



**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.08.27**

**(21)** Номер заявки  
**201591767**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2014.03.14**

**(51)** Int. Cl. *C12N 15/11* (2006.01)  
*C12N 15/113* (2010.01)  
*A61K 31/7088* (2006.01)  
*A61P 21/00* (2006.01)

**(54) АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ ПРОПУСК  
ЭКЗОНОВ, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ**

**(31)** 61/784,547

**(32)** 2013.03.14

**(33)** US

**(43)** 2016.02.29

**(86)** PCT/US2014/029689

**(87)** WO 2014/153220 2014.09.25

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**САРЕПТА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.  
(US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Бестуик Ричард К., Франк Дайан  
Элизабет, Шнелль Фред Джозеф (US)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

**(56)** WO-A1-2010048586  
WO-A1-2012150960  
US-A1-2010168212  
WO-A1-2011057350

AARTSMA-RUS ANNEMIEKE ET AL.:  
"Functional analysis of 114 exon-internal AONs  
for targeted DMD exon skipping: indication for  
steric hindrance of SR protein binding sites",  
OLIGONUCLEOTIDES, MARY ANN LIEBERT,  
NEW YORK, NY, US, vol. 15, no. 4, December  
2005 (2005-12), pages 284-297, XP002406791, ISSN:  
1545-4576, DOI: 10.1089/OLI.2005.15.284, table 1

HEEMSKERK HANS A. ET AL.: "In vivo  
comparison of 2'-O-methyl phosphorothioate and  
morpholino antisense oligonucleotides for Duchenne  
muscular dystrophy exon skipping", JOURNAL OF  
GENE MEDICINE, JOHN WILEY & SONS, INC.,  
US, vol. 11, no. 3, 12 January 2009 (2009-01-12),  
pages 257-266, XP002541504, ISSN: 1099-498X,  
DOI: 10.1002/JGM.1288 [retrieved on 2009-01-12],  
figures 1, 2

FOSTER H. ET AL.: "Genetic therapeutic  
approaches for Duchenne muscular dystrophy",  
HUMAN GENE THERAPY, MARY ANN LIEBERT,  
NEW YORK, NY, US, vol. 23, no. 7, 30 May 2012  
(2012-05-30), pages 676-687, XP002688790, ISSN:  
1043-0342, DOI: 10.1089/HUM.2012.099 [retrieved  
on 2012-05-30], page 679, right-hand column - page  
681, left-hand column

JERRY R. MENDELL ET AL.: "Gene therapy  
for muscular dystrophy: Lessons learned and path  
forward", NEUROSCIENCE LETTERS, vol. 527,  
no. 2, 17 May 2012 (2012-05-17), pages 90-99,  
XP055128775, ISSN: 0304-3940, DOI: 10.1016/  
j.neulet.2012.04.078, page 91, right-hand column

MOULTON H.M. ET AL.: "Morpholinos  
and their peptide conjugates: Therapeutic promise  
and challenge for Duchenne muscular dystrophy",  
BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA)  
- BIOMEMBRANES, ELSEVIER, AMSTERDAM,  
NL, vol. 1798, no. 12, 17 February 2010 (2010-02-17),  
pages 2296-2303, XP027430152, ISSN: 0005-2736,  
DOI: 10.1016/J.BBAMEM.2010.02.012 [retrieved on  
2010-02-17], the whole document

**(57)** Описаны антисмысловые молекулы, способные связываться с выбранным участком-мишенью в гене дистрофина человека, для индукции пропуска экзона 44.

### Родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США № 61/784547, поданной 14 марта 2013 года. Полное содержание описанной выше предварительной заявки включено в настоящее описание в качестве ссылки.

### Область изобретения

Изобретение относится к новым антисмысловым соединениям и композициям, пригодным для способствования пропуску экзона в гене дистрофина человека. Также оно относится к способам индукции пропуска экзона с использованием новых антисмысловых композиций, адаптированных для применения в способах по изобретению.

### Уровень техники, к которому относится изобретение

Антисмысловые технологии развивают с использованием ряда химических соединений, которые влияют на экспрессию генов на различных уровнях (транскрипция, сплайсинг, стабильность, трансляция). Значительная часть этого исследования фокусируется на применении антисмысловых соединений для коррекции или компенсации аномальных или ассоциированных с заболеванием генов при широком диапазоне показаний. Антисмысловые молекулы способны специфично ингибировать экспрессию генов, и благодаря этому многие программы исследований, касающиеся олигонуклеотидов в качестве модуляторов экспрессии генов, фокусируются на ингибировании экспрессии генов-мишеней или функции цис-регуляторных элементов. Антисмысловые олигонуклеотиды, как правило, направлены против РНК либо смысловой цепи (например, мРНК), либо минус-цепи в случае некоторых вирусных РНК-мишеней. Для достижения желаемого эффекта специфического подавления генов олигонуклеотиды, как правило, либо стимулируют расщепление мРНК-мишени, либо блокируют трансляцию мРНК, либо блокируют функцию цис-регуляторных РНК-элементов, тем самым эффективно препятствуя синтезу *de novo* белка-мишени или репликации вирусной РНК.

Однако такие способы непригодны, когда задачей является активация продуцирования нативного белка или компенсация мутаций, которые индуцируют преждевременное завершение трансляции, таких как нонсенс-мутации или мутации со сдвигом рамки считывания. В этих случаях дефектный транскрипт гена не должен подвергаться направленной деградации или пространственному ингибированию, так что химические свойства антисмысловых олигонуклеотидов не должны стимулировать расщепление мРНК-мишени или блокировать трансляцию.

При различных генетических заболеваниях эффекты мутаций на конечную экспрессию гена можно модулировать с использованием процесса направленного пропуска экзона в ходе процесса сплайсинга. Процесс сплайсинга контролируется комплексным многокомпонентным аппаратом, который тесно сближает соседние области соединения экзон-интрон в пре-мРНК и осуществляет расщепление фосфодиэфирных связей на концах интронов с их последующим повторным образованием между экзонами, которые подлежат сплайсингу. Этот комплексный и высокоточный процесс опосредуется последовательностями мотивов в пре-мРНК, которые являются относительно короткими полуконсервативными сегментами РНК, с которыми связываются различные ядерные факторы сплайсинга, которые затем вовлекаются в реакции сплайсинга. Путем изменения того, как аппарат сплайсинга считывает или распознает мотивы, вовлеченные в процессинг пре-мРНК, можно создавать по-разному сплайсированные молекулы мРНК. В настоящее время известно, что большинство генов человека альтернативно сплайсируются в процессе нормальной экспрессии генов, хотя вовлеченные механизмы не идентифицированы. Bennett et al. (патент США № 6210892) описывают антисмысловое модулирование процессинга клеточной мРНК дикого типа с использованием антисмысловых олигонуклеотидных аналогов, которые не индуцируют опосредуемое РНК-азой *N* расщепление РНК-мишени. Это является применимым для возможности получать альтернативно сплайсированные мРНК, которые лишены конкретных экзона (например, как описано (Sazani, Kole et al. 2007)), для получения растворимых рецепторов для суперсемейства TNF, которые лишены экзона, кодирующих проходящие через мембрану домены.

Было показано, что в случаях, когда обычно функциональный белок преждевременно терминируется вследствие мутаций в нем, восстановление некоторой функциональной продукции белка посредством антисмысловой технологии является возможным через вмешательство в процессы сплайсинга и что, если экзона, ассоциированные с вызывающими заболевание мутациями, могут быть специфически удалены из некоторых генов, иногда может продуцироваться укороченный белковый продукт, который обладает сходными с нативным белком биологическими свойствами или обладает достаточной биологической активностью для смягчения заболевания, вызванного мутациями, ассоциированными с экзоном (см., например, Sierakowska, Sambade et al. 1996; Wilton, Lloyd et al. 1999; van Deutekom, Bremmer-Bout et al. 2001; Lu, Mann et al. 2003; Aartsma-Rus, Janson et al. 2004). Kole et al. (патенты США № 5627274; 5916808; 5976879 и 5665593) описывают способы борьбы с aberrантным сплайсингом с использованием модифицированных антисмысловых олигонуклеотидных аналогов, которые не стимулируют расщепление пре-мРНК-мишени. Bennett et al. (патент США № 62108 92) описывают антисмысловое модулирование клеточного процессинга мРНК дикого типа также с использованием антисмысловых олигонуклеотидных аналогов, которые не индуцируют опосредуемое РНК-азой *N* расщепление РНК-мишени.

Процесс направленного пропуска экзона, вероятно, является особенно пригодным в длинных

генах, в которых существует множество экзонов и интронов, где существует избыточность генетического состава экзонов или где белок способен функционировать без одного или нескольких конкретных экзонов. Попытки перенацеливания процессинга генов для лечения генетических заболеваний, ассоциированных с укорочениями, вызванными мутациями в различных генах, фокусируются на применении антисмысловых олигонуклеотидов, которые либо: (1) полностью или частично перекрывают элементы, вовлеченные в процесс сплайсинга; либо (2) связываются с пре-мРНК в положении, достаточно близком к элементу, нарушая связывание и функцию факторов сплайсинга, которые обычно опосредуют конкретную реакцию сплайсинга, которая происходит на этом элементе.

Мышечная дистрофия Дюшенна (DMD) вызывается дефектом экспрессии белка дистрофина. Ген, кодирующий этот белок, содержит 79 экзонов, разнесенных более чем на 2 миллиона нуклеотидов ДНК. Любая мутация в экзоне, которая изменяет рамку считывания экзона, или вносит стоп-кодон, или характеризуется удалением всего экзона или экзонов, находящихся вне рамки считывания, или дубликацией одного или нескольких экзонов, имеет потенциал к нарушению продуцирования функционального дистрофина, приводящему к DMD.

Было обнаружено, что менее тяжелая форма мышечной дистрофии, мышечная дистрофия Беккера (BMD), возникает, когда мутация, как правило, делеция одного или нескольких экзонов, приводит к правильной рамке считывания по всему транскрипту дистрофина, так что трансляция мРНК в белок не терминируется преждевременно. Если соединение вышележащих и нижележащих экзонов при процессинге мутантной пре-мРНК дистрофина сохраняет правильную рамку считывания гена, результатом является мРНК, кодирующая белок с короткой внутренней делецией, которая сохраняет некоторую активность, что приводит к фенотипу Беккера.

На протяжении многих лет известно, что делеция экзона или экзонов, которая не изменяет рамку считывания белка дистрофина, дает начало фенотипу BMD, в то время как делеция экзона, которая вызывает сдвиг в рамке считывания, дает начало DMD (Monaco, Bertelson et al. 1988). Как правило, мутации дистрофина, включая точковые мутации и делеции экзонов, которые изменяют рамку считывания и, таким образом, прерывают надлежащую трансляцию белка, приводят к DMD. Также следует отметить, что некоторые пациенты с BMD и DMD имеют делеции экзонов, охватывающие множественные экзоны.

Модулирование сплайсинга мутантной пре-мРНК дистрофина с использованием антисмысловых олигонуклеотидов описано для условий как *in vitro*, так и *in vivo* (см., например, Matsuo, Masumura et al. 1991; Takeshima, Nishio et al. 1995; Pramono, Takeshima et al. 1996; Duncley, Eperon et al. 1997; Duncley, Manoharan et al. 1998; Errington, Mann et al. 2003).

Первый пример специфического и воспроизводимого пропуска экзона в модели на мышцах *mdx* описан Wilton et al. (Wilton, Lloyd et al. 1999). Путем нацеливания антисмысловой молекулы на донорный участок сплайсинга индуцировали устойчивое и эффективное пропускание экзона 23 в мРНК дистрофина в процессе обработки культивируемых клеток в течение 6 ч. Wilton et al. также описывают нацеливание на акцепторную область пре-мРНК дистрофина мыши более длинных антисмысловых олигонуклеотидов. Было обнаружено, что, в то время как первый антисмысловый олигонуклеотид, направленный на донорный участок сплайсинга интрона 23, индуцировал устойчивое пропускание экзона в первичных культивируемых миобластах, это соединение было значительно менее эффективным в культурах immortalized клеток, экспрессирующих высокие уровни дистрофина. Однако после усовершенствования нацеливания и конструкции антисмысловых олигонуклеотидов специфическое удаление экзона было увеличено практически на порядок величины (Mann, Honeyman et al. 2002).

Недавно начались исследования для решения проблемы достижения длительной экспрессии дистрофина, сопровождающейся минимальными неблагоприятными эффектами в тканях, пораженных в результате отсутствия дистрофина. Внутримышечная инъекция антисмыслового олигонуклеотида, нацеленного на экзон 51 (PRO051), в переднюю большеберцовую мышцу у четырех пациентов с DMD приводила к специфическому пропуску экзона 51 без каких-либо клинически заметных неблагоприятных эффектов (Mann, Honeyman et al. 2002; van Deutekom, Janson et al. 2007). Исследования, направленные на системную доставку антисмыслового фосфородиамидатного морфолиноолигомера, конъюгированного с проникающим в клетку пептидом (PPMO), нацеленного на экзон 23 у мышей *mdx*, привели к получению высокой и длительной продукции белка дистрофина в скелетных и сердечных мышцах без поддающейся обнаружению токсичности (Jearawiriyapaisarn, Moulton et al. 2008; Wu, Moulton et al. 2008; Yin, Moulton et al. 2008).

Последние клинические испытания для исследования безопасности и эффективности переключающих сплайсинг олигонуклеотидов (SSO) для лечения DMD основаны на технологии SSO, индуцирующей альтернативный сплайсинг пре-мРНК путем пространственной блокады сплайсеосомы (Cirak et al., 2011; Goemans et al., 2011; Kinali et al., 2009; van Deutekom et al., 2007).

Несмотря на эти успехи остается потребность в усовершенствованных антисмысловых олигомерах, нацеленных на множество экзонов дистрофина, и усовершенствованных композициях для доставки в мышцы и способах терапевтических применений при DMD.

#### **Сущность изобретения**

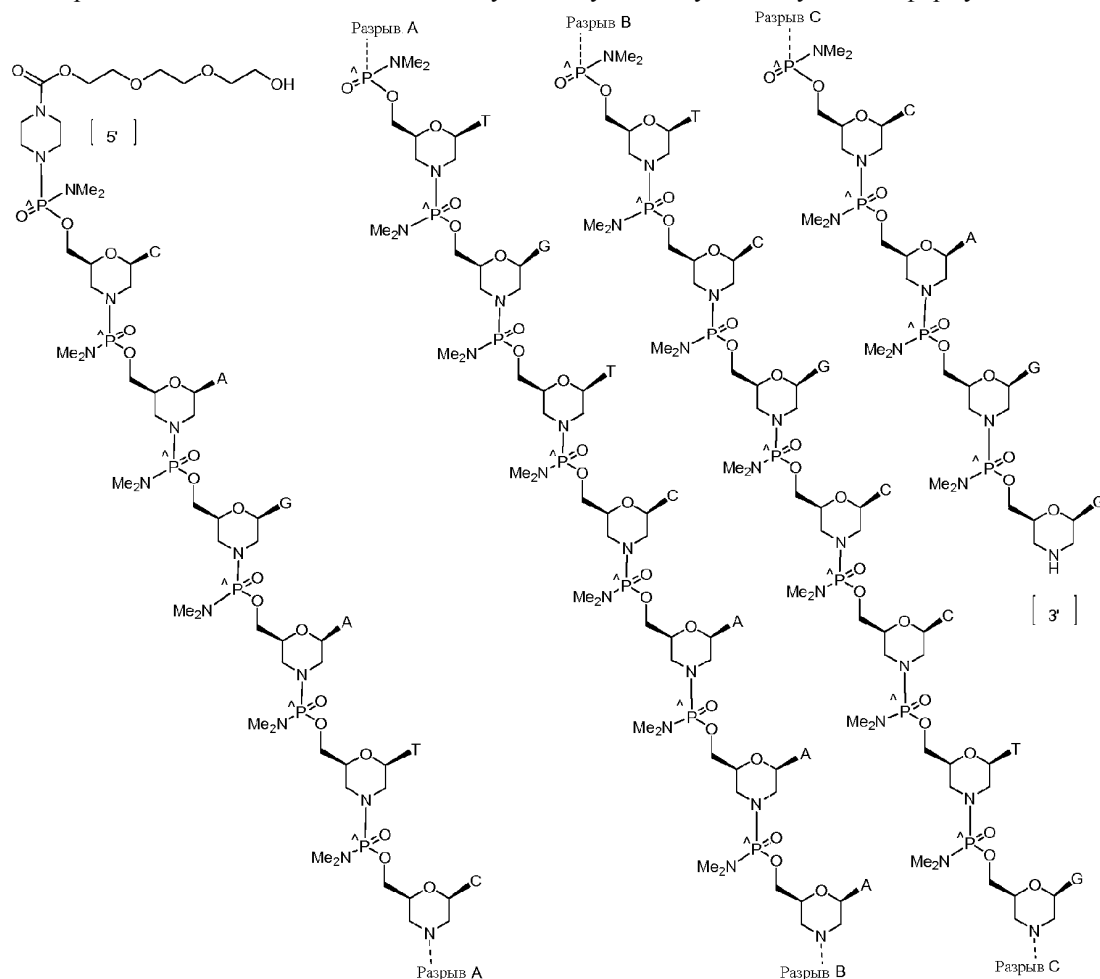
В одном аспекте изобретение относится к антисмысловому олигонуклеотиду, состоящему из 24 оснований, содержащему последовательность оснований, которая на 100% комплементарна мишени

области экзона 44 пре-мРНК дистрофина человека, где мишеневая область представляет собой участок отжига H44A(-07+17), где основания указанного антисмыслового олигонуклеотида связаны с кольцевыми структурами морфолино, и где указанные кольцевые структуры морфолино связаны фосфорсодержащими межсубъединичными связями, связывающими азот морфолино одной кольцевой структуры с 5'-экзоциклическим углеродом соседней кольцевой структуры, и где антисмысловой олигонуклеотид индуцирует пропуск экзона 44; или его фармацевтически приемлемая соль.

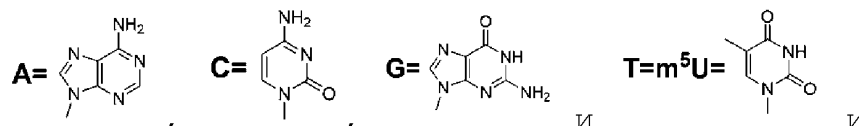
Кроме того, настоящее изобретение относится к варианту указанного антисмыслового олигонуклеотида, в котором последовательность представляет собой антисмысловой олигонуклеотид из 24 оснований и содержит последовательность CAG ATC TGT CAA ATC GCC TGC AGG (SEQ ID NO: 1), где тиминовые основания необязательно заменены урациловыми основаниями.

Также изобретение относится к указанному антисмысловому олигонуклеотиду, в котором олигонуклеотид химически связан с молекулой полиэтиленгликоля.

Изобретение относится к антисмысловому олигонуклеотиду со следующими формулами:



H44A(-7+17); где



где ^ - стереохимия фосфорного центра не определена, или его фармацевтически приемлемая соль.

Также изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей указанный антисмысловой олигонуклеотид или его варианты и фармацевтически приемлемый носитель. Указанная композиция может использоваться для лечения мышечной дистрофии. Мышечная дистрофия представляет собой мышечную дистрофию Дюшенна (DMD), мышечную дистрофию Беккера (BMD).

Эти и другие задачи и признаки будут более понятными после прочтения представленного ниже подробного описания изобретения в совокупности с фигурами.

#### Краткое описание чертежей

На фиг. 1А представлена иллюстративная олигомерная структура морфолино с фосфодиамидатной связью;

на фиг. 1В - конъюгат аргинин-богатого пептида и антисмыслового олигомера в соответствии с одним вариантом осуществления изобретения;

на фиг. 1С - конъюгат, как и на фиг. 1В, где связи остова содержат одну или несколько положительно заряженных групп;

на фиг. 1D-G - повторяющийся субъединичный сегмент иллюстративных морфолиноолигонуклеотидов, обозначаемых с D по G;

на фиг. 2А-2В - схема реакции для получения линкера для твердофазного синтеза и твердой поддержки для синтеза олигомеров;

на фиг. 3 и 4 - графики, соответствующие экспериментам, демонстрирующим относительную активность иллюстративных антисмысловых олигомеров для индукции пропуска экзона 44 в культивируемых клетках рабдомиосаркомы человека. РНК, выделенную из клеток рабдомиосаркомы, обработанных указанными олигомерами, подвергали специфической амплификации экзона 44 с использованием гнездовой ОТ-ПЦР с последующим гель-электрофорезом и количественным определением интенсивности полос. Данные нанесены на график в качестве % пропуска экзона при оценке с помощью ПЦР, т.е. в качестве интенсивности полос продукта с пропуском экзона относительно полноразмерного продукта ПЦР. На фиг. 3 H44A(-06+14), H44A(-06+20) и H44A(-09+17) (SEQ ID NO: 13, 19 и 20, соответственно) представляют собой опубликованные олигомеры. На фиг. 4 H44A(+85+104), H44A(+59+85) и H44A(+65+90) (SEQ ID NO: 14, 21 и 23, соответственно) представляют собой опубликованные олигомеры;

на фиг. 5 и 6 - графики, соответствующие экспериментам, демонстрирующим относительную активность иллюстративных антисмысловых олигомеров для индукции пропуска экзона 44 в первичных миобластах человека.

### Подробное описание изобретения

Варианты осуществления изобретения относятся, главным образом, к усовершенствованным антисмысловым соединениям и к способам их применения, которые специфически предназначены для индукции пропуска экзона в гене дистрофина человека. Дистрофин играет жизненно-важную роль в функционировании мышц, и различные обуславливаемые мышцами заболевания характеризуются мутантными формами этого гена. Таким образом, в определенных вариантах осуществления усовершенствованные антисмысловые соединения, описанные в настоящем описании, индуцируют пропуск экзона в мутантных формах гена дистрофина человека, таких как мутантные гены дистрофина, встречающиеся при мышечной дистрофии Дюшенна (DMD) и мышечной дистрофии Беккера (BMD).

Вследствие событий aberrantного сплайсинга мРНК, вызываемых мутациями, эти мутантные гены дистрофина человека либо экспрессируют дефектный белок дистрофина, либо вообще не экспрессируют поддающийся измерению дистрофин, что является состоянием, которое приводит к различным формам мышечной дистрофии. Для излечения этого состояния антисмысловые соединения по настоящему изобретению гибридизуются с выбранными областями предварительно процессированной РНК мутантного гена дистрофина человека, индуцируют пропуск экзона и дифференциальный сплайсинг в этой в ином случае aberrantной сплайсируемой мРНК дистрофина, и, тем самым, позволяют мышечным клеткам продуцировать мРНК-транскрипт, который кодирует функциональный белок дистрофина. В определенных вариантах осуществления полученный белок дистрофина не обязательно является формой дистрофина "дикого типа", а вместо этого является укороченной, но все еще функциональной или полуфункциональной формой дистрофина.

Путем увеличения уровней функционального белка дистрофина в мышечных клетках эти и сходные варианты осуществления могут быть пригодными для профилактики и лечения мышечной дистрофии, особенно тех форм мышечной дистрофии, таких как DMD и BMD, которые характеризуются экспрессией дефектных белков дистрофина вследствие aberrantного сплайсинга мРНК. Специфические олигомеры, описанные в настоящем описании, кроме того, обеспечивают усовершенствованное специфическое нацеливание на экзоны дистрофина относительно других используемых олигомеров и, тем самым, обеспечивают значительные и практические преимущества относительно альтернативных способов лечения соответствующих форм мышечной дистрофии.

В одном аспекте изобретение относится к антисмысловому олигомеру длиной 20-50 нуклеотидов, способному связывать выбранную мишень, для индукции пропуска экзона в гене дистрофина человека, где антисмысловый олигомер содержит последовательность оснований, которая специфически гибридизуется с областью-мишенью экзона 44, выбранной из группы, состоящей из H44A(-07+15), H44A(-08+15), H44A(-06+15), H44A(-08+17), H44A(-07+17) и H44A(-06+17), где основания олигомера связаны с кольцевыми структурами морфолино и где кольцевые структуры морфолино связаны фосфоросодержащими межсубъединичными связями, связывающими азот морфолино одной кольцевой структуры с 5'-экзоциклическим углеродом соседней кольцевой структуры. В одном варианте осуществления антисмысловый олигомер содержит последовательность оснований, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 4-8. В другом варианте осуществления антисмысловый олигомер имеет длину приблизительно от 20 до 30 нуклеотидов или приблизительно от 22 до 28 нуклеотидов. В другом варианте осуществления изобретение состоит из последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1 и 4-8. В одном варианте осуществления изобретение относится к антисмысловому олигомеру, который не активирует

РНК-азу Н.

В другом аспекте изобретение относится к антисмысловому олигомеру, который химически связан с одной или несколькими частями или конъюгируемыми частями, которые повышают активность, клеточное распределение или клеточный захват антисмыслового олигомера, например такими как молекула полиэтиленгликоля. В других вариантах осуществления антисмысловой олигомер конъюгирован с аргинин-богатым пептидом, таким как последовательность, выбранная из SEQ ID NO: 24-39.

В другом аспекте изобретение относится к антисмысловому олигомеру длиной 20-50 нуклеотидов, способному связывать выбранную мишень, для индукции пропускания экзона в гене дистрофина человека, где антисмысловой олигомер содержит последовательность оснований, которая специфически гибридизуется с областью-мишенью экзона 44, выбранной из группы, состоящей из H44A(-07+15), H44A(-08+15), H44A(-06+15), H44A(-08+17), H44A(-07+17) и H44A(-06+17), где основания олигомера связаны с кольцевыми структурами морфолино и где кольцевые структуры морфолино связаны, по существу, незаряженными фосфоросодержащими межсубъединичными связями, связывающими азот морфолино одной кольцевой структуры с 5'-экзоциклическим углеродом соседней кольцевой структуры. В одном варианте осуществления 5-35% связей антисмыслового олигомера являются положительно заряженными. В другом варианте осуществления межсубъединичные связи антисмыслового олигомера являются незаряженными и чередуются со связями, которые являются положительно заряженными при физиологических значениях pH, где общее число положительно заряженных связей составляет от 2 вплоть до более чем половины общего количества связей. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер содержит кольцевые структуры морфолино и фосфородиамидатные межсубъединичные связи. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер модифицирован подвешенной катионной группой.

В другом аспекте изобретение относится к антисмысловым олигомерам, описанным в примерах 2-7. В некоторых вариантах осуществления урацил может заменять тимин в антисмысловых олигомерах, описанных в примерах 2-7.

В одном аспекте изобретение относится к выделенным антисмысловым олигонуклеотидам длиной от 20 до 50 нуклеотидов, включая по меньшей мере 10, 12, 15, 17, 20 или более нуклеотидов, комплементарных области-мишени экзона 44 гена дистрофина, обозначаемой как участок отжига, выбранной из группы, состоящей из: H44A(-07+17), H44A(-07+20), H44A(-07+22), H44A(-8+15), H44A(-7+15), H44A(-6+15), H44A(-8+17), H44A(-6+17), H44A(+77+101), H44A(+64+91), H44A(+62+89), H44A(+62+85), H44A(-13+14), H44A(-14+15). Антисмысловые олигонуклеотиды специфически гибридизуются с участком отжига, индуцируя пропускание экзона 44.

Другие антисмысловые олигонуклеотиды по изобретению имеют длину от 20 до 50 нуклеотидов и включают по меньшей мере 10, 12, 15, 17, 20, 22, 25 или более нуклеотидов SEQ ID NO: 1-12, 46 и 47. В некоторых вариантах осуществления тиминовые основания в SEQ ID NO: 1-12, 46 и 47 необязательно представляют собой урацил.

Иллюстративные антисмысловые олигомеры по изобретению указаны ниже

- H44A(-07+17): 5'-CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG-3' (SEQ ID NO: 1);
- H44A(-07+20): 5'-CAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG-3' (SEQ ID NO: 2);
- H44A(-07+22): 5'-CTCAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG-3' (SEQ ID NO: 3);
- H44A(-8+15): 5'-GATCTGTCAAATCGCCTGCAGG-3' (SEQ ID NO: 4);
- H44A(-7+15): 5'-GATCTGTCAAATCGCCTGCAGG-3' (SEQ ID NO: 5);
- H44A(-6+15): 5'-GATCTGTCAAATCGCCTGCAG-3' (SEQ ID NO: 6);
- H44A(-8+17): 5'-CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG-3' (SEQ ID NO: 7);
- H44A(-6+17): 5'-CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAG-3' (SEQ ID NO: 8);
- H44A(+77+101): 5'-GTGTCTTTCTGAGAACTGTTTCAGC-3' (SEQ ID NO: 9);
- H44A(+64+91): 5'-GAGAACTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCAC-3' (SEQ ID NO: 10);
- H44A(+62+89): 5'-GAACTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCACTG-3' (SEQ ID NO: 11);
- H44A(+62+85): 5'-CTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCACTG-3' (SEQ ID NO: 12);

12);

H44A(-13+14): 5'-ATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAAAAG-3' (SEQ ID

NO: 46);

H44A(-14+15): 5'-GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAAAAGC-3' (SEQ ID

NO: 47).

В одном варианте осуществления антисмысловой олигомер специфически гибридизуется с участком отжига H44A(-07+17), таким как SEQ ID NO: 1. В другом варианте осуществления антисмысловой олигомер специфически гибридизуется с участком отжига H44A(-07+20), таким как SEQ ID NO: 2. В другом варианте осуществления антисмысловой олигомер специфически гибридизуется с участком отжига H44A(-07+22), таким как SEQ ID NO: 3. В другом варианте осуществления антисмысловой олигомер специфически гибридизуется с участком отжига H44A(-8+15), таким как SEQ ID NO: 4. В другом варианте осуществления антисмысловой олигомер специфически гибридизуется с участком отжига H44A(-7+15), таким как SEQ ID NO: 5. В другом варианте осуществления антисмысловой олигомер специфически гибридизуется с участком отжига H44A(-6+15), таким как SEQ ID NO: 6. В другом варианте осуществления антисмысловой олигомер специфически гибридизуется с участком отжига H44A(-8+17), таким как SEQ ID NO: 7. В другом варианте осуществления антисмысловой олигомер специфически гибридизуется с участком отжига H44A(-6+17), таким как SEQ ID NO: 8. В другом варианте осуществления антисмысловой олигомер специфически гибридизуется с участком отжига H44A(+77+101), таким как SEQ ID NO: 9. В другом варианте осуществления антисмысловой олигомер специфически гибридизуется с участком отжига H44A(+64+91), таким как SEQ ID NO: 10. В другом варианте осуществления антисмысловой олигомер специфически гибридизуется с участком отжига H44A(+62+89), таким как SEQ ID NO: 11. В другом варианте осуществления антисмысловой олигомер специфически гибридизуется с участком отжига H44A(+62+85), таким как SEQ ID NO: 12. В другом варианте осуществления антисмысловой олигомер специфически гибридизуется с участком отжига H44A(-13+14), таким как SEQ ID NO: 46. В другом варианте осуществления антисмысловой олигомер специфически гибридизуется с участком отжига H44A(-14+15), таким как SEQ ID NO: 47.

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, обладают тем же значением, которое обычно подразумевают специалисты в области, к которой относится изобретение. Хотя для применения на практике или тестирования настоящего изобретения можно использовать любые способы и материалы, сходные или эквивалентные способам и материалам, описанным в настоящем описании, предпочтительные способы и материалы описаны. Для целей настоящего изобретения ниже определены следующие термины.

#### I. Определения.

Под "приблизительно" понимают количество, уровень, величину, номер, частоту, процент, размерность, размер, значение, массу или длину, которые отличаются не более чем на 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% от эталонного количества, уровня, величины, номера, частоты, процента, размерности, размера, значения, массы или длины.

Термины "комплементарный" и "комплементарность" относятся к полинуклеотидам (т.е. последовательностям нуклеотидов), связанным по правилам спаривания оснований. Например, последовательность "T-G-A (5'-3')" комплементарна последовательности "T-C-A (5'-3')". Комплементарность может быть "частичной", в случае которой только некоторые из оснований нуклеиновых кислот соответствуют друг другу согласно правилам спаривания оснований. В ином случае может существовать "полная" или "тотальная" комплементарность между нуклеиновыми кислотами. Степень комплементарности между цепями нуклеиновых кислот имеет значительные эффекты на эффективность и прочность гибридизации между цепями нуклеиновых кислот. Хотя часто является желательной абсолютная комплементарность, некоторые варианты осуществления могут включать одно или несколько, но предпочтительно 6, 5, 4, 3, 2 или 1 несоответствующих оснований относительно РНК-мишени. Также включены вариации в любом положении олигомера. В определенных вариантах осуществления вариации в последовательности вблизи концов олигомера, как правило, являются предпочтительными относительно вариаций во внутренней части, и, если они присутствуют, они, как правило, находятся в пределах приблизительно 6, 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотида от 5'- и/или 3'-конца.

Термины "проникающий в клетку пептид" и "CPP" используют взаимозаменяемо, и они относятся к катионным проникающим в клетку пептидам, также называемым транспортными пептидами, пептидами-носителями или пептидными доменами трансдукции. Пептиды, как показано в настоящем описании, обладают способностью индуцировать проникновение в 100% клеток данной популяции клеточной культуры и позволяют перемещение макромолекул во множество тканей *in vivo* при системном введении. Предпочтительным вариантом осуществления CPP является аргинин-богатый пептид, как дополнительно описано ниже.

Термины "антисмысловой олигомер" и "антисмысловое соединение" и "антисмысловой олигонуклеотид" используют взаимозаменяемо, и они относятся к последовательности циклических субъединиц,

каждая из которых содержит образующую пару часть, связанных межсубъединичными связями, которые позволяют образующим пару частям гибридизоваться с последовательностью-мишенью в нуклеиновой кислоте (как правило, РНК) путем формирования пар по принципу Уотсона-Крика с образованием гетеродуплекса нуклеиновая кислота:олигомер в последовательности-мишени. Циклические субъединицы основаны на рибозе или другом пентозном сахаре или в предпочтительном варианте осуществления морфолиногруппе (см. описание морфолиноолигомеров ниже). Олигомер может иметь полную или высокую комплементарность последовательности с последовательностью-мишенью; вариации в последовательности вблизи концов олигомера, как правило, являются предпочтительными относительно вариаций во внутренней части.

Такой антисмысловой олигомер может быть сконструирован для блокирования или ингибирования трансляции мРНК или для ингибирования природного процессинга пре-мРНК путем сплайсинга, и его можно называть "направленным" или "нацеленным против" последовательности-мишени, с которой он гибридизуется. Последовательность-мишень, как правило, представляет собой область, включающую иницирующий кодон AUG мРНК, подавляющий трансляцию олигомер или участок сплайсинга препроцессированной мРНК - подавляющий сплайсинг олигомер (SSO). Последовательность-мишень для участка сплайсинга может включать последовательность мРНК, имеющую ее 5'-концевые от 1 до приблизительно 25 пар оснований ниже нормальной точки акцептора сплайсинга в препроцессированной мРНК. Предпочтительная последовательность-мишень представляет собой любую область препроцессированной мРНК, которая включает участок сплайсинга или полностью содержится в кодирующей экзон последовательности или охватывает акцепторный или донорный участок сплайсинга. Более часто олигомер называют "нацеленным против" биологически значимой мишени, такой как белок, вирус или бактерия, когда он нацелен против нуклеиновой кислоты-мишени, как описано выше.

Термины "олигомер морфолино" или "РМО" (фосфорамидатный или фосфородиамидатный олигомер морфолино) относятся к олигонуклеотидному аналогу, состоящему из субъединичных структур морфолино, где (i) структуры связаны вместе фосфоросодержащими связями длиной от одного до трех атомов, предпочтительно длиной два атома, и предпочтительно незаряженными или катионными, связывающими азот морфолино одной субъединицы с 5'-экзоциклическим углеродом соседней субъединицы, и (ii) каждое кольцо морфолино содержит пуриновую или пиримидиновую образующую пару часть, эффективную для связывания, путем специфического для оснований образования водородных связей, с основанием в полинуклеотиде. См., например, структуру на фиг. 1А, на которой показан предпочтительный тип фосфородиамидатной связи. Термин "кольцевая структура морфолино" можно использовать взаимозаменяемо с термином "субъединица морфолино". В эту связь можно вносить вариации при условии, что они не препятствуют связыванию или активности. Например, кислород, связанный с фосфором, может быть замещен серой (тиофосфородиамидат). 5'-кислород может быть замещен амино или замещенным низшим алкилом амино. Подвешенный азот, связанный с фосфором, может быть незамещенным, монозамещенным или дизамещенным (необязательно замещенным) посредством низшего алкила. Также см. обсуждение катионных связей ниже. Пуриновая или пиримидиновая образующая пару часть, как правило, представляет собой аденин, цитозин, гуанин, урацил, тимин или инозин. Синтез, структуры и характеристики связывания олигомеров морфолино подробно описаны в патентах США № 5698685, 5217866, 5142047, 5034506, 5166315, 5521063, 5506337, 8076476, 8299206 и 7943762 (катионные связи), все из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок. Модифицированные межсубъединичные связи и концевые группы подробно описаны в заявке PCT US 2011/038459 и публикации WO 2011/150408, которые включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

"Аминокислотная субъединица" или "аминокислотный остаток" могут относиться к остатку  $\alpha$ -аминокислоты ( $-\text{CO}-\text{CHR}-\text{NH}-$ ) или остатку  $\beta$ - или другой аминокислоты (например,  $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_n\text{CHR}-\text{NH}-$ ), где R представляет собой боковую цепь (которая может включать водород) и n равно от 1 до 6, предпочтительно от 1 до 4.

Термин "встречающаяся в природе аминокислота" относится к аминокислоте, присутствующей в белках, встречающихся в природе. Термин "неприродные аминокислоты" относится к аминокислотам, не присутствующим в белках, встречающихся в природе, их примеры включают бета-аланин ( $\beta$ -Ala), 6-аминогексановую кислоту (Ahx) и 6-аминопентановую кислоту.

Термин "встречающаяся в природе нуклеиновая кислота" относится к нуклеиновой кислоте, которая обнаруживается в природе. Как правило, встречающиеся в природе нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры нуклеотидов (каждый из которых содержит пуриновое или пиримидиновое нуклеиновое основание и пентозный сахар), связанные фосфодиэфирными связями. Иллюстративные встречающиеся в природе молекулы нуклеиновых кислот включают РНК и ДНК. Термин "не встречающаяся в природе нуклеиновая кислота" относится к нуклеиновой кислоте, которая не присутствует в природе. Например, не встречающиеся в природе нуклеиновые кислоты могут включать одно или несколько неприродных оснований, сахаров и/или межсубъединичных связей, например сахар, основание и/или связь, которые модифицированы или замещены относительно сахара, основания и/или связи, которые находятся во встречающейся в природе молекуле нуклеиновой кислоты. Иллюстративные модификации описаны

в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления не встречающиеся в природе нуклеиновые кислоты включают более одного типа модификации, например, модификации сахаров и оснований, модификации сахаров и связей, модификации оснований и связей, или модификации оснований, сахаров и связей. В предпочтительном варианте осуществления антисмысловые олигонуклеотиды по настоящему изобретению представляют собой не встречающиеся в природе молекулы нуклеиновых кислот. Например, в некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды содержат неприродное (например, модифицированное или замещенное) основание. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды содержат неприродный (например, модифицированный или замещенный) сахар. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды содержат неприродную (например, модифицированную или замещенную) межсубъединичную связь. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды содержат более одного типа модификации или замены, например неприродное основание и/или неприродный сахар, и/или неприродную межсубъединичную связь. В других вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды имеют химический состав встречающейся в природе молекулы нуклеиновой кислоты, т.е. антисмысловые олигонуклеотиды не включают модифицированное или замещенное основание, сахар или межсубъединичную связь. Независимо от химического состава антисмысловые олигонуклеотиды по изобретению синтезируют *in vitro*, и они не включают антисмысловые композиции биологического происхождения. "Экзон" относится к определенной секции нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, или к последовательности нуклеиновой кислоты, которая находится в зрелой форме молекулы РНК после удаления других частей препроцессированной РНК (или РНК-предшественника) путем сплайсинга. Зрелая молекула РНК может представлять собой матричную РНК (мРНК) или функциональную форму некодирующей РНК, такую как рРНК или тРНК. Ген дистрофина человека имеет приблизительно 79 экзонов.

"Инtron" относится к области нуклеиновой кислоты (в гене), которая не транслируется в белок. Инtron представляет собой некодирующую секцию, которая транскрибируется в мРНК-предшественника (пре-мРНК), а затем удаляется посредством сплайсинга в процессе образования зрелой РНК.

"Эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" относится к количеству терапевтического соединения, такого как антисмысловой олигомер, вводимому млекопитающему, либо в качестве однократной дозы, либо в качестве серии доз, которое является эффективным для возникновения желаемого терапевтического эффекта. Для антисмыслового олигомера этого эффекта, как правило, достигают путем ингибирования трансляции или естественного процессинга путем сплайсинга выбранной последовательности-мишени.

"Пропускание экзона" относится, главным образом, к процессу, посредством которого целый экзон или его часть удаляется из данной препроцессированной РНК, и, тем самым, исключается из зрелой РНК, такой как зрелая мРНК, которая транслируется в белок. Таким образом, часть белка, которая в ином случае кодируется пропущенным экзоном, не присутствует в экспрессированной форме белка, что, как правило, приводит к образованию измененной, хотя и все еще функциональной, форме белка. В определенных вариантах осуществления пропускаемый экзон представляет собой aberrантный экзон из гена дистрофина человека, который может содержать мутацию или другое изменение в его последовательности, которые в ином случае вызывают aberrантный сплайсинг. В определенных вариантах осуществления пропускаемый экзон представляет собой любой один или несколько из экзона 1-79 гена дистрофина, хотя предпочтительным является экзон 44 гена дистрофина человека.

"Дистрофин" представляет собой стержневидный цитоплазматический белок и жизненно важную часть белкового комплекса, который соединяет цитоскелет мышечного волокна с окружающим внеклеточным матриксом через клеточную мембрану. Дистрофин содержит множество функциональных доменов. Например, дистрофин содержит актинсвязывающий домен приблизительно в аминокислотах 14-240 и центральный стержневидный домен приблизительно в аминокислотах 253-3040. Этот крупный центральный домен образован 24 спектрин-подобными трехспиральными элементами приблизительно из 109 аминокислот, которые обладают гомологией с  $\alpha$ -актинином и спектринном. Эти повторы, как правило, прерываются четырьмя пролин-богатыми неповторяющимися сегментами, также обозначаемыми как шарнирные области. Повторы 15 и 16 разделены участком из 18 аминокислот, которые, по-видимому, обеспечивают основной участок для протеолитического расщепления дистрофина. Идентичность последовательностей между большинством повторов находится в диапазоне 10-25%. Один повтор содержит три  $\alpha$ -спирали: 1, 2 и 3. Каждая из  $\alpha$ -спиралей 1 и 3 образована 7 спиральными поворотами, возможно взаимодействующими в качестве двойной спирали через гидрофобную поверхность контакта.  $\alpha$ -спираль 2 имеет более комплексную структуру и образована сегментами из четырех и трех поворотов спирали, разделенных остатком глицина или пролина. Каждый повтор кодируется двумя экзонами, как правило, прерываемыми интроном между аминокислотами 47 и 48 в первой части  $\alpha$ -спирали 2. Другой инtron находится в других положениях в повторе, обычно рассеянных по спирали-3. Дистрофин также содержит цистеин-богатый домен приблизительно в аминокислотах 3080-3360), включающий цистеин-богатый сегмент (т.е. 15 остатков цистеина в 280 аминокислотах), демонстрирующий гомологию с С-концевым доменом  $\alpha$ -актина слизевого гриба (*Dictyostelium discoideum*). С-концевой домен находится прибли-

тельно в аминокислотах 3361-3685.

N-конец дистрофина связывается с F-актином и C-конец связывается с ассоциированным с дистрофином белковым комплексом (DAPC) на сарколемме. DAPC включает дистрогликаны, саркогликаны, интегрины и кавеолин, и мутации в любом из этих компонентов вызывают аутосомно наследуемые мышечные дистрофии. DAPC дестабилизируется, когда дистрофин отсутствует, что приводит к уменьшенным уровням белков-участников и, в свою очередь, приводит к прогрессирующему повреждению волокон и проницаемости мембраны. При различных формах мышечной дистрофии, таких как мышечная дистрофия Дюшенна (DMD) и мышечная дистрофия Беккера (BMD), мышечные клетки продуцируют измененную и функционально дефектную форму дистрофина, или вообще не продуцируют дистрофина, в основном вследствие мутаций в последовательности генов, которые приводит к неправильному сплайсингу. Преобладающая экспрессия дефектного белка дистрофина или полное отсутствие дистрофина или дистрофин-подобного белка приводят к быстрому прогрессированию мышечной дегенерации, как указано выше. В этом отношении, "дефектный" белок дистрофин может характеризоваться формами дистрофина, которые продуцируются у определенных индивидуумов с DMD или BMD, как известно в данной области, или отсутствием подающего обнаружению дистрофина.

Как используют в рамках изобретения, термины "функция" и "функциональный" и т.п. относятся к биологической, ферментативной или терапевтической функции.

"Функциональный" белок дистрофин относится, главным образом, к белку дистрофину, имеющему достаточную биологическую активность для уменьшения прогрессирующей дегенерации мышечной ткани, которая в ином случае характерна для мышечной дистрофии, как правило, по сравнению с измененной или "дефектной" формой белка дистрофина, которая присутствует у определенных индивидуумов с DMD или BMD. В определенных вариантах осуществления функциональный белок дистрофин может иметь приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% (включая все числа между ними) биологической активности дистрофина дикого типа *in vitro* или *in vivo* при измерении стандартными в данной области способами. В качестве одного примера, связанную с дистрофином активность в культурах мышц *in vitro* можно измерять по размеру мышечных трубочек, организации миофибрилл (или дезорганизации), активности сокращений и спонтанной кластеризации рецепторов ацетилхолина (см., например, Brown et al., Journal of Cell Science, 112:209-216, 1999). Модели на животных также являются ценными ресурсами для исследования патогенеза заболевания, и они обеспечивают средства для исследования обусловленной дистрофином активности. Двумя из наиболее широко используемых моделей на животных для исследования DMD являются мышь mdx и собака породы золотистый ретривер с мышечной дистрофией (GRMD), обе из которых являются отрицательными по дистрофину (см., например, Collins & Morgan, Int. J. Exp. Pathol. 84: 165-172, 2003). Эти и другие модели на животных можно использовать для измерения функциональной активности различных белков дистрофина. Включаются укороченные формы дистрофина, такие как формы, которые продуцируются определенными из обеспечивающих пропускание экзонов антисмысловых соединений по настоящему изобретению.

Под "выделенным" подразумевают материал, который, по существу, или в основном свободен от компонентов, которые обычно сопровождают его в нативном состоянии. Например, "выделенный полинуклеотид", как используют в рамках изобретения, может относиться к полинуклеотиду, который очищен или извлечен из последовательностей, которые фланкируют его во встречающемся в природе состоянии, как, например, фрагмент ДНК, который извлечен из последовательностей, которые обычно являются соседними с фрагментом.

Как используют в рамках изобретения, "достаточная длина" относится к антисмысловому олигонуклеотиду, который комплементарен по меньшей мере 8, более конкретно 8-30, последовательно расположенным нуклеотидным основаниям в пре-мРНК дистрофина, являющейся мишенью. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид достаточной длины включает по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 20 или более последовательно расположенных нуклеотидных оснований в пре-мРНК дистрофина, являющейся мишенью. В других вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид достаточной длины включает по меньшей мере 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 последовательно расположенных нуклеотидных оснований в пре-мРНК дистрофина, являющейся мишенью. Антисмысловой олигонуклеотид достаточной длины имеет, по меньшей мере, минимальное количество нуклеотидов, способных специфически гибридизоваться с экзоном 44. Предпочтительно олигонуклеотид достаточной длины имеет длину от приблизительно 10 до приблизительно 50 нуклеотидов, включая олигонуклеотиды из 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 и 40 или более нуклеотидов. В одном варианте осуществления олигонуклеотид достаточной длины имеет длину от 10 до приблизительно 30 нуклеотидов. В другом варианте осуществления олигонуклеотид достаточной длины имеет длину от 15 до приблизительно 25 нуклеотидов. В другом варианте осуществления олигонуклеотид достаточной длины имеет длину от 20 до 30 или от 20 до 50 нуклеотидов. В другом варианте осуществления олигонуклеотид достаточной длины имеет длину от 22 до 25, от 22 до 28, от 24 до 28, от 24 до 29, от 25 до 28, от 20 до 30, или от 25 до 30 нуклеотидов.

Под "усиливать" или "усилением", или "увеличивать" или "увеличением", или "стимулировать" или "стимуляцией" подразумевают, главным образом, способность одного или нескольких антисмысловых

соединений или композиций продуцировать или вызывать более высокий физиологический ответ (т.е. нижеследующие эффекты) в клетке или у индивидуума по сравнению с ответом, вызываемым либо отсутствием антисмыслового соединения, либо контрольным соединением. Поддающийся измерению физиологический ответ может включать увеличенную экспрессию функциональной формы белка дистрофина или увеличенную связанную с дистрофином биологическую активность в мышечной ткани среди прочих ответов, очевидных из информации в данной области и настоящего описания. Также можно измерять увеличенную мышечную функцию, в том числе повышение или улучшение мышечной функции приблизительно на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100%. Также можно измерять процент мышечных волокон, которые экспрессируют функциональный дистрофин, в том числе увеличенную экспрессию дистрофина приблизительно в 1, 2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% мышечных волокон. Например, было показано, что приблизительно 40% улучшение мышечной функции может произойти, если 25-30% волокон экспрессируют дистрофин (см., например, DelloRusso et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 12979-12984, 2002). "Увеличенное" или "усиленное" количество, как правило, является "статистически значимым" количеством, и оно может включать увеличение в 1,1, 1,2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 или более раз (например, в 500, 1000 раз) (включая все целые числа и десятичные числа между ними и превышающие 1), например 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т.д.) количества, продуцируемого в отсутствие антисмыслового соединения (отсутствие средства) или в присутствии контрольного соединения.

Термин "снижать" или "ингибировать" может относиться, главным образом, к способности одного или нескольких антисмысловых соединений по изобретению "снижать" соответствующий физиологический или клеточный ответ, такой как симптом заболевания или состояния, описанного в настоящем описании, при измерении стандартными способами в области диагностики. Соответствующие физиологические или клеточные ответы (*in vivo* или *in vitro*) будут очевидны специалистам в данной области, и они могут включать уменьшение симптомов или патологии мышечной дистрофии, или снижение экспрессии дефектных форм дистрофина, таких как измененные формы дистрофина, которые экспрессируются у индивидуумов с DMD или BMD. "Снижение" ответа может быть статистически значимым по сравнению с ответом, вызываемым отсутствием соединения или контрольной композицией, и оно может включать снижение на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100%, включая целые числа между ними.

Также включаются векторные системы доставки, которые способны экспрессировать олигомерные нацеливающие на дистрофин последовательности по настоящему изобретению, такие как векторы, которые экспрессируют полинуклеотидную последовательность, содержащую любую одну или несколько из SEQ ID NO: 1-12, 46 и 47, как описано в настоящем описании. Под "вектором" или "конструкцией нуклеиновой кислоты" подразумевают полинуклеотидную молекулу, предпочтительно молекулу ДНК, происходящую, например, из плазмиды, бактериофага, дрожжей или вируса, в которую может быть встроен или клонирован полинуклеотид. Вектор предпочтительно содержит один или несколько уникальных участков рестрикции и может быть способен к автономной репликации в определенной клетке-хозяине, включающей клетку-мишень или ткань-мишень, или их клетку-предшественника или ткань-предшественника, или способен встраиваться в геном определенного хозяина, так чтобы клонированная последовательность была воспроизводимой. Таким образом, вектор может представлять собой автономно реплицирующийся вектор, т.е. вектор, который существует в качестве внехромосомной структуры, репликация которого не зависит от хромосомной репликации, например в качестве линейной или замкнутой плазмиды, внехромосомного элемента, минихромосомы или искусственной хромосомы. Вектор может содержать любые средства для обеспечения саморепликации. Альтернативно вектор может представлять собой вектор, который при введении в клетку встраивается в геном и реплицируется вместе с хромосомой(ами), в которую он встроился.

"Лечение" индивидуума (например, млекопитающего, такого как человек) или клетки представляет собой любой тип вмешательства, используемый для изменения естественного течения у индивидуума или в клетке. Лечение включает, но не ограничивается ими, введение фармацевтической композиции, и его можно проводить либо профилактически, либо после начала патологического явления или контакта с этиологическим фактором. Лечение включает любой желаемый эффект на симптомы или патологию заболевания или состояния, ассоциированных с белком дистрофина, как в случае определенных форм мышечной дистрофии, и оно может включать, например, минимальные изменения или улучшения одного или нескольких поддающихся измерению маркеров заболевания или состояния, подвергаемых лечению. Также включено "профилактическое" лечение, которое может быть направлено на снижение скорости прогрессирования заболевания или состояния, подвергаемых лечению, замедление возникновения заболевания или состояния или снижение тяжести его возникновения. "Лечение" или "профилактика" не обязательно указывают на полное устранение, излечение или предупреждение заболевания или состояния или ассоциированных с ним симптомов.

Таким образом, включены способы лечения мышечной дистрофии, такой как DMD и BMD, путем введения одного или нескольких антисмысловых олигомеров по настоящему изобретению (например, SEQ ID NO: 1-12, 46 и 47, и их варианты), необязательно в качестве части фармацевтического состава

или дозированной формы, индивидууму, нуждающемуся в этом. Также включены способы индукции пропускания экзонов у индивидуума путем введения одного или нескольких антисмысловых олигомеров, в которых экзон представляет собой экзон 44 из гена дистрофина, предпочтительно, гена дистрофина человека. "Индивидуум", как используют в рамках изобретения, включает любое животное, которое проявляет симптом или имеет риск наличия симптома, который можно лечить антисмысловым соединением по изобретению, такое как индивидуум, который имеет или обладает риском DMD или BMD, или любых симптомов, ассоциированных с этими состояниями (например, потеря мышечных волокон). Подходящие индивидуумы (пациенты) включают лабораторных животных (таких как мышь, крыса, кролик или морская свинка), сельскохозяйственных животных и домашних животных или комнатных животных (таких как кошка или собака). Они включают не являющихся человеком приматов и, предпочтительно пациентов-людей.

Как "алкил", так "алкилен" относятся к насыщенному углеводородному радикалу с прямой или разветвленной цепью, содержащему 1-18 атомов углерода. Примеры включают, но не ограничиваются ими, метил, этил, пропил, изопропил, бутил, изобутил, трет-бутил, н-пентил и н-гексил. Термин "низший алкил" относится к алкильной группе, как определено в настоящем описании, содержащей от 1 до 8 атомов углерода.

"Алкенил" относится к ненасыщенному углеводородному радикалу с прямой или разветвленной цепью, содержащему от 2 до 18 атомов углерода и содержащему по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь. Примеры включают, но не ограничиваются ими, этенил, пропенил, изопропенил, бутенил, изобутенил, трет-бутенил, н-пентенил и н-гексенил. Термин "низший алкенил" относится к алкенильной группе, как определено в настоящем описании, содержащей от 2 до 8 атомов углерода.

"Алкинил" относится к ненасыщенному углеводородному радикалу с прямой или разветвленной цепью, содержащему от 2 до 18 атомов углерода, содержащих по меньшей мере одну углерод-углеродную тройную связь. Примеры включают, но не ограничиваются ими, этинил, пропинил, изопропинил, бутинил, изобутинил, трет-бутинил, пентинил и гексинил. Термин "низший алкинил" относится к алкинильной группе, как определено в настоящем описании, содержащей от 2 до 8 атомов углерода.

"Циклоалкил" относится к моноциклическому или полициклическому алкильному радикалу. Примеры включают, но не ограничиваются ими, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил и циклооктил.

"Арил" относится к циклической ароматической углеводородной части, содержащей вплоть до 18 атомов углерода, имеющей одно или несколько замкнутое кольцо(кольца). Примеры включают, но не ограничиваются ими, фенил, бензил, нафтил, антраценил, фенантраценил и бифенил.

"Аралкил" относится к радикалу формулы  $RaRb$ , где  $Ra$  представляет собой алкиленовую цепь, как определено выше, и  $Rb$  представляет собой один или несколько арильных радикалов, как определено выше, например, бензил, дифенилметил и т.п.

"Тиоалкокси" относится к радикалу формулы  $-SRc$ , где  $Rc$  представляет собой алкильный радикал, как определено в настоящем описании. Термин "низший тиоалкокси" относится к алкоксигруппе, как определено в настоящем описании, содержащей от 1 до 8 атомов углерода.

"Алкокси" относится к радикалу формулы  $-ORd$ , где  $Rd$  представляет собой алкильный радикал, как определено в настоящем описании. Термин "низший алкокси" относится к алкоксигруппе, как определено в настоящем описании, содержащей от 1 до 8 атомов углерода. Примеры алкоксигрупп включают, но не ограничиваются ими, метокси и этокси.

"Алкоксиалкил" относится к алкильной группе, замещенной алкоксигруппой.

"Карбонил" относится к радикалу  $C(=O)-$ .

"Гуанидинил" относится к радикалу  $H_2N(C=NH_2)-NH-$ .

"Амидинил" относится к радикалу  $H_2N(C=NH_2)CH-$ .

"Амино" относится к радикалу  $NH_2$ .

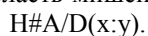
"Алкиламино" относится к радикалу формулы  $-NHRd$  или  $NRdRd$ , где каждый  $Rd$ , независимо, представляет собой алкильный радикал, как определено в настоящем описании. Термин "низший алкиламино" относится к алкиламиногруппе, как определено в настоящем описании, содержащей от 1 до 8 атомов углерода.

"Гетероцикл" означает 5-7-членное моноциклическое, или 7-10-членное бициклическое гетероциклическое кольцо, которое является либо насыщенным, либо ненасыщенным, либо ароматическим и которое содержит от 1 до 4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и где гетероатомы азота и серы необязательно могут быть окисленными, и гетероатом азота может быть необязательно кватернизированным, включая бициклические кольца, в которых один из описанных выше гетероциклов слит с бензольным кольцом. Гетероцикл может быть связан через любой гетероатом или атом углерода. Гетероциклы включают гетероарилы, как определено ниже. Таким образом, в дополнение к гетероарилам, приведенным выше, гетероциклы также включают морфолинил, пирролидинонил, пирролидинил, пиперидинил, пиперизинил, гидантоинил, валеролактаминил, оксиранил, оксетанил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, тетрагидропиридинил, тетрагидротииофенил, тетрагидротииопиранил, тетрагидропиридинил, тетрагидротииопиранил и т.п.

"Гетероарил" означает ароматическое гетероциклическое кольцо из 5-10 членов, имеющее по меньшей мере один гетероатом, выбранный из азота, кислорода и серы, и содержащее по меньшей мере 1 атом углерода, включая как моноциклические, так и бициклические кольцевые системы. Репрезентативные гетероарилы представляют собой пиридил, фурил, бензофуранил, тиофенил, бензотиофенил, хинолинил, пирролил, индолил, оксазолил, бензоксазолил, имидазолил, бензимидазолил, тиазолил, бензотиазолил, изоксазолил, пиразолил, изотиазолил, пиридазинил, пиримидинил, пиразинил, триазинил, циннолинил, фталазинил и хиназолинил.

Термины "необязательно замещенный алкил", "необязательно замещенный алкенил", "необязательно замещенный алкокси", "необязательно замещенный тиаалкокси", "необязательно замещенный алкиламино", "необязательно замещенный низший алкил", "необязательно замещенный низший алкенил", "необязательно замещенный низший алкокси", "необязательно замещенный низший тиаалкокси", "необязательно замещенный низший алкиламино" и "необязательно замещенный гетероцикл" означают, что, когда они замещены, по меньшей мере один атом водорода заменен заместителем. В случае оксозаместителя (=O), замещены два атома водорода. В этом отношении заместители включают дейтерий, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероцикл, необязательно замещенный циклоалкил, оксо, галоген, -CN, -ORx, NRxRy, NRxC(=O)Ry, NRxSO<sub>2</sub>Ry, -NRxC(=O)NRxRy, C(=O)Rx, C(=O)ORx, C(=O)NRxRy, -SOmRx и -SOmNRxRy, где m равно 0, 1 или 2, Rx и Ry являются одинаковыми или различаются и независимо представляют собой водород, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероцикл или необязательно замещенный циклоалкил, и каждый из указанных заместителей необязательно замещенного алкила, необязательно замещенного алкенила, необязательно замещенного алкинила, необязательно замещенного арила, необязательно замещенного гетероцикла и необязательно замещенного циклоалкила может быть дополнительно замещен одним или несколькими оксо, галогенами, -CN, -ORx, NRxRy, NRxC(=O)Ry, NRxSO<sub>2</sub>Ry, -NRxC(=O)NRxRy, C(=O)Rx, C(=O)ORx, C(=O)NRxRy, -SOmRx и -SOmNRxRy.

Система номенклатуры антисмысловых молекул была предложена и опубликована для различения различных антисмысловых молекул (см. Mann et al. (2002), J. Gen. Med. 4, 644-654). Эта номенклатура стала особенно актуальной при исследовании нескольких мало различающихся антисмысловых молекул, все из которых направлены на одну и ту же область-мишень, как показано ниже



Первая буква обозначает вид (например, H: человек, M: мышь, C: собака). "#" обозначает номер экзона дистрофина-мишени. "A/D" указывает на акцепторный или донорный участок сплайсинга в начале и в конце экзона соответственно. (x y) обозначает координаты отжига, где "-" или "+" указывает на интронные или экзонные последовательности, соответственно. Например, A(-6+18) указывает на последние 6 оснований интрона, предшествующего экзону-мишени, и первые 18 оснований экзона-мишени. Наиболее близким участком сплайсинга является акцептор, так что этим координатам предшествует "A". Описание координат отжига в донорном участке связывания может представлять собой D(+2-18), где последние 2 экзонных основания и первые 18 интронных оснований соответствуют участку отжига антисмысловой молекулы. Полностью экзонные координаты могут быть обозначены как A(+65+85), который представляет собой участок между 65- и 85-м нуклеотидами с начала этого экзона.

## II. Антисмысловые олигонуклеотиды.

Когда антисмысловая молекула(ы) нацелена на нуклеотидные последовательности, вовлеченные в сплайсинг экзонов в последовательностях пре-мРНК, нормальный сплайсинг экзонов может ингибироваться, что приводит к тому, что аппарат сплайсинга исключает целый экзон-мишень из зрелой мРНК. Во многих генах делеция всего экзона приводит к продукции нефункционального белка через утрату важных функциональных доменов или нарушение рамки считывания. Однако в некоторых белках является возможным укорочение белка путем делеции одного или нескольких экзонов из белка без нарушения рамки считывания и без серьезного изменения биологической активности белка. Как правило, такие белки имеют структурную роль и/или обладают функциональными доменами на их концах. Мышечная дистрофия Дюшенна возникает в результате мутаций, которые препятствуют синтезу функционального продукта гена дистрофина, как правило, посредством нарушения рамки считывания. Антисмысловые олигонуклеотиды, которые индуцируют пропускание экзонов в области гена дистрофина, содержащей мутацию, могут позволить мышечным клеткам продуцировать зрелый мРНК-транскрипт, который кодирует функциональный белок дистрофин. Итоговый белок дистрофин не обязательно представляет собой форму дистрофина "дикого типа", а скорее является укороченной, но, тем не менее, функциональной или полужункциональной формой дистрофина. Настоящее изобретение относится к антисмысловым молекулам, способным связываться с определенными пре-мРНК-мишенями дистрофина в экзоне 44, и перенацеливать процессинг этого гена.

В частности, изобретение относится к выделенным антисмысловым олигонуклеотидам длиной от 20 до 50 нуклеотидов, включающим по меньшей мере 10, 12, 15, 17, 20 или более последовательно расположенных нуклеотидов, комплементарных области-мишени экзона 44 гена дистрофина, называемой

участком отжига, выбранной из следующих: H44A(-07+17), H44A(-07+20), H44A(-07+22), H44A(-8+15), H44A(-7+15), H44A(-6+15), H44A(-8+17), H44A(-6+17), H44A(+77+101), H44A(+64+91), H44A(+62+89), H44A(+62+85), H44A(-13+14), H44A(-14+15). Антисмысловые олигонуклеотиды специфически гибридизуются с участком отжига, индуцируя пропускание экзона 44.

Антисмысловой олигонуклеотид и РНК-мишень комплементарны друг другу, когда достаточное количество соответствующих положений в каждой молекуле занято нуклеотидами, которые могут образовывать водородную связь друг с другом, так что происходит стабильное и специфическое связывание между олигонуклеотидом и мишенью. Таким образом, "специфически гибридизующийся" и "комплементарный" являются терминами, которые используют для указания на достаточную степень комплементарности или точное образование пар, так что между олигонуклеотидом и мишенью происходит стабильное и специфическое связывание. В данной области понятно, что последовательность антисмысловой молекулы не должна быть на 100% комплементарной ее последовательности-мишени, чтобы она была специфически гибридизующейся. Антисмысловая молекула является специфически гибридизующейся, когда связывание олигонуклеотида с молекулой-мишенью препятствует нормальной функции РНК-мишени, и существует достаточная степень комплементарности, чтобы избежать неспецифического связывания антисмыслового олигонуклеотида с не являющимися мишенями последовательностями в условиях, при которых специфическое связывание является желательным, т.е. в физиологических условиях в случае анализов *in vivo* или терапевтического лечения, и, в случае анализов *in vitro*, в условиях, при которых анализы проводят.

Длина антисмысловой молекулы может варьировать при условии, что она способна селективно связываться с предполагаемой областью в молекуле пре-мРНК. Длину таких последовательностей можно определять в соответствии с методиками селекции, описанными в настоящем описании. Как правило, длина антисмысловой молекулы составляет от приблизительно 10 нуклеотидов вплоть до приблизительно 50 нуклеотидов. Однако будет понятно, что в этом способе можно использовать любую длину нуклеотидов в этом диапазоне. Предпочтительно, длина антисмысловой молекулы составляет 10-30 нуклеотидов.

В одном варианте осуществления олигонуклеотиды по изобретению имеют длину от 20 до 50 нуклеотидов и включают по меньшей мере 10, 12, 15, 17, 20 или более нуклеотидов любой из SEQ ID NO: 1-12, 46 и 47. В некоторых вариантах осуществления тиминные основания в SEQ ID NO: 1-12, 46 и 47 обязательно представляют собой урацил.

Делеция экзона не должна приводить к сдвигу рамки считывания в укороченной транскрибированной мРНК. Таким образом, если в линейной последовательности из трех экзонов конец первого экзона кодирует два из трех нуклеотидов в кодоне и следующий кодон удален, тогда третий экзон в линейной последовательности должен начинаться с единичного нуклеотида, который способен дополнить нуклеотидный триплет кодона. Если третий кодон не начинается с единичного нуклеотида, произойдет сдвиг рамки считывания, который может привести к образованию укороченного или нефункционального белка.

Будет понятно, что компоновка кодонов на конце экзона в структурных белках не всегда может разрываться на конце кодона, следовательно, может существовать необходимость удаления более одного экзона из пре-мРНК для обеспечения считывания мРНК в рамке считывания. В таких обстоятельствах может потребоваться селекция множества антисмысловых олигонуклеотидов способом по изобретению, где каждый из них направлен на отличающуюся область, ответственную за индукцию сплайсинга в экзонах, которые подлежат удалению.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды имеют химический состав встречающейся в природе молекулы нуклеиновой кислоты, т.е. антисмысловые олигонуклеотиды не включают модифицированное или замещенное основание, сахар или межсубъединичную связь. В предпочтительном варианте осуществления антисмысловые олигонуклеотиды по настоящему изобретению представляют собой не встречающиеся в природе молекулы нуклеиновой кислоты. Например, не встречающиеся в природе нуклеиновые кислоты могут включать одно или несколько неприродных оснований, сахаров и/или межсубъединичных связей, например основание, сахар и/или связь, которые были модифицированы или замещены относительно основания, сахара и/или связи, находящихся во встречающейся в природе молекуле нуклеиновой кислоты. Иллюстративные модификации описаны ниже. В некоторых вариантах осуществления не встречающиеся в природе нуклеиновые кислоты включают более одного типа модификации, например модификации сахара и основания, модификации сахара и связи, модификации основания и связи или модификации основания, сахара и связи. Например, в некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды содержат неприродное (например, модифицированное или замещенное) основание. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды содержат неприродный (например, модифицированный или замещенный) сахар. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды содержат неприродную (например, модифицированную или замещенную) межсубъединичную связь. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды содержат более одного типа модификации или замены, например неприродное основание и/или неприродный сахар и/или неприродную межсубъединичную связь.

Во избежание деградации пре-мРНК в ходе образования дуплекса с антисмысловыми молекулами антисмысловые молекулы можно адаптировать для минимизации или предупреждения расщепления эн-

догенной РНК-азой H. Это свойство является высокопредпочтительным, поскольку обработка РНК неметилованными олигонуклеотидами либо внутриклеточно, либо в неочищенных экстрактах, которые содержат РНК-азу H, приводит к деградации дуплексов пре-мРНК: антисмысловой олигонуклеотид. В способе по настоящему изобретению можно использовать любую форму модифицированной антисмысловой молекулы, которая способна обходить или не индуцировать такую деградацию. Примером антисмысловых молекул, которые, когда они в дуплексе с РНК, не расщепляются клеточной РНК-азой H, являются 2'-О-метилпроизводные. 2'-О-метилолигорибонуклеотиды являются высокостабильными в клеточной среде и в тканях животных, и их дуплексы с РНК обладают более высокими величинами  $T_m$ , чем их рибонуклеотидные или дезоксирибонуклеотидные аналоги.

Метилирование 2'-положения гидроксирибозы и включение фосфоротиоатного остова является обычной стратегией получения молекул, которые внешне сходны с РНК, но которые являются значительно более устойчивыми с деградации нуклеазой.

Антисмысловые молекулы, которые не активируют РНК-азу H, можно получать в соответствии с известными способами (см., например, патент США № 5149797). Такие антисмысловые молекулы, которые могут представлять собой дезоксирибонуклеотидные или рибонуклеотидные последовательности, просто содержат любую структурную модификацию, которая пространственно затрудняет или препятствует связыванию РНК-азы H с дуплексной молекулой, содержащей олигонуклеотид, в качестве одного из ее представителей, причем эта структурная модификация, по существу, не затрудняет или не нарушает образование дуплекса. Поскольку части олигонуклеотида, вовлеченные в образование дуплекса, по существу, отличаются от частей, вовлеченных в связывание с ним РНК-азы H, доступны многочисленные антисмысловые молекулы, которые не активируют РНК-азу H. Например, такие антисмысловые молекулы могут представлять собой олигонуклеотиды, где по меньшей мере один или все из межнуклеотидных мостиковых фосфатных остатков представляют собой модифицированные фосфаты, такие как метилфосфонаты, метилфосфотиоаты, фосфоморфолидаты, фосфоропиперазидаты и фосфорамидаты. Например, каждый второй межнуклеотидный мостиковый фосфатный остаток может быть модифицирован, как описано. В другом неограничивающем примере такие антисмысловые молекулы представляют собой молекулы, где по меньшей мере один или все из нуклеотидов содержат 2'-низшую алкильную часть (например,  $C_1$ - $C_4$ , линейный или разветвленный, насыщенный или ненасыщенный алкил, такой как метил, этил, этенил, пропил, 1-пропенил, 2-пропенил и изопропил). Например, может быть модифицирован каждый второй нуклеотид, как описано.

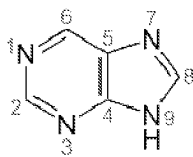
Конкретные примеры антисмысловых олигонуклеотидов, которые могут использоваться в рамках настоящего изобретения, включают олигонуклеотиды, содержащие модифицированные остовы или неприродные межсубъединичные связи. Олигонуклеотиды, имеющие модифицированные остовы, включают олигонуклеотиды, которые сохраняют атом фосфора в остова, и олигонуклеотиды, которые не имеют атома фосфора в остова. Модифицированные олигонуклеотиды, которые не имеют атома фосфора в их межнуклеозидном остова, также могут считаться олигонуклеозидами.

В других антисмысловых молекулах как сахар, так и межнуклеозидная связь, т.е. остов нуклеотидных элементов, заменяют новыми группами. Основные элементы сохраняют для гибридизации с соответствующим соединением нуклеиновой кислоты-мишени. Одно такое олигомерное соединение, олигонуклеотидный миметик, для которого было показано, что он обладает превосходными свойствами гибридизации, называют пептидно-нуклеиновой кислотой (PNA). В соединениях PNA сахарный остов олигонуклеотида заменяют амидсодержащим остова, в частности аминокислотным остова. Нуклеотидные основания сохранены и они связаны прямо или непрямо с атомами азота азатрупа амидной части остова.

Модифицированные олигонуклеотиды также могут содержать одну или несколько замещенных частей сахаров.

Олигонуклеотиды также могут включать модификации или замены нуклеинового основания (часто обозначаемого в данной области просто как "основание"). Олигонуклеотиды, содержащие модифицированное или замещенное основание, включают олигонуклеотиды, в которых одно или несколько пуриновых или пиримидиновых оснований, наиболее часто встречающихся в нуклеиновых кислотах, заменены менее распространенными или неприродными основаниями.

Пуриновые основания содержат пиримидиновое кольцо, слитое с имидазольным кольцом, как описывается общей формулой

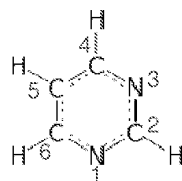


Пурин

Аденин и гуанин представляют собой два пуриновых нуклеотидных основания, наиболее часто встречающихся в нуклеиновых кислотах. Они могут быть замещены другими встречающимися в приро-

де пуринами, включая, но не ограничиваясь ими, N<sup>6</sup>-метиладенин, N<sup>2</sup>-метилгуанин, гипоксантин и 7-метилгуанин.

Пиримидиновые основания содержат шестичленное пиримидиновое кольцо, которое определяется общей формулой



Пиримидин

Цитозин, урацил и представляют собой пиримидиновые основания, наиболее часто встречающиеся в нуклеиновых кислотах. Они могут быть замещены другими встречающимися в природе пиримидинами, включая, но не ограничиваясь ими, 5-метилцитозин, 5-гидроксиметилцитозин, псевдоурацил и 4-тиоурацил. В одном варианте осуществления олигонуклеотиды, описанные в настоящем описании, содержат тиминовые основания вместо урацила.

Другие модифицированные или замещенные основания включают, но не ограничиваются ими, 2,6-диаминопурин, оротовую кислоту, агматидин, лизидин, 2-тиопиримидин (например, 2-тиоурацил, 2-тиотимин), G-зажим и его производные, 5-замещенный пиримидин (например, 5-галоурацил, 5-пропинилурацил, 5-пропинилцитозин, 5-аминометилурацил, 5-гидроксиметилурацил, 5-аминометилцитозин, 5-гидроксиметилцитозин, Super T), 7-деазагуанин, 7-деазааденин, 7-аза-2,6-диаминопурин, 8-аза-7-деазагуанин, 8-аза-7-деазааденин, 8-аза-7-деаза-2,6-диаминопурин, Super G, Super A и N4-этилцитозин, или их производные; N<sup>2</sup>-циклопентилгуанин (cPent-G), N<sup>2</sup>-циклопентил-2-аминопурин (cPent-AP) и N<sup>2</sup>-пропил-2-аминопурин (Pr-AP), псевдоурацил или его производные; и вырожденные или универсальные основания, такие как 2,6-дифтортолуол или отсутствие оснований, такие как абазические участки (например, 1-дезоксирибоза, 1,2-дидезоксирибоза, 1-дезоксид-2-О-метилрибоза; или производные пирролидина, в которых кислород кольца заменен азотом (азарибоза)). Примеры производных Super A, Super G и Super T могут быть найдены в патенте США 6683173 (Epoch Biosciences), который включает в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Было показано, что cPent-G, cPent-AP и Pr-AP снижают иммуностимулирующие эффекты, когда они включены в мРНК (Peacock H. et al. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 9200). Псевдоурацил представляет собой встречающуюся в природе изомеризованную версию урацила с С-гликозидом вместо обычного N-гликозида, как в уридине. Псевдоуридинсодержащая синтетическая мРНК может иметь улучшенный профиль безопасности по сравнению с уридинсодержащей mPvNA (WO 2009127230, включенная в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме).

Определенные модифицированные или замещенные нуклеотидные основания являются особенно пригодными для повышения аффинности связывания антисмысловых олигонуклеотидов по изобретению. Они включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и O-6-замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Было показано, что замены на 5-метилцитозин повышают стабильность дуплекса нуклеиновых кислот на 0,6-1,2°C и в настоящее время являются предпочтительными заменами, еще более конкретно, когда их комбинируют с модификациями сахаров 2'-О-метоксиэтилом.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные или замещенные нуклеотидные основания являются пригодными для облегчения очистки антисмысловых олигонуклеотидов. Например, в определенных вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды могут содержать три или более (например, 3, 4, 5, 6 или более) последовательно расположенных гуаниновых оснований. В определенных антисмысловых олигонуклеотидах нить из трех или более последовательно расположенных гуаниновых оснований может приводить к агрегации олигонуклеотидов, осложняющей очистку. В таких антисмысловых олигонуклеотидах один или несколько последовательно расположенных остатков гуанина могут быть заменены инозином. Замена инозина одним или несколькими остатками гуанина в нити из трех или более последовательных гуаниновых оснований может снижать агрегацию антисмыслового олигонуклеотида, тем самым, облегчая очистку.

В одном варианте осуществления другая модификация антисмысловых олигонуклеотидов вовлекает химическое связывание с олигонуклеотидом одной или нескольких частей или конъюгатов, которые повышают активность, клеточное распределение или клеточный захват олигонуклеотида. Такие части включают, но не ограничиваются ими, липидные части, такие как холестерин, холестерин, холестерин, простой тиоэфир, например, гексил-5-триметилтиол, тиохолестерин, алифатическая цепь, например, додекандиольные или ундецильные остатки, фосфолипид, например, дигексадецил-гас-глицерин или триэтилламмоний 1,2-ди-О-гексадецил-гас-глицеро-3-Н-фосфонат, цепь полиамина или полиэтиленгликоля, или адамантан-уксусную кислоту, пальмитильную часть, или часть октадециламина или гексиламинокарбонилхлестерина.

Для всех положений в данном соединении не является необходимым, чтобы они были единообраз-

но модифицированы и, в действительности, более одной из упомянутых выше модификаций может быть включено в одно соединение или даже в один нуклеозид в олигонуклеотиде. Настоящее изобретение также относится к антисмысловым олигонуклеотидам, которые представляют собой химерные соединения. "Химерные" антисмысловые соединения или "химеры" в контексте настоящего изобретения представляют собой антисмысловые молекулы, в частности олигонуклеотиды, которые содержат две или более химически обособленных области, каждая из которых состоит по меньшей мере из одного мономерного элемента, т.е. нуклеотида в случае олигонуклеотидного соединения. Эти олигонуклеотиды, как правило, содержат по меньшей мере одну область, где олигонуклеотид модифицирован так, чтобы сообщить ему увеличенную устойчивость к деградации нуклеазой, увеличенный клеточный захват и дополнительную область для увеличенной аффинности связывания в отношении нуклеиновой кислоты-мишени.

Антисмысловые молекулы, используемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть удобным образом и стандартными путями получены с использованием хорошо известного способа твердофазного синтеза. Оборудование для такого синтеза продается несколькими поставщиками, включая, например, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Один способ синтеза олигонуклеотидов на модифицированной твердой подложке описан в патенте США № 4458066.

Дополнительно или альтернативно можно использовать любые другие способы такого синтеза, известные в данной области. Является хорошо известным использование сходных способов для получения олигонуклеотидов, таких как фосфоротиоатные и алкилированные производные. В одном таком автоматизированном варианте осуществления в качестве исходных материалов используют диэтилфосфорамидиты и их можно синтезировать, как описано Beaucage et al., (1981) Tetrahedron Letters, 22:1859-1862.

Антисмысловые молекулы по изобретению синтезируют *in vitro*, и они не включают антисмысловые композиции биологического происхождения. Молекулы по изобретению также можно смешивать, инкапсулировать, конъюгировать или иным образом связывать с другими молекулами, структурами молекул или смесями соединений, как например, липосомы, нацеленные на рецептор молекулы, пероральные, ректальные, местные или другие составы, для облегчения захвата, распределения и/или всасывания.

#### А. Морфолиноолигомеры.

Иллюстративные варианты осуществления изобретения относятся к морфолиноолигомерам, имеющим фосфоросодержащие связи остова, как проиллюстрировано на фиг. 1A-1C. В одном варианте осуществления предусматривается связанный через фосфородиамидат морфолиноолигомер, такой как показано на фиг. 1C, который является модифицированным в соответствии с одним аспектом настоящего изобретения так, чтобы он содержал положительно заряженные группы предпочтительно в 10-50% его связей остова. Морфолиноолигомеры с незаряженными связями остова, включая антисмысловые олигомеры, подробно описаны, например, в (Summerton and Weller 1997) и принадлежащих тому же заявителю патентах США № 5698685, 5217866, 5142047, 5034506, 5166315, 5185444, 5521063, 5506337, 8076476, 8299206 и 7943762, все из которых полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. Морфолиноолигомеры с модифицированными связями, включая заряженные связи, могут быть найдены в USSN: 13/118298 (включенная в настоящее описание в качестве ссылки).

Важные свойства субъединиц на основе морфолино включают: 1) способность быть связанными в олигомерной форме посредством стабильных, незаряженных или положительно заряженных связей остова; 2) способность быть опорой для нуклеотидного основания (например, аденин, цитозин, гуанин, тимидин, урацил и инозин), чтобы образовавшийся полимер мог гибридизоваться с нуклеиновой-кислотой-мишенью с комплементарными основаниями, включая РНК-мишень, с величинами  $T_m$  выше чем приблизительно 45°C в относительно коротких олигонуклеотидах (например, 10-15 оснований); 3) способность олигонуклеотида активно или пассивно транспортироваться в клетки млекопитающих; и 4) способность гетеродуплекса антисмысловой олигонуклеотид:РНК быть устойчивыми к деградации РНК-азой и РНК-азой Н соответственно.

Иллюстративные структуры остова для антисмысловых олигонуклеотидов заявленного объекта включают типы морфолиносубъединиц, представленные на фиг. 1D-G, каждый из которых связан незаряженной или положительно заряженной фосфоросодержащей субъединичной связью. На фиг. 1D представлена фосфоросодержащая связь, которая формирует остов из повторяющихся элементов из пяти атомов, где морфолинокольца связаны фосфоамидной связью из 1-атома. На фиг. 1E представлена связь, которая обеспечивает остов из повторяющихся элементов из 6 атомов. В этой структуре атом Y, связывающий 5'-углерод морфолино с группой фосфора, может представлять собой серу, азот, углерод или предпочтительно кислород. Часть X, подвешенная к фосфору, может представлять собой фтор, алкил или замещенный алкил, тиоалкокси или замещенный тиоалкокси, или незамещенный, однозамещенный или двухзамещенный азот, включающий циклические структуры, такие как морфолины или пиперидины. Алкил, алкокси и тиоалкокси предпочтительно включают 1-6 атомов углерода. Части Z представляют собой серу или кислород, и предпочтительно представляют собой кислород.

Связи, представленные на фиг. 1F и 1G, предназначены для остовов из элементов длиной 7 атомов. В структуре 1F часть X является такой, как в структуре 1E, и часть Y может представлять собой метилен, серу или предпочтительно кислород. В структуре 1G, части X и Y являются такими, как в структуре 1E. Особенно предпочтительные морфолиноолигонуклеотиды включают морфолиноолигонуклеотиды, со-

стоящие из структур морфолиносубъединиц формы, представленной на фиг. 1Е, где  $X=NH_2$ ,  $N(CH_3)_2$  или 1-пиперазин или другая заряженная группа,  $Y=O$  и  $Z=O$ .

По существу, незаряженный олигонуклеотид может быть модифицированным в соответствии с одним аспектом изобретения, чтобы он включал заряженные связи, например вплоть до приблизительно 1 на каждые 2-5 незаряженных связей, как, например, приблизительно 4-5 на каждые 10 незаряженных связей. В определенных вариантах осуществления оптимальное улучшение активности антисмыслового олигонуклеотида можно наблюдать, когда приблизительно 25% от связей остова являются катионными. В определенных вариантах осуществления усиление можно наблюдать при небольшом количестве, например 10-20% катионных связей, или когда количество катионных связей находится в диапазоне 50-80%, как, например, приблизительно 60%.

Предусматриваются олигомеры, имеющие любое количество катионных связей, включая олигомеры с полностью катионными связями. Однако предпочтительны, олигомеры являются частично заряженными, имеющими, например, 10-80% катионных связей. В предпочтительных вариантах осуществления приблизительно от 10 до 60% и предпочтительно от 20 до 50% связей являются катионными.

В одном варианте осуществления катионные связи рассеяны вдоль остова. Частично заряженные олигомеры предпочтительно содержат по меньшей мере две последовательно расположенных незаряженных связи; следовательно, олигомер предпочтительно не имеет строго чередующегося характера вдоль его всей длины.

Также предусматриваются олигомеры, имеющие блоки катионных связей и блоки незаряженных связей; например центральный блок незаряженных связей может фланкироваться блоками катионных связей или наоборот. В одном варианте осуществления олигомер имеет 5'-, 3'- и центральные области приблизительно равной длины, и процент катионных связей в центральной области превышает приблизительно 50%, предпочтительно превышает приблизительно 70%.

В определенных вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды можно получать посредством пошагового твердофазного синтеза с использованием способа, подробно описанного в ссылках, цитированных выше и ниже в отношении синтеза олигонуклеотидов, имеющих смешанные или незаряженные и катионные связи остова, и в примерах ниже. В некоторых случаях может быть желательным добавление дополнительных химических частей к антисмысловому соединению, например для улучшения фармакокинетики или для облегчения улавливания или обнаружения соединения. Такая часть может быть ковалентно присоединена в соответствии со стандартными способами синтеза. Например, добавление части полиэтиленгликоля или другого гидрофильного полимера, например полимера, имеющего 1-100 мономерных субъединиц, может быть пригодным для повышения растворимости.

Репортерная часть, такая как флуоресцеин или радиоактивно меченная группа, может быть присоединена для целей обнаружения. Альтернативно репортерная метка, связанная с олигомером, может представлять собой лиганд, такой как антиген или биотин, способный связывать меченое антитело или стрептавидин. При выборе части для присоединения или модификации антисмыслового олигонуклеотида, как правило, безусловно, является желательным выбор химических соединений из групп, которые являются биосовместимыми и, вероятно, будут переноситься индивидуумом без нежелательных побочных эффектов.

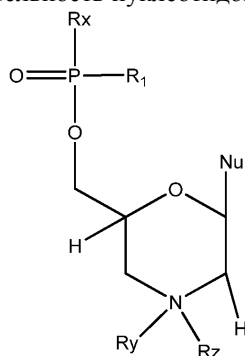
Олигонуклеотиды для применения в антисмысловых применениях имеют длину, обычно находящуюся в диапазоне от приблизительно 10 до приблизительно 50 субъединиц, более предпочтительно приблизительно от 10 до 30 субъединиц, и, как правило, 15-25 оснований. Например, олигонуклеотид по изобретению, имеющий 19-20 субъединиц, что является пригодной длиной для антисмыслового олигонуклеотида, в идеальном случае может иметь от двух до десяти, например от четырех до восьми, катионных связей и остальные незаряженные связи. Олигонуклеотид, имеющий 14-15 субъединиц, в идеальном случае может иметь от двух до семи, например, 3, 4 или 5, катионных связей и остальные незаряженные связи. В предпочтительном варианте осуществления олигонуклеотиды имеют от 25 до 28 субъединиц.

Каждая кольцевая структура морфолина служит опорой для образующей пару части, формируя последовательность образующих пару частей, которые, как правило, предназначены для гибридизации с выбранной антисмысловой мишенью в клетке или у индивидуума, подвергаемого лечению. Образующая пару часть может представлять собой пурин или пиримидин, встречающийся в нативной ДНК или РНК (например, А, G, C, T или U) или аналог, такой как гипоксантин (основной компонент нуклеозида инозина), 5-метилцитозин, 2-6-диаминопурин или другие модифицированные основания, известные в данной области и описанные ниже.

Как отмечалось выше, определенные варианты осуществления относятся к олигонуклеотидам, содержащим новые межсубъединичные связи, включая олигомеры РМО-Х, и олигомеры, имеющие модифицированные концевые группы. В некоторых вариантах осуществления эти олигомеры обладают более высокой аффинностью в отношении ДНК и РНК, чем соответствующие немодифицированные олигомеры, и они демонстрируют повышенную клеточную доставку, специфическую активность и/или свойства распределения в тканях по сравнению с олигомерами, имеющими межсубъединичные связи. Структурные признаки и свойства различных типов связей и олигомеров более подробно описаны в следующем обсуждении. Синтез этих и сходных олигомеров описан в принадлежащей тому же заявителю заявке

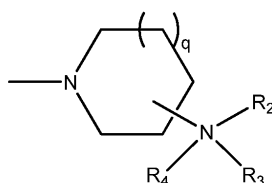
США № 13/118298, которая включена в качестве ссылки в полном объеме.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к олигонуклеотиду, имеющему последовательность, комплементарную последовательности-мишени, которая ассоциирована с заболеванием человека, и содержащему последовательность нуклеотидов, имеющую формулу



где Nu представляет собой нуклеиновое основание;

R<sub>1</sub> имеет формулу



q равно 0, 1 или 2;

R<sub>2</sub> выбран из группы, состоящей из водорода, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> алкильной, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> аралкильной и формамидинильной группы, и

R<sub>3</sub> выбран из группы, состоящей из водорода, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> ацила, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> аминокислоты, ацильной части природной или не природной α- или β-аминокислоты, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> аралкила и C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкила, или

R<sub>2</sub> и R<sub>3</sub> связаны с образованием 5-7-членного кольца, где кольцо может быть необязательно замещено заместителем, выбранным из группы, состоящей из C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкила, фенила, галогена и C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> аралкила;

R<sub>4</sub> выбран из группы, состоящей из электронной пары, водорода, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> аралкила;

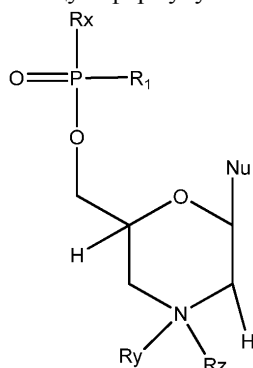
Rx выбран из группы, состоящей из саркозинида, гидроксила, нуклеотида, проникающей в клетку пептидной части и пиперазинила;

Ry выбран из группы, состоящей из водорода, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила, нуклеотида, проникающей в клетку пептидной части, аминокислоты, формамидинильной и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> ацила; и

Rz выбран из группы, состоящей из электронной пары, водорода, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> ацила и их фармацевтически приемлемых солей.

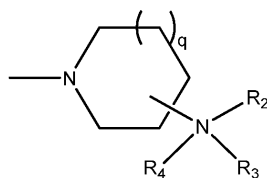
Nu может быть выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, тимина, урацила, цитозина и гипоксантина. Более предпочтительно Nu представляет собой тимин или урацил.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретение относится к олигонуклеотиду, имеющему последовательность нуклеотидов, имеющую формулу



где Nu представляет собой нуклеиновое основание;

R<sub>1</sub> выбран из группы, состоящей из R<sub>1</sub>' и R<sub>1</sub>'', где R<sub>1</sub>' представляет собой диметиламино и R<sub>1</sub>'' имеет формулу



где по меньшей мере один  $R_1$  представляет собой  $R_1''$ ;

$q$  равно 0, 1 или 2 при условии, что по меньшей мере один из  $R_1$  представляет собой пиперидинильную часть;

$R_2$  выбран из группы, состоящей из водорода,  $C_1$ - $C_5$  алкильной,  $C_1$ - $C_5$  аралкильной и формамидинильной группы, и

$R_3$  выбран из группы, состоящей из водорода,  $C_1$ - $C_{10}$  ацильной,  $C_1$ - $C_{10}$  аминокислотной, ацильной части встречающейся в природе или не природной  $\alpha$ - или  $\beta$ -аминокислоты,  $C_1$ - $C_{10}$  аралкил и  $C_1$ - $C_{10}$  алкил, или

$R_2$  и  $R_3$  связаны с образованием 5-7-членного кольца, где кольцо может быть необязательно замещено заместителем, выбранным из группы, состоящей из  $C_1$ - $C_{10}$  алкила, фенила, галогена и  $C_1$ - $C_{10}$  аралкила;

$R_4$  выбран из группы, состоящей из электронной пары, водорода,  $C_1$ - $C_6$  алкила и аралкила;

$R_x$  выбран из группы, состоящей из саркозинамида, гидроксила, нуклеотида, проникающей в клетку части и пиперазина;

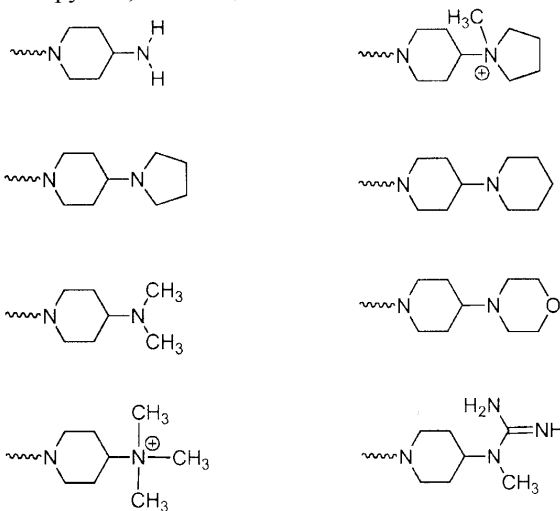
$R_y$  выбран из группы, состоящей из водорода,  $C_1$ - $C_6$  алкила, нуклеотида, проникающей в клетку части, аминокислоты, формамидинильной группы и  $C_1$ - $C_6$  ацила; и

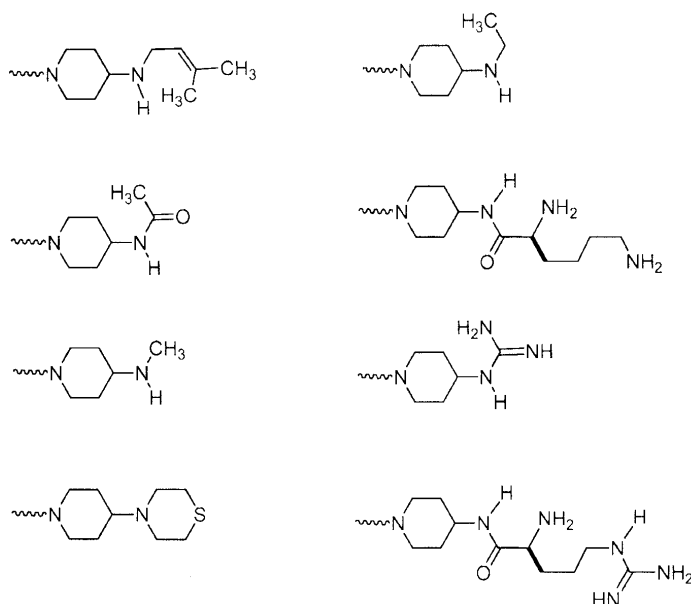
$R_z$  выбран из группы, состоящей из электронной пары, водорода,  $C_1$ - $C_6$  алкила и  $C_1$ - $C_6$  ацила, или их фармацевтически приемлемых солей.

$Nu$  может быть выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, тимина, урацила, цитозина и гипоксантина. Более предпочтительно  $Nu$  представляет собой тимин или урацил.

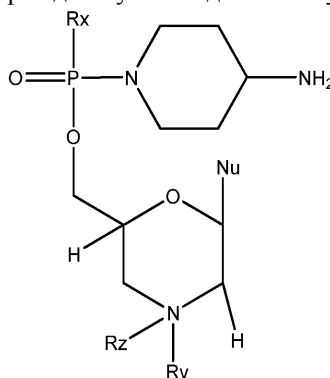
Приблизительно 90-50% групп  $R_1$  представляют собой диметиламино (т.е.  $R_1'$ ). Более предпочтительно, 90-50% групп  $R_1$  представляют собой диметиламино. Наиболее предпочтительно приблизительно 66% групп  $R_1$  представляют собой диметиламино.

$R_1''$  может быть выбран из группы, состоящей из





Предпочтительно, по меньшей мере один нуклеотид в олигонуклеотиде имеет формулу



где Rx, Ry, Rz и Nu являются такими, как указано выше. Наиболее предпочтительно, Nu представляет собой тимин или урацил.

Хотя тимин (Т) является предпочтительной образующей пару частью (Nu или Pi), содержащей химические модификации, описанные выше, любую субъединицу-основание, известную специалисту в данной области, можно использовать в качестве образующей пару части.

#### В. Пептидные переносчики.

Антисмысловые олигонуклеотиды по изобретению могут включать олигонуклеотидную часть, конъюгированную с СРР, предпочтительно аргинин-богатой пептидной транспортирующей частью, эффективной для усиления транспорта соединения в клетки. Транспортная часть предпочтительно связана с концом олигомера, как показано, например, на фиг. 1В и 1С. Пептиды обладают способностью индуцировать проникновение в 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% клеток данной популяции клеточной культуры, включая все целые числа между ними, и они позволяют перемещение макромолекул в множество тканей *in vivo* при системном введении. В одном варианте осуществления проникновения в клетку пептид может представлять собой аргинин-богатый пептидный переносчик. В другом варианте осуществления проникающий в клетку пептид может представлять собой пенетратин или пептид Tat. Эти пептиды хорошо известны в данной области и описаны, например, в публикации США № 2010-0016215 А1, включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Особенно предпочтительный подход для конъюгации пептидов с антисмысловыми олигонуклеотидами может быть найден в публикации РСТ WO 2012/150960, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В предпочтительном варианте осуществления пептида, конъюгированного с олигонуклеотидом по настоящему изобретению, используется глицин в качестве линкера между СРР и антисмысловым олигонуклеотидом. Например, предпочтительный пептид, конъюгированный с РМО, состоит из R<sub>6</sub>-G-РМО.

Было показано, что транспортирующие части, как описано выше, значительно повышают проникновение в клетку связанных олигомеров относительно захвата олигомера в отсутствие связанной транспортирующей части. Захват предпочтительно повышается по меньшей мере в десять раз и более предпочтительно в двадцать раз относительно неконъюгированного соединения.

Использование аргинин-богатых пептидных переносчиков (т.е. проникающих в клетку пептидов) является особенно пригодным для применения на практике настоящего изобретения. Было показано, что

определенные пептидные переносчики являются высокоэффективными в отношении доставки антисмысловых соединений в первичные клетки, включая мышечные клетки (Marshall, Oda et al. 2007; Jearawirapaisarn, Moulton et al. 2008; Wu, Moulton et al. 2008). Более того, по сравнению с другими известными пептидными переносчиками, такими как пенетратин и пептид Tat, пептидные переносчики, описанные в настоящем описании, когда они конъюгированы с антисмысловым РМО, демонстрируют увеличенную способность изменять сплайсинг транскриптов нескольких генов (Marshall, Oda et al. 2007). Предпочтительные варианты осуществления конъюгатов морфолино-пептидный переносчик описаны в WO 2012/150960, включенной в настоящее описание в полном объеме.

Иллюстративные пептидные переносчики, не включающие линкеры, приведены ниже в табл. 1.

Таблица 1. Иллюстративные пептидные переносчики

| Название<br>(Обозначение)                    | Последовательность        | SEQ ID<br>NO <sup>a</sup> |
|----------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| rTAT                                         | RRRQRRKKR                 | 24                        |
| Tat                                          | RKKRRQRRR                 | 25                        |
| R <sub>9</sub> F <sub>2</sub>                | RRRRRRRRRFF               | 26                        |
| R <sub>5</sub> F <sub>2</sub> R <sub>4</sub> | RRRRRFFRRRR               | 27                        |
| R <sub>4</sub>                               | RRRR                      | 28                        |
| R <sub>5</sub>                               | RRRRR                     | 29                        |
| R <sub>6</sub>                               | RRRRRR                    | 30                        |
| R <sub>7</sub>                               | RRRRRRR                   | 31                        |
| R <sub>8</sub>                               | RRRRRRRR                  | 32                        |
| R <sub>9</sub>                               | RRRRRRRRR                 | 33                        |
| (RX) <sub>8</sub>                            | RXRXRXRXRXRXRX            | 34                        |
| (RAhxR) <sub>4</sub> ; (P007)                | RAhxRRAhxRRAhxRRAhxR      | 35                        |
| (RAhxR) <sub>5</sub> ; (CP04057)             | RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxR | 36                        |
| (RAhxRRBR) <sub>2</sub> ;<br>(CP06062)       | RAhxRRBRRAhxRRBR          | 37                        |
| (RAR) <sub>4</sub> F <sub>2</sub>            | RARRARRARRARFF            | 38                        |
| (RGR) <sub>4</sub> F <sub>2</sub>            | RGRRGRRGRGRFF             | 39                        |

Последовательности, которым присвоены SEQ ID NO, не включают связывающую часть (например, C, G, P, Ahx, B, AhxB, где Ahx и B относятся к 6-аминогексановой кислоте и β-аланину соответственно).

С. Экспрессирующие векторы.

В одном варианте осуществления изобретение относится к экспрессирующим векторам для экспрессии нацеленных на дистрофин последовательностей, описанных в настоящем описании, в клетках. Векторные системы доставки способны экспрессировать олигомерные нацеленные на дистрофин последовательности по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления такие векторы экспрессируют полинуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 10 последовательно расположенных нуклеотидов одной или нескольких из SEQ ID NO: 1-12, 46 и 47. В другом варианте осуществления такие векторы экспрессируют полинуклеотидную последовательность, содержащую одну или несколько из SEQ ID NO: 1-12, 46 и 47. Экспрессирующие векторы, пригодные для доставки генов, известны в данной области. Такие экспрессирующие векторы могут быть модифицированы для экспрессии нацеленных на дистрофин последовательностей, описанных в настоящем описании. Иллюстративные экспрессирующие векторы включают полинуклеотидные молекулы, предпочтительно молекулы ДНК, которые происходят, например, из плазмиды, бактериофага, дрожжей или вируса (например, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус и т.д.), в которые может быть встроен или клонирован полинуклеотид. Вектор предпочтительно содержит один или несколько уникальных участков рестрикции и может быть способен к автономной репликации в определенной клетке-хозяине, включающей клетку-мишень или ткань-мишень, или клетку предшественника или ее ткань, или может быть способен встраиваться в геном определенного хозяина, так чтобы клонированная последовательность была воспроизводимой. Таким образом, вектор может представлять собой автономно реплицирующийся вектор, т.е. вектор, который существует в качестве внехромосомной структуры, репликация которой не зависит от репликации хромосомы, например линейную или замкнутую плазмиду, внехромосомный элемент, мини-хромосому или искусственную хромосому. Вектор может содержать любые средства для обеспечения саморепликации. Альтернативно вектор может представлять собой вектор, который при введении в клет-

ку-хозяина встраивается в геном и реплицируется вместе с хромосомой(ами), в которую он встроился.

В одном варианте осуществления экспрессирующие векторы включают тканеспецифический промотор, например специфический для мышц промотор и/или энхансер, который усиливает экспрессию олигомерных нацеленных на дистрофин последовательностей, описанных в настоящем описании, в представляющих интерес конкретных клетках или тканях (например, в мышце). Промоторные последовательности и экспрессирующие векторы, пригодные для экспрессии в мышечных клетках, включают, например, последовательности, описанные в US 2011/0212529, полное содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки. Иллюстративные специфические для мышц промоторы включают промотор десмина, промотор креатинкиназы мышц (МСК), промотор Pitx3, промотор скелетного альфа-актина, или промотор тропонина I. Применение специфических для мышц промоторов дополнительно описано, например, в Talbot et al., *Molecular Therapy* (2010), 18(3): 601-608; Wang et al., *Gene Therapy* (2008), 15(22): 1489-99; и Coulon et al., *Journal of Biological Chemistry* (2007), 282(45): 33192-33200.

### III. Составы и способы введения.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к составам или композициям, пригодным для терапевтической доставки антисмысловых олигомеров, как описано в настоящем описании. Таким образом, в определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтически приемлемым композициям, которые содержат терапевтически-эффективное количество одного или нескольких олигомеров, описанных в настоящем описании, составленных вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями (добавками) и/или разбавителями. Хотя является возможным введение олигомера по настоящему изобретению отдельно, предпочтительным является введение соединения в качестве фармацевтического состава (композиции).

Способы доставки молекул нуклеиновой кислоты описаны, например, в Akhtar et al., 1992, *Trends Cell Bio.*, 2:139; и *Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics*, ed. Akhtar; Sullivan et al., PCT WO 94/02595. Эти и другие протоколы можно использовать для доставки практически любой молекулы нуклеиновой кислоты, в том числе выделенных олигомеров по настоящему изобретению.

Как подробно описано ниже, фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно специально составлять для введения в твердой или жидкой форме, включая композиции, адаптированные для следующих: (1) пероральное введение, например жидкие составы (водные или неводные растворы или суспензии), таблетки, например таблетки для буккального, сублингвального и системного всасывания, болусы, порошки, гранулы, пасты для нанесения на язык; (2) парентеральное введение, например путем подкожной, внутримышечной, внутривенной или эпидуральной инъекции в качестве, например, стерильного раствора или суспензии, или состава с замедленным высвобождением; (3) местное применение, например в качестве крема, мази или пластыря с контролируемым высвобождением или спрея, наносимого на кожу; (4) внутривагинально или внутриректально, например в качестве пессария, крема или пены; (5) сублингвально; (6) в глаз; (7) чрескожным путем; или (8) назальным путем.

Выражение "фармацевтически приемлемый" используют в рамках настоящего изобретения для обозначения соединений, материалов, композиций и/или дозированных форм, которые по мнению медицинского специалиста пригодны для применения в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергического ответа или другой проблемы или осложнения, с соответствием с приемлемым соотношением польза/риск.

Выражение "фармацевтически приемлемый носитель", как используют в рамках изобретения, означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, эксципиент, производственную добавку (например, смазывающее вещество, тальк, стеарат магния, кальция или цинка или стеариновая кислота), или растворимый инкапсулирующий материал, вовлеченный в перенос или транспорт рассматриваемого соединения из одного органа или части тела в другой орган или часть тела. Каждый носитель должен быть "приемлемым" с точки зрения совместимости с другими ингредиентами состава и не вредоносным для пациента.

Некоторые примеры материалов, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают: (1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; (2) крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; (3) целлюлозу и ее производные, такие как натрий карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; (4) порошковый трагакант; (5) солод; (6) желатин; (7) тальк; (8) эксципиенты, такие как масло какао и воски для суппозитория; (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; (10) гликоли, такие как пропиленгликоль; (11) полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; (12) сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; (13) агар; (14) буферные средства, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновую кислоту; (16) не содержащую пирогенов воду; (17) изотонический солевой раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) pH-буферные растворы; (21) полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды; и (22) другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах.

Дополнительные неограничивающие примеры средств, пригодных для составления с антисмысловыми олигомерами по настоящему изобретению, включают: конъюгированные с PEG нуклеиновые кислоты, конъюгированные с фосфолипидом нуклеиновые кислоты, нуклеиновые кислоты, содержащие

липофильные части, фосфоротиоаты, ингибиторы Р-гликопротеина (такие как Pluronic P85), которые усиливают проникновение лекарственных средств в различные ткани; биodeградируемые полимеры, такие как микросферы из сополимера DL-лактола и гликолида для доставки с замедленным высвобождением после имплантации (Emerich D.F. et al., 1999, *Cell Transplant*, 8, 47-58) Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.; и нагруженные наночастицы, такие как наночастицы, изготовленные из полибутилцианоакрилата, которые могут доставлять лекарственные средства через гематоэнцефалический барьер и могут изменять механизмы нейронального захвата (*Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 23, 941-949, 1999).

Также изобретение относится к применению композиции, содержащей липосомы с модифицированной поверхностью, содержащие липиды с поли(этиленгликолем) (PEG-модифицированные, разветвленные и неразветвленные или их комбинации, или длительно циркулирующие липосомы или малоазметные липосомы). Олигомеры по изобретению также могут содержать ковалентно присоединенные молекулы PEG различной молекулярной массы. Эти составы обеспечивают способ увеличения накопления лекарственных средств в тканях-мишенях. Этот класс носителей лекарственных средств является устойчивым к опсонизации и элиминации мононуклеарной фагоцитарной системой (MPS или RES), тем самым, обеспечивая более длительное время в кровотоке и увеличенную экспозицию в тканях для инкапсулированного лекарственного средства (Lasic et al. *Chem. Rev.* 1995, 95, 2601-2627; Ishiwa et al., *Chem. Pharm. Bull.* 1995, 43, 1005-1011). Было показано, что такие липосомы накапливаются селективно в опухолях, предположительно путем экстравазации и захвата в неоваскуляризованные ткани-мишени (Lasic et al., *Science* 1995, 267, 1275-1276; Oku et al., 1995, *Biochim. Biophys. Acta*, 1238, 86-90). Длительно циркулирующие липосомы улучшают фармакокинетику и фармакодинамику ДНК и РНК, в частности, по сравнению с общепринятыми катионными липосомами, о которых известно, что они накапливаются в тканях MPS (Liu et al., *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 24864-24870; Choi et al., международная публикация РСТ № WO 96/10391; Ansell et al., международная публикация РСТ № WO 96/10390; Holland et al., международная публикация РСТ № WO 96/10392). Длительно циркулирующие липосомы, вероятно, будут защищать лекарственные средства от деградации нуклеазами в большей степени по сравнению с катионными липосомами, исходя из их способности избегать накопления в метаболически агрессивных тканях MPS, таких как печень и селезенка.

В следующем варианте осуществления настоящее изобретение относится к композициям олигомеров, полученным для доставки, как описано в патентах США № 6692911, 7163695 и 7070807. В этом отношении, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится олигомеру по настоящему изобретению в композиции, содержащей сополимеры лизина и гистидина (НК) (как описано в патентах США № 7163695, 7070807 и 6692911) либо отдельно, либо в комбинации с PEG (например, разветвленный или неразветвленный PEG или смесь обоих из них), в комбинации с PEG и нацеливающей частью, или любой из указанных выше компонентов в комбинации со сшивающим средством. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится антисмысловым олигомерам в композициях, содержащих модифицированный глюконовой кислотой полигистидин или глюконилированный полигистидин/трансферрин-полилизин. Специалисту в данной области также будет понятно, что в композиции могут быть замещены аминокислоты со свойствами, сходными с His и Lys.

Определенные варианты осуществления олигомеров, описанных в настоящем описании, могут содержать основную функциональную группу, такую как амино или алкиламино, и, таким образом, способны образовывать фармацевтически приемлемые соли с фармацевтически приемлемыми кислотами. Термин "фармацевтически приемлемые соли" в этом отношении относится к относительно нетоксичным неорганическим и органическим кислотно-аддитивным солям соединений по настоящему изобретению. Эти соли можно получать *in situ* в процессе изготовления носителя для введения или дозированной формы, или путем отдельной реакции очищенного соединения по изобретению в форме свободного основания с подходящей органической или неорганической кислотой, и выделения соли, полученной таким образом, при последующей очистке. Репрезентативные соли включают гидробромид, гидрохлорид, сульфат, бисульфат, фосфат, нитрат, ацетат, валерат, олеат, пальмитат, стеарат, лаурат, бензоат, лактат, фосфат, тозилат, цитрат, малеат, фумарат, сукцинат, тартрат, нафтиллат, мезилат, глюкогептаноат, лактобионат и лаурилсульфонат и т.п. (см., например, Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", *J. Pharm. Sci.* 66:1-19).

Фармацевтически приемлемые соли рассматриваемых олигомеров включают общепринятые нетоксичные соли соединений или их четвертичные соли аммония, например из нетоксичных органических или неорганических кислот. Например, такие общепринятые нетоксичные соли включают соли, образованные из неорганических кислот, таких как хлористоводородная, бромистоводородная, серная, сульфаминовая, фосфорная, азотная и т.п.; и соли, полученные из органических кислот, таких как уксусная, пропионовая, янтарная, гликолевая, стеариновая, молочная, яблочная, виннокаменная, лимонная, аскорбиновая, пальмитиновая, малеиновая, гидроксималеиновая, фенилуксусная, глутаминовая, бензойная, салициловая, сульфаниловая, 2-ацетоксибензойная, фумаровая, толуолсульфоновая, метансульфоновая, этандисульфоновая, щавелевая, изотионовая и т.п.

В определенных вариантах осуществления олигомеры по настоящему изобретению могут содержать одну или несколько кислотных функциональных групп и, таким образом, способны образовывать

фармацевтически приемлемые соли с фармацевтически приемлемыми основаниями. Термин "фармацевтически приемлемые соли" в этих случаях относится к относительно нетоксичным, неорганическим и органическим основно-аддитивным солям соединений по настоящему изобретению. Эти соли можно аналогичным образом получать *in situ* в процессе изготовления носителя для введения или дозированной формы, или путем отдельной реакции очищенного соединения в форме свободной кислоты с подходящим основанием, таким как гидроксид, карбонат или бикарбонат, с фармацевтически приемлемым катионом металла, с аммиаком, или с фармацевтически приемлемым органическим первичным, вторичным или третичным амином. Репрезентативные соли щелочных или щелочно-земельных металлов включают соли лития, натрия, калия, кальция, магния и алюминия и т.п. Репрезентативные органические амины, пригодные для образования основно-аддитивных солей, включают этиламин, диэтиламин, этилендиамин, этаноламин, диэтанолламин, пиперазин и т.п. (см., например, Berge et al., выше).

Также в композициях могут присутствовать смачивающие вещества, эмульгаторы и смазывающие вещества, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также красители, разделительные средства, покровные вещества, подсластители, вкусовые добавки и отдушки, консерванты и антиоксиданты.

Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают: (1) растворимые в воде антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.; (2) растворимые в маслах антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (БНА), бутилированный гидрокситолуол (БНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и (3) металл-хелатирующие агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, виннокаменная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Составы по настоящему изобретению включают составы, пригодные для перорального, назального, местного (включая буккальное и сублингвальное), ректального, вагинального и/или парентерального введения. Удобно, чтобы составы присутствовали в единичной дозированной форме, и их можно получать любыми способами, хорошо известными в области фармацевтики. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом носителя для получения единичной дозированной формы, варьирует в зависимости от подвергаемого лечению хозяина, конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом носителя для получения единичной дозированной формы, обычно представляет собой соединение, которое вызывает терапевтический эффект. Как правило, из 100% это количество находится в диапазоне от приблизительно 0,1% до приблизительно 99% активного ингредиента, предпочтительно от приблизительно 5% до приблизительно 70%, наиболее предпочтительно от приблизительно 10% до приблизительно 30%.

В определенных вариантах осуществления состав по настоящему изобретению содержит эксципиент, выбранный из циклодекстринов, целлюлоз, липосом, формирующих мицеллы средств, например желчных кислот, и полимерных носителей, например полиэфиров и полиангидридов; и олигомера по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления упомянутый выше состав обеспечивает перорально биодоступный олигомер по настоящему изобретению.

Способы получения этих составов или композиций включают стадию объединения олигомера по настоящему изобретению и носителя и, необязательно, одного или нескольких вспомогательных ингредиентов. Как правило, составы получают путем единообразного и равномерного объединения соединения по настоящему изобретению с жидкими носителями или тонкоизмельченными твердыми носителями, или и с теми, и с другими, а затем, если необходимо, придания продукту формы.

Составы по изобретению, пригодные для перорального введения, могут иметь форму капсул, крахмальных капсул, пилюль, таблеток, лепешек (с использованием ароматизированной основы, обычно сахарозы и гумиарабика или трагаканта), порошков, гранул, или могут быть в форме раствора или суспензии в водной или неводной жидкости, или в форме эмульсии типа "масло в воде" или "вода в масле", или в форме эликсира или сиропа, или пастилок (с использованием инертной основы, такой как желатин и глицерин, или сахароза и гуммиарабик) и/или в форме средств для полоскания рта и т.п., каждая из которых содержит заданное количество соединения по изобретению в качестве активного ингредиента. Олигомер по настоящему изобретению также можно вводить в качестве болуса, электуария или пасты.

В твердых дозированных формах для перорального введения (капсулы, таблетки, пилюли, драже, порошки, гранулы, таблетки для рассасывания и т.п.), активный ингредиент может быть смешан с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, такими как цитрат натрия или дикальцийфосфат, и/или любым из следующих: (1) наполнители или сухие разбавители, такие как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремниевая кислота; (2) связующие вещества, например, такие как карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и/или гуммиарабик; (3) увлажнители, такие как глицерин; (4) дезинтегрирующие вещества, такие как агар-агар, карбонат кальция, картофельный или маниоковый крахмал, альгиновая кислота, определенные силикаты и карбонат натрия; (5) удерживающие раствор вещества, такие как парафин; (6) ускоряющие всасывание вещества, такие как четвертичные соединения аммония и поверхностно-активные вещества, такие как полоксамер и лаурилсульфат натрия; (7) смачивающие вещества, например, такие как цетиловый спирт, глицеринмоностеарат и неионные поверхностно-активные вещества; (8) абсорбенты, такие как каолин и бентонитовая глина; (9) смазывающие вещества, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые

полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия, стеарат цинка, стеарат натрия, стеариновая кислота и их смеси; (10) красители; и (11) средства для контролируемого высвобождения, такие как кроссповидон или этилцеллюлоза. В случае капсул, таблеток и пилюль, фармацевтические композиции также могут содержать буферные средства. Также в качестве наполнителей в мягких желатиновых капсулах и желатиновых капсулах с твердой оболочкой можно использовать твердые композиции сходного типа с использованием таких эксципиентов, как лактоза или молочные сахара, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и т.п.

Таблетку можно получать путем прессования или формования, необязательно с одним или несколькими вспомогательными ингредиентами. Прессованные таблетки можно получать с использованием связующего вещества (например, желатин или гидроксипропилметил целлюлоза), смазывающего вещества, инертного разбавителя, консерванта, дезинтегрирующего средства (например, натрия крахмала гликолят или сшитая натрий карбоксиметилцеллюлоза), поверхностно-активного вещества или диспергирующего средства. Формованные таблетки можно получать путем формования в подходящем устройстве смеси порошкового соединения, увлажненного инертным жидким разбавителем.

Таблетки и другие твердые дозированные формы фармацевтических композиций по настоящему изобретению, такие как драже, капсулы, пилюли и гранулы, необязательно можно изготавливать с бороздками или получать с покрытиями и оболочками, такие кишечнорастворимые покрытия и другие покрытия хорошо известны в области составления фармацевтических препаратов. Также их можно составлять так, чтобы обеспечить медленное или контролируемое высвобождение активного ингредиента в них с использованием, например, гидроксипропилметилцеллюлозы в различных соотношениях для обеспечения желаемого профиля высвобождения, других полимерных матриц, липосом и/или микросфер. Их можно составлять для быстрого высвобождения, например, в лиофилизированной форме. Также их можно стерилизовать, например, фильтрацией через удерживающий бактерии фильтр или включением стерилизующих агентов в форме стерильных твердых композиций, которые можно растворять в стерильной воде или некоторых других стерильных средах для инъекций непосредственно перед применением. Эти композиции также необязательно могут содержать замутнители и могут иметь такой состав, чтобы высвобождать активный ингредиент(ы) только или предпочтительно в определенной части желудочно-кишечного тракта, необязательно, замедленным образом. Примеры заливочных композиций, которые можно использовать, включают полимерные вещества и воски. Активный ингредиент также может иметь микроинкапсулированную форму, если приемлемо, с одним или несколькими описанными выше эксципиентами.

Жидкие дозированные формы для перорального введения соединений по изобретению включают фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнение к активному ингредиенту жидкие дозированные формы могут содержать инертные разбавители, широко используемые в данной области, например, такие как вода или другие растворители, солюбилизующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное масло, масло зародышей, оливковое, касторовое и кунжутное масло), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот и сорбитана, и их смеси.

Помимо инертных разбавителей, пероральные композиции также могут включать адъюванты, такие как смачивающие вещества, эмульгирующие и суспендирующие вещества, подсластители, вкусовые добавки, красители, отдушки и консерванты.

Суспензии, в дополнение к активным соединениям, могут содержать суспендирующие вещества, например, такие как этоксилированные изостеариловые спирты, полиоксиэтилен сорбит и сложные эфиры сорбитана, микрокристаллическая целлюлоза, метатгидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант и их смеси.

Составы для ректального или вагинального введения могут присутствовать в качестве суппозитория, который можно получать путем смешения одного или нескольких соединений по изобретению с одним или несколькими пригодными не вызывающими раздражения эксципиентами или носителями, содержащими, например, масло какао, полиэтилен гликоль, воск суппозитория или салицилат, и который является твердым при комнатной температуре, но жидким при температуре тела и, таким образом, плавится в прямой кишке или вагинальной полости и высвобождает активное соединение.

Составы и дозированные формы для местного и чрескожного введения олигомера, описанного в настоящем изобретении, включают порошки, спреи, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластыри и ингалируемые средства. Активные олигомеры можно смешивать в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми консервантами, буферами или пропеллентами, которые могут потребоваться. Мази, пасты, кремы и гели могут содержать, в дополнение к активному соединению по настоящему изобретению, эксципиенты, такие как животные и растительные жиры, масла, воски, парафины, крахмал, трагакант, производные целлюлозы, полиэтиленгликоли, силиконы, бентониты, кремниевая кислота, тальк и оксид цинка или их смеси.

Порошки и спреи могут содержать, в дополнение к олигомеру по настоящему изобретению, эксци-

пиенты, такие как лактоза, тальк, кремниевая кислота, гидроксид алюминия, силикаты кальция и полиамидный порошок, или смеси этих веществ. Кроме того, спреи могут содержать стандартные пропелленты, такие как хлорфторуглеводороды и летучие незамещенные углеводороды, такие как бутан и пропан.

Трансдермальные пластыри имеют дополнительное преимущество обеспечения контролируемой доставки олигомера по настоящему изобретению в организм. Такие дозированные формы можно получать путем растворения или диспергирования олигомера в надлежащей среде. Также можно использовать усилители всасывания для увеличения потока средства через кожу. Скорость такого потока можно контролировать либо путем предоставления контролирующей скорости мембраны, либо путем диспергирования средства в полимерной матрице или геле, среди других способов, известных в данной области.

Фармацевтические композиции, пригодные для парентерального введения, могут содержать один или несколько олигомеров по изобретению в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или неводными растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями, или стерильными порошками, которые можно восстанавливать в стерильные инъекционные растворы или дисперсии непосредственно перед применением, которые могут содержать сахара, спирты, антиоксиданты, буферы, бактериостатические средства, растворимые вещества, которые обеспечивают изотоничность состава с кровью предполагаемого реципиента, или суспендирующие средства или загустители. Примеры пригодных водных и неводных носителей, которые можно использовать в фармацевтических композициях по изобретению, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.), и их пригодные смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и пригодные для инъекций органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, с использованием материалов покрытия, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий, и с использованием поверхностно-активных веществ.

Эти композиции также могут содержать адъюванты, такие как консерванты, смачивающие вещества, эмульгаторы и диспергирующие средства. Предупреждение действия микроорганизмов на рассматриваемые олигомеры можно обеспечивать путем включения различных антибактериальных и противогрибковых средств, например парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и т.п. Также может быть желательным включение в композиции обеспечивающих изотоничность средств, таких как сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, длительного всасывания инъекционной фармацевтической формы можно достигать путем включения средств, которые замедляют всасывание, таких как моностеарат алюминия и желатин.

В некоторых случаях для продления эффекта лекарственного средства является желательным замедление всасывания лекарственного средства после подкожной или внутримышечной инъекции. Этого можно достигать с использованием жидкой суспензии кристаллического или аморфного материала, имеющего низкую растворимость в воде, среди других способов, известных в данной области. В этом случае скорость всасывания лекарственного средства зависит от его скорости растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера кристаллов и от кристаллической формы. Альтернативно замедленного всасывания вводимого парентерально лекарственного средства достигают путем растворения или суспендирования лекарственного средства в масляном носителе.

Инъекционные депо-формы можно получать путем формирования микроинкапсулированных матриц рассматриваемых олигомеров в биodeградируемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от соотношения олигомера и полимера и природы конкретного используемого полимера можно контролировать скорость высвобождения олигомера. Примеры других биodeградируемых полимеров включают сложные поли(ортоэфиры) и поли(ангидриды). Также инъекционные депо-составы можно получать путем заключения лекарственного средства в липосомы или микроэмульсии, которые совместимы с тканями организма.

Когда олигомеры по настоящему изобретению вводят в качестве фармацевтических составов человеку и животным, их можно вводить непосредственно или в качестве фармацевтической композиции, содержащей, например, от 0,1 до 99% (более предпочтительно, от 10 до 30%) активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Как отмечалось выше, составы или препараты по настоящему изобретению можно вводить перорально, парентерально, местным путем или ректально. Как правило, их вводят в формах, пригодных для каждого пути введения. Например, их вводят в форме таблеток или капсул, путем инъекции, ингаляции, глазного лосьона, мази, суппозитория и т.д., путем инъекции, инфузии или ингаляции; местным путем с использованием лосьона или мази; и ректальным путем с использованием суппозитория.

Выражения "парентеральное введение" и "вводимый парентерально", как используют в рамках изобретения, означает пути введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно осуществляемые посредством инъекции, и они включают, но не ограничиваются ими, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсульную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, подкапсулярную, субарахноидальную, внутрипозвоночную и внутригрудинную инъекцию и инфузию.

Выражения "системное введение", "вводимый системно", "периферическое введение" и "вводимый периферически", как используют в рамках изобретения, означают введение соединения, лекарственного средства или другого материала путем, отличным от прямого введения в центральную нервную систему, так чтобы они проникали в систему пациента и, таким образом, подвергались метаболизму и другим подобным процессам, например подкожное введение.

Независимо от выбранного пути введения олигомеры по настоящему изобретению, которые можно использовать в подходящей гидратированной форме, и/или фармацевтические композиции по настоящему изобретению, можно составлять в виде фармацевтически приемлемых дозированных форм общепринятыми способами, известными специалистам в данной области. Фактические уровни доз активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению можно варьировать, чтобы получить количество активного ингредиента, которое является эффективным для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, без неприемлемой токсичности для пациента.

Выбранный уровень дозы зависит от различных факторов, включающих активность конкретного используемого олигомера по настоящему изобретению, или его сложного эфира, соли или амида, пути введения, времени введения, скорости экскреции или метаболизма конкретного используемого олигомера, скорости и степени всасывания, длительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, используемых в комбинации с конкретным используемым олигомером, возраста, пола, массы тела, состояния, общего состояния здоровья и предшествующего медицинского анамнеза пациента, подвергаемого лечению, и сходных факторов, хорошо известных в области медицины.

Врач или ветеринар средней квалификации в данной области может без труда определить и назначить требуемое эффективное количество фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начать с доз соединений по изобретению, используемых в фармацевтической композиции, на уровнях, более низких, чем требуется для достижения желаемого терапевтического эффекта, и может постепенно увеличивать дозировки до тех пор, пока не будет достигнут желаемый эффект. Как правило, пригодная суточная доза соединения по изобретению представляет собой количество соединения, которое является наиболее низкой дозой, эффективной для возникновения терапевтического эффекта. Такая эффективная доза, как правило, зависит от факторов, описанных выше. Как правило, пероральные, внутривенные, интрацеребровентрикулярные и подкожные дозы соединений по настоящему изобретению для пациента, когда их используют для указанных эффектов, находятся в диапазоне от приблизительно 0,0001 до приблизительно 100 мг на килограмм массы тела в сутки.

Если желательно, эффективную суточную дозу активного соединения можно вводить в качестве двух, трех, четырех, пяти, шести или более субдоз, вводимых отдельно с соответствующими интервалами на протяжении суток, необязательно, в единичных дозированных формах. В определенных ситуациях дозирование осуществляют путем одного введения в сутки. В определенных вариантах осуществления дозирование представляет собой одно или несколько введений каждые 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 суток, или каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 недель, или каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 месяцев, при необходимости, для поддержания желаемой экспрессии функционального белка дистрофина.

Молекулы нуклеиновых кислот можно вводить в клетки различными способами, известными специалистам в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, инкапсулирование в липосомы, ионтофорез или включение в другие носители, такие как гидрогели, циклодекстрины, биodeградируемые нанокapsулы, и биоадгезивные микросферы, как описано в настоящем описании и как известно в данной области. В определенных вариантах осуществления можно использовать технологию микроэмульгирования для повышения биодоступности липофильных (нерастворимых в воде) фармацевтических средств. Примеры включают триметрин (Dordunoo S.K. et al., *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 17(12), 1685-1713, 1991 и REV 5901 (Sheen P.C. et al., *J. Pharm. Sci.* 80(7), 712-714, 1991). Среди других преимуществ микроэмульгирование обеспечивает усиленную биодоступность путем предпочтительного направления всасывания в лимфатическую систему вместо системы кровообращения, тем самым, обходя печень и предупреждая разрушение соединений в гепатобилиарной циркуляции.

В одном аспекте изобретения составы содержат мицеллы, образованные из олигомера, описанного в настоящем описании, и по меньшей мере одного амфифильного носителя, причем эти мицеллы имеют средний диаметр менее 100 нм. Более предпочтительные варианты осуществления относятся к мицеллам, имеющим средний диаметр менее чем приблизительно 50 нм, и еще более предпочтительные варианты осуществления относятся к мицеллам, имеющим средний диаметр менее чем приблизительно 30 нм, или даже менее чем приблизительно 20 нм.

Хотя предусматриваются все подходящие амфифильные носители, предпочтительными в рамках настоящего изобретения носителями являются носители, которые имеют статус признанных полностью безвредными (GRAS) и которые могут как солюбилизировать соединение по настоящему изобретению, так и микроэмульгировать его на более поздней стадии, когда раствор вступает в контакт с комплексной водной фазой (такой как встречается в желудочно-кишечном тракте). Обычно, амфипатические ингредиенты, которые удовлетворяют этим требованиям, имеют величины HLB (гидрофильно-липофильный баланс) 2-20, и их структуры содержат неразветвленные алифатические радикалы в диапазоне от C-6 до C-

20. Примерами являются полиэтилен-гликолизированные жирные глицериды и полиэтиленгликоли.

Примеры амфифильных носителей включают насыщенные и мононенасыщенные полиэтиленгликолированные глицериды жирных кислот, такие как насыщенные и мононенасыщенные полиэтиленгликолированные глицериды жирных кислот, получаемые из полностью или частично гидрогенизированных различных растительных масел. Такие масла преимущественно могут состоять из три-, ди- и моноглицеридов жирных кислот и сложных ди- и моноэфиров полиэтиленгликоля и соответствующих жирных кислот, причем особенно предпочтительная композиция жирных кислот включает каприновую кислоту 4-10, каприновую кислоту 3-9, лауриновую кислоту 40-50, миристиновую кислоту 14-24, пальмитиновую кислоту 4-14 и стеариновую кислоту 5-15%. Другой пригодный класс амфифильных носителей включает частично этерифицированный сорбитан и/или сорбит с насыщенными или мононенасыщенными жирными кислотами (серия SPAN) или соответствующими этоксилированными аналогами (серия TWEEN).

Особенно пригодными могут быть коммерчески доступные амфифильные носители, в том числе серии Gelucire, Labrafil, Labrasol или Lauroglycol (все производимые и распространяемые Gattefosse Corporation, Saint Priest, France), PEG-моноолеат, PEG-диолеат, PEG-монолаурат и дилаурат, лецитин, полисорбат 80 и т.д. (производимые и распространяемые рядом компаний в США и по всему миру).

В определенных вариантах осуществления доставка может осуществляться с использованием липосом, нанокapsул, микрочастиц, микросфер, липидных частиц, везикул и т.п., для введения композиций по изобретению в соответствующие клетки-хозяева. В частности, композиции по настоящему изобретению можно составлять для доставки инкапсулированными в любой из липидной частицы, липосомы, везикулы, наносферы, наночастицы или сходных с ними. Составление и применение таких систем носителей для доставки можно осуществлять с использованием известных и общепринятых способов.

Гидрофильные полимеры, пригодные для применения в рамках настоящего изобретения, представляют собой полимеры, которые хорошо растворимы в воде, могут ковалентно связываться с образующим везикулу липидом, и которые являются переносимыми *in vivo* без токсичных эффектов (т.е. являются биологически совместимыми). Пригодные полимеры включают полиэтиленгликоль (PEG), полимолочную кислоту (также называемую полилактидом), полигликолевую кислоту (также называемую полигликолидом), сополимер полимолочной-полигликолевой кислоты и поливинилового спирта. В определенных вариантах осуществления полимеры имеют молекулярную массу от приблизительно 100 или 120 Да вплоть до приблизительно 5000 или 10000 Да, или от приблизительно 300 Да до приблизительно 5000 Да. В других вариантах осуществления полимер представляет собой полиэтиленгликоль, имеющий молекулярную массу от приблизительно 100 до приблизительно 5000 Да, или имеющий молекулярную массу от приблизительно 300 до приблизительно 5000 Да. В определенных вариантах осуществления полимер представляет собой полиэтиленгликоль массой 750 Да (PEG(750)). Полимеры также могут определяться количеством мономеров в нем; в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения используются полимеры по меньшей мере приблизительно из трех мономеров, такие как полимеры PEG, состоящие из трех мономеров (приблизительно 150 Да).

Другие гидрофильные полимеры, которые могут быть пригодными для применения в рамках настоящего изобретения, включают поливинилпирролидон, полиметоксазолин, полиэтилоксазолин, полигидроксипропилметакриламид, полиметакриламид, полидиметилакриламид и дериватизированные соединения целлюлозы, такие как гидроксиметилцеллюлоза или гидроксипропилцеллюлоза.

В определенных вариантах осуществления состав по изобретению содержит биосовместимый полимер, выбранный из группы, состоящей из полиамидов, поликарбонатов, полиалкиленов, полимеров акриловых и метакриловых сложных эфиров, поливиниловых полимеров, полигликолидов, полисилоксанов, полиуретанов и их сополимеров, целлюлоз, полипропилена, полиэтиленов, полистирола, полимеров молочной кислоты и гликолевой кислоты, полиангидридов, сложных поли(орто)эфиров, поли(масляной кислоты), поли(валериановой кислоты), сополимера лактида и капролактона, полисахаридов, белков, полигалактуроновых кислот, полицианоакрилатов, и их смесей, комбинаций или сополимеров.

Циклодекстрины представляют собой циклические олигосахариды, состоящие из 6, 7 или 8 элементов глюкозы, обозначаемых греческими буквами  $\alpha$ ,  $\beta$  или  $\gamma$  соответственно. Элементы глюкозы связаны  $\alpha$ -1,4-гликозидными связями. Вследствие конформации кресла элементов сахаров, все вторичные гидроксильные группы (на C-2, C-3) располагаются на одной стороне кольца, в то время как все первичные гидроксильные группы на C-6 располагаются на другой стороне. В результате внешние поверхности являются гидрофильными, что делает циклодекстрины растворимыми в воде. Напротив, полости циклодекстринов являются гидрофобными, поскольку они образованы атомами водорода на атомах C-3 и C-5, и подобными простому эфиру атомами кислорода. Эти матрицы позволяют образование комплексов с различными относительно гидрофобными соединениями, включая, например, стероидные соединения, такие как 17 $\alpha$ -эстрадиол (см., например, van Uden et al. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 38:1-3-113 (1994)). Образование комплексов происходит путем ван-дер-ваальсовых взаимодействий и посредством образования водородных связей. Для общего обзора химии циклодекстринов, см. Wenz, Agnew. *Chem. Int. Ed. Engl.*, 33:803-822 (1994).

Физико-химические свойства производных циклодекстрина строго зависят от типа и степени замещения. Например, их растворимость в воде находится в диапазоне от нерастворимых (например, триацетил- $\beta$ -циклодекстрин) до растворимых на 147% (мас./об.) (G-2- $\beta$ -циклодекстрин). Кроме того, они являются растворимыми во многих органических растворителях. Свойства циклодекстринов обеспечивают контроль над растворимостью различных компонентов состава путем увеличения или снижения их растворимости.

Описаны многочисленные циклодекстрины и способы их получения. Например, Parmeter (I) et al. (патент США № 3453259) и Gramera et al. (патент США № 3459731) описали электронеутральные циклодекстрины. Другие производные включают циклодекстрины с катионными свойствами [Parmeter (II), патент США № 3453257], нерастворимые шитые циклодекстрины (Solms, патент США № 3420788) и циклодекстрины с анионными свойствами [Parmeter (III), патент США № 3426011]. Среди производных циклодекстрина с анионными свойствами к исходному циклодекстрину присоединяли карбоновые кислоты, фосфорные кислоты, фосфиновые кислоты, фосфоновые кислоты, фосфорные кислоты, тиофосфоновые кислоты, тиосульфоновые кислоты, и сульфоновые кислоты [см., Parmeter (III), выше]. Более того, производные циклодекстрина с сульфоалкиловым простым эфиром описаны Stella et al. (патент США № 5134127).

Липосомы состоят по меньшей мере из одной липидной бислоиной мембраны, в которую заключен водный внутренний компартмент. Липосомы могут характеризоваться типом мембраны и размером. Небольшие однослойные везикулы (SUV) имеют одну мембрану и, как правило, их диаметр находится в диапазоне от 0,02 до 0,05 мкм; большие однослойные везикулы (LUVS), как правило, превышают 0,05 мкм. Малослойные большие везикулы и многослойные везикулы имеют множество, обычно концентрических, слоев мембраны и, как правило, имеют размер более 0,1 мкм. Липосомы с несколькими неконцентрическими мембранами, т.е. несколько везикул меньшего размера, содержащихся в более крупной везикуле, называют мультивезикулярными везикулами.

Один аспект настоящего изобретения относится к составам, содержащим липосомы, содержащие олигомер по настоящему изобретению, где мембрана липосомы составлена для обеспечения липосомы с увеличенной вместимостью. Альтернативно или дополнительно, соединение по настоящему изобретению может содержаться в или адсорбироваться на бислои липосомы. Олигомер по настоящему изобретению может агрегироваться с липидным поверхностно-активным веществом и содержаться во внутреннем пространстве липосомы; в этих случаях мембрану липосомы составляют так, чтобы она была устойчивой к разрушающему действию агрегата активное вещество-поверхностно-активное вещество.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения, липидный бислой липосомы содержит липид, дериватизированный полиэтиленгликолем (PEG), так что цепи PEG проходят от внутренней поверхности липидного бислоя до внутреннего пространства, инкапсулированного в липосоме, и проходят от наружной стороны липидного бислоя в окружающую среду.

Активные вещества, содержащиеся в липосомах по настоящему изобретению, находятся в солюбилизированной форме. Агрегаты поверхностно-активного вещества и активного вещества (такие как эмульсии или мицеллы, содержащие представляющее интерес активное вещество), могут быть заключены во внутреннее пространство липосом в соответствии с настоящим изобретением. Поверхностно-активное вещество действует, диспергируя и солюбилизировывая активное вещество, и оно может быть выбрано из любого пригодного алифатического, циклоалифатического или ароматического поверхностно-активного вещества, включая, но не ограничиваясь ими, биосовместимые лизофосфатидилхолины (LPG) различной длины цепи (например, от приблизительно C14 до приблизительно C20). Дериватизированные полимером липиды, такие как PEG-липиды, также можно использовать для формирования мицелл, поскольку они действуют, ингибируя слияние мицелла/мембрана, и поскольку добавление полимера к молекулам поверхностно-активного вещества снижает СМС поверхностно-активного вещества и способствует образованию мицелл. Предпочтительными являются поверхностно-активные вещества с СМО в микромолярном диапазоне; для получения мицелл, заключенных в липосомы, по настоящему изобретению, можно использовать поверхностно-активные вещества с более высоким СМС.

Липосомы в соответствии с настоящим изобретением можно получать любым из множества способов, известных в данной области. См., например, патент США № 4235871; опубликованную заявку PCT WO 96/14057; New RRC, Liposomes: A practical approach, IRL Press, Oxford (1990), pages 33-104; basic DD, Liposomes from physics to applications, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1993. Например, липосомы по настоящему изобретению можно получать путем диффундирования липида, дериватизированного гидрофильным полимером, в предварительно сформированные липосомы, чтобы подвергнуть предварительно сформированные липосомы воздействию мицелл, состоящих из липидов с привитыми полимерами, при концентрациях липидов, соответствующих конечному молярному проценту дериватизированного липида, который является желательным в липосоме. Липосомы, содержащие гидрофильный полимер, также можно получать путем гомогенизации, гидратации липидных полей, или способов экстракции, которые известны в данной области.

В другой иллюстративной методике составления активного вещества сначала диспергируют путем обработки ультразвуком в лизофосфатидилхолине или другом поверхностно-активном веществе с низ-

ким СМС (включая липиды с пересаженным полимером), которое без труда солюбилизирует гидрофобные молекулы. Затем полученную мицеллярную суспензию активного вещества используют для регидратации высушенного липидного образца, который содержит подходящий молярный процент липида с привитым полимером, или холестерина. Затем суспензию липида и активного вещества формуют в липосомы с использованием способов экструзии, известных в данной области, и полученные липосомы отделяют от неинкапсулированного раствора стандартным разделением на колонке.

В одном аспекте настоящего изобретения липосомы получают так, чтобы они имели, по существу, гомогенный размер в выбранном диапазоне размеров. Один эффективный способ оптимизации размеров вовлекает экструзию водной суспензии липосом через серию поликарбонатных мембран, имеющих выбранный единообразный размер пор; причем размер пор мембраны приблизительно соответствует наибольшим размерам липосом, полученным путем экструзии, через эту мембрану. См., например, патент США № 4737323 (12 апреля 1988 года). В определенных вариантах осуществления для введения полинуклеотидов или белков в клетки можно использовать реагенты, такие как DharmaFECT® и Lipofectamine®.

Характеристики высвобождения состава по настоящему изобретению зависят от инкапсулирующего материала, концентрации инкапсулированного лекарственного средства и присутствия модификаторов высвобождения. Например, высвобождением можно манипулировать так, чтобы оно было зависимым от pH, например, с использованием pH-чувствительного покрытия, которое высвобождается только при низком значении pH, как в желудке, или при более высоком значении pH, как в кишечнике. Кишечное покрытие можно использовать для предупреждения высвобождения до завершения прохождения через желудок. Для обеспечения первоначального высвобождения в желудке с последующим высвобождением в кишечнике можно использовать множество покрытий или смесей цианамидов, инкапсулированных в различные материалы. Высвобождением также можно манипулировать путем включения солей или образующих поры средств, которые могут увеличивать захват воды или высвобождение лекарственного средства путем диффузии из капсулы. Для контроля скорости высвобождения также можно использовать эксципиенты, которые модифицируют растворимость лекарственного средства. Также можно включать средства, которые усиливают деградацию матрицы или высвобождение из матрицы. Их можно добавлять к лекарственному средству, добавлять в качестве отдельной фазы (т.е. в качестве частиц), или их можно совместно растворять в полимерной фазе в зависимости от соединения. В большинстве случаев количество должно составлять от 0,1 до 30% (мас./мас., полимера). Типы усилителей деградации включают неорганические соли, такие как сульфат аммония и хлорид аммония, органические кислоты, такие как лимонная кислота, бензойная кислота и аскорбиновая кислота, неорганические основания, такие как карбонат натрия, карбонат калия, карбонат кальция, карбонат цинка и гидроксид цинка, и органические основания, такие как сульфат протамина, спермин, холин, этаноламин, диэтиламин и триэтиламин, и поверхностно-активные вещества, такие как Tween® и Pluronic®. Порообразующие средства, которые добавляют микроструктуру матрицам (т.е. растворимые в воде соединения, такие как неорганические соли и сахара) добавляют в качестве частиц. Диапазон, как правило, составляет от 1 до 30% (мас./мас., полимера).

Захватом также можно манипулировать путем изменения времени нахождения частиц в кишечнике. Этого можно достигать, например, путем покрытия частицы адгезивным к слизистой оболочке полимером или выбора его в качестве инкапсулирующего материала. Примеры включают большинство полимеров со свободными карбоксильными группами, такие как хитозан, целлюлозы и особенно полиакрилаты (как используют в рамках изобретения, полиакрилаты относятся к полимерам, включающим акрилатные группы и модифицированные акрилатные группы, такие как цианоакрилаты и метакрилаты).

Олигомер можно составлять так, чтобы он содержался в хирургическом или медицинском устройстве или имплантате или был адаптирован для высвобождения из них. В некоторых аспектах имплантат может быть покрытым или иным образом обработанным олигомером. Например, гидрогели или другие полимеры, такие как биосовместимые и/или биodeградируемые полимеры, можно использовать для покрытия имплантата композициями по настоящему изобретению (т.е. композиция может быть адаптирована для применения с медицинским устройством с использованием гидрогеля или другого полимера). Полимеры и сополимеры для покрытия медицинских устройств средством хорошо известны в данной области. Примеры имплантатов включают, но не ограничиваются ими, стенты, выделяющие лекарственное средство стенты, швы, протезы, катетеры сосудов, катетеры для диализа, трансплантаты сосудов, протезы клапанов сердца, кардиостимуляторы, имплантируемые кардиовертерные дефибрилляторы, иглы для в/в инъекций, устройства для совмещения и формирования костей, такие как штифты, болты, пластины и другие устройства, и матрицы искусственных тканей для заживления ран.

В дополнение к способам, описанным в настоящем описании, олигомеры для применения в соответствии с изобретением можно составлять для введения любым удобным способом для применения в медицине человека или ветеринарии, по аналогии с другими фармацевтическими препаратами. Анти-смысловые олигомеры и их соответствующие составы можно вводить отдельно или в комбинации с другими стратегиями терапии для лечения мышечной дистрофии, такой как трансплантация миоцитов,

терапия стволовыми клетками, введение аминогликозидных антибиотиков, ингибиторы протеасом и активирующая терапия (например, активация атофина, аутосомного паралога дистрофина).

Описанные пути введения предоставлены только в качестве рекомендаций, поскольку квалифицированный специалист способен без труда определить оптимальный путь введения и любую дозировку для любого конкретного животного и состояния. Было предпринято множество подходов для введения функционального нового генетического материала в клетки, как *in vitro*, и так и *in vivo* (Friedmann (1989) *Science*, 244:1275-1280). Эти подходы включают встраивание гена, подлежащего экспрессии, в модифицированные ретровирусы (Friedmann (1989) выше; Rosenberg (1991) *Cancer Research* 51(18), suppl.: 5074S-5079S); встраивание в неретровирусные векторы (например, аденоассоциированные вирусные векторы) (Rosenfeld et al. (1992) *Cell*, 68:143-155; Rosenfeld et al. (1991) *Science*, 252:431-434); или доставку трансгена, связанного с гетерологичным промоторным-энхансерным элементом, через липосомы (Friedmann (1989), выше; Brigham et al. (1989) *Am. J. Med. Sci.*, 298:278-281; Nabel et al. (1990) *Science*, 249:1285-1288; Hazinski et al. (1991) *Am. J. Resp. Cell Molec. Biol.*, 4:206-209; и Wang and Huang (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 84:7851-7855); сопряженные с лиганд-специфическими системы транспорта на основе катионов (Wu and Wu (1988) *J. Biol. Chem.*, 263:14621-14624) или использование простой ДНК, экспрессирующих векторов (Nabel et al. (1990), выше); Wolff et al. (1990) *Science*, 247:1465-1468). Прямая инъекция трансгенов в ткань обеспечивает только локализованную экспрессию (Rosenfeld (1992) выше; Rosenfeld et al. (1991) выше; Brigham et al. (1989) выше; Nabel (1990) выше; и Hazinski et al. (1991) выше). Группа Brigham et al. (*Am. J. Med. Sci.* (1989) 298:278-281 и *Clinical Research* (1991) 39 (реферат)) сообщили об трансфекции *in vivo* только легких мышей после внутривенного или внутритрахеального введения комплекса ДНК-липосомы. Примером обзорной статьи о методиках генной терапии человека является: Anderson, *Science* (1992) 256:808-813.

#### IV. Наборы.

Изобретение также относится к наборам для лечения пациента с генетическим заболеванием, которые содержат по меньшей мере одну бессмысловую молекулу (например, бессмысловый олигомер, указанный в SEQ ID NO: 1-12, 46 и 47), упакованную в подходящий контейнер вместе с инструкциями по ее применению. Наборы также могут содержать периферические реагенты, такие как буферы, стабилизаторы и т.д. Специалистам в данной области будет понятно, что описанный выше способ имеет широкую применимость для идентификации бессмысловых молекул, пригодных для применения для лечения многих других заболеваний.

#### V. Примеры.

Хотя представленное выше изобретение для ясности понимания подробно описано с помощью иллюстрации и примеров, специалисту в данной области будет очевидно ввиду указаний описания настоящего описания, что определенные изменения и модификации можно вносить в него без отклонения от сущности или объема прилагаемой формулы изобретения. Следующие примеры предоставлены только в качестве иллюстрации и не для ограничения. Специалистам в данной области будет хорошо известно множество некритических параметров, которые могут быть изменены или модифицированы для получения по существу сходных результатов.

#### Материалы и способы.

##### Клетки и условия обработки тканевой культуры.

Клетки рабдомиосаркомы человека (ATCC, CCL-136; клетки RD) высевали в обработанные тканевой культурой флаконы T75 (Nunc) в количестве  $1,5 \times 10^6$  клеток/колба в 24 мл нагретой DMEM с L-глутамином (HyClone), 10% эмбриональной телячьей сывороткой и 1% раствором антибиотиков пенициллина-стрептомицина (CelGro); через 24 ч среду аспирировали, клетки промывали один раз нагретым PBS и добавляли свежую среду. Клетки выращивали до 80% смыкания монослоя в инкубаторе при 37°C с 5,0% CO<sub>2</sub> и собирали с использованием трипсина. Лиофилизированные фосфодиамидатные морфолиноолигомеры (PMO) ресуспендировали в количестве приблизительно 0,5-2,0 mM в свободной от нуклеаз воде; для подтверждения молярности проводили измерение растворов PMO с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). PMO добавляли в клетки RD с использованием нуклеопорации в соответствии с инструкциями изготовителя и набора SG (Lonza). PMO исследовали при различных указанных концентрациях (например, 2,5, 5, 10, 12,5, 20 и 25 мкмоль/л). Клетки инкубировали в течение 24 ч после нуклеопорации в количестве приблизительно  $2-3 \times 10^5$  клеток на лунку 12 или 24-луночного планшета (n=2 или 3), а затем подвергали экстракции РНК, как описано ниже.

Первичные миобласты человека культивировали в среде для роста скелетных мышечных клеток (PromoCell) с использованием стандартных способов. Нуклеопорацию PMO при различных концентрациях проводили, как описано для клеток RD выше. Затем клетки высевали в трех экземплярах в ячейки 12-ячеечного планшета в среде для роста PromoCell и позволяли им инкубироваться в течение 24 ч перед экстракцией РНК, как описано ниже.

##### Экстракция РНК и амплификация способом ПЦР.

РНК экстрагировали из обработанных PMO клеток (клетки или первичные миобласты человека) с использованием 96-луночного набора для выделения РНК RNeasy от GE Healthcare и подвергали либо

гнездовой, либо негнездовой ОТ-ПЦР с использованием стандартных способов и следующих пар праймеров. Внешние праймеры: прямой 5'-caatgctcctgacctctgtgc-3' (SEQ ID NO: 40), обратный 5'-gctctttccaggttcaagtgg-3' (SEQ ID NO: 41); внутренние праймеры: прямой 5'-gtctacaacaaagtcaggtcg-3' (SEQ ID NO: 42), обратный 5'-gcaatgttatctgctctcctcaacc-3' (SEQ ID NO: 43). В некоторых случаях, негнездовую ПЦР проводили с использованием внутренних праймеров. Пропускание экзонов измеряли геле-электрофорезом или с использованием биоанализатора Caliper LabChip и % пропускание экзонов (т.е. интенсивность полос продукта с пропуском экзонов относительно полноразмерного продукта ПЦР) наносили на график, как показано на фиг. 3-6.

Получение субъединиц морфолино, РМО и РМО с модифицированными межсубъединичными связями

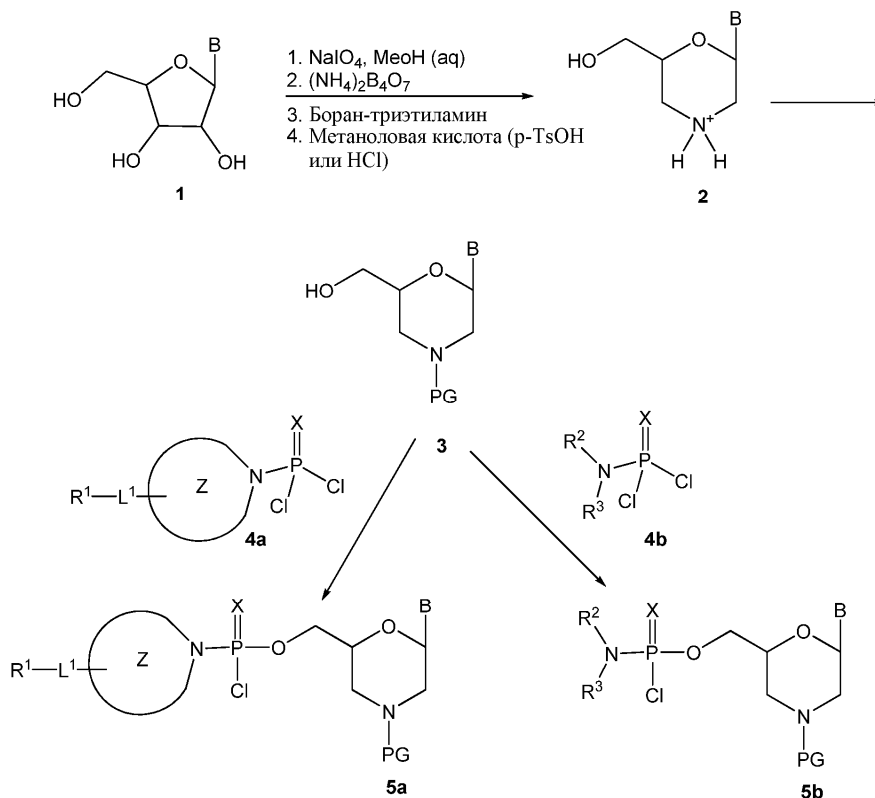


Схема 1. Общий путь синтеза субъединиц РМО и модифицированного РМО.

Ссылаясь на схему реакции 1, где В обозначает образующую пару часть и PG обозначает защитную группу, субъединицы морфолино можно получать из соответствующего рибонуклеозида (1), как показано. Субъединица морфолино (2) может быть необязательно защищена путем реакции с пригодным предшественником защитной группы, например тритилхлоридом. 3'-защитную группу, как правило, удаляют в процессе твердофазного синтеза олигомеров, как более подробно описано ниже. Образующая пару часть может быть пригодным образом защищена для твердофазного синтеза олигомеров. Пригодные защитные группы включают бензоил для аденина и цитозина, фенилацетил для гуанина и пивалоил-оксиметил для гипоксантина (I). Группу пивалоилоксиметила можно вносить в положение N1 гетероциклического основания гипоксантина. Хотя можно использовать незащищенную субъединицу гипоксантина, выход реакций активации является значительно более высоким, когда основание защищено. Другие пригодные защитные группы включают группы, описанные в патенте США № 8076476, который включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Реакция соединения 3 с активированным соединением фосфора 4a или 4b приводит к субъединицам морфолино, имеющим желаемую связывающую часть (5a или 5b). Следует отметить, что части  $\text{R}^1$  и/или  $\text{L}^1$  также могут быть размещены на гетероциклическом кольце Z после образования связи P-O или даже после включения субъединицы в олигомер.

Соединения структуры 4a или 4b можно получать с использованием любого из ряда способов, известных специалистам в данной области, включая способы, описанные в примерах. Затем проводят связывание с частью морфолино, как описано выше.

Соединения структуры 5a или 5b можно использовать в твердофазном синтезе олигомеров для получения олигомеров, содержащих межсубъединичные связи. Такие способы хорошо известны в данной области. В кратком изложении, соединение структуры 5a или 5b можно модифицировать на 5'-конце, чтобы оно содержало линкер для твердой подложки. После присоединения к подложке защитную группу 5a или 5b (например, тритил на 3'-конце) удаляют и свободный амин подвергают реакции с активиро-

ванной фосфорной частью второго соединения структуры 5a или 5b (или его аналога). Эту последовательность повторяют до тех пор, пока не достигнут желаемой длины олигонуклеотида. Защитная группа на 3'-конце может быть либо удалена, либо оставлена, если является желательной 3'-модификация.

Олигонуклеотид может быть удален с твердой подложки с использованием любого из ряда способов, или, например обработкой основанием для расщепления связи с твердой подложкой.

Получение морфолиноолигомеров в общем и конкретных морфолиноолигомеров по изобретению более подробно описано в примерах.

Пример 1.

Получение морфолиноолигомеров.

Получение соединений по изобретению проводят с использованием следующего протокола.

Получение фенилкарбамата тритилпиперазина 35 (фиг. 2A и 2B): К охлажденной суспензии соединения 11 в дихлорметане (6 мл/г 11) добавляли раствор карбоната калия (3,2 экв.) в воде (4 мл/г карбоната калия). К этой двухфазной смеси медленно добавляли раствор фенилхлорформиата (1,03 экв.) в дихлорметане (2 г/г фенилхлорформиата). Реакционную смесь нагревали до 20°C. После завершения реакции (1-2 ч) слои разделяли. Органический слой промывали водой и сушили над безводным карбонатом калия. Продукт 35 выделяли кристаллизацией из ацетонитрила.

Получение карбамата спирта 36: гидрид натрия (1,2 экв.) суспендировали в 1-метил-2-пирролидиноне (32 мл/г гидрида натрия). К этой суспензии добавляли триэтиленгликоль (10,0 экв.) и соединение 35 (1,0 экв.). Полученную взвесь нагревали до 95°C. После завершения реакции (1-2 ч), смесь охлаждали до 20°C. К этой смеси добавляли 30% дихлорметан/метил-трет-бутиловый эфир (об.:об.) и воду. Содержащий продукт органический слой промывали последовательно водным раствором NaOH, водным раствором янтарной кислоты и насыщенным водным раствором хлорида натрия. Продукт 36 выделяли кристаллизацией из смеси дихлорметан/метил-трет-бутиловый эфир/гептан.

Получение кислоты хвоста 37: к раствору соединения 36 в тетрагидрофуране (7 мл/г соединения 36) добавляли янтарный ангидрид (2,0 экв.) и DMAP (0,5 эк.). Смесь нагревали до 50°C. После завершения реакции (5 ч) смесь охлаждали до 20°C и доводили до pH 8,5 водным раствором NaHCO<sub>3</sub>. Добавляли метил-трет-бутиловый эфир и продукт экстрагировали в водный слой. Добавляли дихлорметан и смесь доводили до pH 3 водным раствором лимонной кислоты. Содержащий продукт органический слой промывали смесью цитратного буфера, pH 3, и насыщенным водным раствором хлорида натрия. Этот раствор 37 в дихлорметане использовали без выделения при получении соединения 38.

Получение 38: к раствору соединения 37 добавляли имид N-гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбоновой кислоты (HONB) (1,02 экв.), 4-диметиламинопиридин (DMAP) (0,34 экв.), а затем гидрохлорид 1-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида (EDC) (1,1 экв.). Смесь нагревали до 55°C. После завершения реакции (4-5 ч) смесь охлаждали до 20°C и последовательно промывали смесью 0,2M лимонная кислота/рассол 1:1 и рассолом. Проводили замену растворителя в растворе в дихлорметане на ацетон, а затем на N,N-диметилформамид и продукт выделяли путем осаждения из смеси ацетон/N,N-диметилформамид в насыщенный водный раствор хлорида натрия. Неочищенный продукт повторно суспендировали несколько раз в воде для удаления остаточного N,N-диметилформамида и солей.

Внесение активированного "хвоста" на нагруженную якорем смолу проводили в диметилимидазолидиноне (DMI) посредством методики, использованной для включения субъединиц в ходе твердофазного синтеза.

Получение твердой подложки для синтеза морфолиноолигомеров. Эту методику выполняли в силанизированной имеющей рубашку емкости для пептидов (ChemGlass, NJ, США) с крупнопористой (40-60 мкм) стеклообразной фриттой, верхнеприводной мешалкой, и 3-ходовым запорным краном Teflon для обеспечения барботирования N<sub>2</sub> через фритту или вакуумной экстракции.

Стадии обработки смолой/промывания по следующей методике состоят из двух основных действий: флюидизация смолы или реактор с перемешиваемым слоем и экстракция растворителем/в растворе. Для флюидизации смолы запорный кран располагали так, чтобы позволить N<sub>2</sub> проходить через фритту и в реактор добавляли определенное средство для обработки/промывания смолы и позволяли ему проникнуть и полностью смочить смолу. Затем начинали перемешивание и взвесь смолы перемешивали в течение определенного времени. Для экстракции растворителем/в растворе перемешивание и поток N<sub>2</sub> останавливали и включали вакуумный насос, а затем запорный кран располагали так, чтобы позволить выйти средству для обработки/промывания смолы в отходы. Все объемы обработки/промывания смолы составляли 15 мл/г смолы, если нет иных указаний.

К аминотетрагидрофурановой смоле (размер ячеек 100-200; нагрузка ~1,0 ммоль/г, исходя из замещения азота; 75 г, 1 экв., Polymer Labs, Великобритания, часть #1464-X799) в силанизированной имеющей рубашку емкости для пептидов добавляли 1-метил-2-пирролидинон (NMP; 20 мл/г смолы), а затем смоле позволяли набухать при перемешивании в течение 1-2 ч. После удаления разбухшего растворителя смолу промывали дихлорметаном (2×1-2 мин), 5% диизопропилэтиламином в смеси 25% изопропанол/дихлорметан (2×3-4 мин) и дихлорметаном (2×1-2 мин). После удаления конечного промывочного средства смолу обрабатывали раствором дисульфидного якоря 34 в 1-метил-2-пирролидиноне (0,17M; 15

мл/г смолы, ~2,5 экв.) и смесь смола/реагент нагревали при 45°C в течение 60 ч. После завершения реакции нагревание прекращали, и раствор якоря удаляли, и смолу промывали 1-метил-2-пирролидином (4×3-4 мин) и дихлорметаном (6×1-2 мин). Смолу обрабатывали раствором 10% (об./об.) диэтилдикарбоната в дихлорметане (16 мл/г; 2×5-6 мин), а затем промывали дихлорметаном (6×1-2 мин). Смолу 39 (см. фиг. 4) сушили в потоке N<sub>2</sub> в течение 1-3 ч, а затем в вакууме до постоянной массы (±2%). Выход: 110-150% от первоначальной массы смолы.

Определение нагрузки аминотилполистиролдисульфидной смолы: нагрузку смолы (число потенциально доступных реакционноспособных участков) определяют спектрометрическим анализом числа трифенилметильных (триметильных) групп на грамм смолы.

Известную массу высушенной смолы (25±3 мг) переносят в силанизированную мерную колбу объемом 25 мл и добавляют ~5 мл 2% (об./об.) трифторуксусной кислоты в дихлорметане. Содержимое смешивают путем осторожного вращения, а затем ей позволяют стоять в течение 30 мин. Объем доводят до 25 мл дополнительной 2% (об./об.) трифторуксусной кислотой в дихлорметане и содержимое тщательно перемешивают. С использованием пипетки прямого вытеснения аликвоту триметилсодержащего раствора (500 мкл) переносят в мерную колбу объемом 10 мл и объем доводят до 10 мл метансульфоновой кислотой.

Содержание триметильного катиона в конечном растворе измеряют по УФ-поглощению при 431,7 нм и нагрузку смолы вычисляют в количестве триметильных групп на грамм смолы (мкмоль/г) с использованием соответствующих объемов, разведений, коэффициента экстинкции ( $\epsilon$ : 41 моль<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>) и массы смолы. Анализ проводят в трех экземплярах и вычисляют среднюю нагрузку.

Методика нагрузки смолы согласно этому примеру обеспечивает смолу с нагрузкой приблизительно 500 мкмоль/г. Нагрузку 300-400 мкмоль/г достигали, если стадию включения дисульфидного якоря проводили в течение 24 ч при комнатной температуре.

Нагрузка хвостовой частью: с использованием тех же условий и объемов, что и для получения аминотилполистирол-дисульфидной смолы, в твердую подложку можно вносить хвост. Из нагруженной якорем смолы сначала удаляли защитную группу в кислых условиях, и полученный материал нейтрализовывали перед присоединением. Для стадии присоединения использовали раствор соединения 38 (0,2М) в DMI, содержащий 4-этилморфолин (NEM, 0,4М) вместо раствора дисульфидного якоря. После 2 ч при 45°C смолу 39 промывали два раза 5% диизопропилэтиламином в 25% смеси изопропанол/дихлорметан и один раз DCM. К смоле добавляли раствор ангидрида бензойной кислоты (0,4М) и NEM (0,4М). Через 25 мин рубашку реактора охлаждали до комнатной температуры и смолу промывали два раза 5% диизопропилэтиламином в 25% смеси изопропанол/дихлорметан и восемь раз DCM. Смолу 40 фильтровали и сушили в высоком вакууме. Нагрузку для смолы 40 определяли как нагрузку исходной аминотилполистирол-дисульфидной смолы 39, использованной для нагрузки хвостовой частью.

Твердофазный синтез: морфолиноолигомеры получали на автоматизированном устройстве для синтеза пептидов Gilson AMS-422 в 2-мл реакционных колонках из полипропилена Gilson (партия № 3980270). Алюминиевый блок с каналами для потока воды помещали вокруг колонок, после того как их помещали в устройство для синтеза. AMS-422 альтернативно добавляет раствор реагента/раствор для промывания, выдерживает их в течение определенного времени, и освобождает колонки с использованием вакуума.

Для олигомеров длиной в диапазоне вплоть до приблизительно 25 субъединиц предпочтительной является аминотилполистиролдисульфидная смола с нагрузкой практически 500 мкмоль/г смолы. Для более крупных олигомеров предпочтительной является аминотилполистиролдисульфидная смола с нагрузкой 300-400 мкмоль/г смолы. Если является желательной молекула с 5'-хвостовой частью, выбирают смолу, которая нагружена хвостовой частью, с тем же руководством по нагрузке.

Получали следующие растворы реагентов:

раствор для детритилирования: 10% цианоуксусная кислота (мас./об.) в смеси 4:1 дихлорметан/ацетонитрил; раствор для нейтрализации: 5% диизопропилэтиламин в смеси 3:1 дихлорметан/изопропанол; раствор для присоединения: 0,18М (или 0,24М для олигомеров, которые выросли более чем на 20 субъединиц) активированной морфолиносубъединицы желаемого основания и типа связи и 0,4М N-этилморфолина в 1,3-диметилимидазолидиноне. Дихлорметан (DCM) использовали в качестве переходного промывочного раствора, разделяющего промывания различными растворами реагентов.

На устройстве для синтеза с блоком, установленным на 42°C, в каждую колонку, содержащую 30 мг аминотилполистирол-дисульфидной смолы (или смолы с хвостовой частью) добавляли 2 мл 1-метил-2-пирролидинона и позволяли ей осесть при комнатной температуре в течение 30 мин. После промывания 2 раза по 2 мл дихлорметана использовали следующий цикл синтеза:

| <u>Стадия</u>    | <u>Объем</u>   | <u>Доставка</u>               | <u>Время<br/>удержания</u> |
|------------------|----------------|-------------------------------|----------------------------|
| Детритилирование | 1, 5 мл        | Распределительный<br>патрубок | 15 секунд                  |
| Детритилирование | 1, 5 мл        | Распределительный<br>патрубок | 15 секунд                  |
| Детритилирование | 1, 5 мл        | Распределительный<br>патрубок | 15 секунд                  |
| Детритилирование | 1, 5 мл        | Распределительный<br>патрубок | 15 секунд                  |
| Детритилирование | 1, 5 мл        | Распределительный<br>патрубок | 15 секунд                  |
| Детритилирование | 1, 5 мл        | Распределительный<br>патрубок | 15 секунд                  |
| Детритилирование | 1, 5 мл        | Распределительный<br>патрубок | 15 секунд                  |
| DCM              | 1, 5 мл        | Распределительный<br>патрубок | 30 секунд                  |
| Нейтрализация    | 1, 5 мл        | Распределительный<br>патрубок | 30 секунд                  |
| Нейтрализация    | 1, 5 мл        | Распределительный<br>патрубок | 30 секунд                  |
| Нейтрализация    | 1, 5 мл        | Распределительный<br>патрубок | 30 секунд                  |
| Нейтрализация    | 1, 5 мл        | Распределительный<br>патрубок | 30 секунд                  |
| Нейтрализация    | 1, 5 мл        | Распределительный<br>патрубок | 30 секунд                  |
| Нейтрализация    | 1, 5 мл        | Распределительный<br>патрубок | 30 секунд                  |
| DCM              | 1, 5 мл        | Распределительный<br>патрубок | 30 секунд                  |
| Присоединение    | 350-500<br>мкл | Шприц                         | 40 минут                   |
| DCM              | 1, 5 мл        | Распределительный<br>патрубок | 30 секунд                  |
| Нейтрализация    | 1, 5 мл        | Распределительный<br>патрубок | 30 секунд                  |
| Нейтрализация    | 1, 5 мл        | Распределительный<br>патрубок | 30 секунд                  |
| DCM              | 1, 5 мл        | Распределительный<br>патрубок | 30 секунд                  |
| DCM              | 1, 5 мл        | Распределительный<br>патрубок | 30 секунд                  |
| DCM              | 1, 5 мл        | Распределительный<br>патрубок | 30 секунд                  |

Последовательности индивидуальных олигомеров программировали в устройстве для синтеза, так чтобы в каждую колонку поступал надлежащий раствор для присоединения (A,C,G,T,I) в надлежащей

последовательности. Когда олигомер в колонке завершал включение его конечной субъединицы, колонку извлекали из блока и конечный цикл проводили вручную с раствором для присоединения, содержащим 4-метокситрифенилметилхлорид (0,32М в DMI), содержащим 0,89М 4-этилморфолин.

Отщепление от смолы и удаление защитных групп оснований и остова: После метокситритилирования смолу промывали 8 раз 2 мл 1-метил-2-пирролидинона. Добавляли один мл раствора для расщепления, состоявшего из 0,1М 1,4-дитиотреитола (DTT) и 0,73М триэтиламина в 1-метил-2-пирролидиноне, колонку закрывали, и содержимому позволяли осесть при комнатной температуре в течение 30 мин. После этого раствор дренировали в 12 мл флакон Wheaton. Значительно сжатую смолу промывали два раза 300 мкл раствора для расщепления. К раствору добавляли 4,0 мл концентрированного водного раствора аммиака (хранившегося при -20°C), флакон прочно закрывали (с покрытой тефлоном навинчивающейся крышкой) и сосуд со смесью вращали для перемешивания раствора. Флакон помещали в сушильный шкаф при 45°C на 16-24 ч для обеспечения отщепления защитных групп оснований и остова.

Очистка неочищенного продукта: раствор для аммонолиза во флаконе извлекали из сушильного шкафа и позволяли ему остыть до комнатной температуры. Раствор разбавляли 20 мл 0,28% водного раствора аммиака и пропускали через колонку 2,5×10 см, содержащую смолу Macroprep HQ (BioRad). Для элюирования пиковой фракции, содержащей метокситритил, использовали градиент соли (А: 0,28% аммиак с В: 1М хлорид натрия в 0,28% аммиаке; 0-100% В в течение 60 мин). Объединенные фракции накапливали и далее обрабатывали в зависимости от желаемого продукта.

Деметокситритилирование морфолиноолигомеров: объединенные фракции после макропрепаративной очистки обрабатывали 1М  $\text{H}_3\text{PO}_4$  для уменьшения pH до 2,5. После первоначального перемешивания образцы осаждали при комнатной температуре в течение 4 мин, после чего их нейтрализовывали до pH 10-11 посредством 2,8% аммиака/воды. Продукты очищали твердофазной экстракцией (SPE).

Упаковка и кондиционирование колонки SPE: Amberchrome CG-300M (Rohm and Haas; Philadelphia, PA) (3 мл) упаковывали в 20 мл колонки с фриттами (BioRad Econo-Pac Chromatography Columns (732-1011)) и смолу промывали 3 мл следующих: 0,28%  $\text{NH}_4\text{OH}$ /80% ацетонитрил; 0,5М  $\text{NaOH}$ /20%этанол; вода; 50 мМ  $\text{H}_3\text{PO}_4$ /80% ацетонитрил; вода; 0,5  $\text{NaOH}$ /20% этанол; вода; 0,28%  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

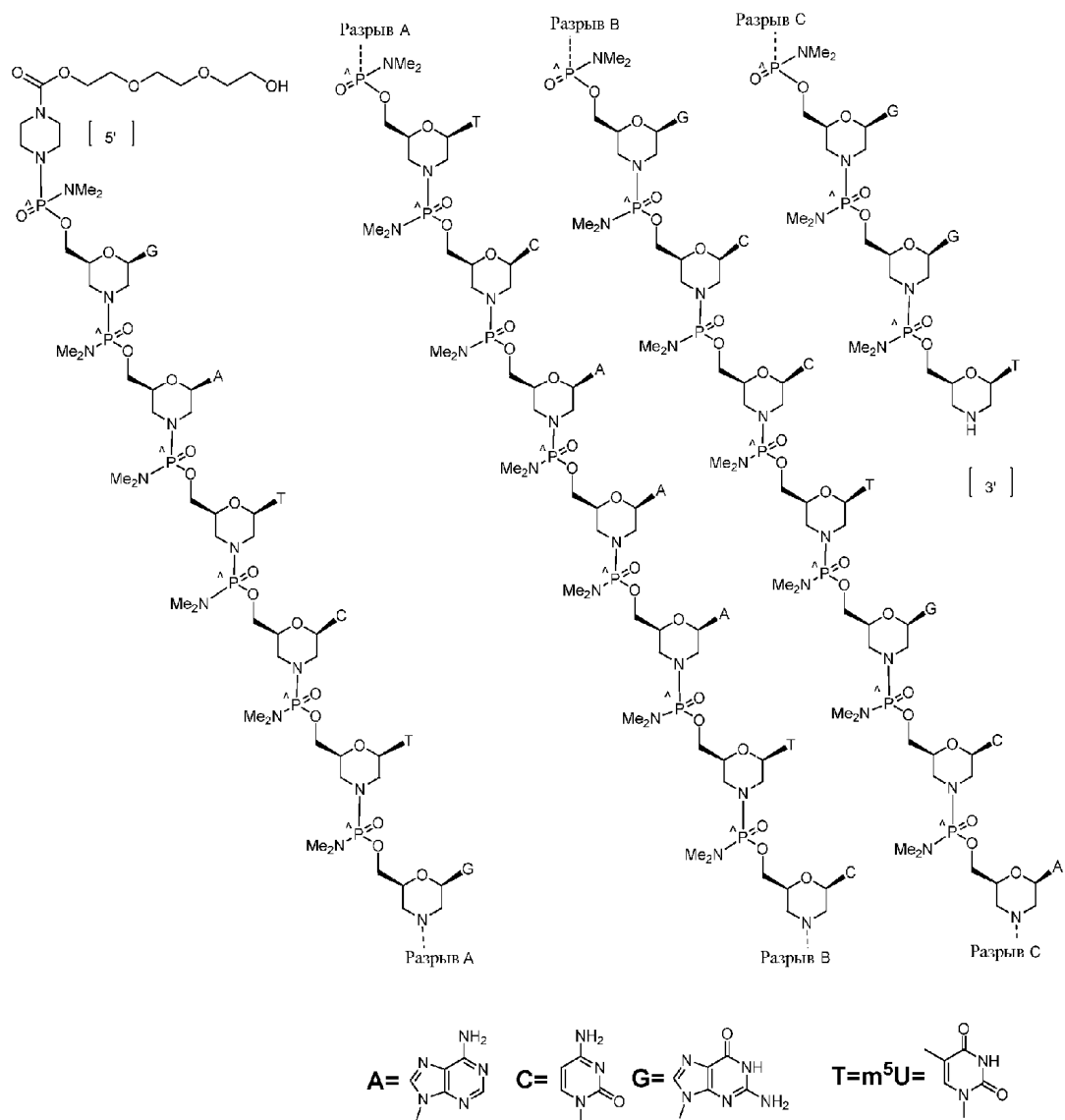
Очистка SPE: раствор после деметокситритилирования наносили на колонку и смолу промывали три раза 3-6 мл 0,28% водного раствора аммиака. Флакон Wheaton (12 мл) помещали под колонку и продукт элюировали посредством двух промываний 2 мл 45% ацетонитрила в 0,28% водном растворе аммиака.

Выделение продукта: растворы замораживали на сухом льде и флаконы помещали в лиофилизатор с получением рассыпчатого белого порошка. Образцы растворяли в воде, фильтровали через фильтр размером 0,22-микронетров (Pall Life Sciences, шприцевой фильтр Acrodisc 25 мм, с 0,2-мкм мембраной HT Tuffryn) с использованием шприца и оптическую плотность (OD) измеряли на УФ-спектрофотометре для определения единиц OD присутствующего олигомера, а также распределения образца для анализа. Затем растворы помещали обратно во флаконы Wheaton для лиофилизации.

Анализ морфолиноолигомеров посредством масс-спектрометрии MALDI: MALDI-TOF использовали для определения состава фракций при очистке, а также получения доказательств идентичности (молекулярная масса) олигомеров. Образцы прогоняли после разбавления раствором 3,5-диметокси-4-гидроксикоричной кислоты (синапиновая кислота), 3,4,5-тригидроксиацетофенона (THAP) или  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты (HCCA) в качестве матрицы.

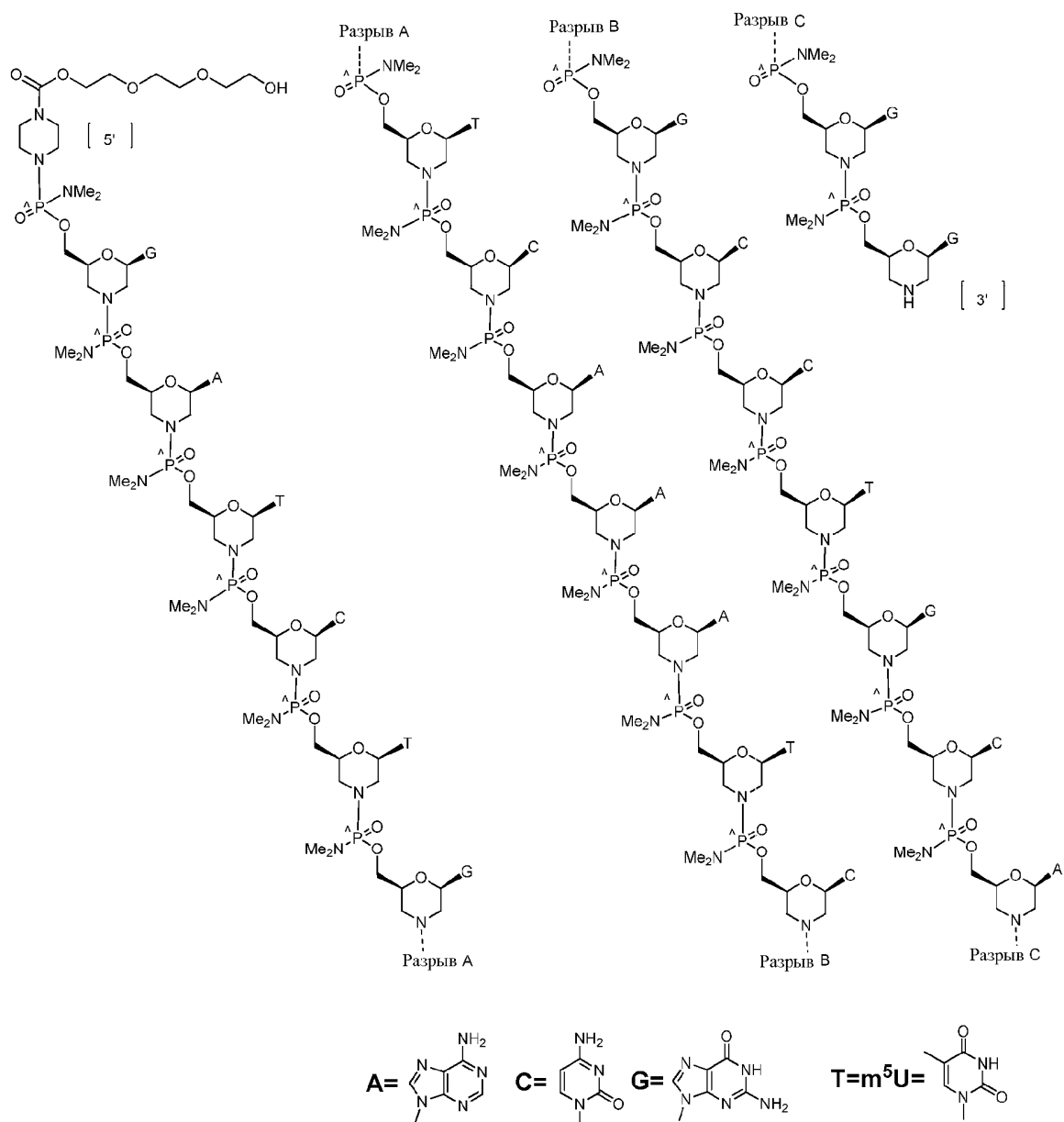
Пример 2.

С использованием протокола, описанного в примере 1, синтезировали следующий РМО: NG-13-0391 H44A(-8+15), SEQ ID NO: 4 (5'-GAT CTG TCA AAT CGC CTG CAG GT-3') и использовали в примерах 8 и 9

<sup>^</sup> Стереохимия фосфорного центра не определена.

### Пример 3.

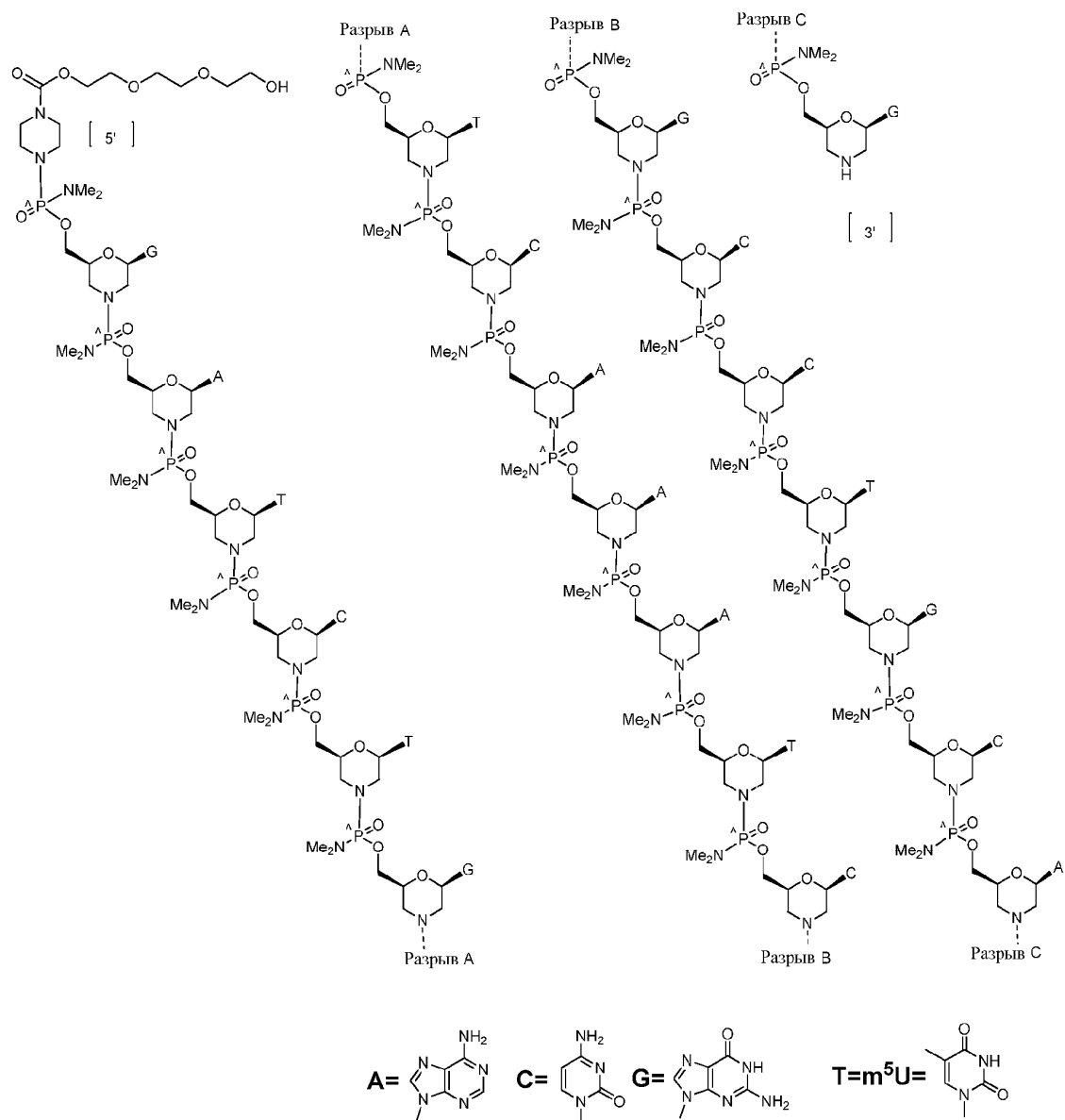
С использованием протокола, описанного в примере 1, синтезировали следующий РМО: NG-13-0392 H44A(-7+15), SEQ ID NO: 5 (5'- GAT CTG TCA AAT CGC CTG CAG G-3') и использовали, как описано в примерах 8 и 9



^ Стереохимия фосфорного центра не определена.

Пример 4.

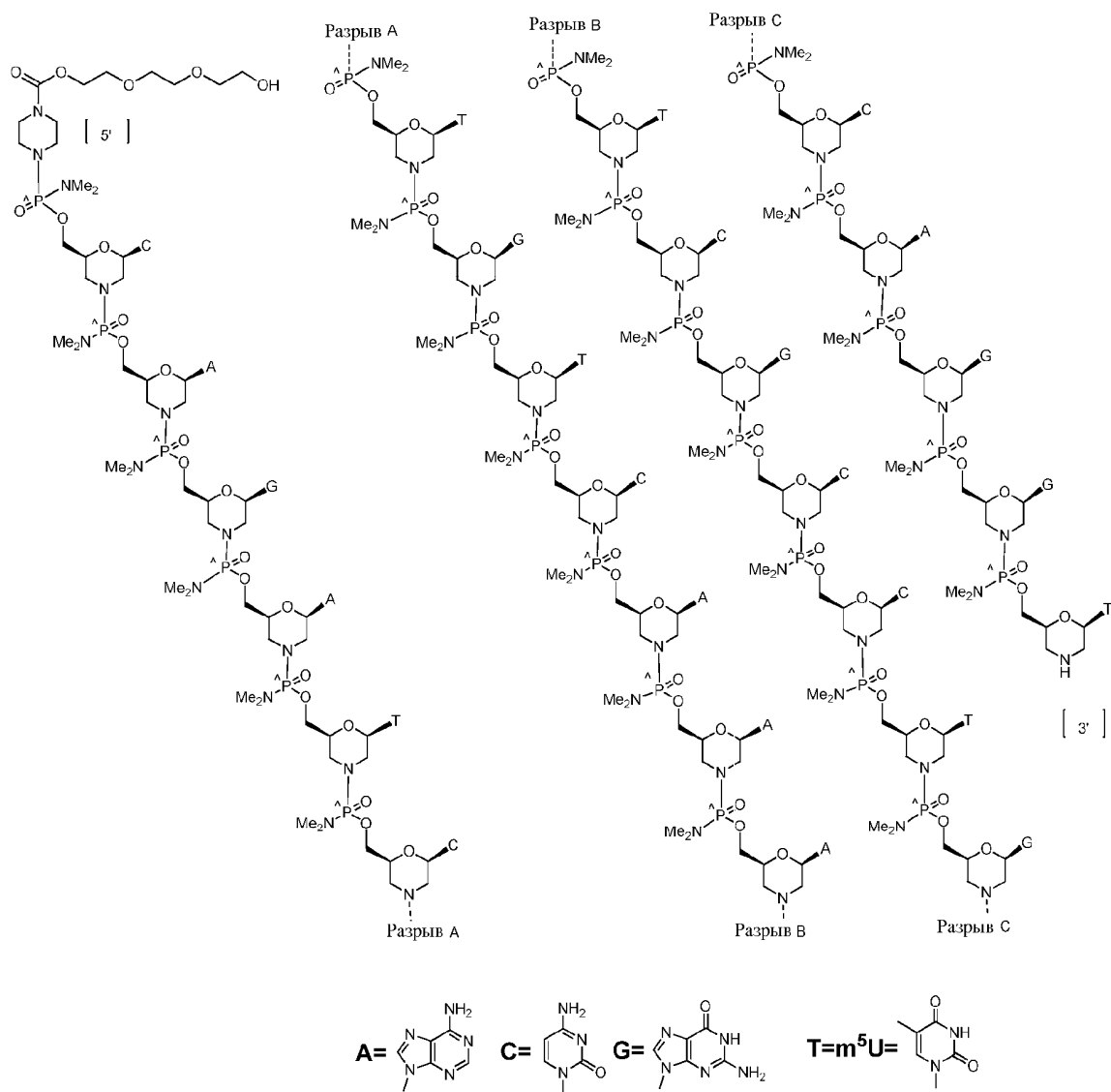
С использованием протокола, описанного в примере 1, синтезировали следующий РМО: NG-13-0393 H44A(-6+15), SEQ ID NO: 6 (5'- GAT CTG TCA AAT CGC CTG CAG -3') и использовали, как описано в примерах 8 и 9



^ Стереохимия фосфорного центра не определена.

Пример 5.

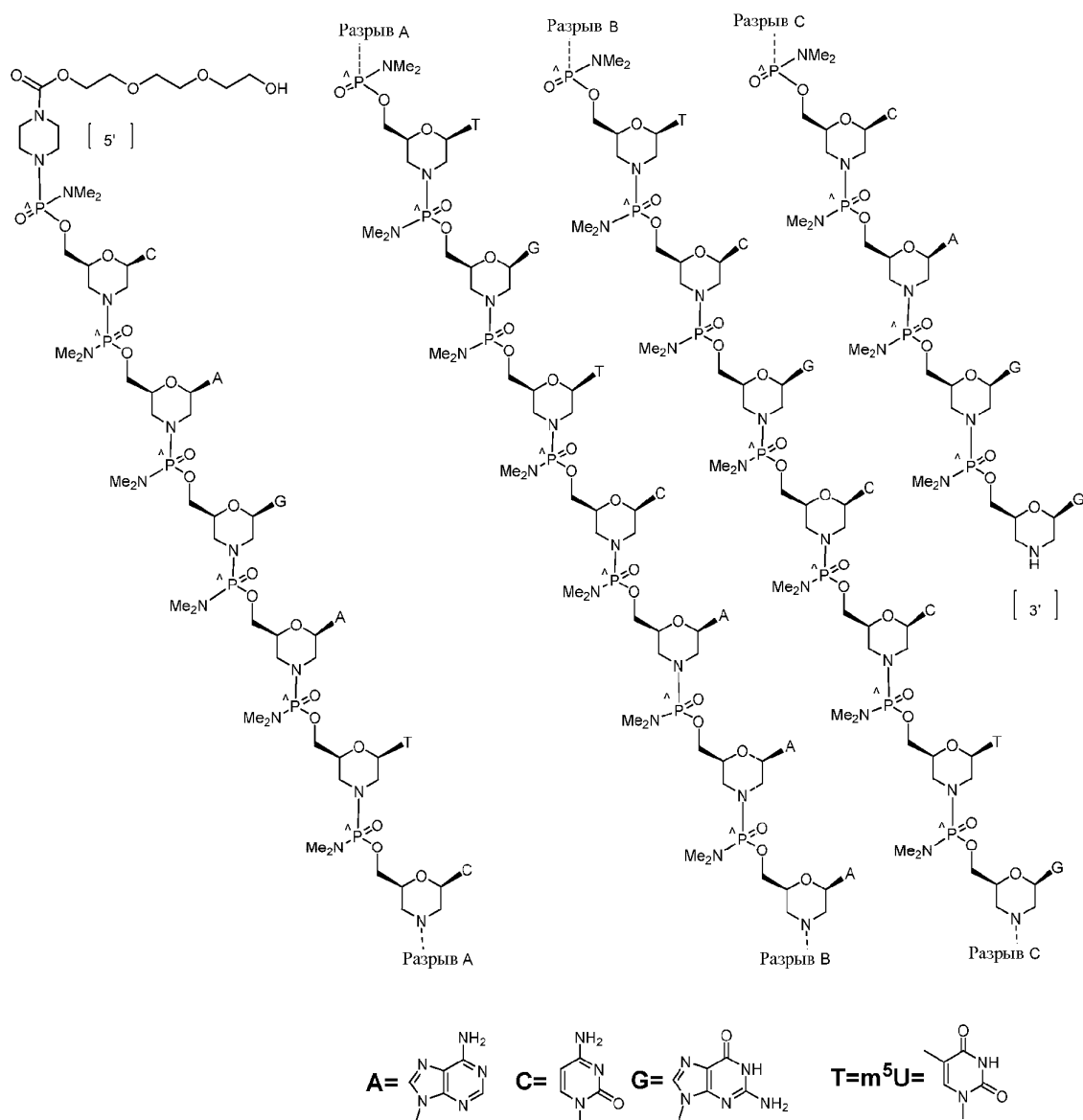
С использованием протокола, описанного в примере 1, синтезировали следующий РМО: NG-13-0394 H44A(-8+17), SEQ ID NO: 7 (5'- CAG ATC TGT CAA ATC GCC TGC AGG T -3') и использовали, как описано в примерах 8 и 9



^ Стереохимия фосфорного центра не определена.

Пример 6.

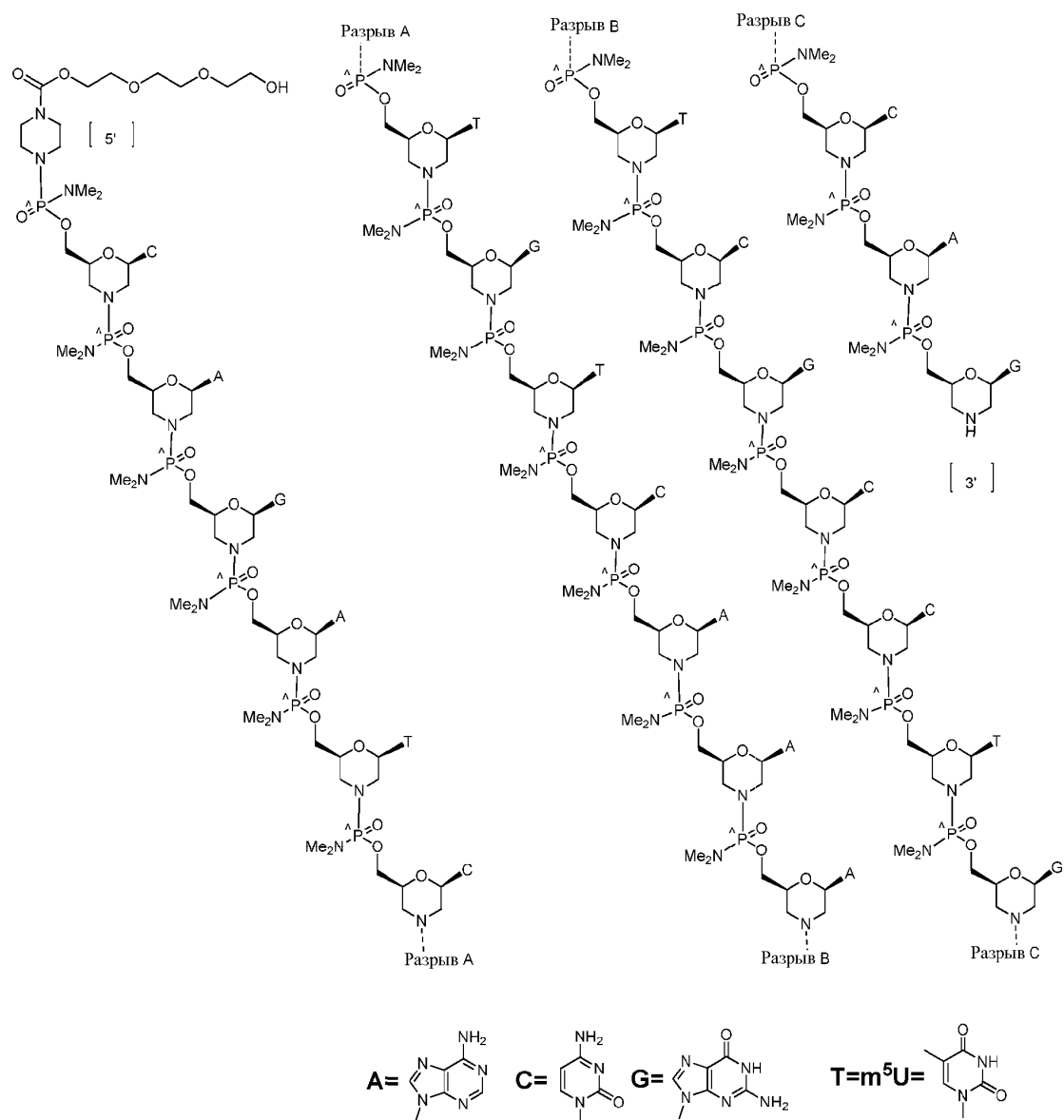
С использованием протокола, описанного в примере 1, синтезировали следующий РМО: NG-13-0008 H44A(-7+17), SEQ ID NO: 1 (5'- CAG ATC TGT CAA ATC GCC TGC AGG-3') и использовали, как описано в примерах 8 и 9



<sup>^</sup> Стереохимия фосфорного центра не определена.

Пример 7.

С использованием протокола, описанного в примере 1, синтезировали следующий РМО: NG-13-0395 H44A(-6+17), SEQ ID NO: 8 (5'- CAG ATC TGT CAA ATC GCC TGC AG -3') и использовали, как описано в примерах 8 и 9

<sup>^</sup> Стереохимия фосфорного центра не определена.

Пример 8.

Пропускание экзона 44.

Серию антисмысловых олигомеров, которые нацелены на экзон 44 дистрофина человека, конструировали и синтезировали следующим образом:

| <u>Описание</u> | <u>Последовательность</u>     | <u>SEQ ID NO</u> |
|-----------------|-------------------------------|------------------|
| H44A(-07+17)    | CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG      | 1                |
| H44A(-07+20)    | CAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG   | 2                |
| H44A(-07+22)    | CTCAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG | 3                |
| H44A(-8+15)     | GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGT       | 4                |

|                |                               |    |
|----------------|-------------------------------|----|
| H44A (-7+15)   | GATCTGTCAAATCGCCTGCAGG        | 5  |
| H44A (-6+15)   | GATCTGTCAAATCGCCTGCAG         | 6  |
| H44A (-8+17)   | CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGGT     | 7  |
| H44A (-6+17)   | CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAG       | 8  |
| H44A (+77+101) | GTGTCTTTCTGAGAACTGTTTCAGC     | 9  |
| H44A (+64+91)  | GAGAACTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCAC  | 10 |
| H44A (+62+89)  | GAAACTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCACTG | 11 |
| H44A (+62+85)  | CTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCACTG     | 12 |
| H44A (-13+14)  | ATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAAG     | 46 |
| H44A (-14+15)  | GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAAG    | 47 |

Выбранные антисмысловые олигомеры, показанные выше, оценивали в отношении эффективности пропуска экзона путем обработки клеток RD в различных указанных концентрациях. В этих экспериментах опубликованные антисмысловые олигомеры, соответствующие H44A(-06+14) и H44A(+85+104) (US 8232384; SEQ ID NO: 167 и 165, соответственно) и H44A(-06+20), H44A(-09+17), H44A(+59+85) и H44A(+65+90) (WO2011/057350; SEQ ID NOs: 68, 220, 54 и 10, соответственно), использовали в качестве сравнительных олигомеров. Как показано на фиг. 3, олигомер H44A(-07+17) (SEQ ID NO: 1) был высокоэффективным в отношении индукции пропуска экзона 44 в клетках RD по сравнению с известными последовательностями. Как показано на фиг. 4, H44A(+62+89) (SEQ ID NO: 11) был высокоэффективным в отношении индукции пропуска экзона 44 в культивируемых клетках RD по сравнению с другими высокоактивными антисмысловыми олигонуклеотидами, известными в данной области.

#### Пример 9.

Пропускание экзона 44 в первичных миобlastах человека.

Исходя из представленных выше результатов, описанных в примере 8, дополнительные олигомеры конструировали и исследовали в первичных миобlastах человека. Дополнительные последовательности, известные в данной области, включали в анализ (H44A(-10+15) и H44A(-20+5); SEQ ID NO: 44 и 45, соответственно) для сравнения с вновь сконструированными олигомерами. Эти последовательности описаны в качестве SEQ ID NO: 4 и 2 в публикации PCT WO/2010/048586. Как показано на фиг. 5-6, все из диапазона олигомеров, располагающихся в области-мишени, определенной как H44A(-07+17), обладают способностью индуцировать пропускание экзона 44 на относительно высоких уровнях по сравнению с последовательностями, известными в данной области. Предпочтительные олигомеры представлены выше в примерах 2-7 (SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 1 и 8, соответственно).

Все публикации и патентные заявки, цитированные в настоящем описании, включены в описание в качестве ссылок, как если бы было конкретно и индивидуально указано, что каждая индивидуальная публикация или патентная заявка включена в качестве ссылки.

## Список последовательностей

| <u>Описание</u>                              | <u>Последовательность</u>         | <u>SEQ<br/>ID<br/>NO</u> |
|----------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| H44A(-07+17)                                 | CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG          | 1                        |
| H44A(-07+20)                                 | CAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG       | 2                        |
| H44A(-07+22)                                 | CTCAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG     | 3                        |
| H44A(-8+15)                                  | GAT CTG TCA AAT CGC CTG CAG GT    | 4                        |
| H44A(-7+15)                                  | GAT CTG TCA AAT CGC CTG CAG G     | 5                        |
| H44A(-6+15)                                  | GAT CTG TCA AAT CGC CTG CAG       | 6                        |
| H44A(-8+17)                                  | CAG ATC TGT CAA ATC GCC TGC AGG T | 7                        |
| H44A(-6+17)                                  | CAG ATC TGT CAA ATC GCC TGC AG    | 8                        |
| H44A(+77+101)                                | GTGTCTTTCTGAGAACTGTTTCAGC         | 9                        |
| H44A(+64+91)                                 | GAGAACTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCAC      | 10                       |
| H44A(+62+89)                                 | GAAACTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCACTG     | 11                       |
| H44A(+62+85)                                 | CTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCACTG         | 12                       |
| H44A(-06+14)                                 | ATCTGTCAAATCGCCTGCAG              | 13                       |
| H44A(+85+104)                                | TTTGTGTCTTTCTGAGAAAC              | 14                       |
| H44A(+61+84)                                 | TGTTTCAGCTTCTGTTAGCCACTGA         | 15                       |
| H44A(-10+15)                                 | GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAA         | 16                       |
| H44A(+64+88)                                 | AAACTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCAC        | 17                       |
| H44A(+79+103)                                | TTGTGTCTTTCTGAGAACTGTTCA          | 18                       |
| H44A(-06+20)                                 | CAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCAG        | 19                       |
| H44A(-09+17)                                 | CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTA        | 20                       |
| H44A(+59+85)                                 | CTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCACTGATT      | 21                       |
| H44A(+59+89)                                 | GAAACTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCACTGATT  | 22                       |
| H44A(+65+90)                                 | AGAAACTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCA       | 23                       |
| rTAT                                         | RRRQRRKKR                         | 24                       |
| Tat                                          | RKKRRQRRR                         | 25                       |
| R <sub>9</sub> F <sub>2</sub>                | RRRRRRRRRFF                       | 26                       |
| R <sub>5</sub> F <sub>2</sub> R <sub>4</sub> | RRRRRFFRRRR                       | 27                       |
| R <sub>4</sub>                               | RRRR                              | 28                       |
| R <sub>5</sub>                               | RRRRR                             | 29                       |
| R <sub>6</sub>                               | RRRRR                             | 30                       |

|                                        |                               |    |
|----------------------------------------|-------------------------------|----|
| R <sub>7</sub>                         | RRRRRRR                       | 31 |
| R <sub>8</sub>                         | RRRRRRRR                      | 32 |
| R <sub>9</sub>                         | RRRRRRRRR                     | 33 |
| (RX) <sub>8</sub>                      | RXXRXRXRXRXRXRX               | 34 |
| (RAh×R) <sub>4</sub> ;<br>(P007)       | RAh×RRAh×RRAh×RRAh×R          | 35 |
| (RAh×R) <sub>5</sub> ;<br>(CP04057)    | RAh×RRAh×RRAh×RRAh×RRAh×R     | 36 |
| (RAh×RRBR) <sub>2</sub> ;<br>(CP06062) | RAh×RRBRRAh×RRBR              | 37 |
| (RAR) <sub>4</sub> F <sub>2</sub>      | RARRARRARRARFF                | 38 |
| (RGR) <sub>4</sub> F <sub>2</sub>      | RGRRGRRGRGRGFF                | 39 |
| Праймер                                | caatgctcctgacctctgtgc         | 40 |
| Праймер                                | gctcttttccagggttcaagtgg       | 41 |
| Праймер                                | gtctacaacaagctcaggtcg         | 42 |
| Праймер                                | gcaatggtatctgcttcctccaacc     | 43 |
| H44A (-10+15)                          | GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAA     | 44 |
| H44A (-20+5)                           | ATCGCCTGCAGGTAAAAGCATATGG     | 45 |
| H44A (-13+14)                          | ATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAAAAG   | 46 |
| H44A (-14+15)                          | GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAAAAGC | 47 |

## Ссылки

Aartsma-Rus, A., A. A. Janson, et al. (2004). "Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense." *Am J Hum Genet* 74(1): 83-92.

Cirak, S., V. Arechavala-Gomez, et al. (2011). "Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study." *Lancet* 378(9791): 595-605.

Dunckley, M. G., I. C. Eperon, et al. (1997). "Modulation of splicing in the DMD gene by antisense oligoribonucleotides." *Nucleosides & Nucleotides* 16(7-9): 1665-1668.

Dunckley, M. G., M. Manoharan, et al. (1998). "Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured Mdx muscle cells by antisense oligoribonucleotides." *Hum Mol Genet* 7(7): 1083-90.

Errington, S. J., C. J. Mann, et al. (2003). "Target selection for antisense oligonucleotide induced exon skipping in the dystrophin gene." *J Gene Med* 5(6): 518-27.

Goemans, N. M., M. Tulinus, et al. (2011). "Systemic Administration of PRO051 in Duchenne's Muscular Dystrophy." *N Engl J Med*.

Jearawiriyapaisarn, N., H. M. Moulton, et al. (2008). "Sustained Dystrophin Expression Induced by Peptide-conjugated Morpholino Oligomers in the Muscles of mdx Mice." *Mol Ther*.

Kinali, M., V. Arechavala-Gomez, et al. (2009). "Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study." *Lancet Neurol* 8(10): 918-28.

Lu, Q. L., C. J. Mann, et al. (2003). "Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse." *Nat Med* 9(8): 1009-14.

Mann, C. J., K. Honeyman, et al. (2002). "Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy." *J Gene Med* 4(6): 644-54.

Marshall, N. B., S. K. Oda, et al. (2007). "Arginine-rich cell-penetrating peptides facilitate delivery of antisense oligomers into murine leukocytes and alter pre-mRNA splicing." *Journal of Immunological Methods* 325(1-2): 114-126.

Matsuo, M., T. Masumura, et al. (1991). "Exon skipping during splicing of dystrophin mRNA precursor due to an intraexon deletion in the dystrophin gene of Duchenne muscular dystrophy kobe." *J Clin Invest* 87(6): 2127-31.

Monaco, A. P., C. J. Bertelson, et al. (1988). "An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus." *Genomics* 2(1): 90-5.

Pramono, Z. A., Y. Takeshima, et al. (1996). "Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence." *Biochem Biophys Res Commun* 226(2): 445-9.

Sazani, P., R. Kole, et al. (2007). Splice switching oligomers for the TNF superfamily receptors and their use in treatment of disease. PCT WO2007058894, University of North Carolina

Sierakowska, H., M. J. Sambade, et al. (1996). "Repair of thalassemic human beta-globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(23): 12840-4.

Summerton, J. and D. Weller (1997). "Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7(3): 187-95.

Takeshima, Y., H. Nishio, et al. (1995). "Modulation of in vitro splicing of the upstream intron by modifying an intra-exon sequence which is deleted from the dystrophin gene in dystrophin Kobe." *J Clin Invest* 95(2): 515-20.

van Deutekom, J. C., M. Bremmer-Bout, et al. (2001). "Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells." *Hum Mol Genet* 10(15): 1547-54.

van Deutekom, J. C., A. A. Janson, et al. (2007). "Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051." N Engl J Med 357(26): 2677-86.

Wilton, S. D., A. M. Fall, et al. (2007). "Antisense oligonucleotide-induced exon skipping across the human dystrophin gene transcript." Mol Ther 15(7): 1288-96.

Wilton, S. D., F. Lloyd, et al. (1999). "Specific removal of the nonsense mutation from the mdx dystrophin mRNA using antisense oligonucleotides." Neuromuscul Disord 9(5): 330-8.

Wu, B., H. M. Moulton, et al. (2008). "Effective rescue of dystrophin improves cardiac function in dystrophin-deficient mice by a modified morpholino oligomer." Proc Natl Acad Sci U S A 105(39): 14814-9.

Yin, H., H. M. Moulton, et al. (2008). "Cell-penetrating peptide-conjugated antisense oligonucleotides restore systemic muscle and cardiac dystrophin expression and function." Hum Mol Genet 17(24): 3909-18.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антисмысловой олигонуклеотид, состоящий из 24 оснований и содержащий последовательность оснований, которая на 100% комплементарна мишени области экзона 44 пре-мРНК дистрофина человека,

где мишенивая область представляет собой участок отжига H44A(-07+17),

где основания указанного антисмыслового олигонуклеотида связаны с кольцевыми структурами морфолино, и

где указанные кольцевые структуры морфолино связаны фосфорсодержащими межсубъединичными связями, связывающими азот морфолино одной кольцевой структуры с 5'-экзоциклическим углеродом соседней кольцевой структуры, и

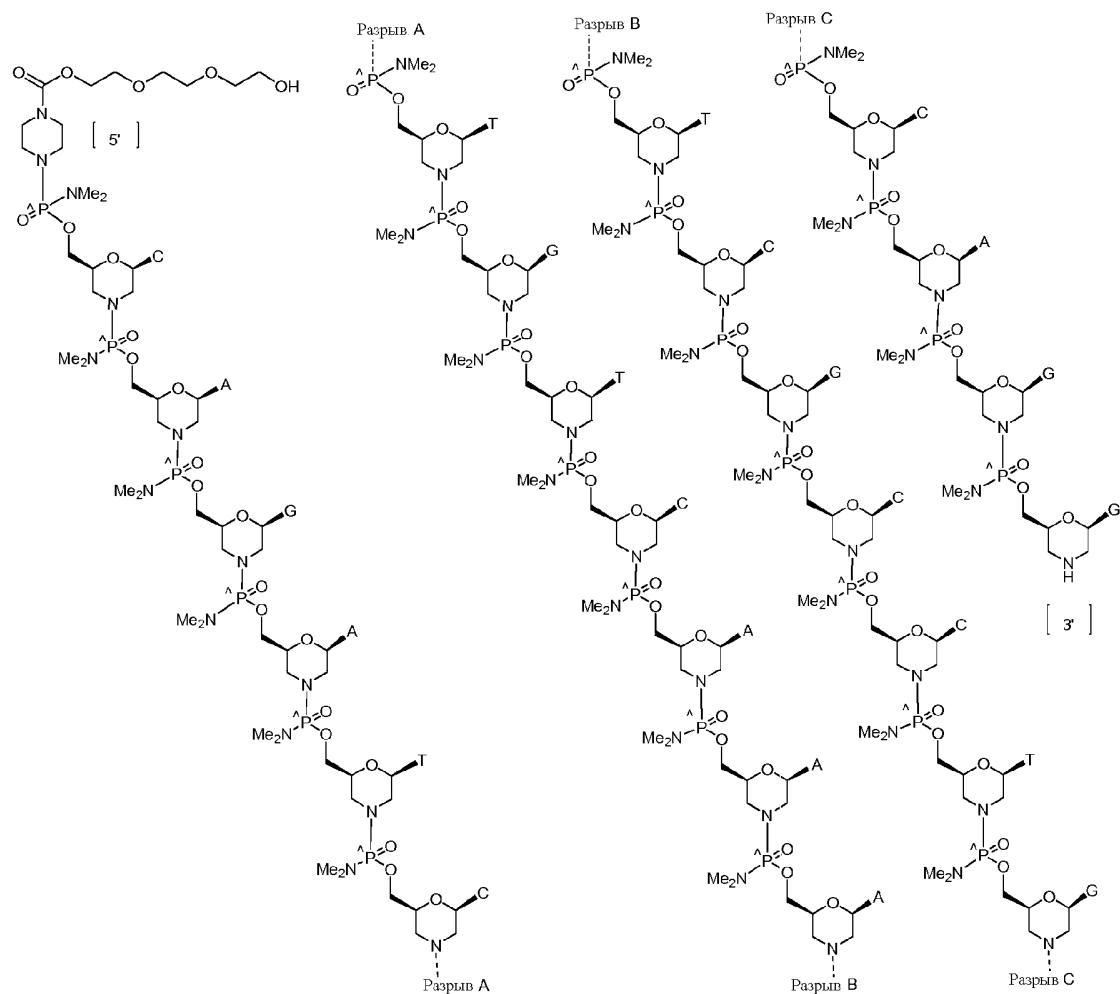
где антисмысловой олигонуклеотид индуцирует пропуск экзона 44,

или его фармацевтически приемлемая соль.

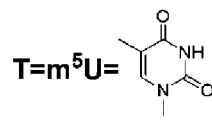
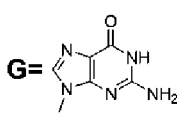
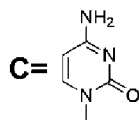
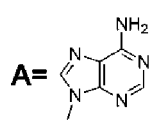
2. Антисмысловой олигонуклеотид по п.1, где последовательность представляет собой антисмысловой олигонуклеотид из 24 оснований и содержит последовательность CAG ATC TGT CAA ATC GCC TGC AGG (SEQ ID NO: 1), где тиминные основания необязательно заменены урациловыми основаниями; или его фармацевтически приемлемая соль.

3. Антисмысловой олигонуклеотид или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп.1 или 2, где олигонуклеотид химически связан с молекулой полиэтиленгликоля.

4. Антисмысловой олигонуклеотид, имеющий формулу



H44A(-7+17); и где



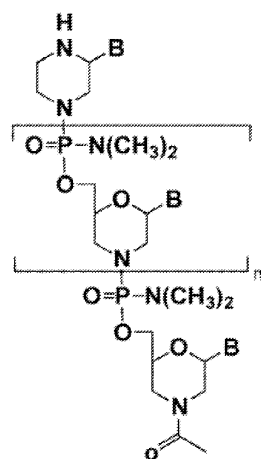
где ^ - стереохимия фосфорного центра не определена, или его фармацевтически приемлемая соль.

5. Фармацевтическая композиция, содержащая антисмысловой олигонуклеотид по любому из предшествующих пунктов и фармацевтически приемлемый носитель.

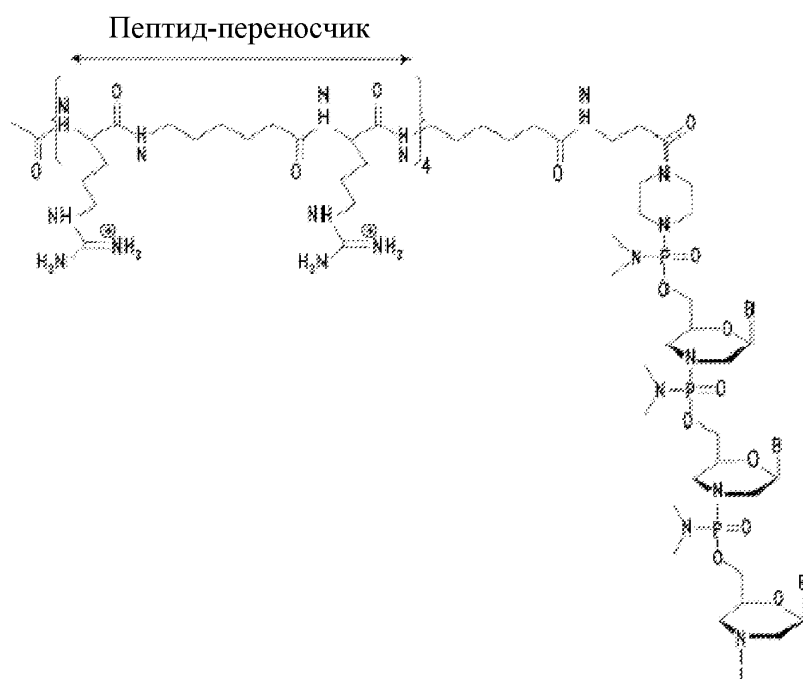
6. Композиция по п.5 для применения для лечения мышечной дистрофии.

7. Композиция по п.6, где мышечная дистрофия представляет собой мышечную дистрофию Дюшенна (DMD).

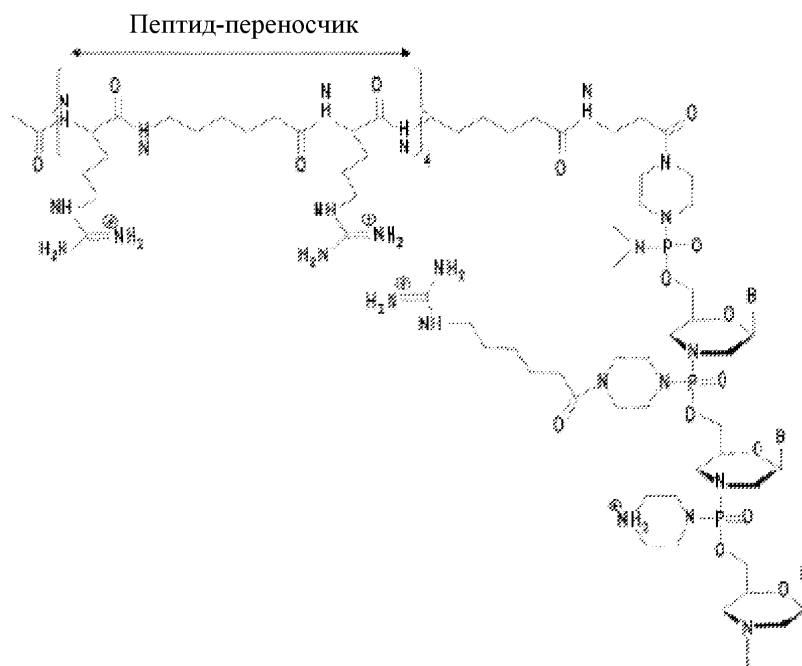
8. Композиция по п.6, где мышечная дистрофия представляет собой мышечную дистрофию Беккера (BMD).



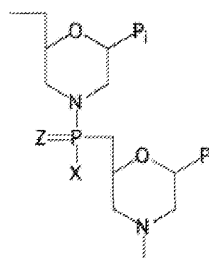
Фиг. 1А



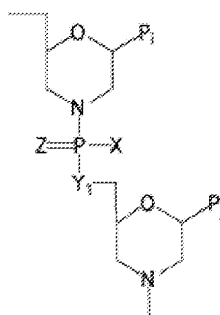
Фиг. 1В



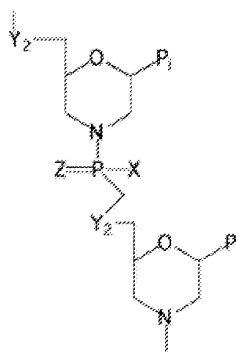
Фиг. 1С



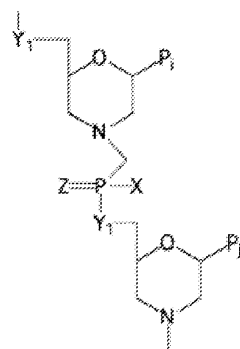
Фиг. 1D



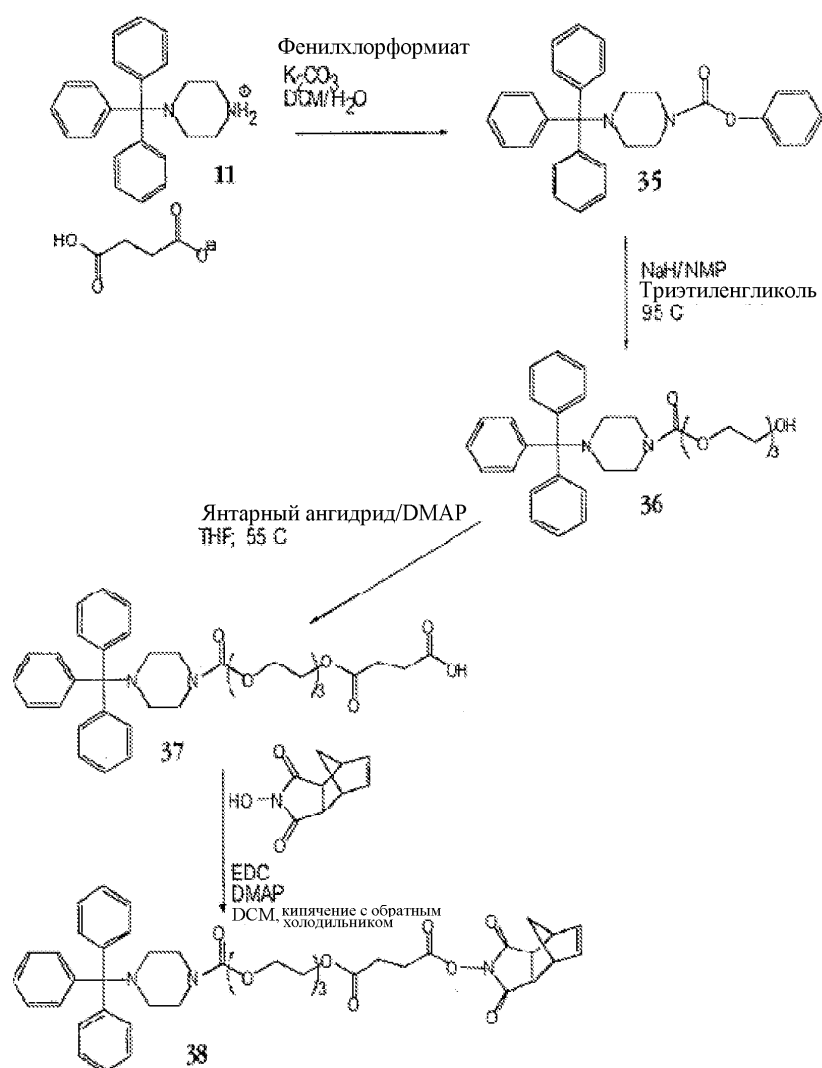
Фиг. 1E



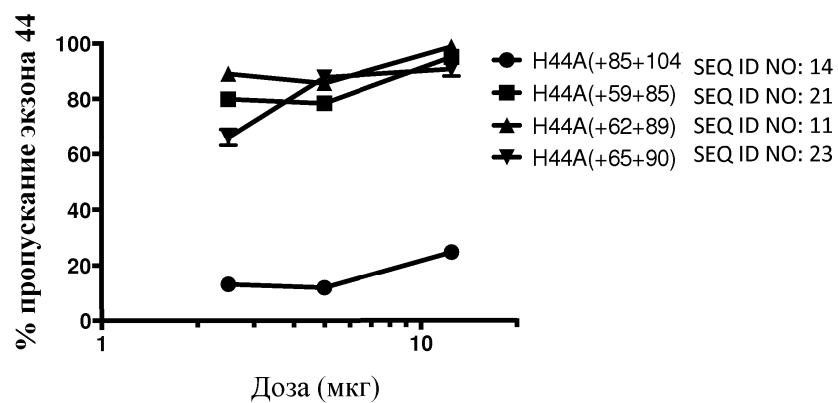
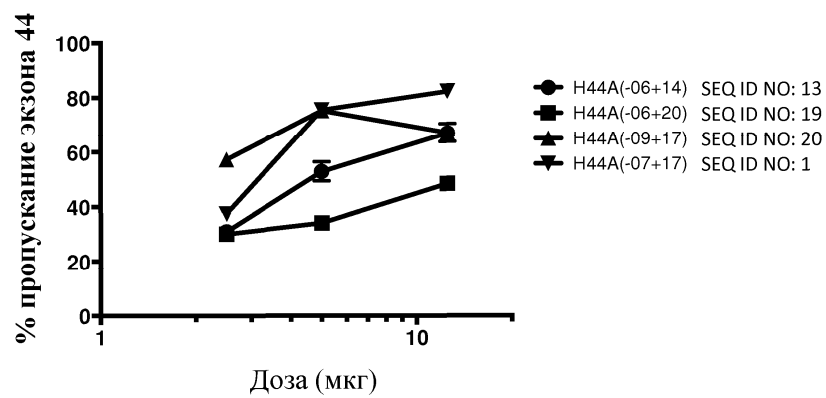
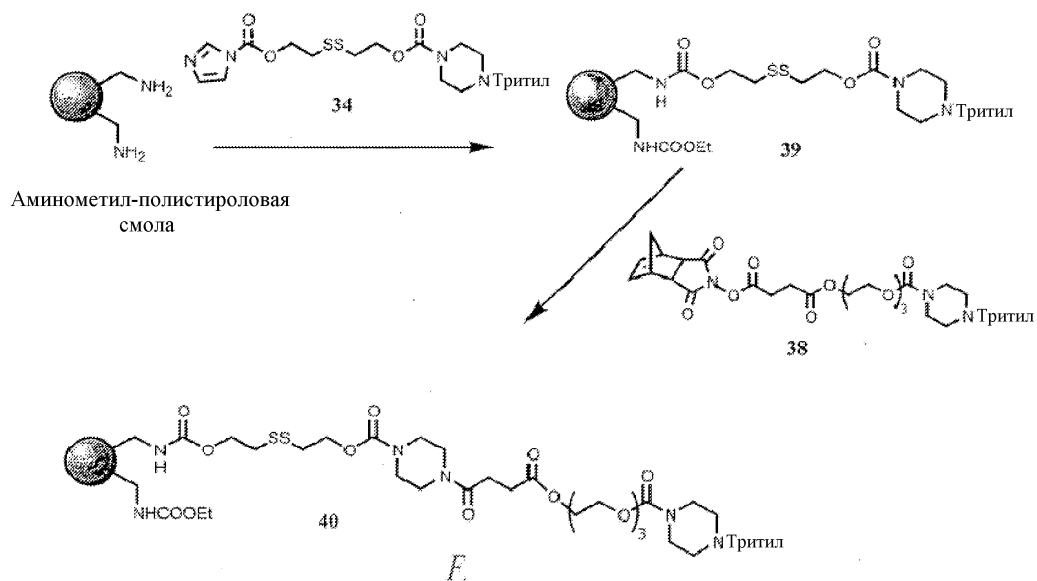
Фиг. 1F

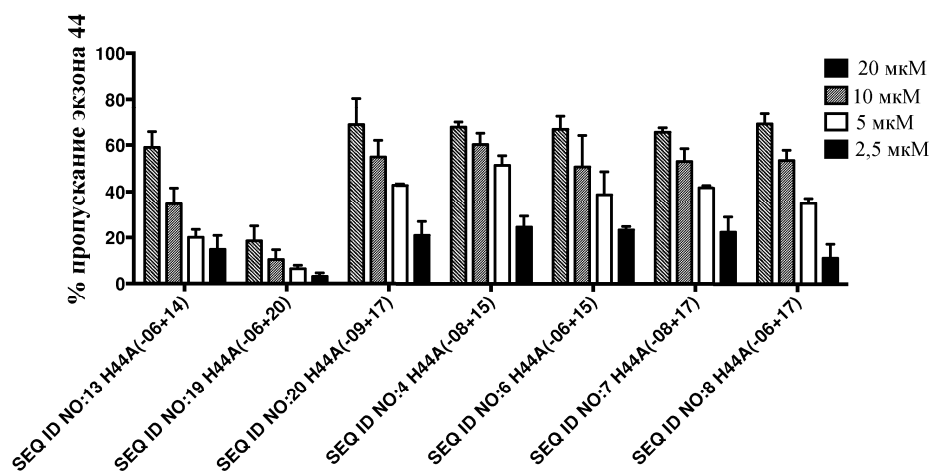


Фиг. 1G

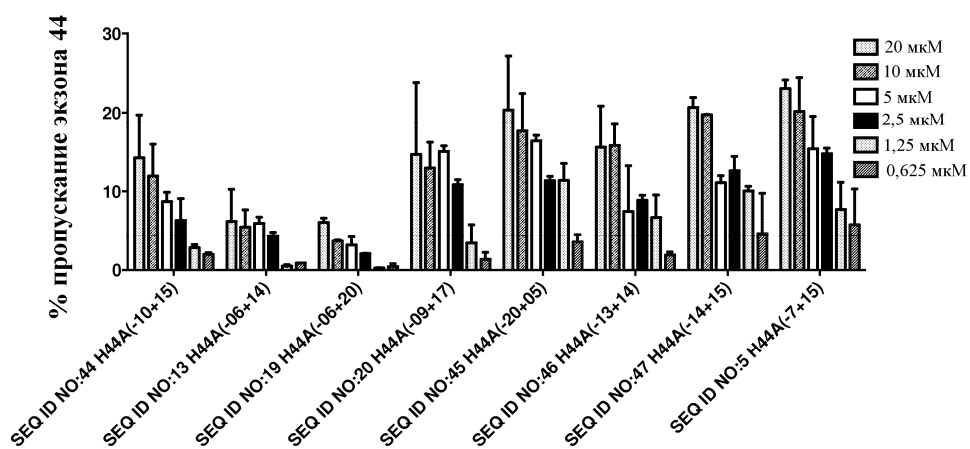


Фиг. 2A





Фиг. 5



Фиг. 6



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2