-PS-2'-MOE-NPS, антисмысловые олигонуклеотиды (ASO) синтезировали в количестве 10 мкмоль, используя универсальную подложку (загрузка 65 мкмоль/г). Процедура синтеза аналогична описанной выше. На 3'-конце для введения С6-NH₂-линкера использовали 6-(4-монометокситритиламино)гексил-(2-цианоэтил)-(N, N-диизопропил)-фосфорамидит в 0,1 М ацетонитриле со временем связывания 10 мин. Твердые подложки, несущие олигонуклеотиды, выдерживали при комнатной температуре с водным раствором аммиака/метиламина (1 : 1) в течение 3 ч в шейкере для отсоединения от подложки и удаления нестабильных в щелочной среде защитных групп. После очистки ИЕХ и обессоливания С6-NH₂-модифицированные ASO можно использовать для проведения постсинтетической конъюгации.

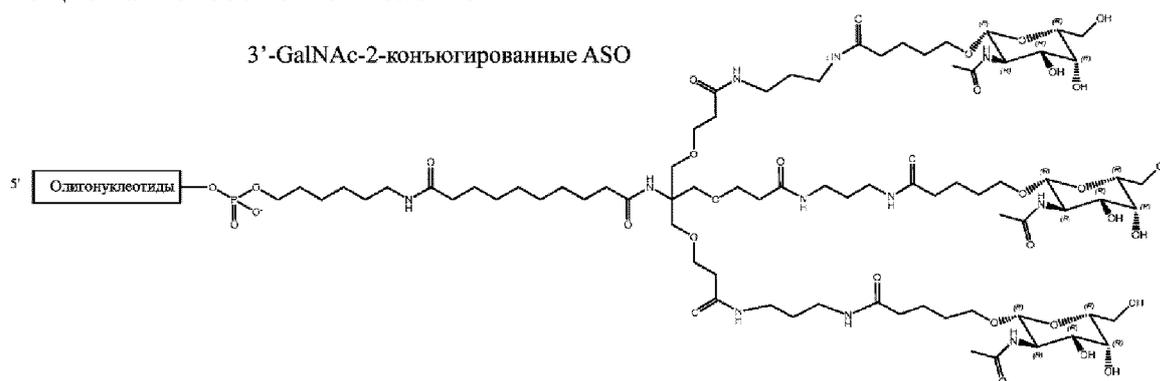


5'-Амино-модификатор С6

6-(4-монометокситритиламино)гексил-(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)-фосфорамидит

Синтез 3'-GalNAc NPS-PS-NPS-ASO (постсинтетическая конъюгация)

[0152] 3'-С6-NH₂-модифицированные ASO растворяли в 0,2 М буферном растворе бикарбоната натрия, pH 8,5 (0,015 мМ), и добавляли 5-7 мол. эквивалента GalNAc-6 эфира, растворенного в DMSO. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Образец анализировали, чтобы подтвердить присутствие любых непрореагировавших аминомодифицированных ASO. К этой смеси добавляли водный раствор аммиака (28% масс.) (5× реакционный объем) и перемешивали при комнатной температуре в течение 2-3 ч. Реакционную смесь концентрировали под пониженным давлением и остаток растворяли в воде и очищали посредством ВЭЖХ на мощной анионообменной колонке.



Конъюгация с 3'-GalNAc6

Конц. олигонуклеотидов	Эквивалент эфира GalNAc 6 PFP	Темп. (°C)	% преобразования в 3' GalNAc ASO
0,015 мМ	5	25	75
0,0076 мМ	7	25	80
0,0076 мМ	4	25	65

Количественное определение неочищенного олигомера или анализ неочищенного материала

[0153] Пробы растворяли в деионизированной воде (1,0 мл) и выполняли количественную оценку следующим образом. Сначала измеряли холостую пробу, используя только воду (1,0 мл). 20 мкл пробы и 980 мкл воды хорошо перемешивали в микроцентрифужной пробирке, переносили в кювету и измеряли поглощательную способность при 260 нм. Сырой материал сушили и хранили при -20 °С.

Анализ неочищенного материала посредством ВЭЖХ/ЖХМС

[0154] Для анализа неочищенного материала посредством МС использовали пробы неочищенного материала с 0,1 OD. После подтверждения данных посредством ЖХМС выполняли стадию очистки.

Очистка посредством ВЭЖХ

[0155] Фосфорамидат- (NP) и тиофосфорамидат- (NPS) модифицированные олигонуклеотиды, содержащие и не содержащие конъюгаты GalNAc, очищали посредством анионообменной ВЭЖХ. Буферные растворы представляли собой 20 мМ

фосфат натрия в 10% CH_3CN , pH 8,5 (буферный раствор А) и 20 мМ фосфат натрия в 10% CH_3CN , 1,8 М NaBr, pH 8,5 (буферный раствор В). Фракции, содержащие полноразмерные олигонуклеотиды, объединяли, обессоливали и лиофилизировали.

Обессоливание очищенного олигомера

[0156] Впоследствии очищенный сухой олигомер обессоливали с помощью Sephadex G-25 М (Amersham Biosciences). Картридж трижды кондиционировали 10 мл деионизированной воды. Наконец, очищенный олигомер, тщательно растворенный в 2,5 мл воды, не содержащей РНКазы, наносили на картридж с очень медленным элюированием по каплям. Не содержащий соли олигомер элюировали, используя 3,5 мл деионизированной воды, непосредственно во флакон с винтовой крышкой.

Испытание на стабильность комплексных олигонуклеотидов

В вариантах осуществления описанные олигонуклеотиды проявляют повышенную аффинность к целевой нуклеотидной последовательности по сравнению с немодифицированными олигонуклеотидами с той же последовательностью. Например, в некоторых последовательностях описанные олигонуклеотиды имеют последовательность нуклеотидных оснований, которая комплементарна целевой нуклеотидной последовательности с более высокой аффинностью, чем немодифицированный олигонуклеотид с той же последовательностью, или гибридизируется с ней. В вариантах осуществления описанный олигонуклеотид в комплексе с комплементарной целевой нуклеотидной последовательностью имеет температуру плавления $T_m > 37$ °С. Комплекс может быть образован в физиологических условиях или в практически физиологических условиях, таких как фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). В вариантах осуществления T_m комплекса составляет > 50 °С. В вариантах осуществления T_m комплекса составляет 50-100 °С. В вариантах осуществления T_m описанного олигонуклеотида, спаренного с целевой нуклеотидной последовательностью в физиологических условиях или в практически физиологических условиях, составляет > 50 °С.

[0157] В определенных вариантах осуществления целевая нуклеотидная последовательность может быть выбрана из нуклеотидной последовательности, представляющей собой известную последовательность вирусной ДНК или РНК, такую как геном ВГВ.

[0158] В вариантах осуществления раскрытые олигонуклеотиды проявляют аффинность по меньшей мере к одной из следующих шести последовательностей генома ВГВ или его РНК-эквивалентов и/или демонстрируют стабильность в комплексе с по меньшей мере одной последовательностью генома ВГВ или его эквивалентом РНК. В вариантах осуществления олигонуклеотид в комплексе с комплементарной последовательностью генома ВГВ имеет температуру плавления (T_m) > 37 °С. Геном ВГВ может представлять собой последовательность РНК, такую как последовательность РНК DR-1 и/или DR-2. Комплекс может быть образован в физиологических условиях или в практически физиологических условиях, таких как фосфатно-солевой буферный раствор

(PBS). В вариантах осуществления T_m комплекса составляет > 50 °C. В вариантах осуществления T_m комплекса составляет 50-100 °C. В вариантах осуществления T_m описанного олигонуклеотида, спаренного с РНК ВГВ в физиологических условиях или в практически физиологических условиях, составляет > 50 °C.

Испытание олигонуклеотидов *in vitro*

[0159] Для оценки активности олигонуклеотидов *in vitro* использовали две клеточные линии ВГВ: HepG2.2.15 (2215) и HepG2.117 (2117). Снижение HBsAg в супернатанте (sup) тканевой культуры, а также цитотоксичность измеряли с использованием клетки HepG2.2.15. Снижение ДНК ВГВ в sup, а также внутриклеточную фракцию измеряли в клетке HepG2.117.

[0160] Клеточная линия HepG2.2.15 представляет собой стабильную клеточную линию с четырьмя встроенными геномами ВГВ. Клетки выращивали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла, обогащенной 10% FCS, 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2% глутамин. За сутки до дозирования $2,5 \times 10^4$ клеток/лунку высевали на покрытые коллагеном 96-луночные планшеты и инкубировали в течение ночи. На сутки дозирования последовательно разведенные олигомеры трансфицировали в клетки реактивом Lipofectamine RNAiMax (Thermo Fisher, г. Уолтем, штат Массачусетс) в соответствии с протоколом производителя. Каждую концентрацию лекарственного средства получали в двух повторениях и для каждого олигонуклеотида измеряли EC50 и CC50. Через трое суток после трансфекции собирали супернатант (sup) и использовали в твердофазном ИФА HBsAg (AutoBio, Китай) для расчета EC50. Для измерения CC50 в анализе использовали клетки CellTiter-Glo® (Promega, г. Мадисон, штат Висконсин) в соответствии с инструкциями производителя.

[0161] HepG2.117 представляет собой стабильную клеточную линию гепатомы, содержащую интегрированную копию 1.05 генома ВГВ (подтип ауw), регулируемую TetOFF (индукция транскрипции в отсутствие тетрациклина или его гомолога доксициклина). Клетки выращивали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в среде DMEM/F12, обогащенной 10% FCS, 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2% глутамин, 250 мкг/мл G418 и 2 мкг/мл тетрациклина. За сутки до дозирования клеточную среду, содержащую тетрациклин, удаляли, клетки промывали для удаления остаточного тетрациклина и высевали в количестве $2,5 \times 10^4$ клеток/лунку со средой для обработки (среда DMEM/F12, содержащая одобренную для применения с системой Tet 2% FBS, 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2% глутамин) в покрытых коллагеном 96-луночных планшетах. Впоследствии клетки инкубировали в течение ночи. На сутки эксперимента последовательно разведенные олигомеры трансфицировали в клетки реактивом Lipofectamine RNAiMax (Thermo Fisher, г. Уолтем, штат Массачусетс) в соответствии с протоколом производителя. Каждую концентрацию лекарственного средства получали в двух повторениях и для каждого олигонуклеотида измеряли EC50 и CC50. Через четверо суток после трансфекции собирали sup, который использовали непосредственно для количественной ПЦР ДНК ВГВ. ДНК ВГВ из клеток выделяли с

помощью набора для выделения нуклеиновых кислот MagMAX™ Total (Thermo Fisher), после чего использовали в кПЦР в качестве матрицы. Последовательность ДНК ВГВ подтипа ауw (учетный номер V01460) использовали для создания (Primer Express, Thermo Fisher) прямого праймера (5'-TTG CCT TCT GAC TTC TTT CCT TCT-3'), обратного праймера (5'-TGC CTG AGT GCT GTA TGG TGA G-3') и флуорогенного зонда TaqMan® (5'-TCG GGA AGC CTT AGA GTC TCC TGA-3'), помеченного FAM (6-карбоксихлорофлуоресцеин) на 5'-конце и TAMRA (6-карбокситетраметилродамин) на 3'-конце. Эти праймеры и зонд использовали для проведения количественной ПЦР в реальном времени с ДНК-полимеразой AmpliTaq Gold (Perkin Elmer Life Science, г. Уолтем, штат Массачусетс). Условия для этой реакции были следующими: 1 цикл, горячий запуск при 95°C на 10 мин, впоследствии 50 циклов денатурации (95°C в течение 15 с) и отжиг/полимеризация (59°C в течение 1 мин).

Инфекционная система ВГВ в первичном человеческом гепатоците

[0162] Криосохраненные первичные человеческие гепатоциты (PHH) размораживали и высевали в 24-луночные планшеты с плотностью 200 000 клеток/лунку. Клеткам позволяли восстановиться в течение ночи при 37°C 5% CO₂. Клетки инфицировали в течение ночи (37 °C/5% CO₂) ВГВ с множественностью инфекции (MOI) 50-100. После инфицирования в течение ночи вирусный посевной материал удаляли и клетки трижды промывали предварительно нагретой промывочной средой. Впоследствии заливали свежую культуральную среду PHH. Среду заменяли на 450 мкл свежей среды. Добавляли 50 мкл смеси для трансфекции. Разводили олигомеры в среде Opti MEM I (Life Technology, кат. № 31985-070) до конечной концентрации 20x, смешивали с равным объемом среды Opti-MEM I, содержащей Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, кат. № 13778-150), пипетировали 3 раза и инкубировали в течение 10-20 мин при комнатной температуре. В лунки добавляли 50 мкл смеси олигонуклеотидов : RNAiMAX, после чего несколько раз постукивали по планшетам рукой. Планшеты возвращали обратно в инкубатор. На сутки анализа супернатант собирали для твердофазного ИФА HBsAg и HBeAg, а клетки для анализа жизнеспособности клеток. Твердофазный ИФА HBsAg описан в разделе выше. В отношении HBeAg использовали способ компании Autobio Diagnostics (CL0312-2).

Испытание олигонуклеотидов *in vivo*

[0163] AAV/HBV представляет собой рекомбинантный AAV, несущий реплицируемый геном ВГВ. Используя высокую гепатотропность генотипа 8 AAV, геном ВГВ можно эффективно доставлять в мышечные клетки печени. Инфицирование иммунокомпетентной мыши AAV/HBV может привести к длительной виремии ВГВ, что имитирует хроническую инфекцию ВГВ у пациентов. Модель AAV/HBV может быть использована для оценки активности *in vivo* различных типов агентов против ВГВ. Мышей инфицировали AAV-HBV на 28-е сутки исследования. Испытуемое изделие или отрицательный контроль (PBS) вводили подкожно (если не указано иное) три раза на 0, 2 и 4-е сутки с указанными уровнями дозы. Или их можно вводить в виде однократной дозы

с указанными уровнями дозы на 0-е сутки. Положительный контроль, энтекавир (ETV), для ДНК ВГВ, но не для антигенов ВГВ, вводили перорально каждые сутки. Сывороточный антиген S (HBsAg) и антиген E (HBeAg) ВГВ анализировали посредством твердофазного ИФА, а ДНК ВГВ посредством ПЦР в реальном времени. Способы твердофазного ИФА и способ количественной ПЦР были описаны выше в разделах, относящихся к анализу *in vitro*.

[0164] В приведенном ниже описании указано, как были получены данные из таблиц 1-22. Для всех данных по EC50 и CC50 для HBsAg в клеточной линии в условиях *in vitro* использовали способ для HepG2.2.15 и, соответственно, в столбцах или строках, в которых показаны данные, ставили отметку 2215. Для всех данных по EC50 и CC50 для ДНК ВГВ в клеточной линии в условиях *in vitro* использовали способ для HepG2.117 и, соответственно, в столбцах или строках, в которых показаны данные, ставили отметку 2117. Для всех данных по EC50 для HBsAg, а также для HBeAg, полученных в инфекционной системе HBV/PHN, использовали способ PHN и, соответственно, в столбцах или строках, в которых показаны данные, ставили отметку PHN. В отношении результатов по мышинной модели AAV-HBV в условиях *in vivo* применяли способ, описанный выше в разделе, относящемся к исследованию *in vivo*. Максимальное уменьшение HBsAg (или HBeAg) описывалось как «низшая точка» (единицы: логарифмическое уменьшение), и в столбцах или строках, в которых показаны данные, ставили отметку «низшая точка». Два ASO часто сравнивали по их низшей точке. Если сравнивали другое значение, а не «низшую точку», то это указано в тексте.

Способ лечения

[0165] Взрослому человеку, страдающему инфекцией ВГВ, вводят внутривенно терапевтически эффективное соединение настоящего описания, например соединение, выбранное из таблиц 1-22. Лечение продолжают до тех пор, пока не наступит облегчение одного или более симптомов ВГВ или, например, не произойдет снижение концентрации сывороточного антигена ВГВ S (HBsAg) и/или антигена E (HBeAg).

[0166] Взрослому человеку, страдающему инфекцией ВГВ, вводят подкожно терапевтически эффективное соединение настоящего описания, например соединение, выбранное из таблиц 1-22. Лечение продолжают до тех пор, пока не наступит облегчение одного или более симптомов ВГВ или, например, не произойдет снижение концентрации сывороточного антигена ВГВ S (HBsAg) и/или антигена E (HBeAg).

Таблица 1

Последовательность	T _m (°C)	Максимальное уменьшение HBsAg (низшая точка) 3×10 мг/кг	Максимальное уменьшение HBeAg (низшая точка) 3×10 мг/кг
258	77,2	3,4 log	2,7 log

259	69,9	2,4 log	1,9 log
Улучшение	7,3	1 log	0,8 log
№	Последовательность (5'-3')		Молярная масса
258	5'- mGnpsmoeCnpsmoeAnpsmGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsAps ApsGpsCpsGpsApsmoeAnpsmGnpsmoeUnpsmGnpsmoeCnp- C6-NH-GalNAc6-3'		8862,97
259*	5'- moeGps(5me)moeCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsTpsGps ApsApsGps(5me)CpsGpsApsmoeApsmoeGpsmoeTpsmoeGps(5me)moeC-po-GalNAc2-3'		9008,93

* Последовательности 260 и 261 также протестировали с получением схожих результатов.

Таблица 2

Последовательность	T _m (°C)	Максимальное уменьшение НВsAg (низшая точка) 3×10 мг/кг	Максимальное уменьшение НВеAg (низшая точка) 3×10 мг/кг
262	77,3	3,1 log	2,5 log
263	69,9	2,4 log	1,9 log
Улучшение	7,4	0,7 log	0,6 log
№	Последовательность (5'-3')		Молярная масса
262*	5'-GalNAc 2- moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGps ApsApsGpsCpsGpsApsmoeAnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsm oeCn 3'		8941,00
263	5'- moeGps(5me)moeCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsTpsGps		9008,93

	ApsApsGps(5me)CpsGpsApsmoeApsmoeGpsmoeТpsmoeGps (5me)moeC-GalNac2-3'	
--	---	--

* 5'-GalNac2-
moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsТpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoe
AnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCn-3'

и

5'-GalNac1-
moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsТpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsmoeAnps
moeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCn-3' были также проверены и дали аналогичные
результаты.

Таблица 3

Последова- тельность	Максимальное уменьшение НВsAg (низшая точка) 3×5 (мг/кг)	Максимальное уменьшение НВеAg (низшая точка) 3×5 (мг/кг)
266	2,3 log	2,1 log
267	2,2 log	1,9 log
Улучшение	0,1 log	0,2 log

№	Последовательность (5'-3')	Молярная масса
266*	5-GalNac2- mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnpsGpsGpsТpsGpsApsApsGps (5m)CpsGpsApsmoeAnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCn-3	8736,73
267	5'-GalNac6-NH-C6- moeGps(5m)moeCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsТpsGpsAp sApsGps(5m)CpsGpsApsmoeApsmoeGpsmoeТpsmoeGps(5m) moeC-3'	9105,14

* 5'-GalNac2-
mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnpsGpsGpsТpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmAnpsmGnpsm
UnpsmGnpsmCn-3' также исследовали с получением схожих результатов.

[0167] Как можно видеть выше, олигомеры МОЕ NPS были более активными, чем
МОЕ PS в условиях *in vivo*, а активность ОМе NPS была аналогичной таковой у
олигомеров МОЕ PS.

[0168] Два олигонуклеотида (первый содержит замену ОEt NPS, а второй содержит

МОЕ NPS) исследовали *in vitro* и *in vivo*. Результаты исследования приведены ниже в таблице 4.

Таблица 4

Последовательность	Максимальное уменьшение HBsAg (низшая точка) 3×5 (мг/кг)	Максимальное уменьшение HBeAg (низшая точка) 3×5 (мг/кг)
269	1,9 log	1,7 log
270	1,9 log	1,8
Разность	0 log	-0,1 log
№	Последовательность (5'-3')	
269	5'-GalNAc2-etoGnps(5m)etoCnpsetoAnpsetoGnpsetoAnpsGps GpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApssetoAnpsetoGnpsetoTnpsetoGnps (5m)etoCn-3'	
270	5-GalNAc2- moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps (5m)CpsGpsApsmAnpsmGnpsmUnpsmGnpsmCn-3	

[0169] Как можно видеть выше, олигомеры МОЕ NPS обладали аналогичной активностью с олигомерами ОЕт NPS.

[0170] Четыре олигонуклеотида (первый содержит замену МОЕ PS, второй содержит имеет замену МОЕ NPS, третий имеет замену ОМЕ PS, четвертый имеет замену ОМЕ NPS) исследовали *in vitro*. Результаты исследования приведены ниже в таблице 5.

Таблица 5

Последовательность	2215 HBsAg EC50 (нМ)	T _m (°C)
271	5	69,9
272	0,7	77,3
273	5	70,7
274	0,9	75,5
№	Последовательность (5'-3')	
271	5'-	
		ММ
		7344,19

	moeGpsmoemCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsTpsGpsApsApsGps5mCpsGpsApsmoeApsmoeGpsmoeTpsmoeGpsmoemC 3'	
272	5'moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsmoeAnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCn 3'	7276,27
273	5'-mGps5mmCpsmApsmGpsmApsGpsGpsTpsGpsApsApsGps5mCpsGpsApsmApsmGpsmUpsmGps5mmC-3'	6889,64
274	5'-mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmApsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsmAnpsmGnpsmUnpsmGnpsmCn-3'	6837,71

[0171] Два олигонуклеотида (первый содержит замену 5'-GalNAc-2'-МОЕ NPS, второй имеет замену 5'-GalNAc-6: МОЕ PS) исследовали *in vivo*. Результаты исследования приведены ниже в таблице 6.

Таблица 6

№	Последовательность (5'-3')	ММ
275	5'-GalNAc2-moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps (5m)CpsGpsApsmoeAnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCn-3'	8957,00
276	5'-GalNAc6-NH-C6-moeGps(5m)moeCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeApsmoeGpsmoeTpsmoeGps(5m)moeC-3'	9105,14
Доза		Увеличение максимального снижения НВsAg (низшая точка)
3×5 (мг/кг)		0,4 Log (в 2,5 раза)
1×5 (мг/кг)		0,5 Log (в 3,2 раза)

[0172] Два олигонуклеотида (первый содержит замену 3'-GalNAc-2'-МОЕ NPS, второй имеет замену 3'-GalNAc2'-МОЕ PS) исследовали *in vivo*. Результаты исследования приведены ниже в таблице 7.

Таблица 7

№	Последовательность (5'-3')	ММ
277	5'moeGps(5m)moeCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeApsmoeGpsmoeTpsmoeGps(5m)moeC-	9008,93

		GalNAc2-3'			
258	mGnpsmoeCnpsmoeAnpsmGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsmoeAnpsmGnpsmoeUnpsmGnpsmoeCnp-C6-NH-GalNAc6			8862,97	
		5'-		3'	
Последовательность	277	258	Улучшение		
T _m (°C)	69,9	77,2	7,3		
2215 HBsAg In vitro EC50 (нМ)	5	0,7	в 7,1 раза		
Максимальное уменьшение HBsAg (низшая точка) 3×10 мг/кг	2,4 log	3,4 log	1 log (в 10 раз)		
Максимальное уменьшение HBeAg (низшая точка) 3×10 мг/кг	1,9 log	2,7 log	0,8 log (в 6,3 раза)		

[0173] Два олигонуклеотида (первый содержит замену OME NPS, второй имеет замену OME PS) исследовали in vivo.

Таблица 8

№	Последовательность (5'-3')	ММ
278	5-GalNAc2- mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsA psmAnpsmGnpsmUnpsmGnpsmCn-3'	8502,45
279	5- mGps(5m)mCpsmApsmGpsmApsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsG psApsmApsmGpsmUpsmGps(5m)mC-GalNAc1-3'	8650,54
Улучшение OME NPS по сравнению с OME PS	Увеличение максимального уменьшения HBsAg (низшая точка)	Максимальное уменьшение HBeAg (низшая точка)

3×10 мг/кг	0,9 Log (в 8 раз)	0,5 log (в 3,2 раза)
------------	-------------------	----------------------

[0174] Следующие последовательности исследовали в мышинной модели ВГВ. При дозе 1×10 мг/кг 3' GalNac MOE NPS поддерживал на 0,8 log (6 раз) лучшую эффективность, чем 5' GalNac MOE PS, преимущество сохранялось на протяжении большей части 21-дневного исследования. 5' GalNac MOE NPS поддерживал улучшение эффективности до 0,4 log (в 2,5 раза) по сравнению с 5' GalNac MOE PS, при этом преимущество сохранялось в течение большей части 21-суточного периода исследования. При дозе 3×3,3 мг/кг, 3' GalNac MOE NPS и 5' GalNac MOE NPS работали одинаково, обе сохраняли до 0,6 log (4 раза) лучшей эффективности, чем 5' GalNac MOE PS, преимущества сохранялись на протяжении большей части 21 дня обучения.

Таблица 9

№	Химический состав	Последовательность (5'-3')	ММ
276	MOE PS	5'-GalNac6-NH-C6- moeGps(5m)moeCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsTps GpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeApsmoeGpsmoeTps moeGps(5m)moeC-3'	9105,14
280	MOE NPS	5'-GalNac2-moeGnpsmoeCnpsmoeAnps moeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps (5m)CpsGpsApsmoeAnpsmoeGnpsmoeUnps moeGnpsmoeCn-3'	8957,00

[0175] Следующие последовательности исследовали в мышинной модели ВГВ.

Таблица 10

№	Химический состав	Последовательность (5'-3')	ММ
276	MOE PS	5'-GalNac6-NH-C6- moeGps(5m)moeCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGps TpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeApsmoeGpsm oeTpsmoeGps(5m)moeC-3'	9105,14
281	MOE NPS	5'- moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGp sTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeAnpsmoeGn psmoeUnpsmoeGnpsmoeCnp-C6-NH-GalNac6-3'	9053,85

282	МОЕ NPS	5'-GalNAc2- moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGp sTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeAnpsmoeGn psmoeUnps moeGnpsmoeCn-3'	8957,00
-----	---------	---	---------

[0176] Следующие последовательности исследовали в мышинной модели ВГВ. Значения в правой колонке показывают максимальное уменьшение HBsAg в LOG при введении дозы 3×10 мг/кг на 0, 2, 4-е сутки.

Таблица 11

№	Химический состав	Последовательность 5'-3'	Максимальное уменьшение HBsAg (низшая точка)	ММ
283	Дезокси NPS	5'-GalNAc1- GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGps GpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsAn psGnpsTnpsGnpsCn-3'	1,1	8312,38
265	МОЕ NPS	5'-GalNAc1- moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnps moeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps CpsGpsApsmoeAnpsmoeGnpsmoeUn psmoeGnpsmoeCn-3'	3,1	9037,17

[0177] Следующие последовательности исследовали в мышинной модели ВГВ. Значения в правой колонке показывают максимальное уменьшение HBsAg в LOG при введении дозы 3×10 мг/кг на 0, 2, 4-е сутки.

Таблица 12

№	Целевая область ВГВ	Химический состав	Последовательность 5'-3'	Максимальное уменьшение HBsAg (низшая точка) в log	ММ
283	DR2 #1	Дезокси NPS	5'-GalNAc1- GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGps GpsTpsGpsApsApsGpsCpsG psApsAnpsGnpsTnpsGnpsCn -3'	1,1	8312,38
284	DR2 #1	ОМЕ NPS	5'-GalNAc1- mGnpsmCnpsmAnpsmGnps mAnpsGps GpsTpsGpsApsApsGpsCpsG psApsmAnpsmGnpsmUnpsm GnpsmCn-3'	2,1	8598,62
285	DR2 #1	F NPS	5'-GalNAc1- fGnpsfCnpsfAnpsfGnpsfAnps GpsGpsTpsGpsApsApsGpsC	2,5	8478,26

			psGpsApsfAnpsfGnpsfUnpsf Gnps-3nh2-fC-3'		
286	DR2 #1	Ara F NPS	5'-GalNAc1- afGnpsafCnpsafAnpsafGnpsa fAnpsGpsGpsTpsGpsApsAps GpsCpsGpsApsafAnpsafGnps afTnpsafGnpsafCn-3'	0,5	8492,29
287	DR2 #2	Дезокси NPS	5'-GalNAc1- dTnpsGnpsCnpsAnpsGnpsAp sGpsGpsTpsGpsApsApsGps CpsGpsAnpsAnpsGnpsTnps- 3nh2-G-3'	1,1	8327,29
288	DR2 #2	OME NPS	5'-GalNAc1- mUnpsmGnpsmCnpsmAnps mGnpsApsGpsGpsTpsGpsAp sApsGpsCps GpsmAnpsmAnpsmGnpsmU npsmGn-3'	2,1	8599,60
289	DR2 #2	F NPS	5'-GalNAc1- fUnpsfGnpsfCnpsfAnpsfGnps ApsGpsGpsTpsGpsApsApsG psCpsGpsfAnpsfAnpsfGnpsf Unps-3nh2-fG-3'	2,4	8479,24
290	Pre-PolyA	OME NPS	5'-GalNAc1- mGnpsmCnpsmUnpsmCnps mCnpsApsApsApsTpsTps5M eCpsTpsTpsTpsApsmUnpsm AnpsmAnpsmGnpsmGnpsm Gn-3'	1,1	8807,84
291	Pre-PolyA	MOE NPS	5'-GalNAc1- moeGnpsmoeCnpsmoeUnps moeCnpsmoeCnpsApsApsAp sTpsTps5MeCpsTpsTpsTpsA psmoeUnpsmoeAnpsmoeAnp smoeGnpsmoeGnpsmoeGn-3'	2,0	9292,42

Таблица 14

№	Химический состав	ММ	Последовательность
294	F NPS с ОРО- связью с 3'GalNac	8507,3	5'- fGnps(5m)fCnpsfAnpsfGnpsfAnpsGpsGpsTpsGpsAps ApsGpsCpsGpsApsfAnpsfGnpsfTnpsfGnpsfC-C6-NH- GalNac6-3'

295	F NPS с NPO- связью с 3'GalNac	8492,29	5'- fGnpsfCnpsfAnpsfGnpsfAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGp s(5m)CpsGpsApsfAnpsfGnpsfUnpsfGnpsfCnp-C6-NH- GalNac6-3'
-----	--------------------------------------	---------	---

Таблица 15

№	Химический	ММ	Последовательность
296	OME NPS с NPO-связью с 3'GalNac	8614,39	5-mGnpsmCnpsmAnps mGnpsmAnpsGps GpsTpsGps ApsApsGps (5m)CpsGpsAps mAnpsmGnpsmUnps mGnpsmCnp-C6-NH- GalNac6-3
297	OME NPS с OPO-связью с 3'GalNac	8614,43	5-mGnpsmCnpsmAnps mGnpsmAnpsGps GpsTpsGps ApsApsGps (5m)CpsGpsAps mAnpsmGnpsmUnps mGnpsmC-C6-NH-GalNac6-3

Таблица 16

№	Химический состав	ММ	Последовательность
298	MOE NPS с NPO-связью с 3'GalNac	9054,52	5'-moeGnpsmoeCnpsmoeAnps moeGnpsmoeAnpsGps GpsTpsGps ApsApsGps (5m)CpsGpsAps moeAnpsmoeGnpsmoeUnps moeGnpsmoeCnp-C6- NH-GalNac6-3'
299	MOE NPS с OPO-связью с 3'GalNac	9069,62	5'-moeGnpsmoeCnpsmoeAnps moeGnpsmoeAnpsGps GpsTpsGps ApsApsGps (5m)CpsGpsAps moeAnpsmoeGnpsmoeUnps moeGnps(5m)moeC-C6- NH-GalNac6-3'

Таблица 17

№	Химический состав	ММ	Последовательность
300	5' GalNac MOE NPS	8955,48	5-GalNac2-moeGnpsmoeCnpsmoeAnps moeGnpsmoeAnpsGps GpsTpsGps ApsApsGps (5m)CpsGpsAps moeAnpsmoeGnpsmoeUnps moeGnpsmoeCn-3

301	5' GalNac OEt NPS	8697,6	5-GalNac2-etoGnpseto(5m)CnpsetoAnps etoGnpsetoAnpsGps GpsTpsGps ApsApsGps (5m)CpsGpsAps etoAnpsetoGnpsetoTnps etoGnpseto(5m)Cn-3'
-----	----------------------	--------	--

Таблица 18

№	Последовательность 5'-3'	Модификация	ММ	2215 HBsAg EC50 (мкМ)	2215 HBsAg CC50 (мкМ)
302	5-mGnpsmCnps2-4- OCH ₂ AnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTps GpsApsApsGpsCpsGpsAps2-4- OCH ₂ AnpsmGnpsmUnpsmGnps3- NH ₂ mC-3	Анти-DR-1 с x2 3'-NH-LNA-A	6835,3	0,0008	0,0148
303	5-mGnpsmCnps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmAnpsGpsGps TpsGpsApsApsGpsCpsGpsAps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmUnpsmGnps 3-NH ₂ mC-3	Анти-DR-1 с x2 3'-NH-ENA-A	6862,0	0,00067	0,0256
304	5-mGnpsmCnps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnps2- 4OCH ₂ CH ₂ AnpsGpsGpsTpsGpsAps ApsGpsCpsGpsAps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmUnpsmGnps 3-NH ₂ mC-3	Анти-DR-1 с x3 3'-NH-ENA-A	6874,7	0,0009	0,0214
305	5-mGnpsmCnpsmAnpsmGnps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsGpsGpsTpsGpsApsA psGpsCpsGpsAps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmUnpsmGnps 3-NH ₂ mC-3	Анти-DR-1 с x2 3'-NH-ENA-A	6863,3	0,00029	0,0226
306	5- mGnpsmCnpsmUnpsmCnpsmCnps2- 4- OCH ₂ CH ₂ AnpsApsApsTpsTpsCpsTp sTpsTps mAnpsmUnpsmAnps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmGnps3- NH ₂ mG-3	Pre Poly A с x2 3'-NH-ENA-A	7116,0	0,0005	> 1,00
307	5- mGnpsmCnpsmUnpsmCnpsmCnps2- 4- OCH ₂ CH ₂ AnpsApsApsTpsTpsCpsTp sTpsTps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsmUnpsmAnps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmGnps3- NH ₂ mG-3	Pre Poly A с x3 3'-NH-ENA-A	7128,6	0,00055	> 1,00

308	5- mGnpsmCnpsmUnpsmCnpsmCnps2- 4- OCH ₂ CH ₂ AnpsApsApsTpsTpsCpsTps sTpsTps2-4-OCH ₂ CH ₂ AnpsmUnps2- 4- OCH ₂ CH ₂ AnpsmAnpsmGnpsmGnps 3-NH ₂ mG-3	Pre Poly A с x3 3'-NH-ENA-A	7127,9	0,0006	> 1,00
-----	---	-----------------------------------	--------	--------	--------

Таблица 19

№	Олигонуклеотиды (5'-3')	Модификация	2215 HBsAg EC50 (мкМ)	2215 HBsAg CC50 (мкМ)
	5- mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTps GpsApsApsGpsCpsGpsApsmAnpsmGnps mUnpsmGnps3-NH ₂ mC-3	Контроль	-	-
309	5-2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnps GpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsmAn psmGnpsmUnps2-4 OCH ₂ CH ₂ Gnps3- NH ₂ mC-3	DR-1 с 3'-NH-ENA- G(1+1)	0,0013	0,0553
310	5-2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmCnpsmAnps2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsApsA psGpsCpsGpsApsmAnps2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmUnps2-4 OCH ₂ CH ₂ Gnps3- NH ₂ mC-3	DR-1 с 3'-NH-ENA-G 2+2 3'-NH-ENA-G	0,0006	0,0230
311	5-2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmCnps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTpsGp sApsApsGpsCpsGpsApsmAnpsmGnpsmUn psmGnps3-NH ₂ mC-3	DR-1 с 3'-ENA-G и 3'- ENA A (1+1) Асимметричная	0,00078	0,0305
312	5-2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmCnpsmUnpsmCnpsmCnps2- 4- OCH ₂ CH ₂ AnpsApsApsTpsTpsCpsTpsTpsTps s mAnpsmUnpsmAnps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsm2-4 OCH ₂ CH ₂ Gnps3-NH ₂ mG-3	Pre Poly A с 1+1/1+1 3'-NH-ENA-G+A	0,0015	> 1,00
313	5-2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmCnpsmUnpsmCnpsmCnps mAnpsApsApsTpsTpsCpsTpsTpsTps mAnpsmUnpsmAnpsmAnpsmGnpsm2-4 OCH ₂ CH ₂ Gnps3-NH ₂ mG-3	Pre Poly A с 3'-NH-ENA-G 1+1	0,0017	> 1,00

Таблица 20

№	Измеренная ММ:	Олигонуклеотиды (5'-3')	Модификация	ВЭЖХ Чистота	2215 HBsAg EC50 (мкМ)	2215 HBsAg CC50 (мкМ)

314	6838,8	5- mGnpsmCnpsmAnpsmGnps mAnpsGpsGpsTpsGpsApsA psGpsCpsGpsApsmAnpsmG npsmUnpsmGnps3-NH ₂ mC- 3	Контроль	86%	-	-
315	6902,9	5-mGnps2-4 OCH ₂ CH ₂ (5me)CnpsmAnps2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmAnpsGpsGp sTpsGpsApsApsGpsCpsGps ApsmAnpsmGnps2-4 OCH ₂ CH ₂ TnpsmGnps3- NH ₂ mC-3	DR-1 2+1	83%	0,0033	> 1,00
316	6914,8	5-2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmCnps2-4 OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmAnp sGpsGpsTpsGpsApsApsGps CpsGpsApsmAnpsmGnps2-4 OCH ₂ CH ₂ TnpsmGnps2- OCH ₂ CH ₂ 3-NH ₂ (5me)C-3	DR-1 2+2	94%	0,0043 0,0025	> 1,00
317	7169,0	5-2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmCnps2-4 OCH ₂ CH ₂ TnpsmCnpsmCnps mAnpsApsApsTpsTpsCpsTp sTpsTpsmAnps2-4 OCH ₂ CH ₂ TnpsmAnpsmAnps mGnps2-4 OCH ₂ CH ₂ Gnps3- NH ₂ mG-3	Pre Poly A 2+2	84%	0,0025	> 1,00
318	7182,2	5-mGnps2-4 OCH ₂ CH ₂ (5me)CnpsmUnps2-4 OCH ₂ CH ₂ (5me)CnpsmCnpsmAnpsAps ApsTpsTpsCpsTpsTpsTpsm Anps2-4 OCH ₂ CH ₂ TnpsmAnpsmAnps 2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmGnps3- NH ₂ mG-3	Pre Poly A 2+2	95%	0,0051	> 1,00

[0178] Три олигонуклеотида, содержащие химический F NPS, были протестированы *in vivo*. Первый из них представляет собой функциональную группу triGalNac на 5'-конце, второй имеет две функциональные группы triGalNac, одну на 5'-конце и другую на 3'-конце. Третий олигонуклеотид содержит функциональную группу triGalNac на 5'-конце и monoGalNac на 3'-конце. В следующей таблице 21 обобщены результаты тестирования.

Таблица 21

№	Целевая область ВГВ	Химический состав	Последовательность 5'-3'	Максимальное уменьшение НВsAg (низшая точка) в log	ММ
---	---------------------	-------------------	--------------------------	--	----

319	DR2 #1	F NPS	5'-GalNac- fGnpsfCnpsfAnpsfGnpsfAnps GpsGpsTpsGpsApsApsGpsCp sGpsApsfAnpsfGnpsfUnpsfGn ps-3nh2-fCn-3'	2,0	8478,26
320	DR2 #1	F NPS	5'-GalNac2- fGnps5mfCnpsfAnpsfGnpsfAn psGpsGpsTpsGpsApsApsGps CpsGpsApsfAnpsfGnpsfTnpsf GnpsfC-C6NH--GalNac6-3'	2,6	10 172,08
321	DR2 #1	F NPS	5'-GalNac2- fGnps5mfCnpsfAnpsfGnpsfAn psGpsGpsTpsGpsApsApsGps CpsGpsApsfAnpsfGnpsfTnpsf GnpsfC-C6NH-GalNac7-3'	2,3	8893,59

[0179] При 3×5 мкП конъюгация с GalNac на 5'-конце и на 3'-конце явно превосходила по показателям конъюгация только на 5'-конце, а активность *in vivo* была на 0,6 log лучше в определенные моменты времени.

[0180] Два олигонуклеотида были протестированы *in vivo* в дозе 3 x 10 мг/кг, один из них содержал функциональную группу triGalNac на 5'-конце, а второй содержал функциональную группу triGalNac на 5'-конце и токоферольную функциональную группу на 3'-конце.

Таблица 22

№	Целевая область ВГВ	Химический состав	Последовательность 5'-3'	Максимальное уменьшение HBsAg (низшая точка) в log	ММ
322	DR2 #1	OMe NPS	5'-GalNac2- mGnpsmCnpsmAnps mGnpsmAnpsGps GpsTpsGps ApsApsGps CpsGpsAps mAnpsmGnpsmUnps mGnps- 3nh2-mC-3	2,6	8502,47
323	DR2 #1	OMe NPS	5'-GalNac1- mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsm AnpsGpsGpsTpsGpsApsAps GpsCpsGpsApsmAnpsmGnp smUnpsmGnpsmC-Toco-3'	2,2	9202,34

[0181] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид настоящего описания также включает в себя олигонуклеотид, который выбран из последовательностей нуклеотидных оснований, перечисленных в таблицах 1-43, независимо от модификаций последовательностей, перечисленных в таблицах 1-43. Олигонуклеотиды настоящего описания также включают в себя олигонуклеотид,

содержащий последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности нуклеотидных оснований, выбранной из последовательностей, перечисленных в таблицах 1-43, независимо от модификаций последовательностей, перечисленных в таблицах 1-43. В некоторых вариантах осуществления 1, 2, 3, 4, 5 нуклеотидных оснований отличны от последовательностей, перечисленных в таблицах 1-43, независимо от модификаций последовательностей, перечисленных в таблицах 1-43.

[0182] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды настоящего описания также включают в себя олигонуклеотид, который выбран из нуклеотидных последовательностей, перечисленных в таблицах 1-43, независимо от последовательностей нуклеотидных оснований, перечисленных в таблицах 1-43. Олигонуклеотиды настоящего описания также включают в себя олигонуклеотид, содержащий последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из последовательностей, перечисленных в таблицах 1-43, независимо от нуклеотидных оснований последовательностей, перечисленных в таблицах 1-43. В некоторых вариантах осуществления 1, 2, 3, 4, 5 нуклеотидных оснований отличны от последовательностей, перечисленных в таблицах 1-43, независимо от модификаций последовательностей, перечисленных в таблицах 1-43.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конструкция, содержащая по меньшей мере одну олигонуклеотидную цепь, имеющую по меньшей мере одну функциональную группу GalNAc, присоединенную к указанной цепи, причем каждая функциональная группа GalNAc независимо выбрана из групп от GalNAc 1 до GalNAc 13.

2. Конструкция по п.1, в которой функциональная группа GalNAc представляет собой GalNAc-2.

3. Конструкция по п.1, в которой функциональная группа GalNAc представляет собой GalNAc-6.

4. Конструкция по любому из пп. 1-3, в которой по меньшей мере одна функциональная группа GalNAc конъюгирована с по меньшей мере одной из олигонуклеотидных цепей посредством линкера.

5. Конструкция по п.4, в которой линкер представляет собой линкер C6-NH₂.

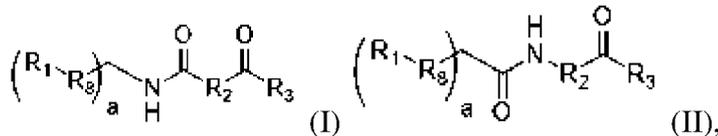
6. Конструкция по любому из пп. 1-5, в которой олигонуклеотидная последовательность имеет аффинность к транскрипту РНК ВГВ или является по существу комплементарной этому транскрипту.

7. Конструкция по любому из пп. 1-7, причем указанная конструкция содержит одну олигонуклеотидную цепь.

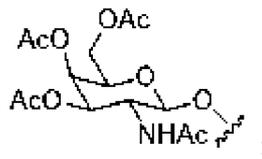
8. Конструкция по любому из пп. 1-7, причем указанная конструкция содержит двойную олигонуклеотидную цепь.

9. Конструкция по любому из пп. 1-9, в которой функциональная группа GalNAc химически присоединена к 3'- и 5'-концам олигонуклеотидной цепи.

10. Соединение, имеющее структуру формулы (I) или (II):



где



R₁ представляет собой

R₈ представляет собой C₃-C₁₀ алкильную группу, C₃-C₁₀ алкилоксидную группу,

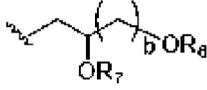
имеющую 1-5 атомов кислорода или

$$\left[\text{R}_1 \right]_c \text{---C(=O)---NH---} \left(\text{---} \right)_d \text{---NH---C(=O)---} \left(\text{---O---} \right)_e \text{---} ;$$

R₂ представляет собой C₃-C₁₀ алкильную группу или C₃-C₁₀ алкилоксидную группу, имеющую 1-5 атомов кислорода;

R₃ представляет собой H, PG', $\left(\text{---L---} \right)_{0-1}$ или $\left(\text{---} \right)_2 \text{---N---R}_4 \text{---R}_5$,

R₄ представляет собой H;

R₅ представляет собой , где

R₆ представляет собой защитную группу или линкер с олигонуклеотидом через необязательный линкер и/или фосфорамидатную связь или связь на основе сложного фосфодиэфира;

R₇ представляет собой H, линкер на твердой подложке или -PH(O)CH₂CH₂CN; или R₄ и R₅ вместе образуют 5- или 6-членное кольцо, необязательно замещенное CH₂OPG;

PG представляет собой спиртозащитную группу;

PG' представляет собой защитную группу;

L представляет собой линкерную функциональную группу;

a представляет собой целое число 1-3;

b представляет собой целое число 1-4;

c представляет собой целое число 3-7; и

d представляет собой целое число 0-4.

11. Соединение по п.10, в котором R₂ представляет собой C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉ или C₁₀ алкил.

12. Соединение по п.10, в котором R₈ представляет собой C₃-C₁₀ алкилоксидную группу, которая содержит 2-5 этиленоксидных групп.

13. Соединение по п.10, в котором линкер представляет собой линкер C₆-NH₂.

14. Соединение по п.10, в котором a равно 1.

15. Соединение по п.10, в котором a равно 3.

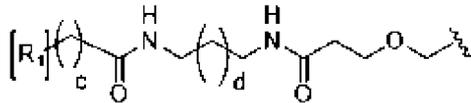
16. Соединение по п.10, в котором b равно 2 или 3.

17. Соединение по п.10, в котором PG представляет собой DMTr.

18. Соединение по п.10, которое представляет собой соединение формулы (I).

19. Соединение по п.10, которое представляет собой соединение формулы (II).

20. Соединение по п.10, в котором R₈ представляет собой:



21. Соединение по п.10, в котором PG выбран из трет-бутилдиметилсилилового эфира (TBMDS), трет-бутилдифенилсилила (TBDPS), триизопропилсилилового эфира (TIPS), монометокситритила (MMTr), 4,4'-диметокситритила (DMTr) или тритола.

22. Соединение по п.10, в котором R₆ представляет собой олигонуклеотид посредством линкера и/или фосфорамидатной связи или связи на основе сложного фосфодиэфира.

23. Соединение по п.22, в котором R₆ включает фосфорамидатную связь.

24. Соединение по п.22, в котором R₆ включает связь на основе сложного фосфодиэфира.

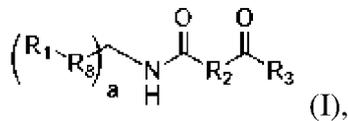
25. Олигонуклеотид, содержащий две функциональные группы GalNAc, выбранные из GalNAc 1 и 13 на 5'-конце и на 3'-конце.

26. Олигонуклеотид, содержащий на одном из концов функциональную группу GalNAc, выбранную из GalNAc 1-13, а также липофильную функциональную группу, такую как токоферол, пальмитоил или холестерин, связанную с другим концом посредством необязательного линкера.

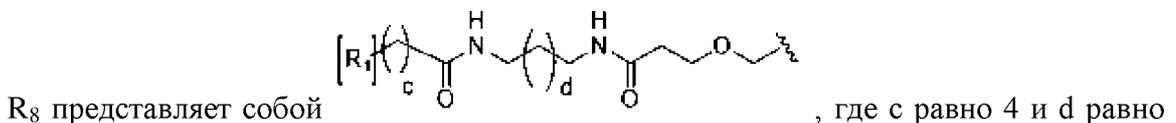
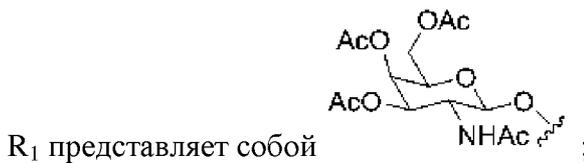
27. Олигонуклеотид, содержащий функциональную группу GalNAc, выбранную из 1-13, любая из которых связана посредством динуклеотидного линкера с фармакофорным антисмысловым олигонуклеотидом.

28. Олигонуклеотид, содержащий функциональную группу GalNAc, выбранную из 1-13, любая из которых связана посредством этиленгликолевой повторяющейся функциональной группы с фармакофорным антисмысловым олигонуклеотидом.

29. Соединение по п.10, которое имеет структуру формулы (I)



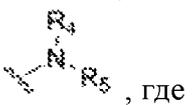
где

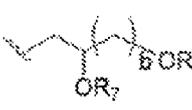


1;

a равно 3;

R₂ представляет собой C₃ алкил;

R₃ представляет собой  , где R₄ представляет собой H;

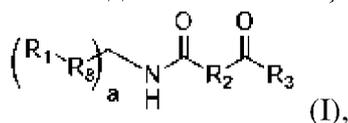
R₅ представляет собой  , где

R₆ представляет собой защитную группу, причем защитная группа представляет собой 4,4'-диметокситритил, и

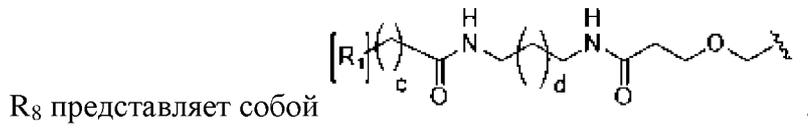
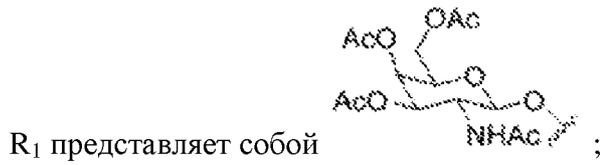
R₇ представляет собой линкер на твердой подложке, причем указанный линкер представляет собой сукцинат; и

b равно 1.

30. Соединение по п.10, в котором соединение имеет структуру формулы (I)



где

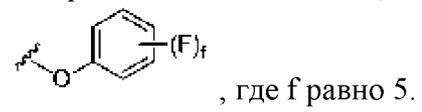


где c равно 4 и d равно 1;

a равно 3;

R_2 представляет собой C_8 алкил;

R_3 представляет собой PG' , где PG' представляет собой



По доверенности