

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202090744** (13) **A1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

**(43)** Дата публикации заявки  
2020.07.13

**(51)** Int. Cl. *A61K 47/64* (2017.01)  
*A61P 21/00* (2006.01)

**(22)** Дата подачи заявки  
2018.06.01

---

**(54) КОНЬЮГАТЫ ОЛИГОМЕРОВ ДЛЯ ПРОПУСКА ЭКЗОНА ПРИ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ**

---

**(31)** 62/562,146; PCT/US2017/066509

**(72)** Изобретатель:

**(32)** 2017.09.22; 2017.12.14

**Пассини Марко А., Хансон Гуннар  
Дж. (US)**

**(33)** US

**(86)** PCT/US2018/035660

**(74)** Представитель:

**(87)** WO 2019/059973 2019.03.28

**Медведев В.Н. (RU)**

**(71)** Заявитель:

**САРЕПТА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.  
(US)**

---

**(57)** Описаны конъюгаты антисмысловых олигомеров, комплементарные выбранному целевому сайту в гене дистрофина человека, для индукции пропуска экзона 53.



**202090744**

**A1**

**A1**

**202090744**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-561980EA/026

### КОНЬЮГАТЫ ОЛИГОМЕРОВ ДЛЯ ПРОПУСКА ЭКЗОНА ПРИ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ

#### РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 62/562146, поданной 27 сентября 2017 г., и международной заявке на патент № PCT/US2017/066509, поданной 14 декабря 2017 г. Общие идеи вышеуказанных заявок включены посредством ссылки во всей их полноте.

#### ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия в формате ASCII, созданная 2 марта 2020 г., названа 814753WO01\_Sequence\_Listing.txt и ее размер составляет 3 кБайта.

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее раскрытие относится к новым конъюгатам антисмысловых олигомеров, подходящим для осуществления пропуска экзона 53 в гене дистрофина человека, и их фармацевтическим композициям. В настоящем раскрытии также предложены способы индукции пропуска экзона 53 с применением новых конъюгатов антисмысловых олигомеров, способы обеспечения продуцирования дистрофина у субъекта, имеющего мутацию гена дистрофина, которая может быть скорректирована при помощи пропуска экзона 53, и способы лечения субъекта, имеющего мутацию гена дистрофина, которая может быть скорректирована при помощи пропуска экзона 53.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Антисмысловые технологии разрабатываются с применением ряда химических веществ для воздействия на экспрессию генов на различных уровнях (транскрипции, сплайсинга, стабильности, трансляции). Значительная часть этих исследований сфокусирована на применении антисмысловых соединений для коррекции или компенсации аномальных или связанных с заболеванием генов при широком спектре показаний. Антисмысловые молекулы способны специфически подавлять экспрессию генов, и вследствие этого многие исследования, в которых олигомеры рассматривают в качестве модуляторов экспрессии генов, сфокусированы на подавлении экспрессии целевых генов или функции цис-регуляторных элементов. Антисмысловые олигомеры, как правило, нацелены на РНК: либо смысловую цепь (например, мРНК), либо минус-цепь в случае некоторых вирусных РНК-мишеней. Желаемый эффект специфической отрицательной регуляции генов обычно достигается за счет того, что олигомеры либо способствуют разрушению целевой мРНК, либо блокируют трансляцию мРНК, либо блокируют функцию цис-регуляторных элементов РНК, тем самым эффективно предотвращая либо синтез целевого белка de novo, либо репликацию вирусной РНК.

Однако такие методики непригодны в случаях, когда целью является положительная регуляция продукции нативного белка или компенсация мутаций, вызывающих преждевременную терминацию трансляции, таких как нонсенс-мутации или мутации, вызывающие сдвиг рамки считывания. В этих случаях транскрипт дефектного гена не должен подвергаться целенаправленной деградации или стерическому ингибированию, следовательно, химическое вещество, представляющее собой антисмысловой олигомер, не должно способствовать разрушению целевой мРНК или блокировать трансляцию.

При различных генетических заболеваниях влияние мутаций на возможную экспрессию гена можно модулировать посредством пропуска целевого экзона в процессе сплайсинга. Процесс сплайсинга регулируется сложным многокомпонентным механизмом, который обеспечивает сближение соседних участков соединения экзона и интрона в пре-мРНК и осуществляет расщепление фосфодиэфирных связей на концах интронов с последующим их образованием между экзонами, которые должны быть соединены в результате сплайсинга. Этот сложный и высокоточный процесс опосредуется мотивами последовательности в пре-мРНК, которые представляют собой относительно короткие полуконсервативные сегменты РНК, с которыми связываются различные ядерные факторы сплайсинга, которые затем принимают участие в реакциях сплайсинга. Изменение пути, с помощью которого механизм сплайсинга считывает или распознает мотивы, участвующие в процессинге пре-мРНК, обеспечивает возможность получения молекул мРНК посредством дифференциального сплайсинга. В настоящее время известно, что большинство генов человека подвергаются альтернативному сплайсингу во время нормальной экспрессии генов, хотя задействованные механизмы пока не установлены. В источнике Bennett et al. (патент США № 6210892) описана антисмысловая модуляция процессинга клеточной мРНК дикого типа с применением аналогов антисмысловых олигомеров, которые не вызывают опосредованного РНКазой H расщепления целевой РНК. Это находит применение в возможности получения путем альтернативного сплайсинга мРНК, лишенных конкретных экзонов (см., например, описанное в источнике Sazani, Kole, et al. 2007 для получения растворимых рецепторов, принадлежащих к суперсемейству рецепторов ФНО, которые лишены экзонов, кодирующих трансмембранные домены).

Было показано, что в тех случаях, когда в норме функциональный белок подвергается преждевременной терминации вследствие присутствия в нем мутаций, могут быть применены средства восстановления продуцирования некоторых функциональных белков с помощью антисмысловой технологии посредством вмешательства во время процессов сплайсинга, и что если экзоны, связанные с мутациями, вызывающими заболевания, могут быть специфическим образом удалены из некоторых генов, иногда может быть получен укороченный белковый продукт, который имеет биологические свойства, схожие со свойствами нативного белка, или обладает достаточной биологической активностью для облегчения заболевания, вызванного мутациями,

связанными с этим 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). В источнике Kole et al. (патенты США №№ 5627274, 5916808, 5976879 и 5665593) раскрыты способы противодействия aberrантному сплайсингу с применением модифицированных аналогов антисмысловых олигомеров, которые не способствуют разрушению целевой пре-мРНК. В источнике Bennett et al. (патент США № 6210892) также описана антисмысловая модуляция процессинга клеточной мРНК дикого типа с применением аналогов антисмысловых олигомеров, которые не вызывают опосредованного РНКазой N расщепления целевой РНК.

Метод пропуска целевого экзона представляется особенно подходящим для применения для генов большой длины, содержащих большое количество экзонов и интронов, где имеется избыточность в генетическом строении экзонов или где белок способен функционировать без одного или более конкретных экзонов. Усилия по перенаправлению процессинга генов для лечения генетических заболеваний, связанных с усечениями, обусловленными мутациями в различных генах, были сфокусированы на применении антисмысловых олигомеров, которые: (1) полностью или частично перекрываются с элементами, участвующими в процессе сплайсинга; или (2) связываются с пре-мРНК в положении, достаточно близком к элементу, чтобы нарушить связывание и функционирование факторов сплайсинга, которые обычно опосредуют конкретную реакцию сплайсинга, происходящую с участием этого элемента.

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) обусловлена дефектом в экспрессии белка дистрофина. Ген, кодирующий указанный белок, содержит 79 экзонов, представленных более чем 2 миллионами нуклеотидов ДНК. Любая экзонная мутация, которая изменяет рамку считывания экзона, или вводит стоп-кодон, или характеризуется удалением из рамки считывания целого экзона или экзонов, или дубликацией одного или более экзонов, потенциально может нарушать продуцирование функционального дистрофина, приводя к МДД.

Было обнаружено, что менее тяжелая форма мышечной дистрофии, мышечная дистрофия Беккера (МДБ), возникает в случае, если после мутации, как правило, делеции одного или более экзонов, образуется корректная рамка считывания на всем протяжении транскрипта дистрофина таким образом, что не происходит преждевременной терминации трансляции мРНК с образованием белка. Если присоединение вышележащих и нижележащих экзонов при процессинге пре-мРНК мутантного дистрофина сохраняет правильную рамку считывания гена, в результате образуется мРНК, кодирующая белок с короткой внутренней делецией, который сохраняет некоторую активность, что приводит к фенотипу Беккера.

Уже много лет известно, что делеции экзона или экзонов, которые не изменяют рамку считывания белка дистрофина, приводят к фенотипу МДБ, тогда как делеция экзона, которая вызывает сдвиг рамки считывания, приведет к возникновению МДД (Monaco, Bertelson et al. 1988). В целом мутации дистрофина, включая точечные мутации

и делеции экзонов, которые изменяют рамку считывания и таким образом нарушают правильную трансляцию белка, приводят к МДД. Следует также отметить, что некоторые пациенты с БМД и МДД имеют делеции экзонов, затрагивающие несколько экзонов.

Имеются сообщения о модуляции сплайсинга пре-мРНК мутантного дистрофина с применением антисмысловых олигорибонуклеотидов как *in vitro*, так и *in vivo* (см., например, Matsuo, Masumura et al. 1991; Takeshima, Nishio et al. 1995; Pramono, Takeshima et al. 1996; Dunckley, Eperon et al. 1997; Dunckley, Manoharan et al. 1998; Wilton, Lloyd et al. 1999; Mann, Honeyman et al. 2002; Errington, Mann et al. 2003).

Антисмысловые олигомеры были специально созданы для нацеливания на конкретные участки пре-мРНК, как правило экзоны, чтобы индуцировать пропуск мутации гена МДД, тем самым возвращая эти лежащие вне рамки считывания мутации в рамку считывания для обеспечения возможности продуцирования внутренне укороченного, однако функционального белка дистрофина. Известно, что такие антисмысловые олигомеры нацелены на мишени, полностью расположенные внутри экзона (так называемые внутренние последовательности экзонов) или на участок соединения донорного сайта сплайсинга или акцепторного сайта сплайсинга, соединяющий экзон с частью интрона.

Обнаружение и разработка таких антисмысловых олигомеров для МДД являлись основным направлением предшествующих исследований. Эти разработки включают разработки: (1) Университета Западной Австралии и Sarepta Therapeutics (заявитель настоящего изобретения): WO 2006/000057; WO 2010/048586; WO 2011/057350; WO 2014/100714; WO 2014/153240; WO 2014/153220; (2) Медицинского центра Лейденского университета (Academisch Ziekenhuis Leiden)/Prosensa Technologies (в настоящее время BioMarin Pharmaceutical): WO 02/24906; WO 2004/083432; WO 2004/083446; WO 2006/112705; WO 2007/133105; WO 2009/139630; WO 2009/054725; WO 2010/050801; WO 2010/050802; WO 2010/123369; WO 2013/112053; WO 2014/007620; (3) Carolinas Medical Center: WO 2012/109296; (4) колледжа Royal Holloway: патенты и заявки, испрашивающие приоритет на основании заявок на патенты США с серийными номерами 61/096073 и 61/164978 и включающие указанные заявки; такие как US 8084601 и US 2017-0204413 (4) JCR Pharmaceuticals и Matsuo: US 6653466; патенты и заявки, испрашивающие приоритет на основании JP 2000-125448, такие как US 6653467, и сама указанная заявка; патенты и заявки, испрашивающие приоритет на основании JP 2000-256547, такие как US 6727355, и сама указанная заявка; WO 2004/048570; (5) Nippon Shinyaku: WO 2012/029986; WO 2013/100190; WO 2015/137409; WO 2015/194520 и (6) Association Institut de Myologie/Universite Pierre et Marie Curie/Universität Bern/Centre national de la Recherche Scientifique/Synthena AG: WO 2010/115993; WO 2013/053928.

Обнаружение и разработка антисмысловых олигомеров, конъюгированных с проникающими в клетку пептидами, для МДД также являлись направлением исследований (см. публикацию PCT № WO 2010/048586; Wu, B. et al., *The American Journal of Pathology*, Vol.181 (2): 392-400, 2012; Wu, R. et al., *Nucleic Acids Research*, Vol.35

(15): 5182-5191, 2007; Mulders, S. et al., 19<sup>th</sup> International Congress of the World Muscle Society, Poster Presentation Berlin, October 2014; Bestas, B. et al., The Journal of Clinical Investigation, doi: 10.1172/JCI76175, 2014; Jearawiriyapaisarn, N. et al., Molecular Therapy, Vol.16(9): 1624-1629, 2008; Jearawiriyapaisarn, N. et al., Cardiovascular Research, Vol.85: 444-453, 2010; Moulton, H.M. et al., Biochemical Society Transactions, Vol.35 (4): 826-828, 2007; Yin, H. et al., Molecular Therapy, Vol.19 (7): 1295-1303, 2011; Abes, R. et al., J.Pept. Sci., Vol.14: 455-460, 2008; Lebleu, B. et al., Advanced Drug Delivery Reviews, Vol.60: 517-529, 2008; McClorey, G. et al., Gene Therapy, Vol. 13: 1373-1381, 2006 ; Alter, J. et al., Nature Medicine, Vol.12 (2): 175-177, 2006; и Youngblood, D. et al., American Chemical Society, Bioconjugate Chem., 2007, 18 (1), pp 50-60).

Проникающие в клетку пептиды (СРР), например, богатый аргинином транспортный фрагмент пептида, могут быть эффективны для усиления проникновения, например, антисмыслового олигомера, конъюгированного с СРР, в клетку.

Несмотря на эти усилия, остается потребность в улучшенных антисмысловых олигомерах, которые нацелены на экзон 53, и соответствующих фармацевтических композициях, которые потенциально могут быть применены для терапевтических способов продуцирования дистрофина и лечения МДД.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Конъюгаты антисмысловых олигомеров, предложенные в настоящем раскрытии, содержат фрагмент антисмыслового олигомера, конъюгированный с СРР. В одном аспекте настоящего раскрытия предложены конъюгаты антисмысловых олигомеров, содержащие:

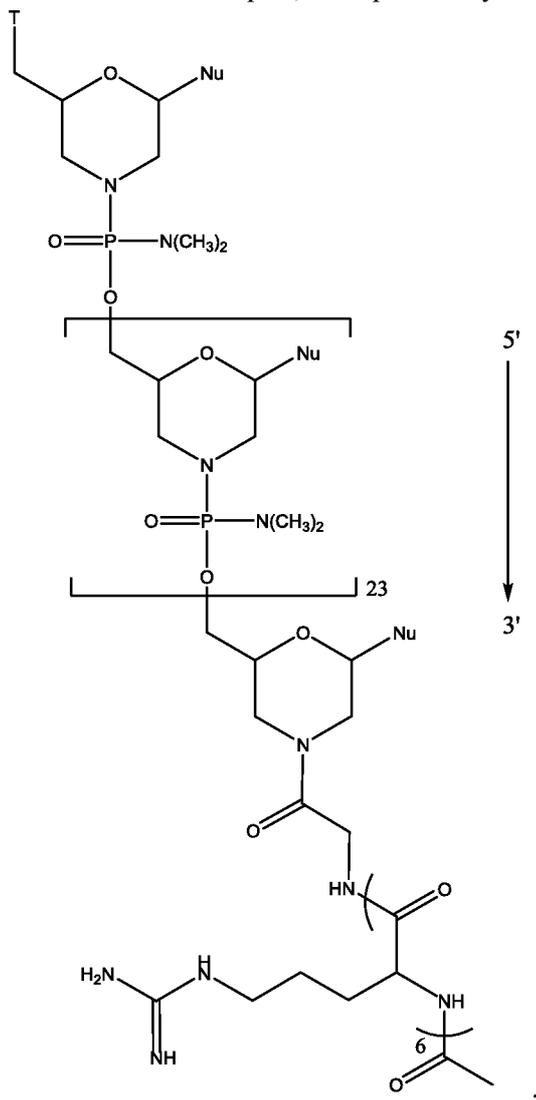
антисмысловой олигомер длиной 25 субъединиц, способный к связыванию выбранной мишени с индуцированием пропуска экзона в гене дистрофина человека, где антисмысловой олигомер содержит последовательность оснований, которая комплементарна целевому участку экзона 53 пре-мРНК дистрофина, обозначенному как сайт отжига; и

проникающий в клетку пептид (СРР), сопряженный с антисмысловым олигомером с помощью линкерного фрагмента.

В некоторых вариантах реализации сайт отжига представляет собой H53A(+36+60).

В некоторых вариантах реализации основания антисмыслового олигомера связаны с кольцевыми структурами на основе морфолиновой группы, где кольцевые структуры на основе морфолиновой группы присоединены с помощью фосфорсодержащих межсубъединичных связей, присоединяющих азот морфолиновой группы одной кольцевой структуры к 5'-экзоциклическому углероду смежной кольцевой структуры. В некоторых вариантах реализации проникающий в клетку пептид представляет собой шесть звеньев аргинина («R<sub>6</sub>»), и линкерный фрагмент представляет собой глицин. В некоторых вариантах реализации антисмысловой олигомер содержит последовательность оснований, обозначенную как SEQ ID NO: 1.

В различных аспектах настоящего раскрытия предложены конъюгаты антисмысловых олигомеров, которые могут соответствовать формуле (I),

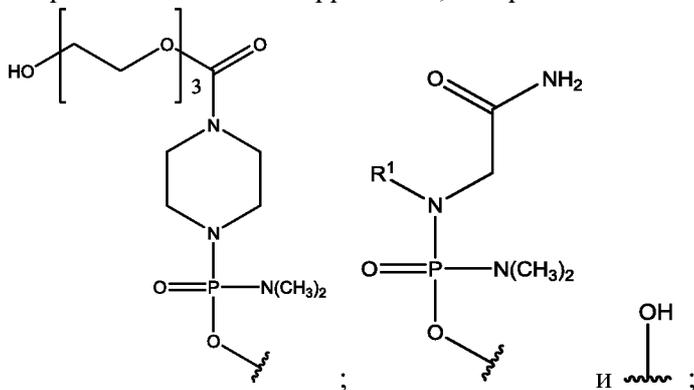


(I)

или их фармацевтически приемлемые соли, где:

каждый Nu представляет собой азотистое (нуклеотидное) основание, совместно с другими образующее нацеливающую последовательность; и

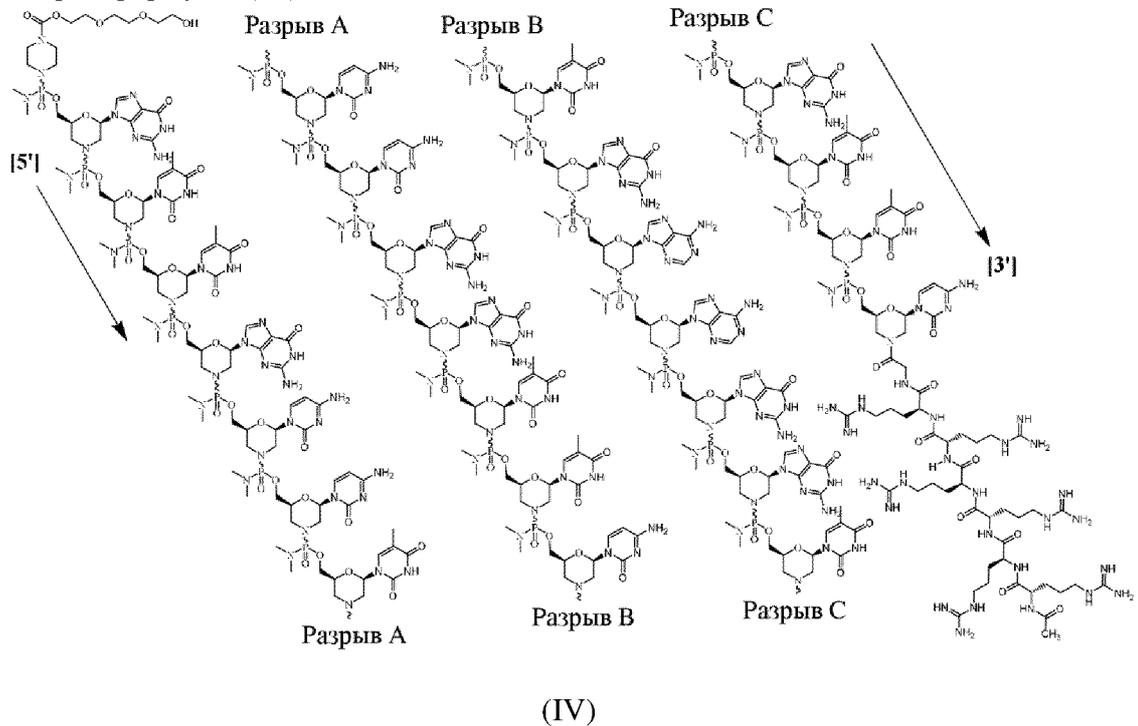
T представляет собой фрагмент, выбранный из:



$R^1$  представляет собой  $C_1$ - $C_6$ алкил;

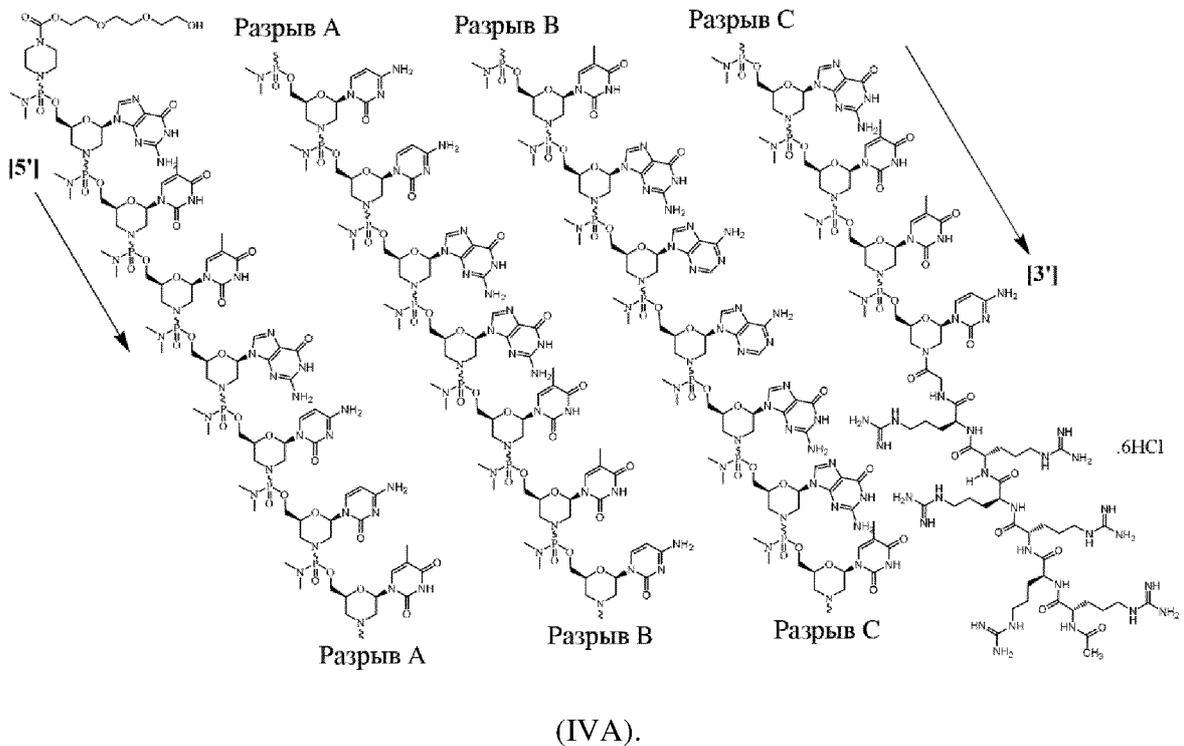
где нацеливающая последовательность комплементарна сайту отжига экзона 53 в пре-мРНК дистрофина, обозначенному как H53A(+36+60).

В другом аспекте настоящего раскрытия предложены конъюгаты антисмысловых олигомеров формулы (IV),



или их фармацевтически приемлемые соли.

В другом аспекте настоящего раскрытия предложены конъюгаты антисмысловых олигомеров формулы (IVA),



В другом аспекте настоящего раскрытия предложены фармацевтические композиции, которые содержат конъюгаты антисмысловых олигомеров согласно

настоящему раскрытию и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах реализации фармацевтически приемлемый носитель представляет собой солевой раствор, содержащий фосфатный буфер.

В другом аспекте настоящего раскрытия предложен способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (МДД) у субъекта, нуждающегося в этом, где указанный субъект имеет мутацию гена дистрофина, которая может быть скорректирована при помощи пропуска экзона 53, причем указанный способ включает введение субъекту конъюгата антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию. Настоящее раскрытие также относится к применению конъюгатов антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию для изготовления лекарственного средства для лечения мышечной дистрофии Дюшенна (МДД) у субъекта, нуждающегося в этом, где указанный субъект имеет мутацию гена дистрофина, которая может быть скорректирована при помощи пропуска экзона 53.

В другом аспекте настоящего раскрытия предложен способ восстановления рамки считывания мРНК для осуществления индукции продуцирования дистрофина у субъекта, имеющего мутацию гена дистрофина, которая может быть скорректирована при помощи пропуска экзона 53, причем указанный способ включает введение субъекту конъюгата антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию. В другом аспекте настоящего раскрытия предложен способ исключения экзона 53 из пре-мРНК дистрофина в ходе процессинга мРНК у субъекта, имеющего мутацию гена дистрофина, которая может быть скорректирована при помощи пропуска экзона 53, причем указанный способ включает введение субъекту конъюгата антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию. В другом аспекте настоящего раскрытия предложен способ связывания экзона 53 пре-мРНК дистрофина у субъекта, имеющего мутацию гена дистрофина, которая может быть скорректирована при помощи пропуска экзона 53, причем указанный способ включает введение субъекту конъюгата антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию.

В другом аспекте настоящего раскрытия предложен конъюгат антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию для применения в терапии. В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия предложен конъюгат антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию для применения для лечения мышечной дистрофии Дюшенна. В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия предложен конъюгат антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию для применения для изготовления лекарственного средства для применения в терапии. В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия предложен конъюгат антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию для применения для изготовления лекарственного средства для лечения мышечной дистрофии Дюшенна.

В другом аспекте настоящего раскрытия также предложены наборы для лечения мышечной дистрофии Дюшенна (МДД) у субъекта, нуждающегося в этом, где указанный субъект имеет мутацию гена дистрофина, которая может быть скорректирована при

помощи пропуска экзона 53, содержащие по меньшей мере конъюгат антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию, упакованный в подходящую емкость, и инструкции по его применению.

Эти и другие задачи и признаки будут более понятны при рассмотрении следующего подробного описания совместно с чертежами.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На **фигуре 1** изображена часть нормальной пре-мРНК дистрофина и зрелой мРНК.

На **фигуре 2** изображена часть аномальной пре-мРНК дистрофина (пример МДД) и образующийся нефункциональный, нестабильный дистрофин.

На **фигуре 3** изображен этеплирсен, выполненный с возможностью обеспечения пропуска экзона 51, восстановления считывания пре-мРНК в рамке считывания.

На **фигуре 4** приведена столбчатая диаграмма процентной доли пропуска экзона 53 в здоровых миоблестах человека с применением РМО#1 и РРМО#1 в различных концентрациях через 96 часов после введения, определенной методом ОТ-ПЦР. Планки погрешностей представляют среднее  $\pm$  С.О.

На **фигурах 5A-5D** приведены представительные изображения, полученные при анализе методом вестерн-блоттинга при определении белка дистрофина в четырехглавой мышце мышей mdx, которым вводили РМО (РМО4225) или РРМО (РРМО4225), в различные моменты времени [7 дней (5A), 30 дней (5B), 60 дней (5C) и 90 дней (5D)].

На **фигуре 6A** приведена линейная диаграмма, отображающая процентную долю дистрофина дикого типа, индуцированного с применением РМО (РМО4225) или РРМО (РРМО4225), в четырехглавой мышце мышей mdx через 90 дней после инъекции, определенную с помощью анализа методом вестерн-блоттинга.

На **фигуре 6B** приведена линейная диаграмма, отображающая процентную долю пропуска экзона 23, индуцированного с применением РМО (РМО4225) или РРМО (РРМО4225), в четырехглавой мышце мышей mdx через 90 дней после инъекции, определенную методом ОТ-ПЦР.

На **фигурах 7A-7D** приведены представительные изображения, полученные при анализе методом вестерн-блоттинга при определении белка дистрофина в диафрагме мышей mdx, которым вводили РМО (РМО4225) или РРМО (РРМО4225), в различные моменты времени [7 дней (7A), 30 дней (7B), 60 дней (7C) и 90 дней (7D)].

На **фигуре 8A** приведена линейная диаграмма, отображающая процентную долю дистрофина дикого типа, индуцированного с применением РМО (РМО4225) или РРМО (РРМО4225), в диафрагме мышей mdx через 90 дней после инъекции, определенную с помощью анализа методом вестерн-блоттинга.

На **фигуре 8B** приведена линейная диаграмма, отображающая процентную долю пропуска экзона 23, индуцированного с применением РМО (РМО4225) или РРМО (РРМО4225), в диафрагме мышей mdx через 90 дней после инъекции, определенную методом ОТ-ПЦР.

На **фигурах 9А-9D** приведены представительные изображения, полученные при анализе методом вестерн-блоттинга при определении белка дистрофина в сердце мышей mdx, которым вводили РМО (РМО4225) или РРМО (РРМО4225), в различные моменты времени [7 дней (9А), 30 дней (9В), 60 дней (9С) и 90 дней (9D)].

На **фигуре 10А** приведена линейная диаграмма, отображающая процентную долю дистрофина дикого типа, индуцированного с применением РМО (РМО4225) или РРМО (РРМО4225), в сердце мышей mdx через 90 дней после инъекции, определенную с помощью анализа методом вестерн-блоттинга.

На **фигуре 10В** приведена линейная диаграмма, отображающая процентную долю пропуска экзона 23, индуцированного с применением РМО (РМО4225) или РРМО (РРМО4225), в сердце мышей mdx через 90 дней после инъекции, определенную методом ОТ-ПЦР.

На **фигуре 11** приведен иммуногистохимический анализ, демонстрирующий дистрофин в левой четырехглавой мышце мышей mdx, индуцированный с применением РМО (РМО4225) или РРМО (РРМО4225).

На **фигурах 12А-В** приведены представительные изображения, полученные при анализе методом вестерн-блоттинга при определении белка дистрофина в сердце мышей mdx, которым вводили РМО (РМО4225) или РРМО (РРМО4225), для различных доз: 40 мг/кг, 80 мг/кг и 120 мг/кг.

На **фигуре 13** приведена столбчатая диаграмма, отображающая процентную долю дистрофина дикого типа, индуцированного с применением РМО (РМО4225) или РРМО (РРМО4225), в сердце мышей mdx, определенную с помощью анализа методом вестерн-блоттинга через 30 дней после инъекции в различных дозах: 40 мг/кг, 80 мг/кг и 120 мг/кг.

На **фигурах 14А-В** приведены представительные изображения, полученные при анализе методом вестерн-блоттинга при определении белка дистрофина в диафрагме мышей mdx, которым вводили РМО (РМО4225) или РРМО (РРМО4225), для различных доз: 40 мг/кг, 80 мг/кг и 120 мг/кг.

На **фигуре 15** приведена столбчатая диаграмма, отображающая процентную долю дистрофина дикого типа, индуцированного с применением РМО (РМО4225) или РРМО (РРМО4225), в диафрагме мышей mdx, определенную с помощью анализа методом вестерн-блоттинга через 30 дней после инъекции в различных дозах: 40 мг/кг, 80 мг/кг и 120 мг/кг.

На **фигурах 16А-В** приведены представительные изображения, полученные при анализе методом вестерн-блоттинга при определении белка дистрофина в четырехглавой мышце мышей mdx, которым вводили РМО (РМО4225) или РРМО (РРМО4225) в различных дозах: 40 мг/кг, 80 мг/кг и 120 мг/кг.

На **фигуре 17** приведена столбчатая диаграмма, отображающая процентную долю дистрофина дикого типа, индуцированного с применением РМО (РМО4225) или РРМО (РРМО4225), в четырехглавой мышце мышей mdx, определенную с помощью анализа

методом вестерн-блоттинга через 30 дней после инъекции в различных дозах: 40 мг/кг, 80 мг/кг и 120 мг/кг.

На **фигуре 18** приведены циклы сочетания, выполняемые при осуществлении способа В синтеза РМО.

На **фигуре 19** приведен иммуногистохимический анализ, демонстрирующий дистрофин и ламинин в диафрагме и сердце мышей mdx, индуцированные с применением РРМО (РРМО4225), в сравнении с применением солевого раствора у мышей mdx и мышей дикого типа.

На **фигуре 20** приведена линейная диаграмма, демонстрирующая процент пропуска экзона 53 у приматов, не являющихся людьми, которым вводили РМО#1 или РРМО#1 еженедельно в течение четырех недель при разных дозах. Процент пропуска экзона 53 измеряли в образцах мышц четырехглавой мышцы с определением методом ОТ-ПЦР.

На **фигуре 21** приведена линейная диаграмма, демонстрирующая процент пропуска экзона 53 у приматов, не являющихся людьми, которым вводили РМО#1 или РРМО#1 еженедельно в течение четырех недель при разных дозах. Процент пропуска экзона 53 измеряли в образцах мышц диафрагмы с определением методом ОТ-ПЦР.

На **фигуре 22** приведена линейная диаграмма, демонстрирующая процент пропуска экзона 53 у приматов, не являющихся людьми, которым вводили РМО#1 или РРМО#1 еженедельно в течение четырех недель при разных дозах. Процент пропуска экзона 53 измеряли в образцах мышц сердца с определением методом ОТ-ПЦР.

На **фигуре 23** приведена линейная диаграмма, демонстрирующая процент пропуска экзона 53 у приматов, не являющихся людьми, которым вводили РМО#1 или РРМО#1 еженедельно в течение четырех недель при разных дозах. Процент пропуска экзона 53 измеряли в образцах мышц двуглавой мышцы с определением методом ОТ-ПЦР.

На **фигуре 24** приведена линейная диаграмма, демонстрирующая процент пропуска экзона 53 у приматов, не являющихся людьми, которым вводили РМО#1 или РРМО#1 еженедельно в течение четырех недель при разных дозах. Процент пропуска экзона 53 измеряли в образцах мышц дельтовидной мышцы с определением методом ОТ-ПЦР.

На **фигуре 25** приведена линейная диаграмма, демонстрирующая процент пропуска экзона 53 у приматов, не являющихся людьми, которым вводили РМО#1 или РРМО#1 еженедельно в течение четырех недель при разных дозах. Процент пропуска экзона 53 измеряли в образцах мышц аорты с определением методом ОТ-ПЦР.

На **фигуре 26** приведена линейная диаграмма, демонстрирующая процент пропуска экзона 53 у приматов, не являющихся людьми, которым вводили РМО#1 или РРМО#1 еженедельно в течение четырех недель при разных дозах. Процент пропуска экзона 53 измеряли в образцах мышц двенадцатиперстной кишки с определением методом ОТ-ПЦР.

На **фигуре 27** приведена линейная диаграмма, демонстрирующая процент пропуска экзона 53 у приматов, не являющихся людьми, которым вводили РМО#1 или РРМО#1 еженедельно в течение четырех недель при разных дозах. Процент пропуска экзона 53 измеряли в образцах мышц толстой кишки с определением методом ОТ-ПЦР.

На **фигуре 28** приведена столбчатая диаграмма процентной доли пропуска экзона 53 в миобластах здорового человека с применением РМО#1 и РРМО#1 в различных концентрациях через 96 часов после введения, определенной методом ОТ-ПЦР. Планки погрешностей представляют среднее  $\pm$  С.О.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Варианты реализации настоящего раскрытия в целом относятся к улучшенным конъюгатам антисмысловых олигомеров и способам их применения, которые специально выполнены с возможностью обеспечения индукции пропуска экзона в гене дистрофина человека. Дистрофин играет жизненно важную роль в функции мышц, и различные связанные с мышцами заболевания характеризуются мутантными формами этого гена. Соответственно, в некоторых вариантах реализации улучшенные конъюгаты антисмысловых олигомеров, описанные в настоящем документе, индуцируют пропуск экзона в мутантных формах гена дистрофина человека, таких как мутантные гены дистрофина, обнаруженные при мышечной дистрофии Дюшенна (МДД) и мышечной дистрофии Беккера (МДБ).

Вследствие аберрантных событий сплайсинга мРНК, вызванных мутациями, экспрессия этих мутантных генов дистрофина человека приводит либо к образованию дефектного белка дистрофина, либо вообще не приводит к образованию определяемых количеств дистрофина - состояние, которое ведет к различным формам мышечной дистрофии. Для коррекции этого состояния осуществляют гибридизацию конъюгатов антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию с выбранными участками препроцессированной мРНК мутантного гена дистрофина человека, индуцируют пропуск экзона и дифференциальный сплайсинг в этой, в противном случае подвергающейся аберрантному сплайсингу, мРНК дистрофина, и тем самым обеспечивают возможность продуцирования мышечными клетками транскрипта мРНК, который кодирует функциональный белок дистрофин. В некоторых вариантах реализации полученный белок дистрофин не обязательно представляет собой форму дистрофина «дикого типа», а скорее представляет собой усеченную, но функциональную форму дистрофина.

Благодаря повышению содержания функционального белка дистрофина в мышечных клетках, эти и подобные варианты реализации пригодны для применения для профилактики и лечения мышечной дистрофии, в частности, таких форм мышечной дистрофии, как МДД и МДБ, которые характеризуются экспрессией дефектных форм белка дистрофина вследствие аберрантного сплайсинга мРНК. Конкретные конъюгаты антисмысловых олигомеров, описанные в настоящем документе, дополнительно обеспечивают улучшенное, специфичное для экзона дистрофина нацеливание по сравнению с другими олигомерами, и, таким образом, имеют значительные и применимые

на практике преимущества по сравнению с альтернативными способами лечения соответствующих форм мышечной дистрофии.

Таким образом, настоящее раскрытие относится к конъюгатам антисмысловых олигомеров, содержащим:

антисмысловой олигомер длиной 25 субъединиц, способный к связыванию выбранной мишени с индуцированием пропуска экзона в гене дистрофина человека, где антисмысловой олигомер содержит последовательность оснований, которая комплементарна целевому участку экзона 53 пре-мРНК дистрофина, обозначенному как сайт отжига; и

проникающий в клетку пептид (СРР), сопряженный с антисмысловым олигомером с помощью линкерного фрагмента.

В некоторых вариантах реализации сайт отжига представляет собой H53A(+36+60).

В некоторых вариантах реализации основания антисмыслового олигомера связаны с кольцевыми структурами на основе морфолиновой группы, где кольцевые структуры на основе морфолиновой группы присоединены с помощью фосфорсодержащих межсубъединичных связей, присоединяющих азот морфолиновой группы одной кольцевой структуры к 5'-экзоциклическому углероду смежной кольцевой структуры. В некоторых вариантах реализации проникающий в клетку пептид представляет собой R<sub>6</sub>, и линкерный фрагмент представляет собой глицин. В некоторых вариантах реализации антисмысловой олигомер содержит последовательность оснований, обозначенную как SEQ ID NO: 1, где каждое основание-производное тимина (Т) необязательно представляет собой основание-производное урацила (U).

Если не указано иное, все технические и научные термины в контексте настоящего описания имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится настоящее раскрытие. Несмотря на то, что при осуществлении или тестировании настоящего изобретения могут применяться любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, описаны предпочтительные способы и материалы. Для целей настоящего раскрытия ниже определены следующие термины.

### **I. Определения**

Под термином «примерно» подразумевается количество, уровень, значение, число, частота, процентная доля, величина, размер, число, масса или длина, которые изменяются в пределах 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% по отношению к указанному количеству, уровню, значению, числу, частоте, процентной доле, величине, размеру, числу, массе или длине.

Термин «алкил» согласно настоящему раскрытию, если не указано иное, относится к насыщенному углеводороду с неразветвленной или разветвленной цепью. В некоторых вариантах реализации алкильная группа представляет собой первичный, вторичный или третичный углеводород. В некоторых вариантах реализации алкильная группа содержит от одного до десяти атомов углерода, то есть представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкил. В

некоторых вариантах реализации алкильная группа содержит от одного до шести атомов углерода, то есть представляет собой  $C_1$ - $C_6$  алкил. В некоторых вариантах реализации алкильная группа выбрана из группы, состоящей из метила,  $CF_3$ ,  $CCl_3$ ,  $CFCl_2$ ,  $CF_2Cl$ , этила,  $CH_2CF_3$ ,  $CF_2CF_3$ , пропила, изопрпила, бутила, изобутила, втор-бутила, т-бутила, пентила, изопентила, неопентила, гексила, изогексила, 3-метилпентила, 2,2-диметилбутила и 2,3-диметилбутила. Термин включает как замещенные, так и незамещенные алкильные группы, включая галогенированные алкильные группы. В некоторых вариантах реализации алкильная группа представляет собой фторированную алкильную группу. Неограничивающие примеры фрагментов, которыми алкильная группа может быть замещена, выбраны из группы, состоящей из галогена (фтора, хлора, брома или иода), гидроксила, амина, алкиламина, ариламина, алкокси, арилокси, нитро, циано, сульфоновой кислоты, сульфата, фосфоновой кислоты, фосфата или фосфоната, либо незащищенных, либо защищенных в случае необходимости, как известно специалистам в данной области техники, например, как указано в источнике Greene, et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, Second Edition, 1991, включенном в настоящее описание посредством ссылки.

Подразумевается, что термин «которая может быть скорректирована при помощи пропуска экзона 53», используемый в настоящем документе применительно к субъекту или пациенту, включает субъектов и пациентов, имеющих одну или более мутаций в гене дистрофина, которые в отсутствие пропуска экзона 53 пре-мРНК дистрофина вызывают сдвиг рамки считывания, тем самым нарушая трансляцию пре-мРНК, что приводит к невозможности продуцирования функционального или полужункционального дистрофина у указанного субъекта или пациента. Примеры мутаций в гене дистрофина, которые могут быть скорректированы при помощи пропуска экзона 53, включают, например, делецию: экзонов с 42 по 52, экзонов с 45 по 52, экзонов с 47 по 52, экзонов с 48 по 52, экзонов с 49 по 52, экзонов с 50 по 52 или экзона 52. Определение наличия у пациента мутации в гене дистрофина, которая может быть скорректирована при помощи пропуска экзона, находится в компетенции специалиста в данной области техники (см., например, Aartsma-Rus et al. (2009) *Hum Mutat.* 30:293-299; Gurvich et al., *Hum Mutat.* 2009; 30(4) 633-640; и Fletcher et al. (2010) *Molecular Therapy* 18(6) 1218-1223).

Термин «олигомер» согласно настоящему раскрытию относится к последовательности субъединиц, соединенных межсубъединичными связями. В некоторых случаях термин «олигомер» используется для обозначения «антисмыслового олигомера». В случае «антисмысловых олигомеров» каждая субъединица состоит из: (i) сахара рибозы или его производного и (ii) азотистого (нуклеотидного) основания, связанного с ним таким образом, что порядок спаривающихся фрагментов оснований образует последовательность оснований, комплементарную целевой последовательности в нуклеиновой кислоте (как правило, РНК) согласно правилу спаривания оснований Уотсона-Крика, с получением гетеродуплекса нуклеиновая кислота:олигомер в пределах целевой последовательности при условии, что либо субъединица, либо межсубъединичная

связь, либо и то и другое не являются встречающимися в природе. В некоторых вариантах реализации антисмысловой олигомер представляет собой олигомер фосфородиамидата морфолина (РМО). В других вариантах реализации антисмысловой олигомер представляет собой 2'-О-метилфосфоротиоат. В других вариантах реализации антисмысловой олигомер согласно настоящему раскрытию представляет собой пептидо-нуклеиновую кислоту (ПНК), закрытую нуклеиновую кислоту (ЗНК) или мостиковую нуклеиновую кислоту (МНК), такую как нуклеиновая кислота с 2'-О,4'-С-этиленовым мостиком (ЕНА). Другие примеры реализации описаны в настоящем раскрытии.

Термины «комплементарный» и «комплементарность» относятся к двум или более олигомерам (каждый из которых содержит последовательность азотистых (нуклеотидных) оснований), которые связаны друг с другом по правилам спаривания оснований Уотсона-Крика. Например, последовательность азотистых (нуклеотидных) оснований «Т-Г-А (5'□3')» комплементарна последовательности азотистых (нуклеотидных) оснований «А-С-Т (3'□5')». Комплементарность может быть «частичной», когда менее всех азотистых (нуклеотидных) оснований данной последовательности азотистых (нуклеотидных) оснований соответствуют другой последовательности азотистых (нуклеотидных) оснований согласно правилам спаривания оснований. Например, в некоторых вариантах реализации комплементарность между данной последовательностью азотистых (нуклеотидных) оснований и другой последовательностью азотистых (нуклеотидных) оснований может составлять примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90% или примерно 95%. Или, в качестве продолжения примера, возможна «полная» или «абсолютная» (100%) комплементарность между данной последовательностью азотистых (нуклеотидных) оснований и другой последовательностью азотистых (нуклеотидных) оснований. Степень комплементарности между последовательностями азотистых (нуклеотидных) оснований оказывает существенное влияние на эффективность и силу гибридизации данных последовательностей.

Термины «эффективное количество» и «терапевтически эффективное количество» согласно настоящему раскрытию используются взаимозаменяемо и относятся к количеству терапевтического соединения, такого как антисмысловой олигомер, которое вводят субъекту-млекопитающему либо в виде однократной дозы, либо в виде части серии доз, которое является эффективным для получения желаемого терапевтического эффекта. Для антисмыслового олигомера этот эффект, как правило, достигается путем подавления трансляции или естественного сплайсинга-процессинга выбранной целевой последовательности или продуцирования клинически значимого количества дистрофина (статистическая значимость).

В некоторых вариантах реализации эффективное количество составляет по меньшей мере 10 мг/кг или по меньшей мере 20 мг/кг композиции, содержащей антисмысловой олигомер, в течение периода лечения субъекта. В некоторых вариантах реализации эффективное количество составляет по меньшей мере 20 мг/кг композиции,

содержащей антисмысловой олигомер, для увеличения количества дистрофин-положительных волокон у субъекта по меньшей мере до 20% от нормы. В некоторых вариантах реализации эффективное количество составляет по меньшей мере 10 мг/кг или по меньшей мере 20 мг/кг композиции, содержащей антисмысловой олигомер, для стабилизации, поддержания или улучшения расстояния ходьбы у пациента до не более чем 20% дефицита, например, в тесте шестиминутной ходьбы (6 ТШХ), по сравнению со здоровым сверстником. В различных вариантах реализации эффективное количество составляет от по меньшей мере 10 мг/кг до примерно 30 мг/кг, от по меньшей мере 20 мг/кг до примерно 30 мг/кг, от примерно 25 мг/кг до примерно 30 мг/кг или от примерно 30 мг/кг до примерно 50 мг/кг. В некоторых вариантах реализации эффективное количество составляет примерно 10 мг/кг, примерно 20 мг/кг, примерно 30 мг/кг или примерно 50 мг/кг. В другом аспекте эффективное количество составляет по меньшей мере примерно 10 мг/кг, примерно 20 мг/кг, примерно 25 мг/кг, примерно 30 мг/кг или от примерно 30 мг/кг до примерно 50 мг/кг в течение по меньшей мере 24 недель, по меньшей мере 36 недель или по меньшей мере 48 недель для увеличения таким образом количества дистрофин-положительных волокон у субъекта до по меньшей мере 20%, примерно 30%, примерно 40%, примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80%, примерно 90%, примерно 95% от нормы и стабилизации или улучшения расстояния ходьбы у пациента до не более чем 20% дефицита, например, в 6 ТШХ, по сравнению со здоровым сверстником. В некоторых вариантах реализации лечение приводит к увеличению количества дистрофин-положительных волокон у пациента до 20-60% или до 30-50% от нормы.

Термины «усилить» или «усиление», или «повышать» или «повышение», или «стимулировать» или «стимулирование» (стимуляция) в целом относятся к способности одного или более конъюгатов антисмысловых олигомеров или фармацевтических композиций вызывать или обуславливать больший физиологический ответ (то есть последующие эффекты) в клетке или у субъекта по сравнению с ответом, обусловленным либо отсутствием конъюгата антисмыслового олигомера, либо контрольным соединением. Больший физиологический ответ может включать повышенную экспрессию функциональной формы белка дистрофина или повышенную связанную с дистрофином биологическую активность в мышечной ткани наряду с другими ответами, очевидными из понимания данной области техники и настоящего описания. Также может быть определено увеличение функции мышц, в том числе увеличение или улучшение функции мышц на примерно 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 может быть определена процентная доля мышечных волокон, экспрессирующих функциональный дистрофин, включая повышенную экспрессию дистрофина в примерно 1%, 2%, 5%, 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 если 25-30% волокон

экспрессируют дистрофин, может происходить улучшение функции мышц на примерно 40% (см., например, DelloRusso et al, Proc Natl Acad Sci USA 99: 12979-12984, 2002). «Повышенное» или «увеличенное» количество, как правило, представляет собой «статистически значимое» количество и 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, 500, 1000 раз, включая все целочисленные и нецелочисленные значения между указанными значениями более 1), например, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и так далее) по сравнению с количеством, получаемым в отсутствие конъюгата антисмыслового олигомера (в отсутствие агента) или в присутствии контрольного соединения.

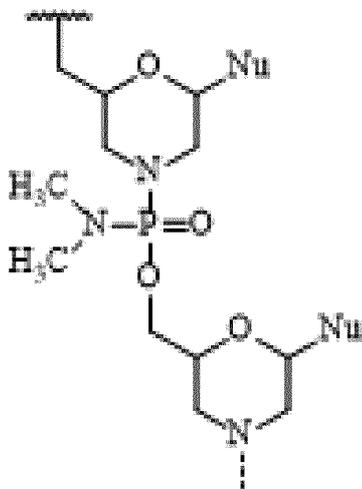
В контексте настоящего описания термины «функция» и «функциональный» и тому подобные относятся к биологической, ферментативной или терапевтической функции.

«Функциональный» белок дистрофин в целом относится к белку дистрофину, обладающему достаточной биологической активностью для уменьшения прогрессирующей дегенерации мышечной ткани, которая в противном случае характерна для мышечной дистрофии, как правило, по сравнению с измененной или «дефектной» формой белка дистрофина, которая присутствует у некоторых субъектов с МДД или МДБ. В некоторых вариантах реализации функциональный белок дистрофин может обладать примерно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% (включая все целочисленные значения между указанными значениями) биологической активности дистрофина дикого типа *in vitro* или *in vivo* при определении в соответствии со стандартными методиками в данной области техники. В качестве одного из примеров связанная с дистрофином активность в культурах мышечных клеток *in vitro* может быть определена по размеру мышечных трубочек, организации (или дезорганизации) миофибрилл, сократительной активности 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 изучения патогенеза заболевания и обеспечивают средства для оценки связанной с дистрофином активности. Двумя из наиболее широко используемых моделей на животных для исследования МДД являются мыши с мышечной дистрофией, сцепленной с X-хромосомой (*mdx*), и собаки с мышечной дистрофией золотистых ретриверов (*GRMD*), и те, и другие являются дистрофин-отрицательными (см., например, Collins & Morgan, Int J Exp Pathol 84: 165-172, 2003). Эти и другие модели на животных могут быть применены для определения функциональной активности различных форм белка дистрофина. К ним относятся в том числе усеченные формы дистрофина, такие как формы, которые продуцируются вследствие введения некоторых конъюгатов антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию, применяемых для пропуска экзона.

Термины «несоответствие» или «несоответствия» относятся к одному или более азотистым (нуклеотидным) основаниям (как смежным, так и отдельным) в последовательности азотистых (нуклеотидных) оснований олигомера, которые не

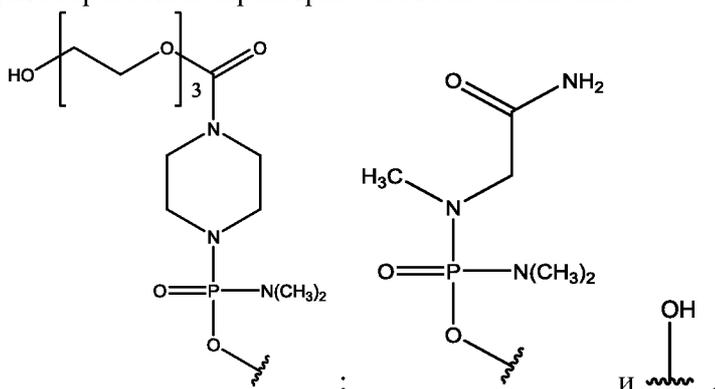
соответствуют целевой пре-мРНК согласно правилам спаривания оснований. Хотя абсолютная комплементарность часто является желательной, некоторые варианты реализации могут включать одно или более, но предпочтительно 6, 5, 4, 3, 2 или 1 несоответствий по отношению к целевой пре-мРНК. К ним относятся вариации в любом участке в пределах олигомера. В некоторых вариантах реализации конъюгаты антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию содержат вариации последовательности азотистых (нуклеотидных) оснований во внутренней части вблизи концов, и, в случае наличия, они, как правило, находятся в пределах примерно 6, 5, 4, 3, 2 или 1 субъединицы от 5'- и/или 3'-конца.

Термины «морфолиновый», «морфолиновый олигомер» и «РМО» относятся к олигомеру фосфородиамидата морфолина следующей общей структуры:

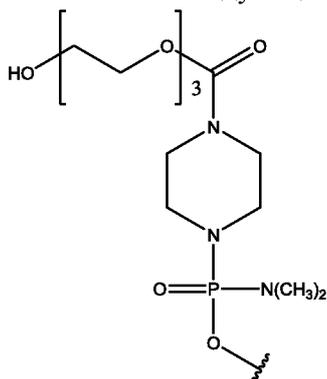


и являющемуся таким, как описано на фигуре 2 из Summerton, J., et al., *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 7: 187-195 (1997). Производные морфолина, описанные в настоящем документе, включают все стереоизомеры и таутомеры общей структуры, указанной выше. Синтез, структуры и характеристики связывания морфолиновых олигомеров подробно описаны в патентах США №№: 5698685; 5217866; 5142047; 5034506; 5166315; 5521063; 5506337; 8076476 и 8299206; содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

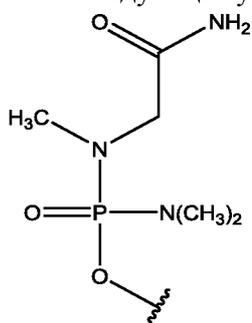
В некоторых вариантах реализации морфолиновая группа на 5'- или 3'-конце олигомера конъюгирована с «хвостовым» фрагментом для повышения его стабильности и/или растворимости. Примеры «хвостов» включают:



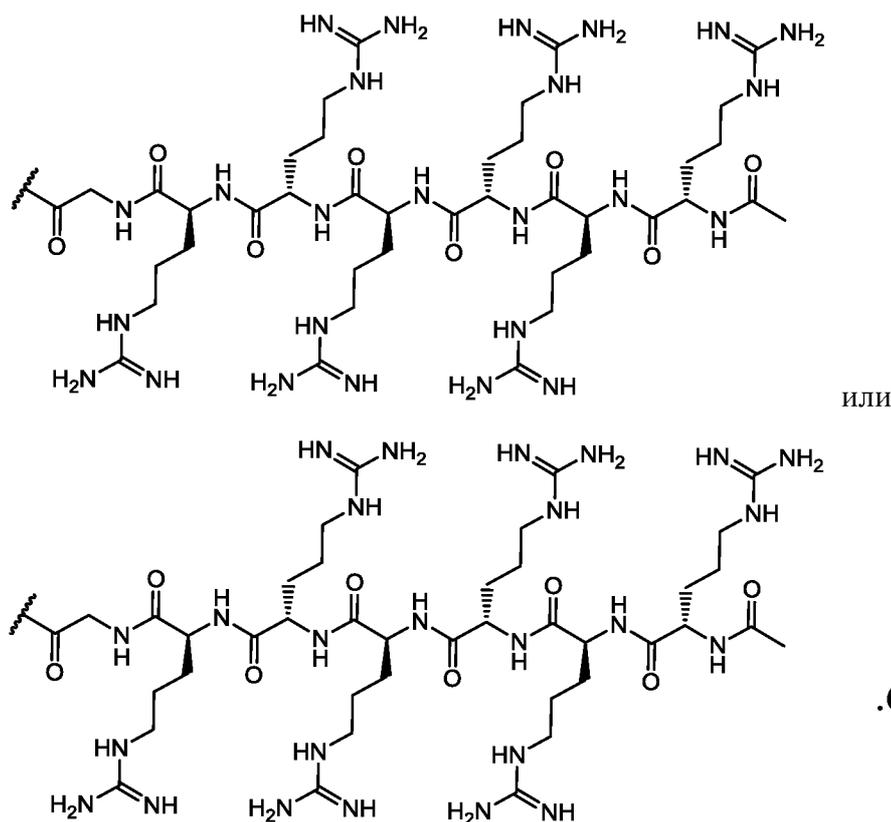
Применительно к приведенным выше примерам хвостовых фрагментов «ТЕG» или «EG3» относится к следующему хвостовому фрагменту:



Применительно к приведенным выше примерам хвостовых фрагментов «GT» относится к следующему хвостовому фрагменту:



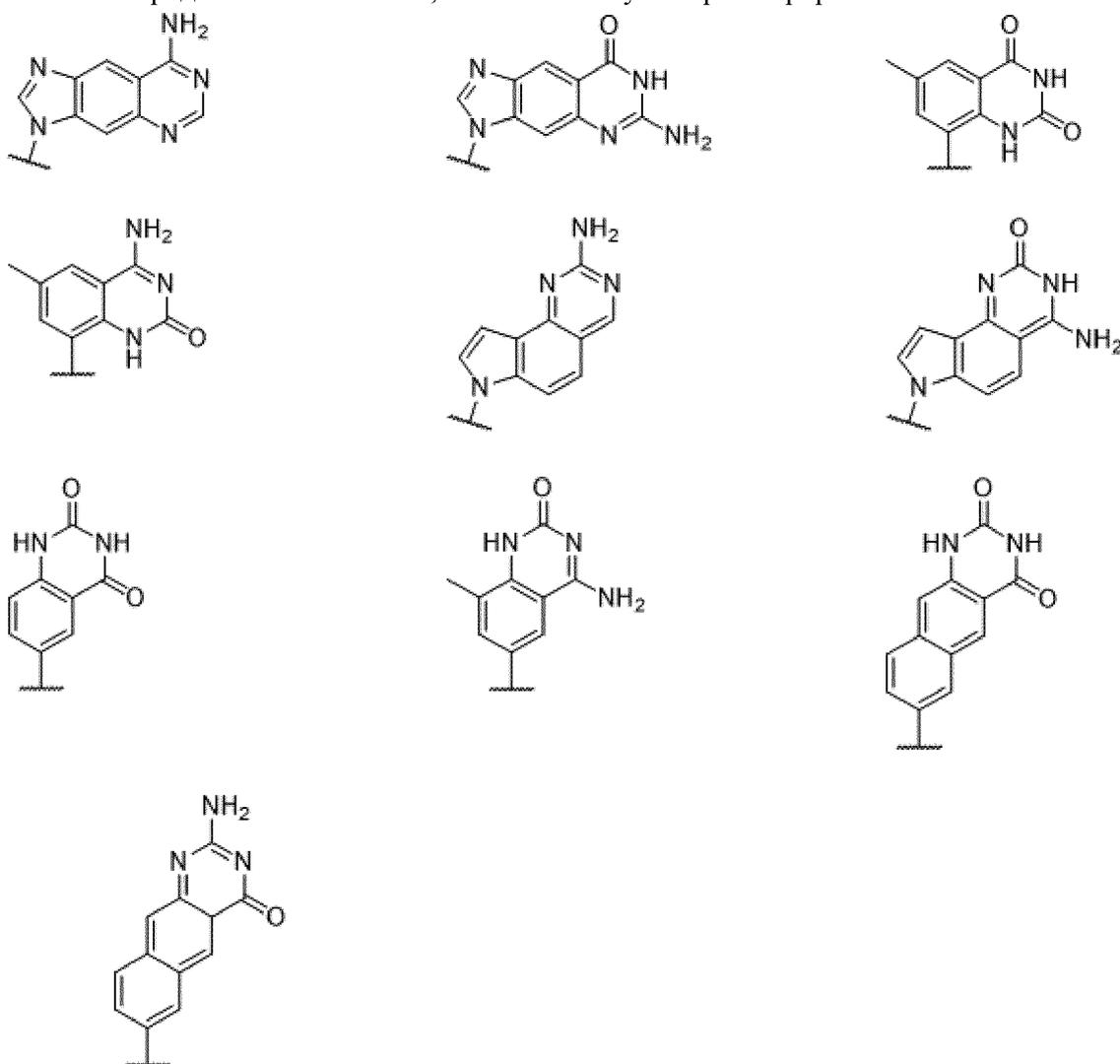
В контексте настоящего описания термины «-G-R<sub>6</sub>» и «-G-R<sub>6</sub>-Ac» используются взаимозаменяемо и относятся к пептидному фрагменту, конъюгированному с антисмысловым олигомером согласно настоящему раскрытию. В различных вариантах реализации «G» представляет собой остаток глицина, конъюгированный с «R<sub>6</sub>» посредством амидной связи, и каждый «R» представляет собой остаток аргинина, конъюгированный с другими посредством амидных связей таким образом, что «R<sub>6</sub>» обозначает шесть (6) остатков аргинина, конъюгированных совместно посредством амидных связей. Остатки аргинина могут иметь любую пространственную конфигурацию, например, остатки аргинина могут представлять собой остатки L-аргинина, остатки D-аргинина или смесь остатков D- и L-аргинина. В некоторых вариантах реализации «-G-R<sub>6</sub>» или «-G-R<sub>6</sub>-Ac» конъюгирован с атомом азота морфолинового кольца наиболее близкой к 3'-концу морфолиновой субъединицы антисмыслового олигомера РМО согласно настоящему раскрытию. В некоторых вариантах реализации «-G-R<sub>6</sub>» или «-G-R<sub>6</sub>-Ac» конъюгирован с 3'-концом антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию и имеет следующую формулу:



Термины «азотистое (нуклеотидное) основание» (Nu), «спаривающийся фрагмент основания» или «основание» используются взаимозаменяемо для обозначения пуринового или пиримидинового основания, входящего в состав встречающихся в природе, или «нативных», ДНК или РНК (например, урацила, тимина, аденина, цитозина и гуанина), а также аналогов этих встречающихся в природе пуринов и пиримидинов. Эти аналоги могут придавать олигомеру улучшенные свойства, такие как аффинность связывания. Примеры аналогов включают гипоксантин (основной компонент инозина); 2,6-диаминопурин; 5-метилцитозин; C5-пропинил-модифицированные пиримидины; 10-(9-(аминоэтоксифеноксазил) (G-clamp) и тому подобное.

Дополнительные примеры спаривающихся фрагментов оснований включают, но не ограничиваются перечисленными, урацил, тимин, аденин, цитозин, гуанин и гипоксантин (инозин), содержащие соответствующие аминогруппы, защищенные ацильными защитными группами, 2-фторурацил, 2-фторцитозин, 5-бром урацил, 5-иод урацил, 2,6-диаминопурин, азацитозин, аналоги пиримидина, такие как псевдоизоцитозин и псевдоурацил, и другие модифицированные азотистые (нуклеотидные) основания, такие как 8-замещенные пурины, ксантин или гипоксантин (последние два являются природными продуктами деградации). Также рассматриваются модифицированные азотистые (нуклеотидные) основания, раскрытые в источниках: Chiu and Rana, RNA, 2003, 9, 1034-1048; Limbach et al. Nucleic Acids Research, 1994, 22, 2183-2196; и Revankar and Rao, Comprehensive Natural Products Chemistry, vol.7, 313; содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

Дополнительно примеры спаривающихся фрагментов оснований включают, но не ограничиваются перечисленными, азотистые (нуклеотидные) основания увеличенного размера, в структуру которых добавлено одно или более бензольных колец. Замены оснований нуклеиновых кислот, описанные в источниках: the Glen Research catalog ([www.glenresearch.com](http://www.glenresearch.com)); Krueger AT et al., Acc. Res., 2007, 40, 141-150; Kool, ET, Acc. Chem.Res., 2002, 35, 936-943; Benner S.A., et al., Nat. Opin. Chem. Biol., 2003, 7, 723-733; и Hirao, I., Curr. Opin. Chem. Biol., 2006, 10, 622-627; содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки, также рассматриваются в качестве пригодных для применения в конъюгатах антисмысловых олигомеров, описанных в настоящем документе. Примеры азотистых (нуклеотидных) оснований увеличенного размера включают представленные ниже, а также их таутомерные формы.



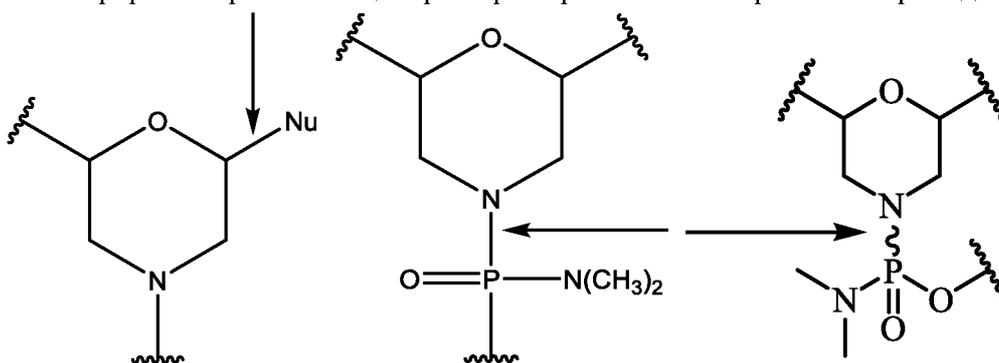
Фразы «парентеральное введение» и «вводимый парентерально» в контексте настоящего описания означают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно посредством инъекции, и включают, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсулярную, внутриглазничную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную,

транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную и интрастернальную инъекцию и инфузию.

Для ясности структуры согласно настоящему раскрытию, включая, например, формулу (IV), непрерывны от 5' до 3', и для удобства отображения всей структуры в компактной форме включены различные разрывы изображения, обозначенные как «РАЗРЫВ А», «РАЗРЫВ В» и «РАЗРЫВ С». Специалисту в данной области техники будет понятно, что, например, каждое обозначение «РАЗРЫВ А» указывает на продолжение изображения структуры в этих точках. Специалисту в данной области техники понятно, что это же верно для каждого обозначения «РАЗРЫВ В» и «РАЗРЫВ С» в указанных выше структурах. Однако ни один из разрывов изображения не предназначен для обозначения и не может быть понят специалистом в данной области техники как обозначающий фактическое прерывание приведенной выше структуры.

В контексте настоящего описания набор скобок, используемых в пределах структурной формулы, указывает, что структурная особенность, заключенная между скобками, повторяется. В некоторых вариантах реализации используемые скобки могут представлять собой «[» и «]», и в некоторых вариантах реализации скобки, используемые для обозначения повторяющихся структурных особенностей, могут представлять собой «(» и «)». В некоторых вариантах реализации число итераций повторения структурной особенности, заключенной между скобками, является числом, указанное за скобками, такое как 2, 3, 4, 5, 6, 7 и так далее. В различных вариантах реализации число итераций повторения структурной особенности, заключенной между скобками, обозначено с помощью переменной, приведенной за скобками, такой как «Z».

В контексте настоящего описания прямая связь или волнистая связь при хиральном атоме углерода или фосфора в структурной формуле указывает на то, что стереохимия хирального атома углерода или фосфора не определена и предполагается, что она включает все формы хирального центра. Примеры таких изображений приведены ниже:



Фраза «фармацевтически приемлемый» означает, что вещество или композиция должны быть химически и/или токсикологически совместимы с другими ингредиентами, содержащимися в составе, и/или субъектом, для лечения которого их применяют.

Фраза «фармацевтически приемлемый носитель» в контексте настоящего описания означает нетоксичный, инертный твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, материал для инкапсулирования или вспомогательное вещество любого типа

в составе. Некоторыми примерами веществ, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, являются сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлоза и ее производные, такие как натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; порошкообразный трагакант; солод; желатин; тальк; вспомогательные вещества, такие как масло какао и воски для суппозиторий; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновая кислота; апирогенная вода; изотонический солевой раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; фосфатные буферные растворы; нетоксичные совместимые смазывающие вещества, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния; окрашивающие агенты; разделительные агенты; покрывающие агенты; подслащивающие агенты; агенты для коррекции вкуса, ароматизирующие агенты; консерванты и антиоксиданты в соответствии с оценкой специалиста по разработке составов.

Термин «восстановление» применительно к синтезу или продуцированию дистрофина в целом относится к продуцированию белка дистрофина, включая усеченные формы дистрофина, у пациента с мышечной дистрофией после лечения с применением конъюгата антисмыслового олигомера, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации лечение приводит к увеличению продуцирования дистрофина *de novo* у пациента на 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% (включая все целочисленные значения между указанными значениями). В некоторых вариантах реализации лечение приводит к увеличению количества дистрофин-положительных волокон у субъекта до по меньшей мере примерно 20%, примерно 30%, примерно 40%, примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80%, примерно 90% или от примерно 95% до 100% от нормы. В других вариантах реализации лечение приводит к увеличению количества дистрофин-положительных волокон у субъекта до от примерно 20% до примерно 60% или от примерно 30% до примерно 50%, от нормы. Процентная доля дистрофин-положительных волокон у пациента после лечения может быть определена с помощью биопсии мышц с применением известных методик. Например, биопсия мышц может быть взята у пациента из подходящей мышцы, такой как двуглавая мышца плеча.

Анализ процентной доли дистрофин-положительных волокон может быть проведен до лечения и/или после лечения или в моменты времени в течение курса лечения. В некоторых вариантах реализации биопсию после лечения берут из мышцы, расположенной контралатерально по отношению к мышце для биопсии до лечения. Анализ экспрессии дистрофина до и после лечения может быть проведен с использованием любого подходящего метода анализа дистрофина. В некоторых вариантах реализации иммуногистохимическое обнаружение проводят в срезах ткани из биопсии мышц с применением антитела, которое является маркером дистрофина, такого как

моноклональное или поликлональное антитело. Например, может быть применено антитело MANDYS106, которое является высокочувствительным маркером дистрофина. Может быть применено любое подходящее вторичное антитело.

В некоторых вариантах реализации процентную долю дистрофин-положительных волокон рассчитывают путем деления количества положительных волокон на общее количество подсчитанных волокон. Образцы нормальных мышц содержат 100% дистрофин-положительных волокон. Таким образом, процентная доля дистрофин-положительных волокон может быть выражена в процентах от нормы. Для контроля присутствия следовых количеств дистрофина в мышце до лечения, а также ревертантных волокон может быть установлен исходный уровень с использованием срезов мышц пациента до лечения при подсчете дистрофин-положительных волокон в мышцах после лечения. Это может быть использовано в качестве порогового значения для подсчета дистрофин-положительных волокон в срезах мышц этого пациента после лечения. В других вариантах реализации окрашенные антителами срезы тканей также можно использовать для количественного определения дистрофина с помощью программного обеспечения для анализа изображений Bioquant (Bioquant Image Analysis Corporation, Nashville, TN). Общая интенсивность сигнала флуоресценции дистрофина может быть представлена в процентах от нормы. Помимо этого, для определения процентного содержания дистрофин-положительных волокон может быть использован анализ методом вестерн-блоттинга с применением моноклональных или поликлональных антител против дистрофина. Например, можно использовать антитело против дистрофина NCL-Dys1 от Leica Biosystems. Анализ процентного содержания дистрофин-положительных волокон также может быть проведен путем определения экспрессии компонентов саркогликанового комплекса ( $\beta$ - $\square$  $\gamma$ ) и/или нейрональной NO-синтазы (NOS).

В некоторых вариантах реализации лечение с применением конъюгатов антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию замедляет или уменьшает прогрессирующую дисфункцию и/или недостаточность дыхательных мышц у пациентов с МДЦ, которые можно было бы ожидать в отсутствие лечения. В некоторых вариантах реализации лечение с применением конъюгата антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию может уменьшать или устранять необходимость во вспомогательных мероприятиях для вентиляции легких, которую можно было бы ожидать в отсутствие лечения. В некоторых вариантах реализации определение функции внешнего дыхания для отслеживания течения заболевания, а также оценка потенциального терапевтического вмешательства включают определение максимального давления фазы вдоха (MIP, МДВ), максимального давления фазы выдоха (MEP, МДВд) и форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ). MIP и MEP определяют уровень давления, которое человек может создавать при вдохе и выдохе, соответственно, и являются чувствительными показателями силы дыхательных мышц. MIP является мерой слабости диафрагмы.

В некоторых вариантах реализации МЕР может снижаться до появления изменений в других тестах функции легких, включая МПР и ФЖЕЛ. В некоторых вариантах реализации МЕР может являться ранним индикатором респираторной дисфункции. В некоторых вариантах реализации ФЖЕЛ может быть использована для измерения общего объема воздуха, выдыхаемого во время форсированного выдоха после максимального вдоха. У пациентов с МДД ФЖЕЛ увеличивается параллельно с физическим ростом до раннего подросткового возраста. Однако, поскольку рост замедляется или задерживается вследствие прогрессирования заболевания, а мышечная слабость прогрессирует, после 10-12 лет жизненная емкость легких входит в нисходящую фазу и снижается со средней скоростью от примерно 8 до 8,5 процента в год. В некоторых вариантах реализации процент прогнозируемого МПР (МПР с учетом массы), процент прогнозируемого МЕР (МЕР с учетом возраста) и процент прогнозируемой ФЖЕЛ (ФЖЕЛ с учетом возраста и роста) являются дополнительными исследуемыми показателями.

Термины «субъект» и «пациент» в контексте настоящего описания включают любое животное, которое проявляет симптом или подвержено риску проявления симптома, который может подлежать лечению с применением конъюгата антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию, как то субъект (или пациент), который имеет МДД, или МДБ, или любой из симптомов, связанных с этими состояниями (например, потерю мышечных волокон) или подвергается риску их возникновения. Подходящие субъекты (или пациенты) включают лабораторных животных (таких как мышь, крыса, кролик или морская свинка), домашний скот и домашних животных, или питомцев (таких как кошка или собака). Включены приматы, не являющиеся людьми, и, предпочтительно, пациенты (или субъекты), являющиеся людьми. Также включены способы продуцирования дистрофина у субъекта (или пациента), имеющего мутацию гена дистрофина, которая может быть скорректирована при помощи пропуска экзона 53.

Фразы «системное введение», «вводимый системно», «периферическое введение» и «вводимый периферически» в контексте настоящего описания означают введение соединения, лекарственного средства или другого вещества, отличное от введения непосредственно в центральную нервную систему, в результате которого они поступают в организм пациента и, таким образом, подвергаются метаболизму и другим подобным процессам, например, подкожное введение.

Фраза «нацеливающая последовательность» относится к последовательности азотистых (нуклеотидных) оснований олигомера, которая комплементарна последовательности нуклеотидов в целевой пре-мРНК. В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия последовательность нуклеотидов в целевой пре-мРНК представляет собой сайт отжига экзона 53 пре-мРНК дистрофина, обозначенный как H53A(+36+60).

«Лечение» субъекта (например, млекопитающего, такого как человек) или воздействие на клетку представляет собой любой тип вмешательства, применяемого для того, чтобы изменить естественный путь развития субъекта или клетки. Лечение

включает, но не ограничивается перечисленным, введение олигомера или его фармацевтической композиции и может быть осуществлено либо профилактически, либо после начала патологического события или контакта с этиологическим фактором. Лечение включает любое желаемое воздействие на симптомы или патологический процесс заболевания или состояния, связанного с белком дистрофином, как то при некоторых формах мышечной дистрофии, и может включать, например, минимальные изменения или улучшения одного или более определяемых маркеров заболевания или состояния, подлежащего лечению. Также включены «профилактические» способы лечения, которые могут быть направлены на снижение скорости прогрессирования заболевания или состояния, подлежащего лечению, задержку наступления этого заболевания или состояния или уменьшение тяжести его начала. «Лечение» или «профилактика» не обязательно означает полное устранение, излечение или предотвращение заболевания или состояния или связанных с ним симптомов.

В некоторых вариантах реализации лечение с применением конъюгата антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию вызывает увеличение продуцирования дистрофина *de novo*, задерживает прогрессирование заболевания, замедляет или уменьшает потерю подвижности, снижает воспаление мышц, уменьшает повреждение мышц, улучшает функцию мышц, уменьшает потерю функции легких и/или усиливает регенерацию мышц, которые можно было бы ожидать в отсутствие лечения. В некоторых вариантах реализации лечение сдерживает, задерживает или замедляет прогрессирование заболевания. В некоторых вариантах реализации лечение поддерживает подвижность или уменьшает потерю подвижности. В некоторых вариантах реализации лечение поддерживает функцию легких или уменьшает потерю функции легких. В некоторых вариантах реализации лечение поддерживает или увеличивает расстояние устойчивой ходьбы у пациента, оцениваемое, например, с помощью теста 6-минутной ходьбы (6 ТШХ). В некоторых вариантах реализации лечение поддерживает или сокращает время ходьбы/бега на расстояние 10 метров (то есть теста ходьбы/бега на расстояние 10 метров). В некоторых вариантах реализации лечение поддерживает или сокращает время вставания из положения лежа на спине (то есть теста времени на вставание). В некоторых вариантах реализации лечение поддерживает или сокращает время подъема по четырем стандартным ступеням (то есть теста подъема по четырем ступеням). В некоторых вариантах реализации лечение сдерживает или снижает воспаление мышц у пациента, оцениваемое, например, с помощью МРТ (например, МРТ мышц ног). В некоторых вариантах реализации с помощью МРТ проводят определение в режиме T2 и/или определяют жировую фракцию для выявления мышечной дегенерации. С помощью МРТ можно выявить изменения в структуре и составе мышц, вызванные воспалением, отеком, повреждением мышц и жировой инфильтрацией.

В некоторых вариантах реализации лечение с применением конъюгата антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию вызывает увеличение продуцирования дистрофина *de novo* и замедляет или уменьшает потерю подвижности,

которую можно было бы ожидать в отсутствие лечения. Например, лечение может стабилизировать, поддерживать, улучшать или повышать способность к ходьбе (например, стабилизация передвижения) у субъекта. В некоторых вариантах реализации лечение поддерживает или увеличивает расстояние устойчивой ходьбы у пациента, оцениваемое, например, с помощью теста 6-минутной ходьбы (6 ТШХ), описанного в источнике McDonald et al. (*Muscle Nerve*, 2010; 42:966-74, содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки). Изменение расстояния 6-минутной ходьбы (6 MWD) может быть выражено в виде абсолютного значения, изменения, выраженного в процентах, или изменения, выраженного в % прогнозируемого значения. В некоторых вариантах реализации лечение поддерживает или увеличивает расстояние устойчивой ходьбы в 6 ТШХ до не более чем 20% дефицита по сравнению со здоровым сверстником. Результаты пациента с МДЦ в 6 ТШХ относительно обычных результатов здорового сверстника могут быть определены путем вычисления % прогнозируемого значения. Например, % прогнозируемого значения 6 MWD для мужчин может быть рассчитан с использованием следующего уравнения:  $196,72 + (39,81 \times \text{возраст}) - (1,36 \times \text{возраст}^2) + (132,28 \times \text{рост в метрах})$ . Для женщин % прогнозируемого значения 6 MWD может быть рассчитан с использованием следующего уравнения:  $188,61 + (51,50 \times \text{возраст}) - (1,86 \times \text{возраст}^2) + (86,10 \times \text{рост в метрах})$  (источник Henricson et al. *PLoS Curr.*, 2012, version 2, содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки). В некоторых вариантах реализации лечение с применением антисмыслового олигомера увеличивает расстояние устойчивой ходьбы у пациента от исходного значения до более чем 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30 или 50 метров (включая все целочисленные значения между указанными значениями).

Потеря функции мышц у пациентов с МДЦ может происходить на фоне нормального роста и развития в детстве. Действительно, у детей младшего возраста с МДЦ может наблюдаться увеличение расстояния, пройденного в процессе 6 ТШХ, в течение примерно 1 года, несмотря на прогрессирующее нарушение функции мышц. В некоторых вариантах реализации 6 MWD пациентов с МДЦ сравнивают с обычным образом развивающимися контрольными субъектами и с существующими нормативными данными сопоставимых по возрасту и полу субъектов. В некоторых вариантах реализации нормальный рост и развитие могут учитываться с использованием уравнения на основе возраста и роста, соответствующего нормативным данным. Такое уравнение можно использовать для преобразования 6 MWD в процент прогнозируемого (% прогнозируемого) значения у субъекта с МДЦ. В некоторых вариантах реализации анализ данных % прогнозируемого 6 MWD является способом учета нормального роста и развития и может показать, что прирост функции в раннем возрасте (например, в возрасте 7 или менее лет) указывает скорее на стабильную, чем улучшающуюся характеристику у пациентов с МДЦ (источник Henricson et al. *PLoS Curr.*, 2012, version 2, содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки).

Система номенклатуры антисмысловых молекул была предложена и опубликована для определения различий между различными антисмысловыми молекулами (см. Mann et al., (2002) J Gen Med 4, 644-654). Эта номенклатура стала особенно актуальной при тестировании нескольких незначительно отличающихся антисмысловых молекул, направленных на один и тот же целевой участок, как показано ниже:

$N\#A/D(x:y)$ .

Первая буква обозначает вид (например, Н: человек, М: мышь, С: собака). Знак «#» обозначает номер целевого экзона дистрофина. «A/D» обозначает акцепторный или донорный сайт сплайсинга в начале и в конце экзона, соответственно. (x y) представляют собой координаты отжига, где «-» или «+» указывают на интронные или экзонные последовательности, соответственно. Например, A(-6+18) будет указывать на последние 6 оснований интрона, предшествующего целевому экзону, и первые 18 оснований целевого экзона. Ближайший сайт сплайсинга будет акцептором, поэтому этим координатам будет предшествовать «A». Описывающими координатами отжига для донорного сайта сплайсинга могут быть D(+2-18), где последние 2 основания экзона и первые 18 оснований интрона соответствуют сайту отжига антисмысловой молекулы. Полностью экзонные координаты отжига будут обозначены как A(+65+85), что означает сайт между 65-м и 85-м нуклеотидами от начала данного экзона.

## **II. Антисмысловые олигомеры**

### **A. Конъюгаты антисмысловых олигомеров для индукции пропуска экзона 53**

В некоторых вариантах реализации конъюгаты антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию комплементарны целевому участку экзона 53 гена дистрофина и индуцируют пропуск экзона 53. В частности, настоящее раскрытие относится к конъюгатам антисмысловых олигомеров, комплементарных целевому участку экзона 53 пре-мРНК дистрофина, обозначенному как сайт отжига. В некоторых вариантах реализации сайт отжига представляет собой H53A(+36+60).

Конъюгаты антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию нацелены на пре-мРНК дистрофина и индуцируют пропуск экзона 53 таким образом, что он исключается из зрелого сплайсированного транскрипта мРНК или подвергается пропуску. С помощью пропуска экзона 53 нарушенная рамка считывания восстанавливается до мутации внутри рамки считывания. Несмотря на то, что МДД включает различные генетические подтипы, конъюгаты антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию были специально разработаны для пропуска экзона 53 пре-мРНК дистрофина. Мутации при МДД, которые могут быть скорректированы при помощи пропуска экзона 53, включают подгруппу пациентов с МДД (8%).

Последовательность азотистых (нуклеотидных) оснований конъюгата антисмыслового олигомера, которая индуцирует пропуск экзона 53, выполнена с возможностью обеспечения ее комплементарности конкретной целевой последовательности в экзоне 53 пре-мРНК дистрофина. В некоторых вариантах реализации антисмысловый олигомер в составе конъюгата антисмыслового олигомера

представляет собой РМО, где каждое морфолиновое кольцо РМО связано с азотистым (нуклеотидным) основанием, включая, например, азотистые (нуклеотидные) основания, содержащиеся в ДНК (аденин, цитозин, гуанин и тимин).

#### В. Свойства компонентов олигомеров

Конъюгаты антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию могут содержать различные компоненты антисмысловых олигомеров. Примеры компонентов олигомеров включают, без ограничения, морфолиновые олигомеры, модифицированные фосфоротиоатом олигомеры, модифицированные 2'-О-метильной группой олигомеры, пептидную нуклеиновую кислоту (ПНК), закрытую нуклеиновую кислоту (ЗНК), фосфоротиоатные олигомеры, модифицированные группой 2'-О-МОЕ олигомеры, модифицированный группой 2'-фтор олигомер, нуклеиновые кислоты, содержащие 2'-О,4'-С-этиленовый мостик (ЕНА), трицикло-ДНК, фосфоротиоатные субъединицы трицикло-ДНК, модифицированные группой 2'-О-[2-(N-метилкарбамоил)-этил]-олигомеры, включая комбинации любых из перечисленных выше. Модифицированные фосфоротиоатом и группой 2'-О-Ме- компоненты могут быть объединены с получением 2'-О-Ме-фосфоротиоатной основной цепи. См., например, публикации РСТ №№ WO/2013/112053 и WO/2009/008725, содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Примеры реализации химических компонентов олигомеров согласно настоящему раскрытию дополнительно описаны ниже.

##### 1. Пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК)

Пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК) представляют собой аналоги ДНК, основная цепь которых имеет структурное сходство с основной цепью, состоящей из звеньев дезоксирибозы, и состоит из звеньев N-(2-аминоэтил)-глицина, к которым присоединены пиримидиновые или пуриновые основания. ПНК, содержащие природные пиримидиновые и пуриновые основания, гибридизуются с комплементарными олигомерами в соответствии с правилами спаривания оснований Уотсона-Крика и с точки зрения распознавания пар оснований имитируют ДНК (Egholm, Buchardt et al. 1993). Основную цепь ПНК составляют пептидные связи, а не фосфодиэфирные связи, что делает их хорошо подходящими для антисмыслового применения (см. структуру ниже). Основная цепь является незаряженной, в результате чего образуются дуплексы ПНК/ДНК или ПНК/РНК, которые демонстрируют повышенную термостабильность. ПНК не распознаются нуклеазами или протеазами. Неограничивающий пример ПНК представлен ниже:

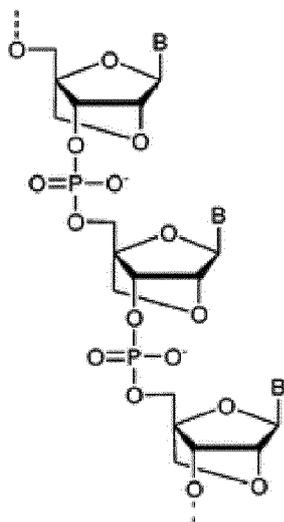


Несмотря на радикальное изменение структуры по сравнению с природной структурой, ПНК способны к специфичному в отношении последовательности связыванию в форме спирали с ДНК или РНК. Характеристики ПНК включают высокую аффинность связывания с комплементарной ДНК или РНК, дестабилизирующий эффект, вызванный ошибочным спариванием пары оснований, устойчивость к действию нуклеаз и протеаз, гибридизацию с ДНК или РНК независимо от концентрации соли и образование триплекса с гомопуриновой ДНК. Компания PANAGENE™ разработала собственные содержащие BTS мономеры ПНК (БТС; бензотиазол-2-сульфонильная группа) и собственный способ олигомеризации. Олигомеризация ПНК с применением содержащих BTS мономеров ПНК состоит из повторяющихся циклов снятия защиты, связывания и экзипирования. ПНК могут быть получены синтетически с применением любой методики, известной в данной области техники. См., например, патенты США №№: 6969766; 7211668; 7022851; 7125994; 7145006 и 7179896. См. также патенты США №№: 5539082; 5714331 и 5719262 о получении ПНК. Дополнительные сведения о соединениях ПНК приведены в источнике Nielsen et al., Science, 254:1497-1500, 1991. Содержание каждого из упомянутых выше источников полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

## 2. Закрытые нуклеиновые кислоты (ЗНК)

Конъюгаты антисмысловых олигомеров также могут содержать субъединицы «закрытой нуклеиновой кислоты» (ЗНК). «ЗНК» являются представителями класса модификаций, называемого мостиковой нуклеиновой кислотой (МНК). МНК характеризуется ковалентной связью которая закрывает конформацию кольца рибозы в С3'-эндо («нозерн») конформации сахара. В случае ЗНК мостик состоит из метилена, находящегося между положениями 2'-О и 4'-С. ЗНК обеспечивает улучшение в отношении предварительной организации главной цепи и стэкинга оснований с обеспечением увеличения уровня гибридизации и термической стабильности.

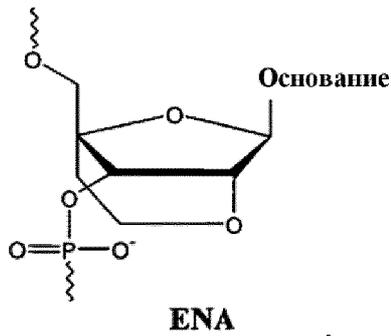
Структуры ЗНК приведены, например, в источниках Wengel, et al., *Chemical Communications* (1998) 455; Koshkin et al., *Tetrahedron* (1998) 54:3607; Jesper Wengel, *Accounts of Chem. Research* (1999) 32:301; Obika, et al., *Tetrahedron Letters* (1997) 38:8735; Obika, et al., *Tetrahedron Letters* (1998) 39:5401; и Obika, et al., *Bioorganic Medicinal Chemistry* (2008) 16:9230, содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Неограничивающий пример ЗНК представлен ниже:



**ЗНК**

Конъюгаты антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию могут содержать одну или более ЗНК; в некоторых случаях конъюгаты антисмысловых олигомеров могут полностью состоять из ЗНК. Способы синтеза отдельных нуклеозидных субъединиц на основе ЗНК и их внедрения в олигомеры описаны, например, в патентах США №№ 7572582, 7569575, 7084125, 7060809, 7053207, 7034133, 6794499 и 6670461, каждый из которых включен посредством ссылки во всей своей полноте. Типичные межсубъединичные линкеры включают фосфодиэфирные и фосфоротиоатные фрагменты; в качестве альтернативы могут использоваться линкеры, не содержащие фосфор. Другие варианты реализации включают конъюгат антисмыслового олигомера, содержащий ЗНК, где каждая субъединица ЗНК отделена субъединицей ДНК. Некоторые конъюгаты антисмысловых олигомеров состоят из чередующихся субъединиц ЗНК и ДНК, где межсубъединичный линкер представляет собой фосфоротиоат.

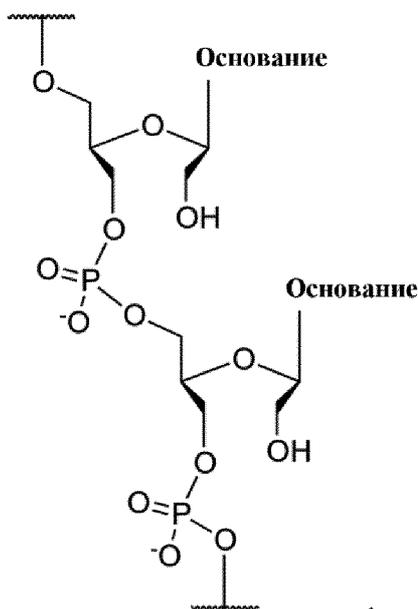
Нуклеиновые кислоты, содержащие 2'-O,4'-C-этиленовый мостик (ЕНА), являются еще одними представителями класса МНК. Неограничивающий пример представлен ниже:



Олигомеры ENA и их получение описаны в источнике Obika et al., *Tetrahedron Lett* (1997) 38 (50): 8735, содержание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Конъюгаты антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию могут содержать одну или более субъединиц ENA.

### 3. Открытая нуклеиновая кислота (ОНК)

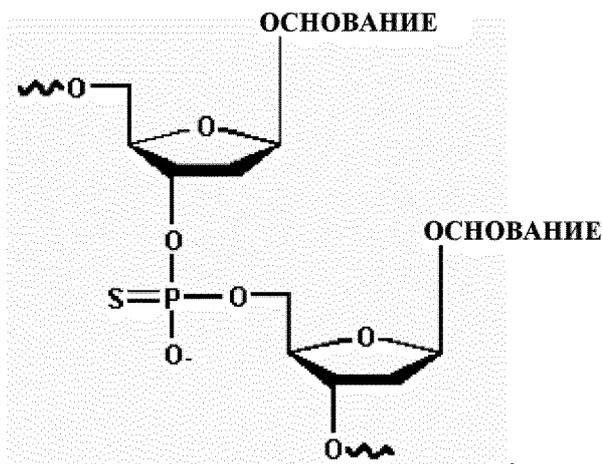
Конъюгаты антисмысловых олигомеров также могут содержать субъединицы открытой нуклеиновой кислоты (ОНК). ОНК и олигомеры ОНК являются аналогом РНК, в которой связь С2'-С3' в субъединице расщеплена. В то время как ЗНК является конформационно ограниченной (по сравнению с ДНК и РНК), ОНК является очень гибкой. ОНК раскрыты, например, в WO 2016/070166. Неограничивающий пример ОНК представлен ниже:



Типичные межсубъединичные линкеры включают фосфодиэфирные и фосфоротиоатные фрагменты; в качестве альтернативы могут использоваться линкеры, не содержащие фосфор.

### 4. Фосфоротиоаты

«Фосфоротиоаты» (или S-олигонуклеотиды) представляют собой вариант нормальной ДНК, в которой один из немостиковых атомов кислорода заменен на атом серы. Неограничивающий пример фосфоротиоата представлен ниже:



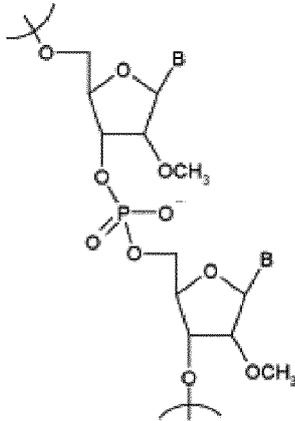
Сульфирование межнуклеотидной связи уменьшает действие эндо- и экзонуклеаз, включая 5'-3' и 3'-5' эндонуклеазу ДНК POL 1, нуклеазы S1 и P1, РНКазы, сывороточные нуклеазы и фосфодиэстеразу змеиного яда. Фосфоротиоаты получают двумя основными путями: воздействием раствора элементарной серы в сероуглероде на гидрофосфонат или с помощью способа сульфирования триэфиров фосфористой кислоты с применением либо тетраэтилтиурамдисульфида (TETD), либо 3Н-1,2-бензодитиол-3-он-1,1-диоксида (BDTD) (см., например, источник Iyer et al., *J.Org. Chem.* 55, 4693-4699, 1990, содержание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки). Последние способы позволяют избежать проблемы нерастворимости элементарной серы в большинстве органических растворителей и токсичности сероуглерода. Способы с применением TETD и BDTD также обеспечивают получение фосфоротиоатов более высокой чистоты.

##### 5. Трицикло-ДНК и трициклофосфоротиоатные субъединицы

Трицикло-ДНК (тц-ДНК) представляют собой класс аналогов ДНК с ограниченной конформационной свободой, в которых каждый нуклеотид модифицирован путем введения циклопропанового кольца для ограничения конформационной гибкости основной цепи и оптимизации геометрии торсионного угла  $\gamma$  основной цепи. Содержащие один вид оснований аденин- и тиминсодержащие тц-ДНК образуют необычайно стабильные пары оснований А-Т с комплементарными РНК. Трицикло-ДНК и их синтез описаны в публикации международной патентной заявки № WO 2010/115993, содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Конъюгаты антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию могут содержать одну или более субъединиц трицикло-ДНК; в некоторых случаях конъюгаты антисмысловых олигомеров могут полностью состоять из субъединиц трицикло-ДНК.

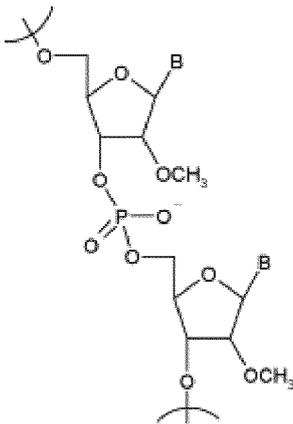
Трициклофосфоротиоатные субъединицы представляют собой субъединицы трицикло-ДНК с фосфоротиоатными межсубъединичными связями. Трициклофосфоротиоатные субъединицы и их синтез описаны в публикации международной патентной заявки № WO 2013/053928, содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Конъюгаты антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию могут содержать одну или более субъединиц

трицикло-ДНК; в некоторых случаях конъюгаты антисмысловых олигомеров могут полностью состоять из субъединиц трицикло-ДНК. Неограничивающий пример трицикло-ДНК/трициклофосфотиоатной субъединицы представлен ниже:



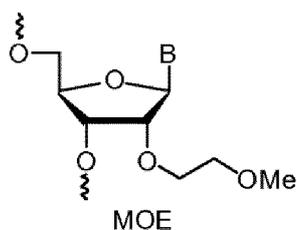
#### 6. 2'-O-метил, 2'-O-МОЕ- и 2'-F-олигомеры

Молекулы «2'-O-Ме-олигомеров» несут метильную группу при остатке 2'-ОН молекулы рибозы. 2'-O-Ме-РНК обладают теми же (или схожими) свойствами, что и ДНК, но защищены от деградации под действием нуклеаз. 2'-O-Ме-РНК также могут быть объединены с фосфотиоатными олигомерами (РТО) с целью дополнительной стабилизации. 2'-O-Ме-олигомеры (фосфодиэфирные или фосфотиоатные) могут быть синтезированы в соответствии со стандартными методиками в данной области техники (см., например, источник Yoo et al., *Nucleic Acids Res.* 32:2008-16, 2004, содержание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки). Неограничивающий пример 2'-O-Ме-олигомера представлен ниже:

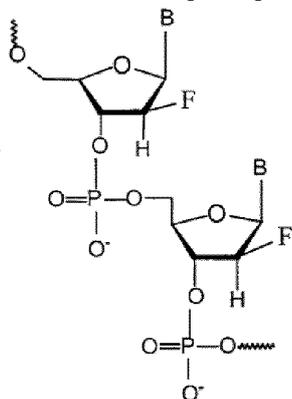


#### 2'-O-Ме

2'-O-метоксиэтилолигомеры (2'-O-МОЕ) несут метоксиэтильную группу при остатке 2'-ОН молекулы рибозы и обсуждаются в источнике Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 78, 486-504, 1995, содержание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Неограничивающий пример 2'-O-МОЕ субъединицы представлен ниже:



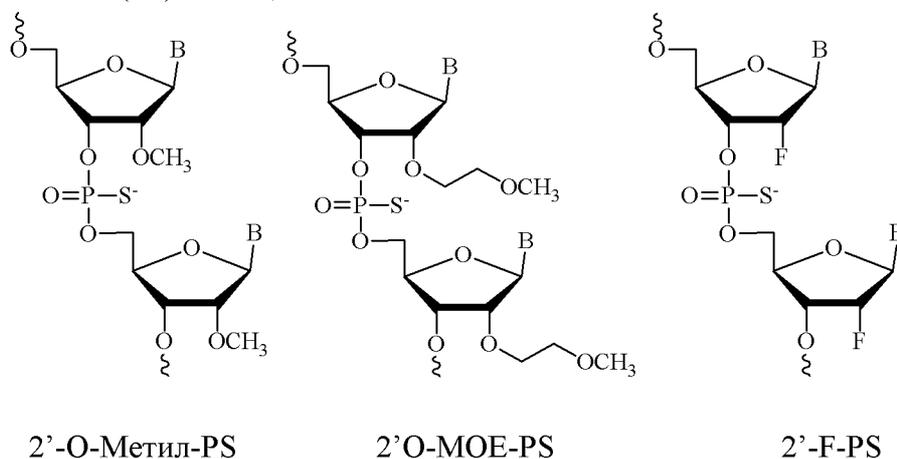
2'-Фторолигомеры (2'-F) содержат атом фтора в положении 2' вместо 2'-ОН. Неограничивающий пример 2'-F-олигомера представлен ниже:



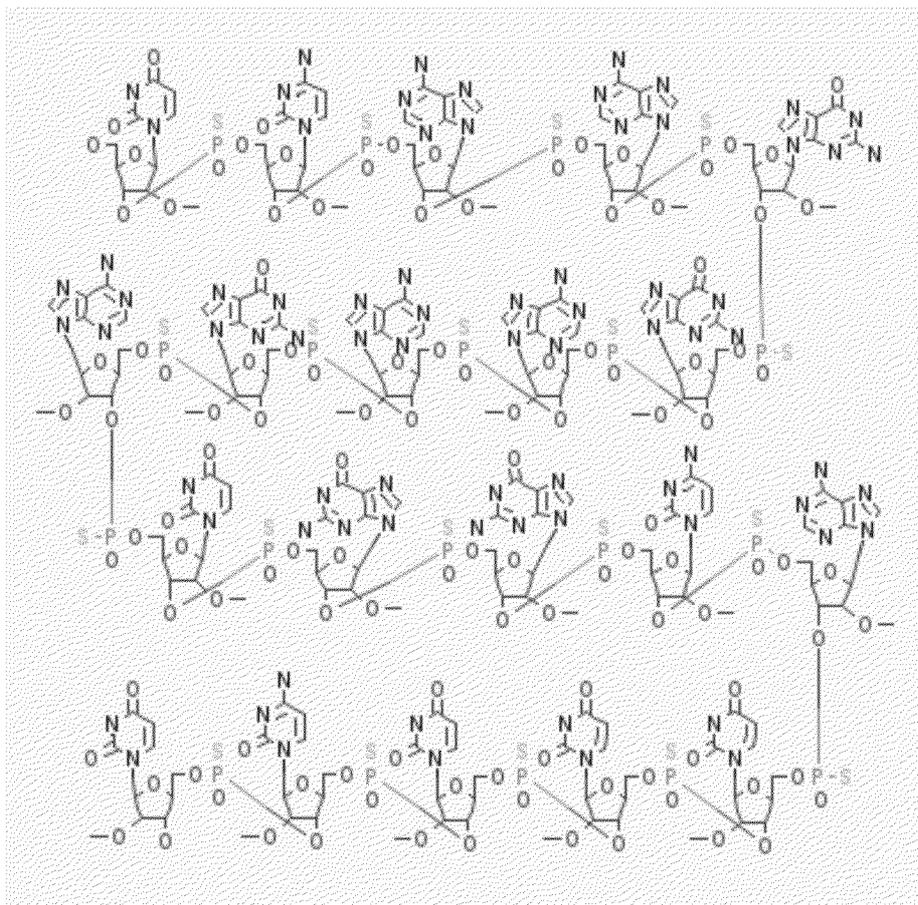
2'-F

2'-Фторолигомеры дополнительно описаны в источнике WO 2004/043977, содержание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

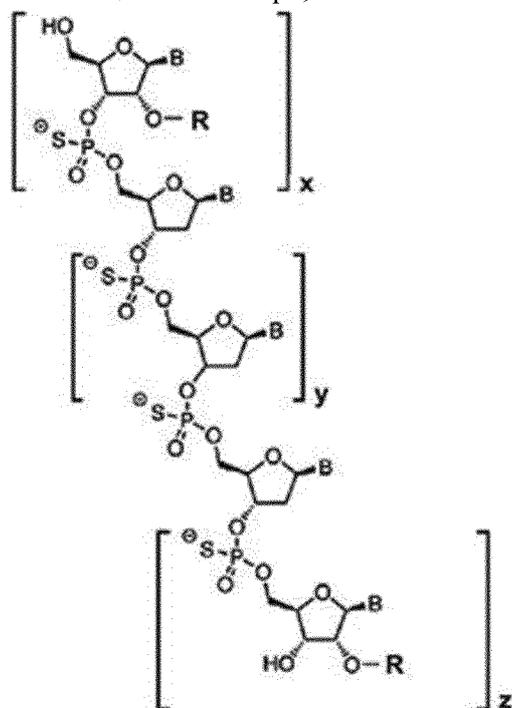
2'-О-метил-, 2'-О-МОЕ- и 2'-F-олигомеры могут также содержать одну или более фосфоротиоатных (PS) связей, как показано ниже:



Кроме того, 2'-О-метил-, 2'-О-МОЕ- и 2'-F-олигомеры могут содержать межсубъединичные PS связи на всем протяжении олигомера, например, как в 2'-О-метилфосфоротиоатном олигомере дрисаперсене, изображенном ниже:



В качестве альтернативы, 2'-O-метил, 2'-O-МОЕ и/или 2'-F-олигомеры могут содержать PS связи на концах олигомера, как показано ниже:



где:

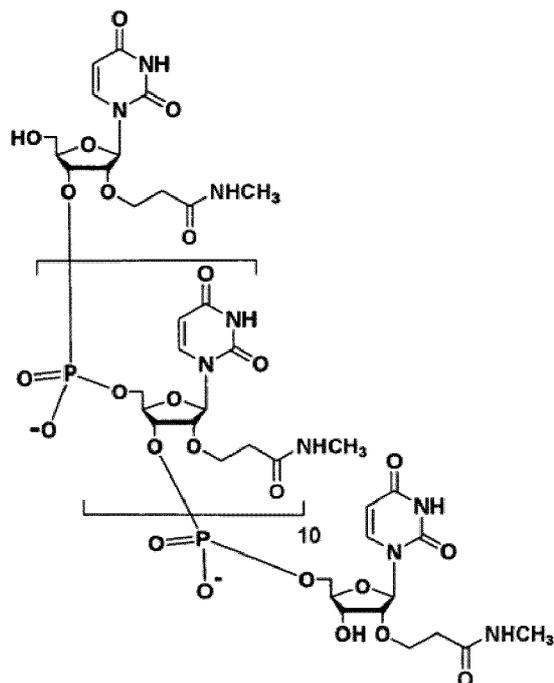
R представляет собой  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$  (метоксиэтил или МОЕ); и

х, у и z обозначают число нуклеотидов, содержащихся в каждом из обозначенных участков: 5'-концевой области, области центрального гэта и 3'-концевой области, соответственно.

Конъюгаты антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию могут содержать одну или более 2'-О-метил, 2' О-МОЕ и 2'-F-замещенных субъединиц и иметь в своей структуре любые из межсубъединичных связей, описанных в настоящем документе. В некоторых случаях конъюгат антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию может полностью состоять из 2'-О-метил, 2' О-МОЕ или 2'-F-замещенных субъединиц. Один вариант реализации конъюгатов антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию полностью состоит из 2'-О-метилзамещенных субъединиц.

#### 7. 2'-О-[2-(N-метилкарбамоил)-этил]-олигомеры (МСЕ)

МСЕ являются еще одним примером 2'-О-модифицированных рибонуклеозидов, пригодных для применения для получения конъюгатов антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию. В данном случае 2'-ОН подвергают дериватизации с получением 2-(N-метилкарбамоил)-этильного фрагмента для повышения устойчивости к действию нуклеаз. Неограничивающий пример МСЕ-олигомера представлен ниже:



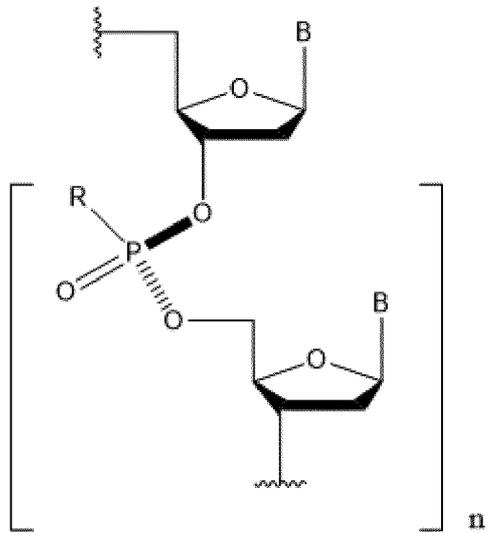
#### МСЕ

МСЕ и их синтез описаны в источнике Yamada et al., *J.Org. Chem.* (2011) 76(9):3042-53, содержание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Конъюгаты антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию могут содержать одну или более МСЕ-замещенных субъединиц.

#### 8. Стереоспецифические олигомеры

Стереоспецифические олигомеры представляют собой олигомеры, стереохимия каждой фосфорсодержащей связи в которых определяется способом синтеза таким

образом, что это приводит к получению по существу стереохимически чистого олигомера. Неограничивающий пример стереоспецифического олигомера представлен ниже:



В приведенном выше примере каждый атом фосфора олигомера имеет одинаковую пространственную конфигурацию. Дополнительные примеры включают олигомеры, описанные выше. Например, LNA, ENA, трицикло-ДНК, МСЕ, 2'-О-метил-, 2'-О-МОЕ-, 2'-F-олигомеры и олигомеры на основе морфолина могут быть получены содержащими стереоспецифические фосфорсодержащие межнуклеозидные связи, такие как, например, фосфотиоатные, фосфодиэфирные, фосфорамидатные, фосфородиамидатные или другие фосфорсодержащие межнуклеозидные связи. Стереоспецифические олигомеры, способы получения, синтез соединений с заданной хиральностью, конструирование хиральных соединений и хиральные вспомогательные вещества для применения для получения таких олигомеров подробно описаны, например, в источниках WO2017192664, WO2017192679, WO2017062862, WO2017015575, WO2017015555, WO2015107425, WO2015108048, WO2015108046, WO2015108047, WO2012039448, WO2010064146, WO2011034072, WO2014010250, WO2014012081, WO20130127858 и WO2011005761, содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

Стереоспецифические олигомеры могут иметь фосфорсодержащие межнуклеозидные связи в конфигурации  $R_P$  или  $S_P$ . Хиральные фосфорсодержащие связи, в которых пространственная конфигурация связей является контролируемой, называются «стереохимически чистыми», в то время как хиральные фосфорсодержащие связи, в которых пространственная конфигурация связей не является контролируемой, называются «стереохимически произвольными». В некоторых вариантах реализации олигомеры согласно настоящему раскрытию содержат множество стереохимически чистых и стереохимически произвольных связей таким образом, что полученный олигомер содержит стереохимически чистые субъединицы в предварительно определенных положениях олигомера. Пример расположения стереохимически чистых субъединиц представлен в публикации международной заявки на патент номер WO 2017/062862 A2 на фигурах 7A и 7B. В одном из вариантов реализации все хиральные фосфорсодержащие

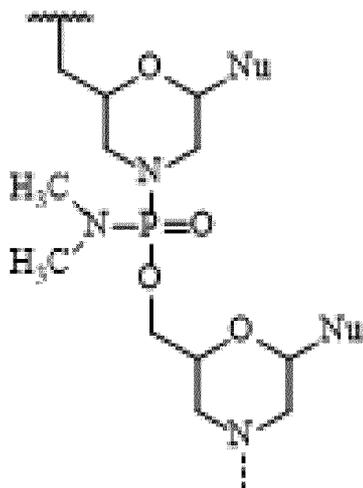




число, равное 1 или более) олигомер содержит по меньшей мере 12 смежных стереохимически чистых фосфорсодержащих связей в одной и той же стереоориентации (т. е. либо  $S_P$ , либо  $R_P$ ). В одном из вариантов реализации олигомера с  $n$  хиральными фосфорсодержащими связями (где  $n$  представляет собой целое число, равное 1 или более) олигомер содержит по меньшей мере 13 смежных стереохимически чистых фосфорсодержащих связей в одной и той же стереоориентации (т. е. либо  $S_P$ , либо  $R_P$ ). В одном из вариантов реализации олигомера с  $n$  хиральными фосфорсодержащими связями (где  $n$  представляет собой целое число, равное 1 или более) олигомер содержит по меньшей мере 14 смежных стереохимически чистых фосфорсодержащих связей в одной и той же стереоориентации (т. е. либо  $S_P$ , либо  $R_P$ ). В одном из вариантов реализации олигомера с  $n$  хиральными фосфорсодержащими связями (где  $n$  представляет собой целое число, равное 1 или более) олигомер содержит по меньшей мере 15 смежных стереохимически чистых фосфорсодержащих связей в одной и той же стереоориентации (т. е. либо  $S_P$ , либо  $R_P$ ). В одном из вариантов реализации олигомера с  $n$  хиральными фосфорсодержащими связями (где  $n$  представляет собой целое число, равное 1 или более) олигомер содержит по меньшей мере 16 смежных стереохимически чистых фосфорсодержащих связей в одной и той же стереоориентации (т. е. либо  $S_P$ , либо  $R_P$ ). В одном из вариантов реализации олигомера с  $n$  хиральными фосфорсодержащими связями (где  $n$  представляет собой целое число, равное 1 или более) олигомер содержит по меньшей мере 17 смежных стереохимически чистых фосфорсодержащих связей в одной и той же стереоориентации (т. е. либо  $S_P$ , либо  $R_P$ ). В одном из вариантов реализации олигомера с  $n$  хиральными фосфорсодержащими связями (где  $n$  представляет собой целое число, равное 1 или более) олигомер содержит по меньшей мере 18 смежных стереохимически чистых фосфорсодержащих связей в одной и той же стереоориентации (т. е. либо  $S_P$ , либо  $R_P$ ). В одном из вариантов реализации олигомера с  $n$  хиральными фосфорсодержащими связями (где  $n$  представляет собой целое число, равное 1 или более) олигомер содержит по меньшей мере 19 смежных стереохимически чистых фосфорсодержащих связей в одной и той же стереоориентации (т. е. либо  $S_P$ , либо  $R_P$ ). В одном из вариантов реализации олигомера с  $n$  хиральными фосфорсодержащими связями (где  $n$  представляет собой целое число, равное 1 или более) олигомер содержит по меньшей мере 20 смежных стереохимически чистых фосфорсодержащих связей в одной и той же стереоориентации (т. е. либо  $S_P$ , либо  $R_P$ ).

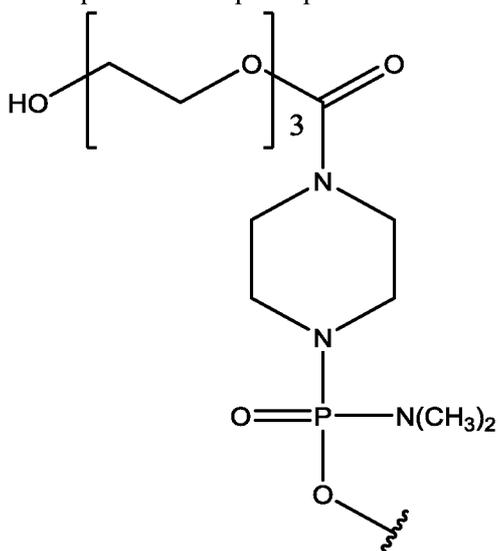
#### 9. Морфолиновые олигомеры

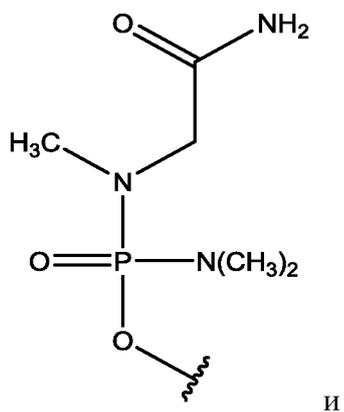
Иллюстративные варианты реализации настоящего изобретения относятся к олигомерам фосфородиамидата морфолина следующей общей структуры:



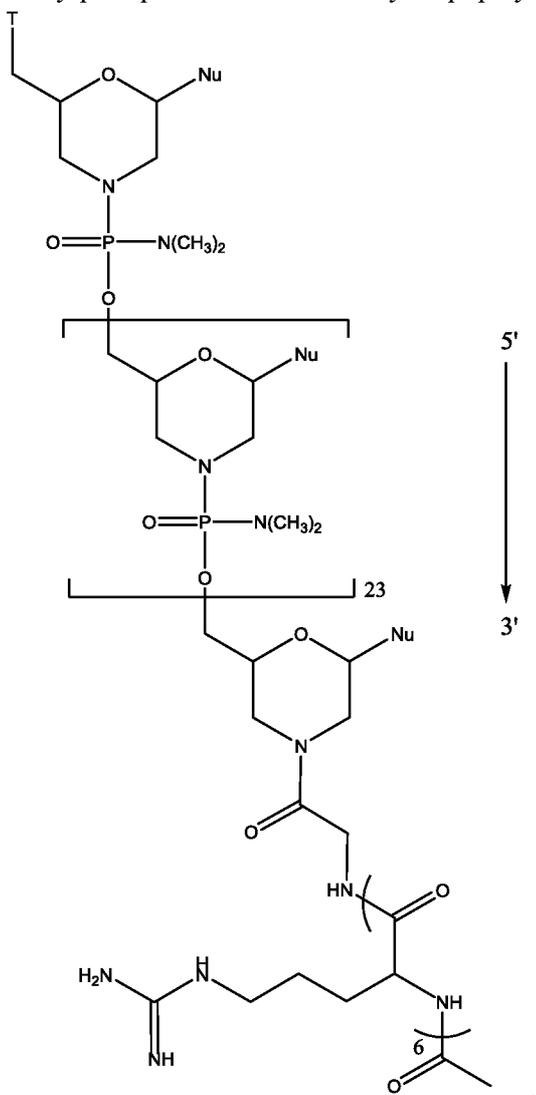
и являющимся такими, как описано на фигуре 2 из Summerton, J., et al., *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 7: 187-195 (1997). Морфолиновые олигомеры, описанные в настоящем документе, предназначены для охвата всех стереоизомеров и таутомеров общей структуры, указанной выше. Синтез, структуры и характеристики связывания морфолиновых олигомеров подробно описаны в патентах США №№: 5698685; 5217866; 5142047; 5034506; 5166315; 5521063; 5506337; 8076476 и 8299206, содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах реализации морфолиновая группа на 5'- или 3'-конце олигомера конъюгирована с «хвостовым» фрагментом для повышения его стабильности и/или растворимости. Примеры «хвостов» включают:





В различных вариантах реализации конъюгат антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию соответствует формуле (I),

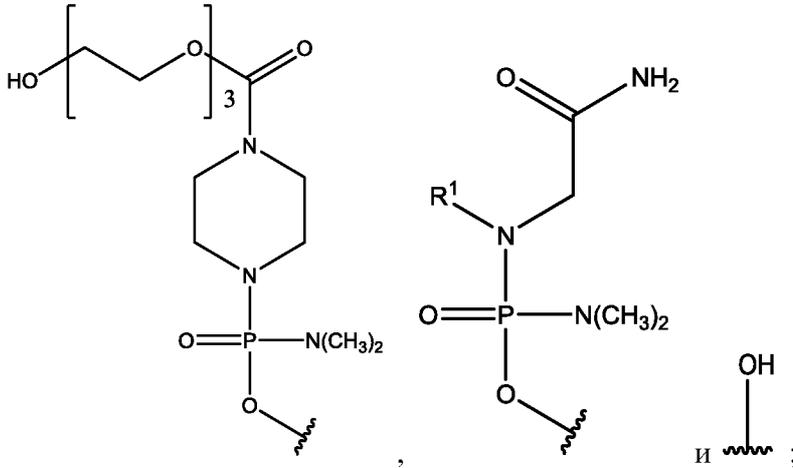


(I)

или представлен его фармацевтически приемлемой солью, где:

каждый Nu представляет собой азотистое (нуклеотидное) основание, совместно с другими образующее нацеливающую последовательность;

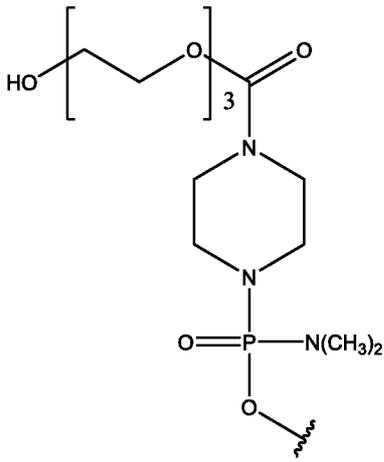
T представляет собой фрагмент, выбранный из:



$R^1$  представляет собой  $C_1$ - $C_6$ алкил;

где нацеливающая последовательность комплементарна сайту отжига экзона 53 в пре-мРНК дистрофина, обозначенному как H53A(+36+60).

В различных вариантах реализации T представляет собой

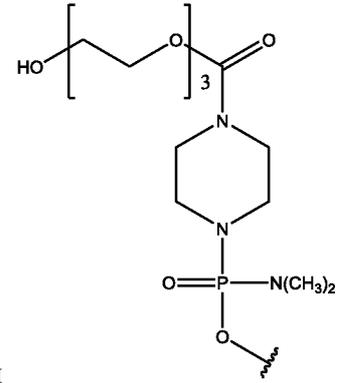


В различных вариантах реализации  $R^1$  представляет собой метил,  $CF_3$ ,  $CCl_3$ ,  $CFC1_2$ ,  $CF_2Cl$ , этил,  $CH_2CF_3$ ,  $CF_2CF_3$ , пропил, изопропил, бутил, изобутил, втор-бутил, т-бутил, пентил, изопентил, неопентил, гексил, изогексил, 3-метилпентил, 2,2-диметилбутил или 2,3-диметилбутил.

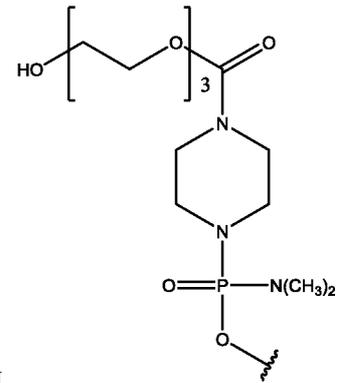
В некоторых вариантах реализации конъюгат антисмыслового олигомера формулы (I) представляет собой его соль, образованную HCl (соляной кислотой). В некоторых вариантах реализации соль HCl представляет собой соль.6HCl.

В некоторых вариантах реализации каждый Nu независимо выбран из цитозина (C), гуанина (G), тимина (T), аденина (A), 5-метилцитозина (5mC), урацила (U) и гипоксантина (I).

В некоторых вариантах реализации нацеливающая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 1 (5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTTC-3'), где каждый тимин (T) необязательно представляет собой урацил (U).

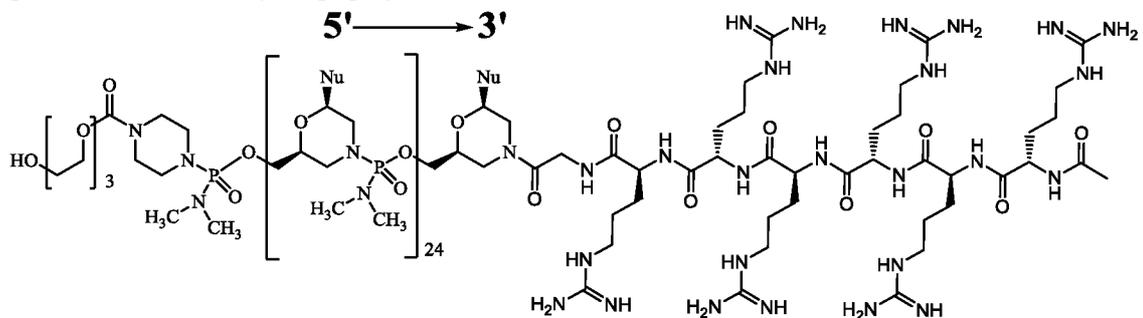


В различных вариантах реализации T представляет собой и нацеливающая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 1 (5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTTC-3'), где каждый тимин (T) необязательно представляет собой урацил (U).



В различных вариантах реализации T представляет собой и нацеливающая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 1 (5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTTC-3').

В некоторых вариантах реализации, включая, например, некоторые варианты реализации формулы (I), конъюгат антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию соответствует формуле (II),



(II)

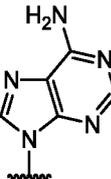
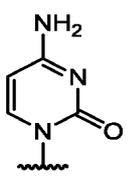
или представлен его фармацевтически приемлемой солью, где:

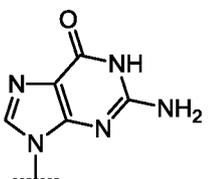
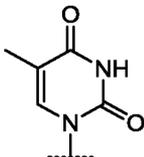
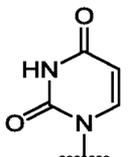
каждый Nu представляет собой азотистое (нуклеотидное) основание, совместно с другими образующее нацеливающую последовательность, которая комплементарна сайту отжига экзона 53 в пре-мРНК дистрофина, обозначенному как H53A(+36+60).

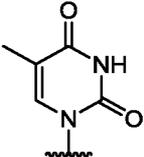
В некоторых вариантах реализации каждый Nu независимо выбран из цитозина (C), гуанина (G), тимина (T), аденина (A), 5-метилцитозина (5mC), урацила (U) и гипоксантина (I).

В различных вариантах реализации каждый Nu от 1 до 25 в направлении от 5' к 3' представляет собой (SEQ ID NO: 1):

№ положения от 5' к 3'	Nu	№ положения от 5' к 3'	Nu	№ положения от 5' к 3'	Nu	№ положения от 5' к 3'	Nu	№ положения от 5' к 3'	Nu
1	G	6	C	11	G	16	G	21	X
2	X	7	X	12	X	17	A	22	G
3	X	8	C	13	X	18	A	23	X
4	G	9	C	14	C	19	G	24	X
5	C	10	G	15	X	20	G	25	C

где A представляет собой , C представляет собой , G

представляет собой , и X представляет собой  или . В

некоторых вариантах реализации каждый X независимо представляет собой .

В некоторых вариантах реализации конъюгат антисмыслового олигомера формулы (II) представляет собой его соль, образованную HCl (соляной кислотой). В некоторых вариантах реализации соль HCl представляет собой соль.6HCl.

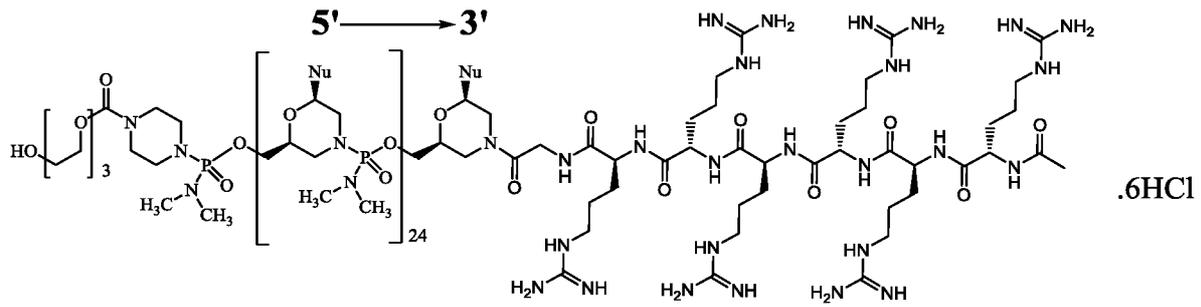
В некоторых вариантах реализации, включая, например, некоторые варианты реализации формулы (II), конъюгат антисмыслового олигомера согласно настоящему

раскрытию

соответствует

формуле

(IIA),



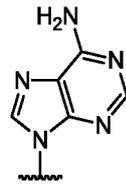
(IIA)

где каждый Nu представляет собой азотистое (нуклеотидное) основание, совместно с другими образующее нацеливающую последовательность, которая комплементарна сайту отжига экзона 53 в пре-мРНК дистрофина, обозначенному как H53A(+36+60).

В некоторых вариантах реализации каждый Nu независимо выбран из цитозина (C), гуанина (G), тимина (T), аденина (A), 5-метилцитозина (5mC), урацила (U) и гипоксантина (I).

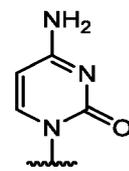
В различных вариантах реализации каждый Nu от 1 до 25 в направлении от 5' к 3' представляет собой (SEQ ID NO: 1):

№ положения от 5' к 3'	Nu	№ положения от 5' к 3'	Nu	№ положения от 5' к 3'	Nu	№ положения от 5' к 3'	Nu	№ положения от 5' к 3'	Nu
1	G	6	C	11	G	16	G	21	X
2	X	7	X	12	X	17	A	22	G
3	X	8	C	13	X	18	A	23	X
4	G	9	C	14	C	19	G	24	X
5	C	10	G	15	X	20	G	25	C

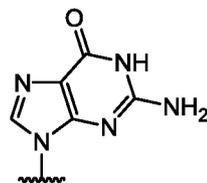


где A представляет собой

, C представляет собой

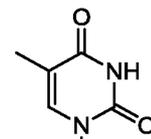


, G

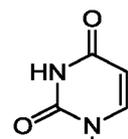


представляет собой

, и X представляет собой

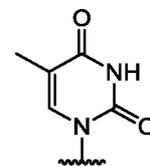


или



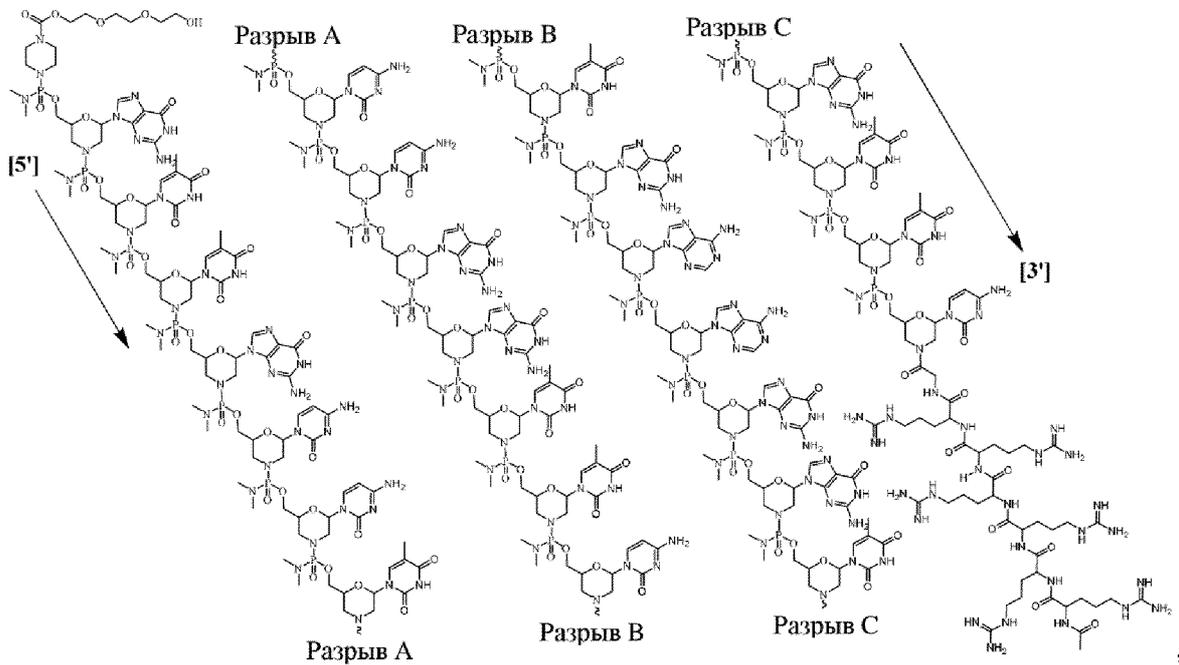
. B

некоторых вариантах реализации каждый X представляет собой



В некоторых вариантах реализации, включая, например, варианты реализации конъюгатов антисмысловых олигомеров формулы (II) и формулы (IIA), нацеливающая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 1 (5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTTC-3'), где каждый тимин (T) необязательно представляет собой урацил (U). В различных вариантах реализации, включая, например, варианты реализации конъюгатов антисмысловых олигомеров формулы (II) и формулы (IIA), нацеливающая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 1 (5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTTC-3').

В некоторых вариантах реализации, включая, например, варианты реализации конъюгатов антисмысловых олигомеров формулы (I), конъюгат антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию соответствует формуле (III),

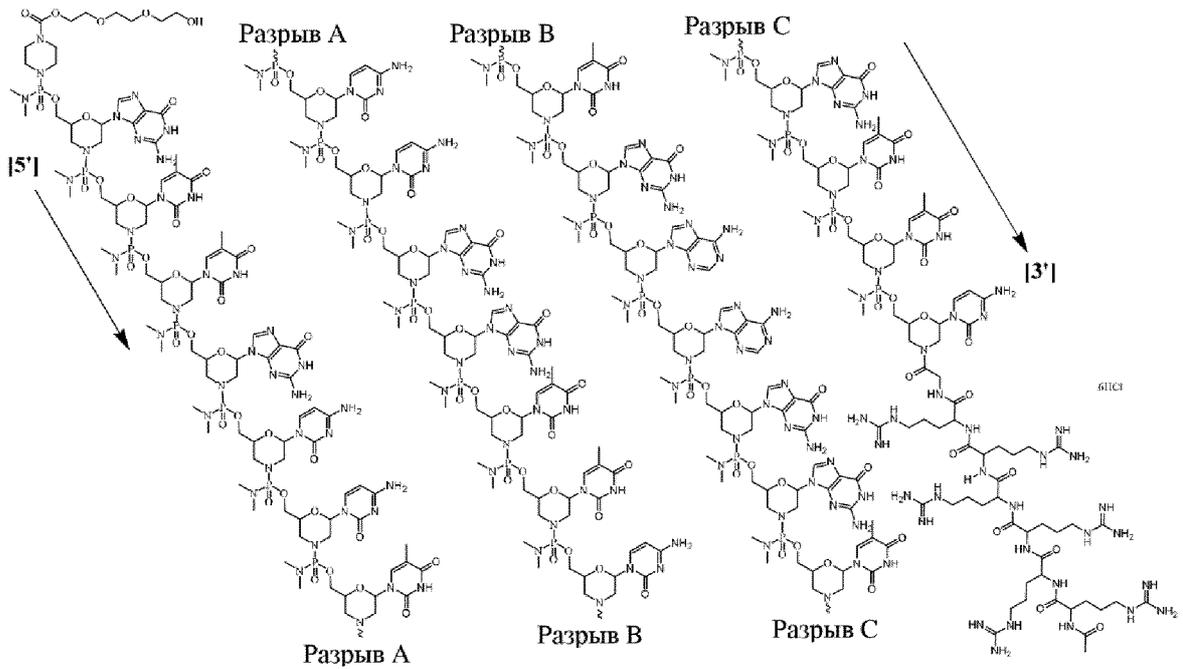


(III)

или представлен его фармацевтически приемлемой солью.

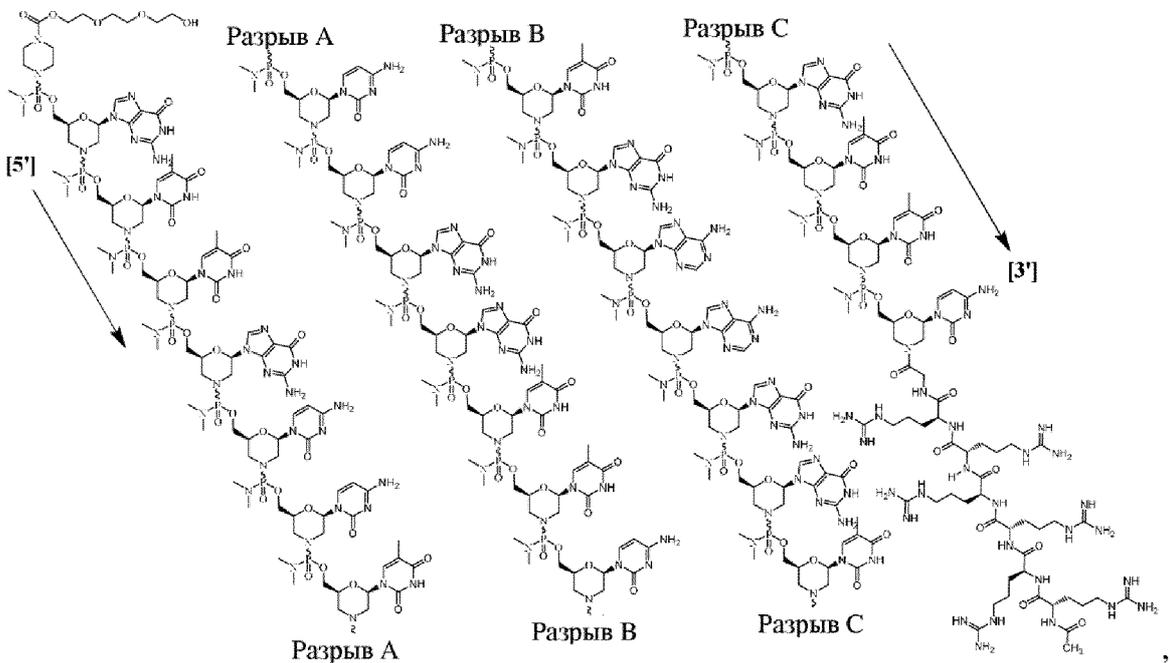
В некоторых вариантах реализации конъюгат антисмыслового олигомера формулы (III) представляет собой его соль, образованную HCl (соляной кислотой). В некоторых вариантах реализации соль HCl представляет собой соль.6HCl.

В некоторых вариантах реализации, включая, например, варианты реализации конъюгатов антисмысловых олигомеров формулы (III), конъюгат антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию соответствует формуле (IIIA),



(III).

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия, включая некоторые варианты реализации конъюгатов антисмысловых олигомеров формулы (I) и варианты реализации конъюгатов антисмысловых олигомеров формулы (III), конъюгат антисмыслового олигомера соответствует формуле (IV),

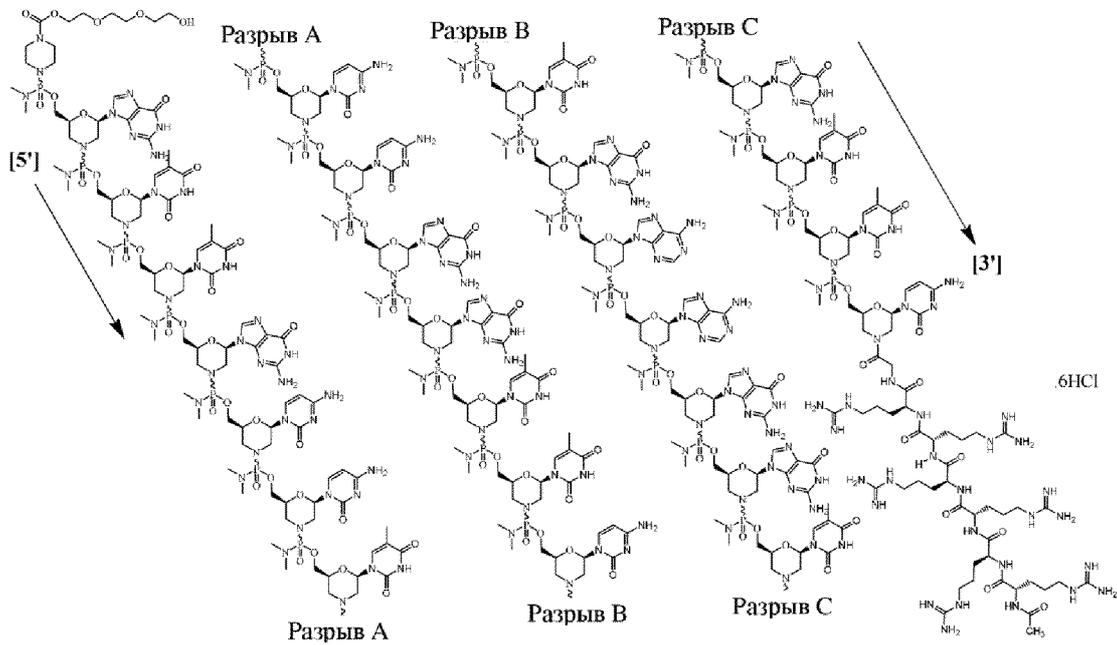


(IV)

или представлен его фармацевтически приемлемой солью.

В некоторых вариантах реализации конъюгат антисмыслового олигомера формулы (IV) представляет собой его соль, образованную HCl (соляной кислотой). В некоторых вариантах реализации соль HCl представляет собой соль  $6\text{HCl}$ .

В некоторых вариантах реализации, включая, например, варианты реализации конъюгатов антисмысловых олигомеров формулы (IV), конъюгат антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию соответствует формуле (IVA),



(IVA)

#### 10. Модификации и замены азотистых (нуклеотидных) оснований

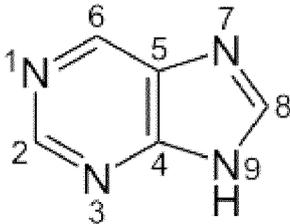
В некоторых вариантах реализации конъюгаты антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию состоят из азотистых (нуклеотидных) оснований РНК и азотистых (нуклеотидных) оснований ДНК (часто называемых в данной области техники просто «основаниями»). Основания РНК известны под названиями аденин (А), урацил (U), цитозин (С) и гуанин (G). Основания ДНК известны под названиями аденин (А), тимин (Т), цитозин (С) и гуанин (G). В различных вариантах реализации конъюгаты антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию состоят из цитозина (С), гуанина (G), тимина (Т), аденина (А), 5-метилцитозина (5mC), урацила (U) и гипоксантина (I).

В некоторых вариантах реализации конъюгат антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию содержит последовательность азотистых (нуклеотидных) оснований, совместно с другими образующих нацеливающую последовательность, где нацеливающая последовательность комплементарна сайту отжига экзона 53 в пре-мРНК дистрофина, обозначенному как H53A(+36+60). В различных вариантах реализации последовательность азотистых (нуклеотидных) оснований содержит последовательность под SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах реализации последовательность азотистых (нуклеотидных) оснований состоит из последовательности под SEQ ID NO: 1. В различных вариантах реализации последовательность азотистых (нуклеотидных) оснований содержит последовательность, в которой имеется делеция, замещение, вставка и/или добавление 1-5 азотистых (нуклеотидных) оснований по сравнению с последовательностью под SEQ ID NO:1. В различных вариантах реализации

последовательность азотистых (нуклеотидных) оснований состоит из последовательности, в которой имеется делеция, замещение, вставка и/или добавление 1-5 азотистых (нуклеотидных) оснований по сравнению с последовательностью под SEQ ID NO:1. В различных вариантах реализации нацеливающая последовательность содержит участок, комплементарный по меньшей мере одной нити из трех или более идентичных смежных азотистых (нуклеотидных) оснований в сайте отжига, где сайт отжига содержит по меньшей мере одно дополнительное азотистое (нуклеотидное) основание по сравнению с участком нацеливающей последовательности и по меньшей мере одно дополнительное азотистое (нуклеотидное) основание не имеет комплементарного азотистого (нуклеотидного) основания в участке нацеливающей последовательности, и где нацеливающий участок, комплементарный по меньшей мере одной нити из трех или более идентичных смежных азотистых (нуклеотидных) оснований, находится внутри нацеливающей последовательности, примеры которой можно найти в патенте США под серийным № 62/573985, содержание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах реализации одно или более оснований РНК или оснований ДНК в олигомере могут быть модифицированы или заменены на основание, отличное от РНК-основания или ДНК-основания. Олигомеры, содержащие модифицированное или замещенное основание, включают олигомеры, в которых одно или более пуриновых или пиримидиновых оснований, наиболее часто встречающихся в нуклеиновых кислотах, заменены на менее распространенные или не встречающиеся в природе основания.

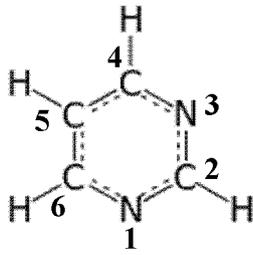
Пуриновые основания содержат пиримидиновое кольцо, конденсированное с имидазольным кольцом, что описывается следующей общей формулой:



### Пурин

Аденин и гуанин являются двумя пуриновыми азотистыми (нуклеотидными) основаниями, наиболее часто встречающимися в нуклеиновых кислотах. Другие встречающиеся в природе пурины включают, но не ограничиваются перечисленными, N<sup>6</sup>-метиладенин, N<sup>2</sup>-метилгуанин, гипоксантин и 7-метилгуанин.

Пиримидиновые основания содержат шестичленное пиримидиновое кольцо, что описывается следующей общей формулой:



Пиримидин

Цитозин, урацил и тимин являются пиримидиновыми основаниями, наиболее часто встречающимися в нуклеиновых кислотах. Другие встречающиеся в природе пиримидины включают, но не ограничиваются перечисленными, 5-метилцитозин, 5-гидроксиметилцитозин, псевдоурацил и 4-тиоурацил. В одном из вариантов реализации олигомеры, описанные в настоящем документе, содержат основания - производные тимина вместо урацила.

Другие подходящие основания включают, но не ограничиваются перечисленными: 2,6-диаминопурин, оротовую кислоту, агматидин, лизидин, 2-тиопиримидины (например, 2-тиоурацил, 2-тиотимин), G-clamp и его производные, 5-замещенные пиримидины (например, 5-галогенурацил, 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 N<sup>4</sup>-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 их производные; и вырожденные или универсальные основания, такие как 2,6-дифтортолуол или отсутствующие основания, такие как сайты, лишённые азотистого основания (например, 1-дезоксирибоза, 1,2-дидезоксирибоза, 1-дезоксидезокси-2-О-метилрибоза; или производные пирролидина, в которых атом кислорода в кольце был заменен на атом азота (азарибоза)). Примеры производных Super A, Super G и Super T представлены в патенте США № 6683173 (Epoch Biosciences), содержание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Было показано, что Pent-G, cPent-AP и Pr-AP уменьшают иммуностимулирующее действие при встраивании в мРНК (Peacock H. et al. J.Am.Chem. Soc. 2011, 133, 9200). Псевдоурацил представляет собой встречающийся в природе изомеризованный вариант урацила, содержащий C-гликозид, а не обычный N-гликозид, как в урдине. Псевдоуридинсодержащая синтетическая мРНК может иметь улучшенный профиль безопасности по сравнению с уридинсодержащей мРНК (источник WO 2009127230, содержание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки).

Некоторые азотистые (нуклеотидные) основания особенно полезны для увеличения аффинности связывания конъюгатов антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию. Они включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2-, N-6- и

О-6-замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Было показано, что замены на 5-метилцитозин увеличивают стабильность дуплекса нуклеиновой кислоты на 0,6-1,2°C и в настоящее время являются предпочтительными заменами оснований, еще более конкретно - в сочетании с 2'-О-метоксиэтильными модификациями сахаров. Дополнительные примеры модифицированных азотистых (нуклеотидных) оснований включают основания, в которых по меньшей мере один атом водорода азотистого (нуклеотидного) основания заменен на фтор.

#### 11. Фармацевтически приемлемые соли конъюгатов антисмысловых олигомеров

Некоторые варианты реализации конъюгатов антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию 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 аспекте относится к сравнительно нетоксичным солям присоединения неорганических и органических кислот конъюгатов антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию. Эти соли могут быть получены *in situ* в переносящей среде для введения или в процессе получения лекарственной формы, либо отдельно путем введения в реакцию очищенного конъюгата антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию в форме его свободного основания с подходящей органической или неорганической кислотой и выделения полученной таким образом соли в процессе последующей очистки. Типичные соли включают гидробромид, гидрохлорид, сульфат, бисульфат, фосфат, нитрат, ацетат, валерат, олеат, пальмитат, стеарат, лаурат, бензоат, лактат, тозилат, цитрат, малеат, фумарат, сукцинат, тартрат, нафтилат, мезилат, глюкогептонат, лактобионат и лаурилсульфонат и тому подобное. (См., например, Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J.Pharm. Sci. 66:1-19).

Фармацевтически приемлемые соли конъюгатов антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию включают обычные нетоксичные соли или четвертичные аммониевые соли конъюгатов антисмысловых олигомеров, например, из нетоксичных органических или неорганических кислот. Например, такие обычные нетоксичные соли включают соли, полученные из неорганических кислот, таких как хлороводородная, бромоводородная, серная, сульфаминовая, фосфорная, азотная и тому подобное; и соли, полученные из органических кислот, таких как уксусная, пропионовая, янтарная, гликолевая, стеариновая, молочная, яблочная, винная, лимонная, аскорбиновая, пальмитиновая, малеиновая, гидроксималеиновая, фенилуксусная, глутаминовая, бензойная, салициловая, сульфаниловая, 2-ацетоксибензойная, фумаровая, толуолсульфо кислота, метансульфо кислота, этандисулфо кислота, щавелевая, изотионовая и тому подобное.

В некоторых вариантах реализации конъюгаты антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию могут содержать одну или более кислотных

функциональных групп и, таким образом, способны к образованию фармацевтически приемлемых солей с фармацевтически приемлемыми основаниями. Термин «фармацевтически приемлемые соли» в этих случаях относится к сравнительно нетоксичным солям присоединения неорганических и органических оснований конъюгатов антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию. Эти соли аналогичным образом могут быть получены *in situ* в переносящей среде для введения или в процессе получения лекарственной формы, либо отдельно путем введения в реакцию очищенного конъюгата антисмыслового олигомера в форме его свободной кислоты с подходящим основанием, таким как гидроксид, карбонат или бикарбонат фармацевтически приемлемого катиона металла, с аммиаком или с фармацевтически приемлемым органическим первичным, вторичным или третичным амином. Типичные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают соли лития, натрия, калия, кальция, магния и алюминия и тому подобное. Типичные органические амины, подходящие для образования солей присоединения основания, включают этиламин, диэтиламин, этилендиамин, этаноламин, диэтанолламин, пиперазин и тому подобное. (См., например, Verge et al., выше).

### **III. Составы и способы введения**

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия предложены составы или фармацевтические композиции, подходящие для терапевтической доставки конъюгатов антисмысловых олигомеров, согласно настоящему раскрытию. Соответственно, в некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия предложены фармацевтически приемлемые композиции, которые содержат терапевтически эффективное количество одного или более конъюгатов антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию, приготовленных совместно с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями (добавками) и/или разбавителями. Несмотря на то, что конъюгат антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию можно вводить отдельно, предпочтительным является введение конъюгата антисмыслового олигомера в виде фармацевтического состава (композиции). В одном из вариантов реализации конъюгат антисмыслового олигомера в составе соответствует формуле (III).

Способы доставки молекул нуклеиновых кислот, которые могут быть применимы для конъюгатов антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию, описаны, например, в источниках: Akhtar et al., 1992, Trends Cell Bio., 2:139; Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995, CRC Press; и Sullivan et al., PCT WO 94/02595. Эти и другие протоколы могут применяться для доставки практически любой молекулы нуклеиновой кислоты, включая конъюгаты антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию.

Фармацевтические композиции согласно настоящему раскрытию могут быть специально приготовлены для введения в твердой или жидкой форме, включая формы, адаптированные для следующего: (1) перорального введения, например, жидкие лекарственные формы для перорального введения (водные или неводные растворы или

суспензии), таблетки (предназначенные для трансбуккального, сублингвального или системного всасывания), болусы, порошки, гранулы, пасты для нанесения на язык; (2) парентерального введения, например, посредством подкожной, внутримышечной, внутривенной или эпидуральной инъекции в виде, например, стерильного раствора или суспензии или состава с замедленным высвобождением; (3) местного применения, например, в виде крема, мази или пластыря или спрея с контролируемым высвобождением, наносимых на кожу; (4) интравагинального или ректального введения, например, в виде пессария, крема или пены; (5) сублингвального введения; (6) введения через глаза; (7) трансдермального введения или (8) назального введения.

Некоторые примеры материалов, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают, но не ограничиваются перечисленными: (1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; (2) крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; (3) целлюлозу и ее производные, такие как натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; (4) порошкообразный трагакант; (5) солод; (6) желатин; (7) тальк; (8) вспомогательные вещества, такие как масло какао и воски для суппозиториев; (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 агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновую кислоту; (16) апирогенную воду; (17) изотонический солевой раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) буферные растворы с определенным pH; (21) сложные полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды и (22) другие нетоксичные совместимые вещества, применяемые в фармацевтических составах.

Дополнительные неограничивающие примеры средств, подходящих для составления с конъюгатами антисмысловых олигомеров по настоящему раскрытию, включают: конъюгированные с ПЭГ нуклеиновые кислоты, конъюгированные с фосфолипидом нуклеиновые кислоты, нуклеиновые кислоты, содержащие липофильные фрагменты, фосфоротиоаты, ингибиторы Р-гликопротеина (такие как Pluronic P85), которые могут усиливать доступ лекарственных средств к различным тканям; биологически разлагаемые полимеры, такие как микросферы поли(DL-лактид-гликолида) для доставки с замедленным высвобождением после имплантации (Emerich, D F et al., 1999, Cell Transplant, 8, 47-58) Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.; и загруженные наночастицы, такие как те, которые сделаны из полибутилцианоакрилата, способные доставлять лекарственные средства через гематоэнцефалический барьер и способные изменять механизмы нейронного поглощения (Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999).

Настоящее раскрытие также относится к применению композиции, содержащей поверхностно-модифицированные липосомы, содержащие липиды, модифицированные

полиэтиленгликолем («ПЭГ») (ПЭГ-модифицированные, разветвленные и неразветвленные или их комбинации, или длительно циркулирующие липосомы, или скрытые липосомы). Конъюгаты олигомеров согласно настоящему раскрытию также могут содержать ковалентно присоединенные молекулы ПЭГ различной молекулярной массы. Эти составы обеспечивают способ увеличения накопления лекарственных средств в тканях-мишенях. Этот класс переносчиков лекарственных средств устойчив к опсонизации и выведению из организма с участием системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ или РЭС), что обеспечивает более длительное время циркуляции в кровотоке и усиленное воздействие на ткани инкапсулированного лекарственного средства (Lasic et al. *Chem. Chem.* 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata et al., *Chem. Pharm. Bull.* 1995, 43, 1005-1011). Было показано, что такие липосомы избирательно накапливаются в опухолях, предположительно за счет экстравазации и захвата неоваскуляризованными тканями-мишенями (Lasic et al., *Science* 1995, 267, 1275-1276; Oku et al., 1995, *Biochim. Biophys. Acta*, 1238, 86-90). Длительно циркулирующие липосомы улучшают фармакокинетические и фармакодинамические характеристики ДНК и РНК, в частности, по сравнению с обычными катионными липосомами, которые, как известно, накапливаются в тканях СМФ (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 также, вероятно, защищают лекарственные средства от деградации под действием нуклеаз в большей степени по сравнению с катионными липосомами благодаря их способности избегать накопления в метаболически агрессивных тканях СМФ, таких как печень и селезенка.

В дополнительном варианте реализации настоящее раскрытие включает фармацевтические композиции на основе конъюгата антисмыслового олигомера, полученные для доставки, как описано в патентах США №№: 6692911; 7163695 и 7070807. В связи с этим, в одном из вариантов реализации настоящее изобретение предусматривает конъюгат антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию в композиции, содержащей сополимеры лизина и гистидина (НК) (как описано в патентах США №№: 7163695; 7070807 и 6692911) либо отдельно, либо в комбинации с ПЭГ (например, разветвленным или неразветвленным ПЭГ или смесью обоих), в комбинации с ПЭГ и нацеливающим фрагментом, или любое из вышеперечисленного в комбинации со сшивающим агентом. В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия предложены конъюгаты антисмысловых олигомеров в составе фармацевтических композиций, содержащих модифицированный глюконовой кислотой полигистидин или глюконилированный полигистидин/трансферрин-полилизин. Специалисту в данной области техники также будет понятно, что аминокислоты со свойствами, подобными свойствам His и Lys, могут быть заменены внутри композиции.

Смачивающие агенты, эмульгаторы и смазывающие вещества (такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния), окрашивающие агенты, антиадгезивные агенты,

покрывающие агенты, подслащивающие агенты, агенты для коррекции вкуса, ароматизирующие агенты, консерванты и антиоксиданты также могут присутствовать в композициях.

Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и тому подобное; (2) жирорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (БГА), бутилированный гидрокситолуол (БГТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и тому подобное; и (3) агенты, хелатирующие металлы, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и тому подобное.

Составы согласно настоящему раскрытию включают составы, подходящие для перорального, назального, местного (включая буккальное и сублингвальное), ректального, вагинального и/или парентерального введения. В целях удобства составы могут быть представлены в виде единичной лекарственной формы и могут быть получены любыми способами, хорошо известными в области фармации. Количество активного ингредиента, которое можно объединять с материалом-носителем для получения лекарственной формы с однократной дозировкой, будет варьировать в зависимости от субъекта, подлежащего лечению, и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое можно объединять с материалом-носителем для получения лекарственной формы с однократной дозировкой, обычно будет составлять такое количество активного ингредиента, которое обеспечивает терапевтический эффект. Как правило, это количество будет составлять от примерно 0,1 процента до примерно девяноста девяти процентов активного ингредиента, предпочтительно от примерно 5 процентов до примерно 70 процентов, наиболее предпочтительно от примерно 10 процентов до примерно 30 процентов.

В некоторых вариантах реализации состав согласно настоящему раскрытию содержит вспомогательное вещество, выбранное из циклодекстринов, целлюлоз, липосом, мицеллообразующих агентов, например, желчных кислот, и полимерных носителей, например, сложных полиэфигов и полиангидридов; и конъюгат антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию. В одном из вариантов реализации конъюгат антисмыслового олигомера в составе соответствует формуле (III). В некоторых вариантах реализации упомянутый выше состав обеспечивает биодоступность при пероральном введении конъюгата антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию.

Способы получения этих составов или фармацевтических композиций включают стадию объединения конъюгата антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию с носителем и, необязательно, одним или более вспомогательными ингредиентами. В целом, составы получают путем равномерного и тщательного объединения конъюгата антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию с

жидкими носителями или тонкоизмельченными твердыми носителями или и с теми, и с другими и затем, при необходимости, формования продукта.

Составы согласно настоящему описанию, подходящие для перорального введения, могут находиться в форме капсул, крахмальных капсул, пилюль, таблеток, леденцов для рассасывания (с использованием ароматизированной основы, обычно сахарозы и камеди или трагаканта), порошков, гранул, или в виде раствора или суспензии в водной или неводной жидкости, или в виде жидкой эмульсии типа «масло-в-воде» или «вода-в-масле», или в виде эликсира или сиропа, или в виде пастилок (с использованием инертной основы, такой как желатин и глицерин или сахароза и камедь) и/или в виде жидкостей для полоскания рта и тому подобного, при этом каждая из указанных форм содержит заранее определенное количество конъюгата антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию в качестве активного ингредиента. Конъюгат антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию также можно вводить в виде болюса, электуария или пасты.

В твердых лекарственных формах для перорального введения согласно настоящему раскрытию (капсулы, таблетки, пилюли, драже, порошки, гранулы, таблетки для рассасывания и тому подобное) активный ингредиент может быть смешан с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, такими как цитрат натрия или дикальция фосфат, и/или любым из следующего: (1) наполнителями или сухими разбавителями, такими как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремниевая кислота; (2) связующими веществами, такими как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и/или камедь; (3) увлажнителями, такими как глицерин; (4) разрыхлителями, такими как агар-агар, карбонат кальция, картофельный или тапиоковый крахмал, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия; (5) агентами, замедляющими растворение, такими как парафин; (6) ускорителями всасывания, такими как четвертичные аммониевые соединения и поверхностно-активные вещества, такие как полоксамер и лаурилсульфат натрия; (7) смачивающими агентами, такими как, например, цетиловый спирт, моностеарат глицерина и неионные поверхностно-активные вещества; (8) абсорбентами, такими как каолин и бентонитовая глина; (9) смазывающими веществами, такими как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия, стеарат цинка, стеарат натрия, стеариновая кислота и их смеси; (10) окрашивающими агентами и (11) агентами, обеспечивающими контролируемое высвобождение, такими как кросповидон или этилцеллюлоза. В случае капсул, таблеток и пилюль фармацевтические композиции также могут содержать буферные агенты. Твердые фармацевтические композиции подобного типа также могут применяться в качестве наполнителей в желатиновых капсулах с мягкой и твердой оболочкой с использованием таких вспомогательных веществ, как лактоза или молочные сахара, а также полиэтиленгликоли с высокой молекулярной массой и тому подобное.

Таблетка может быть получена путем прессования или формования, необязательно совместно с одним или более вспомогательными ингредиентами. Прессованные таблетки могут быть получены с применением связующего вещества (например, желатина или гидроксипропилметилцеллюлозы), смазывающего вещества, инертного разбавителя, консерванта, разрыхлителя (например, натрия крахмалгликолята или поперечно-сшитой натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы), поверхностно-активного или диспергирующего агента. Формованные таблетки могут быть получены путем формования в подходящем устройстве смеси порошкообразного соединения, смоченного инертным жидким разбавителем.

Таблетки и другие твердые лекарственные формы фармацевтических композиций согласно настоящему описанию, такие как драже, капсулы, пилюли и гранулы, могут, необязательно, иметь риск или быть получены с покрытиями и оболочками, такими как энтеросолюбильные покрытия и другие покрытия, хорошо известные в области получения фармацевтических составов. Они также могут быть приготовлены таким образом, чтобы обеспечивать медленное или контролируемое высвобождение используемого в них активного ингредиента с применением, например, гидроксипропилметилцеллюлозы в различных пропорциях для обеспечения желаемого профиля высвобождения, других полимерных матриц, липосом и/или микросфер. Они могут быть приготовлены для быстрого высвобождения, например, лиофилизированы. Их можно стерилизовать, например, посредством фильтрования через задерживающий бактерии фильтр или включения стерилизующих агентов в форме стерильных твердых фармацевтических композиций, которые можно растворять в стерильной воде или в какой-либо другой стерильной инъекционной среде непосредственно перед применением. Эти фармацевтические композиции также, необязательно, могут содержать замутняющие агенты и могут иметь такой состав, что они высвобождают активный(ые) ингредиент(ы) исключительно или предпочтительно в определенном участке желудочно-кишечного тракта, необязательно, с задержкой. Примеры композиций для заключения активных ингредиентов, которые могут быть применены, включают полимерные вещества и воски. Активный ингредиент также может находиться в микроинкапсулированной форме, если необходимо, с одним или более описанными выше вспомогательными веществами.

Жидкие лекарственные формы для перорального введения конъюгатов антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию включают фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. Помимо активного ингредиента, жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, широко применяемые в данной области техники, такие как, например, 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 зародышей, оливковое, касторовое и кунжутное масла),

глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот и сорбитана и их смеси.

Кроме инертных разбавителей, фармацевтические композиции для перорального введения также могут содержать адьюванты, такие как смачивающие агенты, эмульгирующие и суспендирующие агенты, подсластители, ароматизаторы, красители, отдушки и консерванты.

Суспензии, помимо активных соединений, могут содержать суспендирующие агенты, такие как, например, этоксилированные изостеариловые спирты, сложные эфиры полиоксиэтиленсорбита и сорбитана, микрокристаллическая целлюлоза, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант и их смеси.

Составы для ректального или вагинального введения могут быть представлены в виде суппозитория, который может быть получен путем смешивания одного или более соединений согласно настоящему раскрытию с одним или более подходящими не вызывающими раздражения вспомогательными веществами или носителями, содержащими, например, масло какао, полиэтиленгликоль, воск для суппозитория или салицилат, и который является твердым при комнатной температуре, но жидким при температуре тела и, следовательно, будет плавиться в полости прямой кишки или влагалища с высвобождением активного соединения.

Составы или лекарственные формы для местного или трансдермального введения олигомера согласно настоящему раскрытию включают порошки, спреи, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластыри и лекарственные формы для ингаляции. Активные конъюгаты олигомеров могут быть смешаны в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми консервантами, буферами или пропеллентами, которые могут потребоваться. Мази, пасты, кремы и гели могут содержать, помимо активного соединения согласно настоящему описанию, вспомогательные вещества, 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, помимо конъюгата антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию, вспомогательные вещества, такие как лактоза, тальк, кремниевая кислота, гидроксид алюминия, силикаты кальция и порошок полиамида или смеси этих веществ. Спреи могут дополнительно содержать обычные пропелленты, такие как хлорфторуглеводороды и летучие незамещенные углеводороды, такие как бутан и пропан.

Трансдермальные пластыри имеют дополнительное преимущество, заключающееся в обеспечении контролируемой доставки конъюгата антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию в организм. Такие лекарственные формы могут быть получены путем растворения или диспергирования олигомера в подходящей среде. Усилители всасывания также могут применяться для увеличения потока агента через кожу. Скорость такого потока можно контролировать либо с помощью мембраны,

регулирующей скорость, либо путем диспергирования агента в полимерной матрице или геле, помимо прочих способов, известных в данной области техники.

Фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, могут содержать один или более конъюгатов олигомеров согласно настоящему раскрытию в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или неводными растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями или стерильными порошками, которые могут быть восстановлены с получением стерильных инъекционных растворов или дисперсий непосредственно перед применением, которые могут содержать сахара, спирты, антиоксиданты, буферы, бактериостатики, растворенные вещества, придающие составу изотоничность с кровью предполагаемого реципиента, или суспендирующие агенты или загустители. Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые могут применяться в фармацевтических композициях согласно настоящему описанию, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и тому подобное) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и органические сложные эфиры для инъекционного введения, такие как этилолеат. Подходящую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрывающих материалов, таких как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ. В одном из вариантов реализации конъюгат антисмыслового олигомера в фармацевтической композиции соответствует формуле (III).

Эти фармацевтические композиции также могут содержать адъюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Предотвращение действия микроорганизмов на конъюгаты олигомеров согласно настоящему раскрытию может быть обеспечено путем включения различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и тому подобного. Также может быть желательно включение в композиции изотонических агентов, таких как сахара, хлорид натрия и тому подобное. Кроме того, длительное всасывание инъекционной фармацевтической формы может быть обеспечено путем включения агентов, замедляющих всасывание, таких как моностеарат алюминия и желатин.

В некоторых случаях, с целью продления действия лекарственного средства, желательно замедлить всасывание лекарственного средства при подкожной или внутримышечной инъекции. Это может быть достигнуто путем применения жидкой суспензии кристаллического или аморфного материала, малорастворимого в воде, помимо прочих способов, известных в данной области техники. Скорость всасывания лекарственного средства в этом случае зависит от скорости его растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера кристалла и кристаллической формы. В качестве альтернативы, отсроченного всасывания лекарственной формы, вводимой парентерально,

достигают путем растворения или суспендирования лекарственного средства в масляной переносящей среде.

Депо-формы для инъекционного введения могут быть получены путем формирования микрокапсульных матриц конъюгатов олигомеров согласно настоящему раскрытию в биоразлагаемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. Скорость высвобождения олигомера можно контролировать в зависимости от соотношения олигомера и полимера и природы конкретного используемого полимера. Примеры других биоразлагаемых полимеров включают поли(ортоэфир) и поли(ангидриды). Депо-составы для инъекционного введения также могут быть получены путем заключения лекарственного средства в липосомы или микроэмульсии, которые совместимы с тканями организма.

В случаях, когда конъюгаты антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию вводят в виде фармацевтических препаратов людям и животным, их можно вводить в чистом виде или в виде фармацевтической композиции, содержащей, например, от 0,1 до 99% (более предпочтительно от 10 до 30%) конъюгата антисмыслового олигомера в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Составы или препараты согласно настоящему раскрытию можно вводить перорально, парентерально, местно или ректально. Как правило, обеспечивают их формы, подходящие для каждого пути введения. Например, их вводят в форме таблеток или капсул, путем инъекции, ингаляции, в виде лосьона для глаз, мази, суппозитория или инфузии; местно с помощью лосьона или мази или ректально с помощью суппозитория.

Независимо от выбранного пути введения, конъюгаты антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию, которые могут применяться в подходящей гидратированной форме, и/или фармацевтические композиции согласно настоящему раскрытию могут быть приготовлены в виде фармацевтически приемлемых лекарственных форм с помощью обычных способов, известных специалистам в данной области техники. Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях согласно настоящему раскрытию могут варьировать таким образом, чтобы обеспечить количество активного ингредиента, которое является эффективным для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, без неприемлемой токсичности для пациента.

Выбранная величина дозы будет зависеть от множества факторов, включая активность конкретного применяемого конъюгата антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию или его сложного эфира, соли или амида, путь введения, время введения, скорость выведения или метаболизма конкретного применяемого олигомера, скорость и степень всасывания, длительность лечения, использование других лекарственных средств, соединений и/или материалов в сочетании с конкретным применяемым олигомером, возраст, пол, массу, состояние, общее состояние здоровья и предшествующую историю болезни пациента, подлежащего лечению, и подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

Врач или ветеринар, являющийся обычным специалистом в данной области техники, может легко определить и назначить необходимое эффективное количество фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начинать применение доз конъюгатов антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию, применяемых в фармацевтической композиции, с более низких величин, чем требующиеся для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозу до тех пор, пока желаемый эффект не будет достигнут. В целом, подходящая суточная доза конъюгата антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию будет представлять собой такое количество конъюгата антисмыслового олигомера, которое является наименьшей дозой, эффективной для обеспечения терапевтического эффекта. Такая эффективная доза обычно будет зависеть от факторов, описанных в настоящем раскрытии. Как правило, дозы для перорального, внутривенного, интрацеребровентрикулярного и подкожного введения конъюгатов антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию для пациента, в случае их применения для достижения указанных эффектов, будут составлять от примерно 0,0001 до примерно 100 мг на килограмм массы тела в сутки.

В некоторых вариантах реализации конъюгаты антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию вводят в дозах, обычно составляющих примерно 10-160 мг/кг или 20-160 мг/кг. В некоторых случаях могут потребоваться дозы, превышающие 160 мг/кг. В некоторых вариантах реализации дозы для в/в введения составляют от примерно 0,5 мг до 160 мг/кг. В некоторых вариантах реализации конъюгаты антисмысловых олигомеров вводят в дозах, составляющих примерно 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг или 10 мг/кг. В некоторых вариантах реализации конъюгаты антисмысловых олигомеров вводят в дозах, составляющих примерно 10 мг/кг, 11 мг/кг, 12 мг/кг, 15 мг/кг, 18 мг/кг, 20 мг/кг, 21 мг/кг, 25 мг/кг, 26 мг/кг, 27 мг/кг, 28 мг/кг, 29 мг/кг, 30 мг/кг, 31 мг/кг, 32 мг/кг, 33 мг/кг, 34 мг/кг, 35 мг/кг, 36 мг/кг, 37 мг/кг, 38 мг/кг, 39 мг/кг, 40 мг/кг, 41 мг/кг, 42 мг/кг, 43 мг/кг, 44 мг/кг, 45 мг/кг, 46 мг/кг, 47 мг/кг, 48 мг/кг, 49 мг/кг, 50 мг/кг, 51 мг/кг, 52 мг/кг, 53 мг/кг, 54 мг/кг, 55 мг/кг, 56 мг/кг, 57 мг/кг, 58 мг/кг, 59 мг/кг, 60 мг/кг, 65 мг/кг, 70 мг/кг, 75 мг/кг, 80 мг/кг, 85 мг/кг, 90 мг/кг, 95 мг/кг, 100 мг/кг, 105 мг/кг, 110 мг/кг, 115 мг/кг, 120 мг/кг, 125 мг/кг, 130 мг/кг, 135 мг/кг, 140 мг/кг, 145 мг/кг, 150 мг/кг, 155 мг/кг, 160 мг/кг, включая все целочисленные значения между указанными значениями. В некоторых вариантах реализации олигомер вводят в дозе 10 мг/кг. В некоторых вариантах реализации олигомер вводят в дозе 20 мг/кг. В некоторых вариантах реализации олигомер вводят в дозе 30 мг/кг. В некоторых вариантах реализации олигомер вводят в дозе 40 мг/кг. В некоторых вариантах реализации олигомер вводят в дозе 60 мг/кг. В некоторых вариантах реализации олигомер вводят в дозе 80 мг/кг. В некоторых вариантах реализации олигомер вводят в дозе 160 мг/кг. В некоторых вариантах реализации олигомер вводят в дозе 50 мг/кг.

В некоторых вариантах реализации конъюгат антисмыслового олигомера формулы (III) вводят в дозах, составляющих, как правило, от примерно 10-160 мг/кг или 20-160 мг/кг. В некоторых вариантах реализации дозы конъюгата антисмыслового олигомера формулы (III) для в/в введения составляют от примерно 0,5 мг до 160 мг/кг. В некоторых вариантах реализации конъюгат антисмыслового олигомера формулы (III) вводят в дозах, составляющих примерно 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг или 10 мг/кг. В некоторых вариантах реализации конъюгат антисмыслового олигомера формулы (III) вводят в дозах, составляющих примерно 10 мг/кг, 11 мг/кг, 12 мг/кг, 15 мг/кг, 18 мг/кг, 20 мг/кг, 21 мг/кг, 25 мг/кг, 26 мг/кг, 27 мг/кг, 28 мг/кг, 29 мг/кг, 30 мг/кг, 31 мг/кг, 32 мг/кг, 33 мг/кг, 34 мг/кг, 35 мг/кг, 36 мг/кг, 37 мг/кг, 38 мг/кг, 39 мг/кг, 40 мг/кг, 41 мг/кг, 42 мг/кг, 43 мг/кг, 44 мг/кг, 45 мг/кг, 46 мг/кг, 47 мг/кг, 48 мг/кг, 49 мг/кг, 50 мг/кг, 51 мг/кг, 52 мг/кг, 53 мг/кг, 54 мг/кг, 55 мг/кг, 56 мг/кг, 57 мг/кг, 58 мг/кг, 59 мг/кг, 60 мг/кг, 65 мг/кг, 70 мг/кг, 75 мг/кг, 80 мг/кг, 85 мг/кг, 90 мг/кг, 95 мг/кг, 100 мг/кг, 105 мг/кг, 110 мг/кг, 115 мг/кг, 120 мг/кг, 125 мг/кг, 130 мг/кг, 135 мг/кг, 140 мг/кг, 145 мг/кг, 150 мг/кг, 155 мг/кг, 160 мг/кг, включая все целочисленные значения между указанными значениями. В некоторых вариантах реализации конъюгат антисмыслового олигомера формулы (III) вводят в дозе 10 мг/кг. В некоторых вариантах реализации конъюгат антисмыслового олигомера формулы (III) вводят в дозе 20 мг/кг. В некоторых вариантах реализации конъюгат антисмыслового олигомера формулы (III) вводят в дозе 30 мг/кг. В некоторых вариантах реализации конъюгат антисмыслового олигомера формулы (III) вводят в дозе 40 мг/кг. В некоторых вариантах реализации конъюгат антисмыслового олигомера формулы (III) вводят в дозе 60 мг/кг. В некоторых вариантах реализации конъюгат антисмыслового олигомера формулы (III) вводят в дозе 80 мг/кг. В некоторых вариантах реализации конъюгат антисмыслового олигомера формулы (III) вводят в дозе 160 мг/кг. В некоторых вариантах реализации конъюгат антисмыслового олигомера формулы (III) вводят в дозе 50 мг/кг.

При необходимости эффективную суточную дозу активного соединения можно вводить в виде двух, трех, четырех, пяти, шести или более субдоз, вводимых отдельно с подходящими интервалами в течение суток, необязательно, в единичных лекарственных формах. В некоторых ситуациях введение дозы представляет собой одно введение в сутки. В некоторых вариантах реализации введение дозы представляет собой одно или более 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, по мере необходимости, для поддержания желаемого уровня экспрессии функционального белка дистрофина. В некоторых вариантах реализации введение представляет собой одно или более введений один раз в две недели. В некоторых вариантах реализации введение представляет собой одно введение один раз в две недели. В различных вариантах реализации введение представляет собой одно или более введений ежемесячно. В некоторых вариантах реализации введение представляет собой одно введение ежемесячно.



«один раз в три недели» имеет принятое в данной области техники значение «один раз в каждые три недели».

В различных вариантах реализации конъюгаты антисмысловых олигомеров вводят ежемесячно в дозе 10 мг/кг. В различных вариантах реализации конъюгаты антисмысловых олигомеров вводят ежемесячно в дозе 20 мг/кг. В различных вариантах реализации конъюгаты антисмысловых олигомеров вводят ежемесячно в дозе 30 мг/кг. В различных вариантах реализации конъюгаты антисмысловых олигомеров вводят ежемесячно в дозе 40 мг/кг. В некоторых вариантах реализации конъюгаты антисмысловых олигомеров вводят ежемесячно в дозе 60 мг/кг. В некоторых вариантах реализации конъюгаты антисмысловых олигомеров вводят ежемесячно в дозе 80 мг/кг. В некоторых вариантах реализации конъюгаты антисмысловых олигомеров вводят ежемесячно в дозе 100 мг/кг. В некоторых вариантах реализации конъюгаты антисмысловых олигомеров вводят ежемесячно в дозе 160 мг/кг. В контексте настоящего раскрытия подразумевается, что термин «ежемесячно» имеет принятое в данной области техники значение «каждый месяц».

В данной области техники очевидно, что введения еженедельно, один раз в две недели, один раз в три недели или ежемесячно могут осуществляться в виде одного или более введений или частей доз согласно настоящему раскрытию.

Молекулы нуклеиновых кислот и конъюгаты антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию можно вводить в клетки с помощью различных способов, известных специалистам в данной области техники, включающих, но не ограничивающихся перечисленными, инкапсулирование в липосомы, ионофорез или включение в другие переносящие среды, такие как гидрогели, циклодекстрины, биоразлагаемые нанокапсулы и биоадгезивные микросферы, описанные в настоящей заявке и известные в данной области техники. В некоторых вариантах реализации для улучшения биодоступности липофильных (нерастворимых в воде) фармацевтических агентов может применяться технология получения микроэмульсий. Примеры включают Триамтерен (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). Помимо других преимуществ, получение микроэмульсии обеспечивает повышенную биодоступность за счет направления процесса всасывания преимущественно в лимфатическую систему, а не в кровеносную систему, что таким образом позволяет миновать печень и предотвращает разрушение соединений в гепатобилиарной системе.

В одном аспекте настоящего раскрытия составы содержат мицеллы, полученные из олигомера согласно настоящему описанию, и по меньшей мере один амфифильный носитель, в котором указанные мицеллы имеют средний диаметр менее чем примерно 100 нм. В более предпочтительных вариантах реализации предложены мицеллы, имеющие средний диаметр менее чем примерно 50 нм, и в еще более предпочтительных вариантах реализации предложены мицеллы, имеющие средний диаметр менее чем примерно 30 нм или даже менее чем примерно 20 нм.

Несмотря на то, что настоящее изобретение предусматривает все подходящие амфифильные носители, в настоящее время предпочтительными носителями обычно являются те, которые имеют статус «общепризнанный безопасным» (Generally-Recognized-as-Safe, GRAS) и которые могут как солюбилизировать конъюгат антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию, так и микроэмульгировать его на более поздней стадии, когда раствор вступает в контакт со сложной водной фазой (такой как обнаруженная в желудочно-кишечном тракте человека). Обычно амфифильные ингредиенты, которые удовлетворяют этим требованиям, имеют значения ГЛБ (гидрофильно-липофильного баланса) 2-20, и их структуры содержат алифатические радикалы с неразветвленной цепью в диапазоне от C-6 до C-20. Примерами являются полиэтиленгликолизированные глицериды жирных кислот и полиэтиленгликоли.

Примеры амфифильных носителей включают насыщенные и мононенасыщенные полиэтиленгликолизированные глицериды жирных кислот, такие как полученные из различных полностью или частично гидрогенизированных растительных масел. Такие масла могут преимущественно состоять из три-, ди- и моноглицеридов жирных кислот и сложных ди- и моноэфиров полиэтиленгликоля и соответствующих жирных кислот, в частности, предпочтительный состав 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 подходящий класс амфифильных носителей включает частично этерифицированный сорбитан и/или сорбит с насыщенными или мононенасыщенными жирными кислотами (серия SPAN) или соответствующие этоксилированные аналоги (серия TWEEN).

В частности, подходящими могут являться коммерчески доступные амфифильные носители, включая серии Гелуцир, Лабрафил, Лабразол или Лаурогликоль (все производятся и распространяются компанией Gattefosse Corporation, Saint Priest, Франция), ПЭГ-моноолеат, ПЭГ-диолеат, ПЭГ-монолаурат и дилаурат, лецитин, полисорбат 80 и так далее (производятся и распространяются рядом компаний в США и по всему миру).

В некоторых вариантах реализации доставка может осуществляться с применением липосом, нанокапсул, микрочастиц, микросфер, липидных частиц, везикул и тому подобного для введения фармацевтических композиций согласно настоящему раскрытию в подходящие клетки-хозяева. В частности, фармацевтические композиции согласно настоящему раскрытию могут быть приготовлены для доставки либо инкапсулированы в липидную частицу, липосому, везикулу, наносферу, наночастицу или тому подобное. Приготовление и применение таких переносящих сред для доставки может быть выполнено с применением известных и традиционных методик.

Гидрофильные полимеры, подходящие для применения согласно настоящему раскрытию, представляют собой полимеры, которые легко растворимы в воде, могут быть ковалентно присоединены к липиду, образующему везикулу, и которые характеризуются переносимостью *in vivo* без токсических эффектов (то есть являются биосовместимыми).

Подходящие полимеры включают полиэтиленгликоль (ПЭГ), полимолочную кислоту (также называемую полилактидом), полигликолевую кислоту (также называемую полигликолидом), сополимер полимолочной и полигликолевой кислот и поливиниловый спирт. В некоторых вариантах реализации полимеры имеют усредненную молекулярную массу от примерно 100 или 120 дальтон до примерно 5000 или 10000 дальтон, или от примерно 300 дальтон до примерно 5000 дальтон. В других вариантах реализации полимер представляет собой полиэтиленгликоль, имеющий усредненную молекулярную массу от примерно 100 до примерно 5000 дальтон, или имеющий усредненную молекулярную массу от примерно 300 до примерно 5000 дальтон. В некоторых вариантах реализации полимер представляет собой полиэтиленгликоль, имеющий усредненную молекулярную массу примерно 750 дальтон, например, ПЭГ(750). Полимеры также могут быть определены количеством содержащихся в них мономеров; в предпочтительном варианте реализации настоящего раскрытия применяются полимеры, состоящие из по меньшей мере примерно трех мономеров, такие как полимеры ПЭГ, состоящие из трех мономеров, с молекулярной массой примерно 132 дальтон.

Другие гидрофильные полимеры, которые могут являться подходящими для применения согласно настоящему раскрытию, включают поливинилпирролидон, полиметоксазолин, полиэтилоксазолин, полигидроксипропилметакриламид, полиметакриламид, полидиметилакриламид и дериватизированные целлюлозы, такие как гидроксиметилцеллюлоза или гидроксиэтилцеллюлоза.

В некоторых вариантах реализации состав согласно настоящему раскрытию 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, поли(орто)эфиров, поли(бутиловой кислоты), поли(валериановой кислоты), поли(лактид-ко-капролактона), полисахаридов, белков, полигиалуроновых кислот, полицианоакрилатов и их комбинаций, смесей или сополимеров.

Циклодекстрины представляют собой циклические олигосахариды, состоящие из 6, 7 или 8 звеньев глюкозы, обозначаемых греческими буквами  $\alpha$ ,  $\beta$  или  $\gamma$ , соответственно. Звенья глюкозы соединены  $\alpha$ -1,4-гликозидными связями. Вследствие того, что сахарные звенья имеют конформацию «кресло», все вторичные гидроксильные группы (при C-2, C-3) расположены с одной стороны кольца, тогда как все первичные гидроксильные группы при C-6 расположены с другой стороны. В результате внешние поверхности являются гидрофильными, что придает циклодекстринам растворимость в воде. Напротив, полости циклодекстринов являются гидрофобными, поскольку они выстланы атомами водорода при C-3 и C-5 и атомами кислорода, образующими эфироподобные связи. Эти матрицы обеспечивают получение комплексов с рядом относительно гидрофобных соединений, 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)). Комплексообразование происходит за счет ван дер Ваальсовых взаимодействий и образования водородных связей. Общий обзор по химии циклодекстринов см. в источнике Wenz, Agnew. *Chem. Int.Ed. Engl.*, 33:803-822 (1994).

Физико-химические свойства производных циклодекстрина сильно зависят от вида и степени замещения. Например, их растворимость в воде варьирует от нерастворимых (например, триацетил-бета-циклодекстрин) до растворимости, составляющей 147% (масс./об.)(G-2-бета-циклодекстрин). Кроме того, они растворимы во многих органических растворителях. Свойства циклодекстринов позволяют регулировать растворимость различных компонентов состава путем увеличения или уменьшения их растворимости.

Были описаны многочисленные циклодекстрины и способы их получения. Например, в источниках Parmeter (I), et al. (патент США № 3453259) и Gramera, et al. (патент США № 3459731) описаны электронейтральные 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 были присоединены карбоновые кислоты, фосфористые кислоты, фосфиновые кислоты, фосфоновые кислоты, фосфорные кислоты, тиофосфоновые кислоты, тиосульфоновые кислоты и сульфоновые кислоты [см. Parmeter (III), выше]. Кроме того, производные сульфоалкилового эфира циклодекстрина были описаны в источнике Stella, et al. (патент США № 5134127).

Липосомы состоят из по меньшей мере одной бислойной липидной мембраны, заключающей водную внутреннюю полость. Липосомы могут характеризоваться типом и размером мембраны. Малые моноламеллярные везикулы (ММВ) содержат одну мембрану и обычно имеют диаметр от 0,02 до 0,05 мкм; большие моноламеллярные везикулы (БМВ) обычно имеют размер более 0,05 мкм. Большие олиголамеллярные везикулы и мультиламеллярные везикулы содержат несколько, обычно концентрических, мембранных слоев и, как правило, имеют размер более 0,1 мкм. Липосомы с несколькими неконцентрическими мембранами, то есть несколько меньших везикул, содержащихся внутри большой везикулы, называют мультивезикулярными везикулами.

Один аспект настоящего описания относится к составам, содержащим липосомы, содержащие конъюгат антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию, где липосомальная мембрана получена для обеспечения липосомы с повышенной переносимостью. В качестве альтернативы или в дополнение, конъюгат антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию может содержаться внутри или быть адсорбированным на липосомальном бислое липосомы. Конъюгат антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию может агрегировать с липидным поверхностно-активным веществом и переноситься во внутреннее

пространство липосомы; в этих случаях липосомальная мембрана получена таким образом, чтобы быть устойчивой к разрушающему действию агрегата активный агент - поверхностно-активное вещество.

В соответствии с одним из вариантов реализации настоящего раскрытия, липидный бислой липосомы содержит липиды, дериватизированные полиэтиленгликолем (ПЭГ) таким образом, что цепи ПЭГ простираются от внутренней поверхности липидного бислоя во внутреннее пространство, заключенное в липосоме, и простираются от внешней стороны липидного бислоя в окружающую среду.

Активные агенты, содержащиеся внутри липосом согласно настоящему описанию, находятся в солюбилизированной форме. Агрегаты поверхностно-активного вещества и активного агента (такие как эмульсии или мицеллы, содержащие целевой активный агент) могут быть заключены во внутреннем пространстве липосом согласно настоящему описанию. Поверхностно-активное вещество действует с обеспечением диспергирования и солюбилизации активного агента и может быть выбрано из любого подходящего алифатического, циклоалифатического или ароматического поверхностно-активного вещества, включая, но не ограничиваясь перечисленными, биосовместимые лизофосфатидилхолины (ЛФХ) с различной длиной цепи (например, от примерно C14 до примерно C20). Липиды, дериватизированные полимерами, такие как ПЭГ-липиды, также могут применяться для образования мицелл, так как они будут подавлять слияние мицелла/мембрана и так как добавление полимера к молекулам поверхностно-активного вещества уменьшает критическую концентрацию мицеллообразования (ККМ) поверхностно-активного вещества и способствует образованию мицелл. Предпочтительными являются поверхностно-активные вещества с ККМ в микромолярном диапазоне; поверхностно-активные вещества с большими ККМ могут применяться для получения мицелл, заключенных внутри липосом согласно настоящему раскрытию.

Липосомы согласно настоящему раскрытию могут быть получены посредством любого из множества способов, известных в данной области техники. См., например, патент США № 4235871; опубликованную PCT-заявку WO 96/14057; New RRC, *Liposomes: A practical approach*, IRL Press, Oxford (1990), p.33-104; и Lasic DD, *Liposomes from physics to applications*, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1993. Например, липосомы согласно настоящему раскрытию могут быть получены путем диффузии липида, дериватизированного с помощью гидрофильного полимера, в предварительно сформированные липосомы, например, путем подвергания предварительно сформированных липосом воздействию мицелл, состоящих из привитых липидом полимеров, при концентрациях липидов, соответствующих конечному молярному проценту дериватизированного липида, который требуется в липосоме. Липосомы, содержащие гидрофильный полимер, также могут быть получены методами гомогенизации, гидратации липидного поля или экструзии, как известно в данной области техники.

В другом типичном способе получения состава активный агент сначала диспергируют с помощью ультразвука в лизофосфатидилхолине или другом поверхностно-активном веществе с низкой ККМ (включая привитые полимером липиды), которое легко солубилизует гидрофобные молекулы. Полученную мицеллярную суспензию активного агента затем применяют для регидратации высушенного образца липида, который содержит подходящий молярный процент привитого полимером липида или холестерина. Суспензию липида и активного агента затем преобразуют в липосомы с применением методов экструзии, известных в данной области техники, и полученные липосомы отделяют от неинкапсулированного раствора посредством стандартного разделения на колонке.

В одном аспекте настоящего описания полученные липосомы имеют по существу однородные размеры в выбранном диапазоне размеров. Один эффективный способ определения размера включает экструдирование водной суспензии липосом через ряд поликарбонатных мембран, имеющих выбранный однородный размер пор; размер пор мембраны будет примерно соответствовать наибольшим размерам липосом, полученных путем экструзии через эту мембрану. См., например, патент США № 4737323 (12 апреля 1988 г.). В некоторых вариантах реализации такие реагенты как DharmaFECT® и липофектамин (Lipofectamine®) могут применяться для введения полинуклеотидов или белков в клетки.

Характеристики высвобождения состава согласно настоящему раскрытию зависят от инкапсулирующего материала, концентрации инкапсулированного лекарственного средства и присутствия модификаторов высвобождения. Например, высвобождением можно управлять таким образом, чтобы оно зависело от pH, например, путем использования чувствительного к pH покрытия, которое обеспечивает высвобождение только при низком pH, как в желудке, или более высоком pH, как в кишечнике. Энтеросолюбильное покрытие может применяться для предотвращения высвобождения до тех пор, пока состав не пройдет через желудок. Множественные покрытия или смеси цианамиды, инкапсулированные в различных материалах, могут применяться для обеспечения первоначального высвобождения в желудке с последующим более поздним высвобождением в кишечнике. Высвобождением также можно управлять путем включения солей или порообразующих агентов, которые могут увеличить поглощение воды или высвобождение лекарственного средства посредством диффузии из капсулы. Вспомогательные вещества, изменяющие растворимость лекарственного средства, также могут применяться для контроля скорости высвобождения. Также могут быть включены агенты, усиливающие деградацию матрицы или высвобождение из матрицы. Они могут быть добавлены к лекарственному средству, добавлены в виде отдельной фазы (то есть в виде частиц) или могут быть совместно растворены в полимерной фазе в зависимости от соединения. В большинстве случаев количество должно составлять от 0,1 до 30 процентов (масса агента/масса 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 протамина сульфат, спермин, холин, этаноламин, диэтанолламин и триэтанолламин, и поверхностно-активные вещества, такие как твин (Tween®) и плуроник (Pluronic®). Порообразующие агенты, которые придают матрицам микроструктуру (то есть водорастворимые соединения, такие как неорганические соли и сахара), добавляют в виде частиц. Диапазон обычно составляет от одного до тридцати процентов (масса агента/масса полимера).

Поглощением также можно управлять путем изменения времени удерживания частиц в кишечнике. Это может быть достигнуто, например, путем покрытия частицы адгезивным для слизистой оболочки полимером или его выбора в качестве инкапсулирующего материала. Примеры включают большинство полимеров со свободными карбоксильными группами, таких как хитозан, целлюлозы и особенно полиакрилаты (в контексте настоящего описания термин «полиакрилаты» относится к полимерам, содержащим акрилатные группы и модифицированные акрилатные группы, таким как цианоакрилаты и метакрилаты).

Конъюгат антисмыслового олигомера может быть приготовлен таким образом, что он содержится внутри или адаптирован для высвобождения с помощью хирургического или медицинского устройства или имплантата. В некоторых аспектах имплантат может быть покрыт или иным образом обработан конъюгатом антисмыслового олигомера. Например, гидрогели или другие полимеры, такие как биосовместимые и/или биоразлагаемые полимеры, могут применяться для покрытия имплантата фармацевтическими композициями согласно настоящему раскрытию (то есть композиция может быть адаптирована для применения с медицинским устройством с помощью гидрогеля или другого полимера). Полимеры и сополимеры для покрытия медицинских устройств агентом хорошо известны в данной области техники. Примеры имплантатов включают, но не ограничиваются перечисленными, стенты, стенты с лекарственным покрытием, шовные материалы, протезы, сосудистые катетеры, диализные катетеры, сосудистые трансплантаты, протезы сердечных клапанов, кардиостимуляторы, имплантируемые кардиовертеры-дефибрилляторы, иглы для внутривенного введения, устройства для вправления и формирования костей, такие как штифты, винты, пластины и другие устройства, а также матрицы из искусственных тканей для заживления ран.

В дополнение к способам, предложенным в настоящем раскрытии, конъюгаты антисмысловых олигомеров для применения в соответствии с настоящим раскрытием могут быть приготовлены для введения любым удобным способом для применения в медицине или ветеринарии аналогично другим фармацевтическим препаратам. Конъюгаты антисмысловых олигомеров и их соответствующие составы можно вводить отдельно или в сочетании с другими терапевтическими стратегиями, используемыми при лечении мышечной дистрофии, такими как трансплантация миоцитов, терапия стволовыми клетками, введение аминогликозидных антибиотиков, ингибиторов

протеасом и терапия с положительной регуляцией (например, положительная регуляция утروفина, аутосомного паралога дистрофина).

В некоторых вариантах реализации дополнительное терапевтическое средство можно вводить до, одновременно или после введения конъюгата антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию. Например, конъюгаты антисмысловых олигомеров можно вводить в комбинации со стероидом и/или антибиотиком. В некоторых вариантах реализации конъюгаты антисмысловых олигомеров вводят пациенту, который получает фоновую стероидную терапию (например, прерывистую или продолжительную/непрерывную фоновую стероидную терапию). Например, в некоторых вариантах реализации пациент подвергался лечению кортикостероидом до введения антисмыслового олигомера и продолжает получать стероидную терапию. В некоторых вариантах реализации стероид представляет собой глюкокортикоид или преднизон.

Описанные пути введения предназначены только в качестве руководства, поскольку квалифицированный специалист сможет легко определить оптимальный путь введения и любую дозу для любого конкретного животного и состояния. Были предприняты многочисленные подходы для введения функционально нового генетического материала в клетки, как *in vitro*, так и *in vivo* (Friedmann (1989) *Science*, 244:1275-1280). Эти подходы включают интеграцию гена, который необходимо экспрессировать, в модифицированные ретровирусы (Friedmann (1989), выше; Rosenberg (1991) *Cancer Research* 51(18), suppl.: 5074S-5079S); интеграцию 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 промотором-энхансерным элементом, посредством липосом (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) в сочетании с лиганд-специфическими транспортными системами на основе катионов (Wu and Wu (1988) *J.Biol. Chem.*, 263:14621-14624) или применение депротенизированной ДНК, экспрессионных векторов (Nabel et al. (1990), выше, Wolff et al. (1990) *Science*, 247:1465-1468). Прямая инъекция трансгенов в ткань обеспечивает лишь локальную 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)) сообщила о трансфекции *in vivo* исключительно тканей легких мышей после либо внутривенного, либо интратрахеального введения комплекса ДНК-липосома. Примером обзорной статьи по методам генной терапии человека является: Anderson, *Science* (1992) 256:808-813.

В другом варианте реализации фармацевтические композиции согласно настоящему раскрытию могут дополнительно содержать углевод, как предложено в источнике Nan et al., *Nat.Comms.* 7, 10981 (2016), содержание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации

фармацевтические композиции согласно настоящему раскрытию могут содержать 5% углевода-гексозы. Например, фармацевтическая композиция согласно настоящему раскрытию может содержать 5% глюкозы, 5% фруктозы или 5% маннозы. В некоторых вариантах реализации фармацевтические композиции согласно настоящему раскрытию могут содержать 2,5% глюкозы и 2,5% фруктозы. В некоторых вариантах реализации фармацевтические композиции согласно настоящему раскрытию могут содержать углевод, выбранный из: арабинозы, присутствующей в количестве 5% по объему, глюкозы, присутствующей в количестве 5% по объему, сорбитола, присутствующего в количестве 5% по объему, галактозы, присутствующей в количестве 5% по объему, фруктозы, присутствующей в количестве 5% по объему, ксилитола, присутствующего в количестве 5% по объему, маннозы, присутствующей в количестве 5% по объему, комбинации глюкозы и фруктозы, каждая из которых присутствует в количестве 2,5% по объему, и комбинации глюкозы, присутствующей в количестве 5,7% по объему, фруктозы, присутствующей в количестве 2,86% по объему, и ксилитола, присутствующего в количестве 1,4% по объему.

#### **IV. Способы применения**

##### *Восстановление рамки считывания дистрофина посредством пропуска экзона*

Потенциальный терапевтический подход к лечению МДЦ, вызванной мутациями в гене дистрофина, лежащими вне рамки считывания, обусловлен существованием более мягкой формы дистрофинопатии, известной как МДБ, которая вызвана мутациями внутри рамки считывания. Способность превращать мутацию, лежащую вне рамки считывания, в мутацию внутри рамки считывания гипотетически обеспечит сохранение рамки считывания мРНК и продуцирование внутренне укороченного, однако функционального белка дистрофина. Конъюгаты антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию были выполнены с возможностью обеспечения достижения этой цели.

Гибридизация РМО с целевой последовательностью пре-мРНК препятствует образованию комплекса сплайсинга пре-мРНК и удаляет экзон 53 из зрелой мРНК. Структура и конформация конъюгатов антисмысловых олигомеров согласно настоящему раскрытию обеспечивают специфичное для последовательности спаривание оснований с комплементарной последовательностью. По аналогичному механизму, например, этеплирсен, который представляет собой РМО, созданный с возможностью обеспечения пропуска экзона 51 пре-мРНК дистрофина, обеспечивает специфичное для последовательности спаривание оснований с комплементарной последовательностью, содержащейся в экзоне 51 пре-мРНК дистрофина.

Нормальная мРНК дистрофина, содержащая все 79 экзонов, обеспечивает продуцирование нормального белка дистрофина. На графике на фиг. 1 изображен небольшой участок пре-мРНК дистрофина и зрелой мРНК от экзона 47 до экзона 53. Форма каждого экзона отображает распределение кодонов между экзонами; следует отметить, что один кодон состоит из трех нуклеотидов. Экзоны прямоугольной формы начинаются и заканчиваются полными кодонами. Экзоны в форме стрелок начинаются с

полного кодона, но заканчиваются расщепленным кодоном, содержащим только нуклеотид № 1 кодона. Нуклеотиды № 2 и № 3 этого кодона содержатся в следующем экзоне, который начинается с формы шеврона.

мРНК дистрофина, лишенная целых экзонов гена дистрофина, обычно приводит к МДД. График на фиг. 2 иллюстрирует тип генетической мутации (делецию экзона 50), которая, как известно, приводит к МДД. Поскольку экзон 49 заканчивается полным кодоном, а экзон 51 начинается со второго нуклеотида кодона, рамка считывания после экзона 49 сдвигается, что приводит к рамке считывания мРНК вне рамки считывания и включению неправильных аминокислот в последовательность после мутации. Как результат, отсутствие функционального С-концевого домена, связывающего дистрогликан, приводит к продуцированию нестабильного белка дистрофина.

Этеплирсен обеспечивает пропуск экзона 51 с восстановлением рамки считывания мРНК. Поскольку экзон 49 заканчивается полным кодоном, а экзон 52 начинается с первого нуклеотида кодона, делеция экзона 51 восстанавливает рамку считывания, что приводит к образованию внутренне укороченного белка дистрофина с интактным участком связывания дистрогликана, аналогично мутации «внутри рамки считывания», связанной с МДБ (фиг. 3).

Возможность облегчения симптомов при фенотипе МДД с помощью пропуска экзонов для восстановления открытой рамки считывания мРНК дистрофина подтверждается неклиническими исследованиями. В многочисленных исследованиях с применением моделей МДД у животных с дистрофией было показано, что восстановление дистрофина путем пропуска экзонов приводит к достоверным улучшениям мышечной силы и функции (Sharp 2011; Yokota 2009; Wu 2008; Wu 2011; Barton-Davis 1999; Goyenvalle 2004; Gregorevic 2006; Yue 2006; Welch 2007; Kawano 2008; Reay 2008; van Putten 2012). Убедительным примером этого является исследование, в котором содержание дистрофина после терапии, направленной на пропуск экзонов (с использованием РМО), соотносили с мышечной функцией в той же самой ткани. У мышей mdx с дистрофией передние большеберцовые (ТА) мышцы, обработанные специфичным для мышей РМО, сохраняли ~ 75% их максимальной силовой способности после стресс-индуцированных сокращений, тогда как необработанные контралатеральные мышцы ТА сохраняли лишь ~ 25% их максимальной силовой способности ( $p < 0,05$ ) (Sharp 2011). В другом исследовании 3 собаки CXMD с дистрофией получали в возрасте 2-5 месяцев терапию, направленную на пропуск экзонов, с применением специфичного для их генетической мутации РМО один раз в неделю в течение 5-7 недель или каждую вторую неделю в течение 22 недель. После терапии, направленной на пропуск экзонов, у всех трех собак была обнаружена выраженная экспрессия дистрофина в скелетных мышцах всего организма, а также сохранялась или улучшалась способность к передвижению (беговой тест на 15 метров) относительно исходного уровня. Напротив, собаки CXMD соответствующего возраста, не получавшие лечение, демонстрировали заметное снижение способности к передвижению в течение исследования (Yokota 2009).

Было показано, что РМО обладают большей активностью пропуска экзонов в эквимольных концентрациях, чем фосфоротиоаты, как у мышей mdx, так и в модели МДД человека у мышцах (hDMD), в которой экспрессируется целый транскрипт, характерный для МДД человека (Heemskirk 2009). В экспериментах *in vitro* с применением полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и вестерн-блоттинга (WB) в нормальных клетках скелетных мышц человека или клетках мышц пациентов с МДД, содержащих различные мутации, при которых возможно применение пропуска экзона 51, было обнаружено, что этеплирсен (РМО) является мощным индуктором пропуска экзона 51. Индуцированный этеплирсеном пропуск экзона 51 был подтвержден *in vivo* в модели hDMD у мышей (Arechavala-Gomez 2007).

Клинические результаты анализа действия конъюгата антисмыслового олигомера, который комплементарен целевому участку экзона 53 пре-мРНК дистрофина человека и индуцирует пропуск экзона 53, включают определение процента дистрофин-положительных волокон (PDPF), тест шестиминутной ходьбы (6MWT), потерю способности к передвижению (LOA), оценку по шкале North Star Ambulatory Assessment (NSAA), исследование функции легких (PFT), способность подниматься (из положения лежа на спине) без внешней поддержки, продуцирование дистрофина *de novo* и другие функциональные пробы.

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия предложены способы продуцирования дистрофина у субъекта, имеющего мутацию гена дистрофина, которая может быть скорректирована при помощи пропуска экзона 53, включающие введение указанному субъекту конъюгата антисмыслового олигомера или его фармацевтически приемлемой соли согласно настоящему раскрытию. В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия предложены способы восстановления рамки считывания мРНК для индукции продуцирования белка дистрофина у субъекта с мышечной дистрофией Дюшенна (МДД), имеющего мутацию гена дистрофина, которая может быть скорректирована при помощи пропуска экзона 53. Продуцирование белка может быть определено с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), анализа методом вестерн-блоттинга или иммуногистохимии (ИГХ).

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия предложены способы лечения МДД у нуждающегося в этом субъекта, имеющего мутацию гена дистрофина, которая может быть скорректирована при помощи пропуска экзона 53, включающие введение указанному субъекту конъюгата антисмыслового олигомера или его фармацевтически приемлемой соли согласно настоящему раскрытию. В различных вариантах реализации эффективность лечения субъекта определяют по задержке прогрессирования заболевания. В некоторых вариантах реализации эффективность лечения субъекта определяют по сохранению способности к передвижению у субъекта или снижению потери способности к передвижению у субъекта. В некоторых вариантах реализации способность к передвижению определяют с применением теста 6-минутной

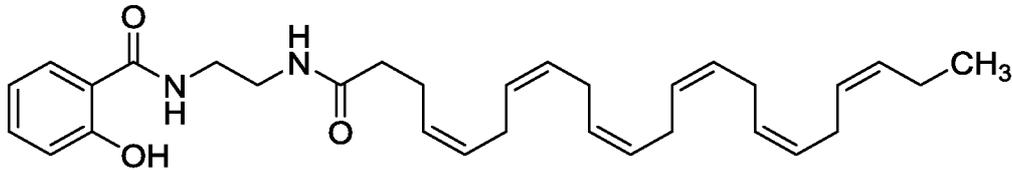
ходьбы (6MWT). В некоторых вариантах реализации способность к передвижению определяют с применением шкалы North Star Ambulatory Assessment (NSAA).

В различных вариантах реализации настоящего раскрытия предложены способы сохранения функции легких или снижения потери функции легких у субъекта с МДД, имеющего мутацию гена МДД, которая может быть скорректирована при помощи пропуска экзона 53, включающие введение указанному субъекту конъюгата антисмыслового олигомера или его фармацевтически приемлемой соли согласно настоящему раскрытию. В некоторых вариантах реализации функцию легких определяют как максимальное давление фазы выдоха (MEP). В некоторых вариантах реализации функцию легких определяют как максимальное давление фазы вдоха (MIP). В некоторых вариантах реализации функцию легких определяют как форсированную жизненную емкость легких (ФЖЕЛ).

В другом варианте реализации фармацевтические композиции согласно настоящему раскрытию могут быть введены совместно с углеводом в способах согласно настоящему раскрытию, либо в одном составе, либо в виде отдельного состава, как предложено в источнике Han et al., Nat. Comms. 7, 10981 (2016), содержание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации фармацевтические композиции согласно настоящему раскрытию могут быть введены совместно с 5% углевода-гексозы. Например, фармацевтические композиции согласно настоящему раскрытию могут быть введены совместно с 5% глюкозы, 5% фруктозы или 5% маннозы. В некоторых вариантах реализации фармацевтические композиции согласно настоящему раскрытию могут быть введены совместно с 2,5% глюкозы и 2,5% фруктозы. В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция согласно настоящему раскрытию может быть введена совместно с углеводом, выбранным из: арабинозы, присутствующей в количестве 5% по объему, глюкозы, присутствующей в количестве 5% по объему, сорбитола, присутствующего в количестве 5% по объему, галактозы, присутствующей в количестве 5% по объему, фруктозы, присутствующей в количестве 5% по объему, ксилитола, присутствующего в количестве 5% по объему, маннозы, присутствующей в количестве 5% по объему, комбинации глюкозы и фруктозы, каждая из которых присутствует в количестве 2,5% по объему, и комбинации глюкозы, присутствующей в количестве 5,7% по объему, фруктозы, присутствующей в количестве 2,86% по объему, и ксилитола, присутствующего в количестве 1,4% по объему.

В различных вариантах реализации конъюгат антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию вводят совместно с терапевтически эффективным количеством нестероидного противовоспалительного соединения. В некоторых вариантах реализации нестероидное противовоспалительное соединение представляет собой ингибитор NF-κB. Например, в некоторых вариантах реализации ингибитор NF-κB может представлять собой CAT-1004 или его фармацевтически приемлемую соль. В различных вариантах реализации ингибитор NF-κB может представлять собой конъюгат салицилата и ДНА. В

некоторых вариантах реализации ингибитор NF-kB представляет собой CAT-1041 или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах реализации ингибитор NF-kB представляет собой конъюгат салицилата и EPA. В различных вариантах реализации ингибитор NF-kB представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах реализации нестероидное противовоспалительное соединение представляет собой ингибитор TGF- $\beta$ . Например, в некоторых вариантах реализации ингибитор TGF- $\beta$  представляет собой HT-100.

В некоторых вариантах реализации описан конъюгат антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию для применения в терапии. В некоторых вариантах реализации описан конъюгат антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию для применения для лечения мышечной дистрофии Дюшенна. В некоторых вариантах реализации описан конъюгат антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию для применения для изготовления лекарственного средства для применения в терапии. В некоторых вариантах реализации описан конъюгат антисмыслового олигомера согласно настоящему раскрытию для применения для изготовления лекарственного средства для лечения мышечной дистрофии Дюшенна.

#### **V. Наборы**

В настоящем раскрытии также предложены наборы для лечения пациента с генетическим заболеванием, содержащие по меньшей мере антисмысловую молекулу (например, конъюгат антисмыслового олигомера, содержащий антисмысловый олигомер, представленный в SEQ ID NO: 1), упакованную в подходящую емкость, совместно с инструкциями по ее применению. Наборы также могут содержать вспомогательные реагенты, такие как буферы, стабилизаторы и так далее. Средним специалистам в данной области должно быть понятно, что применение указанного выше способа широко применимо для идентификации антисмысловых молекул, подходящих для применения при лечении многих других заболеваний. В одном из вариантов реализации набор содержит конъюгат антисмыслового олигомера в соответствии с формулой (III).

#### **Примеры**

Несмотря на то, что приведенное выше описание более подробно раскрыто с помощью чертежей и примеров в целях ясности понимания, среднему специалисту в данной области техники будет очевидно, с учетом идей, представленных в настоящем документе, что к нему могут быть применены некоторые изменения и модификации без отступления от сущности или объема прилагаемой формулы изобретения. Следующие примеры приведены только в качестве иллюстрации, а не для ограничения. Специалисты в данной области техники легко обнаружат ряд не критичных параметров, которые могут

быть изменены или модифицированы с получением по существу аналогичных результатов.

### **Материалы и методы**

#### *Условия обработки клеток и культур тканей*

Для определения пропуска экзонов использовали дифференцированные миоциты человека (ZenBio, Inc.). В частности, миобласты (ZenBio, Inc., SKB-F) выращивали до достижения конfluence 80-90% при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в среде для выращивания (SKB-M; ZenBio, Inc.). Дифференцировку инициировали путем замены среды для выращивания средой для дифференцировки (SKM-D; ZenBio, Inc.). Для анализа пропуска экзона 53  $1 \times 10^4$  дифференцированных клеток высевали в 24-луночный планшет и добавляли в каждую лунку 1 мл среды для дифференцировки (SKM-D; ZenBio, Inc.), содержащей различные концентрации РМО или РРМО, и инкубировали в течение 96 часов.

#### *Анализ методом вестерн-блоттинга*

Для анализа методом вестерн-блоттинга ткань гомогенизировали с применением буфера для гомогенизации (4% ДСН, 4 М мочевины, 125 мМ Трис-НСl (рН 6,8)) в отношении 9-18×20-мкМ срезов ткани при диаметре примерно 5 мм в 133 мкл буфера. Соответствующий лизат собирали и подвергали количественному определению белка с применением набора RC DC Protein Assay Kit согласно инструкциям производителя (BioRad, номер по кат. 500-0122). Образцы экстракта ткани разбавляли 1:10 с использованием буфера для гомогенизации для обеспечения попадания в диапазон стандартной кривой БСА. Образцы получали таким образом, чтобы в 35 мкл образца содержалось необходимое количество белка, с применением при этом 25 мкл белкового лизата, 7 мкл буфера для образцов NuPAGE LDS (Life Technologies, номер по кат. NP0008, Карлсбад, Калифорния, США) и 3 мкл восстановителя NuPAGE (10x) (Life Technologies, номер по кат. NP0004). После нагревания образцов белка в течение 5 минут при 95°C образцы центрифугировали и надосадочную жидкость загружали в 10 лунок из 1 мм 3-8% полиакриламидного трис-ацетатного мини-геля NuPAGE Novex (Life Technologies, номер по кат. EA0375) при максимальной загрузке 50 мкг общего белка на дорожку. Электрофорез в геле проводили при 150 В при комнатной температуре до выхода фронта красителя из геля. Полученные в результате гели с белком переносили на PVDF-мембраны (Life Technologies, номер по кат. LC2007) в течение 75 минут при комнатной температуре при 30 вольт с применением буфера для переноса NuPAGE (Life Technologies NP006-1), 10% метанола и 0,1% антиоксиданта NuPAGE (Life Technologies NP0005).

После переноса белка PVDF-мембраны погружали в ТТБС-буфер (1X TBS (Amresco, номер по кат. J640-4L), 0,1% (об./об.) Tween-20). Мембраны переносили в блокирующий буфер (5% (вес./об.) обезжиренное сухое молоко (Lab Scientific, номер по кат. M0841) в ТТБС) и вымачивали в течение ночи при 4°C при осторожном качании. После блокирования мембраны инкубировали либо в течение 60 минут при комнатной температуре в DYS1 (Leica, номер по кат. NCL-DYS1), разбавленной в соотношении 1:20 с применением блокирующего буфера, либо в течение 20 минут при комнатной

температуре в антителе к  $\alpha$ -актину (Leica, номер по кат. NA931V), разбавленном в соотношении 1:100000 с применением блокирующего буфера, с последующими шестью промывками (с помощью TTBS, по пять минут каждая). Антитело к IgG мыши, конъюгированное с пероксидазой хрена (GE Healthcare, номер по кат. NA931V), разбавляли в соотношении 1:40000 с применением блокирующего буфера и добавляли к мембранам на 45 минут (DYS1) или 15 минут ( $\alpha$ -актин), после чего опять следовали шесть промывок. С применением набора для обнаружения посредством вестерн-блоттинга ECL Prime (GE Healthcare, номер по кат. RPN2232) гель переводили на пленку и проявляли соответственно. Проявленные пленки сканировали и анализировали с использованием программного обеспечения ImageQuant TL Plus (версия 8.1) и проводили линейный регрессионный анализ с использованием программного обеспечения Graphpad.

Каждый гель для вестерн-блоттинга включает стандартную кривую дистрофина из 4-5 точек, полученную с применением общего белка, выделенного из нормальной ткани (четырёхглавой мышцы, диафрагмы или сердца мыши), разбавленного до, например, 64%, 16%, 4%, 1% и 0,25% (см., например, фигуры 5A и 5B) и введенного в экстракт МДД-ткани (например, четырёхглавой мышцы, диафрагмы или сердца мыши mdx или четырёхглавой мышцы, диафрагмы или гладкой мышцы (GI) NHP). Образцы для стандартной кривой обрабатывали, как описано выше. Содержание белка дистрофина в процентах от содержания дистрофина дикого типа (%WT) определяли путем сравнения интенсивностей полос дистрофина со стандартной кривой геля.

#### *Анализ методом ОТ-ПЦР*

Для анализа методом ОТ-ПЦР РНК выделяли из клеток с использованием набора Illustra GE spin kit в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию и чистоту РНК определяли с использованием NanoDrop. Пропуск экзона 53 определяли методом ОТ-ПЦР с прямым праймером, который связывается с границей экзонов 51/52 и экзоном 54, SEQ ID NO: 5 (5'-CATCAAGCAGAAGGCAACAA-3'), и обратным праймером, который связывается с границей экзонов 51/52 и экзоном 54, SEQ ID NO: 6 (5'-GAAGTTTCAGGGCCAAGTCA-3'). Пропуск экзона 53 приводил к получению ампликона длиной 201 п.н., а отсутствие пропуска экзона 53 приводило к получению ампликона длиной 413 п.н.

Пропуск экзона 23 мыши определяли методом ОТ-ПЦР с прямым праймером SEQ ID NO: 7 (5'-CACATCTTTGATGGTGTGAGG-3') и обратным праймером SEQ ID NO: 8 (5'-CAACTTCAGCCATCCATTTCTG-3').

После того, как РНК подвергали ОТ-ПЦР, образцы анализировали с использованием прибора Caliper, в котором используется капиллярный гель-электрофорез. Процент пропуска экзонов рассчитывали с помощью следующего уравнения: (площадь под кривой для полос с пропуском)/(сумма площадей под кривой для полос с пропуском и без пропуска) $\times$ 100.

#### *Иммуногистохимия: окрашивание дистрофина*

Замороженные срезы ткани четырехглавой мышцы мыши толщиной 10 микрон использовали для обнаружения дистрофина с помощью первичного антитела против дистрофина (разведение 1:250, кролик, Abscam, номер по кат. ab15277) в 10% козьей сыворотке+1% БСА в ФСБ и вторичного антитела козы против иммуноглобулинов кролика (разведение 1:1000) Alexa-Fluoro 488 в 10% козьей сыворотке+1% БСА.

*Получение морфолиновых субъединиц*

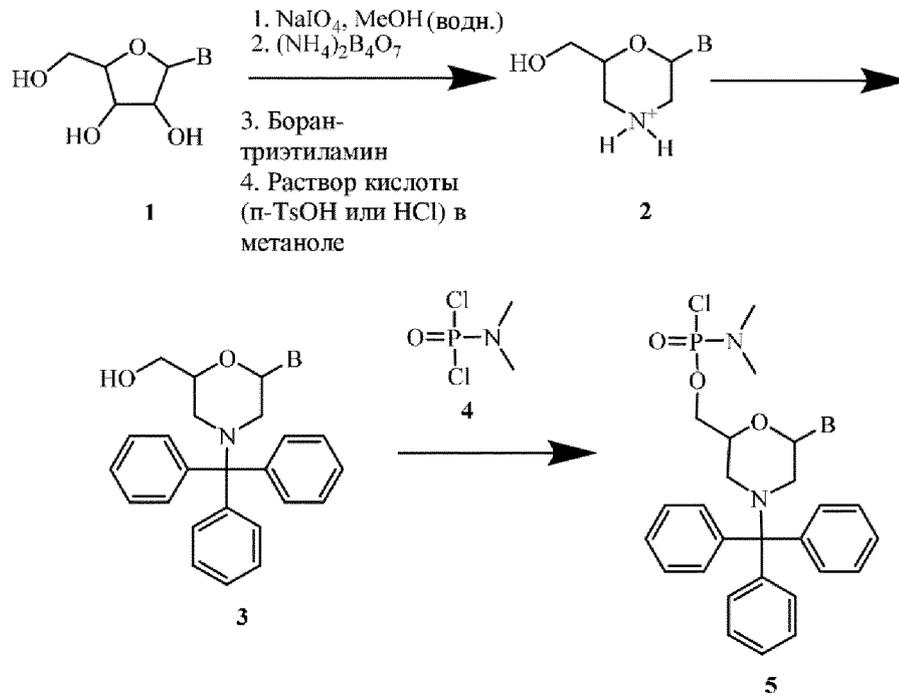


Схема 1. Общий путь синтеза субъединиц РМО

В соответствии со схемой 1, где В представляет собой спаривающийся фрагмент основания, морфолиновые субъединицы могут быть получены из соответствующего рибонуклеозида (1), как показано. Морфолиновая субъединица (2) может быть необязательно защищена путем взаимодействия с подходящим предшественником защитной группы, например, тритилхлоридом. Защитную группу 3' обычно удаляют во время твердофазного синтеза олигомера, как более подробно описано ниже. Спаривающийся фрагмент основания может быть подходящим образом защищен для твердофазного синтеза олигомеров. Подходящие защитные группы включают бензоил для аденина и цитозина, фенилацетил для гуанина и пивалоилоксиметил для гипоксантина (I). Пивалоилоксиметильная группа может быть введена в положение N1 гипоксантинового гетероциклического основания. Хотя можно использовать незащищенную гипоксантиновую субъединицу, выходы в реакциях активации намного выше, когда основание защищено. Другие подходящие защитные группы включают группы, раскрытые в патенте США № 8076476, содержание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

Реакция соединения **3** с активированным соединением фосфора **4** приводит к получению морфолиновой субъединицы, содержащей желаемый связывающий фрагмент **5**.

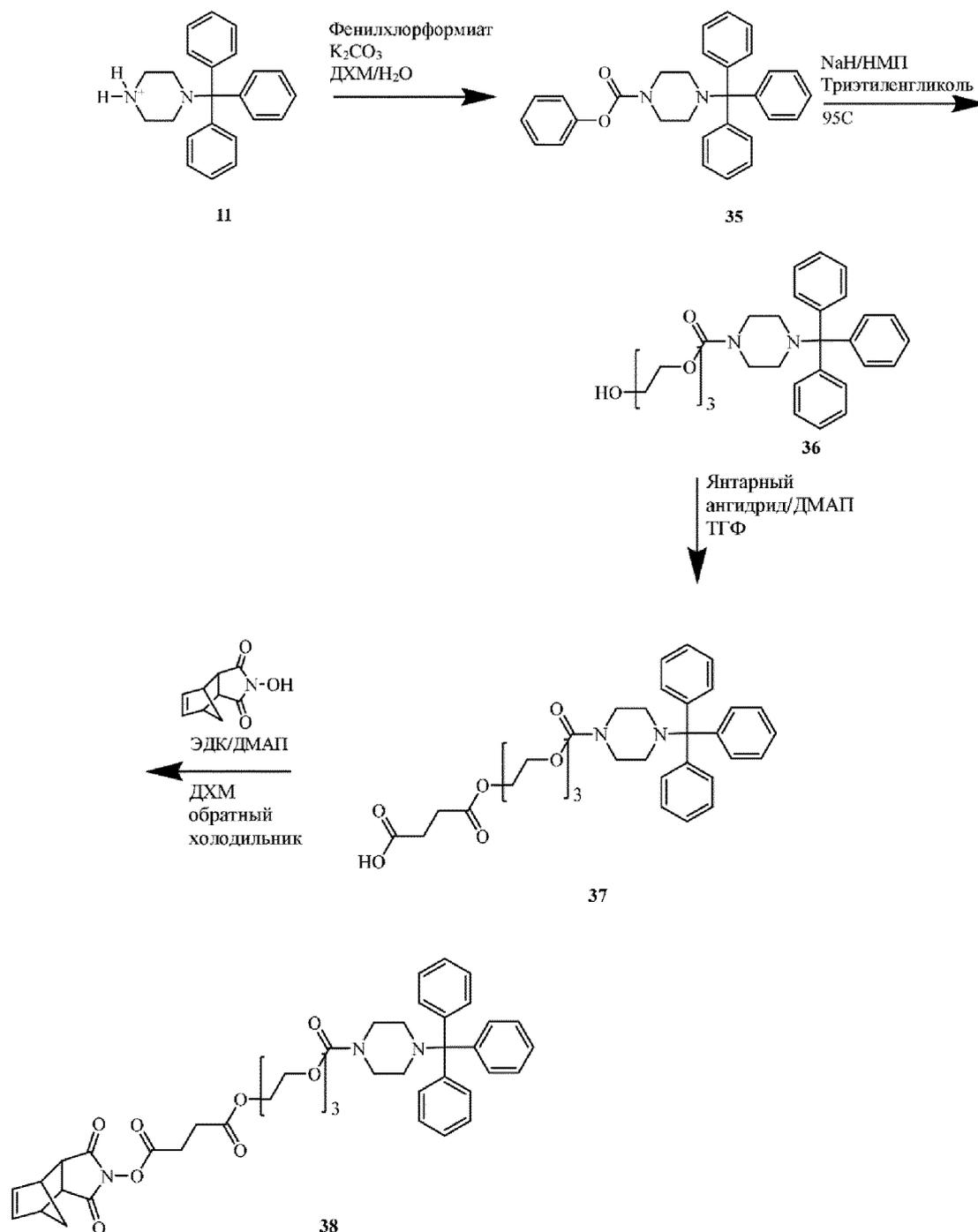
Соединения структуры **4** могут быть получены с применением любого количества способов, известных специалистам в данной области техники. Затем осуществляют сочетание с морфолиновым фрагментом, как описано выше.

Соединения структуры **5** могут быть применены в твердофазном синтезе олигомеров для получения олигомеров, содержащих межсубъединичные связи. Такие способы хорошо известны в данной области техники. Кратко, соединение структуры **5** может быть модифицировано с 5'-конца таким образом, чтобы оно содержало линкер для связи с твердой подложкой. После нанесения на подложку защитную группу соединения **5** (например, тритил на 3'-конце) удаляют и подвергают свободный амин взаимодействию с активированным фосфорсодержащим фрагментом второй молекулы соединения структуры **5**. Эту последовательность повторяют до тех пор, пока не будет получен олигомер желаемой длины. Защитная группа в 3'-концевой области может быть удалена или оставлена, если модификация в положении 3' является желательной. Олигомер может быть удален с твердой подложки с применением любого количества способов, например, обработки основанием для расщепления связи с твердой подложкой.

Получение морфолиновых олигомеров в целом и конкретных морфолиновых олигомеров согласно настоящему раскрытию более подробно описано в примерах.

#### *Получение морфолиновых олигомеров*

Получение соединений согласно настоящему раскрытию проводят с применением следующего протокола в соответствии со схемой 2:



### Схема 2. Получение активированной кислоты «хвоста»

Получение тритилпиперазинфенилкарбамата **35**: 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 °С. По завершении реакции (1-2 часа) слои разделяли. Органический слой промывали водой и сушили над безводным карбонатом калия. Продукт **35** выделяли с помощью кристаллизации из ацетонитрила.

Получение эфира спирта и карбаминовой кислоты **36**: Суспендировали гидрид натрия (1,2 экв.) в 1-метил-2-пирролидиноне (32 мл/г гидроксида натрия). К этой суспензии

добавляли триэтиленгликоль (10,0 экв.) и соединение **35** (1,0 экв.). Полученную суспензию нагревали до 95 °С. По завершении реакции (1-2 часа) смесь охлаждали до 20 °С. К этой смеси добавляли 30% дихлорметана/метил-трет-бутилового эфира (об.:об.) и воду. Содержащий продукт органический слой последовательно промывали водным NaOH, водной янтарной кислотой и насыщенным водным хлоридом натрия. Продукт **36** выделяли с помощью кристаллизации из дихлорметана/метил-трет-бутилового эфира/гептана.

Получение кислоты «хвоста» **37**: К раствору соединения **36** в тетрагидрофуране (7 мл/г **36**) добавляли янтарный ангидрид (2,0 экв.) и ДМАП (0,5 экв.). Смесь нагревали до 50 °С. По завершении реакции (5 часов) смесь охлаждали до 20 °С и доводили pH до 8,5 с помощью водного NaHCO<sub>3</sub>. Добавляли метил-трет-бутиловый эфир и подвергали полученный продукт экстракции в водный слой. Добавляли дихлорметан и доводили pH смеси до 3 с помощью водной лимонной кислоты. Содержащий продукт органический слой промывали смесью цитратного буфера с pH=3 и насыщенного водного хлорида натрия. Этот раствор **37** в дихлорметане использовали без выделения для получения соединения **38**.

Получение **38**: К раствору соединения **37** добавляли имид N-гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбоновой кислоты (HONB) (1,02 экв.), 4-диметиламинопиридин (ДМАП) (0,34 экв.) и затем 1-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида гидрохлорид (ЭДК) (1,1 экв.). Смесь нагревали до 55°C. По завершении реакции (4-5 часов) полученную смесь охлаждали до 20°C и последовательно промывали 0,2 М лимонной кислотой/солевым раствором 1:1 и солевым раствором. Раствор в дихлорметане подвергали замене растворителя на ацетон и затем на N, N-диметилформамид, и полученный продукт выделяли с помощью осаждения из ацетона/N, N-диметилформамида в насыщенный водный хлорид натрия. Неочищенный продукт несколько раз повторно суспендировали в воде для удаления остаточного N, N-диметилформамида и соли.

*Способ А синтеза РМО: применение дисульфидного якоря*

Введение активированного «хвоста» в смолу после ее загрузки якорем проводили в диметилимидазолидиноне (ДМИ) согласно методике, применяемой для встраивания субъединиц во время твердофазного синтеза.

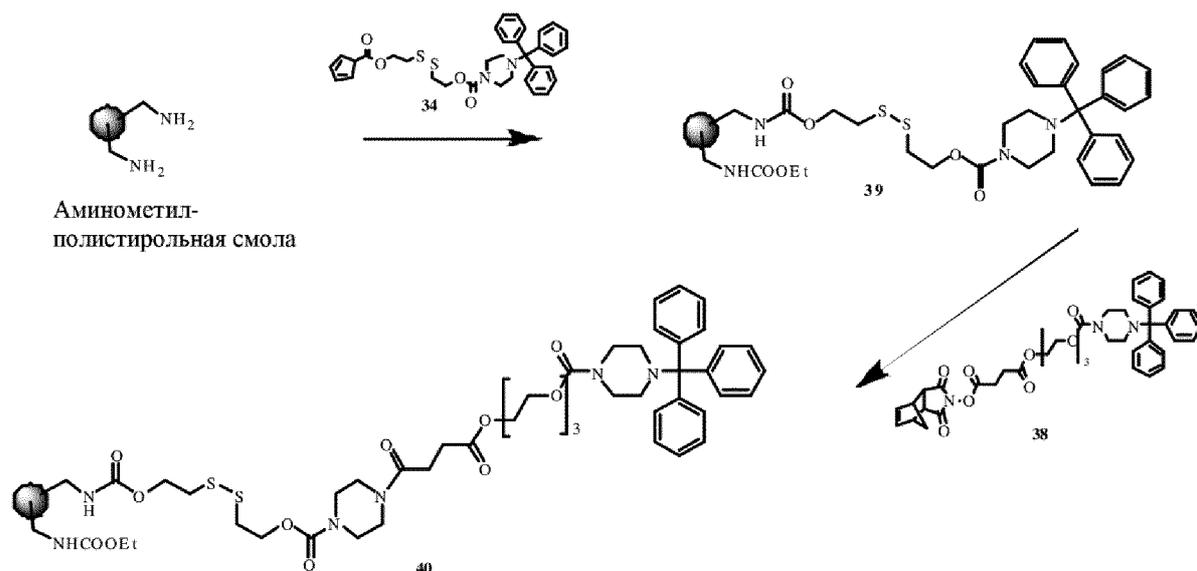


Схема 3: Получение твердой подложки для синтеза морфолиновых олигомеров

Эту процедуру выполняли в силинизированном сосуде с рубашкой для синтеза пептидов (ChemGlass, NJ, USA) со стеклянной фриттой крупной пористости (40-60 мкм), верхнеприводной мешалкой и 3-ходовым тефлоновым запорным краем для обеспечения возможности барботации N<sub>2</sub> через фритту или вакуумной экстракции.

Стадии обработки/промывки смолы в следующей методике состоят из двух основных операций: псевдооживления смолы или использования реактора с перемешиваемым слоем и экстракции растворителя/ раствора. Для псевдооживления смолы запорный кран устанавливали таким образом, чтобы обеспечить восходящий ток N<sub>2</sub> через фритту, и добавляли в реактор указанные реагенты для обработки/промывки смолы и обеспечивали их проникновение и полное смачивание смолы. Затем начинали перемешивание и перемешивали суспензию смолы в течение указанного времени. Для экстракции растворителя/раствора прекращали перемешивание и подачу N<sub>2</sub> и запускали вакуумный насос, и затем устанавливали запорный кран в положение, обеспечивающее возможность удаления реагентов для обработки/промывки смолы в емкость для отходов. Объемы всех реагентов для обработки/промывки смолы составляли 15 мл/г смолы, если не указано иное.

К аминметилполистирольной смоле (100-200 меш; емкость ~1,0 ммоль/г на основе замещения азота; 75 г, 1 экв., Polymer Labs, UK, part #1464-X799) в силинизированном сосуде с рубашкой для синтеза пептидов добавляли 1-метил-2-пирролидинон (НМП; 20 мл/г смолы) и оставляли смолу для набухания при перемешивании в течение 1-2 часов. После удаления растворителя для набухания смолу промывали дихлорметаном (2×1-2 мин), 5% диизопропилэтиламин в 25% изопропанол/дихлорметане (2×3-4 мин) и дихлорметаном (2×1-2 мин). После удаления последнего реагента для промывки смолу обрабатывали раствором дисульфидного якоря **34** в 1-метил-2-пирролидиноне (0,17 М; 15 мл/г смолы, ~2,5 экв.) и полученную смесь смола/реагент нагревали при 45°C в течение 60

часов. По завершении реакции прекращали нагревание и удаляли раствор якоря и промывали смолу 1-метил-2-пирролидиноном (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) и затем промывали дихлорметаном (6×1-2 мин). Полученную смолу **39** сушили в токе N<sub>2</sub> в течение 1-3 часов и затем под вакуумом до постоянной массы ( $\pm 2\%$ ). Выход: 110-150% от исходной массы смолы.

Определение емкости аминотетрагидропиримидиновой смолы. Емкость смолы (количество потенциально доступных реакционных центров) определяют с помощью спектрометрического анализа количества трифенилметильных (триметильных) групп на грамм смолы.

Известную массу высушенной смолы ( $25 \pm 3$  мг) переносят в силанизированную мерную колбу объемом 25 мл и добавляют ~5 мл 2% (об./об.) трифторуксусной кислоты в дихлорметане. Содержимое перемешивают путем осторожного вращения и затем оставляют на 30 минут. Объем доводят до 25 мл посредством добавления 2% (об./об.) трифторуксусной кислоты в дихлорметане и содержимое тщательно перемешивают. С помощью пипетки прямого вытеснения аликвоту триметилсодержащего раствора (500 мкл) переносят в мерную колбу объемом 10 мл и доводят объем до 10 мл посредством добавления метансульфоновой кислоты.

Содержание триметильного катиона в конечном растворе определяют по УФ-поглощению при длине волны 431,7 нм и рассчитывают емкость смолы в виде количества триметильных групп на грамм смолы (мкмоль/г) с использованием подходящих объемов, разведений, коэффициента экстинкции ( $\epsilon$ : 41 мкмоль·см<sup>-1</sup>) и массы смолы. Анализ проводят в трех повторностях и рассчитывают среднюю емкость.

Методика загрузки смолы, описанная в этом примере, обеспечит смолу с емкостью примерно 500 мкмоль/г. Емкость 300-400 мкмоль/г была получена, если стадия введения дисульфидного якоря выполняется в течение 24 часов при комнатной температуре.

Загрузка «хвоста». «Хвост» может быть введен в твердую подложку с использованием тех же условий и объемов, что и для получения аминотетрагидропиримидиновой смолы. Сначала со смолы после ее загрузки якорем снимали защиту в кислых условиях и нейтрализуют полученный материал, затем осуществляли сочетание. Для стадии сочетания вместо раствора дисульфидного якоря использовали раствор **38** (0,2 М) в ДМИ, содержащем 4-этилморфолин (N-ЭМ, 0,4 М). Через 2 часа при 45°C смолу **39** дважды промывали 5% диизопропилэтиламином в 25% изопропанол/дихлорметане и один раз ДХМ. К смоле добавляли раствор бензойного ангидрида (0,4 М) и N-ЭМ (0,4 М). Через 25 минут рубашку реактора охлаждали до комнатной температуры и полученную смолу дважды промывали 5% диизопропилэтиламином в 25% изопропанол/дихлорметане и восемь раз ДХМ. Смолу **40** отфильтровывали и сушили под высоким вакуумом. Определено, что емкость смолы **40** равна емкости исходной аминотетрагидропиримидиновой смолы **39**, используемой для загрузке «хвоста».

Твердофазный синтез. Морфолиновые олигомеры получали на автоматическом синтезаторе пептидов Gilson AMS-422 на полипропиленовых реакционных колонках Gilson объемом 2 мл (Part # 3980270). Вокруг колонок, когда они находились на синтезаторе, был помещен алюминиевый блок с каналами для потока воды. В качестве альтернативы AMS-422 будет добавлять реагенты/промывочные растворы, выдерживать их в течение определенного времени и опорожнять колонки с помощью вакуума.

Для олигомеров, имеющих длину в диапазоне до примерно 25 субъединиц, предпочтительной является аминотилполистиролдисульфидная смола с емкостью примерно 500 мкмоль/г смолы. Для более крупных олигомеров предпочтительной является аминотилполистиролдисульфидная смола с емкостью 300-400 мкмоль/г смолы. Если желаемой является молекула с 5'-«хвостом», смоле после ее загрузки «хвостом» выбирают в соответствии с теми же рекомендациями относительно емкости.

Готовили следующие растворы реагентов:

раствор для детритилирования: 10% цианоуксусная кислота (масс./об.) в дихлорметане/ацетонитриле 4:1;

раствор для нейтрализации: 5% диизопропилэтиламин в дихлорметане/изопропанолу 3:1; и

раствор для сочетания: 0,18 М (или 0,24 М для олигомеров, имеющих длину более 20 субъединиц) активированной морфолиновой субъединицы с желаемым основанием и типом связи и 0,4 М N-этилморфолина в 1,3-диметилимидазолидиноне.

В качестве промежуточного промывочного раствора, разделяющего промывки с использованием растворов различных реагентов, использовали дихлорметан (ДХМ).

На синтезаторе с блоком, установленным на 42°C, к каждой колонке, содержащей 30 мг аминотилполистиролдисульфидной смолы (или смолы с «хвостом»), добавляли 2 мл 1-метил-2-пирролидинона и оставляли при комнатной температуре на 30 мин. После двукратной промывки 2 мл дихлорметана осуществляли следующий цикл синтеза:

Стадия	Объем	Доставка	Время выдержки
Детритилирование	1,5 мл	Распределитель	15 секунд
Детритилирование	1,5 мл	Распределитель	15 секунд
Детритилирование	1,5 мл	Распределитель	15 секунд
Детритилирование	1,5 мл	Распределитель	15 секунд
Детритилирование	1,5 мл	Распределитель	15 секунд
Детритилирование	1,5 мл	Распределитель	15 секунд
Детритилирование	1,5 мл	Распределитель	15 секунд
ДХМ	1,5 мл	Распределитель	30 секунд
Нейтрализация	1,5 мл	Распределитель	30 секунд
Нейтрализация	1,5 мл	Распределитель	30 секунд
Нейтрализация	1,5 мл	Распределитель	30 секунд
Нейтрализация	1,5 мл	Распределитель	30 секунд
Нейтрализация	1,5 мл	Распределитель	30 секунд
Нейтрализация	1,5 мл	Распределитель	30 секунд
ДХМ	1,5 мл	Распределитель	30 секунд
Сочетание	350-500мкл	Шприц	40 минут
ДХМ	1,5 мл	Распределитель	30 секунд
Нейтрализация	1,5 мл	Распределитель	30 секунд
Нейтрализация	1,5 мл	Распределитель	30 секунд
ДХМ	1,5 мл	Распределитель	30 секунд
ДХМ	1,5 мл	Распределитель	30 секунд
ДХМ	1,5 мл	Распределитель	30 секунд

Последовательности отдельных олигомеров были запрограммированы в синтезаторе таким образом, чтобы на каждую колонку подавался необходимый раствор для сочетания (А, С, G, Т, I) в надлежащей последовательности. После включения в олигомер, находящийся на колонке, последней субъединицы колонку извлекали из блока и выполняли последний цикл вручную с использованием раствора для сочетания, состоящего из 4-метокситрифенилметилхлорида (0,32 М в ДМИ), содержащего 0,89 М 4-этилморфолина.

Отщепление от смолы и удаление защитных групп оснований и основной цепи. После метокситритилирования смолу промывали 8 раз 2 мл 1-метил-2-пирролидинона. Добавляли один мл раствора для отщепления, состоящего из 0,1 М 1,4-дитиотреитола (ДТТ) и 0,73 М триэтиламина в 1-метил-2-пирролидиноне, колонку закрывали и оставляли

при комнатной температуре на 30 мин. По истечении этого времени раствор сцеживали во флакон Wheaton объемом 12 мл. Хорошо отжатую смолу дважды промывали 300 мкл раствора для отщепления. К раствору добавляли 4,0 мл конц. водного раствора аммиака (хранится при  $-20^{\circ}\text{C}$ ), флакон плотно закрывали (покрытой тефлоном завинчивающейся крышкой) и взбалтывали смесь для перемешивания раствора. Флакон помещали в печь при  $45^{\circ}\text{C}$  на 16-24 часа для проведения отщепления защитных групп оснований и основной цепи.

Очистка неочищенного продукта. Упакованный во флаконы раствор после аммонолиза вынимали из печи и давали остыть до комнатной температуры. Раствор разбавляли 20 мл 0,28% водного раствора аммиака и пропускали через колонку размером  $2,5 \times 10$  см, содержащую смолу Macroprep HQ (BioRad). Для элюирования пика, содержащего метокситритил, использовали градиент соли (А: 0,28% раствор аммиака и В: 1 М хлорид натрия в 0,28% растворе аммиака; 0-100% В в течение 60 мин). Объединенные фракции объединяли и подвергали дополнительной обработке в зависимости от желаемого продукта.

Деметокситритилирование морфолиновых олигомеров. Объединенные фракции после очистки с помощью Macroprep обрабатывали с применением 1 М  $\text{H}_3\text{PO}_4$  для снижения рН до 2,5. После предварительного перемешивания образцы выдерживали при комнатной температуре в течение 4 мин, при этом их нейтрализовали до рН 10-11 с помощью 2,8% раствора аммиака/воды. Полученные продукты очищали с помощью твердофазной экстракции (ТФЭ).

Заполнение и кондиционирование колонки для ТФЭ. Amberchrome CG-300M (Rohm and Haas; Philadelphia, PA) (3 мл) набивают в колонки объемом 20 мл с фриттой (хроматографические колонки BioRad Econo-Pac (732-1011)) и промывают смолу 3 мл следующего: 0,28%  $\text{NH}_4\text{OH}/80\%$  ацетонитрила; 0,5 М  $\text{NaOH}/20\%$  этанола; вода; 50 мМ  $\text{H}_3\text{PO}_4/80\%$  ацетонитрила; вода; 0,5  $\text{NaOH}/20\%$  этанола; вода; 0,28%  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

Очистка с помощью ТФЭ. Раствор после деметокситритилирования наносили на колонку и три раза промывали смолу 3-6 мл 0,28% водного раствора аммиака. Под колонку помещали флакон Wheaton (объемом 12 мл) и элюировали продукт путем двух промывок 2 мл 45% ацетонитрила в 0,28% водном растворе аммиака.

Выделение продукта. Растворы замораживали в сухом льду и помещали флаконы в лиофилизатор для получения легкого белого порошка. Полученные образцы растворяли в воде, фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (Pall Life Sciences, шприцевой фильтр Acrodisc диаметром 25 мм с мембраной NT Tuffryn с диаметром пор 0,2 мкм) с помощью шприца и измеряли оптическую плотность (ОП) на УФ-спектрофотометре для определения того, сколько единиц ОП олигомера присутствует, а также дозирования образцов для анализа. Затем растворы помещали обратно во флаконы Wheaton для лиофилизации.

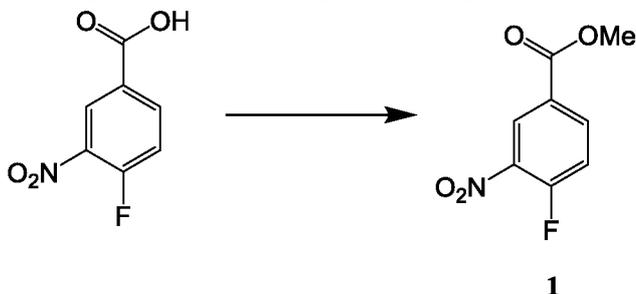
Анализ морфолиновых олигомеров с помощью MALDI. Для определения состава фракций при очистке, а также для подтверждения подлинности (молекулярной массы)

олигомеров использовали масс-спектрометрию MALDI-TOF. Анализ образцов проводили после их разбавления раствором 3,5-диметокси-4-гидроксикоричной кислоты (синапиновой кислоты), 3,4,5-тригидроксиацетофенона (ТГАФ) или альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты (НССА) в качестве матриц.

Способ В синтеза РМО: применение якоря NCP2

Синтез якоря NCP2:

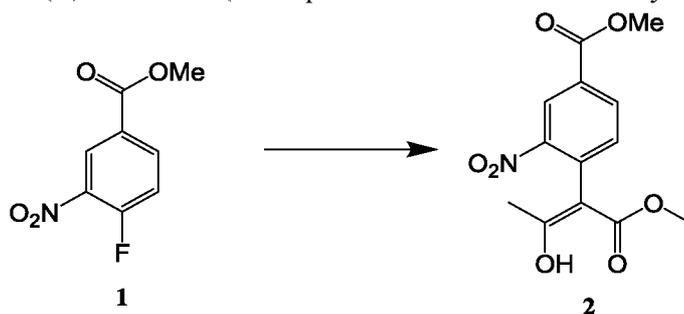
1. Получение метил-4-фтор-3-нитробензоата (**1**)



В сосуд объемом 100 л вносили 12,7 кг 4-фтор-3-нитробензойной кислоты, добавляли 40 кг метанола и 2,82 кг концентрированной серной кислоты. Смесь перемешивали при кипячении с обратным холодильником (65°C) в течение 36 часов. Реакционную смесь охлаждали до 0°C. Кристаллы образовывались при 38°C. Смесь выдерживали при 0°C в течение 4 часов, затем фильтровали в атмосфере азота. Сосуд объемом 100 л и осадок на фильтре промывали 10 кг метанола, охлажденного до 0°C. Твердый осадок на фильтре сушили на воронке в течение 1 часа, переносили на поддоны и сушили в вакуумном сушильном шкафу при комнатной температуре до постоянной массы, составившей 13,695 кг метил-4-фтор-3-нитробензоата (выход 100%; ВЭЖХ 99%).

2. Получение 3-нитро-4-(2-оксопропил)-бензойной кислоты

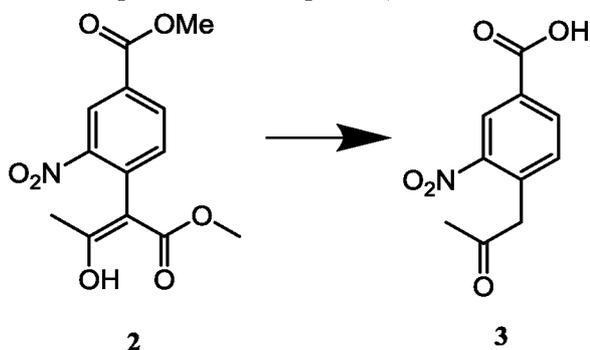
А. (Z)-Метил-4-(3-гидрокси-1-метокси-1-оксобут-2-ен-2-ил)-3-нитробензоат (**2**)



В сосуд объемом 100 л вносили 3,98 кг метил-4-фтор-3-нитробензоата (**1**) с предыдущей стадии, 9,8 кг ДМФА, 2,81 кг метилацетоацетата. Смесь перемешивали и охлаждали до 0°C. К полученной смеси добавляли 3,66 кг ДБУ в течение примерно 4 часов, в то время как температуру поддерживали на уровне 5°C или ниже. Смесь перемешивали еще 1 час. В реакционный сосуд добавляли раствор 8,15 кг лимонной кислоты в 37,5 кг очищенной воды, в то время как температуру реакции поддерживали на уровне 15°C или ниже. После добавления реакцию перемешивали в течение еще 30 минут, затем фильтровали в атмосфере азота. Влажный осадок на фильтре

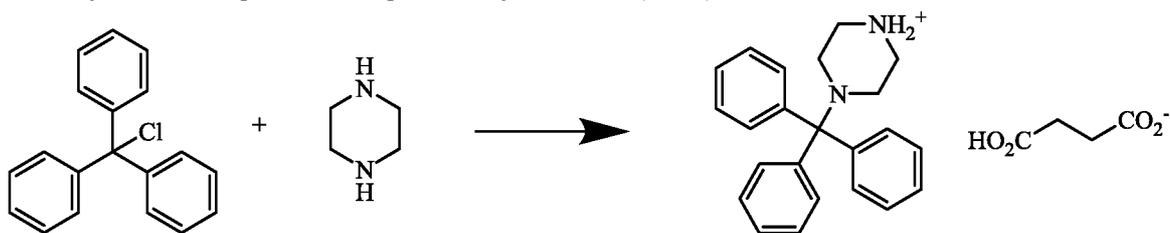
возвращали в сосуд объемом 100 л вместе с 14,8 кг очищенной воды. Суспензию перемешивали в течение 10 минут, затем фильтровали. Влажный осадок снова возвращали в сосуд объемом 100 л, суспендировали с 14,8 кг очищенной воды в течение 10 минут и фильтровали для получения неочищенного (Z)-метил-4-(3-гидрокси-1-метокси-1-оксобут-2-ен)-2-ил)-3-нитробензоата.

### В. 3-Нитро-4-(2-оксопропил)бензойная кислота



Неочищенный (Z)-метил-4-(3-гидрокси-1-метокси-1-оксобут-2-ен)-2-ил)-3-нитробензоат вносили в реакционный сосуд объемом 100 л в атмосфере азота. К нему добавляли 14,2 кг 1,4-диоксана и перемешивали. К смеси добавляли раствор 16,655 кг концентрированной HCl и 13,33 кг очищенной воды (6 М HCl) в течение 2 часов при поддержании температуры реакционной смеси ниже 15°C. Когда добавление было завершено, реакционную смесь нагревали с обратным холодильником (80°C) в течение 24 часов, охлаждали до комнатной температуры и фильтровали в атмосфере азота. Твердый осадок на фильтре измельчали с 14,8 кг очищенной воды, фильтровали, снова измельчали с 14,8 кг очищенной воды и фильтровали. Твердое вещество возвращали в сосуд объемом 100 л с 39,9 кг ДХМ и кипятили с обратным холодильником при перемешивании в течение 1 часа. Для растворения оставшихся твердых веществ добавляли 1,5 кг очищенной воды. Нижний органический слой отделяли в предварительно нагретый сосуд объемом 72 л, затем возвращали в чистый сухой сосуд объемом 100 л. Раствор охлаждали до 0°C, выдерживали в течение 1 часа, затем фильтровали. Твердый осадок на фильтре дважды промывали раствором 9,8 кг ДХМ и 5 кг гептана, затем сушили на воронке. Твердое вещество переносили в поддоны и сушили до постоянной массы, составившей 1,855 кг 3-нитро-4-(2-оксопропил)-бензойной кислоты. Общий выход 42% от соединения 1. ВЭЖХ 99,45%.

### 3. Получение N-тримилпиперазина сукцината (NTP)



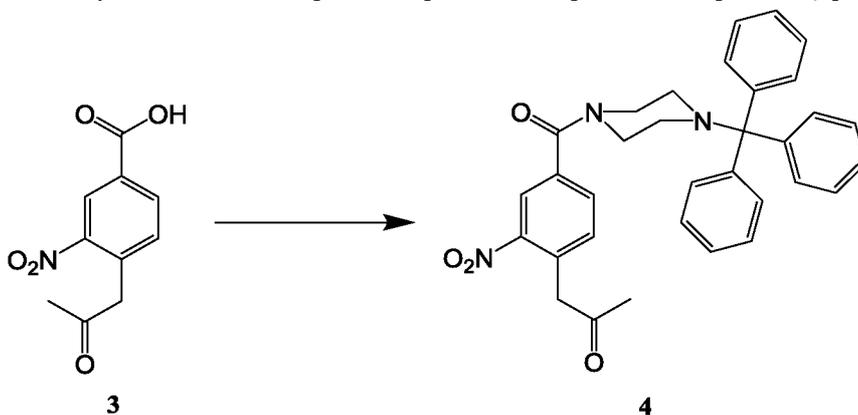
В сосуд с рубашкой объемом 72 л в атмосфере азота вносили 1,805 кг трифенилметилхлорида и 8,3 кг толуола (раствор ТРС). Смесь перемешивали до

растворения твердого вещества. В реакционную колбу с рубашкой объемом 100 л в атмосфере азота добавляли 5,61 кг пиперазина, 19,9 кг толуола и 3,72 кг метанола. Смесь перемешивали и охлаждали до 0°C. К ней медленно добавляли порциями раствор ТРС в течение 4 часов, в то время как температуру реакции поддерживали на уровне 10°C или ниже. Смесь перемешивали в течение 1,5 ч при 10°C, затем давали нагреться до 14°C. 32,6 кг очищенной воды вносили в сосуд объемом 72 л, затем переносили в сосуд объемом 100 л, в то время как внутренняя температура загрузки поддерживалась на уровне (20±5)°C. Слой давали возможность разделиться, и нижний водный слой отделяли и убирали для хранения. Органический слой трижды подвергали экстракции с использованием 32 кг очищенной воды для каждой экстракции, и водные слои отделяли и объединяли с отложенным для хранения водным раствором.

Оставшийся органический слой охлаждали до 18°C, и к нему медленно добавляли порциями раствор 847 г янтарной кислоты в 10,87 кг очищенной воды. Смесь перемешивали в течение 1,75 часа при (20±5)°C. Смесь фильтровали и твердые вещества промывали 2 кг МТБЭ (ТВМЕ) и 2 кг ацетона, затем сушили на воронке. Осадок на фильтре дважды измельчали с 5,7 кг ацетона, фильтровали и промывали 1 кг ацетона между измельчениями. Твердое вещество сушили на воронке, затем переносили на поддон и сушили в вакуумном сушильном шкафу при комнатной температуре до постоянной массы, составившей 2,32 кг НТР. Выход 80%.

4. Получение (4-(2-гидроксипропил)-3-нитрофенил)-(4-тримилпиперазин-1-ил)-метанола

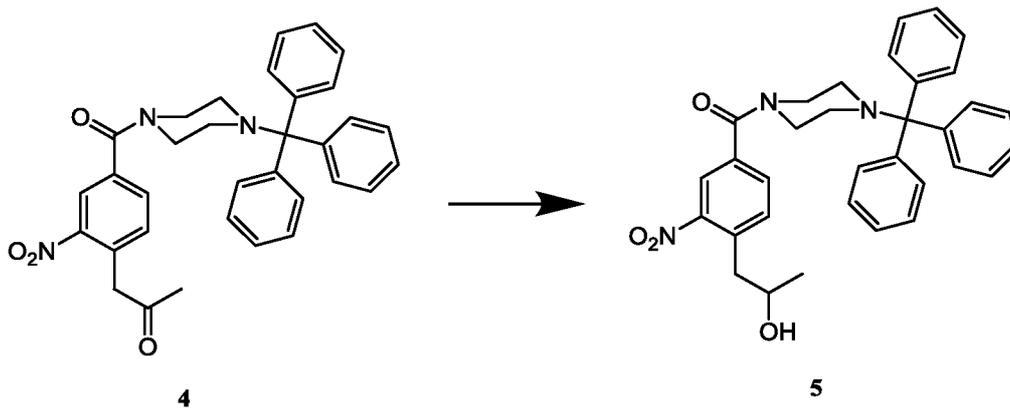
А. Получение 1-(2-нитро-4(4-тримилпиперазин-1-карбонил)фенил) пропан-2-она



В сосуд с рубашкой объемом 100 л в атмосфере азота помещали 2 кг 3-нитро-4-(2-оксипропил)-бензойной кислоты (3), 18,3кг ДХМ и 1,845 кг N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида гидрохлорида (EDC.HCl). Раствор перемешивали до получения гомогенной смеси. 3,048 кг НТР добавляли в течение 30 минут при комнатной температуре и перемешивали в течение 8 часов. К реакционной смеси добавляли 5,44 кг очищенной воды и перемешивали в течение 30 минут. Слой давали возможность разделиться, и нижний органический слой, содержащий продукт, высушивали и сохраняли. Водный слой дважды подвергали экстракции 5,65 кг ДХМ. Объединенные органические слои промывали раствором 1,08 кг хлорида натрия в 4,08 кг очищенной

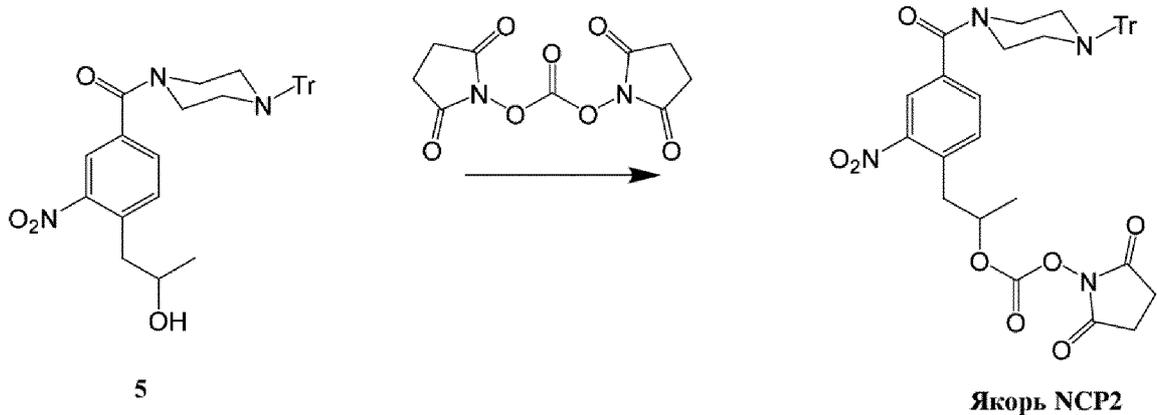
воды. Органические слои сушили над 1,068 кг сульфата натрия и фильтровали. Сульфат натрия промывали 1,3 кг ДХМ. Объединенные органические слои суспендировали с 252 г силикагеля и фильтровали через фильтровальную воронку, содержащую слой из 252 г силикагеля. Слой силикагеля промывали 2 кг ДХМ. Объединенные органические слои упаривали на роторном испарителе. К остатку добавляли 4,8 кг ТГФ и затем упаривали на роторном испарителе до тех пор, пока не было достигнуто 2,5 объема неочищенного 1-(2-нитро-4-(4-тримилпиперазин-1-карбонил)-фенил)-пропан-2-она в ТГФ.

В. Получение (4-(2-гидроксипропил)-3-нитрофенил)(4-тримилпиперазин-1-ил)метанона (**5**)



В сосуд с рубашкой объемом 100 л в атмосфере азота вносили 3600 г соединения **4** с предыдущей стадии и 9800 г ТГФ. Перемешиваемый раствор охлаждали до  $\leq 5^{\circ}\text{C}$ . Раствор разбавляли с помощью 11525 г этанола и добавляли 194 г борогидрида натрия на протяжении приблизительно 2 часов при  $\leq 5^{\circ}\text{C}$ . Реакционную смесь перемешивали дополнительные 2 часа при  $\leq 5^{\circ}\text{C}$ . Реакционную смесь гасили раствором приблизительно 1,1 кг хлорида аммония в приблизительно 3 кг воды путем медленного добавления для поддержания температуры на уровне  $\leq 10^{\circ}\text{C}$ . Реакционную смесь перемешивали дополнительные 30 минут, фильтровали для удаления неорганических веществ, повторно загружали в сосуд с рубашкой объемом 100 л и экстрагировали с помощью 23 кг ДХМ. Органический слой отделяли, а водный слой еще дважды подвергали экстракции с использованием 4,7 кг ДХМ для каждой экстракции. Объединенные органические слои промывали раствором примерно 800 г хлорида натрия в примерно 3 кг воды, затем сушили над 2,7 кг сульфата натрия. Суспензию фильтровали и осадок на фильтре промывали 2 кг ДХМ. Объединенные фильтраты концентрировали до 2,0 объемов, разбавляли примерно 360 г этилацетата и упаривали. Неочищенный продукт загружали в колонку с силикагелем из 4 кг оксида кремния, заполненную ДХМ в атмосфере азота, и элюировали 2,3 кг этилацетата в 7,2 кг ДХМ. Объединенные фракции упаривали и остаток растворяли в 11,7 кг толуола. Полученный раствор в толуоле фильтровали и осадок на фильтре дважды промывали, используя каждый раз 2 кг толуола. Осадок на фильтре сушили до постоянной массы, составившей 2,275 кг соединения **5** (выход 46% от соединения **3**) ВЭЖХ 96,99%.

5. Получение 2,5-диоксопирролидин-1-ил-(1-(2-нитро-4-(4-трифенилметилпиперазин-1-карбонил)-фенил)-пропан-2-ил)-карбоната (**якорь NCP2**)



В сосуд с рубашкой объемом 100 л в атмосфере азота вносили 4,3 кг соединения **5** (масса корректировалась на основе остаточного толуола по данным Н<sup>1</sup> ЯМР; все реагенты в дальнейшем масштабировались соответственно) и 12,7 кг пиридина. К полученному загружали 3,160 кг DSC (78,91 вес. % по данным Н<sup>1</sup> ЯМР), при этом внутреннюю температуру поддерживали на уровне  $\leq 35^{\circ}\text{C}$ . Реакционную смесь выдерживали в течение приблизительно 22 часов при температуре окружающей среды, затем фильтровали. Осадок на фильтре промывали 200 г пиридина. В двух партиях, каждая из которых содержит  $\frac{1}{2}$  объема фильтрата, промывочную жидкость фильтрата медленно вносили в сосуд с рубашкой объемом 100 л, содержащий раствор примерно 11 кг лимонной кислоты в примерно 50 кг воды, и перемешивали в течение 30 минут, чтобы обеспечить образование твердого осадка. Твердое вещество собирали с помощью фильтровальной воронки, дважды промывали с использованием 4,3 кг воды на каждую промывку и сушили на фильтровальной воронке под вакуумом.

Объединенные твердые вещества вносили в сосуд с рубашкой объемом 100 л и растворяли в 28 кг ДХМ, и промывали раствором 900 г карбоната калия в 4,3 кг воды. Через 1 час слой оставляли для разделения, и водный слой удаляли. Органический слой промывали 10 кг воды, отделяли и сушили над 3,5 кг сульфата натрия. ДХМ фильтровали, упаривали и сушили в вакууме до 6,16 кг **якоря NCP2** (выход 114%).

Синтез смолы, нагруженной якорем NCP2

В реактор для твердофазного синтеза объемом 75 л с тефлоновым запорным краном вносили примерно 52 л НМП и 2300 г аминотилполистирольной смолы. Смолу перемешивали в НМП до набухания в течение примерно 2 часов, затем осушали. Смолу дважды промывали примерно 4 л ДХМ на каждую промывку, затем дважды - 39 л нейтрализующего раствора на каждую промывку, затем дважды - 39 л ДХМ на каждую промывку. Раствор якоря NCP2 медленно добавляли к перемешиваемому раствору смолы, перемешивали в течение 24 часов при комнатной температуре и осушали. Смолу промывали четыре раза 39 л НМП на каждую промывку и шесть раз 39 л ДХМ на каждую промывку. Смолу обрабатывали и перемешивали с  $\frac{1}{2}$  защитного раствора ДЭДК в течение

30 минут, осушали, обрабатывали и перемешивали со второй ½ защитного раствора ДЭДК в течение 30 минут и осушали. Смолу шесть раз промывали 39 л ДХМ на каждую промывку, затем сушили в сушильном шкафу до постоянной массы, составившей 3573,71 г смолы, нагруженной якорем.

Получение морфолинового олигомера с использованием якоря NCP2

Твердофазный синтез 50 л неочищенной лекарственной субстанции голодирсена (РМО #1)

1 Материалы

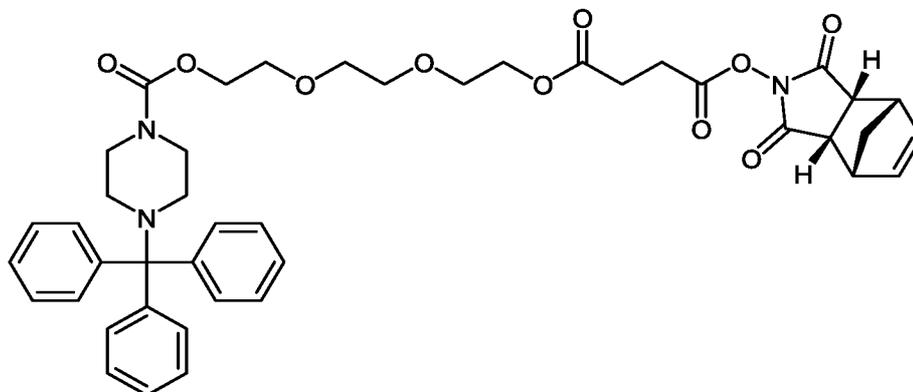
**Таблица 2. Исходные вещества**

Название вещества	Химическое название	Номер CAS	Химическая формула	Молекулярная масса
Активированная А-субъединица	N, N-диметил-[6-[6-(бензоиламино)-9H-пурин-9-ил]-4-(трифенилметил)-2-морфолинил]-метилловый эфир фосфорамидохлоридной кислоты	1155373-30-0	C <sub>38</sub> H <sub>37</sub> ClN <sub>7</sub> O <sub>4</sub> P	722,2
Активированная С-субъединица	N, N-диметил-[6-[4-(бензоиламино)-2-оксо-1(2H)-пиримидинил]-4-(трифенилметил)-2-морфолинил]-метилловый эфир фосфорамидохлоридной кислоты	1155373-31-1	C <sub>37</sub> H <sub>37</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>5</sub> P	698,2
Активированная ДПГ-субъединица	2,2-диметил-4-[[[9-[6-[[[хлор-(диметиламино)-фосфинил]-окси]-метил]-4-(трифенилметил)-2-морфолинил-2-[(2)-фенилацетил]-амино]-9H-пурин-6-ил]-окси]-метил]-фениловый эфир пропановой кислоты	1155309-89-9	C <sub>51</sub> H <sub>53</sub> ClN <sub>7</sub> O <sub>7</sub> P	942,2
Активированная Т-субъединица	N, N-диметил-[6-(3,4-дигидро-5-метил-2,4-диоксо-1(2H)-пиримидинил)-4-(трифенилметил)-2-морфолинил]-метилловый эфир фосфорамидохлоридной кислоты	1155373-34-4	C <sub>31</sub> H <sub>34</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>5</sub> P	609,1
Активированный хвост EG3	1-[3aR,4S,7R,7aS)-1,3,3a,4,7,7a-гексагидро-1,3-диоксо-4,7-метано-2H-изоиндол-2-ил]-4-[2-[2-[2-[[[4-(трифенилметил)-1-пиперазинил]-карбонил]-	1380600-06-5	C <sub>43</sub> H <sub>47</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub>	765,9

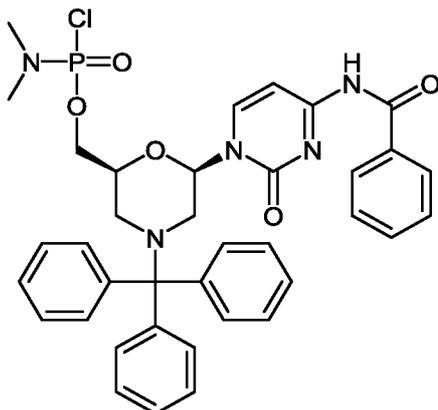
	окси]-этокси]-этокси]- этиловый] эфир бутандиовой кислоты			
--	---	--	--	--

**Химическая структура исходных веществ:**

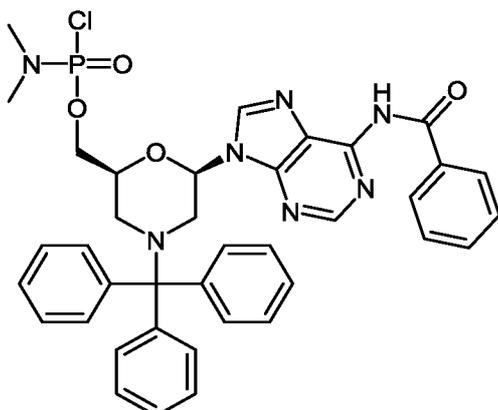
A. Активированный хвост EG3



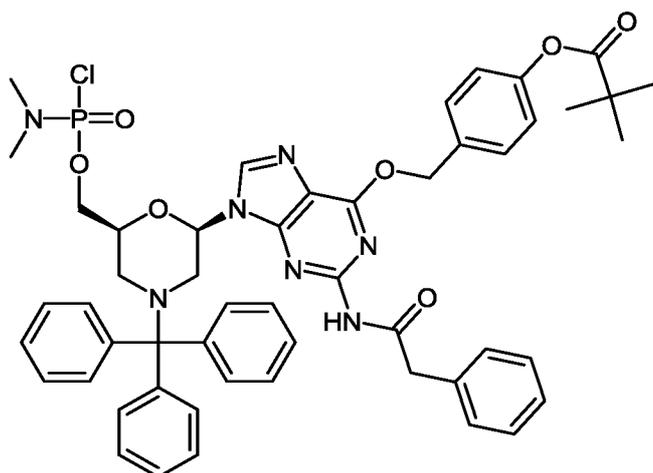
B. Активированная субъединица C (в отношении получения см. патент США № 8067571)



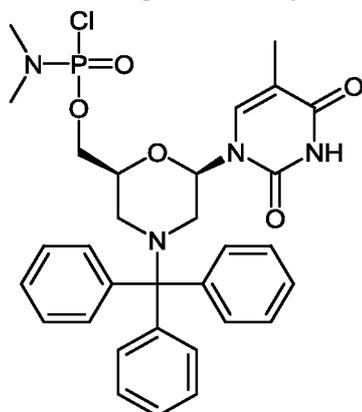
C. Активированная субъединица A (в отношении получения см. патент США № 8067571)



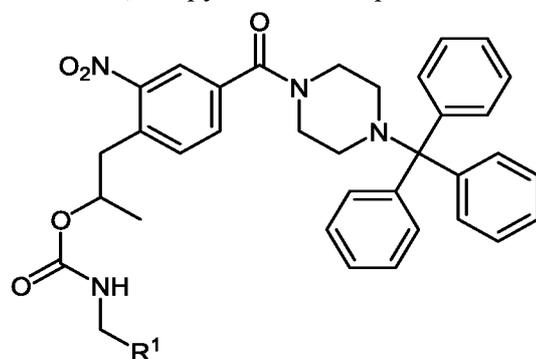
D. Активированная субъединица DPG (в отношении получения см. WO 2009/064471)



Е. Активированная субъединица Т (в отношении получения см. WO 2013/082551)



Г. Смола, нагруженная якорем



где R1 представляет собой иммобилизирующий носитель.

**Таблица 3.** Описание растворов для твердофазного олигомерного синтеза неочищенной лекарственной субстанции голодирсена

Название раствора	Состав раствора
Раствор якоря NCP2	37,5 л НМП и 1292 г якоря NCP2
Защитный раствор ДЭДК	4,16 л диэтилдикарбоната (ДЭДК), 3,64 л НЭМ и 33,8 л ДХМ
Раствор ЦПТФА	2,02 кг 4-цианопиридина, 158 л ДХМ, 1,42 л ТФУ, 39 л ТФЭ и 2 л очищенной воды

Нейтрализующий раствор	35,3 л ИПС, 7,5 л ДИПЭА и 106,5 л ДХМ
Раствор для расщепления	1530,04 г ДТТ, 6,96 л НМП и 2,98 л ДБУ

## 2. Синтез неочищенной лекарственной субстанции голодирсена

### А. Набухание смолы

750 г нагруженной якорем смолы и 10,5 л НМП вносили в силанизированный реактор объемом 50 л и перемешивали в течение 3 часов. НМП сливали, а нагруженную якорем смолу дважды промывали с использованием 5,5 л ДХМ для каждой промывки и дважды - с использованием 5,5 л 30% ТФЭ/ДХМ для каждой промывки.

### В. Цикл 0: присоединение хвоста EG3

Нагруженную якорем смолу промывали три раза по 5,5 л 30% ТФЭ/ДХМ для каждой промывки и осушали, промывали 5,5 л раствора ЦПТФА в течение 15 минут и осушали, а затем снова промывали 5,5 л раствора ЦПТФА в течение 15 минут без осушения, к которому добавляли 122 мл НЭМ/ДХМ в отношении 1:1, и суспензию перемешивали в течение 2 минут и осушали. Смолу дважды промывали 5,5 л нейтрализующего раствора в течение 5 минут и осушали, затем дважды по 5,5 л ДХМ для каждой промывки и осушали. Раствор 706,2 г активированного хвоста EG3 (ММ 765,85) и 234 мл НЭМ в 3 л ДМИ добавляли к смоле и перемешивали в течение 3 часов при комнатной температуре и осушали. Смолу дважды промывали 5,5 л раствора для нейтрализации в течение 5 минут на каждую промывку и один раз 5,5 л ДХМ и осушали. Раствор 374,8 г бензойного ангидрида и 195 мл НЭМ в 2680 мл НМП вносили и перемешивали в течение 15 минут и сливали. Смолу перемешивали с 5,5 л нейтрализующего раствора в течение 5 минут, затем один раз промывали 5,5 л ДХМ и дважды по 5,5 л 30% ТФЭ/ДХМ для каждой промывки. Смолу суспендировали в 5,5 л 30% ТФЭ/ДХМ и выдерживали в течение 14 часов.

### С. Циклы присоединения субъединиц 1-30

#### i. Обработки перед присоединением

Перед каждым циклом присоединения, как описано на фигуре 18, смолу: 1) промывали 30% ТФЭ/ДХМ; 2) а) обрабатывали раствором ЦПТФА в течение 15 минут и осушали, и б) обрабатывали раствором ЦПТФА в течение 15 минут, к которому добавляли НЭМ/ДХМ в отношении 1:1, перемешивали и осушали; 3) трижды перемешивали с нейтрализующим раствором; и 4) дважды промывали ДХМ. См. фигуру 18.

#### ii. Обработка после присоединения

После слива каждого раствора субъединицы, как описано на фигуре 18, смолу: 1) промывали ДХМ; и 2) промывали два раза 30% ТФЭ/ДХМ. Если смолу выдерживали в течение периода времени до следующего цикла присоединения, вторая промывка ТФЭ/ДХМ не была слита, и смола оставалась в указанном промывочном растворе ТФЭ/ДХМ. См. фигуру 18.

iii. Циклы присоединения активированных субъединиц

Циклы присоединения были выполнены, как описано на фигуре 18.

iv. Окончательная промывка ИПС

После того, как заключительная стадия присоединения была выполнена так, как описано на фигуре 18, смолу 8 раз промывали с использованием 19,5 л ИПС для каждой промывки и сушили под вакуумом при комнатной температуре в течение примерно 63,5 часов до сухой массы 4857,9 г.

C. Расщепление

Указанную выше смолу, связанную с неочищенной лекарственной субстанцией голодирсена, разделяли на две партии, каждая партия была обработана следующим образом. Партию смолы массой 1619,3 г: 1) перемешивали с 10 л НМП в течение 2 часов, затем НМП сливали; 2) промывали 3 раза, каждый по 10 л 30% ТФЭ/ДХМ; 3) обрабатывали 10 л раствора ЦПТФА в течение 15 минут; и 4) 10 л раствора ЦПТФА в течение 15 минут, к которому затем добавляли 130 мл НЭМ/ДХМ в отношении 1:1, перемешивали в течение 2 минут и сливали. Смолу трижды обрабатывали 10 л раствора для нейтрализации, шесть раз промывали 10 л ДХМ и восемь раз 10 л НМП. Смолу обрабатывали расщепляющим раствором 1530,4 г ДТТ и 2,98 кг ДБУ в 6,96 л НМП в течение 2 часов для отделения неочищенной лекарственной субстанции голодирсена от смолы. Раствор для расщепления сливали и оставляли в отдельном сосуде. Реактор и смолу промывали 4,97 л НМП, который объединяли с расщепляющим раствором.

D. Снятие защиты

Объединенные расщепляющий раствор и промывочный раствор на основе НМП переносили в контейнер высокого давления, куда добавляли 39,8 л  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), который охлаждали до температуры от  $-10^\circ \text{C}$  до  $-25^\circ \text{C}$  в морозильной камере. Контейнер высокого давления герметично закрывали и нагревали до  $45^\circ \text{C}$  в течение 16 ч., затем оставляли охлаждаться до  $25^\circ \text{C}$ . Этот раствор для снятия защиты, содержащий неочищенное лекарственное вещество голодирсена, разбавляли в соотношении 3:1 очищенной водой и доводили значение pH до 3,0 с помощью 2 М фосфорной кислоты, затем до pH 8,03 с помощью  $\text{NH}_4\text{OH}$ . ВЭЖХ: C18 77,552% и SCX-10 73,768%.

Очистка неочищенной лекарственной субстанции голодирсена (PMO#1)

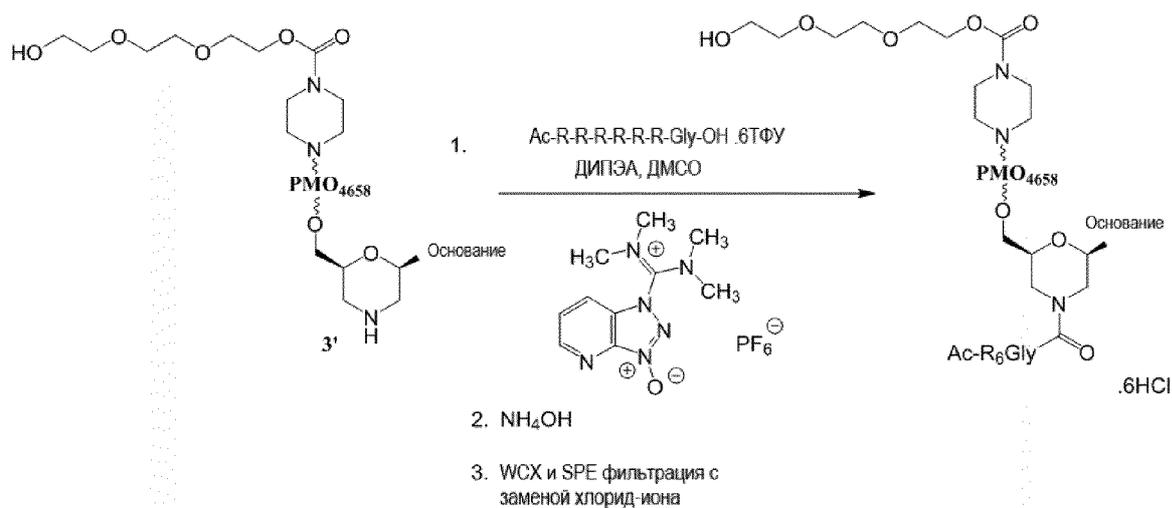
Раствор для снятия защиты из вышеуказанной части D, содержащий неочищенную лекарственную субстанцию голодирсена, загружали в колонку с анионообменной смолой ToyoPearlSuper-Q® 650S (TosohBioscience) и элюировали градиентом 0-35% В объемом более 17 объемов колонки (буфер А: 10 мМ гидроксида натрия; буфер В: 1 М хлорида натрия в 10 мМ гидроксида натрия), и фракции приемлемой чистоты (ВЭЖХ C18 и SCX) объединяли с получением раствора очищенного лекарственного продукта. ВЭЖХ: 93,571% (C18) 88,270% (SCX).

Раствор очищенной лекарственной субстанции обессоливали и лиофилизировали с получением 1450,72 г очищенной лекарственной субстанции голодирсена. Выход 54,56%; ВЭЖХ: 93,531% (C18) 88,354% (SCX).

Таблица 5. Сокращения

Сокращение	Название
ДБУ	1,8-дизабициклоундец-7-ен
ДХМ	Дихлорметан
ДИПЭА	N, N-диизопропилэтиламин
ДМИ	1,3-диметил-2-имидазолидинон
ДТТ	Дитиотреитол
ИПС	Изопропиловый спирт
ММ	Молекулярная масса
НЭМ	N-этилморфолин
НМП	N-метил-2-пирролидон
КТ	Комнатная температура
ТФК	2,2,2-трифторуксусная кислота
ТФЭ	2,2,2-трифторэтанол

## Иллюстративный пример конъюгирования СРР

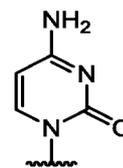
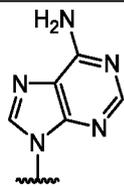


Аналитические процедуры. Масс-спектры матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI-TOF-MS) регистрировали на Bruker Autoflex™ Speed с использованием матрицы синапиновой кислоты (SA). SCX-ВЭЖХ проводили на системе Thermo Dionex UltiMate® 3000, оснащенной детектором с 3000 диодных матриц и колонкой ProPac™ SCX-20 (250 x 4 мм) при скорости потока 1,0 мл/мин (pH=2; температура колонки 30°C). Подвижные фазы представляли собой **A** (25% ацетонитрила в воде, содержащей 24 мМ Н<sub>3</sub>РO<sub>4</sub>) и **B** (25% ацетонитрила в воде, содержащей 1 М КСl и 24 мМ Н<sub>3</sub>РO<sub>4</sub>). Использовали градиентное элюирование: 0 мин, 35% **B**; 2 мин, 35% **B**; 22 мин, 80% **B**; 25 мин, 80% **B**; 25,1 мин, 35% **B**; 30 мин, 35% **B**.

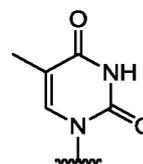
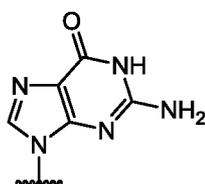
К смеси РМО4658 (1,82 г, 0,177 ммоль, свежесушеный путем лиофилизации в течение двух дней; SEQ ID NO: 11), Ac-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-Gly-OH



от 5' к 3'									
1	G	6	C	11	G	16	G	21	T
2	T	7	T	12	T	17	A	22	G
3	T	8	C	13	T	18	A	23	T
4	G	9	C	14	C	19	G	24	T
5	C	10	G	15	T	20	G	25	C



где А представляет собой , С представляет собой , G

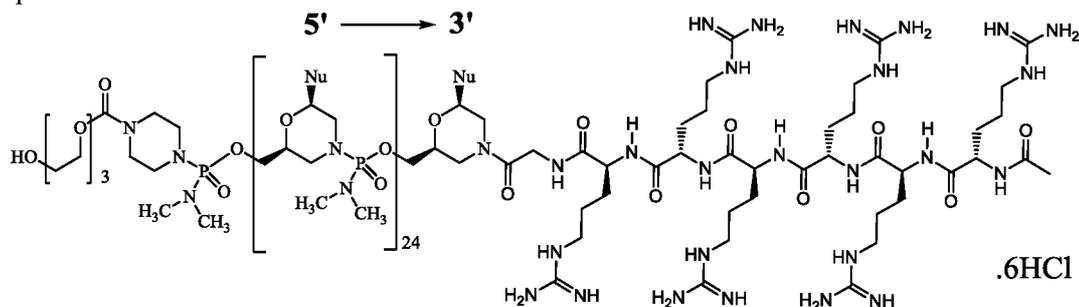


представляет собой , и Т представляет собой .

ВЭЖХ: 71,85%; условия: Dionex DNAPac (DNX#97), градиент: 75%A+20%B+5%C при 0 мин; 50%A при 20 мин; 25%A+75%C при 21 мин; подвижная фаза А: 10мМ NaOH/20мМ NaCl; С: 10мМ NaOH/0,5 М NaCl. Темп. колонки: 45С; скорость потока 1,0 мл/мин.

### Пример 2: РРМО#1

При применении описанного выше протокола для получения РРМО4658 синтезировали РРМО#1 из РМО#1:

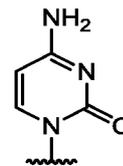
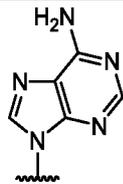


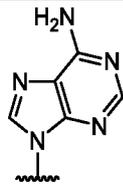
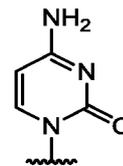
### РРМО#1

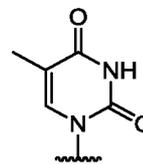
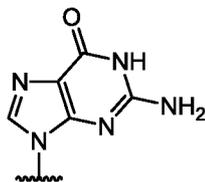
где каждый Nu от 1 до 25 в направлении от 5' к 3' представляет собой:

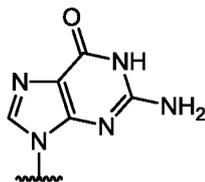
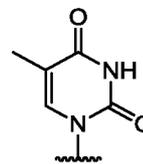
№ положения от 5' к 3'	Nu	№ положения от 5' к 3'	Nu	№ положения от 5' к 3'	Nu	№ положения от 5' к 3'	Nu	№ положения от 5' к 3'	Nu
1	G	6	C	11	G	16	G	21	T
2	T	7	T	12	T	17	A	22	G
3	T	8	C	13	T	18	A	23	T
4	G	9	C	14	C	19	G	24	T

5	C	10	G	15	T	20	G	25	C
---	---	----	---	----	---	----	---	----	---



где А представляет собой , С представляет собой , G



представляет собой , и Т представляет собой .

### Пример 3: Пропуск экзона 53 *in vitro* (миобласты)

Два соединения, которые нацелены на экзон 53 дистрофина человека (DMD), описанные в таблице ниже, РМО#1 и РРМО#1, оба из которых содержат одну и ту же последовательность, были оценены в отношении пропуска экзона 53 DMD в миобластах здоровых людей.

#### Последовательности РМО#1 и РРМО#1 для экзона 53 DMD человека

Название	Нацеливающая последовательность (TS)	TS SEQ ID NO.	5'	3'
РМО#1	GTTGCCTCCGGTTCTGAAG GTGTTC	1	EG3	H
РРМО#1	GTTGCCTCCGGTTCTGAAG GTGTTC	1	EG3	-G-R <sub>6</sub>

В частности, миобласты здорового человека (высев 5-6, SKB-F-SL, приобретенный у Zen-Bio, Inc.) высевали при ~40% конфлюэнтности при обработке РМО#1 или РРМО#1 в различных концентрациях (а именно 40 мкМ, 20 мкМ, 10 мкМ, 5 мкМ, 2,5 мкМ и 1,25 мкМ) в среде SKM-M® (Zen-Bio, Inc.). После девяноста шести часов инкубирования миобласты промывали ФСБ и лизировали лизирующим буфером RA1 в наборе Illustra® GE RNAspin 96 (номер по кат. 25-055-75, GE Healthcare Bio-Sciences). Общая РНК была выделена в соответствии с рекомендацией производителя, за исключением того, для элюирования РНК использовали 40 мкл воды, не содержащей РНКаз.

Чтобы определить пропуск экзона 53, вызываемый обоими соединениями, была проведена двухстадийная ОТ-ПЦР с детекцией по «конечной точке». В частности, одиннадцать микролитров общей РНК сначала подвергали обратной транскрипции в кДНК с помощью набора для синтеза первой цепи SuperScript® IV (номер по кат. 18091200, Invitrogen) с использованием случайных гексамеров в соответствии с инструкциями производителя. ПЦР проводили путем добавления 9 мкл кДНК в Supermix для высокоточной ПЦР с ДНК-полимеразой Taq Platinum (номер по кат. 12532024, Invitrogen) с праймерами, которые были нацелены на границу экзона 51/52 и экзон 54 МДД человека (прямой праймер: (SEQ ID NO: 5): CATCAAGCAGAAGGCAACAА;

обратный праймер: (SEQ ID NO: 6): GAAGTTTCAGGGCCAAGTCA). ПЦР-амплификацию проводили с использованием амплификатора BioRad® CFX96 в реальном времени, используя программу, показанную в таблице 2. Экспрессию продуктов ПЦР с пропуском или без пропуска оценивали путем загрузки 32 мкл продукта ПЦР в систему LabChip® GX с использованием набора реагентов DNA High Sensitivity Reagent kit (CLS760672, Perkin Elmer). Процентную долю пропуска экзона 53 DMD рассчитывали как процент молярности (нмоль/л) для полосы с пропуском экзона 53 (201 п.н.) по сравнению с суммарной молярностью для полос с пропуском (201 п.н.) и без пропуска (413 п.н.).

Для оценки того, являются ли средние значения 2 групп статистически отличающимися друг от друга при каждой дозе, применяли двухвыборочный t-критерий Стьюдента для независимых выборок (гомоскедастичный). Значение  $P < 0,05$  считалось статистически значимым.

**Программа амплификатора, применяемая для амплификации ампликонов, ассоциированных с МДД, с пропуском экзона 53 или без такового.**

Стадия	Температура	Время
1. Денатурация	94°C	2 мин
2. Денатурация	94°C	30 сек
3. Отжиг	61,2°C	30 сек
4. Элонгация	68°C	1 мин
5. Повторить стадии 2-4	34 цикла	
6. Конечная элонгация	68°C	5 мин
7. Хранение	4°C	∞

Результаты представлены в таблице ниже и на **фигуре 4**. На **фигуре 4** планки погрешностей означают среднее  $\pm$  С.О., «[число] x» выше планок означает относительное кратное изменение процента пропуска экзона с помощью РРМО#1 по сравнению с РМО#1 при каждой концентрации, «\*» означает значимое различие между РМО#1 и РРМО#1 при значении  $p < 0,05$ .

**Процент пропуска экзона 53 DMD с помощью РМО#1 и РРМО#1 в миообластах человека**

Соединение/ доза (мкМ)	Процент пропуска экзона (среднее $\pm$ С.О.)					
	1,25	2,5	5	10	20	40
РМО#1	1,27 $\pm$ 0,24	2,19 $\pm$ 0,44	3,58 $\pm$ 0,91	6,56 $\pm$ 1,32	11,06 $\pm$ 2,08	19,57 $\pm$ 4,23
РРМО#1	2,03 $\pm$ 0,48	3,73 $\pm$ 0,70	6,57 $\pm$ 1,47	10,27 $\pm$ 2,78	17,08 $\pm$ 4,61	26,90 $\pm$ 4,78

Данные, представленные в вышеприведенной таблице и на **фигуре 4**, неожиданно демонстрируют, что значительно большие результаты по пропуску экзона 53 в миообластах были достигнуты при обработке клеток соединением РРМО#1 по сравнению с РМО#1 во всех концентрациях, и степень увеличения была неожиданной. Это значительное улучшение дополнительно продемонстрировано в сравнительном исследовании *in vivo* с приматами, не являющимися людьми (NHP), из примера 5, где NHP вводили РРМО#1 или РМО#1 и измеряли уровень пропуска экзона 53 в различных соответствующих мышечных тканях (более подробно см. в примере 5). Более того, поскольку РРМО#1 разлагается в среде SKM-M, применяемой в этом примере (данные не показаны), в течение промежутка

времени данного исследования, исследование с NHP по сути демонстрирует даже большее улучшение, нежели улучшение, продемонстрированное в этом примере.

#### **Пример 4: Исследование на мышах MDX**

Мышь mdx является приемлемой и хорошо охарактеризованной моделью мышечной дистрофии Дюшенна (МДД) у животного, содержащей мутацию в экзоне 23 гена дистрофина. Известно, что антисмысловая последовательность M23D (SEQ ID NO: 2) вызывает пропуск экзона 23 и восстановление экспрессии функционального дистрофина. Мышам MDX в возрасте 6-7 недель в хвостовую вену делали одну инъекцию либо РМО4225, либо РМО4225 из таблицы ниже при дозе, составляющей 40 мг/кг, либо солевого раствора.

Название	Нацеливающая последовательность (TS)	TS SEQ ID NO.	5'	3'
РМО4225	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	2	EG3	H
РРМО4225	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	2	EG3	-G-R <sub>6</sub>

Как РМО4225, так и РРМО4225 были получены с помощью способа А для РМО и способов конъюгирования CPP, описанных выше.

Обработанных мышей умерщвляли через 7, 30, 60 и 90 дней после инъекции однократной дозы (n=6 для каждой группы). Диафрагму, сердце и правую четырехглавую мышцу анализировали методом вестерн-блоттинга для определения продуцирования белка дистрофина и методом ОТ-ПЦР для определения процентной доли пропуска экзона, а левую четырехглавую мышцу исследовали иммуногистохимически и окрашивали Н/Е (гематоксилин и эозин) так, как описано выше.

Восстановление белка дистрофина количественно определяли с помощью вестерн-блоттинга, и процент пропуска экзона 23 определяли с помощью ОТ-ПЦР, в каждом случае - так, как описано выше.

Результаты ОТ-ПЦР и вестерн-блоттинга показаны на фигурах 5А-10В и в таблицах ниже. Неожиданно, РРМО4225 индуцировал значительно более высокие и устойчивые уровни восстановления дистрофина и пропуска экзона 23 по сравнению с РМО4225, причем самые высокие уровни наблюдались через 30 дней после инъекции. Еще более неожиданно, что РРМО4225 увеличивал уровень дистрофина в сердце, тогда как РМО4225 не оказывал такого действия; при применении РМО4225 не наблюдали дистрофина и пропуска экзона в сердце во все моменты времени.

	<b>Количественная оценка белка дистрофина в процентах от белка дикого типа (% WT) с помощью вестерн-блоттинга</b>								
	<b>Соединение</b>	<b>РМО4225</b>				<b>РРМО4225</b>			
	<b>День</b>	<b>7</b>	<b>30</b>	<b>60</b>	<b>90</b>	<b>7</b>	<b>30</b>	<b>60</b>	<b>90</b>
<b><u>Ткань</u></b>									
Четырехглавая мышца		1,1	2,3	1,6	0,7	20,7	28,1	20,8	8,2

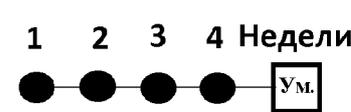
Диафрагма	1,4	1,9	1,3	0,6	14,5	15,2	9,8	2,3	
Сердце	0	0	0	0	2,0	1,0	0,9	0,1	
	<b>Процент пропуска экзона, определенный методом ОТ-ПЦР</b>								
	<b>Соединение</b>	<b>РМО4225</b>				<b>РРМО4225</b>			
	<b>День</b>	<b>7</b>	<b>30</b>	<b>60</b>	<b>90</b>	<b>7</b>	<b>30</b>	<b>60</b>	<b>90</b>
<b><u>Ткань</u></b>									
Четырехглавая мышца	21, 2	5,5	7,9	2,8	61,5	42,02	28,8	6,9	
Диафрагма	29, 9	2,6	0,5	0	51,6	36,76	3,05	0	
Сердце	0	0	0	0	13,15	2,64	0	0	

Результаты иммуногистохимии показаны на фигуре 11. Здесь РРМО4225 восстанавливает дистрофин в четырехглавой мышце, тогда как 4225 обуславливает «пятнистый» паттерн экспрессии. Равномерное распределение дистрофина при лечении с применением РРМО4225 указывает на то, что масштабное нацеливание на скелетные мышцы достижимо. РРМО4225 значительно улучшил доставку по сравнению с РМО4225 *in vivo*.

#### **Пример 5: Пропуск экзона 53 у приматов, не являющихся людьми (NHP)**

Чтобы дополнительно продемонстрировать эффективность пропуска экзонов при применении антисмысловых олигомеров РРМО, использовали приматов, не являющихся людьми. В частности, яванским макакам, имеющим интактные мышечные ткани, внутривенно вводили РРМО#1, РМО#1 (из примера 3) или солевой раствор в соответствии со схемой введения в таблице ниже.

#### **Схема введения для яванских макак.**

Группа	Соединение	Доза (мг/кг)	Количество в группе	Стратегия доставки
1	Физиологический раствор	0	2	 <p>1 2 3 4 Недели</p> <p>1 раз в неделю, всего 4 дозы</p>
2	РРМО#1	20	3	
3	РРМО#1	40	3	
4	РРМО#1	80	3	
5	РМО#1	40	3	

Животных наблюдали в течение всего исследования, в том числе осуществляли клинические наблюдения (например, оценку состояния кожи и шерсти, эффектов в отношении дыхательной функции) и измерения массы тела. Образцы крови и мочи отбирали по меньшей мере до начала испытания и через 24 часа после первой дозы и последней дозы (при необходимости).

При каждом запланированном вскрытии или проведении эвтаназии *in extremis* собирали и немедленно замораживали срезы диафрагмы, гладких мышц двенадцатиперстной кишки, толстой кишки и аорты, четырехглавой мышцы, дельтовидной мышцы, двуглавой мышцы и сердца. Процент пропуска экзона 53 определяли с применением ОТ-ПЦР, как описано выше, с помощью праймеров, которые нацеливались на экзоны 51-54 *МДД* человека (прямой праймер: TGC CAT CTC CAA ACT AGA AAT GCC A (SEQ ID NO. 9); обратный праймер: GCG GAG GTC TTT GGC CAA CT (SEQ ID NO: 10)). Результаты показаны на фигурах 20-27 и в таблице ниже.

Мышца	Процент пропуска экзона			
	РРМО#1			РМО#1
	20 мг/кг	40 мг/кг	80 мг/кг	40 мг/кг
<i>Четырехглавая мышца</i>	35,59	72,94	95,37	2,64
<i>Диафрагма</i>	64,64	96,06	99,17	2,23
<i>Двуглавая мышца</i>	36,7	93,26	96,91	2,34
<i>Дельтовидная мышца</i>	48,01	88,89	98,1	2,54
<i>Сердце</i>	29,17	71,53	92,57	1,32
<i>Аорта</i>	53,81	73,77	73,53	30,47
<i>Двенадцатиперстная кишка</i>	15,75	46,94	74,99	6,94
<i>Толстая кишка</i>	27,81	67,98	87,81	8,42

Неожиданно, РРМО#1 обеспечил значительные уровни пропуска экзона в подвергнутых исследованию интактных тканях, по сравнению с РМО#1. В частности, в случае РРМО#1 наблюдали стабильный пропуск экзона 53 в скелетных, сердечных и гладких мышцах. Ежедневное введение доз РМО#1 по 40 мг/кг обеспечивало только низкие уровни пропуска экзона 53 в скелетной мышце и сердце (1,3-2,6%) и умеренные уровни в гладкой мышце (6,9-30,5%).

Примечательно и неожиданно то, что тогда как введение РМО#1 приводит к уровню пропуска в четырехглавой мышце, диафрагме, двуглавой мышце, дельтовидной мышце и сердце, составляющему от 1,32 до 2,64%, РРМО#1 обеспечивает значительно и существенно более высокий уровень пропуска экзона во всех этих тканях, например, при 20 мг/кг - более чем в 10х выше, при 40 мг/кг - более чем в 27х выше, и при уровне дозировки 80 мг/кг уровень пропуска экзона 53 составляет свыше 90%. В частности, удивление вызывает уровень пропуска экзона, достигаемый в сердце при, например, 80

мг/кг, где уровень пропуска экзона превышал 90%, тогда как РМО#1 обеспечивал уровень пропуска экзона, составляющий 1,32% при 40 мг/кг. Без ограничения какой-либо конкретной теорией, систематическое введение и доставку РРМО#1 в интактные мышечные ткани NHP без дистрофических изменений, а также достижение уровня пропуска экзона 53, достигаемого с помощью РРМО#1, в частности в сердечной мышце, нельзя было предвидеть на основе вышеуказанных данных в отношении мышцы mdx в примере 4. То есть, доставка в здоровую ткань, как в случае NHP, отличается от доставки в ткань с дистрофическими изменениями.

#### **Пример 6: Исследование зависимости ответа от дозы у мышей MDX**

Мышам MDX в возрасте 6-7 недель в хвостовую вену делали одну инъекцию либо РРМО4225, либо РМО4225, описанных выше, при дозе 40 мг/кг, 80 мг/кг или 120 мг/кг (n=6 на группу).

Обработанных мышей умерщвляли через 30 дней после инъекции. Диафрагму, четырехглавую мышцу и сердце обрабатывали для анализа методом вестерн-блоттинга для определения продуцирования белка дистрофина на основе описанного выше протокола вестерн-блоттинга (используемого, например, в примере 4) со следующими модификациями:

Параметр	Протокол вестерн-блоттинга из примера 4	Модификации протокола вестерн-блоттинга
Количественное определение белка	Набор RC DC Protein Assay Kit	метод БСА
Стадия блокировки	В течение ночи при 4 <sup>0</sup> С	1 час при к.т.
Инкубирование с первичным антителом	1 час при к.т.	В течение ночи при 4 <sup>0</sup> С
Концентрация первичного антитела	1:20	1:500

Восстановление белка дистрофина в % от дикого типа представлено в таблице и на фигурах 12-15.

	<b>Количественная оценка белка дистрофина в процентах от белка дикого типа (% WT) с помощью вестерн-блоттинга</b>						
	<b>Соединение</b>	<b>РМО4225</b>			<b>РРМО4225</b>		
	<b>Доза (мг/кг)</b>	<b>40</b>	<b>80</b>	<b>120</b>	<b>40</b>	<b>80</b>	<b>120</b>
<b><u>Ткань</u></b>							
Диафрагма		0,80	0,97	1,83	8,02	26,03	42,77
Сердце		0,13	0,24	0,34	0,61	6,34	19,48
Четырехглавая мышца		3,5	2,6	3,0	43	90	144

Неожиданно данные показывают, что однократная доза РРМО4225 увеличивает уровни дистрофина дозозависимым образом у мышей mdx в значительно и существенно большей степени, чем РМО4225.

#### **Пример 7: Исследование диафрагмы и сердца мышей MDX методом ИГХ**

Мышам MDX в возрасте 6-7 недель в хвостовую вену делали одну инъекцию РРМО4225 при дозе, составляющей 80 мг/кг, или солевого раствора, а мышам дикого типа в возрасте 6-7 недель делали одну инъекцию солевого раствора. Обработанных мышей mdx, мышей mdx, которым вводили физиологический раствор, и мышей дикого типа умерщвляли через 30 дней после введения однократной дозы (n=4 на группу). Результаты иммуногистохимии показаны на фигуре 19. Здесь результаты показывают равномерное увеличение дистрофина в тканях, связанное с заболеваемостью и смертностью при МДД у мышей mdx, получавших РРМО4225.

#### **Пример 8: Пропуск экзона 53 in vitro (миотрубочки)**

Два соединения, которые нацелены на экзон 53 дистрофина человека (DMD), описанные в приведенной ниже таблице, РМО#1 и РРМО#1, оба из которых содержат одинаковую последовательность, оценивали в отношении пропуска экзона 51 DMD в мышечных трубочках здорового человека.

#### **Последовательности РМО#1 и РРМО#1 для экзона 53 DMD человека**

Название	Последовательность соединения	ID NO нацеливающей последовательности	5'	3'
РМО#1	GTT GCC TCC GGT TCT GAA GGT GTT C (SEQ ID NO: 1)	H53(+36+60)	EG3	H
РРМО#1	GTT GCC TCC GGT TCT GAA GGT GTT C (SEQ ID NO: 1)	H53(+36+60 R6G)	EG3	GR6Ac

В частности, миобласты здорового человека (высев 5-6, SKB-F-SL, приобретенный у Zen-Bio, Inc.) культивировали для достижения конfluenceности 80-90% в среде SKM-M, после чего инициировали дифференцировку путем инкубирования в среде с низким содержанием сыворотки (SKM-D, Zen-Bio, Inc.). Через пять дней после дифференцировки зрелые мышечные трубочки инкубировали с вышеуказанными соединениями в различных концентрациях (а именно 40 мкМ, 20 мкМ, 10 мкМ, 5 мкМ, 2,5 мкМ и 1,25 мкМ). После девяти часов инкубирования мышечные трубочки промывали ФСБ и лизировали лизирующим буфером RLT из набора RNeasy Micro (номер по кат. 74004, Qiagen). Общая РНК была выделена в соответствии с рекомендацией производителя, за исключением того, для элюирования РНК использовали 20 мкл воды, не содержащей РНКаз.

Чтобы определить пропуск экзона 53, вызываемый обоими соединениями, была проведена двухстадийная ОТ-ПЦР с детекцией по «конечной точке». В частности, семь микролитров общей РНК сначала подвергали обратной транскрипции в кДНК с помощью набора для синтеза первой цепи SuperScript® IV (номер по кат. 18091200, Invitrogen) с использованием случайных гексамеров в соответствии с инструкциями производителя. ПЦР проводили путем добавления 5 мкл кДНК в Supermix для высокоточной ПЦР с ДНК-полимеразой Taq Platinum (номер по кат. 12532024, Invitrogen) с праймерами, которые были нацелены на границу экзона 51/52 и экзон 54 МДД человека (прямой праймер: CAT CAA GCA GAA GGC AAC AA (SEQ ID NO: 5); обратный праймер: GAA GTT TCA GGG

ССА AGT CA (SEQ ID NO: 6)). ПЦР-амплификацию проводили с использованием амплификатора BioRad® CFX96 в реальном времени, используя программу, показанную в таблице 2. Экспрессию продуктов ПЦР с пропуском или без пропуска оценивали путем загрузки 32 мкл продукта ПЦР в систему LabChip® GX с использованием набора реагентов DNA High Sensitivity Reagent kit (CLS760672, Perkin Elmer). Процентную долю пропуска экзона 53 DMD рассчитывали как процент молярности (нмоль/ л) для полосы с пропуском экзона 53 (201 п.н.) по сравнению с суммарной молярностью для полос с пропуском (201 п.н.) и без пропуска (413 п.н.).

Для оценки того, являются ли средние значения 2 групп статистически отличающимися друг от друга при каждой дозе, применяли двухвыборочный t-критерий Стьюдента для независимых выборок (гомоскедастичный). Значение  $P < 0,05$  считалось статистически значимым.

**Программа амплификатора, применяемая для амплификации ампликонов, ассоциированных с МДД, с пропуском экзона 53 или без такового**

Стадия	Температура	Время
8. Денатурация	94°C	2 мин
9. Денатурация	94°C	30 сек
10. Отжиг	61,2°C	30 сек
11. Элонгация	68°C	1 мин
12. Повторить стадии 2-4	34 цикла	
13. Конечная элонгация	68°C	5 мин
14. Хранение	4°C	∞

Результаты представлены в таблице ниже и на **фигуре 20**. На **фигуре 20** планки погрешностей означают среднее  $\pm$  С.О., «[число] x» выше планок означает относительное кратное изменение процента пропуска экзона с помощью РРМО#1 по сравнению с РМО#1 при каждой концентрации, «\*» и «\*\*» означает значимое различие между РМО#1 и РРМО#1 при значении  $p < 0,05$  или  $0,005$ , соответственно.

**Процент пропуска экзона 53 DMD при применении РМО#1 и РРМО#1 в мышечных трубочках человека**

Соединение/ доза (мкМ)	Процент пропуска экзона (среднее $\pm$ С.О.)					
	1,25	2,5	5	10	20	40
РМО#1	1,45 $\pm$ 0,39	2,63 $\pm$ 0,50	3,33 $\pm$ 0,47	4,78 $\pm$ 0,88	8,40 $\pm$ 0,53	12,98 $\pm$ 1,21
РРМО#1	3,10 $\pm$ 1,67	2,45 $\pm$ 0,52	4,73 $\pm$ 1,01	7,08 $\pm$ 0,48	9,45 $\pm$ 1,03	12,08 $\pm$ 1,30

Данные, представленные в вышеприведенной таблице и на **фигуре 24**, неожиданно демонстрируют, что значительно большие результаты по пропуску экзона 53 в мышечных трубочках были достигнуты при обработке клеток соединением РРМО#1 по сравнению с РМО#1 по меньшей мере в концентрациях 5 мкМ и 10 мкМ, и степень увеличения была неожиданной. Это значительное улучшение дополнительно продемонстрировано в сравнительном исследовании *in vivo* с приматами, не являющимися людьми (NHP), из примера 5, где NHP вводили РРМО#1 или РМО#1 и измеряли уровень пропуска экзона 53 в различных соответствующих мышечных тканях (более подробно см. в примере 5). Более того, поскольку РРМО#1 разлагается в среде SKM-M, применяемой в этом примере

(данные не показаны), в течение промежутка времени данного исследования, исследование с ННР по сути демонстрирует даже большее улучшение, нежели улучшение, продемонстрированное в этом примере.

Все публикации и патентные заявки, цитируемые в настоящем документе, включены в настоящее описание посредством ссылки, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка были конкретно и индивидуально обозначены как включенные посредством ссылки.

#### **ЦИТИРУЕМЫЕ ИСТОЧНИКИ**

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.

Abes, R., et al. (2008). "Arginine-rich cell penetrating peptides: design, structure-activity, and applications to alter pre-mRNA splicing by steric-block oligonucleotides." *J Pept. Sci.* 14: 455-460.

Alter, J., et al. (2006). "Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology." *Nat. Med.* 12(2): 175-177.

Bestas, B., et al. (2014). "Splice-correcting liganucleotides restore BTK function in X-linked agammaglobulinemia model." *J. Clin. Invest.*

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. Tulinius, 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.*

Jearawiriyapaisarn, N., et al. (2010). "Long-term improvement in mdx cardiomyopathy after therapy with peptide-conjugated morpholino oligomers." *Cardiovascular Research* 85: 444-453.

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.

Leblue, B., et al. (2008). "Cell penetrating peptide conjugates of steric block oligonucleotides." *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60: 517-529.

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.

McClory, G., et al. (2006). "Antisense oligonucleotide-induced exon skipping restored dystrophin expression in vitro in a canine model of DMD." *Gene Therapy* 13: 1373-1381.

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.

Moulton, H.M., (2007). "Cell-penetrating peptide-morpholino conjugates alter pre-mRNA splicing of DMD (Duchenne muscular dystrophy) and inhibit murine coronavirus replication in vivo." *Biochem. Society Trans* 35(4): 826-828.

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.

Wu, B., et al. (2012). "Long-term rescue of dystrophin expression and improvement in muscle pathology and function in dystrophic mdx mice by peptide-conjugated morpholino." *The Am. J. Pathol.* 181(2): 392-400.

Wu, P., et al. (2007) "Cell-penetrating peptides as transporters for morpholino oligomers: effects of amino acid composition on intracellular delivery and cytotoxicity." *Nucleic Acids Research* 35(15): 5182-5191.

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.

Yin, H., et al. (2011). "Pip5 transduction peptides direct high efficiency oligonucleotide-mediated dystrophin exon skipping in heart and phenotypic correction in mdx mice." *Mol. Ther* 19(7): 1295-1303.

Youngblood, D., et al. (2006). "Stability of cell-penetrating peptide- morpholino oligomer conjugates in human serum and in cells." *Am. Chem. Soc.*

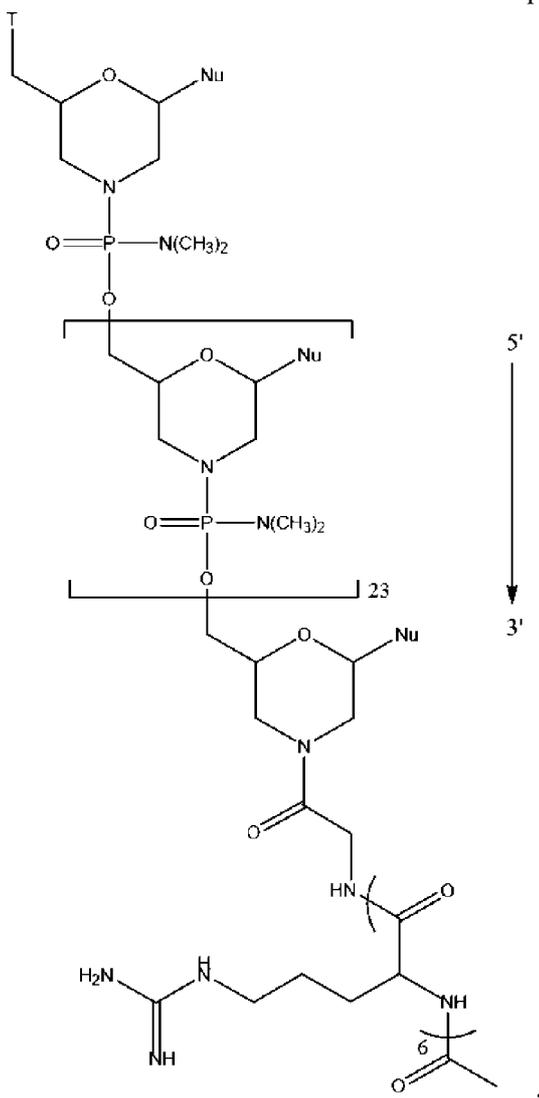
#### ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Описание	Последовательность от 5' до 3' или от N-конца до C-конца	SEQ ID NO
H53A(+36+60)	GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC	1
mdx4225	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	2
R <sub>6</sub>	RRRRRR	3
R <sub>6</sub> -G	RRRRRRG	4
Прямой праймер, связывающийся с границей экзонов 51/52 и экзоном 54 человека	CATCAAGCAGAAGGCAACAA	5
Прямой праймер, связывающийся с границей экзонов 51/52 и экзоном 54	GAAGTTTCAGGGCCAAGTCA	6

человека		
Прямой праймер, связывающий экзон 23 мыши	CACATCTTTGATGGTGTGAGG	7
Обратный праймер, связывающий экзон 23 мыши	СAACTTCAGCCATCCATTTCTG	8
Прямой праймер, связывающийся с границей экзонов 51- 54 человека	TGCCATCTCCAAACTAGAAATGCCA	9
Обратный праймер, связывающийся с границей экзонов 51- 54 человека	GCGGAGGTCTTTGGCCAАСТ	10
4658	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	11

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат антисмыслового олигомера формулы (I),

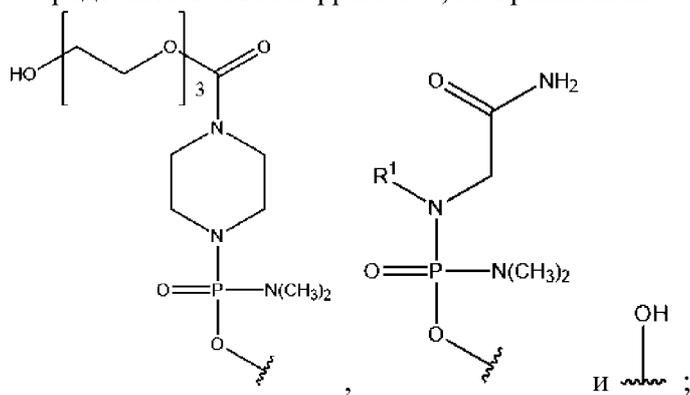


(I)

или его фармацевтически приемлемая соль, где:

каждый Nu представляет собой азотистое (нуклеотидное) основание, совместно с другими образующее нацеливающую последовательность; и

T представляет собой фрагмент, выбранный из:

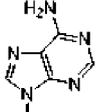
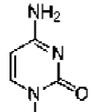
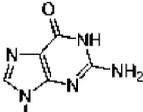
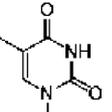
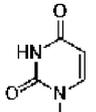


$R^1$  представляет собой  $C_1$ - $C_6$ алкил;

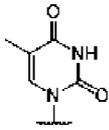




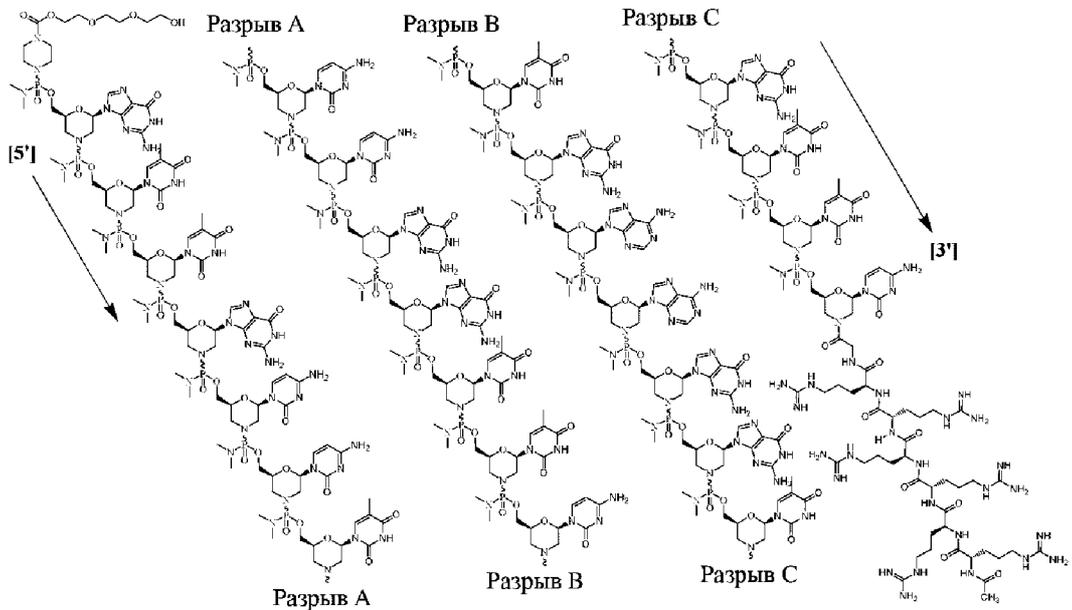
Я		Я		Я		Я		Я	
от 5' к 3'		от 5' к 3'		от 5' к 3'		от 5' к 3'		от 5' к 3'	
1	G	6	C	11	G	16	G	21	X
2	X	7	X	12	X	17	A	22	G
3	X	8	C	13	X	18	A	23	X
4	G	9	C	14	C	19	G	24	X
5	C	10	G	15	X	20	G	25	C

и где А представляет собой , С представляет собой , G представляет собой , и каждый X независимо представляет собой  или .

9. Конъюгат антисмыслового олигомера по п. 8, где каждый X представляет собой



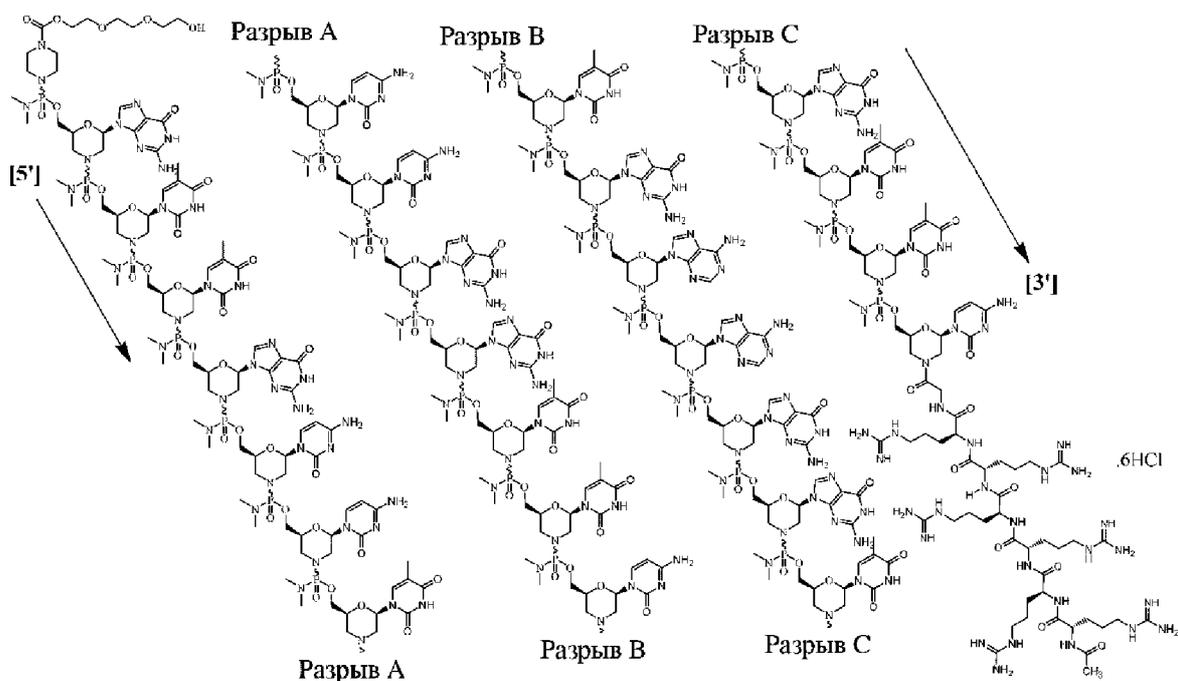
10. Конъюгат антисмыслового олигомера формулы (IV),



(IV)

или его фармацевтически приемлемая соль.

11. Конъюгат антисмыслового олигомера по п. 9, где антисмысловый олигомер имеет формулу (IVA),



(IVA).

12. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат антисмыслового олигомера по любому из пп. 1-11 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель.

13. Способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (МДД) у субъекта, нуждающегося в этом, где субъект имеет мутацию гена дистрофина, которая может быть скорректирована при помощи пропуска экзона 53, при этом способ включает введение субъекту конъюгата антисмыслового олигомера по любому из пп. 1-11.

14. Способ по п. 13, где конъюгат антисмыслового олигомера вводят еженедельно.

15. Способ по п. 13, где конъюгат антисмыслового олигомера вводят один раз в две недели.

16. Способ по п. 13, где конъюгат антисмыслового олигомера вводят один раз в три недели.

17. Способ по п. 13, где конъюгат антисмыслового олигомера вводят ежемесячно.

18. Способ восстановления рамки считывания мРНК для индукции продуцирования дистрофина у субъекта, имеющего мутацию гена дистрофина, которая может быть скорректирована при помощи пропуска экзона 53, при этом способ включает введение субъекту конъюгата антисмыслового олигомера по любому из пп. 1-11.

19. Способ по п. 18, где конъюгат антисмыслового олигомера вводят еженедельно.

20. Способ по п. 18, где конъюгат антисмыслового олигомера вводят один раз в две недели.

21. Способ по п. 18, где конъюгат антисмыслового олигомера вводят один раз в три недели.

22. Способ по п. 18, где конъюгат антисмыслового олигомера вводят ежемесячно.

23. Способ по любому из пп. 18-22, где конъюгат антисмыслового олигомера вводят в дозе примерно 30 мг/кг.

24. Способ по любому из пп. 18-22, где конъюгат антисмыслового олигомера вводят в дозе примерно 40 мг/кг.

25. Способ по любому из пп. 18-22, где конъюгат антисмыслового олигомера вводят в дозе примерно 60 мг/кг.

26. Способ по любому из пп. 18-22, где конъюгат антисмыслового олигомера вводят в дозе примерно 80 мг/кг.

27. Способ по любому из пп. 18-22, где конъюгат антисмыслового олигомера вводят в дозе примерно 160 мг/кг.

28. Способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (МДД) у субъекта, нуждающегося в этом, где субъект имеет мутацию гена дистрофина, которая может быть скорректирована при помощи пропуска экзона 53, при этом способ включает введение субъекту фармацевтической композиции по п. 12.

29. Способ восстановления рамки считывания мРНК для индукции продуцирования дистрофина у субъекта, имеющего мутацию гена дистрофина, которая может быть скорректирована при помощи пропуска экзона 53, при этом способ включает введение субъекту фармацевтической композиции по п. 12.

30. Способ исключения экзона 53 из пре-мРНК дистрофина в ходе процессинга мРНК у субъекта, имеющего мутацию гена дистрофина, которая может быть скорректирована при помощи пропуска экзона 53, при этом способ включает введение субъекту фармацевтической композиции по п. 12.

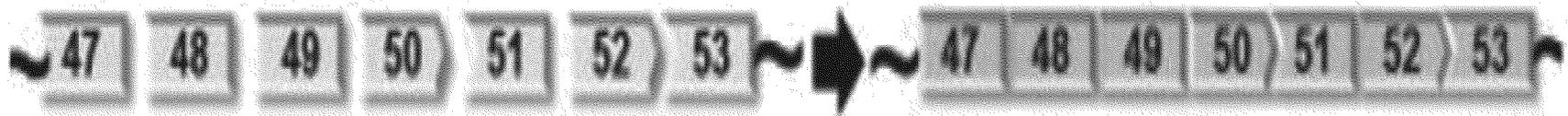
31. Способ связывания экзона 53 пре-мРНК дистрофина у субъекта, имеющего мутацию гена дистрофина, которая может быть скорректирована при помощи пропуска экзона 53, при этом способ включает введение субъекту фармацевтической композиции по п. 12.

По доверенности

Фигура 1

а) пре-мРНК нормального дистрофина

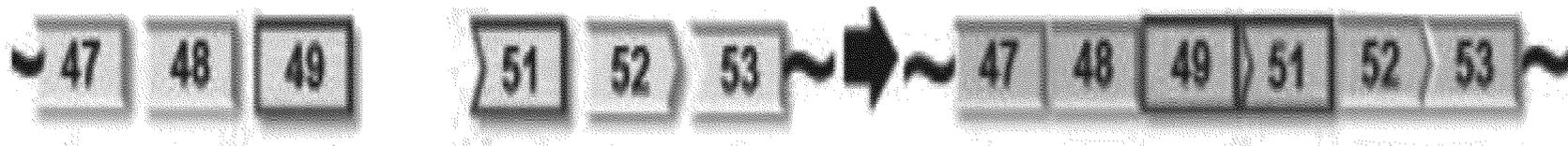
Зрелая мРНК нормального дистрофина



Фигура 2

b) Удаление экзона 50 нарушает рамку считывания

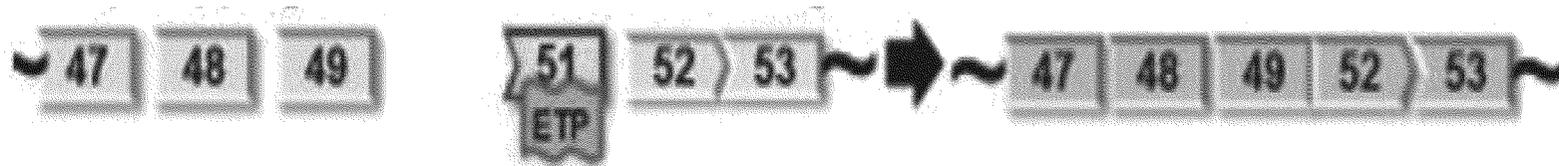
Нефункциональный, нестабильный дистрофин



Фигура 3

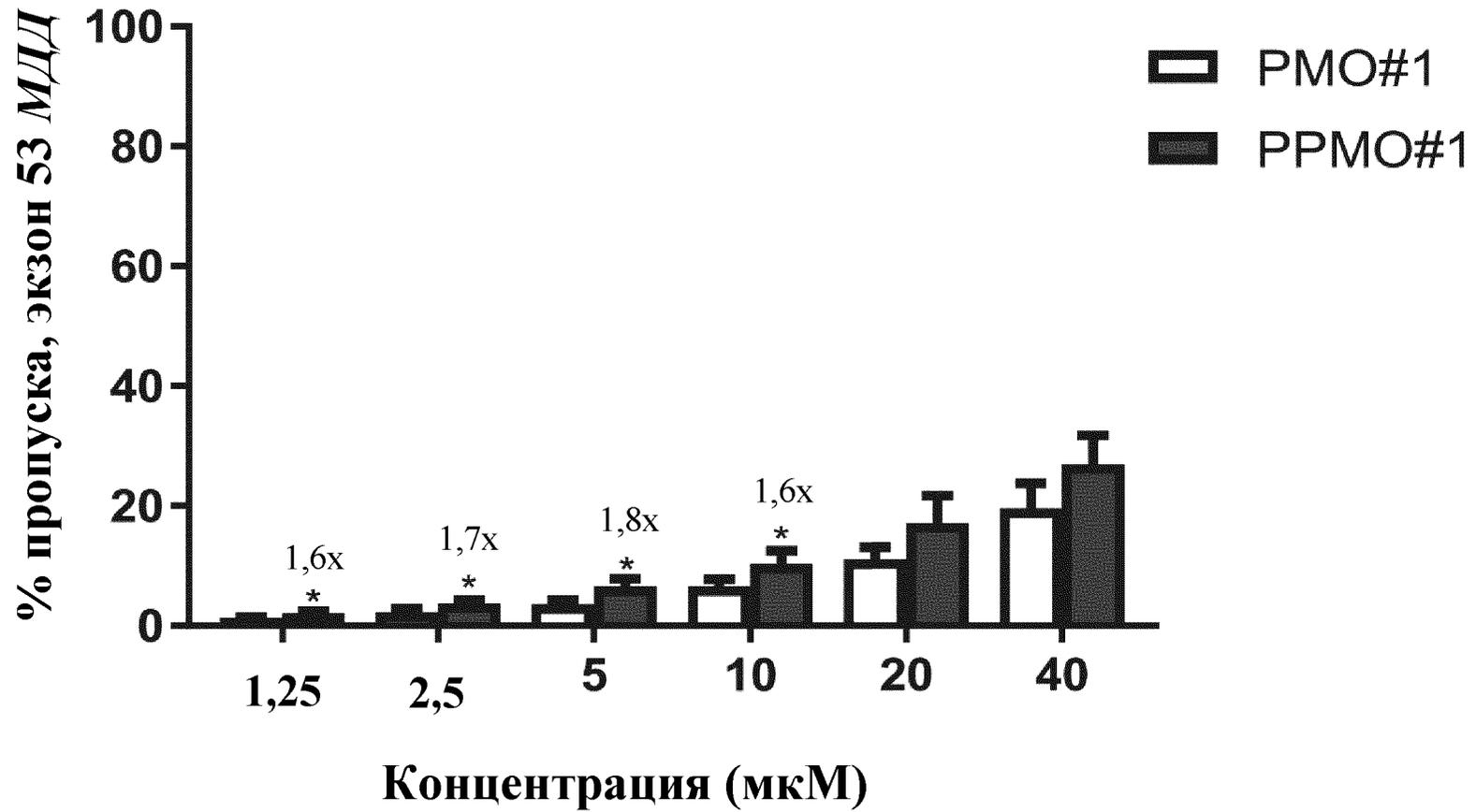
с) Пропуск экзона 51 восстанавливает  
рамку считывания

Дистрофин с  
внутренней делецией



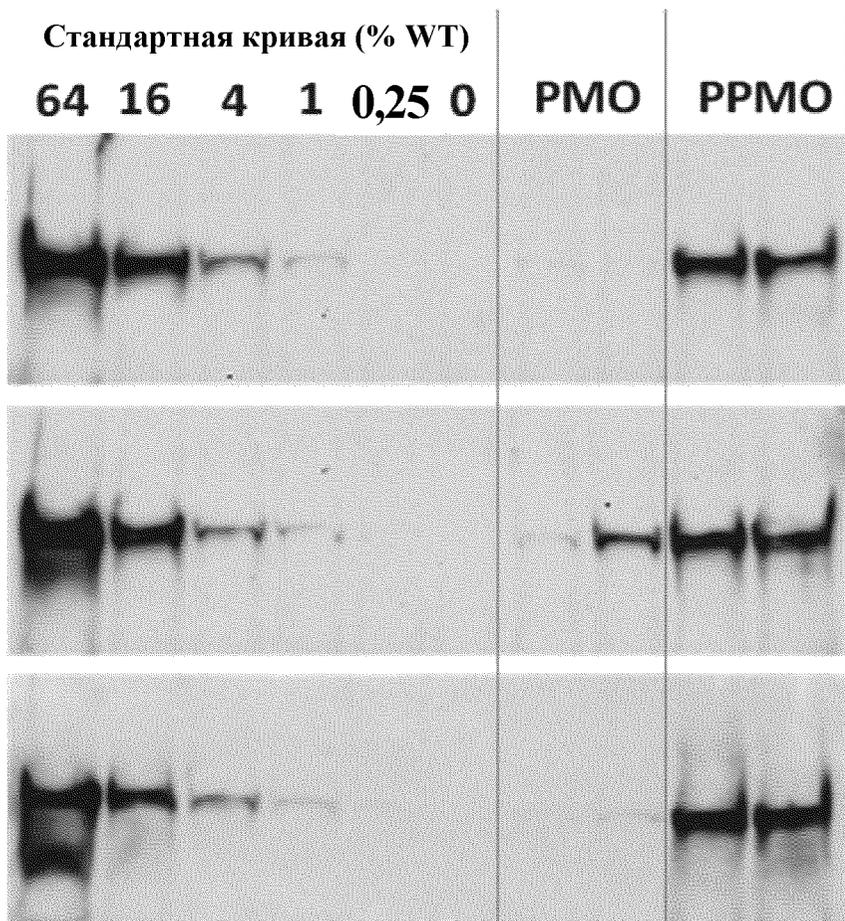
Источник: взято из Kole 2012

Фигура 4



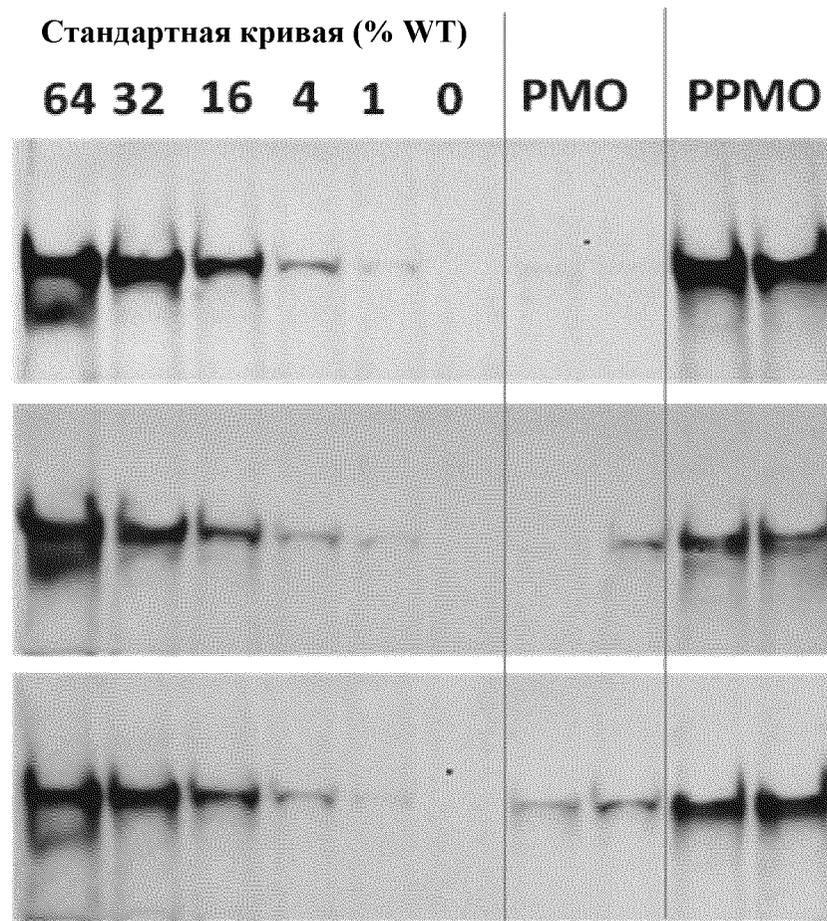
Фигура 5А

7 дней



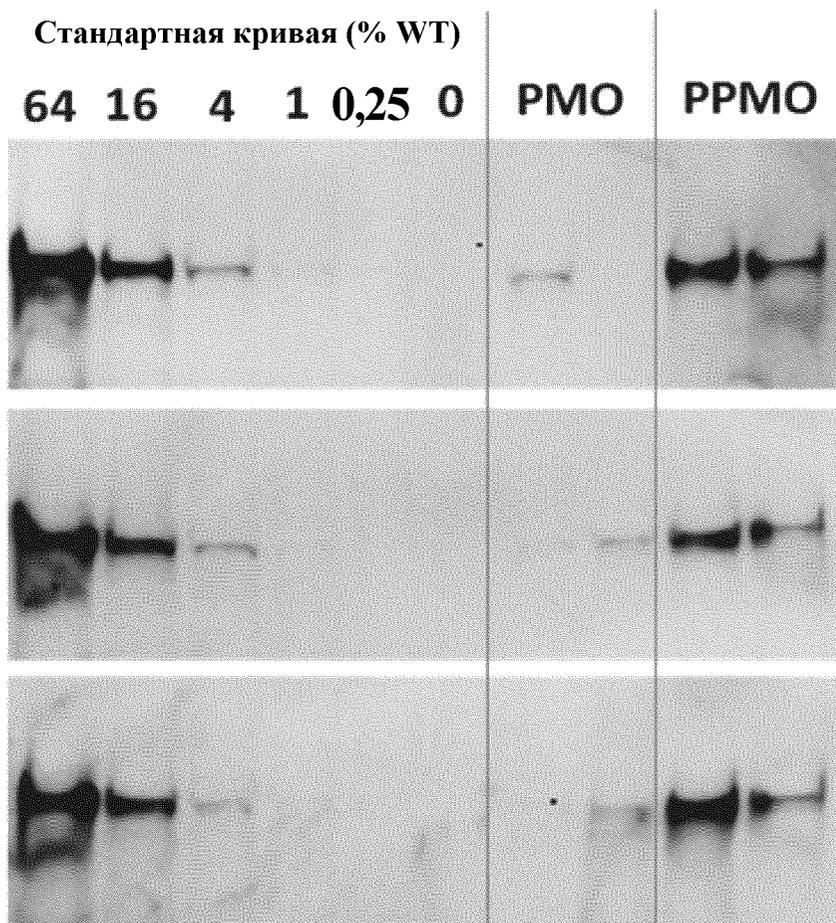
Фигура 5В

30 дней



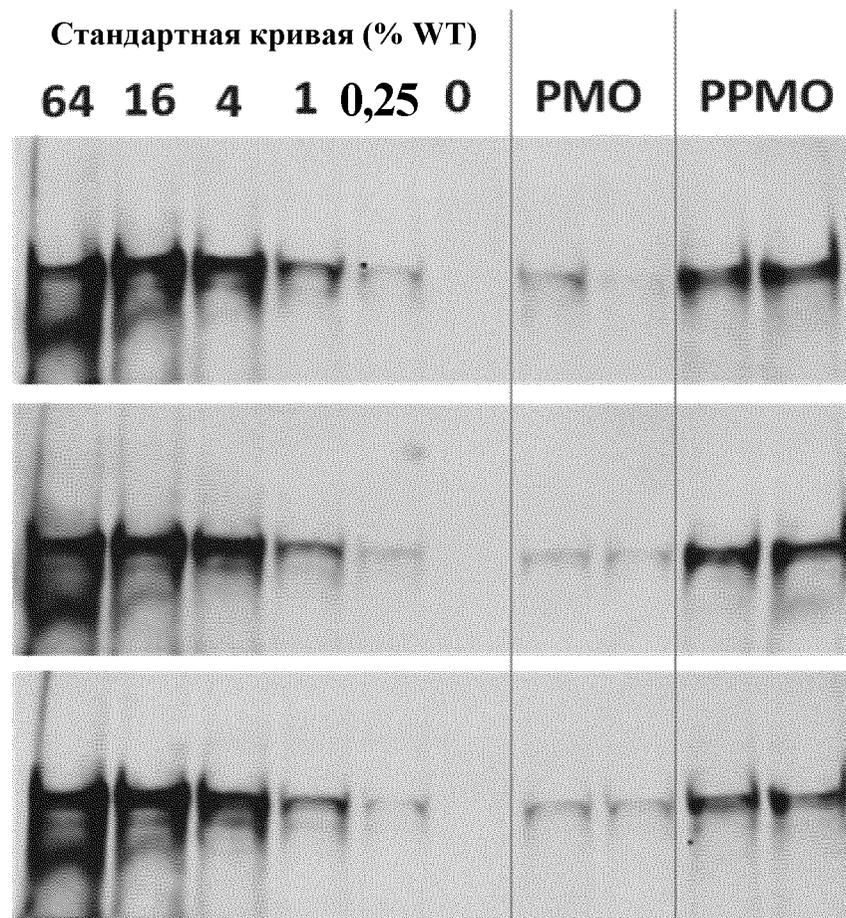
Фигура 5С

60 дней

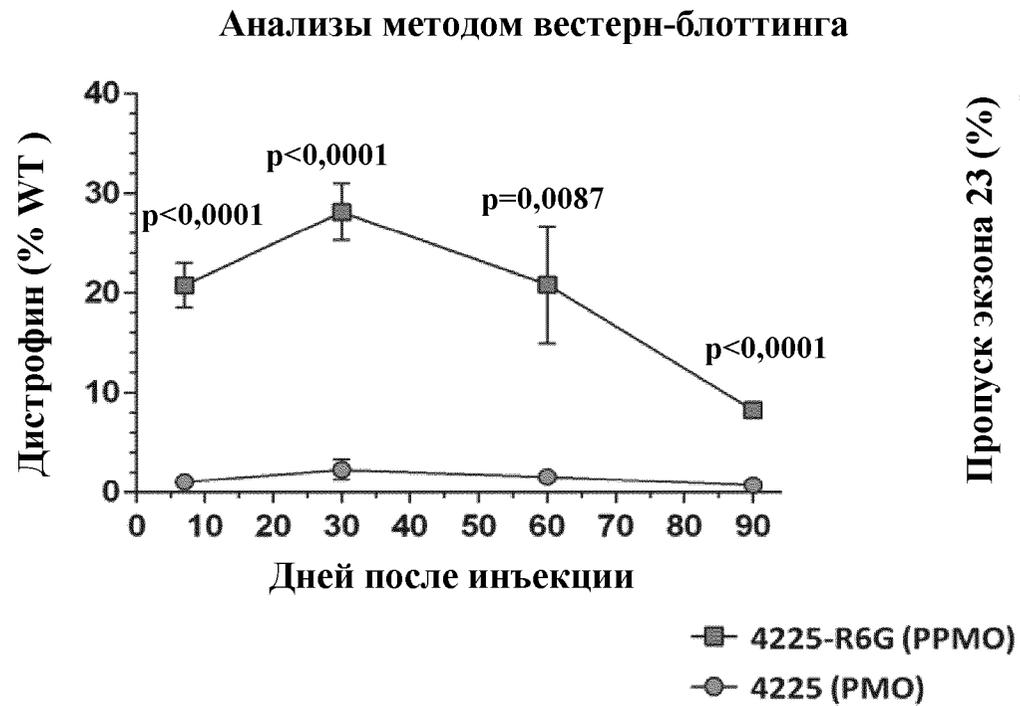


Фигура 5D

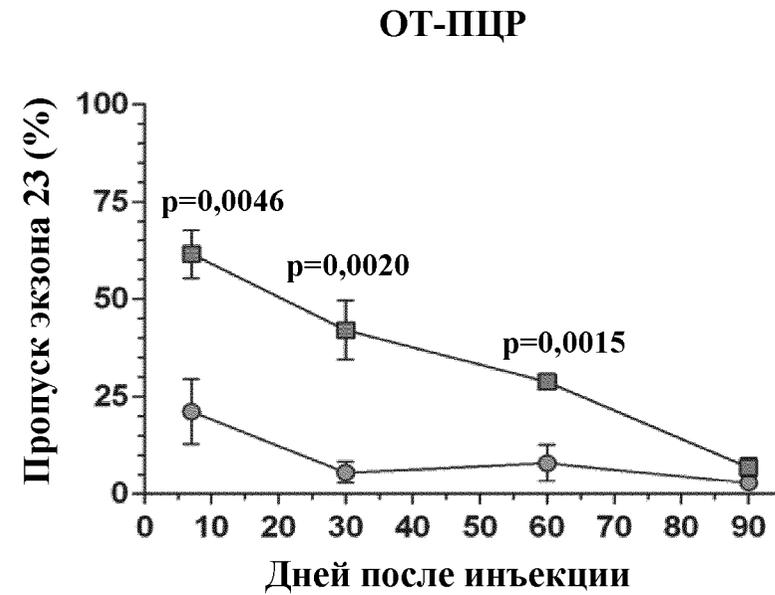
90 дней



Фигура 6А

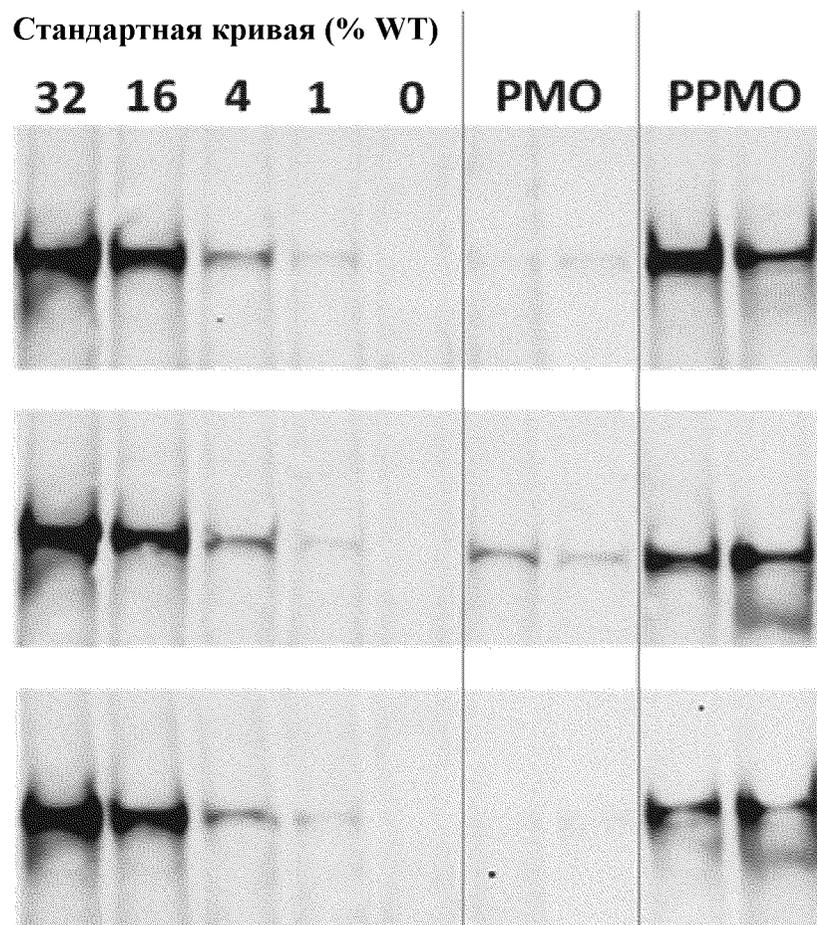


Фигура 6В



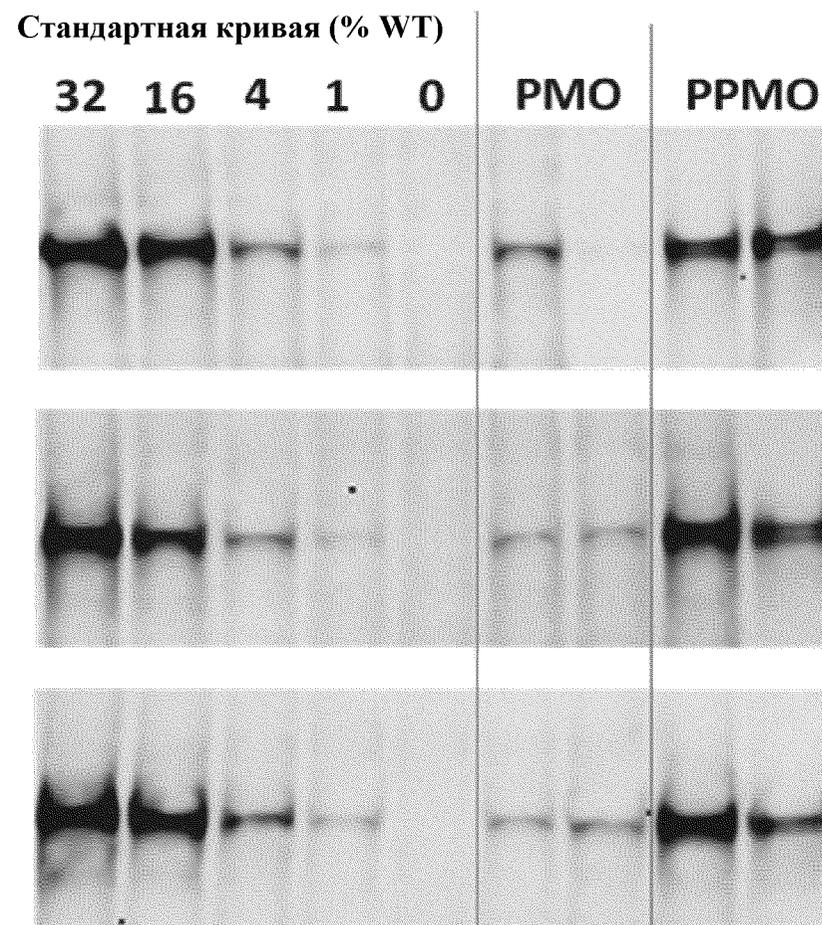
Фигура 7А

7 дней



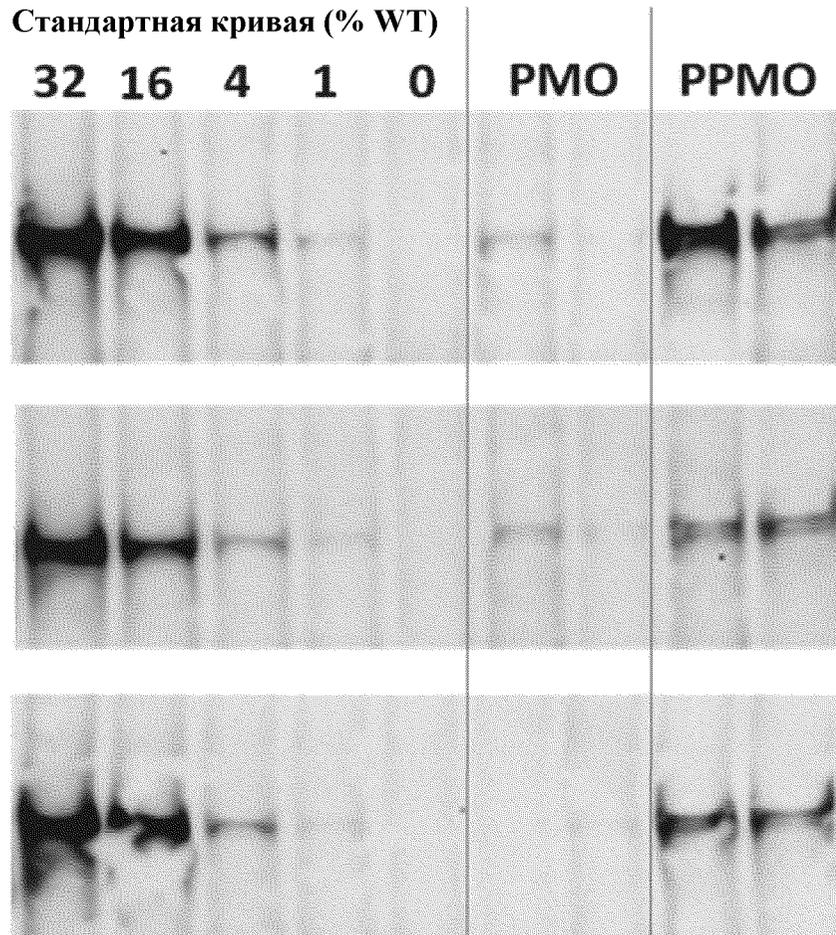
Фигура 7В

30 дней



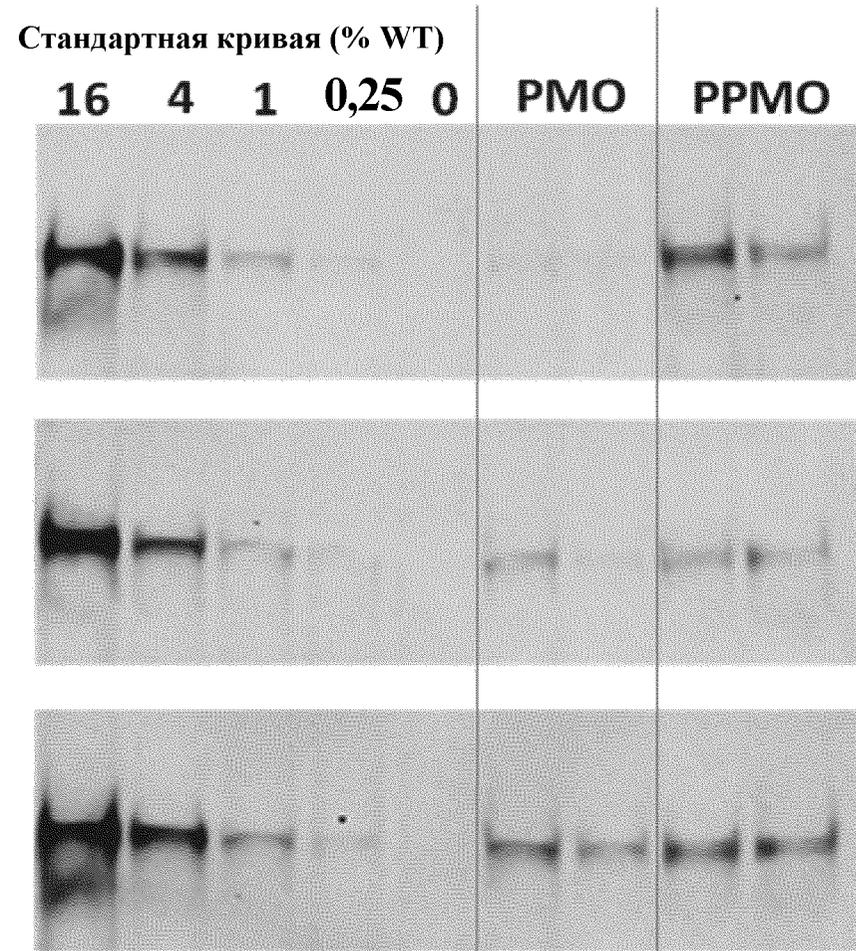
Фигура 7С

60 дней

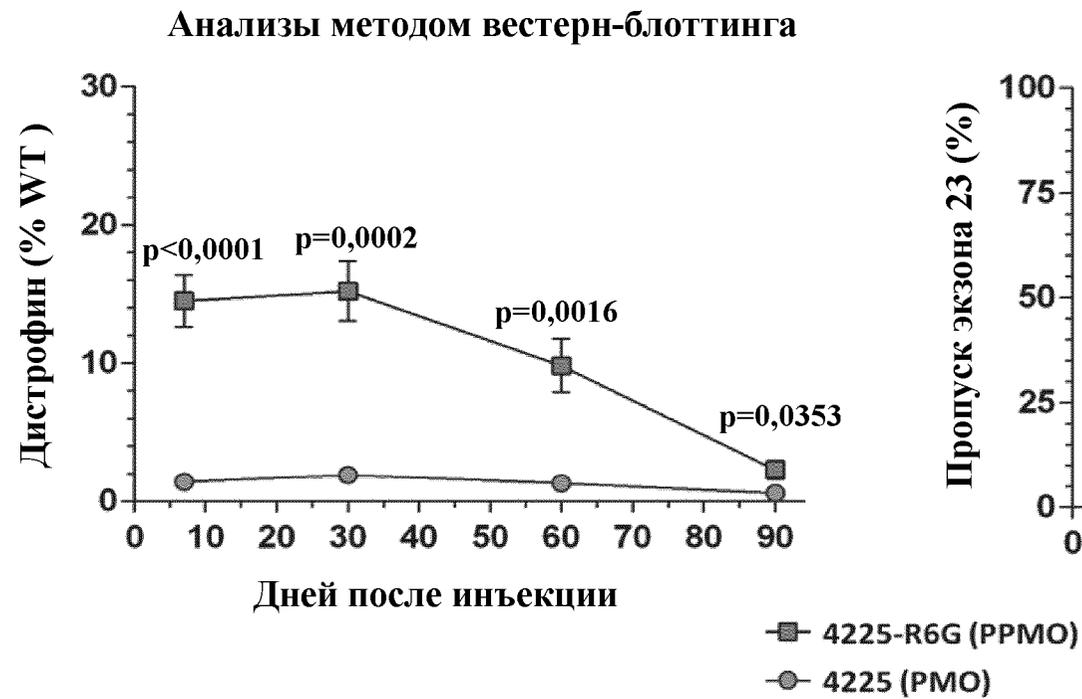


Фигура 7D

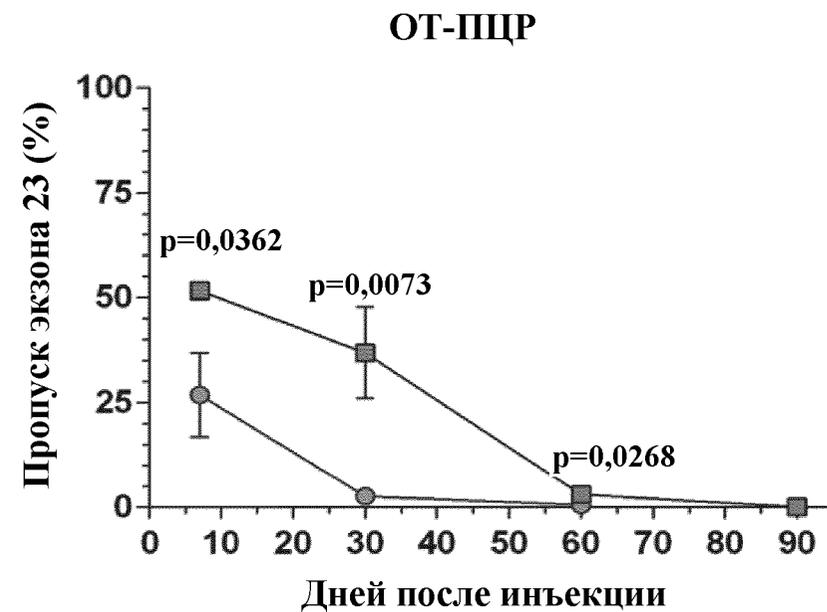
90 дней



Фигура 8А

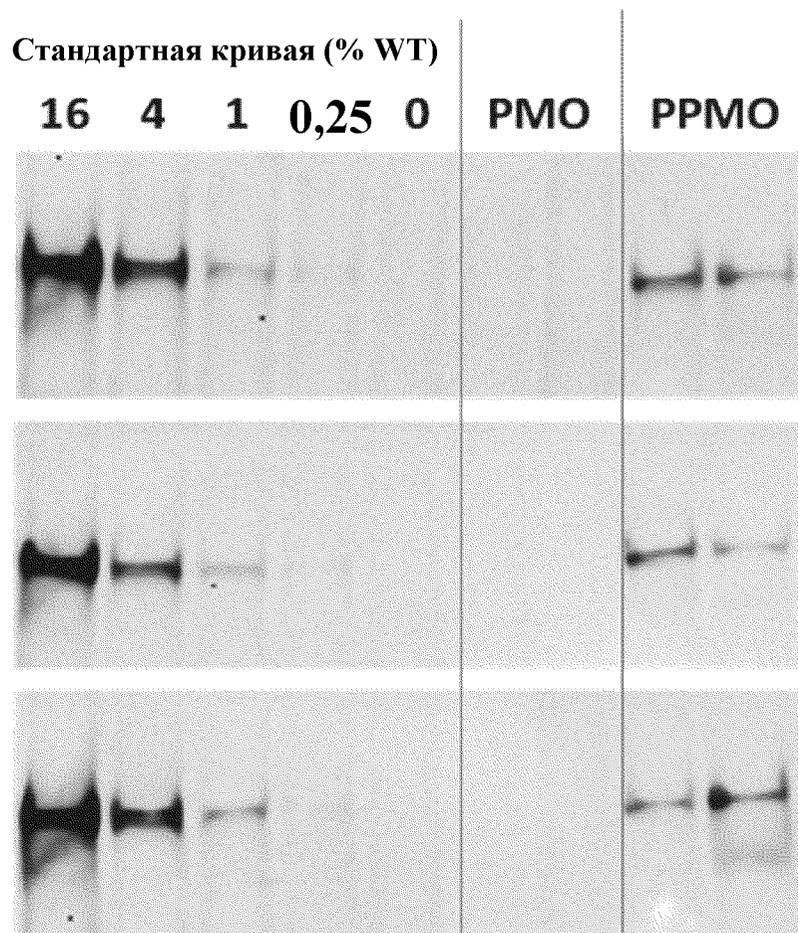


Фигура 8В



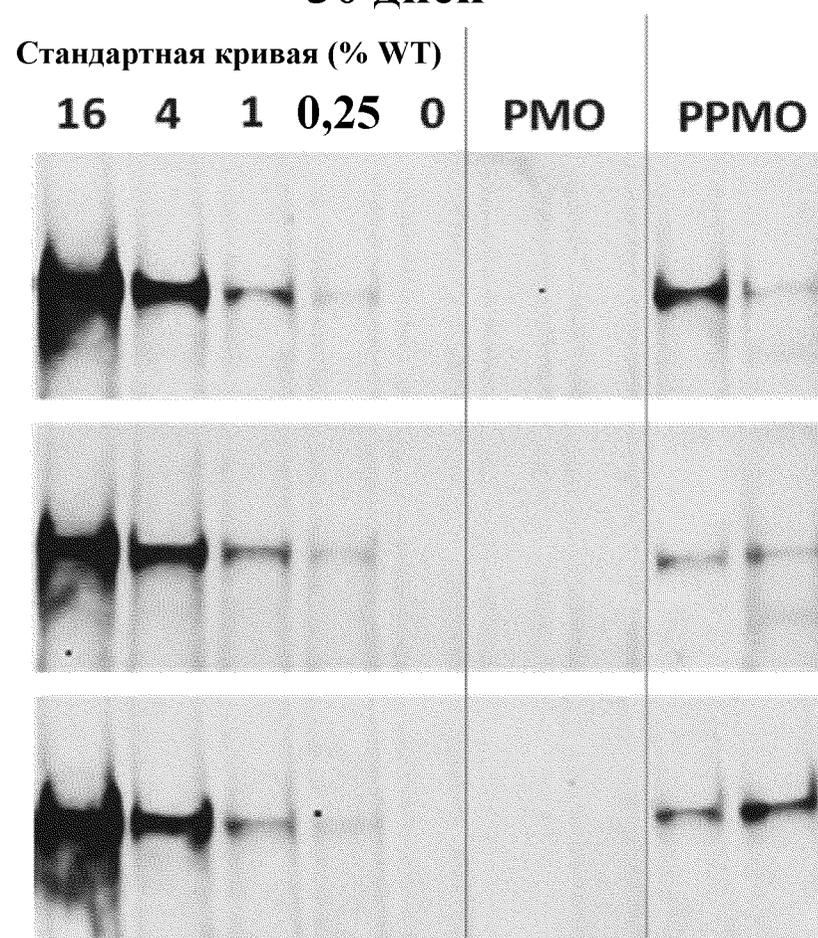
Фигура 9А

7 дней



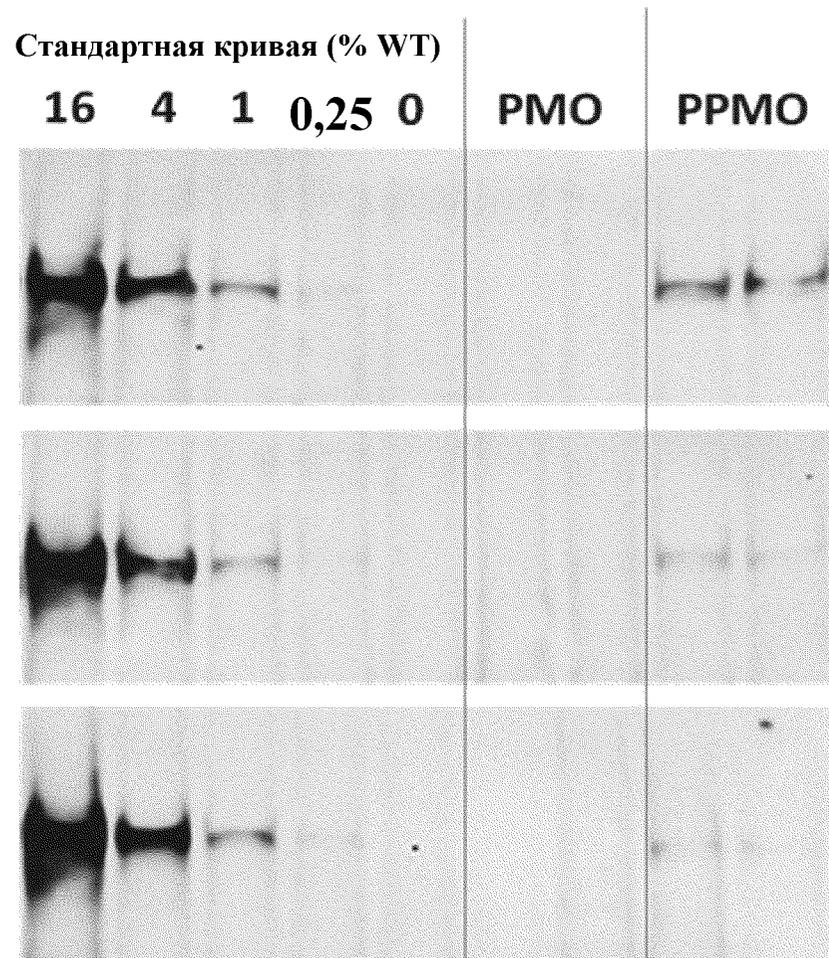
Фигура 9В

30 дней



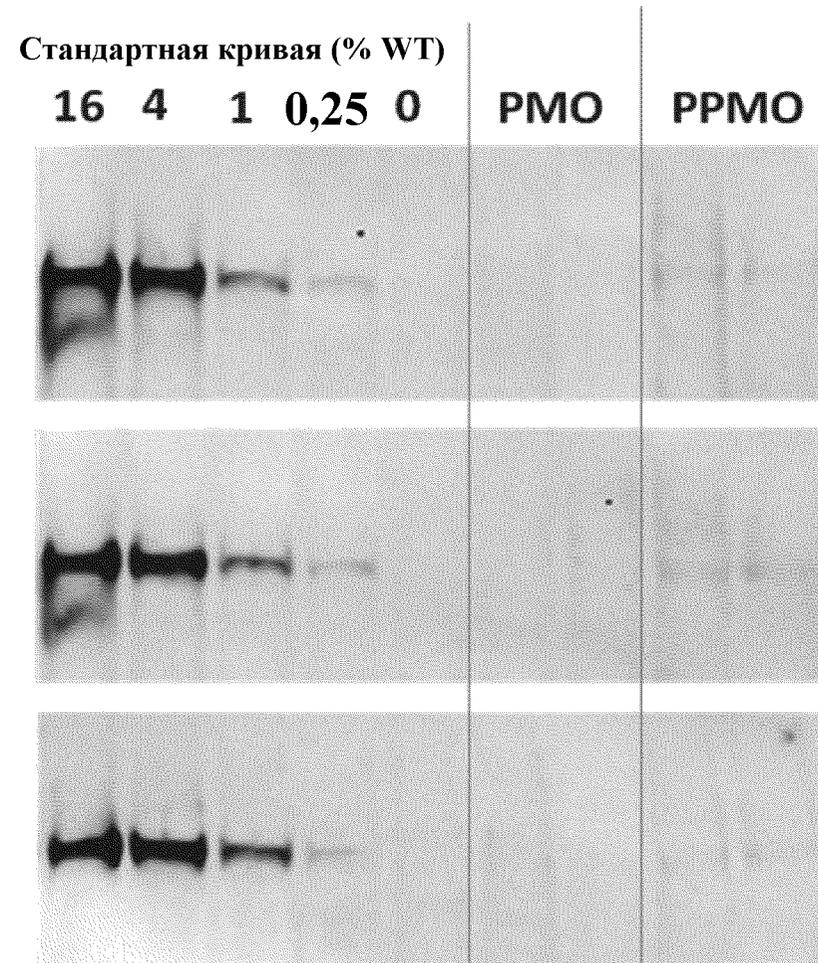
Фигура 9С

**60 дней**

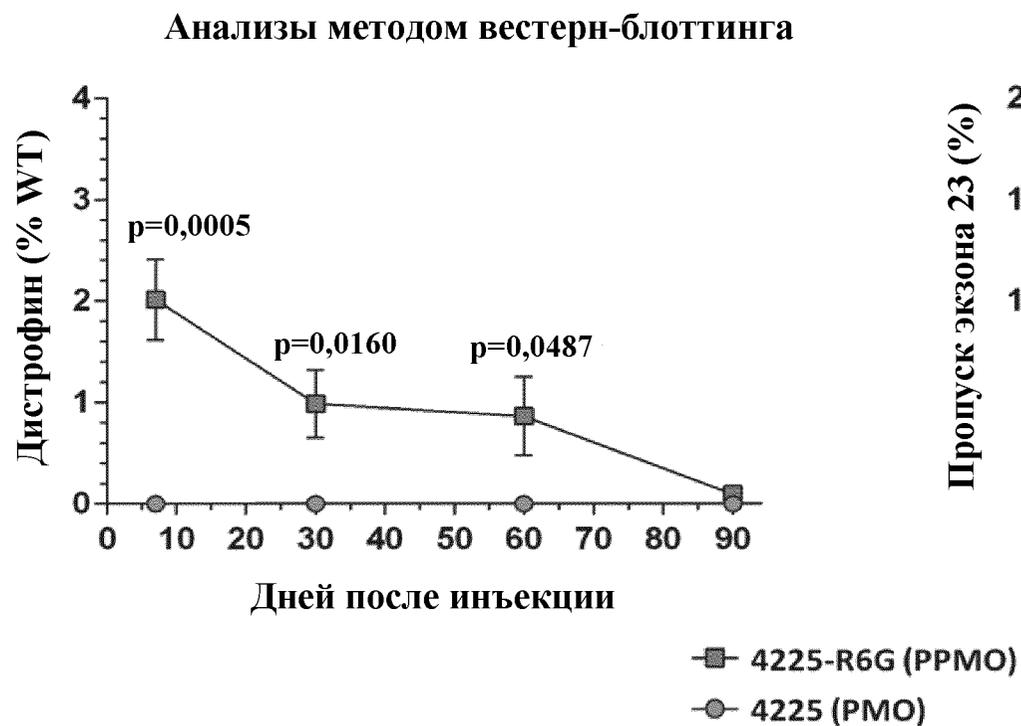


Фигура 9D

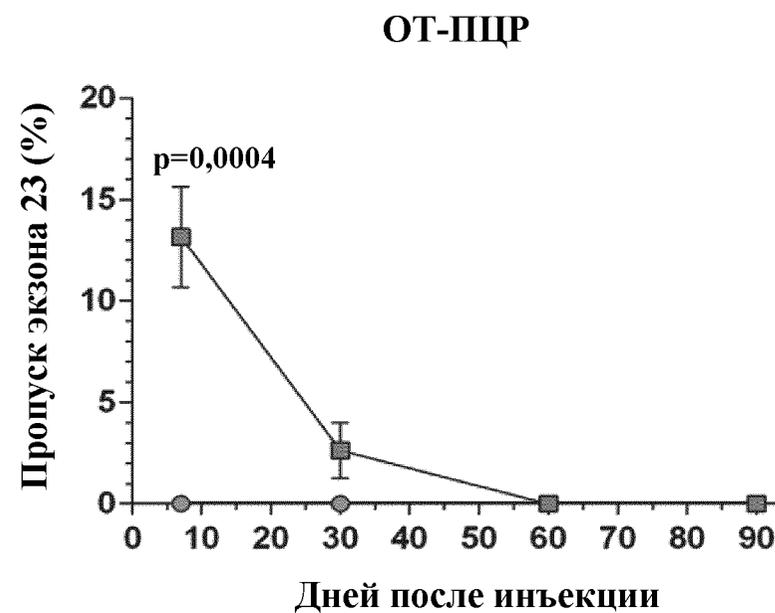
**90 дней**



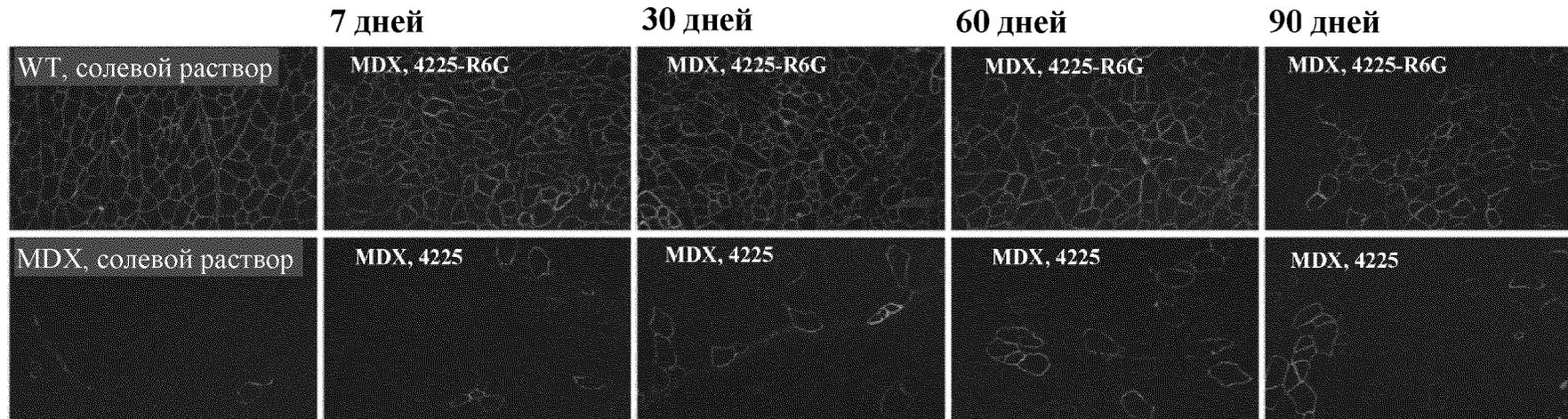
Фигура 10А



Фигура 10В

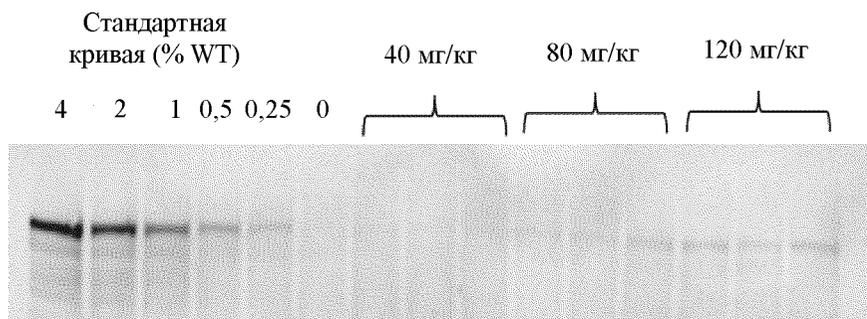


Фигура 11



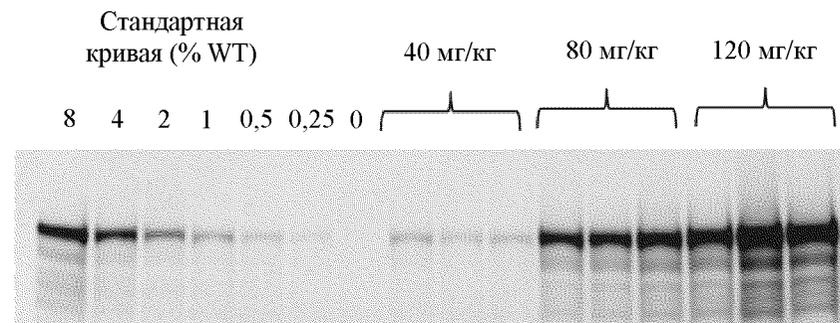
Фигура 12А

Сердце - РМО

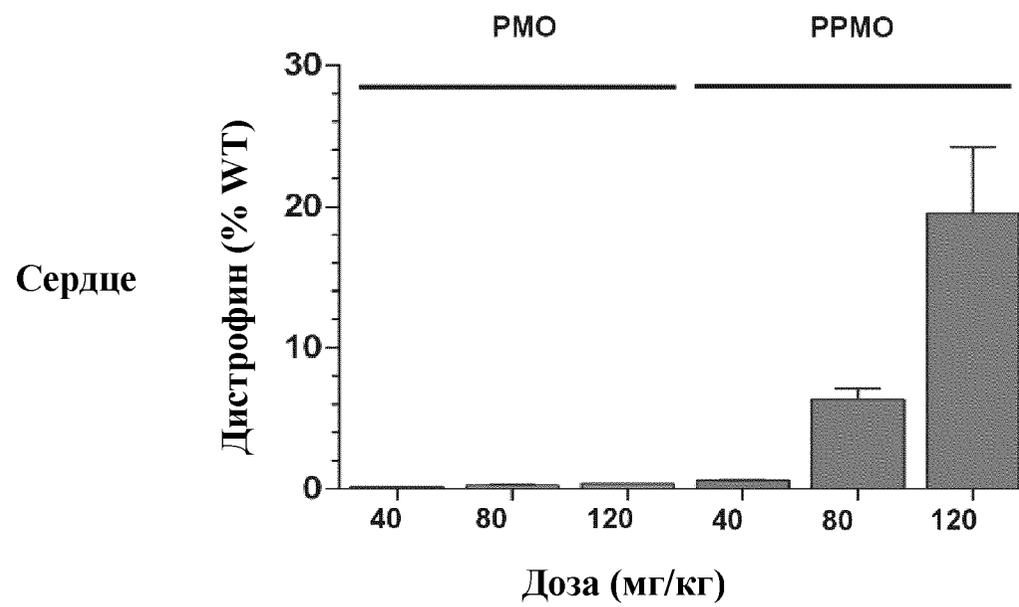


Фигура 12В

Сердце - РРМО

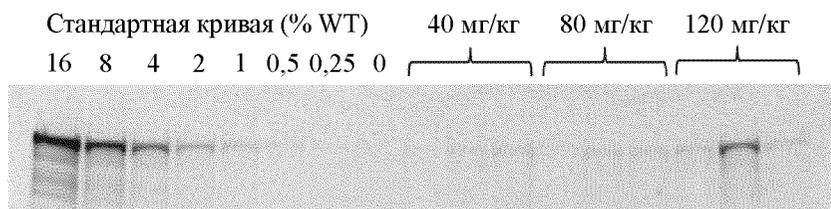


Фигура 13



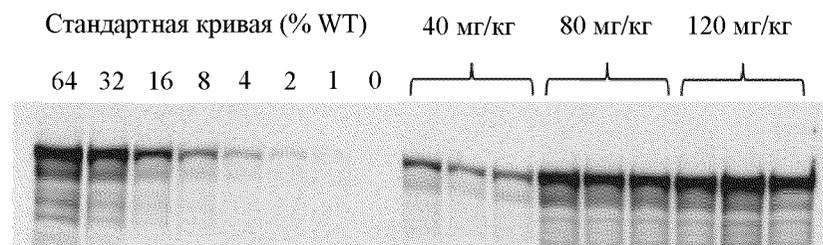
Фигура 14А

Диафрагма - РМО

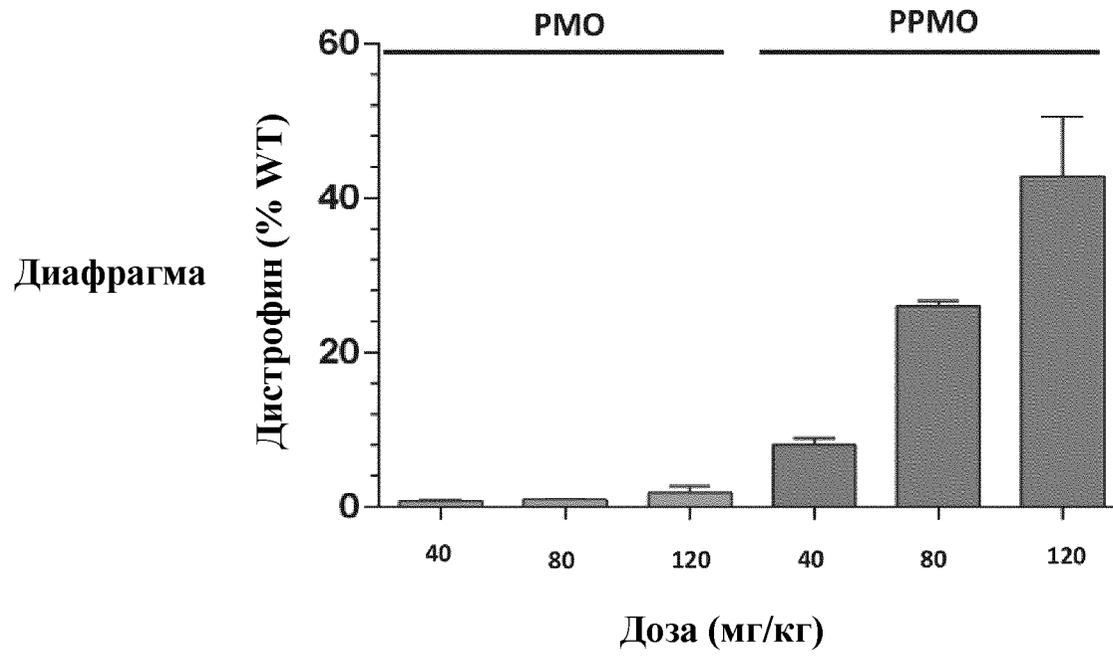


Фигура 14В

Диафрагма - РРМО

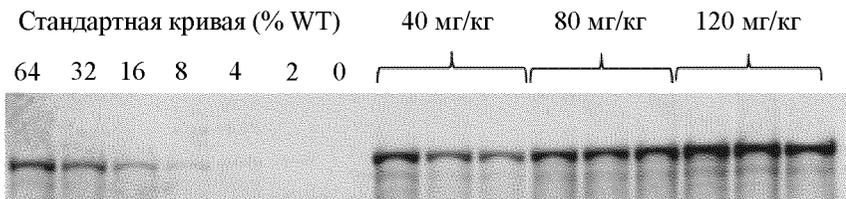


Фигура 15



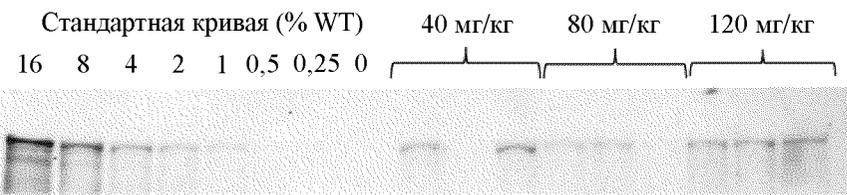
Фигура 16А

**Четырехглавая мышца - РРМО**



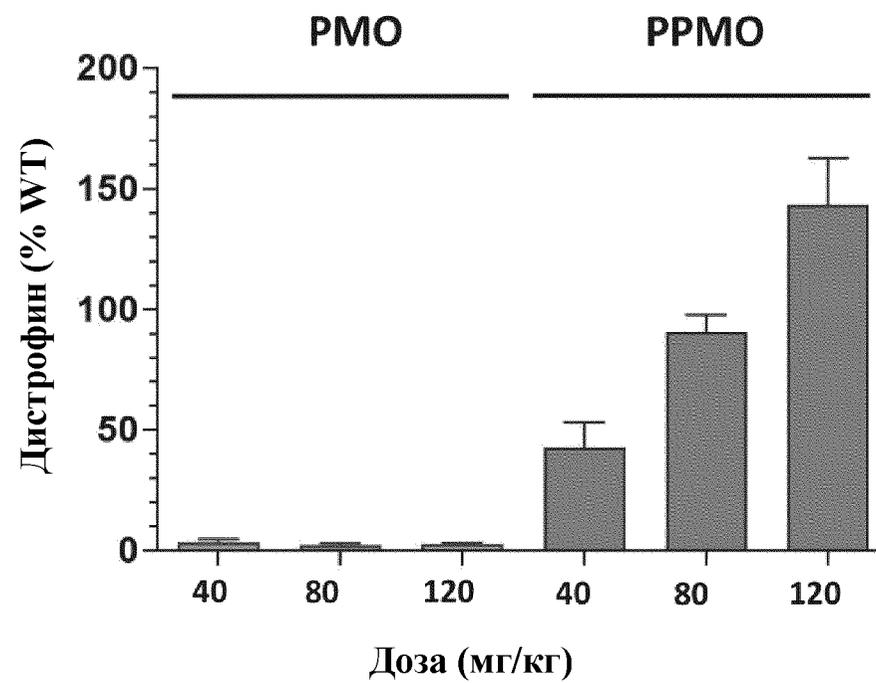
Фигура 16В

**Четырехглавая мышца - РМО**



Фигура 17

Четырехглавая мышца



20/34

№ цикла: субъединица (SU)	Обработка перед присоединением				Цикл присоединения		Обработка после присоединения	
	1	2	3	4			1	2
	Промывка 30% ТФЭ/ ДХМ	Раствор ЦПТФА <sup>1</sup>	Нейтрали- зующий раствор	Промывка ДХМ	Количество SU (г) НЭМ (л) ДМИ (л)	ОТ, время присое- динения (ч.)	Промывка ДХМ	Промывка 30% ТФЭ/ ДХМ
1:ДПГ	5,5 л	а) 5,5 л б) 5,5 л 122 мл	3×5,5 л	5,5 л	536,7 г; 195 мл НЭМ; 3,2 л ДМИ	5	5,5 л	2×5,5 л
2:Т	7,0 л	а) 7 л б) 7 л 158 мл	3×7 л	2×7 л	468,2 г; и 195 мл НЭМ; 3,2 л ДМИ	4,25	7 л	2×7 л
3:Т	8 л	а) 8 л б) 8 л 182 мл	3×8 л	2×8 л	536,7 г; 195 мл НЭМ; 3,4 л ДМИ	4,25	8 л	2×8 л
4:ДПГ	9 л	а) 9 л б) 9 л 206 мл	3×9 л	2×9 л	536,7 г; 195 мл НЭМ; 3,6 л ДМИ	4,25	9 л	2×9 л
5:С	9,5 л	а) 9,5 л б) 9,5 л 220 мл	3×9,5 л	2×9,5 л	555,2 г; 195 мл НЭМ; 3,4 л ДМИ	4,25	9,5 л	2×9,5 л
6:С	10 л	а) 10 л б) 10 л 232 мл	3×10 л	2×10 л	555,2 г; 195 мл НЭМ; 3,45 л ДМИ	4,25	10 л	2×10 л
7:Т	11 л	а) 11 л б) 11 л 256 мл	3×11 л	2×11 л	536,7 г; 195 мл НЭМ; 3,57 л ДМИ	4,25	11 л	2×11 л
8:С	11 л	а) 11 л б) 11 л 256 мл	3×11 л	2×11 л	555,2 г; 195 мл НЭМ; 3,64 л ДМИ	4,25	11 л	2×11 л

<sup>1</sup> значение в мл указывает на количество 1:1 НЭМ/ДХМ

Фигура 18

№ цикла: субъеди- ница (SU)	Обработка перед присоединением				Цикл присоединения		Обработка после присоединения	
	1	2	3	4			1	2
	Промывка 30% ТФЭ/ ДХМ	Раствор ЦПТФА <sup>1</sup>	Нейтрали- зующий раствор	Промывка ДХМ	Количество SU (г) НЭМ (л) ДМИ (л)	ОТ, время присое- динения (ч.)	Промывка ДХМ	Промывка 30% ТФЭ/ ДХМ
9:С	11,5 л	а) 11,5 л б) 11,5 л 268 мл	3×11,5 л	2×11,5 л	468,2 г; 195 мл НЭМ; 3,72 л ДМИ	4,25	11,5 л	2×11,5 л
10:ДПП	12 л	а) 12 л б) 12 л 280 мл	3×12 л	2×12 л	536,7 г; 195 мл НЭМ; 3,96 л ДМИ	4,25	12 л	2×12 л
11:ДПП	13,5 л	а) 13,5 л б) 13,5 л 204 мл	3×13,5 л	2×13,5 л	721,7 г; 253 мл НЭМ; 4,02 л ДМИ	4,25	13,5 л	2×13,5 л
12:Т	13,5 л	а) 13,5 л б) 13,5 л 204 мл	3×13,5 л	2×13,5 л	721,7 г; 253 мл НЭМ; 4,02 л ДМИ	4,25	13,5 л	2×13,5 л
13:Т	14 л	а) 14 л б) 14 л 216 мл	3×14 л	2×14 л	941,9 г; 253 мл НЭМ; 4,02 л ДМИ	4,25	14 л	2×14 л
14:С	14,5 л	а) 14,5 л б) 14,5 л 228 мл	3×14,5 л	2×14,5 л	941,9 г; 253 мл НЭМ; 4,1 л ДМИ	4,25	14,5 л	2×14,5 л
15:Т	15,5 л	а) 15,5 л б) 15,5 л 254 мл	3×15,5 л	2×15,5 л	721,7 г; 253 мл НЭМ; 4,26 л ДМИ	4,25	15,5 л	2×15,5 л
16:ДПП	15,5 л	а) 15,5 л б) 15,5 л 254 мл	3×15,5 л	2×15,5 л	721,7 г; 253 мл НЭМ; 4,26 л ДМИ	4,25	15,5 л	2×15,5 л

Фигура 18 (продолжение)

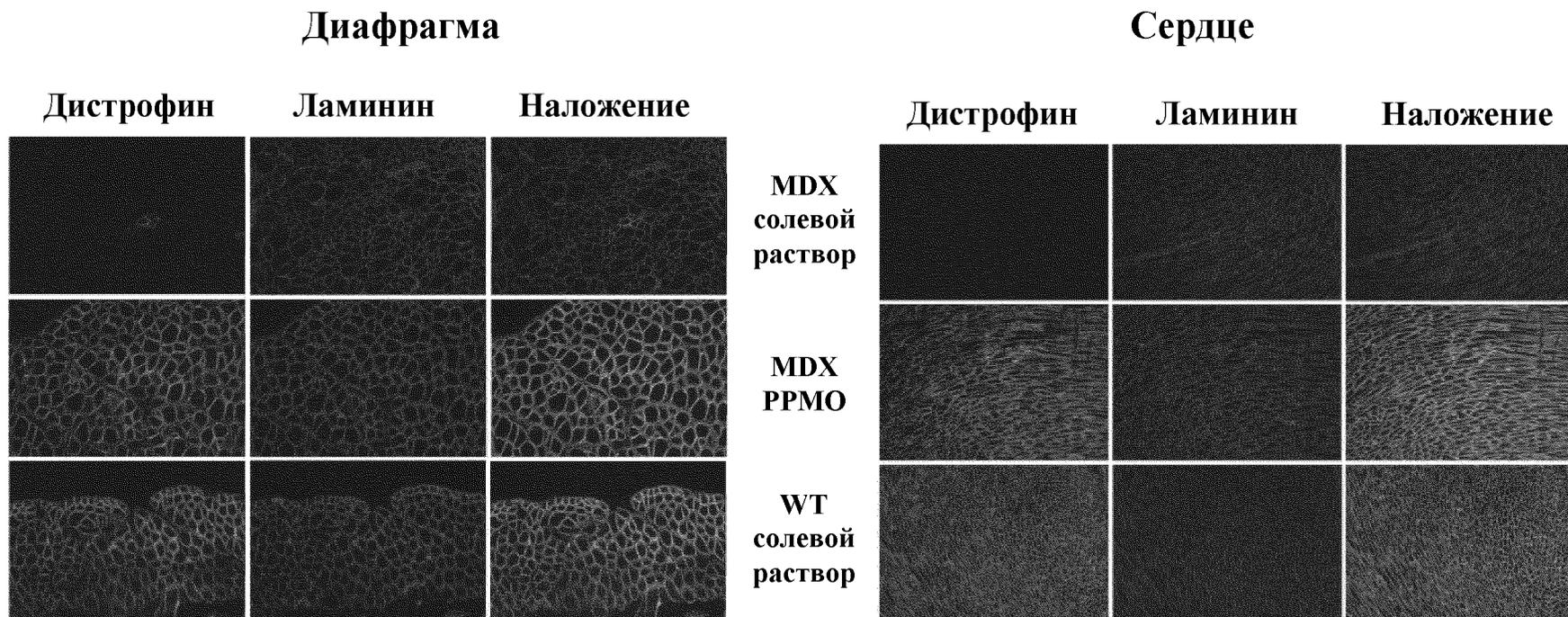
№ цикла: субъединица (SU)	Обработка перед присоединением				Цикл присоединения		Обработка после присоединения	
	1	2	3	4			1	2
	Промывка 30% ТФЭ/ДХМ	Раствор ЦПТФА <sup>1</sup>	Нейтрализующий раствор	Промывка ДХМ	Количество SU (г) НЭМ (л) ДМИ (л)	ОТ, время присоединения (ч.)	Промывка ДХМ	Промывка 30% ТФЭ/ДХМ
17:А	16 л	а) 16 л б) 16 л 366 мл	3×16 л	2×16 л	941,9 г; 253 мл НЭМ; 4,4 л ДМИ	4,75	16 л	2×16 л
18:А	16,5 л	а) 16,5 л б) 16,5 л 378 мл	3×16,5 л	2×16,5 л	721,7 г; 253 мл НЭМ; 4,4 л ДМИ	4,25	16,5 л	2×16,5 л
19:ДПП	16,5 л	а) 16,5 л б) 16,5 л 378 мл	3×16,5 л	2×16,5 л	608,7 г; 253 мл НЭМ; 4,57 л ДМИ	4,25	16,5 л	2×16,5 л
20:ДПП	17 л	а) 17 л б) 17 л 390 мл	3×17 л	2×17 л	941,9 г; 253 мл НЭМ; 4,57 л ДМИ	4,75	17 л	2×17 л
21:Т	17 л	а) 17 л б) 17 л 390 мл	3×17 л	2×17 л	1159,2 г; 311 мл НЭМ; 4,72 л ДМИ	4,25	17 л	2×17 л
22:ДПП	17,5 л	а) 17,5 л б) 17,5 л 402 мл	3×17,5 л	2×17,5 л	858,7 г; 311 мл НЭМ; 4,72 л ДМИ	4,75	17,5 л	2×17,5 л
23:Т	17,5 л	а) 17,5 л б) 17,5 л 402 мл	3×17,5 л	2×17,5 л	888,3 г; 311 мл НЭМ; 4,88 л ДМИ	4,25	17,5 л	2×17,5 л
24:Т	18 л	а) 18 л б) 18 л 414 мл	3×18 л	2×18 л	749,1 г; 311 мл НЭМ; 4,95 л ДМИ	4,25	18 л	2×18 л

Фигура 18 (продолжение)

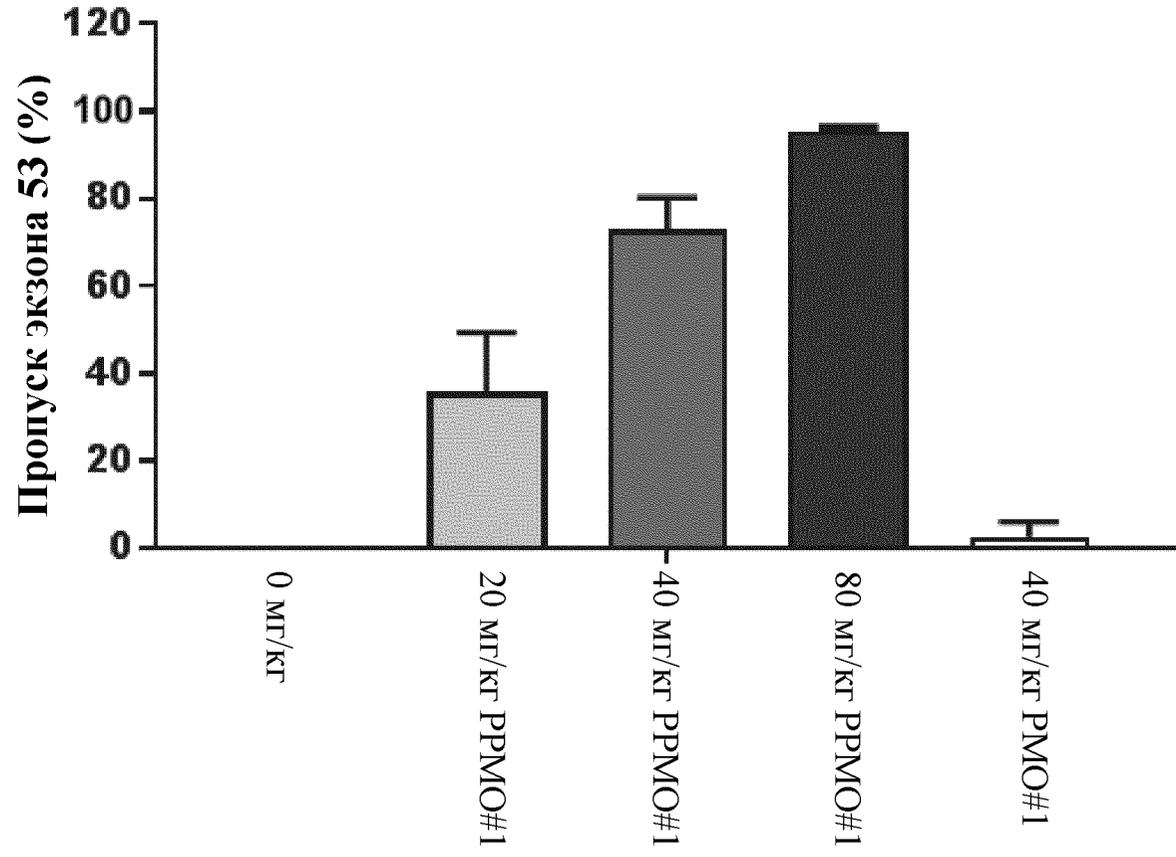
№ цикла: субъединица (SU)	Обработка перед присоединением				Цикл присоединения		Обработка после присоединения	
	1	2	3	4			1	2
	Промывка 30% ТФЭ/ ДХМ	Раствор ЦПТФА <sup>1</sup>	Нейтрали- зующий раствор	Промывка ДХМ	Количество SU (г) НЭМ (л) ДМИ (л)	ОТ, время присое- динения (ч.)	Промывка ДХМ	Промывка 30% ТФЭ/ ДХМ
25:С	18 л	а) 18 л б) 18 л 414 мл	3×18 л	2×18 л	749,1 г; 311 мл НЭМ; 5,1 л ДМИ	4,25	18 л	2×18 л

Фигура 18 (продолжение)

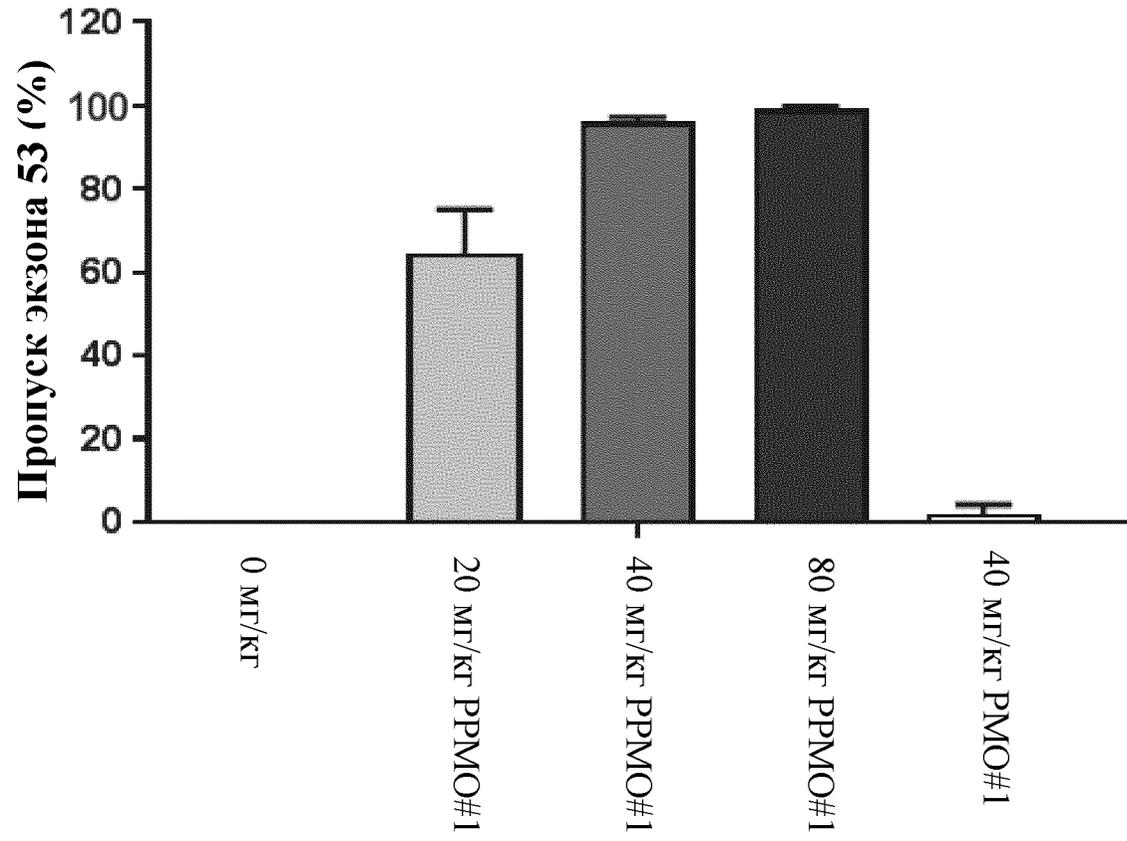
Фигура 19



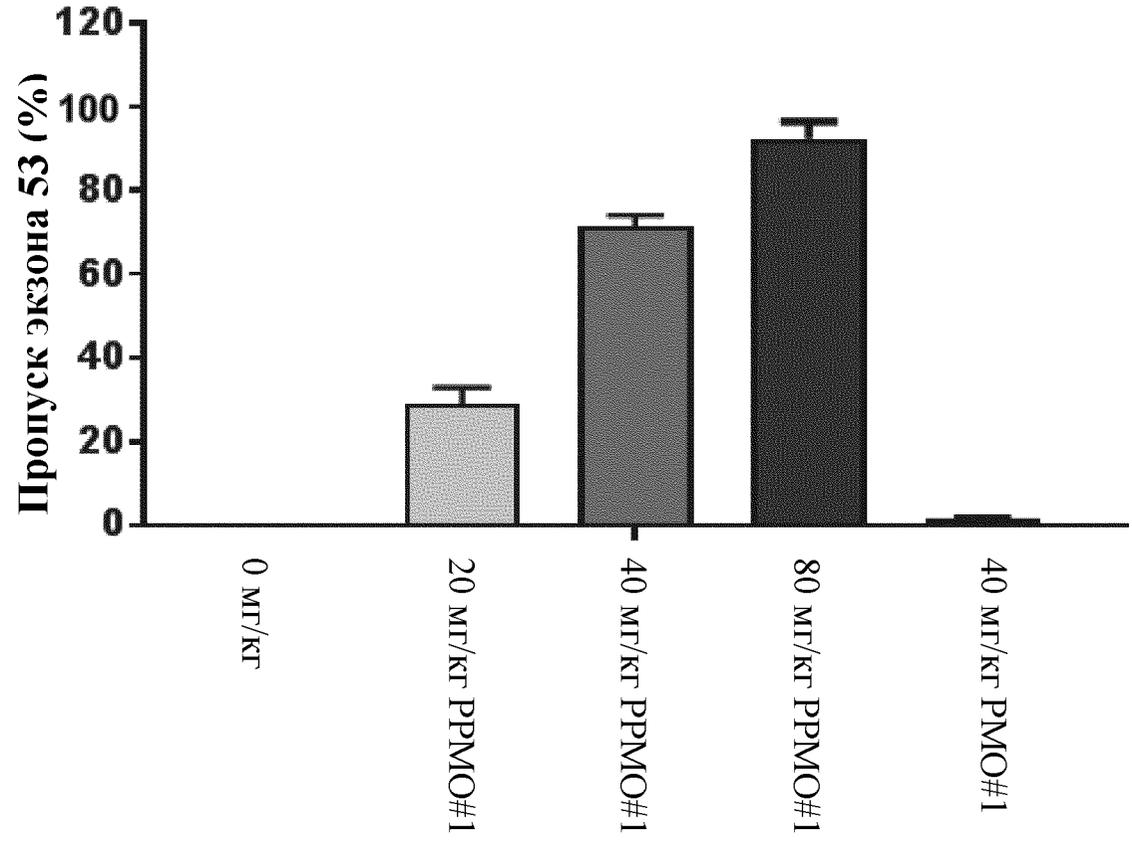
Фигура 20



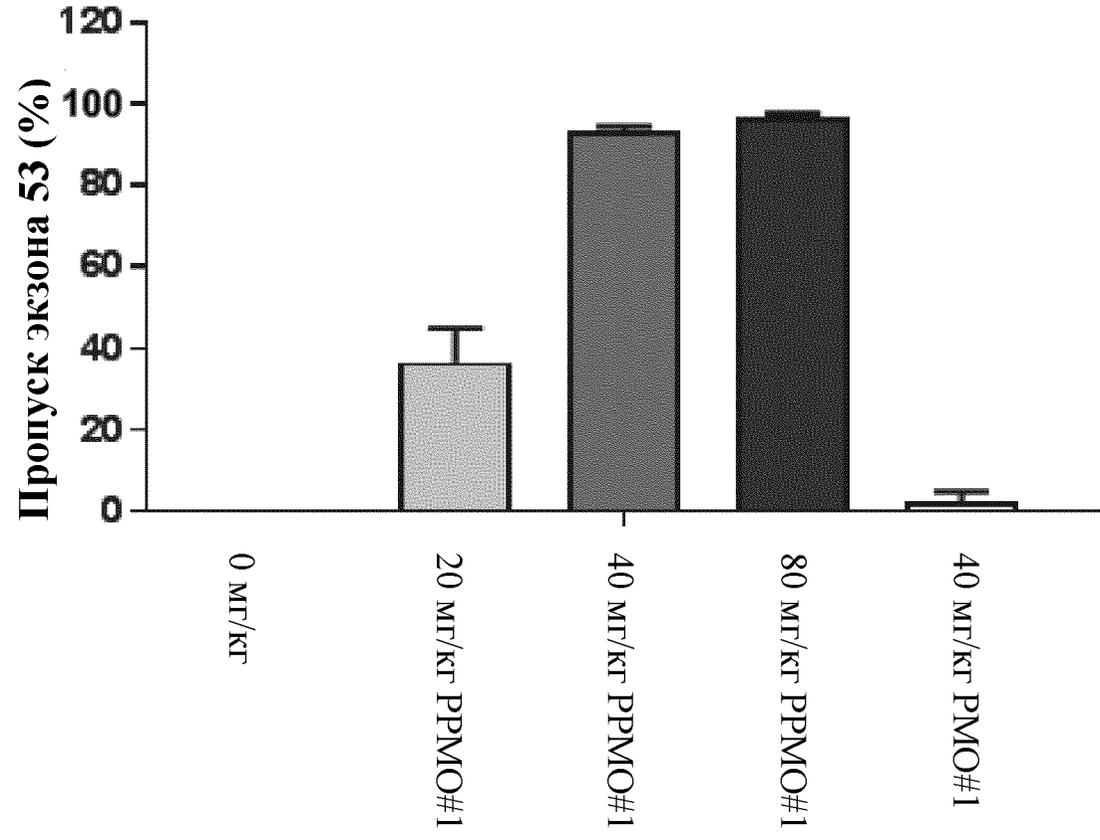
Фигура 21



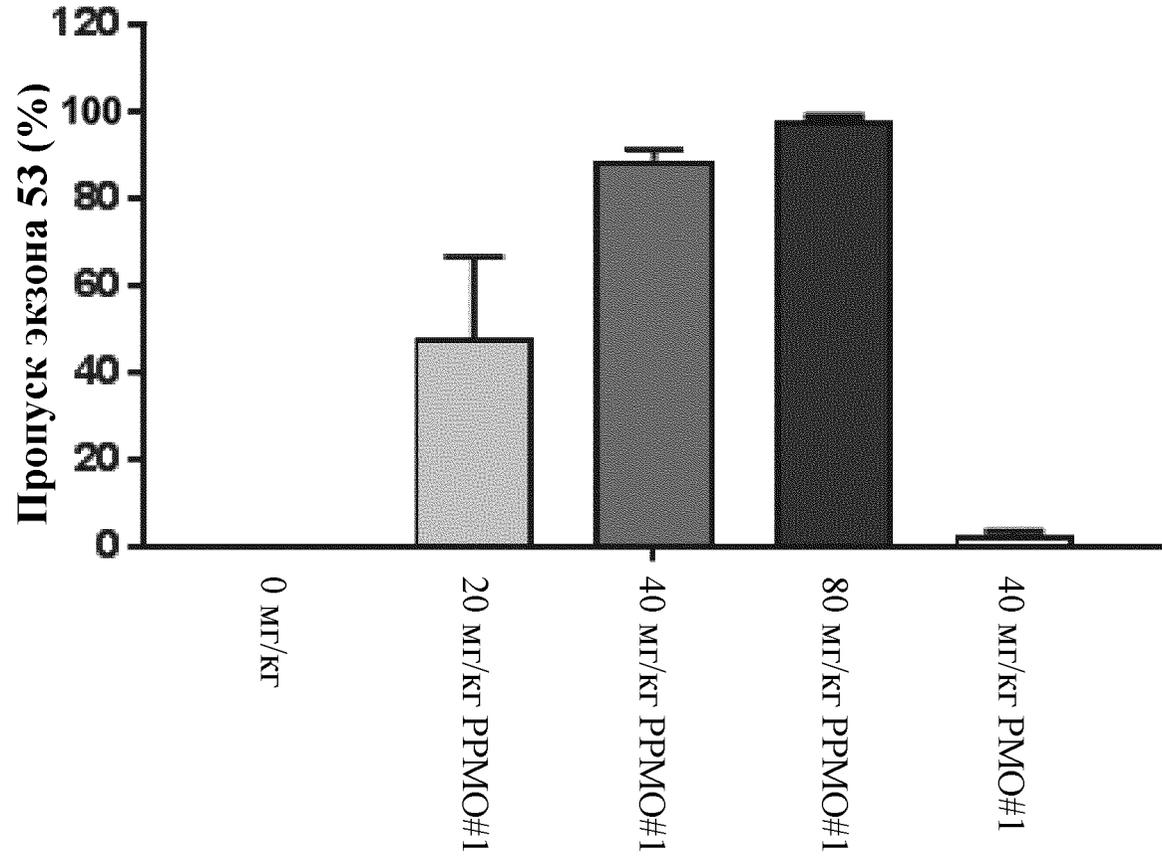
Фигура 22



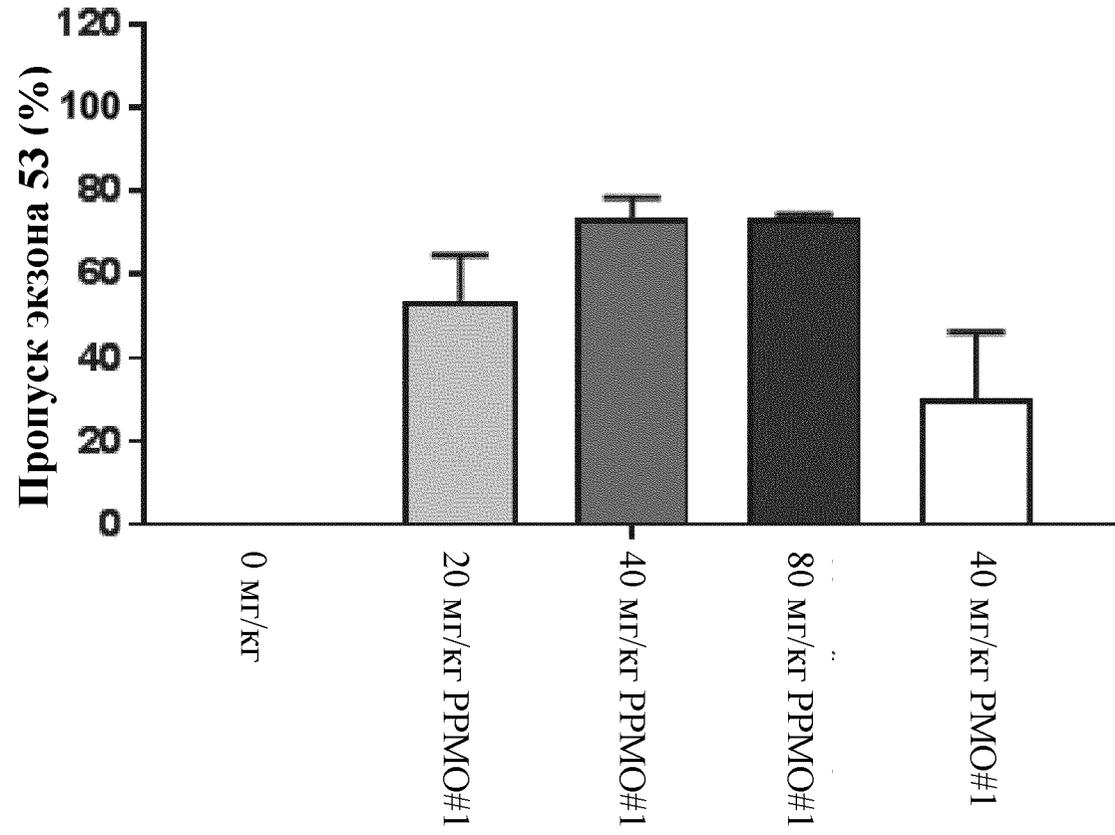
Фигура 23



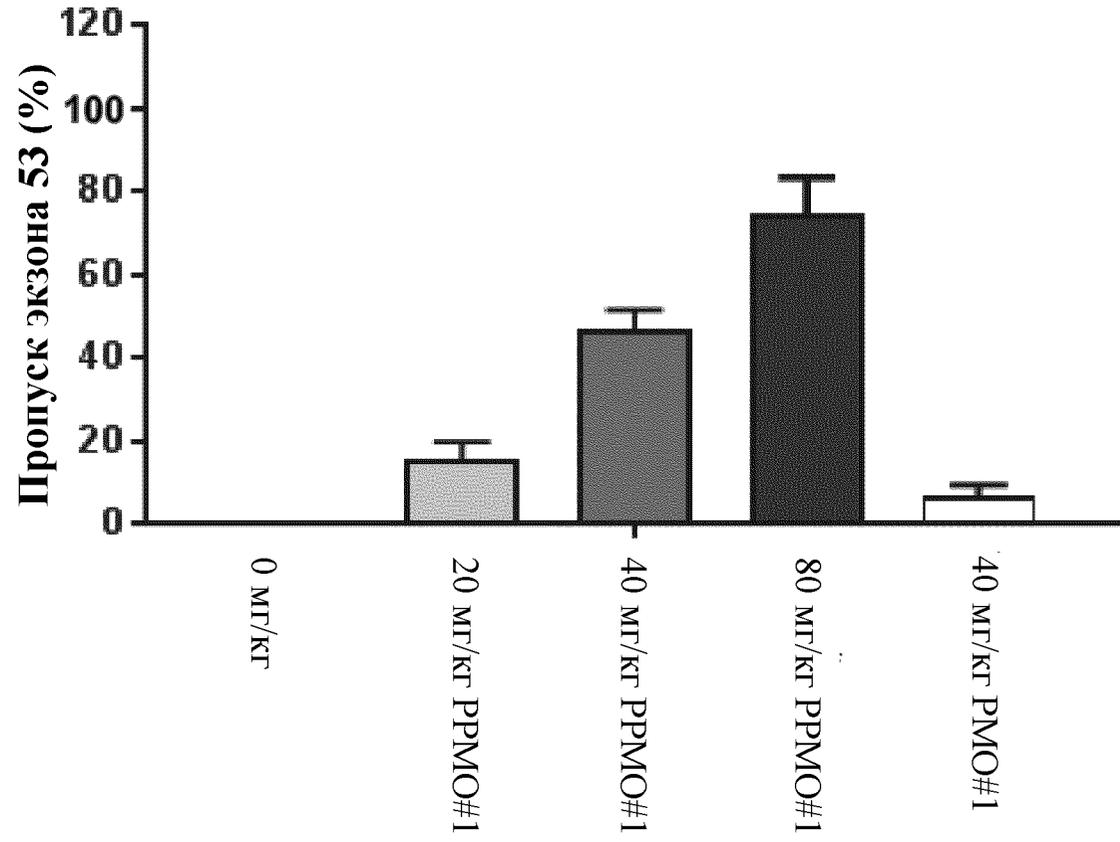
Фигура 24



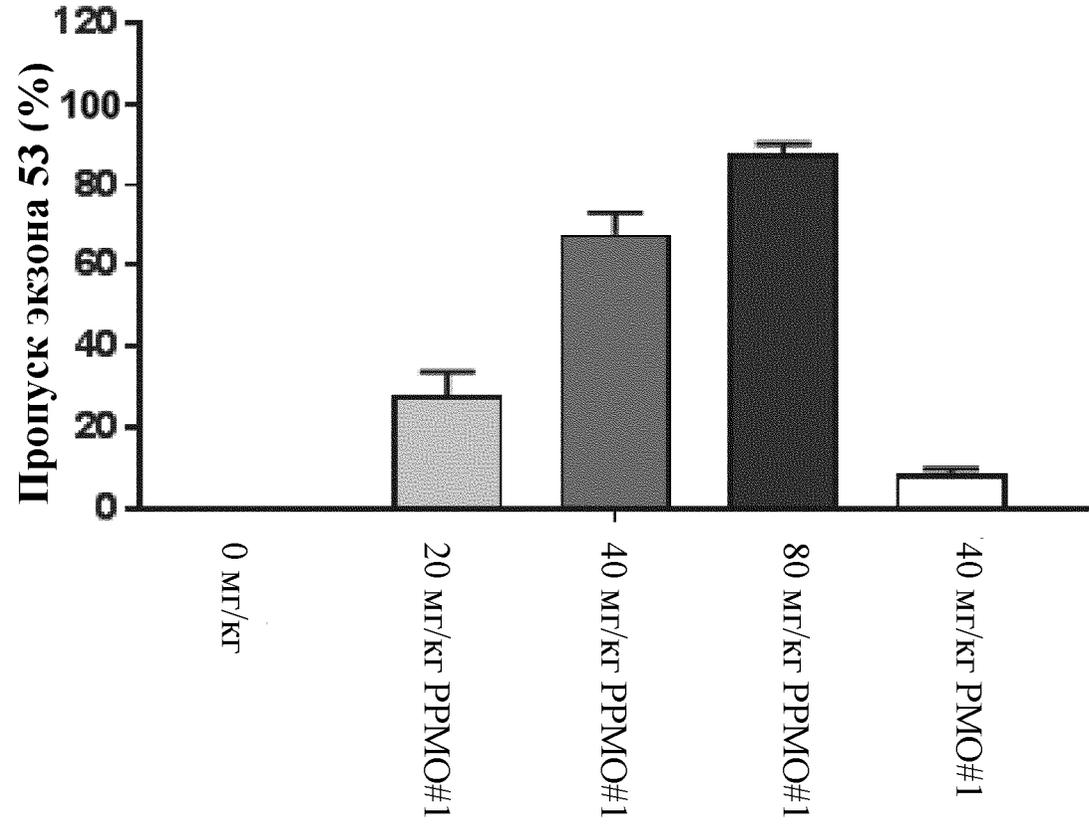
Фигура 25



Фигура 26



Фигура 27



Фигура 28

