

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190581** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.07.13

(22) Дата подачи заявки
2019.08.20

(51) Int. Cl. *A61K 9/20* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

(54) **АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА SCN2A, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ SCN1A**

(31) 62/765,344

(32) 2018.08.20

(33) US

(86) PCT/US2019/047313

(87) WO 2020/041348 2020.02.27

(71) Заявитель:

РОГКОН, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Петру Стивен (AU)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном документе предложены способы, соединения и композиции для снижения экспрессии SCN2A у субъекта. Такие способы, соединения и композиции применимы для лечения, предотвращения, отсрочки или облегчения связанного с SCN1A заболевания или расстройства (например, синдрома Драве) у нуждающегося в этом субъекта.

A1

202190581

202190581

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-567364EA/085

АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА SCN2A, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ SCN1A

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/765 344, поданной 2 августа 2018 года. Содержание указанной выше заявки полностью включено в данный документ посредством ссылки.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и полностью включен в данный документ посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 23 сентября 2019 г., называется PRX-057 WO_SL.txt и имеет размер 2235 байт.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

В данном документе предложены способы, соединения и композиции, применяемые для снижения экспрессии альфа-субъединицы 2 потенциалзависимого натриевого канала (SCN2A) у субъекта (например, человека). Также в данном документе предложены способы, соединения и композиции, содержащие антисмысловые олигонуклеотиды SCN2A (ASOs), которые могут быть применимы при лечении заболеваний или состояний, связанных с альфа-субъединицей 1 потенциалзависимого натриевого канала (SCN1A) у субъекта. Такие способы, соединения и композиции могут быть применимы, например, для лечения, предотвращения, отсрочки или облегчения энцефалопатии, связанной с SCN1A, такой как синдром Драве.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Ген альфа-субъединицы 1 потенциалзависимого натриевого канала (SCN1A) расположен на длинном (q) плече хромосомы 2 человека в положении 24.3, который кодирует Nav1.1, альфа-субъединицу потенциалзависимого натриевого канала, который экспрессируется в головном мозге и участвует в передаче нервных сигналов. Мутации в SCN1A могут быть ассоциированы с эпилепсией, генерализованной эпилепсией с фебрильными припадками, семейными фебрильными припадками, мигренью, ранней младенческой эпилептической энцефалопатией 6, синдромом Драве (тяжелая миоклоническая эпилепсия младенчества) и другими энцефалопатиями, связанными с SCN1A. Однако механизм, с помощью которого мутации SCN1A вызывают побочные эффекты, недостаточно изучен в данной области, и удовлетворительные способы лечения энцефалопатий SCN1A отсутствуют. Таким образом, сохраняется потребность в новых способах, применимых для лечения этих нарушений, связанных с SCN1A.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе предложены композиции, соединения и способы модуляции экспрессии альфа-субъединицы 2 потенциалзависимого натриевого канала (SCN2A) для лечения заболеваний, ассоциированных с альфа-субъединицей 1 (SCN1A) натриевого

потенциалзависимого канала, таких как энцефалопатии SCN1A, включая синдром Драве (тяжелая миоклоническая эпилепсия младенчества (SMEI)), эпилепсию, генерализованную эпилепсию с фебрильными припадками, семейными фебрильными припадками, мигрени и раннюю младенческую эпилептическую энцефалопатию б.

В одном аспекте изобретение относится к способу лечения энцефалопатии SCN1A у нуждающегося в этом субъекта путем введения субъекту соединения, содержащего одноцепочечный олигонуклеотид длиной 10-80 нуклеозидов и, имеющего последовательность азотистых оснований, содержащую часть из 10 смежных азотистых оснований, имеющих по меньшей мере 80% комплементарность к равной по длине части целевой области транскрипта пре-мРНК или транскрипта мРНК гена SCN2A человека в количестве и в течение периода времени, достаточных для лечения энцефалопатии SCN1A.

В некоторых вариантах осуществления способ снижает экспрессию гена SCN2A человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотид содержит, состоит по существу из или состоит последовательности азотистых оснований, комплементарной части мРНК SCN2A кодирующей аминокислотную последовательность с номером доступа в GenBank NP_066287.2 или содержащей последовательность азотистых оснований с номером доступа в GenBank NM_021007.2.

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотид содержит один или более модифицированных сахаров, одну или более модифицированных межнуклеозидных связей и/или одно или более модифицированных азотистых оснований.

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотид включает один или более модифицированных сахаров.

В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый из одного или более модифицированных сахаров независимо выбран из группы, состоящей из бициклического сахара, 2'-О-метоксиэтил (2МОЕ) модифицированного сахара, 2'-О-метокси (2-ОМе) модифицированного сахара, 2'-метокси модифицированного сахара, 2'-О-алкил модифицированного сахара, модифицированного сахара с затрудненным этилом (сEt), заблокированного сахара и разблокированного сахара.

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотид содержит 2МОЕ-модифицированные сахара по всей длине олигонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотид содержит одну или более модифицированных межнуклеозидных связей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения одна или более модифицированных межнуклеозидных связей содержат модифицированный фосфат.

В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый из модифицированных фосфатов независимо выбран из группы, состоящей из фосфоротиоата, фосфородитиоата, фосфорамидата, фосфородиамидата, тиофосфорамидата, тиофосфородиамидата, метилфосфоната, фосфороморфолидата и фосфоропиперазидата.

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотид имеет

фосфоротиоатные межнуклеозидные связи по всей длине олигонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотид имеет фосфородиамидатные морфолиновые межнуклеозидные связи по всей длине олигонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотид содержит одно или более модифицированных азотистых оснований.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированное азотистое основание выбрано из группы, состоящей из 5-метилцитозина, 5-гидроксиметилцитозина, ксантина, гипоксантина, 2-амиoadенина, 6-метиладенина, 6-метилгуанина, 2-пропиладенина, 2-пропилгуанина, 2-тиоурацила, 2-тиотимина, 2-тиоцитозина, 5-галогенурацила, 5-галогенцитозина, 5-пропинилурацила, 5-пропинилцитозина, 6-азоурацила, 6-азоцитозина, 6-азотимина, 5-урацила (псевдурацила), 4-тиоурацила, 8-галогенаденина, 8-амиoadенина, 8-тиоладенина, 8-тиоалкиладенина, 8-гидроксиладенина, 8-галогенгуанина, 8-аминогуанина, 8-тиолгуанина, 8-тиоалкилгуанина, 8-гидроксилгуанина, 5-бромурцила, 5-трифторметилурацила, 5-бромцитозина, 5-трифторметилцитозина, 7-метилгуанина, 7-метиладенина, 2-фтораденина, 8-азагуанина, 8-азааденина, 7-дезазагуанина, 7-дезазааденина, 3-дезазагуанина и 3-дезазааденина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированное азотистое основание представляет собой 5-метилцитозин.

В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный олигонуклеотид содержит:

сегмент-гэп, состоящий из связанных дезоксинуклеозидов;

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

сегмент 3'-крыла, состоящий из связанных нуклеозидов;

при этом сегмент-гэп расположен непосредственно рядом с сегментом 5'-крыла и сегментом 3'-крыла и между ними, и при этом каждый нуклеозид каждого сегмента крыла содержит модифицированный сахар.

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотид состоит из 12-40 (например, 16-30) азотистых оснований.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает ингибирование экспрессии SCN2A в нейрональных клетках субъекта.

В некоторых вариантах осуществления изобретения энцефалопатия SCN1A выбрана из группы, состоящей из эпилепсии, генерализованной эпилепсии с фебрильными припадками, наследственных фебрильных припадков, ранней младенческой эпилептической энцефалопатии 6 и синдрома Драве.

В некоторых вариантах осуществления изобретения энцефалопатия SCN1A представляет собой синдром Драве.

В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение вводят

инtrateкально, интрамедуллярно или интрацеребровентрикулярно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения снижение экспрессии SCN2A обеспечивает терапевтический эффект.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ уменьшает один или более симптомов энцефалопатии SCN1A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения один или более симптомов энцефалопатии SCN1A выбран из группы, состоящей из длительных припадков, частых припадков, поведенческих задержек и задержек в развитии, проблем с движением и равновесием, ортопедических состояний, задержки речевого развития и проблем с речью, проблем роста и питания, проблем со сном, хронической инфекции, нарушения сенсорной интеграции, нарушения вегетативной нервной системы, мигреней и потоотделения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотид является селективным по отношению к пре-мРНК или мРНК SCN2A по сравнению с пре-мРНК или мРНК SCN1A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ существенно не снижает экспрессию SCN1A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект имеет мутацию с приобретением функции у SCN1A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект имеет мутацию с потерей функции у SCN1A.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Если не указано иное, приведенные ниже термины имеют следующие значения:

«2'-дезоксинуклеозид» означает нуклеозид, содержащий 2'-Н(Н)фуранозильный сахарный фрагмент, обнаруженный в встречающихся в природе дезоксирибонуклеиновых кислотах (ДНК). В определенных вариантах осуществления изобретения 2'-дезоксинуклеозид может содержать модифицированное азотистое основание или может содержать азотистое основание РНК (урацил).

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

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

«2'-замещенный нуклеозид» или «2-модифицированный нуклеозид» означает нуклеозид, содержащий 2'-замещенный или 2'-модифицированный сахарный фрагмент. Используемый в данном документе термин «2'-замещенный» или «2-модифицированный» в отношении сахарного фрагмента означает сахарный фрагмент, содержащий по меньшей мере одну 2'-замещающую группу, отличную от Н или ОН.

«3'-сайт-мишень» относится к нуклеотиду целевой нуклеиновой кислоты, которая является комплементарной крайнему 3'-концевому нуклеотиду конкретного соединения.

«5'-сайт-мишень» относится к нуклеотиду целевой нуклеиновой кислоты, которая

является комплементарной крайнему 5'-концевому нуклеотиду конкретного соединения.

«5-метилцитозин» означает цитозин с метильной группой, присоединенной в положении 5.

«Около» означает в пределах $\pm 10\%$ от значения. Например, если указано, что «соединения оказывали влияние по меньшей мере на 70% ингибирования SCN2A», то подразумевается, что уровни SCN2A ингибируются в диапазоне от 60% до 80%.

«Введение» или «процесс введения» относится к путям введения предложенного в данном документе соединения или композиции субъекту для осуществления предусмотренной функции. Пример пути введения, который может быть использован, включает, но не ограничивается ими, интратекальное, интрамедуллярное, интрацеребровентрикулярное и парентеральное введение, такое как подкожная, внутривенная или внутримышечная инъекция или инфузия.

«Одновременное введение» или «совместное введение» означает введение двух или более соединений любым способом, при котором фармакологические эффекты обоих проявляются у пациента. Для одновременного введения не требуется, чтобы оба соединения вводились в одной фармацевтической композиции, в одной и той же лекарственной форме, одним и тем же путем введения или в одно и то же время. Эффекты обоих соединений не обязательно проявляются одновременно. Эффекты должны только накладываться друг на друга в течение определенного периода времени и не обязательно должны быть одинаковыми. Одновременное введение или совместное введение включает параллельное или последовательное введение.

«Улучшение» относится к улучшению или уменьшению по меньшей мере одного индикатора, признака или симптома ассоциированного заболевания, нарушения или состояния. В определенных вариантах осуществления изобретения улучшение включает задержку или замедление прогрессирования или тяжести одного или нескольких индикаторов состояния или заболевания. Прогрессирование или степень тяжести индикаторов может быть определена субъективными или объективными показателями, которые известны специалистам в данной области техники.

«Антисмысловая активность» означает любую детектируемую или измеримую активность, обусловленную гибридизацией антисмыслового соединения с его целевой нуклеиновой кислотой. В определенных вариантах осуществления изобретения антисмысловая активность представляет собой снижение количества или экспрессии целевой нуклеиновой кислоты или белка, кодируемого такой целевой нуклеиновой кислотой, по сравнению с уровнями целевой нуклеиновой кислоты или уровнями целевого белка в отсутствие антисмыслового соединения к мишени.

«Антисмысловое соединение» означает соединение, содержащее олигонуклеотид и необязательно одну или более дополнительных элементов, таких как конъюгатная группа или концевая группа. Примеры антисмысловых соединений включают одноцепочечные и двухцепочечные соединения, такие как олигонуклеотиды, рибозимы, киРНК, кшРНК, оцРНК и соединения на основе занятости.

«Антисмысловое ингибирование» означает снижение уровней целевой нуклеиновой кислоты в присутствии антисмыслового соединения, являющегося комплементарным к целевой нуклеиновой кислоте, по сравнению с уровнями целевой нуклеиновой кислоты и в отсутствие антисмыслового соединения.

«Антисмысловыми механизмами» являются все те механизмы, в которые вовлечена гибридизация соединения с целевой нуклеиновой кислотой, причем результат или эффект гибридизации заключается в разрушении мишени или занятии мишени с одновременным прекращением вовлечения клеточного аппарата, например, транскрипции или сплайсинга.

«Антисмысловой олигонуклеотид» означает олигонуклеотид, имеющий последовательность азотистых оснований, являющуюся комплементарной к целевой нуклеиновой кислоте или ее области или сегменту. В определенных вариантах осуществления изобретения антисмысловой олигонуклеотид специфически гибридизуется с целевой нуклеиновой кислотой или ее областью или сегментом.

«Атаксия» означает потерю полного контроля над движениями тела.

«Бициклический нуклеозид» или «BNA» означает нуклеозид, содержащий бициклический сахарный фрагмент. «Бициклический сахарный фрагмент» означает модифицированный сахарный фрагмент, содержащий два кольца, где второе кольцо образовано через мостик, соединяющий два атома в первом кольце, тем самым образуя бициклическую структуру. В определенных вариантах осуществления изобретения первое кольцо бициклического сахарного фрагмента представляет собой фуранозильный фрагмент. В определенных вариантах осуществления изобретения бициклический сахарный фрагмент не содержит фуранозильный фрагмент.

«Группа разветвления» означает группу атомов, имеющую по меньшей мере 3 положения, которые способны образовывать ковалентные связи с по меньшей мере с 3 группами. В определенных вариантах осуществления группа разветвления обеспечивает множество реактивных сайтов для соединения связанных лигандов с олигонуклеотидом через линкер конъюгата и/или расщепляемый фрагмент.

«Химическая модификация» в соединении описывает замены или изменения в результате химической реакции любого из звеньев в соединении. «Модифицированный нуклеозид» означает нуклеозид, имеющий, независимо, модифицированный сахарный фрагмент и/или модифицированное азотистое основание. «Модифицированный олигонуклеотид» означает олигонуклеотид, содержащий по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь, модифицированный сахар и/или модифицированное азотистое основание.

«Химически отличающаяся область» относится к области соединения, которая некоторым образом химически отличается от другой области того же соединения. Например, область, имеющая 2'-О-метоксиэтилнуклеотиды, химически отличается от области, имеющей нуклеотиды без 2'-О-метоксиэтильных модификаций.

«Химерные антисмысловые соединения» означает антисмысловые соединения, которые имеют по меньшей мере 2 химически отличающиеся области, причем каждое

положение имеет множество субъединиц.

«Расщепляемая связь» означает любую химическую связь, которая может быть расщеплена. В определенных вариантах осуществления изобретения расщепляемая связь выбрана из: амида, полиамида, сложного эфира, простого эфира, одного или обоих сложных эфиров фосфодиефира, фосфатного сложного эфира, карбамата, дисульфида или пептида.

«Расщепляемый фрагмент» означает связь или группу, которая может быть расщеплена при физиологических условиях, например, внутри клетки, животного или человека.

«Комплементарный» по отношению к олигонуклеотиду означает, что последовательность азотистых оснований такого олигонуклеотида или одна или более его областей совпадает с последовательностью азотистых оснований другого олигонуклеотида или нуклеиновой кислоты или одной или более их областей, когда две последовательности азотистых оснований выровнены в противоположных направлениях. Соответствующие нуклеотидные основания или дополнительные нуклеотидные основания, как описано в данном документе, ограничиваются следующими парами: аденин (A) и тимин (T), аденин (A) и урацил (U), цитозин (C) и гуанин (G) и 5-метилцитозин (^mC) и гуанин (G), если не указано иное. Комплементарные олигонуклеотиды и/или нуклеиновые кислоты не обязательно должны иметь комплементарность азотистых оснований для каждого нуклеотида и могут включать одно или более ошибочных спариваний азотистых оснований. Напротив, «полностью комплементарный» или «на 100% комплементарный» по отношению к олигонуклеотидам означает, что такие олигонуклеотиды имеют совпадения азотистых оснований в каждом нуклеотиде без каких-либо ошибочных спариваний азотистых оснований.

«Смежный» в контексте олигонуклеотида относится к нуклеотидам, азотистым основаниям, сахарным фрагментам или межнуклеотидным связям, которые расположены непосредственно рядом друг с другом. Например, «смежные азотистые основания» означает азотистые основания, расположенные непосредственно рядом друг с другом.

«Деменция» означает продолжающуюся потерю интеллектуальной функции, которая ухудшает память, способность к суждению и мышлению.

«Конструирование» или «сконструированный для» относится к процессу конструирования соединения, которое специфически гибридизуется с выбранной молекулой нуклеиновой кислоты.

«Разбавитель» означает компонент композиции, который не обладает фармакологической активностью, но является фармацевтически необходимым или желательным. Например, разбавитель в композиции для инъекции может представлять собой жидкость, например, солевой раствор.

«По-разному модифицированные» означает химические модификации или химические заместители, которые отличны друг от друга, включая отсутствие модификаций. Так, например, МОЕ нуклеотид и немодифицированный нуклеотид ДНК являются «по-разному модифицированными», даже несмотря на то, что нуклеотид ДНК не

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

«Доза» означает определенное количество соединения или фармацевтического агента, обеспечиваемое за одно введение или за определенный период времени. В определенных вариантах осуществления изобретения доза может быть введена в виде одного, двух или более болюсов, таблеток или инъекций. Например, в определенных вариантах осуществления изобретения, где подкожное введение является желательным, для обеспечения желаемой дозы может потребоваться объем, который не помещается в одной инъекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения для достижения желаемой дозы могут быть использованы две или более инъекции. В определенных вариантах осуществления изобретения доза может быть введена при помощи двух или более инъекций для минимизации реакции в месте инъекции у субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение или фармацевтический агент вводят путем инфузии в течение длительного периода времени или непрерывно. Дозы могут быть указаны как количество фармацевтического агента в час, день, неделю или месяц.

«Режим дозирования» представляет собой комбинацию доз, предназначенную для достижения одного или более желаемых эффектов.

«Двухцепочечное соединение» означает соединение, содержащее два олигомерных соединения, которые являются комплементарными друг к другу и образуют дуплекс, и причем одно из двух указанных олигомерных соединений включает олигонуклеотид.

«Эффективное количество» означает количество соединения, достаточное для достижения желаемого физиологического результата у субъекта, нуждающегося в соединении. Эффективное количество может варьироваться среди субъектов в зависимости от состояния здоровья и физического состояния субъекта, подлежащего лечению, таксономической группы субъектов, подлежащих лечению, состава композиции, оценки состояния здоровья субъекта и других соответствующих факторов.

«Эффективность» означает способность производить желаемый эффект.

«Ensembl ID» представляет собой идентификационный номер, состоящий из букв и цифр, присвоенный последовательности гена программой Ensembl, которая является совместным проектом EMBL-EBI и Wellcome Trust Sanger Institute по разработке системы программного обеспечения, которая производит и поддерживает автоматическую аннотацию эукариотических геномов. Аннотация Ensembl помогает идентифицировать местоположение гена в конкретном геноме и может использоваться для настройки эквивалентного гена в геноме другого вида.

«Эпилепсия» представляет собой заболевание центральной нервной системы, при котором происходит хроническое нарушение активности нервных клеток в головном мозге. В определенных случаях она может вызвать припадки, периоды необычного поведения, необычные ощущения, а иногда и потерю сознания. В определенных случаях она также может вызывать другие симптомы, включая миоклонус, когнитивные нарушения, неспособность к обучению или задержку развития у детей. В определенных случаях данное заболевание может привести к летальному исходу у некоторых пациентов. В определенных случаях некоторые формы эпилепсии ассоциированы с прогрессирующими нейродегенеративными заболеваниями. Многие люди с эпилепсией имеют более одного симптома.

«Экспрессия» включает в себя все функции, с помощью которых кодированная информация гена преобразуется в структуры, присутствующие и действующие в клетке. Такие структуры включают, но не ограничиваются ими, продукты транскрипции и трансляции.

«Гэпмер» означает олигонуклеотид, в котором внутренняя область, имеющая множество нуклеозидов, которые поддерживают расщепление РНКазой H, расположена между внешними областями, имеющими один или более нуклеозидов, где нуклеозиды, составляющие внутреннюю область, химически отличаются от нуклеозида или нуклеозидов, составляющих внешние области. Внутренняя область может называться «гэп», а внешние области могут называться «крыльями».

«SCN1A» означает альфа-субъединицу 1 потенциалзависимого натриевого канала человека и относится к любой нуклеиновой кислоте SCN1A. Например, в определенных вариантах осуществления изобретения SCN1A включает последовательность ДНК, кодирующую SCN1A, последовательность РНК, транскрибируемую из ДНК, кодирующую SCN1A (включая геномную ДНК, содержащую интроны и экзоны). Мишень может указываться как в верхнем, так и в нижнем регистре.

«SCN2A» означает альфа-субъединицу 2 потенциалзависимого натриевого канала человека и относится к любой нуклеиновой кислоте SCN2A. Например, в определенных вариантах осуществления изобретения SCN2A включает последовательность ДНК, кодирующую SCN2A, последовательность РНК, транскрибируемую из ДНК, кодирующую SCN2A (включая геномную ДНК, содержащую интроны и экзоны). Мишень может указываться как в верхнем, так и в нижнем регистре.

«SCN2A-специфический ингибитор» относится к любому агенту, способному специфически ингибировать экспрессию или активность SCN2A на молекулярном уровне. Например, SCN2A-специфические ингибиторы включают нуклеиновые кислоты (включая антисмысловые соединения), пептиды, антитела, небольшие молекулы и другие агенты, способные ингибировать экспрессию или активность SCN2A.

«Гибридизация» означает отжиг олигонуклеотидов и/или нуклеиновых кислот. Не ограничиваясь конкретным механизмом, наиболее распространенный механизм гибридизации включает водородную связь, которая может быть водородной связью

Уотсона - Крика, Хугстина или обратной водородной связью Хугстина, между комплементарными азотистыми основаниями. В определенных вариантах осуществления изобретения молекулы комплементарных нуклеиновых кислот включают, но не ограничиваются ими, антисмысловое соединение и нуклеиновую кислоту-мишень. В определенных вариантах осуществления изобретения молекулы комплементарных нуклеиновых кислот включают, но не ограничиваются ими, антисмысловой олигонуклеотид и нуклеиновую кислоту-мишень.

«Непосредственно рядом» означает отсутствие промежуточных элементов между расположенными непосредственно рядом друг с другом элементами одного и того же типа (например, нет промежуточных азотистых оснований между расположенными непосредственно рядом друг с другом азотистыми основаниями).

«Субъект» означает человека или животное, отличающееся от человека, выбранное для лечения или терапии.

«Ингибирование экспрессии или активности» относится к снижению или блокированию экспрессии или активности по сравнению с экспрессией или активностью в необработанном или контрольном образце и необязательно указывает на тотальное устранение экспрессии или активности.

«Межнуклеозидная связь» означает группу или связь, которая образует ковалентную связь между соседними нуклеозидами в олигонуклеотиде. «Модифицированная межнуклеозидная связь» означает любую межнуклеозидную связь, кроме встречающейся в природе фосфатной межнуклеозидной связи. Нефосфатные связи в данном документе называются модифицированными межнуклеозидными связями.

«Интрацеребровентрикулярное введение» означает введение в желудочковую систему головного мозга.

«Внутрибрюшинное введение» означает введение путем инфузии или инъекции в брюшину.

«Интрамедуллярное введение» означает введение в спинной мозг, продолговатый мозг или в костную полость костного мозга.

«Инtrateкальное введение» означает введение в позвоночный канал или в субарахноидальное пространство таким образом, чтобы оно достигло спинномозговой жидкости (СМЖ).

«Внутривенное введение» означает введение в вену.

«Удлиненные олигонуклеотиды» представляют собой олигонуклеотиды, которые имеют один или более дополнительных нуклеозидов относительно олигонуклеотида, описанного в данном документе, например, исходного олигонуклеотида.

«Связанные нуклеозиды» означают соседние нуклеозиды, связанные вместе межнуклеозидной связью.

«Ошибочное спаривание» или «некомплементарный» означает азотистое основание первого олигонуклеотида, которое не является комплементарным соответствующему основанию второго олигонуклеотида или целевой нуклеиновой кислоты, когда первый и

второй олигонуклеотиды выровнены. Например, азотистые основания, включая, но не ограничиваясь ими, универсальное азотистое основание, инозин и гипоксантин, способны гибридизоваться по меньшей мере с одним азотистым основанием, но все же являются ошибочно спаренными или некомплементарными по отношению к азотистому основанию, с которым они гибридизуются. В качестве другого примера, азотистое основание первого олигонуклеотида, которое не способно гибридизоваться с соответствующим азотистым основанием второго олигонуклеотида или целевой нуклеиновой кислоты, когда первый и второй олигонуклеотиды являются выровненными, представляет собой ошибочно спаренное или некомплементарное азотистое основание.

«Модуляция» относится к изменению или коррекции элемента в клетке, ткани, органе или организме. Например, модуляция SCN2A может означать увеличение или уменьшение уровня SCN2A в клетке, ткани, органе или организме. «Модулятор» влияет на изменение в клетке, ткани, органе или организме. Например, соединение может быть модулятором SCN2A, который снижает количество SCN2A в клетке, ткани, органе или организме.

«МОЕ» означает метоксиэтил.

«Мономер» относится к одиночному звену олигомера. Мономеры включают, но не ограничиваются ими, нуклеозиды и нуклеотиды.

«Мотив» означает структуру немодифицированных и/или модифицированных сахарных фрагментов, азотистых оснований и/или межнуклеозидных связей в олигонуклеотиде.

«Миоклонус» означает эпизоды повторяющихся стереотипных непроизвольных подергиваний мышц или мышечных судорог, которые могут оказывать негативное влияние на часть тела или все тело и иметь различную продолжительность.

«Природный» или «встречающийся в природе» означает обнаруженный в природе.

«Небициклический модифицированный сахар» или «небициклический модифицированный сахарный фрагмент» означает модифицированный сахарный фрагмент, который содержит модификацию, такую как заместитель, которая не образует мостик между двумя атомами сахара с образованием второго кольца.

«Нуклеиновая кислота» относится к молекулам, состоящим из мономерных нуклеотидов. Нуклеиновая кислота включает, но не ограничивается ими, рибонуклеиновые кислоты (РНК), дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК), одноцепочечные нуклеиновые кислоты и двухцепочечные нуклеиновые кислоты.

«Азотистое основание» означает гетероциклический фрагмент, способный спариваться с основанием другой нуклеиновой кислоты. Используемый здесь термин «встречающееся в природе азотистое основание» представляет собой аденин (A), тимин (T), цитозин (C), урацил (U) и гуанин (G). «Модифицированное азотистое основание» представляет собой встречающееся в природе химически модифицированное азотистое основание. «Универсальное основание» или «универсальное азотистое основание» представляет собой азотистое основание, отличное от встречающегося в природе

азотистого основания и модифицированного азотистого основания, и способно спариваться с любым азотистым основанием.

«Последовательность азотистых оснований» означает порядок расположения смежных азотистых оснований в нуклеиновой кислоте или олигонуклеотиде, независимо от любого сахара или межнуклеозидной связи.

«Нуклеозид» означает соединение, содержащее азотистое основание и сахарный фрагмент. Азотистое основание и сахарный фрагмент, каждый независимо, являются немодифицированными или модифицированными. «Модифицированный нуклеозид» означает нуклеозид, содержащий модифицированное азотистое основание и/или модифицированный сахарный фрагмент. Модифицированные нуклеозиды включают нуклеозиды, в которых отсутствует азотистое основание.

«Олигомерное соединение» означает соединение, содержащее один олигонуклеотид и, необязательно, один или более дополнительных элементов, таких как группа конъюгата или концевая группа.

«Олигонуклеотид» означает полимер из связанных нуклеозидов, каждый из которых может быть модифицированным или немодифицированным независимо друг от друга. Если не указано иное, олигонуклеотиды состоят из 8-80 связанных нуклеозидов. «Модифицированный олигонуклеотид» означает олигонуклеотид, в котором модифицирован по меньшей мере один сахар, азотистое основание или межнуклеозидная связь. «Немодифицированный олигонуклеотид» означает олигонуклеотид, который не содержит никаких модификаций сахара, азотистых оснований или межнуклеозидных модификаций.

«Исходный олигонуклеотид» означает олигонуклеотид, последовательность которого используется в качестве основы для конструирования большего количества олигонуклеотидов с аналогичной последовательностью, но с разной длиной, мотивами и/или химическими составами. Новые сконструированные олигонуклеотиды могут иметь такую же или перекрывающуюся последовательность, что и исходный олигонуклеотид.

«Парентеральное введение» означает введение путем инъекции или инфузии. Парентеральное введение включает подкожное введение, внутривенное введение, внутримышечное введение, внутриартериальное введение, внутрибрюшинное введение или внутричерепное введение, например, интратекальное или интрацеребровентрикулярное введение.

«Фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель» означает любое вещество, подходящее для применения при введении субъекту (например, человеку). Например, фармацевтически приемлемый носитель может быть стерильным водным раствором, таким как ФСБ или вода для инъекций.

«Фармацевтически приемлемые соли» означают физиологически и фармацевтически приемлемые соли соединений, такие как олигомерные соединения или олигонуклеотиды, то есть, соли, которые сохраняют желаемую биологическую активность исходного соединения и не дают каких-либо нежелательных токсикологических эффектов.

«Фармацевтический агент» означает соединение, которое обеспечивает терапевтический эффект при введении субъекту.

«Фармацевтическая композиция» означает смесь веществ, подходящих для введения субъекту. Например, фармацевтическая композиция может содержать одно или более соединений или их солей и стерильный водный раствор.

«Фосфоротиоатная связь» означает модифицированную фосфатную связь, в которой один из немостиковых атомов кислорода заменен атомом серы. Фосфоротиоатная связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь.

«Фосфорный фрагмент» означает группу атомов, содержащую атом фосфора. В определенных вариантах осуществления изобретения фосфорный фрагмент включает моно-, ди- или трифосфат или фосфоротиоат.

Термин «часть» означает определенное число смежных (то есть, связанных) азотистых оснований нуклеиновой кислоты. В определенных вариантах изобретения, термин «часть» означает определенное число смежных азотистых оснований целевой нуклеиновой кислоты. В определенных вариантах изобретения, термин «часть» означает определенное количество смежных азотистых оснований олигомерного соединения.

Термин «предупредить» означает замедление или предотвращение начала, развития или прогрессирования заболевания, расстройства или состояния на период времени от нескольких минут и до конца жизни.

«Пролекарство» означает соединение в форме вне организма, которое при введении субъекту метаболизируется до другой формы внутри организма или его клеток. В определенных вариантах осуществления изобретения метаболитизированная форма представляет собой активную или более активную форму соединения (например, лекарственного средства). Обычно превращение пролекарства в организме облегчается действием фермента(ов) (например, эндогенного или вирусного фермента) или химического вещества(веществ), присутствующих в клетках или тканях, и/или под воздействием физиологических условий.

«Уменьшить» означает уменьшить до меньшего объема, размера или количества.

«RefSeq No.» представляет собой уникальную комбинацию букв и цифр, присвоенную последовательности, чтобы указать, что последовательность соответствует конкретному целевому транскрипту (например, целевому гену). Такую последовательность и информацию о целевом гене (в совокупности, запись о гене) можно найти в базе данных генетических последовательностей. Базы данных генетических последовательностей включают базу данных эталонных последовательностей NCBI, GenBank, Европейский архив нуклеотидов и Банк данных ДНК Японии (последние три образуют Международную коллаборацию баз данных нуклеотидных последовательностей или INSDC).

«Область» определяется как часть целевой нуклеиновой кислоты, имеющая по меньшей мере одну идентифицируемую структуру, функцию или характеристику.

«Соединение РНКи» означает антисмысловое соединение, которое действует, по меньшей мере частично, через RISC или Ago2, но не через РНазу H, модулируя целевую

нуклеиновую кислоту и/или белок, кодируемый целевой нуклеиновой кислотой. Соединения РНК включают, но не ограничиваются ими, двухцепочечную миРНК, одноцепочечную РНК (оцРНК) и микроРНК, включая имитаторы микроРНК.

«Сегменты» определяются как меньшие по размеру фрагменты или субфрагменты областей в нуклеиновой кислоте.

Термин «припадки» представляет собой симптом множества различных заболеваний и состояний, которые могут оказывать негативное воздействие на головной мозг. «Припадки» обычно вызываются нарушениями электрической связи между нейронами в головном мозге в результате травмы головного мозга, заболевания или расстройства. Припадки могут принимать разные формы и оказывать различное негативное воздействие на разных людей. Распространенные физические изменения, которые могут произойти во время приступа, включают затруднение речи, неспособность глотать, слюнотечение, многократное моргание глаз, фиксацию взгляда, отсутствие движения мышечного тонуса, опускающийся тремор, судороги или подергивания, ригидные или напряженные мышцы, повторяющиеся нецеленаправленные движения, называемые автоматизмом, вовлекающие лицо, руки или ноги, судорожные припадки, потерю контроля над мочеиспусканием или стулом, потливость, изменение цвета кожи (бледность или покраснение), расширение зрачков, прикусывание языка, затрудненное дыхание, ощущение сердцебиения. В определенных вариантах осуществления изобретения припадки имеют легкую степень тяжести. В других вариантах осуществления изобретения припадки вызывают полную потерю трудоспособности или могут привести к смерти. Аномальную активность головного мозга часто можно задокументировать по аномальным результатам на электроэнцефалограмме (ЭЭГ).

«Побочные эффекты» означают физиологическое заболевание и/или состояния, возникающие вследствие лечения и являющиеся отличными от желаемых эффектов. В определенных вариантах изобретения, побочными эффектами являются реакции, возникающие в области инъекции; нарушения функции печени, выявленные в результате обследования; отклонения от нормы по результатам печеночных проб; гепатотоксичность; нефротоксичность; нарушения функции центральной нервной системы; миопатии; и недомогание. Так, например, на гепатотоксичность или нарушение функции печени могут указывать повышенные уровни аминотрансферазы в сыворотке. Так, например, на гепатотоксичность и нарушения функции печени могут указывать повышенные уровни билирубина.

«Одноцепочечный» в отношении соединения означает, что соединение имеет только один олигонуклеотид. «Самокомплементарный» означает олигонуклеотид, который, по меньшей мере частично гибридизуется сам с собой. Соединение, состоящее из одного олигонуклеотида, где олигонуклеотид соединения является самокомплементарным, представляет собой одноцепочечное соединение. Одноцепочечное соединение может быть способно связываться с комплементарным соединением с образованием дуплекса.

«Сайты» определяются как уникальные положения азотистых оснований в целевой

нуклеиновой кислоте.

«Специфически гибридизующийся» относится к олигонуклеотиду, имеющему достаточную степень комплементарности между олигонуклеотидом и целевой нуклеиновой кислотой, чтобы вызвать желаемый эффект, но при этом оказывая минимальное воздействие или вообще не оказывая какого-либо воздействия на нецелевые нуклеиновые кислоты. В определенных вариантах осуществления изобретения, специфическая гибридизация происходит в физиологических условиях.

«Специфически ингибировать» целевую нуклеиновую кислоту означает снижать или блокировать экспрессию целевой нуклеиновой кислоты при одновременном проявлении меньшего, минимального или нулевого эффекта подавления нецелевых нуклеиновых кислот, и не обязательно указывает на полное устранение экспрессии целевой нуклеиновой кислоты.

«Стандартный клеточный анализ» означает анализ(ы), описанный(ые) в примерах, и их разумные варианты.

«Стандартный эксперимент *in vivo*» означает процедуру(ы), описанную(ые) в Примере(ах), и их разумные варианты.

Термин «субъект» относится к человеку или животному, отличному от человека, включая, но не ограничиваясь ими, мышей, крыс, кроликов, собак, кошек, свиней и отличных от человека приматов, включая, но не ограничиваясь ими, обезьян и шимпанзе.

«Сахарный фрагмент» означает немодифицированный сахарный фрагмент или модифицированный сахарный фрагмент. «Немодифицированный сахарный фрагмент» или «немодифицированный сахар» означает 2'-ОН(Н)фуранозильный фрагмент, как обнаружено в РНК («немодифицированный сахарный фрагмент РНК»), или 2'-Н(Н)фрагмент, как обнаружено в ДНК («немодифицированный сахарный фрагмент ДНК»). Немодифицированные сахарные фрагменты имеют по одному водороду в каждом из положений 1', 3' и 4', кислород в положении 3' и два атома водорода в положении 5'. «Модифицированный сахарный фрагмент» или «модифицированный сахар» означает модифицированный фуранозильный сахарный фрагмент или заместитель сахара. «Модифицированный фуранозильный сахарный фрагмент» означает фуранозильный сахар, содержащий неводородный заместитель вместо по меньшей мере одного водорода немодифицированного сахарного фрагмента. В определенных вариантах осуществления изобретения модифицированный фуранозильный сахарный фрагмент представляет собой 2'-замещенный сахарный фрагмент. Такие модифицированные фуранозильные сахарные фрагменты включают бициклические сахара и небциклические сахара.

«Сахарный суррогат» означает модифицированный сахарный фрагмент, имеющий отличное от фуранозильного фрагмента строение, который способен связывать азотистое основание с другой группой, такой как межнуклеозидная связь, группа конъюгата или концевая группа в олигонуклеотиде. Модифицированные нуклеозиды, содержащие сахарные суррогаты, могут быть включены в одно или более положений внутри олигонуклеотида, и такие олигонуклеотиды способны гибридизоваться с

комплементарными олигомерными соединениями или нуклеиновыми кислотами.

«Подкожное введение» означает введение непосредственно под кожу.

«Целевой ген» относится к гену, кодирующему мишень.

«Нацеливание» означает специфическую гибридизацию соединения с целевой нуклеиновой кислотой для индукции желаемого эффекта.

Термины «целевая нуклеиновая кислота», «целевая РНК» и «целевой транскрипт РНК» относятся к нуклеиновой кислоте, на которую можно нацеливать соединения, описанные в данном документе.

«Целевая область» означает часть целевой нуклеиновой кислоты, на которую нацелено одно или более соединений.

«Целевой сегмент» означает последовательность нуклеотидов целевой нуклеиновой кислоты, на которую нацелено описанное в данном документе соединение. «5'-сайт-мишень» относится к крайнему 5'-концевому нуклеотиду целевого сегмента. «3'-сайт-мишень» относится к крайнему 3'-концевому нуклеотиду целевого сегмента.

«Концевая группа» означает химическую группу или группу атомов, которые ковалентно связаны с концом олигонуклеотида.

«Терапевтически эффективное количество» означает количество соединения, фармацевтического агента или композиции, которое обеспечивает благоприятный терапевтический эффект у субъекта.

«Лечение» относится к введению соединения или фармацевтической композиции субъекту с целью изменения или улучшения течения заболевания, расстройства или патологического состояния у субъекта.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1А-1В представлены графики, показывающие изменения уровня мРНК SCN2A у мышей, гетерозиготных по мутации SCN2A R1882Q на P15 (n=3 для всех групп лечения) (фиг. 1А) и P35 (ASO 1 n=4, ASO 2 n=4, ASO 3 n=1, необработанные n=3) (фиг. 1В). Кратность изменения была нормализована к необработанному дикому типу соответствующего возраста. Всем мышам проводили инъекции P1-P2.

На Фиг. 2 показано процент снижения мРНК Scn2a, нормализованный к необработанным гетерозиготным мышам Scn1a RX соответствующего возраста. мРНК измеряли на P15. N=3 образца головного мозга на группу лечения.

На Фиг. 3 представлен график, показывающий % выживаемости мышей, гетерозиготных по Scn1a, после инъекции подавляющего Scn2a ASO (5 мкг) или скремблированного ASO (50 мкг). Всем мышам проводили инъекцию на P1 и их состояние отслеживали в течение 45 дней.

На Фиг. 4А представлен график, показывающий массу тела мышей Scn1a RX, подвергнутых скремблированию или обработке mScn2a ASO, на P21. N=15 для подвергнутых скремблированию и N=18 для ASO.

На Фиг. 4В представлен график, показывающий массу тела мышей Scn1a RX, подвергнутых скремблированию или обработке mScn2a ASO, на P45. N=15 для

подвергнутых скремблированию и N=18 для ASO.

На Фиг. 5 представлен график, показывающий количество припадков у мышей, гетерозиготных по Scn1a, после инъекции ASO, подавляющего Scn2a (5 мкг; n=9) или скремблированного ASO (50 мкг; n=17) Всем мышам проводили инъекцию на P1.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Следует понимать, что предшествующее общее описание и последующее подробное описание являются только иллюстративными и пояснительными, и не ограничивают заявляемые варианты осуществления. В контексте данного документа использование единственного числа включает множественное число, если специально не указано иное. В данном контексте использование «или» означает «и/или», если не указано иное. Кроме того, использование термина «включая», а также других форм, таких как «включает» и «включенный», не является ограничивающим.

Заголовки разделов, используемые в данном документе, предназначены только для организационных целей и не должны рассматриваться как ограничение описываемого предмета. Все документы или части документов, процитированные в этой заявке, включая, но не ограничиваясь ими, патенты, заявки на патенты, статьи, книги, трактаты, и записи эталонных последовательностей GenBank и NCBI настоящим явным образом включены посредством ссылки для обсуждаемых частей документа, а также во всей своей полноте.

Понятно, что последовательность, представленная в каждой SEQ ID NO в примерах, содержащихся в данном документе, не зависит от какой-либо модификации сахарного фрагмента, межнуклеозидной связи или азотистого основания. Таким образом, соединения, определенные SEQ ID NO, могут независимо содержать одну или более модификаций сахарного фрагмента, межнуклеозидной связи или азотистого основания. Соединения, описанные номером ISIS (ISIS #), указывают на комбинацию последовательности азотистых оснований, химической модификации и мотива.

Настоящее изобретение частично основано на открытии того, что олигонуклеотиды, нацеленные на ген SCN2A, применимы для лечения субъектов с энцефалопатией SCN1A. Соответственно, в изобретении представлены способы профилактики и лечения энцефалопатии SCN1A у субъекта путем введения олигонуклеотидов, нацеленных на ген SCN2A.

Определенные варианты осуществления

В определенных вариантах осуществления представлены способы, соединения и композиции для модуляции энцефалопатии SCN1A (например, синдрома Драве) или ее симптома у субъекта путем введения соединения или композиции субъекту, при этом соединение или композиция содержит модулятор SCN2A. Модуляция SCN2A может привести к снижению уровня или экспрессии SCN2A с целью снижения экспрессии SCN2A для лечения, профилактики, ослабления или отсрочки энцефалопатии SCN1A или ее симптома. В определенных вариантах осуществления изобретения, модулятор SCN2A представляет собой SCN2A-специфический ингибитор. В определенных вариантах осуществления изобретения SCN2A-специфические ингибиторы представляют собой

нуклеиновые кислоты (включая антисмысловые соединения), пептиды, антитела, небольшие молекулы и другие агенты, способные ингибировать экспрессию или активность SCN2A. В определенных вариантах осуществления изобретения, субъектом является человек.

В определенных вариантах осуществления изобретения, олигонуклеотид является селективным по отношению к пре-мРНК или мРНК SCN2A по сравнению с пре-мРНК или мРНК SCN1A. В определенных вариантах осуществления изобретения, способ по существу не снижает экспрессию SCN1A. В определенных вариантах осуществления изобретения, субъект имеет мутацию с приобретением функции у SCN1A. В определенных вариантах осуществления изобретения, субъект имеет мутацию с потерей функции у SCN1A.

Определенные раскрытые в данном документе варианты осуществления относятся к соединениям или композициям, содержащим модулятор SCN2A. Такие соединения или композиции применимы для лечения, профилактики, ослабления или отсрочки начала энцефалопатии SCN1A (например, синдрома Драве) или ее симптома. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение содержит SCN2A-специфический ингибитор. В определенных вариантах осуществления изобретения SCN2A-специфический ингибитор представляет собой нуклеиновую кислоту, полипептид, антитело, небольшую молекулу или другой агент, способный ингибировать экспрессию или активность SCN2A. В определенных вариантах осуществления изобретения SCN2A-специфический ингибитор представляет собой нуклеиновую кислоту, нацеленную на SCN2A. В определенных вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота является одноцепочечной. В определенных вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота является двухцепочечной. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композиция содержит антисмысловое соединение. В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления соединение или композиция содержит олигомерное соединение. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композиция содержит олигонуклеотид, нацеленный на SCN2A. В определенных вариантах осуществления изобретения олигонуклеотид является одноцепочечным. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение содержит дезоксирибонуклеотиды. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение содержит рибонуклеотиды и является двухцепочечным. В определенных вариантах осуществления изобретения олигонуклеотид является модифицированным олигонуклеотидом. В определенных вариантах осуществления изобретения модифицированный олигонуклеотид является одноцепочечным.

В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления изобретения соединение может содержать модифицированный олигонуклеотид длиной от 8 до 80, от 10 до 30, от 12 до 50, от 13 до 30, от 13 до 50, от 14 до 30, от 14 до 50, от 15 до 30, от 15 до 50, от 16 до 30, от 16 до 50, от 17 до 30, от 17 до 50, от 18 до 22, от 18 до 24, от 18 до 30, от 18 до 50, от 19 до 22, от 19 до 30, от 19 до 50 или от 20 до 30 связанных нуклеозидов.

В определенных вариантах осуществления изобретения по меньшей мере одна

межнуклеозидная связь указанного модифицированного олигонуклеотида представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь. В определенных вариантах осуществления изобретения по меньшей мере одна межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную межнуклеозидную связь. В определенных вариантах осуществления изобретения межнуклеозидные связи представляют собой фосфоротиоатные связи и связи фосфатного сложного эфира.

В определенных вариантах осуществления изобретения любой из вышеуказанных олигонуклеотидов содержит по меньшей мере один модифицированный сахар. В определенных вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один модифицированный сахар содержит 2'-О-метоксиэтильную группу. В определенных вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один модифицированный сахар представляет собой бициклический сахар, такой как группа 4'-CH(CH₃)-O-2', группа 4'-CH₂-O-2' или группа 4'-(CH₂)₂-O-2'.

В определенных вариантах осуществления изобретения один нуклеозид указанного модифицированного олигонуклеотида содержит модифицированное азотистое основание. В определенных вариантах осуществления изобретения, модифицированное азотистое основание представляет собой 5-метилцитозин.

В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композиция содержит модифицированный олигонуклеотид, содержащий: а) сегмент-гэп, состоящий из связанных дезоксинуклеозидов; б) сегмент 5'-крыла, состоящий из связанных нуклеозидов; и с) сегмент 3'-крыла, состоящий из связанных нуклеозидов. Сегмент-гэп расположен между сегментом 5'-крыла и сегментом 3'-крыла, и каждый нуклеозид каждого сегмента крыла содержит модифицированный сахар. В определенных вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одна межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную связь. В определенных вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

В определенных вариантах осуществления изобретения соединение содержит модифицированный олигонуклеотид длиной от 12 до 80 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение представляет собой антисмысловое соединение или олигомерное соединение. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение является одноцепочечным. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение является двухцепочечным. В определенных вариантах осуществления изобретения модифицированный олигонуклеотид имеет длину от 12 до 30 связанных нуклеозидов.

В определенных вариантах осуществления изобретения соединения или композиции, в данном документе, дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

В определенных вариантах осуществления изобретения соединения или композицию вводят совместно со вторым агентом. В определенных вариантах осуществления изобретения соединения и второй агент вводят одновременно.

В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе соединения и композиции, нацеленные на SCN2A, можно использовать в способах ингибирования экспрессии SCN2A в клетке. В определенных вариантах осуществления изобретения соединения и композиции, представленные в данном документе, нацеленные на SCN2A, могут использоваться в способах лечения, предотвращения, отсрочки или облегчения заболевания или расстройства, связанного с SCN1A, включая, помимо прочего, синдром Драве

Определенные показания

Определенные варианты осуществления, предложенные в данном документе, относятся к способам ингибирования экспрессии или активности SCN2A, которые могут быть применимы для лечения, предотвращения или облегчения заболевания, ассоциированного с SCN1A, у субъекта, путем введения соединения или композиции, нацеленной на SCN2A. В определенных вариантах осуществления изобретения такое соединение или композиция содержит SCN2A-специфический ингибитор. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение содержит антисмысловое соединение или олигомерное соединение, нацеленное на SCN2A. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение содержит модифицированный олигонуклеотид, нацеленный на SCN2A.

В определенных вариантах осуществления изобретения способ ингибирования экспрессии или активности SCN2A в клетке включает приведение клетки в контакт с соединением или композицией, содержащими SCN2A-специфический ингибитор, тем самым ингибируя экспрессию или активность SCN2A в клетке. В определенных вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой нейрон. В определенных вариантах осуществления изобретения клетка находится в ткани головного мозга. В определенных вариантах осуществления изобретения, клетка находится в ткани головного мозга субъекта, который имеет расстройство, состояние, симптом или физиологический маркер, ассоциированный с расстройством SCN1A, или находится в группе риска. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание или расстройство SCN1A представляет собой синдром Драве. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание SCN1A представляет собой эпилепсию. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание SCN1A представляет собой генерализованную эпилепсию с фебрильными припадками. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание SCN1A представляет собой наследственные фебрильные припадки. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание SCN1A представляет собой раннюю младенческую эпилептическую энцефалопатию 6. В определенных вариантах осуществления изобретения SCN2A-специфический ингибитор представляет собой нуклеиновой кислотой, пептидом, антителом, небольшой молекулой или другим агентом, способным ингибировать экспрессию или активность SCN2A. В определенных вариантах осуществления изобретения SCN2A-специфический ингибитор представляет собой антисмысловое соединение или олигомерное соединение, нацеленное на SCN2A. В

определенных вариантах осуществления изобретения SCN2A-специфический ингибитор представляет собой олигонуклеотид, нацеленный на SCN2A. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композиция содержит модифицированный олигонуклеотид длиной от 8 до 80 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композиция содержит модифицированный олигонуклеотид длиной от 10 до 30 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид, может быть одноцепочечным. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид, может быть двухцепочечным.

В определенных вариантах осуществления изобретения способ лечения, предотвращения, отсрочки начала, замедления прогрессирования или улучшения одного или более из заболевания, нарушений, состояний, симптомов или физиологических маркеров, ассоциированных с SCN1A, включает введение субъекту соединения или композиции, содержащей SCN2A-специфический ингибитор. В определенных вариантах осуществления изобретения способ лечения, предотвращения, отсрочки начала, замедления прогрессирования или облегчения заболевания, расстройства, состояния, симптома или физиологического маркера, ассоциированного с заболеванием или расстройством, связанным с SCN1A у субъекта, включает введение субъекту соединения или композиции, содержащей SCN2A-специфический ингибитор, таким образом, излечивая, предотвращая, задерживая начало, замедляя прогрессирование или облегчая заболевание. В определенных вариантах осуществления изобретения субъект идентифицирован как имеющий или подверженный риску возникновения заболевания, расстройства, состояния, симптома или физиологического маркера. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание или расстройство SCN1A представляет собой синдром Драве. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание SCN1A представляет собой эпилепсию. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание SCN1A представляет собой генерализованную эпилепсию с фебрильными припадками. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание SCN1A представляет собой наследственные фебрильные припадки. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание SCN1A представляет собой раннюю младенческую эпилептическую энцефалопатию 6. В определенных вариантах осуществления, SCN2A-специфический ингибитор вводят субъекту парентерально. В определенных вариантах осуществления изобретения парентеральное введение представляет собой интрацеребровентрикулярное введение. В определенных вариантах осуществления изобретения парентеральное введение представляет собой интратекальное введение. В определенных вариантах осуществления изобретения парентеральное введение представляет собой подкожное введение. В определенных вариантах осуществления изобретения, субъектом является человек. В определенных вариантах осуществления изобретения, SCN2A-специфический ингибитор представляет собой нуклеиновую кислоту,

пептид, антитело, небольшую молекулу или другой агент, способный ингибировать экспрессию или активность SCN2A. В определенных вариантах осуществления изобретения SCN2A-специфический ингибитор содержит антисмысловое соединение или олигомерное соединение, нацеленное на SCN2A. В определенных вариантах осуществления изобретения SCN2A-специфический ингибитор представляет собой олигонуклеотид, нацеленный на SCN2A. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композиция содержит модифицированный олигонуклеотид длиной от 10 до 30 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид, может быть одноцепочечным. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид, может быть двухцепочечным.

В определенных вариантах осуществления изобретения способ уменьшения частоты припадков, уменьшения миоклонуса или мышечных спазмов, облегчения затруднений при ходьбе (периферической невропатии), спастичности, уменьшения, предотвращения начала или лечения деменции, облегчения проблем с речью, уменьшения или предотвращения появления зрительных галлюцинаций, лечения, уменьшения или предотвращения начала прогрессирующей неврологической дегенерации, лечения, уменьшения или предотвращения начала повреждения нервов, контролирующей функцию мочевого пузыря, уменьшения гипотонии, улучшения мышечного тонуса, уменьшения или предотвращения начала увеличения печени, уменьшения или предотвращения возникновения пороков сердца, уменьшения или предотвращения накопления полиглюкозановых телец в клетке, улучшения или предотвращения нарушения когнитивных функций и уменьшения атаксии или их комбинации у субъекта включает введение субъекту соединения или композиции, содержащей SCN2A-специфический ингибитор. В определенных вариантах осуществления изобретения, клетка представляет собой нейрон. В определенных вариантах осуществления изобретения введение соединения или композиции снижает частоту припадков у субъекта. В определенных вариантах осуществления изобретения введение соединения или композиции уменьшает миоклонус или мышечные спазмы у субъекта. В определенных вариантах осуществления изобретения введение соединения или композиции облегчает у субъекта трудности при ходьбе. В определенных вариантах осуществления изобретения введение соединения или композиции облегчает периферическую невропатию у субъекта. В определенных вариантах осуществления изобретения введение соединения или композиции снижает спастичность у субъекта. В определенных вариантах осуществления изобретения введение соединения или композиции снижает, предотвращает возникновение или лечит деменцию у субъекта. В определенных вариантах осуществления изобретения введение соединения или композиции облегчает проблемы с речью у субъекта. В определенных вариантах осуществления изобретения введение соединения или композиции уменьшает или предотвращает появление зрительных галлюцинаций у субъекта. В определенных вариантах осуществления изобретения введение соединения или композиции лечит, снижает или предотвращает начало прогрессирующей неврологической

дегенерации у субъекта. В определенных вариантах осуществления изобретения введение соединения или композиции лечит, уменьшает или предотвращает начало повреждения нервов, которые контролируют функцию мочевого пузыря у субъекта. В определенных вариантах осуществления изобретения введение соединения или композиции лечит, снижает или предотвращает возникновение гипотонии у субъекта. В определенных вариантах осуществления изобретения введение соединения или композиции повышает мышечный тонус у субъекта. В определенных вариантах осуществления изобретения введение соединения или композиции улучшает или предотвращает нарушение когнитивных функций. В определенных вариантах осуществления изобретения введение соединения или композиции лечит или снижает атаксию у субъекта. В определенных вариантах осуществления изобретения введение соединения или композиции лечит, уменьшает или предотвращает одно или более из длительных припадков, частых припадков, поведенческих задержек и задержек в развитии, проблем с движением и балансом, ортопедических состояний, задержки речевого развития и проблем с речью, проблем с ростом и питанием, нарушений сна, хронической инфекции, нарушения сенсорной интеграции, нарушения работы вегетативной нервной системы и потоотделения. В определенных вариантах осуществления изобретения субъект идентифицирован как имеющий или подверженный риску возникновения заболевания, расстройства, состояния, симптома или физиологического маркера, связанного с SCN1A. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание или расстройство SCN1A представляет собой синдром Драве. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание SCN1A представляет собой эпилепсию. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание SCN1A представляет собой генерализованную эпилепсию с фебрильными припадками. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание SCN1A представляет собой наследственные фебрильные припадки. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание SCN1A представляет собой раннюю младенческую эпилептическую энцефалопатию 6. В определенных вариантах осуществления, SCN2A-специфический ингибитор вводят субъекту парентерально. В определенных вариантах осуществления изобретения парентеральное введение представляет собой интрацеребровентрикулярное введение. В определенных вариантах осуществления изобретения парентеральное введение представляет собой интратекальное введение. В определенных вариантах осуществления изобретения введение представляет собой интрамедуллярное введение. В определенных вариантах осуществления изобретения парентеральное введение представляет собой подкожное введение. В определенных вариантах осуществления изобретения, субъектом является человек. В определенных вариантах осуществления изобретения SCN2A-специфический ингибитор представляет собой нуклеиновую кислоту, пептид, антитело, небольшую молекулу или другой агент, способный ингибировать экспрессию или активность SCN2A. В определенных вариантах осуществления изобретения SCN2A-специфический ингибитор представляет собой антисмысловое соединение или олигомерное соединение, нацеленное

на SCN2A. В определенных вариантах осуществления изобретения SCN2A-специфический ингибитор представляет собой олигонуклеотид, нацеленный на SCN2A. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композиция содержит модифицированный олигонуклеотид длиной от 8 до 80 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композиция содержит модифицированный олигонуклеотид длиной от 10 до 30 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид, может быть одноцепочечным. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид, может быть двухцепочечным.

В определенных вариантах осуществления изобретения, введение соединения или композиции, раскрытых в данном документе, уменьшает частоту припадков, уменьшает миоклонус или мышечные спазмы, облегчает трудности при ходьбе, снимает спастичность, уменьшает, предотвращает начало или лечит деменцию, облегчает проблемы с речью, уменьшает или предотвращает появление зрительных галлюцинаций, лечит, уменьшает или предотвращает начало прогрессирующей неврологической дегенерации, лечит, уменьшает или предотвращает начало повреждения нервов, которые контролируют функцию мочевого пузыря, уменьшает гипотонию, улучшает мышечный тонус, улучшает состояние при нарушении когнитивных функций и уменьшает атаксию или их комбинацию. В определенных вариантах осуществления изобретения припадки были независимо уменьшены по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45% или по меньшей мере на 50%. В определенных вариантах осуществления изобретения, миоклонус или мышечные спазмы были независимо уменьшены по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45% или по меньшей мере на 50%. В определенных вариантах осуществления изобретения, трудности при ходьбе были независимо облегчены по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45% или по меньшей мере на 50%. В определенных вариантах осуществления изобретения, спастичность была независимо снижена по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45% или по меньшей мере на 50%. В определенных вариантах осуществления изобретения, задержки речевого развития и проблемы с речью были независимо облегчены по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45% или по меньшей мере на 50%. В определенных вариантах осуществления изобретения, зрительные галлюцинации были независимо уменьшены по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по

меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45% или по меньшей мере на 50%. В определенных вариантах осуществления изобретения, прогрессирующая неврологическая дегенерация была независимо снижена по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45% или по меньшей мере на 50%. В определенных вариантах осуществления изобретения, прогрессирование деменции было независимо снижено по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45% или по меньшей мере на 50%. В определенных вариантах осуществления изобретения, повреждения нервов, которые контролируют функцию мочевого пузыря были независимо уменьшены по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45% или по меньшей мере на 50%. В определенных вариантах осуществления изобретения, гипотония была независимо снижена по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45% или по меньшей мере на 50%. В определенных вариантах осуществления изобретения, нарушение когнитивных функций было снижено по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45% или по меньшей мере на 50%. В определенных вариантах осуществления изобретения, атаксия снижалась по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45% или по меньшей мере на 50%. В определенных вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой нейрон.

В определенных вариантах осуществления предложены соединения и композиции, описанные в данном документе, используются в терапии. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к соединению или композиции, содержащей SCN2A-специфический ингибитор, для применения при лечении, предупреждения, отсрочки начала, замедления прогрессирования или облегчения одного или нескольких заболеваний, расстройств, состояний, симптомов или физиологических маркеров, ассоциированных с SCN1A. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к соединению или композиции для применения при лечении, предупреждения, отсрочке начала, замедления прогрессирования или облегчения заболевания или расстройства SCN1A или его симптомов или его физиологического маркера. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание или расстройство SCN1A представляет собой синдром Драве. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание SCN1A представляет собой эпилепсию. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание SCN1A представляет собой генерализованную эпилепсию с фебрильными припадками. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание SCN1A представляет собой

наследственные фебрильные припадки. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание SCN1A представляет собой раннюю младенческую эпилептическую энцефалопатию 6.

В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание или расстройство SCN1A представляет собой синдром Драве. В определенных вариантах осуществления изобретения SCN2A-специфический ингибитор представляет собой нуклеиновую кислоту, пептид, антитело, небольшую молекулу или другой агент, способный ингибировать экспрессию или активность SCN2A. В определенных вариантах осуществления изобретения SCN2A-специфический ингибитор представляет собой антисмысловое соединение или олигомерное соединение, нацеленное на SCN2A. В определенных вариантах осуществления изобретения SCN2A-специфический ингибитор представляет собой олигонуклеотид, нацеленный на SCN2A. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композиция содержит модифицированный олигонуклеотид длиной от 8 до 80 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композиция содержит модифицированный олигонуклеотид длиной от 10 до 30 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид, может быть одноцепочечным. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид, может быть двухцепочечным.

Определенные варианты осуществления относятся к соединению или композиции, включающим SCN2A-специфический ингибитор, для применения с целью уменьшения частоты припадков, уменьшения миоклонуса или мышечных спазмов, облегчения затруднений при ходьбе, уменьшения, предотвращения или лечения деменции, облегчения проблем с речью, уменьшения или предотвращения появления зрительных галлюцинаций, лечения, уменьшения или предотвращения начала прогрессирующей неврологической дегенерации, лечения, уменьшения или предотвращения начала повреждения нервов, контролирующей функцию мочевого пузыря, уменьшения гипотонии, улучшения мышечного тонуса, улучшения или предотвращения нарушения когнитивных функций и уменьшения атаксии или их комбинации у субъекта. В определенных вариантах осуществления изобретения введение соединения или композиции снижает частоту припадков у субъекта. В определенных вариантах осуществления изобретения введение соединения или композиции уменьшает миоклонус или мышечные спазмы у субъекта. В определенных вариантах осуществления изобретения введение соединения или композиции облегчает у субъекта трудности при ходьбе. В определенных вариантах осуществления изобретения введение соединения или композиции снижает, предотвращает возникновение или лечит деменцию у субъекта. В определенных вариантах осуществления изобретения введение соединения или композиции облегчает проблемы с речью у субъекта. В определенных вариантах осуществления изобретения введение соединения или композиции уменьшает или предотвращает появление зрительных галлюцинаций у

субъекта. В определенных вариантах осуществления изобретения введение соединения или композиции лечит, снижает или предотвращает начало прогрессирующей неврологической дегенерации у субъекта. В определенных вариантах осуществления изобретения введение соединения или композиции лечит, уменьшает или предотвращает начало повреждения нервов, контролирующую функцию мочевого пузыря у субъекта. В определенных вариантах осуществления изобретения введение соединения или композиции лечит, снижает или предотвращает гипотонию у субъекта. В определенных вариантах осуществления изобретения введение соединения или композиции улучшает мышечный тонус у субъекта. В определенных вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой нейрон. В определенных вариантах осуществления изобретения введение соединения или композиции улучшает или предотвращает нарушение когнитивных функций. В определенных вариантах осуществления изобретения введение соединения или композиции лечит, снижает атаксию у субъекта. В определенных вариантах осуществления изобретения субъект идентифицирован как имеющий или подверженный риску возникновения заболевания, расстройства, состояния, симптома или физиологического маркера, ассоциированного с заболеванием или расстройством SCN1A. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание или расстройство SCN1A представляет собой синдром Драве. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание SCN1A представляет собой эпилепсию. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание SCN1A представляет собой генерализованную эпилепсию с фебрильными припадками. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание SCN1A представляет собой наследственные фебрильные припадки. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание SCN1A представляет собой раннюю младенческую эпилептическую энцефалопатию 6. В определенных вариантах осуществления изобретения субъект является человеком. В определенных вариантах осуществления изобретения SCN2A-специфический ингибитор представляет собой нуклеиновую кислоту, пептид, антитело, небольшую молекулу или другой агент, способный ингибировать экспрессию или активность SCN2A. В определенных вариантах осуществления изобретения SCN2A-специфический ингибитор представляет собой антисмысловое соединение или олигомерное соединение, нацеленное на SCN2A. В определенных вариантах осуществления изобретения SCN2A-специфический ингибитор представляет собой олигонуклеотид, нацеленный на SCN2A. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композиция содержит модифицированный олигонуклеотид длиной от 8 до 80 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композиция содержит модифицированный олигонуклеотид длиной от 10 до 30 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид, может быть одноцепочечным. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид, может быть двухцепочечным.

Определенные варианты осуществления относятся к применению соединений или композиций, описанных в данном документе, для производства или приготовления лекарственного средства для терапии. Определенные варианты осуществления относятся к применению соединений или композиций, описанных в данном документе, для производства или приготовления лекарственного средства для лечения, предотвращения, отсрочки начала, замедления прогрессирования или облегчения одного или более заболеваний, расстройств, состояний, симптомов или физиологических маркеров, ассоциированных с SCN1A. В определенных вариантах осуществления соединение или композиция, описанные в данном документе, используются для производства или приготовления лекарственного средства для лечения, облегчения, отсрочки или предотвращения заболевания или расстройства SCN1A. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание или расстройство SCN1A представляет собой синдром Драве. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание SCN1A представляет собой эпилепсию. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание SCN1A представляет собой генерализованную эпилепсию с фебрильными припадками. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание SCN1A представляет собой наследственные фебрильные припадки. В определенных вариантах осуществления изобретения заболевание SCN1A представляет собой раннюю младенческую эпилептическую энцефалопатию 6. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композиция содержит нуклеиновую кислоту, пептид, антитело, небольшую молекулу или другой агент, способный ингибировать экспрессию или активность SCN2A. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композиция содержит антисмысловое соединение или олигомерное соединение, нацеленное на SCN2A. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композиция содержит олигонуклеотид, нацеленный на SCN2A. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композиция содержит модифицированный олигонуклеотид длиной от 8 до 80 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композиция содержит модифицированный олигонуклеотид длиной от 10 до 30 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композиция, содержащие модифицированный олигонуклеотид, могут быть одноцепочечными. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композиция, содержащие модифицированный олигонуклеотид, могут быть двухцепочечными.

Определенные варианты осуществления относятся к применению соединения или композиции для производства или приготовления лекарственного средства для уменьшения частоты припадков, уменьшения миоклонуса или мышечных спазмов, облегчения трудностей при ходьбе, уменьшения, предотвращения возникновения или лечения деменции, облегчения затруднения в речи, уменьшения или предотвращения появления зрительных галлюцинаций, лечения, уменьшения или предотвращения начала

прогрессирующей неврологической дегенерации, лечения, уменьшения или предотвращения начала повреждения нервов, контролирующей функцию мочевого пузыря, уменьшения гипотонии, улучшения мышечного тонуса, улучшения или предотвращения нарушения когнитивных функций, ухудшения и уменьшения атаксии или их комбинации у субъекта, имеющего или подверженного риску возникновения заболевания или расстройства SCN1A. В определенных вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой нейрон. Определенные варианты осуществления изобретения относятся к применению соединения или композиции при производстве или приготовлении лекарственного средства для уменьшения частоты припадков у субъекта. Определенные варианты осуществления изобретения относятся к применению соединения или композиции при производстве или приготовлении лекарственного средства для уменьшения миоклонуса или мышечных спазмов у субъекта. Определенные варианты осуществления изобретения относятся к применению соединения или композиции при производстве или приготовлении лекарственного средства для облегчения трудностей при ходьбе у субъекта. Определенные варианты осуществления изобретения относятся к применению соединения или композиции при производстве или приготовлении лекарственного средства для уменьшения, предотвращения начала или лечения деменции у субъекта. Определенные варианты осуществления изобретения относятся к применению соединения или композиции при производстве или приготовлении лекарственного средства, облегчающего проблемы с речью у субъекта. Определенные варианты осуществления изобретения относятся к применению соединения или композиции при производстве или приготовлении лекарственного средства, уменьшающего или предотвращающего возникновение зрительных галлюцинаций у субъекта. Определенные варианты осуществления изобретения относятся к применению соединения или композиции при производстве или приготовлении лекарственного средства для лечения, уменьшения или предотвращения начала прогрессирующей неврологической дегенерации у субъекта. Определенные варианты осуществления изобретения относятся к применению соединения или композиции при производстве или приготовлении лекарственного средства для лечения, уменьшения или предотвращения начала повреждения нервов контролирующей функцию мочевого пузыря у субъекта. Определенные варианты осуществления изобретения относятся к применению соединения или композиции при производстве или приготовлении лекарственного средства для лечения, снижения или предотвращения гипотонии у субъекта. Определенные варианты осуществления изобретения относятся к применению соединения или композиции при производстве или приготовлении лекарственного средства для улучшения мышечного тонуса у субъекта. Определенные варианты осуществления относятся к применению соединения или композиции при производстве или приготовлении лекарственного средства, снижающего атаксию у субъекта. В определенных вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой нейрон. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композиция содержит нуклеиновую кислоту, пептид, антитело, небольшую

молекулу или другой агент, способный ингибировать экспрессию или активность SCN2A. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композиция содержит антисмысловое соединение или олигомерное соединение, нацеленное на SCN2A. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композиция содержит олигонуклеотид, нацеленный на SCN2A. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композиция содержит модифицированный олигонуклеотид длиной от 8 до 80 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композиция содержит модифицированный олигонуклеотид длиной от 10 до 30 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композиция, содержащие модифицированный олигонуклеотид, могут быть одноцепочечными. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композиция, содержащие модифицированный олигонуклеотид, могут быть двухцепочечными.

В любом из вышеуказанных способов или применений соединение или композиция могут содержать антисмысловое соединение, нацеленное на SCN2A. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение содержит олигонуклеотид, например, олигонуклеотид состоящий из от 8 до 80 связанных нуклеозидов, от 10 до 30 связанных нуклеозидов, от 12 до 30 связанных нуклеозидов или 20 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления изобретения олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь, по меньшей мере один модифицированный сахар и/или по меньшей мере одно модифицированное азотистое основание. В определенных вариантах осуществления изобретения модифицированная межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатной межнуклеозидную связь, модифицированный сахар представляет собой бициклический сахар или 2'-О-метоксиэтил, а модифицированное азотистое основание представляет собой 5-метилцитозин. В определенных вариантах осуществления изобретения модифицированный олигонуклеотид содержит сегмент-гэп состоящий из связанных дезокси-нуклеозидов; сегмент 5'-крыла, состоящий из связанных нуклеозидов; и сегмент 3'-крыла, состоящий из связанных нуклеозидов; при этом сегмент-гэп расположен непосредственно между сегментом 5'-крыла и сегментом 3'-крыла и рядом с ними, и при этом каждый нуклеозид каждого сегмента крыла содержит модифицированный сахар. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение может содержать модифицированный олигонуклеотид длиной от 12 до 80 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение представляет собой антисмысловое соединение или олигомерное соединение. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение является одноцепочечным. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение является двухцепочечным. В определенных вариантах осуществления изобретения модифицированный олигонуклеотид имеет длину от 12 до 30 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления изобретения соединения или композиции, в данном документе, дополнительно содержат

фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

В любом из вышеуказанных способов или применений соединение или композиция содержит или состоит из модифицированного олигонуклеотида длиной от 12 до 30 связанных нуклеозидов, причем модифицированный олигонуклеотид содержит:

сегмент гэп, состоящий из связанных 2'-дезоксинуклеозидов;

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

сегмент 3'-крыла, состоящий из связанных нуклеозидов;

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

В любом из вышеуказанных способов или применений соединение или композицию можно вводить парентерально. Например, в определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композицию можно вводить путем инъекции или инфузии. Парентеральное введение включает подкожное введение, внутривенное введение, внутримышечное введение, внутриартериальное введение, внутрибрюшинное введение или внутрочерепное введение. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композицию вводят совместно со вторым агентом. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или композицию и второй агент вводят одновременно. В любом из вышеуказанных способов или применений соединение или композицию можно вводить интратекально. В любом из вышеуказанных способов или применений соединение или композицию можно вводить интрамедуллярно. В любом из вышеуказанных способов или применений соединение или композицию можно вводить интрацеребровентрикулярно.

Определенные соединения

В определенных вариантах осуществления изобретения соединения, описанные в данном документе, являются бессмысленными соединениями. В определенных вариантах осуществления изобретения бессмысленное соединение содержит или состоит из олигомерного соединения. В определенных вариантах осуществления изобретения олигомерное соединение содержит модифицированный олигонуклеотид. В определенных вариантах осуществления изобретения, модифицированный олигонуклеотид имеет последовательность азотистых оснований, комплементарную последовательности целевой нуклеиновой кислоты.

В определенных вариантах осуществления изобретения соединение, описанное в данном документе, содержит или состоит из модифицированного олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления изобретения, модифицированный олигонуклеотид имеет последовательность азотистых оснований, комплементарную последовательности целевой нуклеиновой кислоты.

В определенных вариантах осуществления изобретения соединение или бессмысленное соединение является одноцепочечным. Такое одноцепочечное соединение или бессмысленное соединение содержит или состоит из олигомерного соединения. В определенных вариантах осуществления изобретения такое олигомерное соединение

содержит или состоит из олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления изобретения олигонуклеотид представляет собой антисмысловой олигонуклеотид. В определенных вариантах осуществления изобретения олигонуклеотид является модифицированным. В определенных вариантах осуществления изобретения олигонуклеотид одноцепочечного антисмыслового соединения или олигомерного соединения содержит самокомплементарную последовательность азотистых оснований.

В определенных вариантах осуществления изобретения соединения являются двухцепочечными. Такие двухцепочечные соединения содержат первый модифицированный олигонуклеотид, имеющий область, комплементарную целевой нуклеиновой кислоте, и второй модифицированный олигонуклеотид, имеющий область, комплементарную первому модифицированному олигонуклеотиду. В определенных вариантах осуществления изобретения модифицированный олигонуклеотид представляет собой РНК-олигонуклеотид. В определенных вариантах осуществления изобретения азотистое основание тимин в модифицированном олигонуклеотиде заменено на азотистое основание урацил. В определенных вариантах осуществления изобретения соединение содержит группу конъюгата. В определенных вариантах осуществления изобретения, каждый модифицированный олигонуклеотид имеет длину 12-30 связанных нуклеозидов.

В определенных вариантах осуществления изобретения соединения являются двухцепочечными. Такие двухцепочечные соединения содержат первое олигомерное соединение, имеющее область, комплементарную целевой нуклеиновой кислоте, и второе олигомерное соединение, имеющее область, комплементарную первому олигомерному соединению. Первое олигомерное соединение таких двухцепочечных соединений обычно содержит или состоит из модифицированного олигонуклеотида. Олигонуклеотид второго олигомерного соединения такого двухцепочечного соединения может быть модифицированным или немодифицированным. Олигомерные соединения двухцепочечных соединений могут включать некомплементарные выступающие нуклеозиды.

Примеры одноцепочечных и двухцепочечных соединений включают, но не ограничиваются ими, олигонуклеотиды, киРНК, олигонуклеотиды, нацеленные на микроРНК, и соединения одноцепочечной РНКи, такие как малые шпилечные РНК (мшРНК), одноцепочечные миРНК (оцРНК) и имитаторы микроРНК.

В определенных вариантах осуществления соединения, описанное в данном документе, имеет последовательность азотистых оснований, которая, при записи в направлении от 5'- к 3'-концу, включает обратный комплемент целевого сегмента и целевой нуклеиновой кислоты, на которую оно нацелено.

В определенных вариантах осуществления соединения, описанное в данном документе, содержит олигонуклеотид длиной от 10 до 30 связанных субъединиц. В определенных вариантах осуществления соединения, описанное в данном документе, содержит олигонуклеотид длиной от 12 до 30 связанных субъединиц. В определенных вариантах осуществления соединения, описанное в данном документе, содержит

до 50, от 15 до 30, от 15 до 50, от 16 до 30, от 16 до 50, от 17 до 30, от 17 до 50, от 18 до 22, от 18 до 24, от 18 до 30, от 18 до 50, от 19 до 22, от 19 до 30, от 19 до 50 или от 20 до 30 связанных субъединиц. В определенных таких вариантах осуществления соединение, описанное в данном документе, содержит олигонуклеотид длиной 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 связанных субъединиц или в диапазоне длин, определяемом любыми двумя из вышеуказанных значений. В определенных вариантах осуществления связанные субъединицы представляют собой нуклеотиды, нуклеозиды или азотистые основания.

В определенных вариантах осуществления соединения могут быть сокращены или усечены. Например, отдельная субъединица может быть удалена из 5'-конца (5'-усечение) или, альтернативно, из 3'-конца (3'-усечение). Укороченное или усеченное соединение, нацеленное на нуклеиновую кислоту SCN2A, может иметь две субъединицы, удаленные из 5'-конца или альтернативно может иметь две субъединицы, удаленные из 3'-конца соединения. В альтернативном варианте, удаленные нуклеозиды могут быть распределены по всему соединению.

Когда одна дополнительная субъединица присутствует в удлиненном соединении, дополнительная субъединица может располагаться на 5'- или 3'-конце соединения. Когда присутствуют две или более дополнительных субъединиц, добавленные субъединицы могут быть смежными друг с другом, например, в соединении, имеющем две субъединицы, добавленные к 5'-концу (5'-добавление) или, альтернативно, к 3'-концу (3'-добавление) соединения. В альтернативном варианте, добавленные субъединицы могут быть распределены по всему соединению.

Существует возможность увеличивать или уменьшать длину соединения, такого как олигонуклеотид, и/или вводить ошибочно спаренные основания без устранения активности (Например, Woolf et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7305-7309, 1992; Gautschi et al. *J. Natl. Cancer Inst.* 93:463-471, March 2001; Maher and Dolnick *Nuc. Acid. Res.* 16:3341-3358, 1988). Однако, кажущиеся незначительными изменения в олигонуклеотидной последовательности, химическом составе и мотиве могут иметь большие различия в одном или нескольких из многих свойств, необходимых для клинической разработки (Seth et al. *J. Med. Chem.*, 52, 10, 2009; Egli et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 16642, 2011).

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, представляют собой соединения интерферирующей РНК (РНКи), которые включают соединения двухцепочечной РНК (также называемой короткой интерферирующей РНК или киРНК) и соединения одноцепочечной РНКи (или оцРНК). Такие соединения работают по меньшей мере частично через путь RISC, чтобы деградировать и/или секвестрировать целевую нуклеиновую кислоту (таким образом, включают соединения микроРНК/имитаторы микроРНК). Используемый в данном документе термин миРНК означает эквивалентные другим терминам, используемым для

описания молекул нуклеиновых кислот, которые могут опосредовать специфичные для последовательности РНКи, например короткую интерферирующую РНК (киРНК), двухцепочечную РНК (дцРНК), микро-РНК (миРНК), короткую шпилечную РНК (кшРНК), короткий интерферирующий олигонуклеотид, короткую интерферирующую нуклеиновую кислоту, короткий интерферирующий модифицированный олигонуклеотид, химически модифицированную миРНК, РНК посттранскрипционного сайленсинга генов (птсгРНК) и другие. Кроме того, используемый в данном документе термин «РНКи» означает, что он эквивалентен другим терминам, используемым для описания специфической для последовательности РНК-интерференции, такой как посттранскрипционный сайлесинг генов, ингибирование трансляции или эпигенетика.

В определенных вариантах осуществления двухцепочечное соединение содержит первую цепь, имеющую последовательность азотистых оснований, комплементарную целевой области нуклеиновой кислоты SCN2A, и вторую цепь. В определенных вариантах осуществления двухцепочечное соединение содержит рибонуклеотиды, в которых первая цепь содержит урацил (U) вместо тимина (T) и является комплементарной целевой области. В определенных вариантах осуществления двухцепочечное соединение содержит (i) первую цепь, содержащую последовательность азотистых оснований, комплементарную целевой области нуклеиновой кислоты SCN2A, и (ii) вторую цепь. В определенных вариантах осуществления двухцепочечное соединение содержит один или более модифицированных нуклеотидов, в которых в положении 2' сахара содержится галоген (такой как фторидная группа, 2'-F) или содержится алкоксигруппа (такая как метоксигруппа; 2'-ОМе). В определенных вариантах осуществления двухцепочечное соединение содержит по меньшей мере одну модификацию 2'-F сахара и по меньшей мере одну модификацию 2'-ОМе сахара. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна модификация 2'-F сахара и по меньшей мере одна модификация 2'-ОМе сахара расположены в чередующемся порядке по меньшей мере для 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных азотистых оснований вдоль цепи соединения дцРНК. В определенных вариантах осуществления двухцепочечное соединение включает одну или более связей между соседними нуклеотидами, кроме встречающейся в природе фосфодиэфирной связи. Примеры таких связей включают фосфорамидные, фосфоротиоатные и фосфородитиоатные связи. Двухцепочечные соединения могут также представлять собой молекулы химически модифицированной нуклеиновой кислоты, как указано в патенте США №6 673 661. В других вариантах осуществления изобретения дцРНК содержит одну или две кэпированных цепей, как описано, например, в WO 00/63364, поданной 19 апреля 2000 года. В определенных вариантах осуществления первая цепь двухцепочечного соединения представляет собой направляющую цепь киРНК, а вторая цепь двухцепочечного соединения представляет собой «сопровождающую» цепь миРНК. В определенных вариантах осуществления вторая цепь двухцепочечного соединения является комплементарной первой цепи. В определенных вариантах осуществления каждая цепь двухцепочечного соединения состоит из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 связанных

нуклеозидов.

В определенных вариантах осуществления одноцепочечное соединение, описанное в данном документе, может содержать любую из олигонуклеотидных последовательностей, нацеленных на SCN2A, описанных в данном документе. В определенных вариантах осуществления такое одноцепочечное соединение представляет собой соединение одноцепочечной РНКи (оцРНКи). В определенных вариантах осуществления соединение оцРНКи содержит последовательность азотистых оснований, комплементарную целевой области нуклеиновой кислоты SCN2A. В определенных вариантах осуществления соединение оцРНКи содержит рибонуклеотиды, в которых урацил (U) заменен тиминном (T). В определенных вариантах осуществления соединение оцРНКи содержит последовательность азотистых оснований, комплементарную целевой области нуклеиновой кислоты SCN2A. В определенных вариантах осуществления соединение оцРНКи содержит один или более модифицированных нуклеотидов, в которых в положении 2' сахара содержится галоген (такой как фторидная группа, 2'-F) или содержится алкоксигруппа (такая как метоксигруппа; 2'-OMe). В определенных вариантах осуществления соединение оцРНКи содержит по меньшей мере одну модификацию 2'-F сахара и по меньшей мере одну модификацию 2'-OMe сахара. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна модификация 2'-F сахара и по меньшей мере одна модификация 2'-OMe сахара расположены в чередующемся порядке по меньшей мере для 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных азотистых оснований вдоль цепи соединения оцРНКи. В определенных вариантах осуществления соединение оцРНКи содержит одну или более связей между соседними нуклеотидами, кроме встречающейся в природе фосфодиэфирной связи. Примеры таких связей включают фосфорамидные, фосфоротиоатные и фосфородитиоатные связи. Соединения оцРНКи могут также представлять собой молекулы химически модифицированной нуклеиновой кислоты, как указано в патенте США № 6 673 661. В других вариантах осуществления дцРНКи содержит одну или две кэпированных цепей, как описано, например, в WO 00/63364, поданной 19 апреля 2000 года. В определенных вариантах осуществления соединение оцРНКи состоит из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 связанных нуклеозидов.

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат модифицированные олигонуклеотиды. Определенные модифицированные олигонуклеотиды имеют один или более асимметричных центров и, таким образом, образуют энантимеры, диастереомеры и другие стереоизомерные конфигурации, которые могут быть определены с точки зрения абсолютной стереохимии как (R) или (S), как α или β , например, для аномеров сахаров, или как (D) или (L), например, для аминокислот и т.д. В предложенные в данном документе модифицированные олигонуклеотиды включены все такие возможные изомеры, включая их рацемические и оптически чистые формы, если не указано иное. Аналогичным образом, все цис- и транс-изомеры, а также таутомерные формы также включены в настоящее изобретение.

Определенные механизмы

В определенных вариантах осуществления изобретения соединения, описанные в данном документе, содержат модифицированные олигонуклеотиды или состоят из них. В определенных вариантах осуществления изобретения соединения, описанные в данном документе, являются бессмысленными соединениями. В определенных вариантах осуществления изобретения, такие бессмысленные соединения содержат олигомерные соединения. В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, способны гибридизоваться с целевой нуклеиновой кислотой, что приводит к по меньшей мере одной бессмысленной активности. В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, избирательно воздействуют на одну или более целевых нуклеиновых кислот. Такие селективные соединения содержат последовательность азотистых оснований, способных гибридизоваться с одной или более целевыми нуклеиновыми кислотами, что приводит к одной или более нужным бессмысленным активностям и не способных гибридизоваться с одной или более нецелевыми нуклеиновыми кислотами, или не способных гибридизоваться с одной или более нецелевыми нуклеиновыми кислотами таким образом, что приводит к значительной нежелательной бессмысленной активности.

При определенных бессмысленных активностях гибридизация соединения, описанного в данном документе, с целевой нуклеиновой кислотой приводит к привлечению белка, который расщепляет целевую нуклеиновую кислоту. Например, определенные соединения, описанные в данном документе, приводят к опосредованному РНазой Н расщеплению целевой молекулы нуклеиновой кислоты. РНаза Н представляет собой клеточную эндонуклеазу, которая катализирует расщепление цепи РНК в составе дуплекса РНК:ДНК. ДНК в таком дуплексе РНК:ДНК необязательно должна быть немодифицированной ДНК. В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, являются достаточно «ДНК-подобными», чтобы вызывать активность РНазы Н. Кроме того, в определенных вариантах осуществления допускается наличие одного или более не ДНК-подобных нуклеозидов в гэпе гэмпера.

В определенных бессмысленных активностях, описанные в данном документе соединения или часть соединения включаются в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC), что в конечном итоге приводит к расщеплению целевой нуклеиновой кислоты. Например, определенные соединения, описанные в данном документе, приводят к расщеплению целевой нуклеиновой кислоты с помощью Argonaute. Соединения, загружаемые в RISC, представляют собой соединения РНКи. Соединения РНКи могут быть двухцепочечными (киРНК) или одноцепочечными (оцРНК).

В определенных вариантах осуществления гибридизация описанных в данном документе соединений с целевой нуклеиновой кислотой не приводит к привлечению белка, который расщепляет эту целевую нуклеиновую кислоту. В определенных таких вариантах осуществления гибридизация соединения с целевой нуклеиновой кислотой приводит к изменению сплайсинга целевой нуклеиновой кислоты. В определенных вариантах осуществления гибридизация соединения с целевой нуклеиновой кислотой приводит к

ингибированию связывающего взаимодействия между целевой нуклеиновой кислотой и белком или другой нуклеиновой кислотой. В определенных таких вариантах осуществления гибридизация соединения с целевой нуклеиновой кислотой приводит к изменению трансляции целевой нуклеиновой кислоты.

Антисмысловая активность может наблюдаться прямо или косвенно. В определенных вариантах осуществления наблюдение или обнаружение антисмысловой активности включает наблюдение или обнаружение изменения количества целевой нуклеиновой кислоты или белка, кодируемого такой целевой нуклеиновой кислотой, изменение соотношения вариантов сплайсинга нуклеиновой кислоты или белка, и/или фенотипическое изменение в клетке или у животного.

Целевые нуклеиновые кислоты, целевые области и нуклеотидные последовательности

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат или состоят из олигонуклеотида, содержащего область, комплементарную целевой нуклеиновой кислоте. В определенных вариантах осуществления целевая нуклеиновая кислота представляет собой эндогенную молекулу РНК. В определенных вариантах осуществления целевая нуклеиновая кислота выбрана из мРНК и пре-мРНК, включая интронные, экзонные и нетранслируемые области. В определенных вариантах осуществления целевая нуклеиновая кислота представляет собой пре-мРНК. В определенных вариантах осуществления целевая область полностью находится внутри интрона. В определенных вариантах осуществления целевая область охватывает соединение интрон/экзон. В определенных вариантах осуществления целевая область составляет по меньшей мере 50% внутри интрона.

Последовательности генов человека, кодирующих SCN2A, описаны в данной области техники (HGNC: 10588; Entrez Gene: 6326; Ensembl: ENSG00000136531; OMIM: 182390; UniProtKB: Q99250). Таким образом, транскрипт мРНК SCN2A может называться мРНК SCN2A или мРНК NAV1.2, включая пре-мРНК. мРНК SCN2A включает, например, последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность с номером доступа в GenBank NP_066287.2 (например, GenBank NM_021007.2, GI: 93141209), а также другие варианты сплайсинга/транскрипта мРНК (например, номер доступа в GenBank: NM_001040143.1, GI: 93141213; NM_001040142.1, GI: 93141211; или другие известные варианты). Таким образом, транскрипт мРНК SCN2A может называться мРНК SCN2A или мРНК NAV2.1, включая пре-мРНК.

Последовательности генов человека, кодирующих SCN1A, описаны в данной области техники (HGNC: 10585; Entrez Gene 6323; Ensembl: ENSG00000144285; OMIM: 182389; UniProtKB: P35498). Таким образом, транскрипт мРНК SCN1A может называться мРНК SCN1A или мРНК NAV1.1, включая пре-мРНК.

Гибридизация

В некоторых вариантах осуществления изобретения гибридизация происходит между соединением, раскрытым в данном документе, и нуклеиновой кислотой SCN2A.

Наиболее распространенный механизм гибридизации включает образование водородных связей (например, водородной связи Уотсона - Крика, Хугстина или обратной водородной связи Хугстина) между комплементарными азотистыми основаниями молекул нуклеиновых кислот.

Гибридизация может происходить в различных условиях. Условия гибридизации зависят от последовательности и определяются природой и составом молекул нуклеиновой кислоты, подлежащих гибридизации.

Способы определения того, является ли последовательность специфически гибридизуемой с целевой нуклеиновой кислотой, хорошо известны в данной области техники. В определенных вариантах осуществления изобретения соединения, предложенные в данном документе, способны специфично гибридизоваться с нуклеиновой кислотой SCN2A.

Комплементарность

Известно, что олигонуклеотид является комплементарным другой нуклеиновой кислоте, когда последовательность азотистых оснований такого олигонуклеотида или одной или более его областей совпадает с последовательностью азотистых оснований другого олигонуклеотида или нуклеиновой кислоты или одной или более их областей, когда две последовательности азотистых оснований выровнены в противоположных направлениях. Соответствующие азотистые основания или комплементарные азотистые основания, как описано в данном документе, ограничиваются аденином (A) и тиминном (T), аденином (A) и урацилом (U), цитозином (C) и гуанином (G) и 5-метилцитозином (mC) и гуанином (G), если не указано иное. Комплементарные олигонуклеотиды и/или нуклеиновые кислоты не обязательно должны иметь комплементарность азотистых оснований для каждого нуклеозида и могут включать одно или более ошибочных спариваний азотистых оснований. Олигонуклеотид является полностью комплементарным или на 100% комплементарным, если такие олигонуклеотиды имеют совпадения азотистых оснований в каждом нуклеозиде без каких-либо ошибочно спаренных азотистых оснований.

В определенных вариантах осуществления изобретения соединения, описанные в данном документе, содержат модифицированные олигонуклеотиды или состоят из них. В определенных вариантах осуществления изобретения соединения, описанные в данном документе, являются бессмысленными соединениями. В определенных вариантах осуществления соединения содержат олигомерные соединения. Некомплементарные азотистые основания между соединением и нуклеиновой кислотой SCN2A могут быть допустимыми при условии, что соединение остается способным специфически гибридизоваться с целевой нуклеиновой кислотой. Более того, соединение может гибридизоваться с одним или более сегментами нуклеиновой кислоты SCN2A, при этом промежуточные или соседние сегменты не задействованы в гибридизации (например, петлевая структура, ошибочное спаривание или шпилькообразная структура).

В определенных вариантах осуществления соединения, предложенные в данном

документе, или их определенная часть, являются или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% комплементарными нуклеиновой кислоте SCN2A, целевой области, целевому сегменту или их определенной части. Процент комплементарности соединения с целевой нуклеиновой кислотой может быть определен с использованием стандартных методов.

Например, соединение, в котором 18 из 20 нуклеотидов соединения являются комплементарными к целевой области и поэтому будут специфически гибридизоваться, имеет 90% комплементарности. В данном примере оставшиеся некомплементарные азотистые основания могут быть расположены кластерно или перемежаться с комплементарными азотистыми основаниями и необязательно должны быть смежными друг с другом или комплементарными азотистым основаниям. Таким образом, соединение длина которого составляет 18 азотистых оснований, содержащее четыре некомплементарных азотистых основания, фланкированных двумя участками полной комплементарности с целевой нуклеиновой кислотой, обладает 77,8% общей комплементарностью с целевой нуклеиновой кислотой, и таким образом, входит в пределы объема настоящего изобретения. Процент комплементарности соединения к области целевой нуклеиновой кислоты может быть определен стандартными методами с применением компьютерной программы BLAST (основной инструмент поиска локальных выравниваний) и программ PowerBLAST, известных из уровня техники (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1990, 215, 403-410; Zhang and Madden, *Genome Res.*, 1997, 7, 649-656). Процент гомологии, идентичность или комплементарность последовательностей, могут быть определены, например, программой Gap (висконсинский пакет анализа последовательностей, версия 8 для Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Мэдисон, штат Висконсин), с использованием настроек по умолчанию, в которых используется алгоритм Смита и Уотермана (*Adv. Appl. Math.*, 1981, 2, 482-489).

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, или их определенные части являются полностью комплементарными (т.е. на 100% комплементарными) целевой нуклеиновой кислоте или ее определенной части. Например, соединение может быть полностью комплементарным нуклеиновой кислоте SCN2A или ее целевой области или целевому сегменту или целевой последовательности. В контексте данного документа «полностью комплементарный» означает, что каждое азотистое основание соединения способно точно спариваться с соответствующими азотистыми основаниями целевой нуклеиновой кислоты. Например, соединение из 20 азотистых оснований является полностью комплементарным целевой последовательности длиной 400 азотистых оснований, при условии, что существует соответствующая часть целевой нуклеиновой кислоты из 20 азотистых оснований, которая является полностью комплементарной указанному соединению. Полностью комплементарный может также использоваться в отношении определенной части первой и/или второй нуклеиновой кислоты. Например, часть из 20 азотистых оснований соединения, состоящего из 30 азотистых оснований, может быть «полностью комплементарным» целевой

последовательности длиной 400 азотистых оснований. Часть из 20 азотистых оснований олигонуклеотида, состоящего из 30 азотистых оснований, является полностью комплементарным целевой последовательности, если целевая последовательность имеет соответствующую часть из 20 азотистых оснований, при этом каждое азотистое основание является комплементарным части из 20 азотистых оснований соединения. В то же время, все соединение из 30 азотистых оснований может быть полностью или не полностью комплементарным целевой последовательности в зависимости от того, будут ли остальные 10 азотистых оснований соединения также комплементарными целевой последовательности.

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат одно или более ошибочно спаренных азотистых оснований относительно целевой нуклеиновой кислоты. В определенных таких вариантах осуществления антисмысловая активность против целевой нуклеиновой кислоты снижается за счет такого ошибочного спаривания, но активность против нецелевой нуклеиновой кислоты снижается в большей степени. Таким образом, в определенных таких вариантах осуществления изобретения улучшается селективность соединения. В определенных вариантах осуществления ошибочное спаривание специфически расположено внутри олигонуклеотида, имеющего гэммерный мотив. В определенных таких вариантах осуществления изобретения, ошибочное спаривание находится в положении 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 от 5'-конца области гэпа. В определенных таких вариантах осуществления изобретения, ошибочное спаривание находится в положении 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 от 3'-конца области гэпа. В определенных вариантах осуществления изобретения, ошибочное спаривание находится в положении 1, 2, 3 или 4 от 5'-конца области крыла. В определенных вариантах осуществления изобретения, ошибочное спаривание находится в положении 4, 3, 2 или 1 от 3'-конца области крыла. В определенных вариантах осуществления изобретения, ошибочное спаривание специфически расположено внутри олигонуклеотида, не содержащего гэммерный мотив. В определенных таких вариантах осуществления ошибочное спаривание находится в положении 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 от 5'-конца олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления изобретения ошибочное спаривание находится в положении 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 от 3'-конца олигонуклеотида.

Некомплементарное азотистое основание может располагаться на 5'-конце или 3'-конце соединения. В альтернативном варианте, некомплементарное азотистое основание или азотистые основания нуклеотидов могут находиться во внутреннем положении соединения. Если присутствуют два или более некомплементарных азотистых оснований, они могут быть смежными (т.е. связанными) или несмежными. В одном варианте осуществления изобретения некомплементарное азотистое основание располагается в сегменте крыла гэммера олигонуклеотида.

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, длина которых равна или составляет до 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20

азотистых оснований, содержат не более 4, не более 3, не более 2 или не более 1 некомплементарного азотистого основания относительно целевой нуклеиновой кислоты, такой как нуклеиновая кислота SCN2A, или ее указанной части.

В определенных вариантах осуществления изобретения соединения, описанные в данном документе, длина которых равна или составляет до 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 азотистых оснований, содержат не более 6, не более 5, не более 4, не более 3, не более 2 или не более 1 некомплементарного азотистого основания относительно целевой нуклеиновой кислоты, такой как нуклеиновая кислота SCN2A, или ее указанной части.

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, также включают те, которые являются комплементарными части целевой нуклеиновой кислоты. В данном контексте «часть» относится к определенному количеству смежных (т.е. связанных) азотистых оснований в пределах области или сегмента целевой нуклеиновой кислоты. «Часть» может также относиться к определенному количеству смежных азотистых оснований соединения. В определенных вариантах осуществления изобретения соединения являются комплементарными части целевого сегмента из по меньшей мере 8 азотистых оснований. В определенных вариантах осуществления изобретения соединения являются комплементарными части целевого сегмента из по меньшей мере 9 азотистых оснований. В определенных вариантах осуществления изобретения соединения являются комплементарными части целевого сегмента из по меньшей мере 10 азотистых оснований. В определенных вариантах осуществления изобретения соединения являются комплементарными части целевого сегмента из по меньшей мере 11 азотистых оснований. В определенных вариантах осуществления изобретения соединения являются комплементарными части целевого сегмента из по меньшей мере 12 азотистых оснований. В определенных вариантах осуществления изобретения соединения являются комплементарными части целевого сегмента из по меньшей мере 13 азотистых оснований. В определенных вариантах осуществления изобретения соединения являются комплементарными части целевого сегмента из по меньшей мере 14 азотистых оснований. В определенных вариантах осуществления изобретения соединения являются комплементарными части целевого сегмента из по меньшей мере 15 азотистых оснований. Также предусмотрены соединения, которые являются комплементарными части из по меньшей мере 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более азотистых оснований целевого сегмента, или диапазона, определяемого любыми двумя из указанных значений.

Идентичность

Соединения, представленные в данном документе, также могут иметь определенный процент идентичности конкретной нуклеотидной последовательности, SEQ ID NO, или соединению, представленному конкретным номером Isis, или его части. В определенных

вариантах осуществления изобретения соединения, описанные в данном документе, представляют собой бессмысловые соединения или олигомерные соединения. В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, представляют собой модифицированные олигонуклеотиды. В контексте данного документа соединение является идентичным последовательности, описанной в данном документе, если оно имеет такую же способность к спариванию азотистых оснований. Например, РНК, которая содержит урацил вместо тимидина в описанной последовательности ДНК, будет считаться идентичной последовательности ДНК, поскольку и урацил, и тимидин спариваются с аденином. Предусмотрены также укороченные и удлиненные варианты соединений, описанных в данном документе, а также соединений, имеющих неидентичные основания по отношению к соединениям, предложенным в данном документе. Неидентичные основания могут быть смежными друг с другом или диспергированными по всему соединению. Процент идентичности соединения рассчитывают по количеству оснований, которые имеют идентичное спаривание оснований, относительно последовательности, с которой проводится сравнение.

В определенных вариантах осуществления изобретения соединения, описанные в данном документе, или их части по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны одному или более соединениям или SEQ ID NO, или их части, как описано в данном документе. В определенных вариантах осуществления изобретения соединения, описанные в данном документе, или их части по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны или любой процент между такими значениями конкретной нуклеотидной последовательности, SEQ ID NO, или соединения, представленного конкретным числом Isis, или его частью, в котором соединения содержат олигонуклеотид, имеющий одно или более ошибочно спаренных азотистых оснований. В определенных таких вариантах осуществления ошибочное спаривание находится в положении 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 от 5'-конца олигонуклеотида. В определенных таких вариантах осуществления изобретения ошибочное спаривание находится в положении 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 от 3'-конца олигонуклеотида.

В определенных вариантах осуществления изобретения соединения, описанные в данном документе, являются бессмысловыми соединениями. В определенных вариантах осуществления изобретения часть соединения сравнивают с равной по длине частью целевой нуклеиновой кислоты. В определенных вариантах осуществления изобретения сравнивают часть из 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 азотистых оснований с равной по длине частью целевой нуклеиновой кислоты.

В определенных вариантах осуществления изобретения соединения, описанные в данном документе, представляют собой олигонуклеотиды. В определенных вариантах осуществления изобретения часть олигонуклеотида сравнивают с равной по длине частью целевой нуклеиновой кислоты. В определенных вариантах осуществления изобретения сравнивают часть из 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25

азотистых оснований с равной по длине частью целевой нуклеиновой кислоты.

Определенные модифицированные соединения

В определенных вариантах осуществления изобретения соединения, описанные в данном документе, содержат или состоят из олигонуклеотидов, состоящих из связанных нуклеозидов. Олигонуклеотиды могут быть немодифицированными олигонуклеотидами (РНК или ДНК) или могут быть модифицированными олигонуклеотидами. Модифицированные олигонуклеотиды содержат по меньшей мере одну модификацию относительно немодифицированной РНК или ДНК (т.е. содержат по меньшей мере один модифицированный нуклеозид (содержащий модифицированный сахарный фрагмент и/или модифицированное азотистое основание), и/или по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь).

Модифицированные нуклеозиды

Модифицированные нуклеозиды содержат модифицированный сахарный фрагмент или модифицированное азотистое основание, или и модифицированный сахарный фрагмент, и модифицированное азотистое основание.

1. Модифицированные сахарные фрагменты

В определенных вариантах осуществления изобретения сахарные фрагменты представляют собой небциклические модифицированные сахарные фрагменты. В определенных вариантах осуществления модифицированные сахарные фрагменты являются бициклическими или трициклическими сахарными фрагментами. В определенных вариантах осуществления модифицированные сахарные фрагменты представляют собой заменители сахара. Такие заменители сахара могут содержать одну или более замен, соответствующих заменам других типов модифицированных сахарных фрагментов.

В определенных вариантах осуществления модифицированные сахарные фрагменты представляют собой небциклические модифицированные сахарные фрагменты, содержащие фуранозильное кольцо с одним или более ациклическими заместителями, включая, но не ограничиваются ими, заместители в положениях 2', 4' и/или 5'. В определенных вариантах осуществления изобретения один или более ациклических заместителей небциклических модифицированных сахарных фрагментов являются разветвленными. Примеры 2'-заместителей, подходящих для небциклических модифицированных сахарных фрагментов, включают, но не ограничиваются ими: 2'-F, 2'-OCH₃ («ОМе» или «О-метил») и 2'-O(CH₂)₂OCH₃ («МОЕ»). В определенных вариантах осуществления изобретения, заместитель в 2'-положении также может быть выбран из галогена, аллила, амина, азидо, тио, CN, OCN, CF₃, OCF₃, O-C₁-C₁₀ алкокси, O-C₁-C₁₀ замещенного алкокси, O-C₁-C₁₀ алкила, O-C₁-C₁₀ замещенного алкила, S-алкила, N(R_m)-алкила, O-алкенила, S-алкенила, N(R_m)-алкенила, O-алкинила, S-алкинила, N(R_m)-алкинила, O-алкиленил-O-алкила, алкинила, алкарила, аралкиал, O-алкариа, O-аралкила, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂ON(R_m)(R_n) или OCH₂C(=O)-N(R_m)(R_n), где каждый R_m и R_n независимо представляет собой H или замещенный или незамещенный C₁-C₁₀ алкил и 2'-

заместители, описанные в Cook et al., US 6,531,584; Cook et al., патенте США 5 859 221; и Cook et al., патенте США 6 005 087. Определенные варианты осуществления этих 2'-заместителей могут быть дополнительно замещены одной или более группами заместителей, независимо выбранными из: гидроксила, amino, алкокси, карбокси, бензила, фенила, нитро (NO₂), тиола, тиоалкокси, тиоалкила, галогена, алкила, арила, алкенила и алкинила. Примеры 4'-заместителей, подходящих для линейно небициклических модифицированных сахарных фрагментов, включают, но не ограничиваются ими, алкокси (*например*, метокси), алкил и группы, описанные в Manoharan et al., WO 2015/106128. Примеры 5'-заместителей, подходящих для небициклических модифицированных сахарных фрагментов, включают, но не ограничиваются ими: 5'-метил (R или S), 5'-винил и 5'-метокси. В определенных вариантах осуществления изобретения небициклические модифицированные сахара содержат более одного немостикового заместителя сахара, например, 2'-F-5'-метилсахарные фрагменты и модифицированные сахарные фрагменты и модифицированные нуклеозиды, описанные в Migawa et al., WO 2008/101157 и Rajeev et al., US2013/0203836.

В определенных вариантах осуществления 2'-замещенный нуклеозид или 2'-небициклический модифицированный нуклеозид содержит сахарный фрагмент, содержащий линейную 2'-замещающую группу, выбранную из: F, NH₂, N₃, OCF₃, OCH₃, O(CH₂)₃NH₂, CH₂CH=CH₂, OCH₂CH=CH₂, OCH₂CH₂OCH₃, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂ON(R_m)(R_n), O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂ и N-замещенного ацетамида (OCH₂C(=O)-N(R_m)(R_n)), где каждый R_m и R_n независимо представляет собой H, аминоксильную группу или замещенный или незамещенный C₁-C₁₀ алкил.

В определенных вариантах осуществления 2'-замещенный нуклеозид или 2'-небициклический модифицированный нуклеозид содержит сахарный фрагмент, содержащий линейную 2'-замещающую группу, выбранную из: F, OCF₃, OCH₃, OCH₂CH₂OCH₃, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂ и OCH₂C(=O)-N(H)CH₃ («NMA»).

В определенных вариантах осуществления 2'-замещенный нуклеозид или 2'-небициклический модифицированный нуклеозид содержит фрагмент сахара, содержащий линейную 2'-замещающую группу, выбранную из: F, OCH₃ и OCH₂CH₂OCH₃.

Нуклеозиды, содержащие модифицированные сахарные фрагменты, такие как небициклические модифицированные сахарные фрагменты, обозначаются положением(ями) замены(замен) на сахарном фрагменте нуклеозида. Например, нуклеозиды, содержащие 2'-замещенные или 2-модифицированные сахарные фрагменты, называются 2'-замещенными нуклеозидами или 2-модифицированными нуклеозидами.

Определенные модифицированные сахарные фрагменты содержат мостиковый заместитель сахара, который образует второе кольцо, в результате чего образуется бициклический сахарный фрагмент. В определенных таких вариантах осуществления бициклический сахарный фрагмент содержит мостик между 4' и 2' атомами фуранозного кольца. Примеры таких 4'-2'-мостиковых заместителей, включают, но не ограничиваются

ими: 4'-CH₂-2', 4'-(CH₂)₂-2', 4'-(CH₂)₃-2', 4'-CH₂-O-2' («LNA»), 4'-CH₂-S-2', 4'-(CH₂)₂-O-2' («ENA»), 4'-CH(CH₃)-O-2' (называемый «затрудненный этил» или «сEt» в S-конфигурации), 4'-CH₂-O-CH₂-2', 4'-CH₂-N(R)-2', 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' («затрудненный МОЕ» или «сМОЕ») и их аналоги (см., например, Seth et al., патент США № 7 399 845, Bhat et al., патент США № 7 569 686, Swayze et al., патент США № 7 741 457. и Swayze et al., патент США № 8 022 193), 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' и их аналоги (см., например, Seth et al., патент США № 8 278 283), 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' и его аналоги (см., например, Prakash et al., патент США № 8 278 425), 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (см., например, Allerson et al., патент США № 7 696 345 и Allerson et al., патент США № 8 124 745), 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (см., например, Zhou, et al., *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134), 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' и его аналоги (см., например, Seth et al., патент США №8 278 426), 4'-C(R_aR_b)-N(R)-O-2', 4'-C(R_aR_b)-O-N(R)-2', 4'-CH₂-O-N(R)-2' и 4'-CH₂-N(R)-O-2', где каждый R, R_a и R_b независимо представляет собой H, защитную группу или C₁-C₁₂ алкил (см., например, Imanishi et al., патент США № 7 427 672).

В определенных вариантах осуществления изобретения такие 4'-2' мостики независимо содержат от 1 до 4 связанных групп, независимо выбранных из: -[C(R_a)(R_b)]_n-, -[C(R_a)(R_b)]_n-O-, -C(R_a)=C(R_b)-, -C(R_a)=N-, -C(=NR_a)-, -C(=O)-, -C(=S)-, -O-, -Si(R_a)₂-, -S(=O)_x- и -N(R_a)-;

где:

x равен 0, 1 или 2;

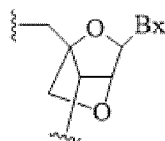
n равен 1, 2, 3 или 4

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

Дополнительные бициклические сахарные фрагменты известны в данной области техники, см., например: Freier et al., *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22), 4429-4443, Albaek et al., *J. Org. Chem.*, 2006, 71, 7731-7740, Singh et al., *Chem. Commun.*, 1998, 4, 455-456; Koshkin et al., *Tetrahedron*, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, 97, 5633-5638; Kumar et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 2219-2222; Singh et al., *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 10035-10039; Srivastava et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 20017, 129, 8362-8379; Elayadi et al., *Curr. Opinion Invens. Drugs*, 2001, 2, 558-561; Braasch et al., *Chem. Biol.*, 2001, 8, 1-7; Orum et al., *Curr. Opinion Mol. Ther.*, 2001, 3, 239-243; Wengel et al., патент США

№ 7 053 207, Imanishi et al., патент США № 6 268 490, Imanishi et al. патент США № 6 770748, Imanishi et al., патент США № RE44779; Wengel et al., патент США № 6 794 499, Wengel et al., патент США № 6 670 461; Wengel et al., патент США № 7 034 133, Wengel et al., патент США № 8 080 644; Wengel et al., патент США № 8 034 909; Wengel et al., патент США № 8 153 365; Wengel et al., патент США № 7 572 582; и Ramasamy et al., патент США № 6 525 191, Torsten et al., международная заявка WO 2004/106356, Wengel et al., международная заявка WO 91999/014226; Seth et al., международная заявка WO 2007/134181; Seth et al., патент США № 7 547 684; Seth et al., патент США № 7 666 854; Seth et al., патент США № 8 088 746; Seth et al., патент США № 7 750 131; Seth et al., патент США № 8 030 467; Seth et al., патент США № 8 268 980; Seth et al., патент США № 8 546 556; Seth et al., патент США № 8 530 640; Migawa et al., патент США № 9 012 421; Seth et al., патент США № 8 501 805; Allerson et al., патент США № 2008/0039618 и Migawa et al., Патент США № 2015/0191727.

В определенных вариантах осуществления изобретения бициклические сахарные фрагменты и нуклеозиды, включающие такие бициклические сахарные фрагменты, дополнительно определяют по изомерной конфигурацией. Например, LNA нуклеозид (описанный в данном документе) может находиться в α -L конфигурации или в β -D конфигурации.



LNA (β -D-конфигурация)
мостик = 4'-CH₂-O-2'



α -L-LNA (α -L-конфигурация)
мостик = 4'-CH₂-O-2'

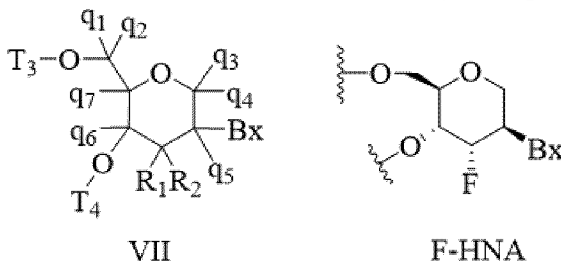
Бициклические нуклеозиды α -L-метиленокси (4'-CH₂-O-2') или α -L-LNA были внедрены в олигонуклеотиды, которые демонстрировали антисмысловую активность (Frieden et al., *Nucleic Acids Research*, 2003, 21, 6365-6372). В данном документе общие описания бициклических нуклеозидов включают обе изомерные конфигурации. Когда положения специфических бициклических нуклеозидов (например, LNA или cEt) идентифицированы в приведенных в данном документе примерах, они находятся в конфигурации β -D, если не указано иное.

В определенных вариантах осуществления модифицированные сахарные фрагменты содержат один или более немостиковых сахарных заместителей и один или более мостиковых сахарных заместителей (например, 5'-замещенные и 4'-2'-мостиковые сахара).

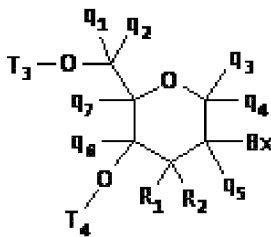
В определенных вариантах осуществления модифицированные сахарные фрагменты представляют собой заменители сахара. В определенных таких вариантах осуществления атом кислорода сахарного фрагмента заменен, например, атомом серы, углерода или азота. В определенных таких вариантах осуществления такие модифицированные сахарные фрагменты также содержат мостиковые и/или немостиковые заместители, как описано в данном документе. Например, определенные заменители сахара содержат 4'-атом серы и

замещение в положении 2-(см., например, Bhat et al., патент США № 7 875 733 и Bhat et al., патент США № 7 939 677) и/или положении 5'.

В определенных вариантах осуществления заменители сахара содержат кольца, имеющие количество атомов отличное от 5. Например, в определенных вариантах осуществления заменитель сахара содержит шестичленный тетрагидропиран («ТГП»). Такие тетрагидропираны могут быть дополнительно модифицированы или замещены. Нуклеозиды, содержащие такие модифицированные тетрагидропираны, включают, но не ограничиваются ими, гекситоловую нуклеиновую кислоту (ГНК), аниоловую нуклеиновую кислоту (АНК), маннитоловую нуклеиновую кислоту (МНК) (см. Leumann, *Bioorg. & Med. Chem.* 2002, 10, 841-854) или фтор-ГНК (Ф-ГНК):



(«Ф-ГНК», см., например, Swayze et al., патент США № 8 088 904; Swayze et al., патент США № 8 440 803; Swayze et al.; и Swayze et al., патент США № 9 005 906, Ф-ГНК также может называться Ф-ТГП или 3'-фтортетрагидропиран), и нуклеозиды, содержащие дополнительные модифицированные соединения ТГП, имеющие формулу:

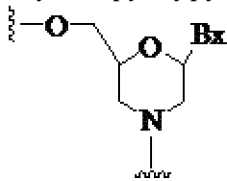


где независимо для каждого из указанного по меньшей мере одного нуклеозида ТГП: Bx представляет собой фрагмент азотистого основания; T₃ и T₄, каждый независимо, представляют собой межнуклеозидную связывающую группу, связывающую модифицированный нуклеозид ТГП с остатком олигонуклеотида, или один из T₃ и T₄ представляет собой межнуклеозидную связывающую группу, связывающую модифицированный нуклеозид ТГП с остатком олигонуклеотида, а другой из T₃ и T₄ представляет собой H, гидроксил-защитную группу, группу конъюгата или 5'- или 3'-концевую группу; Q₁, Q₂, Q₃, Q₄, Q₅, Q₆ и Q₇, каждый независимо, представляют собой H, C₁-C₆ алкил, замещенный C₁-C₆ алкил, C₂-C₆ алкенил, замещенный C₂-C₆ алкенил, C₂-C₆ алкинил или замещенный C₂-C₆ алкинил; и каждый из R₁ и R₂ независимо выбран из: водорода, галогена, замещенного или незамещенного алкокси, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, OC(=X)J₁, OC(=X)NJ₁J₂, NJ₃C(=X)NJ₁J₂ и CN, где X представляет собой O, S или NJ₁, и каждый J₁, J₂ и J₃ независимо представляют собой H или C₁-C₆ алкил.

В определенных вариантах осуществления представлены модифицированные ТГП нуклеозиды, где q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ и q₇ представляют собой H. В определенных вариантах

осуществления по меньшей мере один из $q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6$ и q_7 отличен от H. В определенных вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один из $q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6$ и q_7 представляет собой метил. В определенных вариантах осуществления предложены модифицированные ТПП нуклеозиды, где один из R_1 и R_2 представляет собой F. В определенных вариантах осуществления изобретения R_1 представляет собой F, а R_2 представляет собой H, в определенных вариантах осуществления изобретения R_1 представляет собой метокси, а R_2 представляет собой H, и в определенных вариантах осуществления R_1 представляет собой метоксиэтокси, а R_2 представляет собой H.

В определенных вариантах осуществления изобретения заменители сахара содержат кольца, имеющие более 5 атомов и более одного гетероатома. Например, описаны нуклеозиды, содержащие морфолиносахарные фрагменты, и их применение в олигомерных соединениях (см., например: Braasch et al., *Biochemistry*, 2002, 41, 4503-4510 и Summerton et al., патент США № 5 698 685; Summerton et al., патент США № 5 166 315; Summerton et al., патент США № 5 185 444; и Summerton et al., патент США № 5 034 506). В контексте данного документа термин «морфолино» означает заменитель сахара, имеющий следующую структуру:



В определенных вариантах осуществления изобретения морфолино могут быть модифицированными, например, добавлением или изменением различных групп заместителей относительно представленной выше структуры морфолино. Такие заменители сахара в данном контексте называют «модифицированными морфолино».

В определенных вариантах осуществления изобретения заменители сахара содержат ациклические фрагменты. Примеры нуклеозидов и олигонуклеотидов, содержащих такие суррогаты ациклических сахаров, включают, но не ограничиваются ими: пептидную нуклеиновую кислоту («ПНК»), ациклическую бутилнуклеиновую кислоту (см., например, Kumar et al., *Org. Biomol. Chem.*, 2013, 11, 5853-5865), а также нуклеозиды и олигонуклеотиды, описанные в Manoharan et al., WO2011/133876.

Многие другие бициклические и трициклические сахара и суррогатные кольцевые системы сахаров известны в данной области техники, которые можно использовать в модифицированных нуклеозидах.

2. Модифицированные азотистые основания

Модификации или замены азотистых оснований (или оснований) структурно отличаются от встречающихся в природе или синтетических немодифицированных азотистых оснований, но при этом являются функционально взаимозаменяемыми. Как природные, так и модифицированные азотистые основания способны участвовать в образовании водородных связей. Такие модификации азотистых оснований могут придавать описанным в данном документе соединениям нуклеазную стабильность,

повышать аффинность связывания, а также улучшать другие полезные биологические свойства.

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат модифицированные олигонуклеотиды. В определенных вариантах осуществления модифицированные олигонуклеотиды содержат один или более нуклеозидов, содержащих немодифицированное азотистое основание. В определенных вариантах осуществления модифицированные олигонуклеотиды содержат один или более нуклеозидов, содержащих модифицированное азотистое основание. В определенных вариантах осуществления модифицированные олигонуклеотиды содержат один или более нуклеозидов, которые не содержат азотистое основание, называемые нуклеозидом с удаленным азотистым основанием.

В определенных вариантах осуществления модифицированные азотистые основания выбраны из: 5-замещенных пиримидинов, 6-азапиримидинов, алкил- или алкинилзамещенных пиримидинов, алкилзамещенных пуринов и N-2, N-6 и O-6 замещенных пуринов. В определенных вариантах осуществления модифицированные азотистые основания выбраны из: 2-аминопропиладенина, 5-гидроксиметилцитозина, 5-метилцитозина, ксантина, гипоксантина, 2-амиoadенина, 6-N-метиладенина, 6-N-метилгуанина, 2-пропиладенина, 2-тиоурацила, 2-тиотимина и 2-тиоцитозина, 5-пропинил(C≡C-CH₃) урацила, 5-пропинилцитозина, 6-азоурацила, 6-азоцитозина, 6-азотимина, 5-рибозилурацила (псевдоурацила), 4-тиоурацила, 8-галогена, 8-амино, 8-тиола, 8-тиоалкила, 8-гидроксила, 8-аза и другие 8-замещенных пуринов, 5-галогена, в частности, 5-брома, 5-трифторметила, 5-галоурацила и 5-галоцитозина, 7-метилгуанина, 7-метиладенина, 2-F-аденина, 2-аминоаденина, 7-дезазагуанина, 7-дезазааденина, 3-дезазагуанина и 3-дезазааденина, 6-N-бензоладенина, 2-N-изобутирилгуанина, 4-N-бензоилцитозина, 4-N-бензоилурацила, 5-метил 4-N-бензоилцитозина, 5-метил 4-N-бензоилурацила, универсальных оснований, гидрофобных оснований, разнородных оснований, оснований с увеличенным размером и фторированных оснований. Другие модифицированные азотистые основания включают трициклические пиримидины, такие как 1,3-диазафеноксазин-2-он, 1,3-диазафенотиазин-2-он и 9-(2-аминоэтокси)-1,3-диазафеноксазин-2-он (G-фиксирующее основание). Пуриновые или пиримидиновые основания модифицированных азотистых оснований могут быть заменены другими гетероциклами, например 7-дезазааденином, 7-дезазагуанозином, 2-аминопиридином и 2-пиридоном. Дополнительные нуклеотидные основания включают основания, раскрытые в Merigan et al., патент США № 3 687 808, те, которые раскрыты в The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, Kroschwitz, J.I., Ed., John Wiley & Sons, 1990, 858-859; Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613; Sanghvi, Y.S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, Crooke, S.T. and Lebleu, B., Eds., CRC Press, 1993, 273-288; и те, которые раскрыты в главах 6 и 15, Antisense Drug Technology, Crooke S.T., Ed., CRC Press, 2008, 163-166 и 442-443.

Публикации, описывающие получение определенных из указанных выше

модифицированных азотистых оснований, а также других модифицированных азотистых оснований, включают, но не ограничиваются ими, Manoharan et al., патент США № 2003/0158403, Manoharan et al., патент США № 2003/0175906; Dinh et al., патент США № 4 845 205; Spielvogel et al., патент США № 5 130 302; Rogers et al., патент США № 5 134 066; Bischofberger et al., патент США № 5 175 273; Urdea et al., патент США № 5 367 066; Benner et al., патент США № 5 432 272; Matteucci et al., патент США № 5 434 257; Gmeiner et al., патент США № 5 457 187; Cook et al., патент США № 5 459 255; Froehler et al., патент США № 5 484 908; Matteucci et al., патент США № 5 502 177; Hawkins et al., патент США № 5 525 711; Haralambidis et al., патент США № 5 552 540; Cook et al., патент США № 5 587 469; Froehler et al., патент США № 5 594 121; Switzer et al., патент США № 5 596 091; Cook et al., патент США № 5 614 617; Froehler et al., патент США № 5 645 985; Cook et al., патент США № 5 681 941; Cook et al., патент США № 5 811 534; Cook et al., патент США № 5 750 692; Cook et al., патент США № 5 948 903; Cook et al., патент США № 5 587 470; Cook et al., патент США № 5 457 191; Matteucci et al., патент США № 5 763 588; Froehler et al., патент США № 5 830 653; Cook et al., патент США № 5 808 027; Cook et al., 6 166 199; and Matteucci et al., патент США № 6 005 096.

В определенных вариантах осуществления соединения, нацеленные на нуклеиновую кислоту SCN2A, содержат одно или более модифицированных азотистых оснований. В определенных вариантах осуществления изобретения модифицированное азотистое основание представляет собой 5-метилцитозин. В определенных вариантах осуществления каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

Модифицированные межнуклеозидные связи

Встречающаяся в природе межнуклеозидная связь РНК и ДНК представляет собой 3'-5' фосфодиэфирную связь. В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, имеющие одну или более модифицированных, т.е. неприродных межнуклеозидных связей, часто предпочтительны по сравнению с соединениями, имеющими природные межнуклеозидные связи, благодаря желаемым свойствам, таким как, например, улучшенное клеточное поглощение, усиленная аффинность связывания с целевыми нуклеиновыми кислотами и повышенная стабильность в присутствии нуклеаз.

В определенных вариантах осуществления соединения, нацеленные на нуклеиновую кислоту SCN2A, содержат одну или более модифицированных межнуклеозидных связей. В определенных вариантах осуществления модифицированные межнуклеозидные связи представляют собой фосфоротиоатные связи. В определенных вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связь соединения представляет собой фосфоротиоатную межнуклеозидную связь.

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат олигонуклеотиды. Олигонуклеотиды, имеющие модифицированные межнуклеозидные связи, включают межнуклеозидные связи, которые сохраняют атом фосфора, а также межнуклеозидные связи, которые не имеют атома фосфора.

Иллюстративные фосфорсодержащие межнуклеозидные связи включают, но не ограничиваются ими, фосфодиэфиры, фосфотриэфиры, метилфосфонаты, фосфорамидаты и тиофосфаты. Хорошо известны способы получения фосфорсодержащих и не содержащих фосфор связей.

В определенных вариантах осуществления нуклеозиды модифицированных олигонуклеотидов могут быть связаны вместе с использованием любой межнуклеозидной связи. Два основных класса межнуклеозидных связывающих групп определяют по наличию или отсутствию атома фосфора. Типичные фосфорсодержащие межнуклеозидные связи включают, но не ограничиваются ими, фосфаты, которые содержат фосфодиэфирную связь («P=O») (также называемые немодифицированными или встречающимися в природе связями), фосфотриэфиры, метилфосфонаты, фосфорамидаты и фосфоротиоаты («P=S») и фосфородитиоаты («HS-P=S»). Типичные не содержащие фосфор межнуклеозидные связывающие группы включают, но не ограничиваются ими, метиленметилямино (-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-), тиодиэфир, тионокарбамат (-O-C(=O)(NH)-S-); силоксан (-O-SiH₂-O-); и N, N'-диметилгидразин (-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-). Модифицированные межнуклеозидные связи по сравнению с встречающимися в природе фосфатными связями можно использовать для изменения, как правило, повышения устойчивости олигонуклеотида к нуклеазам. В определенных вариантах осуществления межнуклеозидные связи, имеющие хиральный атом, могут быть получены в виде рацемической смеси или в виде отдельных энантиомеров. Типичные хиральные межнуклеозидные связи включают, но не ограничиваются ими, алкилфосфонаты и фосфоротиоаты. Способы получения фосфорсодержащих и нефосфорсодержащих межнуклеозидных связей хорошо известны специалистам в данной области техники.

Нейтральные межнуклеозидные связи включают, но не ограничиваются ими, фосфотриэфиры, метилфосфонаты, MMI (3'-CH₂-N(CH₃)-O-5'), амид-3 (3'-CH₂-C(=O)-N(H)-5'), амид-4 (3'-CH₂-N(H)-C(=O)-5'), формацеталь (3'-O-CH₂-O-5'), метоксипропил и тиоформацеталь (3'-S-CH₂-O-5'). Дополнительные нейтральные межнуклеозидные связи включают неионные связи, содержащие силоксан (диалкилсилоксан), карбоксильный сложный эфир, карбоксамид, сульфид, сульфоновый сложный эфир и амиды (см., например: Carbohydrate Modifications in Antisense Research; Y.S. Sanghvi и P.D. Cook, ред., ACS Symposium Series 580; главы 3 и 4, 40-65). Дополнительные нейтральные межнуклеозидные связи включают неионные связи, содержащие смешанные составные части N, O, S и CH₂.

В определенных вариантах осуществления изобретения олигонуклеотиды содержат модифицированные межнуклеозидные связи, расположенные вдоль олигонуклеотида или его области определенным образом или в виде мотива модифицированной межнуклеозидной связи. В определенных вариантах осуществления межнуклеозидные связи расположены в разорванном мотиве. В таких вариантах осуществления изобретения межнуклеозидные связи в каждой из двух областей крыльев являются отличными от межнуклеозидных связей в области гэта. В определенных вариантах осуществления

изобретения межнуклеозидные связи в крыльях являются фосфодиэфирными, а межнуклеозидные связи в гэпе являются фосфоротиоатными. Нуклеозидный мотив выбран независимо, так что олигонуклеотид, имеющий разорванный мотив межнуклеозидных связей, может иметь или не иметь разорванный нуклеозидный мотив, и если он имеет разорванный нуклеозидный мотив, то длина крыльев и гэпа может быть одинаковой или нет.

В определенных вариантах осуществления олигонуклеотиды содержат область, имеющую мотив чередующихся межнуклеозидных связей. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотиды по настоящему изобретению содержат область одинаково модифицированных межнуклеозидных связей. В определенных таких вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область, которая равномерно связана фосфоротиоатными межнуклеозидными связями. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид равномерно связан фосфоротиоатными межнуклеозидными связями. В определенных вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связь олигонуклеотида выбрана из фосфодиэфира и фосфоротиоата. В определенных вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связь олигонуклеотида выбрана из фосфодиэфира и фосфоротиоата, и по меньшей мере одна межнуклеозидная связь является фосфоротиоатной.

В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере 6 фосфоротиоатных межнуклеозидных связей. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере 8 фосфоротиоатных межнуклеозидных связей. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере 10 фосфоротиоатных межнуклеозидных связей. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере один блок из по меньшей мере 6 последовательных фосфоротиоатных межнуклеозидных связей. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере один блок из по меньшей мере 8 последовательных фосфоротиоатных межнуклеозидных связей. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере один блок из по меньшей мере 10 последовательных фосфоротиоатных межнуклеозидных связей. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере один блок из по меньшей мере 12 последовательных фосфоротиоатных межнуклеозидных связей. В определенных таких вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один такой блок расположен на 3'-конце олигонуклеотида. В определенных таких вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один такой блок расположен в пределах 3 нуклеозидов от 3'-конца олигонуклеотида.

В определенных вариантах осуществления олигонуклеотиды содержат одну или более метилфосфонатных связей. В определенных вариантах осуществления изобретения олигонуклеотиды, имеющие гэммерный нуклеозидный мотив, содержат линкерный мотив, содержащий все фосфоротиоатные связи, за исключением одной или двух

метилфосфонатных связей. В определенных вариантах осуществления одна метилфосфонатная связь находится в центральном гэпе олигонуклеотида, имеющего гэммерный нуклеозидный мотив.

В определенных вариантах осуществления желательно распределять количество фосфоротиоатных межнуклеозидных связей и фосфодиэфирных межнуклеозидных связей для сохранения устойчивости к нуклеазе. В определенных вариантах осуществления изобретения желательно распределять количество и положение фосфоротиоатных межнуклеозидных связей, а также количество и положение фосфодиэфирных межнуклеозидных связей для сохранения устойчивости к нуклеазе. В определенных вариантах осуществления изобретения количество фосфоротиоатных межнуклеозидных связей может быть уменьшено, а количество фосфодиэфирных межнуклеозидных связей может быть увеличено. В определенных вариантах осуществления изобретения количество фосфоротиоатных межнуклеозидных связей может быть уменьшено, а количество фосфодиэфирных межнуклеозидных связей может быть увеличено при сохранении устойчивости к нуклеазе. В определенных вариантах осуществления изобретения желательно уменьшить количество фосфоротиоатных межнуклеозидных связей при сохранении устойчивости к нуклеазе. В определенных вариантах осуществления изобретения желательно увеличить количество фосфодиэфирных межнуклеозидных связей при сохранении устойчивости к нуклеазе.

Определенные мотивы

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат олигонуклеотиды. Олигонуклеотиды могут иметь мотив, *например* структуру немодифицированных и/или модифицированных сахарных фрагментов, азотистых оснований и/или межнуклеозидных связей. В определенных вариантах осуществления модифицированные олигонуклеотиды содержат один или более модифицированных нуклеозидов, содержащих модифицированный сахар. В определенных вариантах осуществления модифицированные олигонуклеотиды содержат один или более модифицированных нуклеозидов, содержащих модифицированное азотистое основание. В определенных вариантах осуществления модифицированные олигонуклеотиды содержат одну или более модифицированных межнуклеозидных связей. В таких вариантах осуществления модифицированные, немодифицированные и по-разному модифицированные сахарные фрагменты, азотистые основания и/или межнуклеозидные связи модифицированного олигонуклеотида определяют мотив. В определенных вариантах осуществления каждая структура сахарных фрагментов, азотистых оснований и межнуклеозидных связей не зависит друг от друга. Таким образом, модифицированный олигонуклеотид может быть описан его сахарным мотивом, мотивом азотистых оснований и/или мотивом межнуклеозидной связи (в контексте данного документа мотив азотистых оснований описывает модификации азотистых оснований независимо от последовательности азотистых оснований).

1. Определенные сахарные мотивы

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат олигонуклеотиды. В определенных вариантах осуществления изобретения олигонуклеотиды содержат один или более типов модифицированных сахарных фрагментов и/или немодифицированных сахарных фрагментов, расположенных вдоль олигонуклеотида или его области определенным образом или в виде сахарного мотива. В определенных случаях, такие мотивы могут содержать, но не ограничиваются ими, любые сахарные модификации, рассмотренные в данном документе и/или другие известные модификации сахара.

В определенных вариантах осуществления модифицированные олигонуклеотиды содержат или состоят из области, имеющей гэтапмерный мотив, который содержит две внешних области или «крыла» и центральную или внутреннюю область, или «гэтап». Эти три области гэтапмерного мотива (5'-крыло, гэтап и 3'-крыло) образуют непрерывную последовательность азотистых оснований, в которой по меньшей мере некоторые из сахарных фрагментов нуклеозидов в каждом крыле отличаются по меньшей мере от некоторых сахарных фрагментов нуклеозидов в гэтапе. В частности, по меньшей мере те сахарные фрагменты нуклеозидов каждого крыла, которые расположены ближе всего к гэтапу (крайний 3'-концевой нуклеозид 5'-крыла и крайний 5'-концевой нуклеозид 3'-крыла), отличаются от сахарного фрагмента соседних нуклеозидов в гэтапе, определяя таким образом границу между крыльями и гэтапом (т.е. соединение крыло/гэтап). В определенных вариантах осуществления изобретения сахарные фрагменты в гэтапе являются одинаковыми по отношению друг к другу. В определенных вариантах осуществления изобретения гэтап содержит один или более нуклеозидов, имеющих сахарный фрагмент, который отличается от сахарного фрагмента одного или более других нуклеозидов в гэтапе. В определенных вариантах осуществления сахарные мотивы, принадлежащие двум крыльям, являются одинаковыми по отношению друг к другу (симметричный гэтапмер). В определенных вариантах осуществления сахарные мотивы 5'-крыла отличаются от сахарного мотива 3'-крыла (асимметричный сахарный гэтапмер).

В определенных вариантах осуществления крылья гэтапмера содержат 1-5 нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления крылья гэтапмера содержат 2-5 нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления крылья гэтапмера содержат 3-5 нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления все нуклеозиды гэтапмера являются модифицированными нуклеозидами.

В определенных вариантах осуществления изобретения гэтап гэтапмера содержит 7-12 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления изобретения гэтап гэтапмера содержит 7-10 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления изобретения гэтап гэтапмера содержит 8-10 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления изобретения гэтап гэтапмера содержит 10 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления изобретения каждый нуклеозид гэтапа гэтапмера представляет собой 2'-дезоксинуклеозид.

В определенных вариантах осуществления изобретения гэтапмер представляет собой

дезоксигэпмер. В таких вариантах осуществления нуклеозиды на стороне гэпа каждого соединения крыло/гэп представляют собой немодифицированные 2'-дезоксинуклеозиды, а нуклеозиды на стороне крыла каждого соединения крыло/гэп являются модифицированными нуклеозидами. В определенных таких вариантах осуществления изобретения каждый нуклеозид гэпа представляет собой немодифицированный 2'-дезоксинуклеозид. В определенных вариантах осуществления каждый нуклеозид каждого крыла представляет собой модифицированный нуклеозид.

В определенных вариантах осуществления изобретения модифицированный олигонуклеотид имеет полностью модифицированный сахарный мотив, где каждый нуклеозид модифицированного олигонуклеотида включает модифицированный сахарный мотив. В определенных вариантах осуществления модифицированные олигонуклеотиды содержат или состоят из области, имеющей полностью модифицированный сахарный мотив, где каждый нуклеозид области содержит модифицированный сахарный фрагмент. В определенных вариантах осуществления модифицированные олигонуклеотиды содержат или состоят из области, имеющей полностью модифицированный сахарный мотив, где каждый нуклеозид в полностью модифицированной области содержит один и тот же модифицированный сахарный мотив, называемый в данном документе однородно модифицированным сахарным мотивом. В определенных вариантах осуществления полностью модифицированный олигонуклеотид представляет собой равномерно модифицированный олигонуклеотид. В определенных вариантах осуществления каждый нуклеозид однородно модифицированного олигонуклеотида содержит одну и ту же 2'-модификацию.

2. Определенные мотивы азотистых оснований

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат олигонуклеотиды. В определенных вариантах осуществления изобретения олигонуклеотиды содержат модифицированные и/или немодифицированные азотистые основания, расположенные вдоль олигонуклеотида или его области определенным образом или в виде мотива. В определенных вариантах осуществления каждое азотистое основание является модифицированным. В определенных вариантах осуществления ни одно из азотистых оснований не является модифицированным. В определенных вариантах осуществления каждый пурин или каждый пиримидин является модифицированным. В определенных вариантах осуществления каждый аденин является модифицированным. В определенных вариантах осуществления каждый гуанин является модифицированным. В определенных вариантах осуществления каждый тимин является модифицированным. В определенных вариантах осуществления каждый урацил является модифицированным. В определенных вариантах осуществления каждый цитозин является модифицированным. В определенных вариантах осуществления некоторые, все или никакие из цитозиновых фрагментов в олигонуклеотиде не представляют собой 5-метилцитозиновые фрагменты.

В определенных вариантах осуществления модифицированные олигонуклеотиды

содержат блок модифицированных азотистых оснований. В определенных вариантах осуществления блок находится на 3'-конце олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления блок находится в пределах 3 нуклеозидов 3'-конца олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления блок находится на 5'-конце олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления блок находится в пределах 3 нуклеотидов 5'-конца олигонуклеотида.

В определенных вариантах осуществления олигонуклеотиды, имеющие гэммерный мотив, содержат нуклеозид, содержащий модифицированное азотистое основание. В определенных таких вариантах осуществления один нуклеозид, содержащий модифицированное азотистое основание, находится в центральном гэпе олигонуклеотида, имеющего гэммерный мотив. В определенных вариантах осуществления сахарный фрагмент указанного нуклеозида представляет собой 2'-дезоксирибозильный фрагмент. В определенных вариантах осуществления модифицированное азотистое основание выбрано из 2-тиопиримидина и 5-пропинепиримидина.

3. Определенные мотивы межнуклеозидных связей

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат олигонуклеотиды. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотиды содержат модифицированные и/или немодифицированные межнуклеозидные связи, расположенные вдоль олигонуклеотида или его области определенным образом или в виде мотива модифицированной межнуклеозидной связи. В определенных вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связывающая группа представляет собой фосфатную межнуклеозидную связь (P=O). В определенных вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связывающая группа модифицированного олигонуклеотида представляет собой фосфоротиоат (P=S). В определенных вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связывающая группа модифицированного олигонуклеотида независимо выбрана из фосфоротиоатной и фосфатной межнуклеозидной связи. В определенных вариантах осуществления сахарный мотив модифицированного олигонуклеотида представляет собой гэммер, и все межнуклеозидные связи внутри гэпа являются модифицированными. В определенных вариантах осуществления определенные или все межнуклеозидные связи в крыльях являются немодифицированными фосфатными связями. В определенных вариантах осуществления терминальные межнуклеозидные связи являются модифицированными.

Определенные модифицированные олигонуклеотиды

В определенных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, содержат модифицированные олигонуклеотиды. В определенных вариантах осуществления представленные выше модификации (сахар, азотистое основание, межнуклеозидная связь) включены в модифицированный олигонуклеотид. В определенных вариантах осуществления модифицированные олигонуклеотиды характеризуются своей модификацией, мотивами и общей длиной. В определенных вариантах осуществления изобретения такие параметры не зависят друг от друга. Таким образом, если не указано

иное, каждая межнуклеозидная связь олигонуклеотида, имеющего гэдмерный сахарный мотив, может быть модифицирована или немодифицирована и может или не может следовать паттерну сахарных модификаций гэдмера. Например, межнуклеозидные связи в областях крыла сахарного гэдмера могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга, и могут быть такими же, или отличаться от межнуклеозидных связей в области гэдпа сахарного мотива. Подобным образом, такие гэдмерные олигонуклеотиды могут содержать одно или более модифицированных азотистых оснований независимо от гэдмерной структуры модификаций сахара. Кроме того, в определенных случаях олигонуклеотид описывается общей длиной или диапазоном и длинами или диапазонами длин двух или более областей (например, областей нуклеозидов, имеющих определенные модификации сахара), в таких обстоятельствах можно выбрать числа для каждого диапазона, что приводит к олигонуклеотиду, имеющему общую длину, выходящую за пределы указанного диапазона. В таких обстоятельствах должны быть удовлетворены оба элемента. Например, в определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид состоит из 15-20 связанных нуклеозидов и имеет сахарный мотив, состоящий из трех областей, А, В и С, где область А состоит из 2-6 связанных нуклеозидов, имеющих указанный сахарный мотив, область В состоит из 6-10 связанных нуклеозидов с указанным сахарным мотивом, а область С состоит из 2-6 связанных нуклеозидов с указанным сахарным мотивом. Такие варианты осуществления не включают модифицированные олигонуклеотиды, где А и С каждый состоит из 6 связанных нуклеозидов, а В состоит из 10 связанных нуклеозидов (даже несмотря на то, что такое количество нуклеозидов разрешено в рамках требований для А, В и С), поскольку общая длина таких олигонуклеотидов равна 22, что превышает верхний предел общей длины модифицированного олигонуклеотида (20). Таким образом, если в описании олигонуклеотида ничего не сказано в отношении одного или более параметров, такой параметр не ограничивается. Таким образом, модифицированный олигонуклеотид, описанный только как имеющий гэдмерный сахарный мотив без дальнейшего описания, может иметь любую длину, мотив межнуклеозидной связи и мотив азотистых оснований. Если не указано иное, все модификации не зависят от последовательности азотистых оснований.

Композиции и способы составления фармацевтических композиций

Описанные в данном документе соединения могут быть смешаны с фармацевтически приемлемыми активными или инертными веществами для приготовления фармацевтических композиций или составов. Композиции и способы составления фармацевтических композиций зависят от ряда критериев, включая, но не ограничиваясь ими, способ введения, степень тяжести заболевания или дозу, которую необходимо ввести.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие одно или более соединений или их соли. В определенных вариантах осуществления соединения представляют собой бессмысловые соединения или олигомерные соединения. В определенных вариантах осуществления соединения содержат модифицированный олигонуклеотид или состоят из него. В

определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит подходящий фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит стерильный физиологический раствор и одно или более соединений. В определенных вариантах осуществления такая фармацевтическая композиция состоит из стерильного физиологического раствора и одного или более соединений. В определенных вариантах осуществления стерильный физиологический раствор представляет собой физиологический раствор фармакологической чистоты. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция состоит из одного или более соединений и стерильной воды. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция состоит из одного соединения и стерильной воды. В определенных вариантах осуществления стерильная вода представляет собой воду фармакологической чистоты. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит одно или более соединений и фосфатно-солевой буфер (ФСБ). В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция состоит из одного или более соединений и стерильного ФСБ. В определенных вариантах осуществления стерильный ФСБ представляет собой ФСБ фармакологической чистоты. Композиции и способы составления фармацевтических композиций зависят от ряда критериев, включая, но не ограничиваясь ими, способ введения, степень тяжести заболевания или дозу, которую необходимо ввести.

Описанное в данном документе соединение, нацеленное на нуклеиновую кислоту SCN2A, можно использовать в фармацевтических композициях путем комбинирования соединения с подходящим фармацевтически приемлемым разбавителем или носителем. В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемый разбавитель представляет собой стерильную воду, подходящую для инъекций. Соответственно, в одном варианте осуществления, в описанных в данном документе способах, используется фармацевтическая композиция, содержащая соединение, нацеленное на нуклеиновую кислоту SCN2A, и фармацевтически приемлемый разбавитель. В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемый разбавитель представляет собой воду. В определенных вариантах осуществления соединение содержит или состоит из модифицированного олигонуклеотида, предложенного в данном документе.

Фармацевтические композиции, содержащие соединения, предложенные в данном документе, включают любые фармацевтически приемлемые соли, сложные эфиры или соли таких сложных эфиров или любой другой олигонуклеотид, которые при введении животному, включая человека, способны обеспечивать (прямо или косвенно) биологически активный метаболит или их остаток. В определенных вариантах осуществления соединения представляют собой антисмысловые соединения или олигомерные соединения. В определенных вариантах осуществления соединения содержат модифицированный олигонуклеотид или состоит из него. Соответственно, например, раскрытие также относится к фармацевтически приемлемым солям соединений, пролекарствам, фармацевтически приемлемым солям таких пролекарств и другим биоэквивалентам.

Подходящие фармацевтически приемлемые соли включают, но не ограничиваются ими, соли натрия и калия.

Пролекарство может включать включение дополнительных нуклеозидов на одном или обоих концах соединения, которые расщепляются эндогенными нуклеазами в организме с образованием активного соединения.

В определенных вариантах осуществления соединения или композиции дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

ПРЕИМУЩЕСТВА ОПРЕДЕЛЕННЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

В данном документе впервые предложены способы и композиции для модуляции нуклеиновой кислоты SCN2A, которая может лечить, задерживать, предотвращать и/или облегчать заболевание или состояние, связанное с SCN1A (например, синдром Драве), или его физиологический маркер. В конкретном варианте осуществления впервые предложены ингибиторы SCN2A (например, олигонуклеотиды, нацеленные на нуклеиновую кислоту, кодирующую SCN2A) для уменьшения частоты припадков, уменьшения миоклонуса или мышечных спазмов, облегчения трудностей при ходьбе, уменьшения, предотвращения появления или лечения деменции, облегчения проблем с речью, уменьшения или предотвращения появления зрительных галлюцинаций, лечения, уменьшения или предотвращения начала прогрессирующей неврологической дегенерации, уменьшения атаксии или их комбинации у субъекта, имеющего заболевание или состояние, связанное с SCN1A (например, синдром Драве).

ПРИМЕРЫ

Неограничивающее раскрытие и включение посредством ссылки

Несмотря на то, что определенные соединения, композиции и способы, описанные в данном документе, были подробно описаны в соответствии с определенными вариантами осуществления изобретения, следующие примеры служат лишь для иллюстрации соединений, описанных в данном документе, и не предназначены для ограничения данного изобретения. Каждая из ссылок, цитируемых в настоящей заявке, включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Пример 1: мРНК SCN2A была восстановлена с помощью LNA.

LNA растворяли до 10 мкг/мкл стерильной дистиллированной водой и хранили при -30 ° C до использования. Последовательности используемых LNA показаны ниже в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Последовательности ASO

RGCN #	Последовательность в гене	Положение в NM_00109929 8	Интрон/экзон	Перекрестная реакция человека	Последовательность ASO (LNA)
ASO 1	AAAGCTAAGAGAC CCA (SEQ ID NO: 1)	1907	Экзон	Да	TGGGTCTCTTAG CTTT (SEQ ID NO: 4)

ASO 2	AGATTGCATTTTCA CC (SEQ ID NO: 2)	21683	Интрон	Нет	GGTGAAAATGC AATCT (SEQ ID NO: 5)
ASO 3	GGCAATACTTCCCA AC (SEQ ID NO: 3)	38752	Интрон	Нет	GTTGGGAAGTA TTGCC (SEQ ID NO: 6)

Таблица 2. Номенклатура Exiqon последовательностей ASO

RGCN#	Номенклатура Exiqon
ASO 1	+T*+G*+G*+G*T*C*T*C*T*T*A*G*+C*+T*+T*+T (SEQ ID NO: 4)
ASO 2	+G*+G*+T*+G*A*A*A*A*T*G*C*A*+A*+T*+C*+T (SEQ ID NO: 5)
ASO 3	+G*+T*+T*+G*G*G*A*A*G*T*A*T*+T*+G*+C*+C (SEQ ID NO: 6)

Неонатальная интрацеребровентрикулярная (ИЦВ) инъекция

Все исследования были проведены в соответствии с Руководство по уходу за лабораторными животными и их использованию и были одобрены Комитетом по соблюдению этических норм обращения с животными Института Флори. Беременные мыши ICR, несущие детенышей, гетерозиготных по мутации Scn2a R1882Q, были сгенерированы компанией Cyagen. Мышей содержали в помещении с регулируемой температурой, с 12-часовым циклом освещения/темноты и свободным доступом к пище и жидкости.

Перед инъекцией детенышей (P2) осматривали визуально, чтобы убедиться в наличии млечного пятна. Криоанестезию индуцировали путем помещения детенышей в небольшой пластиковый контейнер, окруженный колотым льдом, на 4-5 минут, и для определения глубины анестезии использовали реакцию сдавливания пальцев ног. LNA (10 мкг/мкл) загружали в шприц объемом 10 мкл с иглой размером 32 G (Hamilton). Поверхность кожи детенышей стерилизовали тампоном, смоченным 80% этанолом, а место инъекции помечали маркером на расстоянии примерно 0,7-1,0 мм латеральнее сагиттального шва и 0,7-1,0 мм рострально от лямбды. Иглу вводили на 2 мм ниже поверхности кожи под углом, перпендикулярным поверхности черепа. LNA (20 мкг) в объеме 2 мкл медленно вводили в правый желудочек. Для восстановления, мышей держали на тепловом блоке (32 градуса Цельсия) в течение 5-10 минут, пока не наблюдалось движение. Перед возвращением в домашнюю клетку детенышей обтирали подстилкой, чтобы минимизировать риск детоубийства.

Правое полушарие головного мозга мышей, обработанных LNA, собирали на P15 и P35, а затем мгновенно замораживали жидким азотом. Тотальную РНК выделяли при помощи реагента TRIzol (ThermoFisher Scientific). Для начальной гомогенизации использовали 1 мл реагента TRIzol на полушарие, а выделение РНК выполняли в соответствии с протоколом производителя. После этого, до 20 мкг тотальной РНК на образец обрабатывали 1 мкл ДНазы (набор для обработки и удаления ДНазы, не

содержащий ДНК; ThermoFisher Scientific) в 50 мкл реакции в соответствии с инструкциями производителя; затем ДНазу удаляли с помощью входящего в комплект реагента для инактивации (набор для обработки и удаления ДНазы, не содержащей ДНК; ThermoFisher Scientific). Для генерации кДНК из 500 нг тотальной РНК каждый образец подвергали обратной транскрипции с помощью обратной транскриптазы M-MLV с использованием праймеров олиго(dT)₁₅ (оба Promega) в соответствии с протоколами производителя. Впоследствии 20 нг кДНК каждого образца использовали в качестве матрицы в количественных ПЦР в реальном времени (кРВ-ПЦР). Реакции кРВ-ПЦР готовили с использованием GoTaq кПЦР MasterMix (Promega) в соответствии с инструкциями производителя, и проводили в 96-луночных реакционных планшетах MicroAmp Fast-Optical (ThermoFisher Scientific) с использованием системы ViiA 7 (ThermoFisher Scientific). Во время запуска кРВ-ПЦР за начальной преинкубацией в течение 10 минут при 95°C следовало 40 циклов амплификации (95°C в течение 15 сек, 60°C в течение 60 сек). Наконец, был проведен анализ точки плавления (95 °C в течение 15 сек, 60°C в течение 60 сек, нагрев до 95°C со скоростью 0,05 °C/сек) для определения температур плавления амплифицированных продуктов. Последовательности праймеров (5'-3') были следующими: TGCTGTGCGGAAATCTGCC (прямой праймер SCN2A) (SEQ ID NO: 7); CGGATGCTCAAGAGAGACTGG (обратный праймер SCN2A) (SEQ ID NO: 8); GAGGTGCTGCTGATGTGC (прямой праймер RPL32) (SEQ ID NO: 9); GGCGTTGGGATTGGTGACT (обратный праймер RPL32) (SEQ ID NO: 10). Данные кРВ-ПЦР анализировали с использованием программного обеспечения QuantStudio Real Time PCR v1.3 (ThermoFisher Scientific). Для количественного анализа экспрессии экспрессию SCN2A нормировали на экспрессию конститутивного гена RPL32 (метод $2^{-\Delta\Delta CT}$; Pfaffl et al., *Nucl. Acids. Res.* 29(9): e45, 2001). Нормализованную экспрессию SCN2A у мышей, получавших ASO, затем нормализовали к экспрессии SCN2A в необработанном контроле соответствующего возраста ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

Все три LNA (ASO 1, ASO 2 и ASO 3) снижали уровень мРНК SCN2A в 2-3 раза через 13 дней после инъекции (Фиг. 1A). Аналогичный уровень снижения наблюдался на P35 (Фиг. 1B), **что** указывает на то, что LNA были стабильны в СМЖ и были эффективны в подавлении мРНК SCN2A в течение минимум 1 месяца.

Пример 2: SCN2A ASO анализ выживаемости и припадков у SCN1A гетерозиготных мышей.

Предпосылка

Мышиная модель SCN1A R1407X (Scn1a RX) точно отражает ключевые особенности болезни с ранним началом, тяжелой эпилепсии, известной как синдром Драве. Мыши, гетерозиготные носители мутации R1407X, подвержены повышенному риску преждевременной смерти и спонтанных припадков. Ген Scn1a кодирует потенциал-зависимый натриевый канал Nav1.1, который преимущественно экспрессируется в ингибиторных нейронах. Электрофизиологический анализ показал, что нейроны, экспрессирующие R1407X, не выдерживают высокочастотное возбуждение потенциала

действия, что приводит к дезингибированию и, как следствие, к повышенной возбудимости головного мозга. Следовательно, стратегии, которые могут снизить общую повышенную возбудимость головного мозга, могут быть терапевтическими при синдроме Драве. Ключевым регулятором возбудимости головного мозга на раннем этапе развития является другая изоформа потенциалзависимого натриевого канала, Nav1.2, кодируемая геном SCN2A.

Способ снижения функции Nav1.2 заключается в нацеливании на ген SCN2A с использованием антисмысловых олигонуклеотидов (ASO). ASO являются одноцепочечными олигонуклеотидами ДНК/РНК разработанными для контроля экспрессии необходимого гена. ASO, специально разработанные для подавления гена SCN1A мыши, применяли на мышинной модели SCN1A RX, и эффективность оценивали по степени выживаемости, количеству спонтанных припадков и электроэнцефалограмме (ЭЭГ).

Способы

Количественный анализ экспрессии генов (RT-qPCR)

Тотальную РНК выделяли из ткани головного мозга мыши с использованием реагента Trizol в соответствии с протоколом производителя (ThermoFisher, США). Загрязняющую геномную ДНК удаляли путем обработки ДНКазой (реагенты, не содержащие ДНК, Ambion/Life Technologies, США). Нацеленные на SCN2A мыши праймеры (F: TGCTGTGCGGAAATCTGCC (SEQ ID NO: 7), R: CGGATGCTCAAGAGAGACTGG (SEQ ID NO: 8)) были сконструированы для охвата интронов, чтобы различать амплификацию геномной ДНК и кДНК. Для РВ-кПЦР кДНК примированную олиго-dT, синтезировали из 500 нг тотальной РНК с использованием обратной транскриптазы вируса лейкоза мышей Молони (Promega, США). РВ-кПЦР на системе ViiA 7 Real-Time PCR System с использованием мастер-микса GoTaq qPCR (Promega, США) выполняли в соответствии с протоколами производителя. Значения относительной экспрессии гена получали путем нормализации к эталонному гену RPL32 с использованием метода 2DDCt.

Неонатальная интрацеребровентрикулярная инъекция

Детенышам SCN1A RX вводили 5 мкг антисмысловых олигонуклеотидов SCN2A мыши (ASO mScn2a) или отрицательного контроля, 50 мкг скремблированного ASO, в постнатальный день (P) 1 интрацеребровентрикулярным (ицв) путем. Детенышей подвергали криоанестезии, затем иглу шприца (32G, Hamilton), с загруженным ASO, вводили на полпути между лямбдой и правым глазом. Глубина инъекции составляла 2 мм ниже поверхности кожи, и 2 мкл общего mScn2a ASO вводили в правый желудочек.

Отслеживание припадков

Мышей SCN1A RX помещали в домашнюю клетку и проводили круглосуточное видеонаблюдение с P21 по P28. Видео были просмотрены двумя экспериментаторами, и были отмечены припадки, превышающие 4 балла по шкале Расина. Усредненная по группе частота припадков была рассчитана путем деления общего количества припадков в каждой

экспериментальной группе на количество мышей в экспериментальной группе.

Электроэнцефалография (ЭЭГ)

Мышей SCN1A RX (P30-35) анестезировали 1-3% изофлураном. Мышей помещали в стереотаксический аппарат (Korff) с расположением поверхности черепа горизонтально между лямбдой и брегмой. Четыре эпидуральных электрода были размещены на поверхности головного мозга и зафиксированы стоматологическим цементом. Перед записью ЭЭГ мышей восстанавливали в течение 4-7 дней. Активность коры головного мозга контролировали в течение 24 часов (Pinnacle Technology). Во время записи мыши могли свободно перемещаться по клетке с неограниченным доступом к пище и воде.

Полученные результаты

Снижение мРНК Scn2a путем введения ASO

ASO mScn2a (5 мкг) или скремблированный ASO (50 мкг) вводили в правый желудочек детенышей Scn1a RX на P1. Уровень мРНК Scn2a оценивали через 14 дней после введения ASO. Как и ожидалось, скремблированный ASO не влиял на экспрессию мРНК Scn2a. В головном мозге мышей, обработанных ASO mScn2a, уровень мРНК Scn2a снизился на $78,15 \pm 1,87\%$ (Фиг. 2). У мышей Scn1a RX, обработанных скремблированным ASO, выживаемость составила 76,47% на P21. У мышей Scn1a RX, обработанных mScn2a ASO, гибели к P21 не наблюдалось (фиг. 3). Масса тела была одинаковой между обработанными скремблированным ASO и мышами Scn1a RX, обработанными mScn2a ASO, на P21 и P45 (Фиг. 4A-4B). К экспериментальной конечной точке (P45) выживаемость составила 29,41% и 94,44% для скремблированных и mScn2a ASO, соответственно.

ASO улучшает эпилептический фенотип выживаемости мышинной модели Scn1a RX.

Частые припадки являются изнурительным признаком синдрома Драве, поэтому эпизод припадков является критическим маркером терапевтической эффективности. Мышей Scn1a RX помещали в группы в соответствии с их лечением и помещали под круглосуточный видеомониторинг с P21 по P28 (фиг. 5). Видео были просмотрены, и были отмечены приступы выше 4 баллов по шкале Расина. Спонтанный припадок был значительно снижен с помощью 5 мкг ASO mScn2a по сравнению с мышами Scn1a RX, получавшими скремблированный ASO.

Результаты этого исследования продемонстрировали замечательную терапевтическую эффективность ASO mScn2a на мышинной модели синдрома Драве. Продолжительность жизни мышинной модели заболевания увеличивалась, и фенотип спонтанных припадков был значительно улучшен.

Пример 3: Снижение трансляции SCN2A *in vitro* с помощью ASO SCN2A

Клетки SH-SY5Y человека, которые естественным образом экспрессируют SCN2A, хранят и инкубируют в соответствующей клеточной культуре. Клетки SH-SY5Y обрабатывают 20-мерным антисмысловым олигонуклеотидом, нацеленным на ген SCN2A. Уровни РНК и белка измеряют в отдельных экспериментах с зависимостью от концентрации и времени. Уровни РНК можно измерить с помощью нозерн-блоттинга, ОТ-

ПЦР и/или количественного анализа ПЦР. Уровни белка измеряют с помощью вестерн-блоттинга.

Пример 4: Лечение синдрома Драве путем введения ASO SCN2A.

Пациент-человек с синдромом Драве был отобран для лечения ASO. 20-мерный антисмысловый олигонуклеотид, нацеленный на мРНК SCN2A, синтезируется с фосфоротиоатными связями и модификациями 2МОЕ на всех сахарных фрагментах. ASO растворяют в подходящем наполнителе, совместимом с введением человеку. Раствор, содержащий растворенный ASO, вводится в нейрональные клетки пациента, так что раствор ASO взаимодействует с пораженными нейрональными клетками. ASO трансфицирует нейрональные клетки и изменяет трансляцию SCN2A в целевых клетках, что приводит к снижению уровня белка SCN2A. Количественный анализ (например, вестерн-блоттинг) проводится для измерения снижения уровня белка SCN2A. Иммуногистохимия и иммунное окрашивание золотом используют для прямой визуализации снижения SCN2A в нейрональных клетках. Пациент проходит обширное регулярное обследование, чтобы измерить уменьшение симптомов, ассоциированных с синдромом Драве, после назначения лечения ASO.

Пример 5: Профилактика синдрома Драве путем введения ASO SCN2A

Пациент-человек с мутацией SCN1A, генетическим маркером синдрома Драве, отобран для лечения ASO. 20-мерный антисмысловый олигонуклеотид, нацеленный на мРНК SCN2A, синтезируется с фосфоротиоатными связями и модификациями 2МОЕ на всех сахарных фрагментах. ASO растворяют в подходящем наполнителе, совместимом с введением человеку. Раствор, содержащий растворенный ASO, вводится в нейрональные клетки пациента, так что раствор ASO взаимодействует с пораженными нейрональными клетками. ASO трансфицирует нейрональные клетки и изменяет трансляцию SCN2A в целевых клетках, что приводит к снижению уровня белка SCN2A. Количественный анализ (например, вестерн-блоттинг) проводится для измерения снижения уровня белка SCN2A. Иммуногистохимия и иммунное окрашивание золотом используют для прямой визуализации снижения SCN2A в нейрональных клетках. Пациент проходит обширное регулярное обследование, чтобы определить, возникают ли симптомы, ассоциированные с началом синдрома Драве, после введения лечения ASO.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения энцефалопатии SCN1A у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту соединения, содержащего одноцепочечный олигонуклеотид длиной 10-80 нуклеозидов и имеющего последовательность азотистых оснований, содержащую часть из 10 смежных азотистых оснований, имеющих по меньшей мере 80% комплементарность к равной по длине части целевой области транскрипта пре-мРНК или транскрипта мРНК гена SCN2A человека, в количестве и в течение периода времени, достаточных для лечения энцефалопатии SCN1A.

2. Способ по п. 1, в котором способ снижает экспрессию гена SCN2A человека.

3. Способ по пп. 1 или 2, в котором олигонуклеотид содержит, состоит по существу из или состоит из последовательности азотистых оснований, комплементарной части мРНК SCN2A, кодирующей аминокислотную последовательность с номером доступа в GenBank NP_066287.2 или содержащей последовательность азотистых оснований с номером доступа в GenBank NM_021007.2.

4. Способ по любому из пп. 1-3, в котором олигонуклеотид содержит один или более модифицированных сахаров, и одну или более модифицированных межнуклеозидных связей и/или одно или более модифицированных азотистых оснований.

5. Способ по п. 4, в котором олигонуклеотид содержит один или более модифицированных сахаров.

6. Способ по п. 5, в котором каждый из одного или более модифицированных сахаров независимо выбран из группы, состоящей из бициклического сахара, 2'-О-метоксиэтил (2МОЕ) модифицированного сахара, 2'-О-метокси (2-ОМе) модифицированного сахара, 2'-метокси модифицированного сахара, 2'-О-алкил модифицированного сахара, модифицированного сахара с затрудненным этилом (сEt), заблокированного сахара и разблокированного сахара.

7. Способ по п. 6, в котором олигонуклеотид содержит 2МОЕ-модифицированные сахара по всей длине олигонуклеотида.

8. Способ по любому из пп. 4-7, в котором олигонуклеотид содержит одну или более модифицированных межнуклеозидных связей.

9. Способ по п. 8, в котором одна или более модифицированных межнуклеозидных связей содержат модифицированный фосфат.

10. Способ по п. 9, в котором каждый из модифицированных фосфатов независимо выбран из группы, состоящей из фосфоротиоата, фосфородитиоата, фосфорамидата, фосфородиамидата, тиофосфорамидата, тиофосфородиамидата, метилфосфоната, фосфороморфолидата и фосфоропиперазидата.

11. Способ по п. 10, в котором олигонуклеотид имеет фосфоротиоатные межнуклеозидные связи по всей длине олигонуклеотида.

12. Способ по п. 11, в котором олигонуклеотид имеет фосфородиамидатные морфолиновые межнуклеозидные связи по всей длине олигонуклеотида.

13. Способ по любому из пп. 4-12, в котором олигонуклеотид содержит одно или

более модифицированных азотистых оснований.

14. Способ по п. 13, в котором модифицированное азотистое основание выбрано из группы, состоящей из 5-метилцитозина, 5-гидроксиметилцитозина, ксантина, гипоксантина, 2-аминоаденина, 6-метиладенина, 6-метилгуанина, 2-пропиладенина, 2-пропилгуанина, 2-тиоурацила, 2-тиотимина, 2-тиоцитозина, 5-галогенурацила, 5-галогенцитозина, 5-пропинилурацила, 5-пропинилцитозина, 6-азоурацила, 6-азоцитозина, 6-азотимина, 5-урацила (псевдурацила), 4-тиоурацила, 8-галогенаденина, 8-аминоаденина, 8-тиоладенина, 8-тиоалкиладенина, 8-гидроксиладенина, 8-галогенгуанина, 8-аминогуанина, 8-тиолгуанина, 8-тиоалкилгуанина, 8-гидроксилгуанина, 5-бромурацила, 5-трифторметилурацила, 5-бромцитозина, 5-трифторметилцитозина, 7-метилгуанина, 7-метиладенина, 2-фтораденина, 8-азагуанина, 8-азааденина, 7-дезазагуанина, 7-дезазааденина, 3-дезазагуанина и 3-дезазааденина.

15. Способ по п. 14, в котором модифицированное азотистое основание представляет собой 5-метилцитозин.

16. Способ по п. 15, в котором каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

17. Способ по любому из пп. 4-17, в котором модифицированный олигонуклеотид содержит:

сегмент-гэп, состоящий из связанных дезоксинуклеозидов;

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

сегмент 3'-крыла, состоящий из связанных нуклеозидов;

при этом сегмент-гэп расположен непосредственно между сегментом 5'-крыла и сегментом 3'-крыла и рядом с ними, и при этом каждый нуклеозид каждого сегмента крыла содержит модифицированный сахар.

18. Способ по любому из пп. 1-16, в котором олигонуклеотид состоит из 12-40 азотистых оснований.

19. Способ по п. 18, в котором олигонуклеотид состоит из 16-30 азотистых оснований.

20. Способ по любому из пп. 1-19, причем способ включает ингибирование экспрессии SCN2A в нейрональных клетках субъекта.

21. Способ по любому из пп. 1-20, в котором энцефалопатия SCN1A выбрана из группы, состоящей из эпилепсии, генерализованной эпилепсии с фебрильными припадками, наследственных фебрильных припадков, ранней младенческой эпилептической энцефалопатии 6 и синдрома Драве.

22. Способ по п. 21, в котором энцефалопатия SCN1A представляет собой синдром Драве.

23. Способ по любому из пп. 1-22, в котором соединение вводят интратекально, интрамедуллярно или интрацеребровентрикулярно.

24. Способ по любому из пп. 1-23, в котором снижение экспрессии SCN2A обеспечивает терапевтический эффект.

25. Способ по любому из пп. 1-24, причем способ уменьшает один или более

симптомов энцефалопатии SCN1A.

26. Способ по п. 25, в котором один или более симптомов энцефалопатии SCN1A выбран из группы, состоящей из длительных припадков, частых припадков, поведенческих задержек и задержек в развитии, проблем с движением и равновесием, ортопедических состояний, задержки речевого развития и проблем с речью, проблем роста и питания, проблем со сном, хронической инфекции, нарушения сенсорной интеграции, нарушения вегетативной нервной системы, мигреней и потоотделения.

27. Способ по любому из пп. 1-26, в котором олигонуклеотид является селективным по отношению к пре-мРНК или мРНК SCN2A по сравнению с пре-мРНК или мРНК SCN1A.

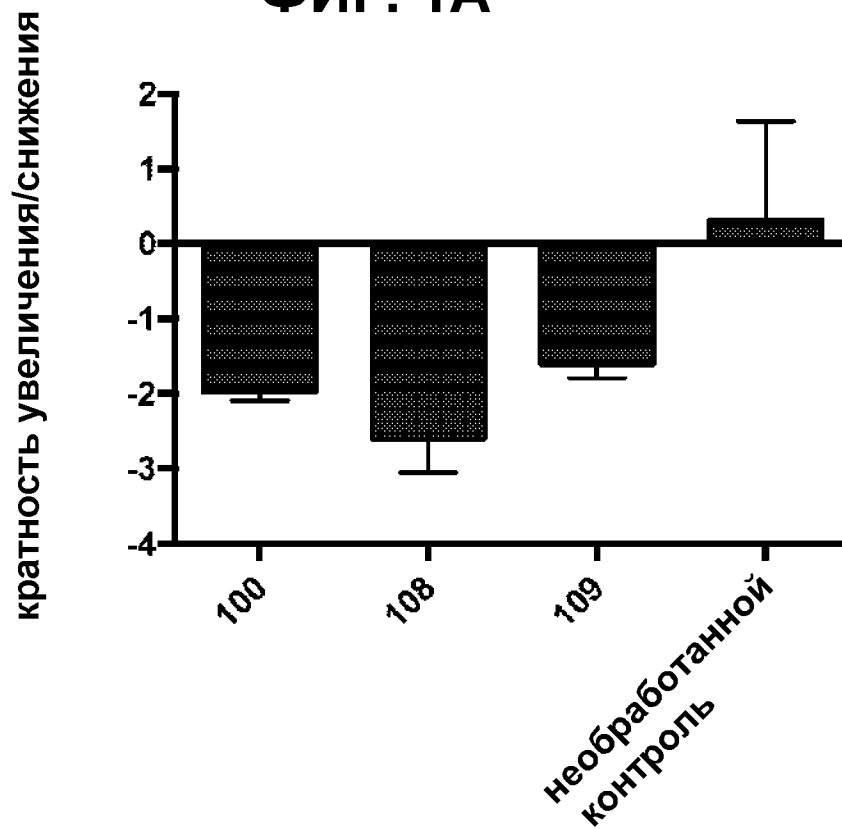
28. Способ по любому из пп. 1-27, причем способ существенно не снижает экспрессию SCN1A.

29. Способ по любому из пп. 1-28, в котором субъект имеет мутацию с приобретением функции у SCN1A

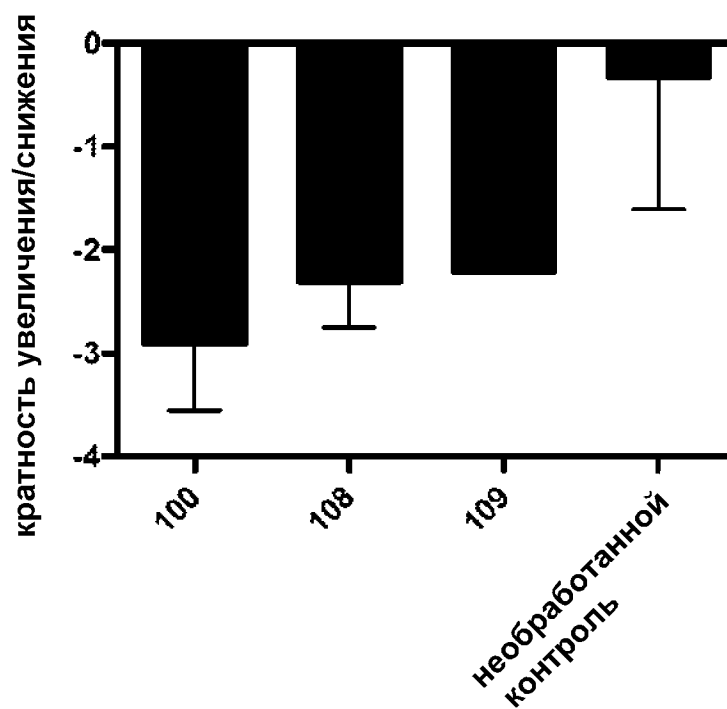
30. Способ по любому из пп. 1-29, в котором субъект имеет мутацию с потерей функции у SCN1A.

По доверенности

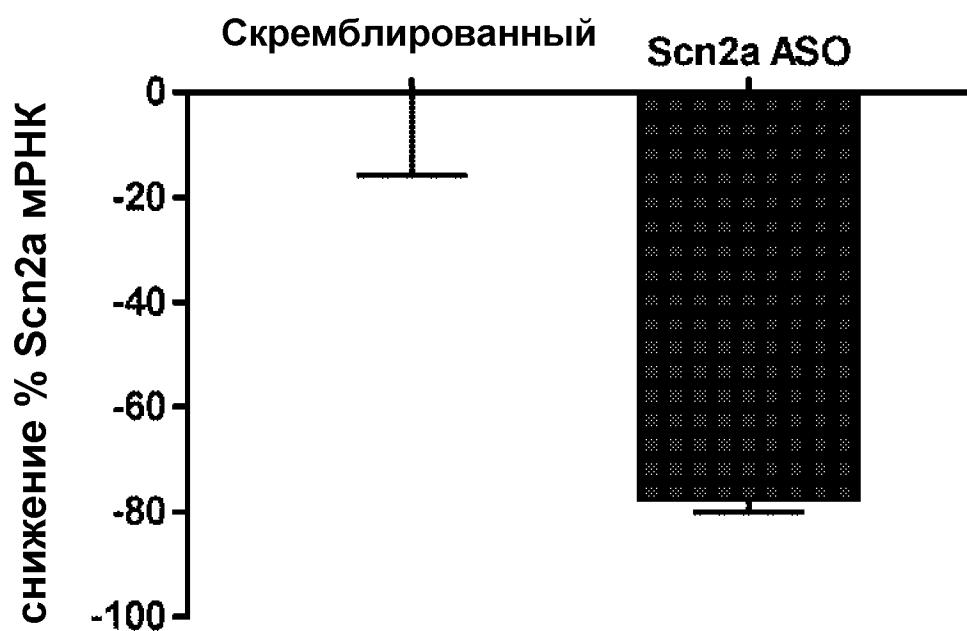
ФИГ. 1А



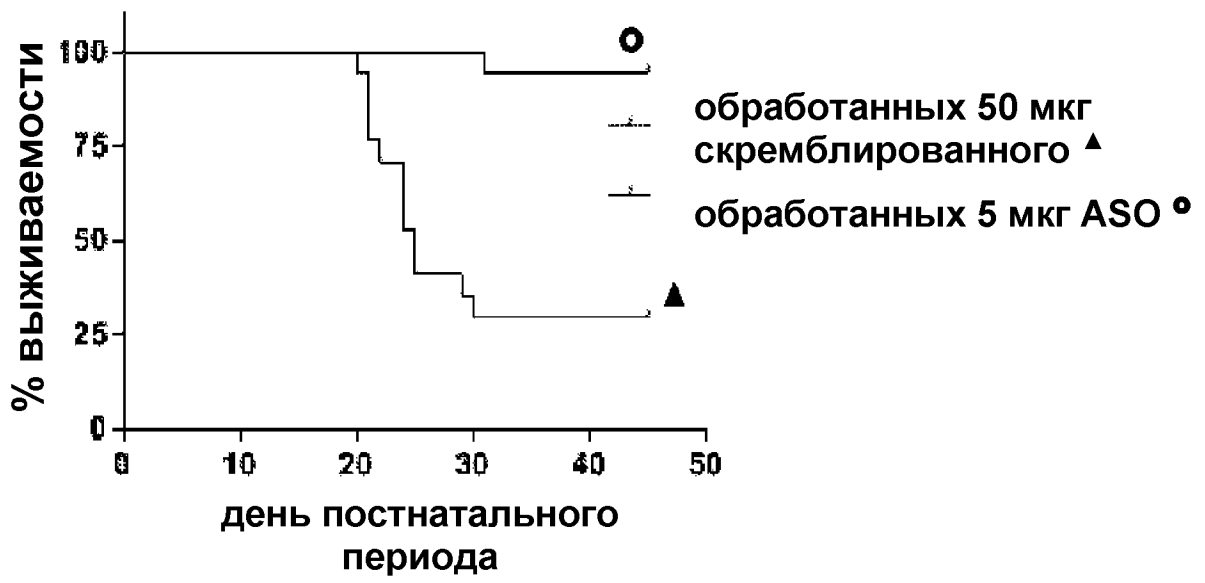
ФИГ. 1В



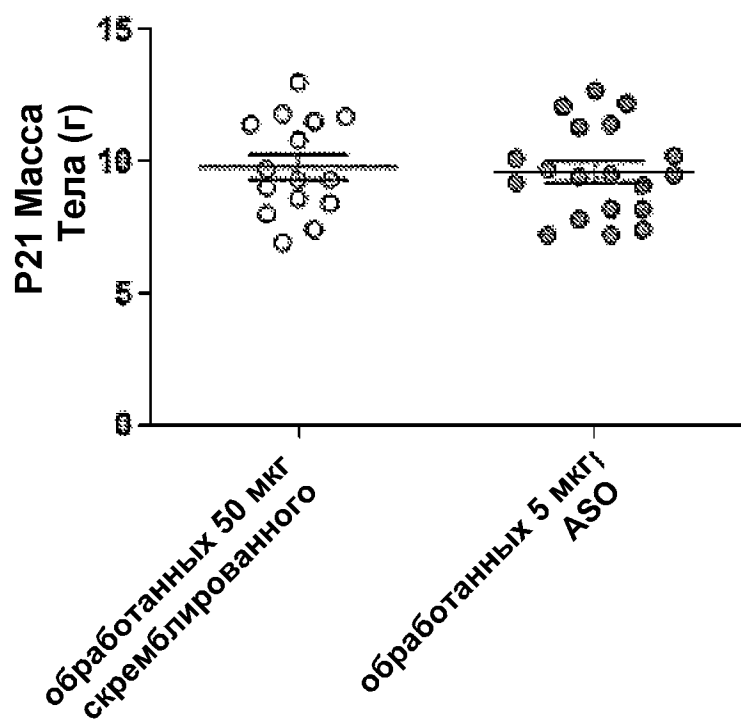
ФИГ. 2



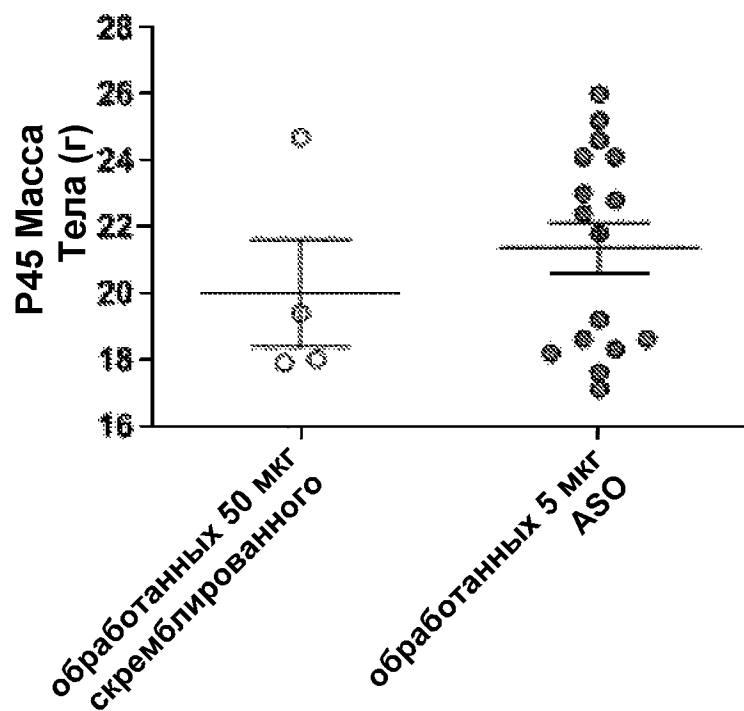
ФИГ. 3



ФИГ. 4А



ФИГ. 4В



ФИГ. 5

