

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192567** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.12.09

(51) Int. Cl. *A61K 31/7125* (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.03.25

(54) **СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ С ПОМОЩЬЮ КАСИМЕРСЕНА**

(31) 62/825,573; 62/902,518

(72) Изобретатель:

(32) 2019.03.28; 2019.09.19

Кайе Эдвард М. (US)

(33) US

(74) Представитель:

(86) PCT/US2020/024550

Медведев В.Н. (RU)

(87) WO 2020/198268 2020.10.01

(71) Заявитель:

**САРЕПТА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)**

(57) Изобретение предусматривает, наряду с прочим, улучшенные композиции и способы лечения мышечной дистрофии. Например, настоящее изобретение предусматривает способы лечения пациентов с мышечной дистрофией Дюшенна, имеющих мутацию в гене DMD, которая поддается лечению посредством пропуска экзона 45, посредством введения эффективного количества касимерсена.

202192567
A1

202192567

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-570404EA/025

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ С ПОМОЩЬЮ КАСИМЕРСЕНА

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 62/825573, поданной 28 марта 2019 года, и предварительной заявке на патент США № 62/902518, поданной 19 сентября 2019 года. Общие идеи вышеуказанных заявок включены посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[2] Настоящее изобретение относится к улучшенным способам лечения мышечной дистрофии у пациента. Оно также обеспечивает композиции, подходящие для обеспечения пропуска экзона 45 в гене дистрофина человека.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[3] При разнообразных генетических заболеваниях эффект мутаций на последующую экспрессию гена может изменяться с помощью процесса пропуска целевого экзона во время процесса сплайсинга. В случаях, где нормально функционирующий белок преждевременно терминирован из-за мутации в нем, была показана возможность осуществления способов для восстановления образования некоторого функционального белка с помощью антисмысловой технологии посредством вмешательства во время процесса сплайсинга, и если экзоны, связанные с заболеваниями, обуславливающими мутации, могут быть точно удалены из некоторых генов, иногда может образовываться укороченный белковый продукт, который имеет биологические свойства, подобные свойствам полноценного белка, или имеет достаточную биологическую активность для уменьшения тяжести заболевания, обусловленного мутациями, связанными с экзоном (см. например, Sierakowska, Sambade et al. 1996; Wilton, Lloyd et al. 1999; van Deutekom, Bremmer-Bout et al. 2001; Lu, Mann et al. 2003; Aartsma-Rus, Janson et al. 2004).

[4] Мышечная дистрофия Дюшенна (DMD) обусловлена нарушением экспрессии белка дистрофина. Дистрофин представляет собой стержневидный цитоплазматический белок и важную часть белкового комплекса, который соединяет цитоскелет мышечного волокна с окружающим внеклеточным матриксом через клеточную мембрану. Дистрофин играет важную структурную роль в мышечном волокне, соединяя внеклеточный матрикс и цитоскелет. N-концевой участок связывает актин, при этом C-концевой участок представляет собой часть гликопротеинового комплекса дистрофина (DGC), который соединяется с сарколеммой. Было показано, что мышечные волокна, испытывающие дефицит дистрофина, мышцей mdx проявляют повышенную предрасположенность к разрыву сарколеммы, индуцированному сокращением (см. Petrof et al. 1993; Cirak et al. 2012).

[5] Ген, кодирующий белок дистрофин, содержит 79 экзонов, расположенных на более чем 2 миллионах нуклеотидов ДНК. Любая экзонная мутация, которая изменяет

рамку считывания экзона, или вводит стоп-кодон, или характеризуется удалением из рамки целого экзона или экзонов, или дубликацией одного или нескольких экзонов, имеет возможность нарушать образование функционального дистрофина, что приводит к DMD.

[6] Начало заболевания может регистрироваться при рождении с присутствием повышенных уровней креатинкиназы и значительных двигательных дефектов в первый год жизни. В возрасте семи или восьми лет большинство пациентов с DMD имеют в возрастающей степени затрудненную походку и теряют способность подниматься с пола и подниматься по лестнице; в возрасте 10-14 лет большинство пациентов являются зависимыми от инвалидной коляски. DMD неизбежно приводит к смертельному исходу; пораженные индивидуумы, как правило, умирают от дыхательной и/или сердечной недостаточности в позднем подростковом возрасте или вскоре после 20-ти лет. Непрерывное развитие DMD допускает терапевтическое вмешательство на всех стадиях заболевания; однако, до недавнего времени лечение было ограничено глюкокортикоидами, которые связаны с множеством побочных эффектов, включая набор веса, изменения в поведении, изменения в пубертатном периоде, остеопороз, синдром Кушинга, задержку роста и катаракту. Следовательно, развитие улучшенных видов терапии для лечения причины, лежащей в основе данного заболевания, является необходимостью.

[7] Было обнаружено, что менее тяжелая форма мышечной дистрофии, мышечная дистрофия Беккера (BMD), возникает когда мутация, как правило, делеция одного или нескольких экзонов, приводит к правильному считыванию рамки всего транскрипта дистрофина так, что трансляция mRNA в белок не терминируется преждевременно. Если присоединение против хода транскрипции и по ходу транскрипции экзонов в процессинге мутированной пре-mRNA дистрофина сохраняет правильную рамку считывания гена, то результат представляет собой mRNA, кодирующую белок с короткой внутренней делецией, который сохраняет некоторую активность, что приводит к фенотипу Беккера.

[8] В течение множества лет было известно, что делеции экзона или экзонов, которые не изменяют рамку считывания белка дистрофина, приводят к фенотипу BMD, тогда как делеция экзона, которая вызывает сдвиг рамки, приводит к DMD (Monaco, Bertelson et al. 1988). В целом, мутации дистрофина, включающие точечные мутации и делеции экзона, которые изменяют рамку считывания и таким образом препятствуют правильной трансляции белка, приводят к DMD. Также должно быть отмечено, что некоторые пациенты с BMD и DMD имеют делеции экзонов, затрагивающие множество экзонов.

[9] Недавние клинические исследования, испытывающие безопасность и эффективность олигонуклеотидов, переключающих сплайсинг (SSO), для лечения DMD, основаны на технологии SSO с индуцированием альтернативного сплайсинга пре-mRNA посредством стерического блокирования сплайсосомы (Cirak et al., 2011; Goemans et al., 2011; Kinali et al., 2009; van Deutekom et al., 2007). Однако, несмотря на такие успехи, фармакологические возможности, доступные для лечения DMD, ограничены.

[10] Таким образом, остается необходимость в улучшенных композициях и способах образования дистрофина и лечения у пациентов мышечной дистрофии, такой как DMD и BMD.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

[11] Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на клинических доказательствах, показывающих, что вследствие лечения с помощью антисмыслового олигонуклеотида, пропускающего экзон 45, касимерсена, в значительной степени повысилось содержание белка дистрофина у пациентов относительно исходного уровня. Кроме того, наблюдали положительную корреляцию между пропуском экзона и белком дистрофина *de novo*.

[12] Соответственно, в некоторых аспектах изобретение предусматривает способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD) у пациента, нуждающегося в этом, который имеет мутацию в гене DMD, которая поддается лечению посредством пропуска экзона 45, включающий введение пациенту дозы касимерсена или его фармацевтически приемлемой соли.

[13] В некоторых аспектах изобретение предусматривает способ восстановления рамки считывания mRNA с индуцированием пропуска экзона у пациента с мышечной дистрофией Дюшенна (DMD), нуждающегося в этом, который имеет мутацию в гене DMD, которая поддается лечению посредством пропуска экзона 45, включающий введение пациенту дозы касимерсена или его фармацевтически приемлемой соли.

[14] В некоторых аспектах изобретение предусматривает способ повышения образования дистрофина у пациента с мышечной дистрофией Дюшенна (DMD), нуждающегося в этом, который имеет мутацию в гене DMD, которая поддается лечению посредством пропуска экзона 45, включающий введение пациенту дозы касимерсена или его фармацевтически приемлемой соли.

[15] В некоторых аспектах дозу вводят при величине дозы, составляющей приблизительно 4 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 20 мг/кг, приблизительно 30 мг/кг, приблизительно 40 мг/кг или приблизительно 50 мг/кг веса тела пациента.

[16] В некоторых аспектах дозу вводят в виде однократной дозы. В некоторых аспектах дозу вводят один раз в неделю. В некоторых аспектах дозу вводят внутривенно. В некоторых аспектах дозу вводят внутривенно путем инфузии. В некоторых аспектах дозу вводят внутривенно путем инфузии в течение периода времени 35-60 минут. В некоторых аспектах дозу вводят внутривенно путем подкожной инъекции.

[17] В некоторых аспектах возраст пациента составляет не более 40 лет, не более 30 лет или не более 21 года. В некоторых аспектах возраст пациента составляет от 1 до 21 года. В некоторых аспектах возраст пациента составляет от 5 до 21 года. В некоторых аспектах возраст пациента составляет от 7 до 13 лет.

[18] В некоторых аспектах изобретение предусматривает способ в соответствии с любым из вышеуказанных или связанных аспектов, где пациент имеет мутацию гена

DMD, которая выбрана из группы, включающей экзоны 7-42, 12-42, 18-42, 44-46, 44-47, 44-48, 44-49, 44-51, 44-53, 44-55, 44-57 или 44-59 или экзон 44.

[19] В некоторых аспектах изобретение предусматривает способы в соответствии с любым из вышеуказанных или связанных аспектов, где пациенту длительно вводят касимерсен. В некоторых аспектах пациенту вводят касимерсен в течение по меньшей мере 48 недель. В некоторых аспектах пациенту вводят касимерсен в течение более чем одного года, более чем двух лет, более чем трех лет, более чем четырех лет, более чем пяти лет, более чем десяти лет, более чем двадцати лет или более чем тридцати лет.

[20] В некоторых аспектах изобретение предусматривает способы в соответствии с любым из вышеуказанных или связанных аспектов, где пациент принимает стабильную дозу кортикостероидов в течение по меньшей мере 6 месяцев до введения касимерсена. В некоторых аспектах пациент принимает стабильную дозу кортикостероидов в течение по меньшей мере 6 месяцев до введения касимерсена и продолжает принимать кортикостероиды во время введения касимерсена.

[21] В некоторых аспектах изобретение предусматривает способы в соответствии с любым из вышеуказанных или связанных аспектов, где касимерсен или его фармацевтически приемлемая соль составлены в виде фармацевтической композиции. В некоторых аспектах касимерсен или его фармацевтически приемлемая соль составлены в виде фармацевтической композиции при концентрации 50 мг/мл. В некоторых аспектах касимерсен или его фармацевтически приемлемая соль составлены в виде фармацевтической композиции при концентрации 50 мг/мл и представлены в лекарственной форме в количестве 100 мг/2 мл. В некоторых аспектах касимерсен или его фармацевтически приемлемая соль составлены в виде фармацевтической композиции при концентрации 50 мг/мл и представлены в лекарственной форме в количестве 500 мг/2 мл. В некоторых аспектах лекарственная форма содержится во флаконе для однократного применения.

[22] В некоторых аспектах касимерсен или его фармацевтически приемлемая соль составлены в виде фармацевтической композиции, содержащей касимерсен или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых аспектах фармацевтически приемлемый носитель представляет собой забуференный фосфатом раствор.

[23] В некоторых аспектах изобретение предусматривает способ в соответствии с любым из вышеуказанных или связанных аспектов, где пропуск экзона определяют посредством полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (RT-PCR).

[24] В некоторых аспектах изобретение предусматривает способ в соответствии с любым из вышеуказанных или связанных аспектов, где способ обеспечивает повышение образования дистрофина у пациента. В некоторых аспектах образование дистрофина измеряют с помощью вестерн-блот анализа. В некоторых аспектах образование дистрофина измеряют с помощью иммуногистохимического исследования (ИНС).

[25] В некоторых аспектах изобретение предусматривает способ в соответствии с

любым из вышеуказанных или связанных аспектов, дополнительно включающий подтверждение, что пациент имеет мутацию в гене DMD, которая поддается лечению посредством пропуска экзона 45, до введения касимерсена.

[26] В некоторых аспектах изобретение предусматривает применение касимерсена или его фармацевтически приемлемой соли для лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD) у пациента, нуждающегося в этом, при этом пациент имеет мутацию гена DMD, которая поддается лечению посредством пропуска экзона 45, где лечение включает введение пациенту однократной внутривенной дозы касимерсена, составляющей приблизительно 30 мг/кг, один раз в неделю.

[27] В некоторых аспектах изобретение предусматривает применение касимерсена или его фармацевтически приемлемой соли для применения при восстановлении рамки считывания mRNA с индуцированием пропуска экзона у пациента с мышечной дистрофией Дюшенна (DMD), нуждающегося в этом, при этом пациент имеет мутацию гена DMD, которая поддается лечению посредством пропуска экзона 45, где лечение включает введение пациенту однократной внутривенной дозы касимерсена, составляющей приблизительно 30 мг/кг, один раз в неделю.

[28] В некоторых аспектах изобретение предусматривает применение касимерсена или его фармацевтически приемлемой соли для применения при повышении образования дистрофина у пациента с мышечной дистрофией Дюшенна (DMD), нуждающегося в этом, при этом пациент имеет мутацию гена DMD, которая поддается лечению посредством пропуска экзона 45, где лечение включает введение пациенту однократной внутривенной дозы касимерсена, составляющей приблизительно 30 мг/кг, один раз в неделю.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[29] Варианты осуществления по настоящему изобретению относятся к способам лечения мышечной дистрофии, такой как DMD, посредством введения касимерсена - специально разработанного антисмыслового олигонуклеотида для индуцирования пропуска экзона 45 в гене дистрофина человека. Дистрофин играет важную роль в мышечной функции, и различные заболевания, связанные с мышцами, характеризуются мутированной формой данного гена. Следовательно, в определенных вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, могут применяться для индуцирования пропуска экзона 45 в мутированных формах гена дистрофина человека, такой как мутированный ген дистрофина, обнаруживаемый при DMD.

[30] Таким образом, настоящее изобретение относится к способам лечения мышечной дистрофии, такой как DMD, посредством индуцирования пропуска экзона 45 у пациента. Кроме того, изобретение относится к способам восстановления рамки считывания mRNA для индуцирования пропуска экзона у пациента с DMD. Изобретение также относится к способам повышения образования дистрофина у пациентов с DMD.

[31] Если не указано иное, то все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют такое же значение, как общепринятое специалистами, имеющими обычную квалификацию в данной области техники, к которой относится

настоящее изобретение. Хотя на практике или испытании настоящего изобретения могут использоваться любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, описаны предпочтительные способы и материалы. Для целей настоящего изобретения следующие термины определены ниже.

I. Определения

[32] Слово «приблизительно» означает количество, уровень, значение, число, частоту, долю в процентах, величину, размер, количество, вес или длину, которая отличается на 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% относительно исходного количества, уровня, значения, числа, частоты, доли в процентах, величины, размера, количества, веса или длины.

[33] Фраза «поддается лечению посредством пропуска экзона 45», используемая в данном документе относительно субъекта или пациента, предполагает включение субъектов и пациентов, имеющих одну или несколько мутаций в гене дистрофина, которые при отсутствии пропуска экзона 45 гена дистрофина вызывают смещение рамки считывания, тем самым нарушая трансляцию пре-mRNA, приводя к неспособности субъекта или пациента образовывать дистрофин. Неограничивающие примеры мутаций в следующих экзонах гена дистрофина, поддающиеся лечению посредством пропуска экзона 45, включают, например, делеции: экзонов 7-42, 12-42, 18-42, 44-46, 44-47, 44-48, 44-49, 44-51, 44-53, 44-55, 44-57 или 44-59 или экзона 44. Определение того, имеет ли пациент мутацию в гене дистрофина, которая поддается лечению посредством пропуска экзона, находится в области компетенции специалиста в данной области техники (см., например, Aartsma-Rus et al. (2009) *Hum Mutat.* 30:293-299, Gurvich et al., *Hum Mutat.* 2009; 30(4) 633-640, и Fletcher et al. (2010) *Molecular Therapy* 18(6) 1218-1223).

[34] Термины «антисмысловой олигомер», и «антисмысловое соединение», и «антисмысловой олигонуклеотид», и «олигомер», и «олигонуклеотид» применяют взаимозаменяемо в данном изобретении и относится к последовательности циклических субъединиц, соединенных межсубъединичными связями, при этом каждая циклическая субъединица состоит из: (i) сахара, представляющего собой рибозу или ее производного; и (ii) связанного с ним фрагмента азотистого основания так, что порядок связывания фрагментов азотистых оснований образует нуклеотидную последовательность, которая является комплементарной к целевой последовательности в нуклеиновой кислоте (как правило, РНК) согласно правилу Уотсон-Криковского связывания оснований, с образованием нуклеиновой кислоты: олигомерный гетеродуплекс внутри целевой последовательности. В определенных вариантах осуществления олигомер представляет собой фосфordiамидатный морфолиновый олигомер («РМО»). В других вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид представляет собой 2'-О-метилтиофосфат. В других вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид по настоящему изобретению представляет собой пептидно-нуклеиновую кислоту (PNA), закрытую нуклеиновую кислоту (LNA) или содержащую мостиковую связь нуклеиновую кислоту (BNA), такую как нуклеиновая кислота, содержащая 2'-О,4'-С-этилен мостиковую связь

(ENA).

[35] Термины «комплементарный» и «комплементарность» относятся к двум или более олигомерам (т. е., каждый содержит последовательность нуклеиновых оснований), которые связаны друг с другом согласно Уотсон-Криковским правилам связывания оснований. Например, последовательность нуклеиновых оснований «Т-Г-А (5'□3')» является комплементарной к последовательности нуклеиновых оснований «А-С-Т (3'□5')». Комплементарность может быть «частичной», при которой не все нуклеиновые основания данной последовательности нуклеиновых оснований сопрягаются с другой последовательностью нуклеиновых оснований в соответствии с правилами связывания оснований. Например, в некоторых вариантах осуществления комплементарность между данной последовательностью нуклеиновых оснований и другой последовательностью нуклеиновых оснований может составлять приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. Или, может быть «полная» или «совершенная» (100%) комплементарность между данной последовательностью нуклеиновых оснований и другой последовательностью нуклеиновых оснований в продолжении примера. Степень комплементарности между последовательностями нуклеиновых оснований оказывает значительные эффекты на эффективность и силу гибридизации между последовательностями.

[36] Дистрофин представляет собой стержневидный цитоплазматический белок и важную часть белкового комплекса, который соединяет цитоскелет мышечного волокна с окружающим внеклеточным матриксом через клеточную мембрану. Дистрофин содержит множество функциональных доменов. Например, дистрофин содержит актин-связывающий домен, приблизительно состоящий из аминокислот 14-240 и центральный стержневидный домен, приблизительно состоящий из аминокислот 253-3040. Данный большой центральный домен образован из 24 подобных тройных спиральных элементов, подобных спектриновым, состоящих из приблизительно 109 аминокислот, которые гомологичны альфа-актину и спектрину. Повторы, как правило, прерываются четырьмя не повторяющимися сегментами с высоким содержанием пролина, которые также называются шарнирными участками. Повторы 15 и 16 разделены участком, состоящим из 18 аминокислот, который, как оказывается, обеспечивает главный сайт протеолитического расщепления дистрофина. Идентичность последовательности между большинством повторов находится в диапазоне от 10-25%. Один повтор содержит три альфа-спирали: 1, 2 и 3. Каждая из альфа-спиралей 1 и 3 образована с помощью 7 поворотов спирали, возможно, взаимодействуя как суперспираль с помощью гидрофобной поверхности контакта. Альфа-спираль 2 имеет более сложную структуру и образована из сегментов с четырьмя и тремя поворотами спирали, разделенными остатком глицина или пролина. Каждый повтор закодирован двумя экзонами, как правило, прерванными интроном между аминокислотами 47 и 48 в первой части альфа-спирали 2. Другой интрон обнаруживается в различных положениях в повторе, обычно находящихся вокруг спирали 3. Дистрофин также содержит домены с высоким содержанием цистеина, состоящие из приблизительно

3080-3360 аминокислот, включая сегменты с высоким содержанием цистеина (т. е., 15 остатков цистеина в 280 аминокислотах), проявляя гомологичность с С-концевым доменом альфа-актина гриба слизевого гриба (*Dictyostelium discoideum*). Карбоксиконцевой домен состоит из приблизительно 3361-3685 аминокислот.

[37] N-конец дистрофина связывается с F-актином и С-конец связывается с дистрофин-ассоциированным белковым комплексом (DAPC) в сарколемме. DAPC включает дистрогликаны, саркогликаны, интегрин и кавеолин, и мутации в любом из этих компонентов обуславливают аутосомно наследуемые мышечные дистрофии. При отсутствии дистрофина DAPC дестабилизируется, что приводит к уменьшению уровня белковых элементов, и, в свою очередь, приводит к прогрессирующему повреждению волокон и утечке через мембрану. В различных формах мышечной дистрофии, таких как мышечная дистрофия Дюшенна (DMD) и мышечная дистрофия Беккера (BMD), мышечная клетка продуцирует измененную и функционально дефектную форму дистрофина, или не продуцирует дистрофин совсем, преимущественно из-за мутаций в последовательности гена, которые приводят к неправильному сплайсингу. Преобладающая экспрессия дефектного белка дистрофина, или полное отсутствие дистрофина или белка, подобного дистрофину, приводит к быстрому развитию мышечной дегенерации, как указано выше. В связи с этим «дефектный» белок дистрофин может характеризоваться формами дистрофина, которые образуются у некоторых субъектов с DMD или BMD, как известно из уровня техники, или отсутствием определяемого дистрофина.

[38] «Экзон» относится к определенному участку нуклеиновой кислоты, который кодирует белок или последовательность нуклеиновой кислоты, которая представлена в зрелой форме молекулой РНК после того, как все части предварительно обработанной (или предшествующей) РНК удалены посредством сплайсинга. Зрелая молекула РНК может представлять собой информационную РНК (mRNA) или функциональную форму некодирующей РНК, такую как rRNA или tRNA. Ген дистрофина человека имеет приблизительно 79 экзонов.

[39] «Инtron» относится к участку нуклеиновой кислоты (внутри гена), которая не транслируется в белок. Инtron представляет собой некодирующий участок, который транскрибируется в незрелую mRNA (пре-mRNA), и впоследствии удаляется посредством сплайсинга во время образования зрелой РНК.

[40] «Эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству терапевтического соединения, такого как антисмысловый олигомер, включая, например, касимерсен, которое вводится субъекту-млекопитающему, в виде однократной дозы или как часть серии доз, что является эффективным для получения необходимого терапевтического эффекта. Для антисмыслового олигомера данный эффект может быть осуществлен посредством ингибирования трансляции или природного сплайс-процессинга выбранной целевой последовательности, или пропуска экзона для повышения образования дистрофина.

[41] В некоторых вариантах осуществления эффективное количество составляет по меньшей мере 4 мг/кг, по меньшей мере 10 мг/кг или по меньшей мере 20 мг/кг антисмыслового олигомера или композиции, включающей антисмысловый олигомер, в течение периода времени лечения субъекта. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество составляет по меньшей мере 4 мг/кг, по меньшей мере 10 мг/кг или по меньшей мере 20 мг/кг антисмыслового олигомера или композиции, включающей антисмысловый олигомер, для повышения числа дистрофин-положительных волокон у субъекта. В различных вариантах осуществления эффективное количество составляет по меньшей мере 4 мг/кг, по меньшей мере 10 мг/кг, от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 20 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 25 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг или от приблизительно 30 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество составляет приблизительно 30 мг/кг или приблизительно 50 мг/кг.

[42] В различных вариантах осуществления эффективное количество составляет по меньшей мере 4 мг/кг, по меньшей мере 10 мг/кг или по меньшей мере 20 мг/кг антисмыслового олигомера или композиции, включающей антисмысловый олигомер, для повышения образования дистрофина у субъекта. В различных вариантах осуществления эффективное количество составляет по меньшей мере 4 мг/кг, по меньшей мере 10 мг/кг, от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 20 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 25 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг или от приблизительно 30 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество составляет приблизительно 30 мг/кг или приблизительно 50 мг/кг.

[43] В определенных вариантах осуществления эффективное количество составляет по меньшей мере 4 мг/кг, по меньшей мере 10 мг/кг или по меньшей мере 20 мг/кг антисмыслового олигомера или композиции, включающей антисмысловый олигомер, для стабилизации, поддержания или улучшения пройденной дистанции от 20% дефицита, например при 6 MWT, у пациента относительно здорового сверстника. В различных вариантах осуществления эффективное количество составляет по меньшей мере 4 мг/кг, по меньшей мере 10 мг/кг, от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 20 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 25 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг или от приблизительно 30 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество составляет приблизительно 30 мг/кг или приблизительно 50 мг/кг.

[44] В определенных вариантах осуществления эффективное количество составляет по меньшей мере 4 мг/кг, по меньшей мере 10 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 20 мг/кг, приблизительно 25 мг/кг, приблизительно 30 мг/кг или от приблизительно 30 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг, в течение по меньшей мере 24 недель, по меньшей мере 36 недель или по меньшей мере 48 недель, тем самым повышая число дистрофин-положительных волокон у субъекта. В некоторых вариантах

осуществления повышение количества дистрофин-положительных волокон у субъекта составляет по меньшей мере 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95% от нормы. В некоторых вариантах осуществления лечение повышает число дистрофин-положительных волокон до 20-60% или 30-50% от нормы у пациента.

[45] В определенных вариантах осуществления эффективное количество составляет по меньшей мере 4 мг/кг, по меньшей мере 10 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 20 мг/кг, приблизительно 25 мг/кг, приблизительно 30 мг/кг или от приблизительно 30 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг, в течение по меньшей мере 24 недель, по меньшей мере 36 недель или по меньшей мере 48 недель для стабилизации, поддержания или улучшения пройденной дистанции от 20% дефицита, например при 6 MWT, у пациента относительно здорового сверстника.

[46] В различных вариантах осуществления эффективное количество составляет по меньшей мере 4 мг/кг, по меньшей мере 10 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 20 мг/кг, приблизительно 25 мг/кг, приблизительно 30 мг/кг или от приблизительно 30 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг в течение по меньшей мере 24 недель, по меньшей мере 36 недель или по меньшей мере 48 недель, тем самым повышая образование дистрофина у пациента. В некоторых вариантах осуществления повышение образования дистрофина составляет приблизительно 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,5%, 0,7%, 0,9%, 1%, 1,01%, 1,5%, 2%, 2,01%, 2,5%, 3%, 3,01%, 3,5%, 4%, 4,01%, 4,5%, 5%, 5,01%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5%, 8%, 8,5%, 9%, 9,5%, 10%, 10,5%, 11%, 11,5%, 12%, 12,5%, 13%, 13,5%, 14%, 14,5%, 15%, 15,5%, 16%, 16,5%, 17%, 17,5%, 18%, 18,5%, 19%, 19,5%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% или 60% относительно здорового сверстника. В определенных вариантах осуществления повышение образования дистрофина может составлять приблизительно 0,1%-0,5%, 0,5%-0,9%, 0,8%-1%, 0,9%-1,2%, 0,9%-1,0%, 0,9%-1,01%, 1%-1,01%, 1%-1,5%, 1,5%-2%, 1,9%-2,0%, 1,9%-2,01%, 2%-2,01%, 2%,-2,5%, 2,5%-3%, 2,9%-3,0%, 2,9%-3,01%, 2%-3,01%, 3%-3,5%, 3,5%-4%, 4%-4,5%, 4,5%-5%, 5%-6%, 6%-7%, 7%-8%, 8%-9%, 9%-10%, 1%-2%, 1%-3%, 1%-5%, 2%-4%, 2%-5%, 4%-6%, 5%,-8%, 8%-10%, 1%-5%, 2%-6%, 3%-7%, 4%-8%, 5%-10%, 10%-12%, 12%-15%, 15%-20%, 17%-20%, 20%-22%, 20%-25%, 25%-30% или 30%-35% относительно здорового сверстника.

[47] Под «усиливать», или «усиливающий», или «повышение», или «повышающий», или «индуцировать», или «индуцирующий» в общем понимают отношение к способности одного или нескольких антисмысловых олигонуклеотидов, включающих, например, касимерсен или его фармацевтические композиции, вызывать или обуславливать больший физиологический ответ (т. е., эффекты по ходу транскрипции) в клетке или субъекте по сравнению с ответом, обусловленным или отсутствием антисмыслового олигонуклеотида, или контрольным соединением. Измеряемый физиологический ответ может включать повышение экспрессии (или

образования) функциональных форм белка дистрофина или повышение биологической активности, связанной с дистрофином, в мышечной ткани наряду с ответами, очевидными для понимания из уровня техники и описания данного документа. Также можно измерить повышение функции мышц, включая повышение или улучшение функции мышц на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100%. Также можно измерить процентную долю мышечных волокон, которые экспрессируют функциональный дистрофин, включая повышение экспрессии дистрофина в приблизительно 1%, 2%, 5%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% мышечных волокон. Например, было показано, что может происходить около 40% улучшения функции мышц, если 25-30% волокон экспрессируют дистрофин (см., например, DelloRusso et al, Proc Natl Acad Sci USA 99: 12979-12984, 2002). В некоторых вариантах осуществления повышение образования дистрофина составляет приблизительно 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,5%, 0,7%, 0,9%, 1%, 1,01%, 1,5%, 2%, 2,01%, 2,5%, 3%, 3,01%, 3,5%, 4%, 4,01%, 4,5%, 5%, 5,01%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5%, 8%, 8,5%, 9%, 9,5%, 10%, 10,5%, 11%, 11,5%, 12%, 12,5%, 13%, 13,5%, 14%, 14,5%, 15%, 15,5%, 16%, 16,5%, 17%, 17,5%, 18%, 18,5%, 19%, 19,5%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% или 60% относительно здорового сверстника. В определенных вариантах осуществления повышение образования дистрофина может составлять приблизительно 0,1%-0,5%, 0,5%-0,9%, 0,8%-1%, 0,9%-1,2%, 0,9%-1,0%, 0,9%-1,01%, 1%-1,01%, 1%-1,5%, 1,5%-2%, 1,9%-2,0%, 1,9%-2,01%, 2%-2,01%, 2%,-2,5%, 2,5%-3%, 2,9%-3,0%, 2,9%-3,01%, 2%-3,01%, 3%-3,5%, 3,5%-4%, 4%-4,5%, 4,5%-5%, 5%-6%, 6%-7%, 7%-8%, 8%-9%, 9%-10%, 1%-2%, 1%-3%, 1%-5%, 2%-4%, 2%-5%, 4%-6%, 5%,-8%, 8%-10%, 1%-5%, 2%-6%, 3%-7%, 4%-8%, 5%-10%, 10%-12%, 12%-15%, 15%-20%, 17%-20%, 20%-22%, 20%-25%, 25%-30% или 30%-35% относительно здорового сверстника. Используемые в данном документе фразы «повышение образования дистрофина», «повышенное образование дистрофина» или т. п. относятся к повышению образования по меньшей мере одного из дистрофина, белка, подобного дистрофину, или функционального белка дистрофина у субъекта.

[48] «Повышенное» или «увеличенное» количество, как правило, представляет собой «статистически значимое» количество и может включать повышение в 1,1, 1,2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 или более раз (например, 500, 1000 раз), (включая все целые числа и десятичные точки между ними и больше 1), например, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т. д.) больше по сравнению с количеством, которое образовывается без содержания антисмыслового олигонуклеотида (отсутствие средства) или контрольного соединения.

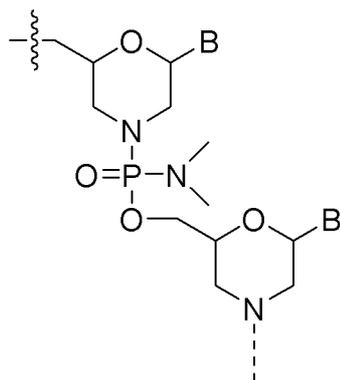
[49] Термин «понижение» или «ингибирование» может в общем относиться к способности одного или нескольких антисмысловых соединений по настоящему изобретению к «уменьшению» соответствующего физиологического или клеточного ответа, такого как симптом заболевания или состояние, описанное в данном документе,

как измерено в соответствии с принятыми методиками в области диагностики. Соответствующие физиологические или клеточные ответы (*in vivo* или *in vitro*) будут являться очевидными для специалистов в данной области техники и могут включать понижения проявлений симптомов или патологии мышечной дистрофии, или понижение экспрессии дефектных форм дистрофина, таких как измененные формы дистрофина, которые экспрессируются у индивидуумов с DMD или BMD. «Уменьшение» ответа может быть статистически значимым по сравнению с ответом, получаемым в отсутствие антисмыслового соединения или контрольной композиции, и может включать 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% уменьшение, включая все промежуточные целые числа.

[50] Используемые в данном документе термины «функция» и «функциональный» и т. п. относятся к биологической, ферментативной или терапевтической функции.

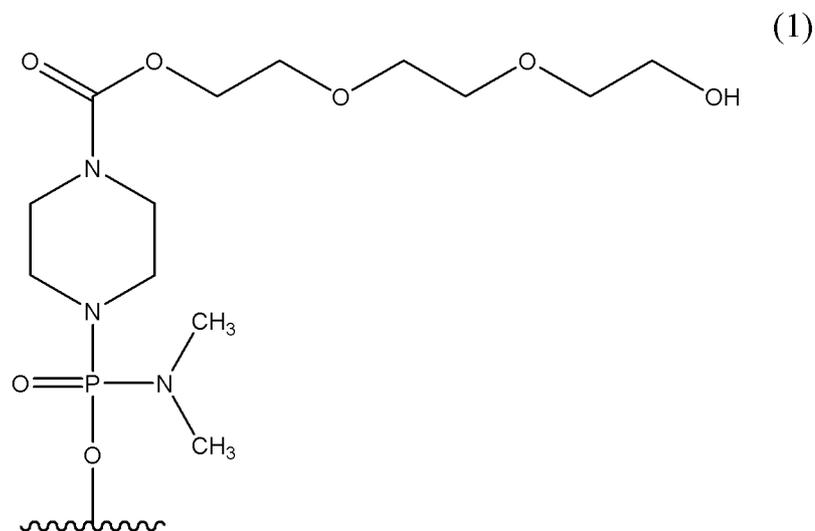
[51] «Функциональный» белок дистрофин относится в общем к белку дистрофину, имеющему достаточную биологическую активность для понижения прогрессирующего разрушения мышечной ткани, которое в другом случае является характеристикой мышечной дистрофии, как правило, по сравнению с измененной или «дефектной» формой белка дистрофина, которая присутствует у определенных субъектов с DMD или BMD. В определенных вариантах осуществления функциональный белок дистрофин может иметь приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% (включая все промежуточные целые числа) биологической активности дистрофина дикого типа *in vitro* или *in vivo*, как измерено в соответствии с принятыми методиками в уровне техники. В качестве одного примера, может измеряться активность в мышечных культурах *in vitro*, связанная с дистрофином, в соответствии с размером мышечной трубочки, организацией (или дезорганизацией) миофибрилл, сократительной активностью и произвольной кластеризацией рецепторов ацетилхолина (см., например, Brown et al., *Journal of Cell Science*. 112:209-216, 1999). Животные модели также представляют собой полезные ресурсы для исследования патогенеза заболевания и предусматривают средства для испытания активности, связанной с дистрофином. Две из наиболее широко применяемых животных моделей для изучения DMD представляют собой мышей *mdx* и собак золотистого ретривера с мышечной дистрофией (GRMD), обе из которых являются дистрофин-отрицательными (см., например, Collins & Morgan, *Int J Exp Pathol* 84: 165-172, 2003). Эти и другие животные модели могут использоваться для измерения функциональной активности различных белков дистрофина. Включая укороченные формы дистрофина, такие как те формы, которые образуются определенными антисмысловыми олигонуклеотидами, пропускающими экзоны, по настоящему изобретению.

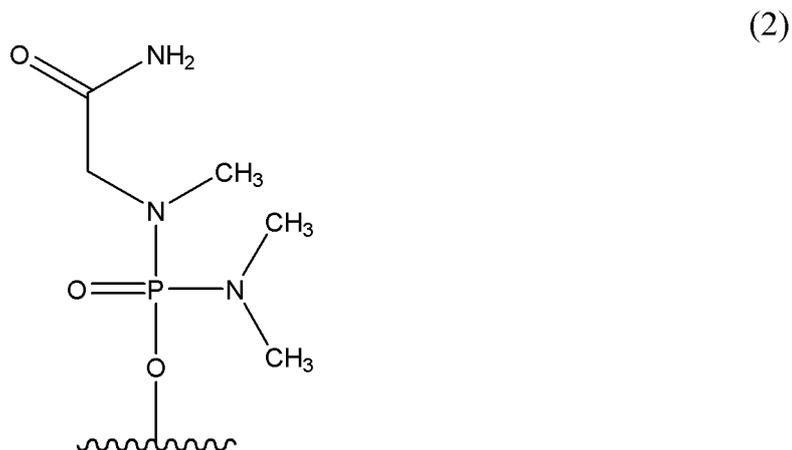
[52] Термины «морфолиновый олигонуклеотид», «морфолиновый олигомер» или «РМО» относятся к фосфордиамидату морфолинового олигомера со следующей общей структурой:



B = нуклеиновое основание

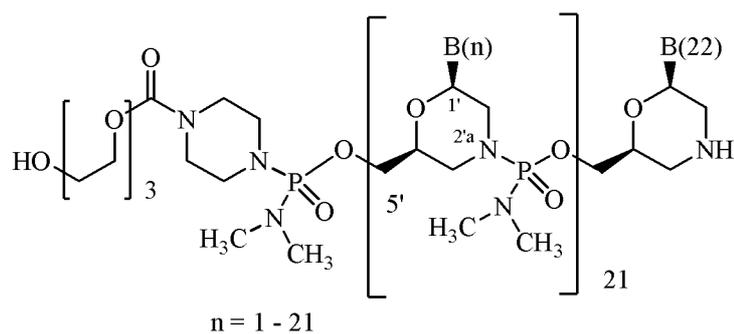
и как изображено на фигуре 2 Summerton, J., et al., *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 7: 187-195 (1997). Морфолиновые олигонуклеотиды, как описано в данном документе, предназначены для описания всех стереоизомеров (и их смесей) и конфигураций с вышеуказанной общей структурой. Характеристики синтеза, структур и связывания морфолиновых олигомеров подробно описаны в патентах США №№ 5698685, 5217866, 5142047, 5034506, 5166315, 5521063, 5506337, 8076476 и 8299206, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки. В определенных вариантах осуществления морфолиновые олигонуклеотиды конъюгированы при 5'- или 3'-конце олигомера с «хвостовым» фрагментом для повышения его стабильности и/или растворимости. Иллюстративные хвостовые фрагменты включают:





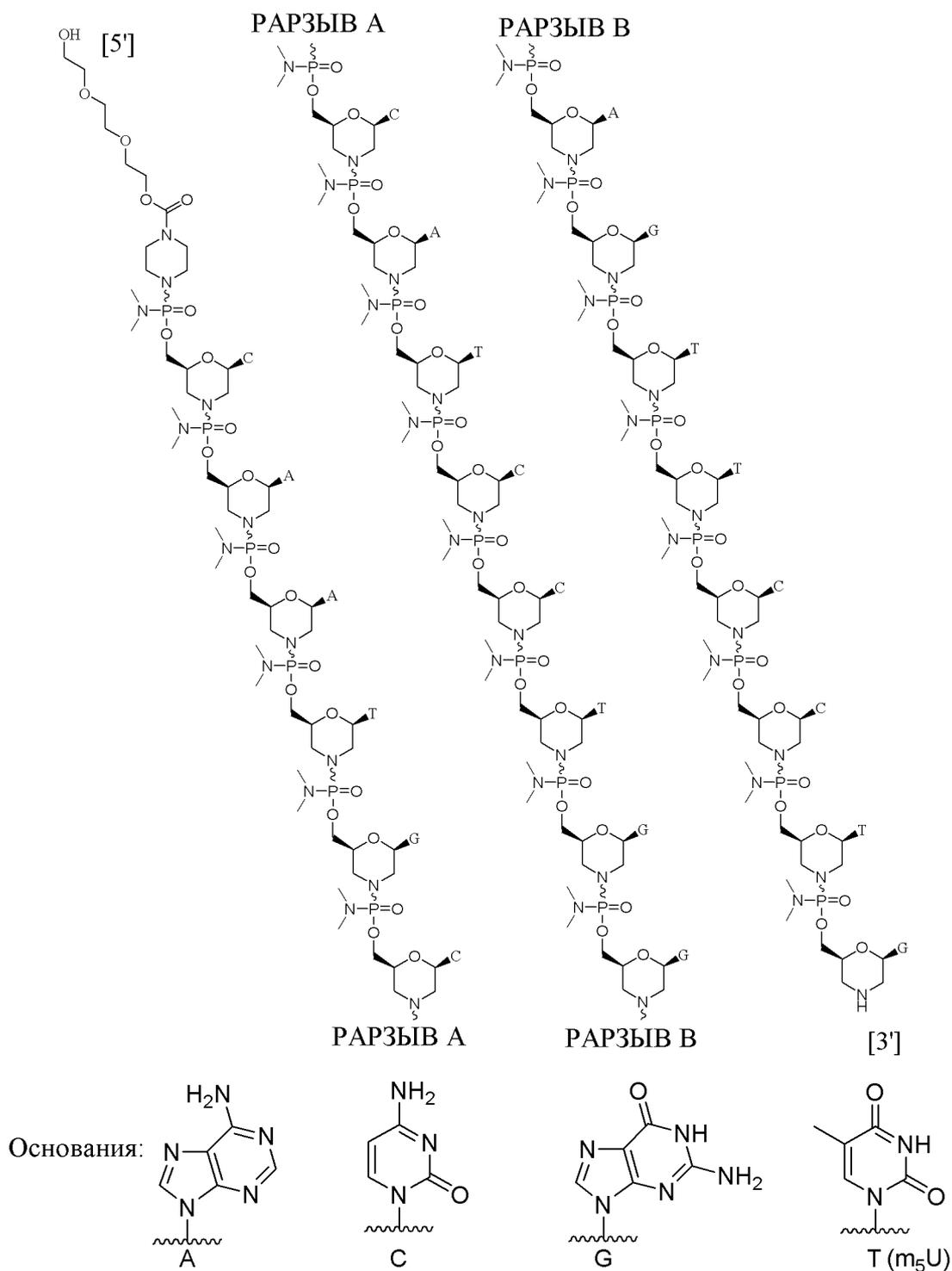
[53] «Касимерсен», также известный под кодовым наименованием «SRP-4045», представляет собой РМО, имеющий нуклеотидную последовательность 5'-СААТGCCАТCСТGGAGTTCСТG-3' (SEQ ID NO:1). Касимерсен зарегистрирован под регистрационным номером CAS 1422959-91-8. Химические названия включают: все-Р-амбо-[Р,2',3'-тридезоксип-(диметиламино)-2',3'-имино-2',3'-секо](2'а→5')(С-А-А-Т-Г-С-С-А-Т-С-С-Т-Г-Г-А-Г-Т-Т-С-С-Т-Г) 5'-[4-({2-[2-(2-гидроксиэтокси)этокси]этокси}карбонил)-N, N-диметилпиперазин-1-фосфорамидат] (SEQ ID NO:1).

[54] Касимерсен имеет следующую структуру:



B(1-22):
 C-A-A-T-G-C-C-A-T-C-C-T-G-G-A-G-T-T-C-C-T-G (SEQ ID NO:1)

И также представлен следующей химической структурой:

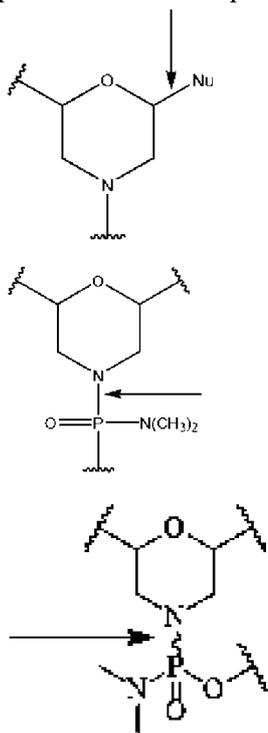


[55] Для наглядности, структуры изобретения, включающие, например, вышеуказанные структуры касимерсена, являются непрерывными от 5' до 3' и для удобства изображения всей структуры в компактной форме были включены различные разрывы иллюстраций, помеченные «РАЗРЫВ А» и «РАЗРЫВ В». Как будет понято специалисту в данной области техники, например, каждое указание «РАЗРЫВ А» показывает непрерывность иллюстрации структуры в этих точках. Специалисту в данной области техники понятно, что то же является справедливым для каждого случая «РАЗРЫВ В» в вышеуказанных структурах. Однако, ни один из разрывов иллюстраций не

предполагает указания действительного прерывания вышеуказанной структуры, что будет понятно специалисту в данной области техники.

[56] Используемый в данном документе набор скобок, применяемый внутри структурной формулы, указывает, что структурный элемент внутри скобок повторяется. В некоторых вариантах осуществления применяемые скобки могут быть в виде «[« и »]», и в некоторых вариантах осуществления скобки, применяемые для указания повторяющихся структурных элементов, могут быть в виде «(« и »)». В некоторых вариантах осуществления число повторяющихся стадий структурного элемента внутри скобок представляет собой число, указанное вне скобок, такое как 2, 3, 4, 5, 6, 7 и т. д. В различных вариантах осуществления число повторяющихся стадий структурного элемента между скобками указано переменной, указанной вне скобок, такой как «Z».

[57] Используемая в данном документе связь, прочерченная к хиральному атому углерода или фосфора в пределах прямой связи или волнистой связи структурной формулы, указывает на то, что стереохимия хирального атома углерода или фосфора является неопределенной и предполагает включение всех форм хирального центра. Примеры таких иллюстраций изображены ниже:



[58] Фразы «парентеральное введение» и «вводится парентерально», используемые в данном документе, означают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно инъекции, и включают без ограничения внутривенные, внутримышечные, внутриартериальные, внутрибололочные, внутрикапсулярные, внутриглазные, внутрисердечные, внутридермальные, внутрибрюшинные, транстрахеальные, подкожные, внутрикожные, внутрисуставные, субкапсулярные, субарахноидальные, внутрипозвоночные и внутригрудинные инъекцию и инфузию.

[59] Фраза «фармацевтически приемлемый» означает, что вещество или

композиция должны быть совместимы химически и/или токсикологически с остальными ингредиентами, содержащимися в составе, и/или субъектом, которого лечат ими.

[60] Фраза «фармацевтически приемлемый носитель», используемая в данном документе, означает нетоксичное, инертное твердое вещество, полутвердое вещество или жидкий наполнитель, разбавитель, материал для инкапсуляции или вспомогательный состав любого типа. Некоторые примеры материалов, которые могут выступать в качестве фармацевтически приемлемых носителей, представляют собой сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как натрий-карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетилцеллюлоза; порошкообразный трагакант; ржаной солод; желатин; тальк; вспомогательные вещества, такие как какао-масло и суппозиторные воски; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные средства, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновую кислоту; апирогенную воду; изотонический солевой раствор; раствор Рингера; этиловый спирт и растворы фосфатного буфера, а также другие нетоксичные совместимые смазывающие средства, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также красящие средства, разделительные средства, средства для нанесения покрытий, подсластители, ароматизирующие и парфюмерные средства, консерванты и антиоксиданты могут также присутствовать в композиции в соответствии с решением разработчика рецептуры.

[61] Описанный в данном документе термин «восстановление» синтеза или образования дистрофина относится в общем к образованию белка дистрофина, включая укороченные формы дистрофина у пациентов с мышечной дистрофией после лечения с помощью антисмыслового олигомера. В некоторых вариантах осуществления лечение приводит к повышению образования дистрофина у пациента на 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% (включая все промежуточные целые числа). В некоторых вариантах осуществления лечения повышает число дистрофин-положительных волокон до по меньшей мере 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90% или от приблизительно 95% до 100% от нормы у субъекта. В других вариантах осуществления лечения повышает число дистрофин-положительных волокон до приблизительно 20%, до приблизительно 60% или от приблизительно 30% до приблизительно 50% от нормы у субъекта. Процент дистрофин-положительных волокон у пациента после лечения может быть определен посредством мышечной биопсии с применением известных методик. Например, мышечная биопсия может быть проведена на подходящей мышце, такой как двуглавая мышца плеча, у пациента.

[62] Анализ процентной доли дистрофин-положительных волокон может быть проведен перед лечением и/или после лечения или в моменты времени в течение всего курса лечения. В некоторых вариантах осуществления биопсию после лечения проводят

на мышце, противоположной той, на которой биопсию проводили перед лечением. Исследования экспрессии дистрофина до и после лечения могут быть проведены с применением любого подходящего анализа в отношении дистрофина. В некоторых вариантах осуществления иммуногистохимическое определение проводят на срезах ткани, полученных после проведения биопсии мышечной ткани, с применением антитела, которое представляет собой маркер в отношении дистрофина, такого как моноклональное или поликлональное антитело. Например, может использоваться антитело MANDYS106, которое является высокочувствительным маркером в отношении дистрофина. Может применяться любое подходящее вторичное антитело.

[63] В некоторых вариантах осуществления процент дистрофин-положительных волокон рассчитывают делением числа положительных волокон на общее число подсчитанных волокон. Образцы нормальной мышцы содержат 100% дистрофин-положительных волокон. Следовательно, процент дистрофин-положительных волокон может быть выражен как доля в процентах относительно нормальных волокон. Для контроля присутствия следовых уровней дистрофина в мышце перед лечением, а также ревертантных волокон, исходный уровень может быть составлен с применением срезов мышц перед лечением от каждого пациента при подсчете дистрофин-положительных волокон в мышцах после лечения. Это может использоваться как пороговая величина для подсчета дистрофин-положительных волокон в срезах мышц у пациентов после лечения. В других вариантах осуществления срезы ткани, окрашенные антителом, могут также применяться для количественного определения дистрофина с применением программного обеспечения для анализа изображений Bioquant (Bioquant Image Analysis Corporation, Нашвилл, Теннесси). Общую интенсивность сигнала флуоресценции дистрофина можно отобразить как долю в процентах от нормы. Кроме того, может использоваться вестерн-блот анализ с моноклональными или поликлональными антителами к дистрофину для определения доли в процентах дистрофин-положительных волокон. Например, может применяться антитело к дистрофину NCL-Dys1 от Novacastra. Долю в процентах дистрофин-положительных волокон можно также анализировать посредством определения экспрессии компонентов комплекса саркогликана (β,γ) и/или нейрональной NOS.

[64] В некоторых вариантах осуществления лечение с помощью антисмыслового олигомера по настоящему изобретению, такого как касимерсен, замедляет или понижает прогрессирующее нарушение функции и/или недостаточность дыхательных мышц у пациентов с DMD, появление которых следовало бы ожидать без применения лечения. В некоторых вариантах осуществления лечение с помощью антисмыслового олигомера по настоящему изобретению может понижать или устранять необходимость во вспомогательной вентиляции, осуществления которой следовало бы ожидать без применения лечения. В некоторых вариантах осуществления измерения дыхательной функции для отслеживания течения заболевания, а также оценка возможности терапевтических вмешательств, включают максимальное давление при вдохе (MIP),

максимальное давление при выдохе (MEP) и форсированную жизненную емкость легких (FVC). С помощью показателей MIP и MEP измеряют уровень давления, который человек может создавать во время вдоха и выдоха, соответственно, и они являются чувствительными показателями силы дыхательных мышц. MIP является показателем слабости мышц диафрагмы.

[65] В некоторых вариантах осуществления MEP может снижаться до появления изменений в других испытаниях функции легких, включая MIP и FVC. В некоторых вариантах осуществления MEP может быть ранним признаком нарушения дыхательной функции. В некоторых вариантах осуществления FVC может применяться для измерения общего объема воздуха, выдохнутого во время усиленного выдоха после максимального вдоха. У пациентов с DMD, FVC повышается наряду с физическим ростом до раннего подросткового возраста. Однако, по мере того, как рост замедляется или останавливается вследствие развития заболевания и развивается мышечная слабость, жизненная емкость легких входит в нисходящую фазу и снижается после возраста 10-12 лет со средней скоростью приблизительно 8-8,5 процентов в год. В некоторых вариантах осуществления прогнозируемый процент MIP (MIP с учетом веса), прогнозируемый процент MEP (MEP с учетом возраста) и прогнозируемый процент FVC (FVC с учетом возраста и роста) являются вспомогательными анализами.

[66] Используемые в данном документе термины «субъект» или «пациент» включают любое животное, которое проявляет симптом или подвержено риску проявления симптома, который может быть подвергнут лечению с помощью антисмыслового олигонуклеотида по настоящему изобретению, такое как субъект, который имеет или подвержен риску наличия DMD или BMD, или любых симптомов, связанных с такими состояниями (например, потеря мышечных волокон). Подходящие субъекты (пациенты) включают лабораторных животных (таких как мышь, крыса, кролик или морская свинка), сельскохозяйственных животных и домашних животных или питомцев (таких как кошка или собака). Включены приматы, отличные от человека, и, предпочтительно, пациенты-люди. Также включены способы образования дистрофина у субъекта, имеющего мутацию гена дистрофина, которая поддается лечению посредством пропуска экзона 45.

[67] Используемый в данном документе термин «пациент детского возраста» подразумевает пациента в возрасте 1-21 года, включительно.

[68] Используемые в данном документе фразы «системное введение», «вводится системно», «периферическое введение» и «вводится периферически» означают введение соединения, например, подкожное введение, лекарственного средства или другого материала, отличное от непосредственного введения в центральную нервную систему, так, что они проникают в системы организма пациента и, таким образом, подвергаются метаболизму и другим подобным процессам.

[69] Используемая в данном документе фраза «постоянное введение» относится к непрерывному, регулярному, долговременному терапевтическому введению, *т. е.*,

периодическому введению без существенного прекращения. Например, ежесуточно в течение периода времени по меньшей мере нескольких недель или месяцев, или лет с целью лечения мышечной дистрофии у пациента. Например, еженедельно, в течение периода времени по меньшей мере нескольких месяцев или лет, с целью лечения мышечной дистрофии у пациента (например, еженедельно в течение по меньшей мере шести недель, еженедельно в течение по меньшей мере 12 недель, еженедельно в течение по меньшей мере 24 недель, еженедельно в течение по меньшей мере 48 недель, еженедельно в течение по меньшей мере 72 недель, еженедельно в течение по меньшей мере 96 недель, еженедельно в течение по меньшей мере 120 недель, еженедельно в течение по меньшей мере 144 недель, еженедельно в течение по меньшей мере 168 недель, еженедельно в течение по меньшей мере 180 недель, еженедельно в течение по меньшей мере 192 недель, еженедельно в течение по меньшей мере 216 недель или еженедельно в течение по меньшей мере 240 недель).

[70] Используемая в данном документе фраза «периодическое введение» относится к введению с промежутками между дозами. Например, периодическое введение включает введение с постоянными интервалами (например, еженедельно, ежемесячно), которые могут повторяться.

[71] Используемый в данном документе термин «плацебо» относится к веществу, которое не имеет терапевтического эффекта и может применяться в качестве контроля.

[72] Используемая в данном документе фраза «контрольная группа, получающая плацебо», относится к субъекту или пациенту, которые получают плацебо вместо комбинированной терапии, антисмыслового олигонуклеотида, нестероидного противовоспалительного соединения и/или другой фармацевтической композиции. Контрольная группа, получающая плацебо, может иметь такой же мутантный статус, быть подобного возраста, иметь подобную способность передвигаться и/или получать подобные сопутствующие лекарственные препараты (включая стероиды и т. д.), как субъект или пациент.

[73] Фразы «целевая последовательность», «нуклеотидная последовательность» или «последовательность нуклеиновых оснований» относятся к последовательности нуклеиновых оснований олигомера, которая комплементарна последовательности нуклеотидов в целевой пре-mRNA. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения последовательность нуклеотидов в целевой пре-mRNA представляет собой сайт отжига экзона 45 в пре-mRNA дистрофина, обозначенный как H45A(-03+19).

[74] «Лечение» субъекта (например, млекопитающего, такого как человек) или «обработка» клетки представляет собой любой тип вмешательства, применяемый в попытке изменить природное течение болезни у субъекта или в клетке. Лечение включает без ограничения введение олигомера или его фармацевтической композиции и может быть проведено или профилактически, или после инициации патологического события, или обнаружения этиологического фактора. Лечение включает любой необходимый эффект на симптомы или патологию заболевания или состояние, связанное с белком

дистрофином, как определенные формы мышечной дистрофии, и может включать, например, минимальные изменения или улучшения в одном или нескольких измеряемых маркерах заболевания или состояния, подвергающегося лечению. Также включены «профилактические» виды лечения, которые могут быть направлены на уменьшение скорости развития заболевания или состояния, подвергающегося лечению, задержку проявления заболевания или состояния или понижение тяжести их проявления. «Лечение» или «профилактика» не обязательно указывают на полное устранение, излечение или предупреждение заболевания или состояния, или связанных с ними симптомов.

[75] В некоторых вариантах осуществления лечение с помощью антисмыслового олигомера по настоящему изобретению обеспечивает повышение образования дистрофина, задерживает развитие заболевания, замедляет или понижает потерю способности передвигаться, понижает мышечное воспаление, понижает повреждение мышцы, улучшает мышечную функцию, понижает потерю легочной функции и/или усиливает регенерацию мышц, которых следовало бы ожидать без применения лечения. В некоторых вариантах осуществления лечение позволяет сохранить на том же уровне, задержать или замедлить развитие заболевания. В некоторых вариантах осуществления лечение позволяет сохранить способность передвигаться или понижает потерю способности передвигаться. В некоторых вариантах осуществления лечение позволяет сохранить легочную функцию или понижает потерю легочной функции. В некоторых вариантах осуществления лечение позволяет сохранить или повысить устойчиво пройденную дистанцию у пациента, как измерено с помощью, например, теста с 6-минутной ходьбой (6MWT). В некоторых вариантах осуществления лечение позволяет сохранить или понизить время, необходимое для прохождения/пробега 10 метров (т. е., испытание, оценивающее время, необходимое для прохождения/пробега 10 метров). В некоторых вариантах осуществления лечение позволяет сохранить или уменьшить время, необходимое для подъема из положения лежа (*m. e.* тест для оценки времени, необходимого для подъема). В некоторых вариантах осуществления лечение позволяет сохранить или уменьшить время, необходимое для поднятия по четырем стандартным ступенькам (*m. e.*, тест, включающий поднятие по четырем ступенькам). В некоторых вариантах осуществления лечение позволяет сохранить или понизить мышечное воспаление у пациента, как измерено с помощью, например, MRI (например, MRI мышц ноги). В некоторых вариантах осуществления MRI измеряет T2 и/или жировую фракцию для выявления мышечной дегенерации. MRI может выявлять изменения в мышечной структуре и композиции, обусловленные воспалением, отеком, повреждением мышцы и жировой инфильтрацией.

[76] В некоторых вариантах осуществления лечение с помощью антисмыслового олигомера по настоящему изобретению обеспечивает повышение образования дистрофина. В некоторых вариантах осуществления повышение образования дистрофина составляет приблизительно 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,5%, 0,7%, 0,9%, 1%, 1,01%, 1,5%, 2%, 2,01%, 2,5%, 3%, 3,01%, 3,5%, 4%, 4,01%, 4,5%, 5%, 5,01%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5%, 8%,

8,5%, 9%, 9,5%, 10%, 10,5%, 11%, 11,5%, 12%, 12,5%, 13%, 13,5%, 14%, 14,5%, 15%, 15,5%, 16%, 16,5%, 17%, 17,5%, 18%, 18,5%, 19%, 19,5%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% или 60% относительно здорового сверстника. В определенных вариантах осуществления повышение образования дистрофина может составлять приблизительно 0,1%-0,5%, 0,5%-0,9%, 0,8%-1%, 0,9%-1,2%, 0,9%-1,0%, 0,9%-1,01%, 1%-1,01%, 1%-1,5%, 1,5%-2%, 1,9%-2,0%, 1,9%-2,01%, 2%-2,01%, 2%,-2,5%, 2,5%-3%, 2,9%-3,0%, 2,9%-3,01%, 2%-3,01%, 3%-3,5%, 3,5%-4%, 4%-4,5%, 4,5%-5%, 5%-6%, 6%-7%, 7%-8%, 8%-9%, 9%-10%, 1%-2%, 1%-3%, 1%-5%, 2%-4%, 2%-5%, 4%-6%, 5%,-8%, 8%-10%, 1%-5%, 2%-6%, 3%-7%, 4%-8%, 5%-10%, 10%-12%, 12%-15%, 15%-20%, 17%-20%, 20%-22%, 20%-25%, 25%-30% или 30%-35% относительно здорового сверстника.

[77] В определенных вариантах осуществления лечение с помощью антисмыслового олигомера по настоящему изобретению обеспечивает повышение образования дистрофина и замедляет или понижает потерю способности передвигаться, которой следовало бы ожидать без применения лечения. Например, лечение может стабилизировать, сохранять, улучшать или повышать способность к ходьбе (например, стабилизация способности передвигаться) у субъекта. В некоторых вариантах осуществления лечение позволяет сохранить или повышает устойчивую пройденную дистанцию у пациента, как измерено с помощью, например, теста с 6-минутной ходьбой (6MWT), описанного McDonald, et al. (*Muscle Nerve*, 2010; 42:966-74, включенном в данный документ посредством ссылки). Изменение в испытании с оценкой дистанции, пройденной в течение 6 минут ходьбы (6MWD) может быть выражено как абсолютное значение, доля изменения в процентах или прогнозируемое изменение значения в %. В некоторых вариантах осуществления лечение позволяет сохранить или улучшить устойчиво пройденную дистанцию в 6MWT при 20% дефекте у субъекта относительно здорового сверстника. Показатели пациента с DMD в 6MWT относительно типичных показателей здорового сверстника могут быть определены с помощью расчета прогнозируемого значения в %. Например, прогнозируемый в % 6MWD для мужчин может быть рассчитан с применением следующего уравнения: $196,72 + (39,81 \times \text{возраст}) - (1,36 \times \text{возраст}^2) + (132,28 \times \text{рост в метрах})$. Для женщин прогнозируемый в % 6MWD можно рассчитать с применением следующего уравнения: $188,61 + (51,50 \times \text{возраст}) - (1,86 \times \text{возраст}^2) + (86,10 \times \text{рост в метрах})$ (Henricson et al. *PLoS Curr.*, 2012, version 2, включено в данный документ посредством ссылки).

[78] В некоторых вариантах осуществления лечение с помощью антисмыслового олигомера повышает устойчиво пройденную дистанцию у пациента от исходного уровня до более чем 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30 или 50 метров (включая все промежуточные целые числа). В некоторых вариантах осуществления повышение образования дистрофина составляет приблизительно 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,5%, 0,7%, 0,9%, 1%, 1,01%, 1,5%, 2%, 2,01%, 2,5%, 3%, 3,01%, 3,5%, 4%, 4,01%, 4,5%, 5%, 5,01%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5%, 8%, 8,5%, 9%, 9,5%, 10%, 10,5%, 11%, 11,5%, 12%, 12,5%, 13%, 13,5%, 14%, 14,5%, 15%,

15,5%, 16%, 16,5%, 17%, 17,5%, 18%, 18,5%, 19%, 19,5%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% или 60% относительно здорового сверстника. В определенных вариантах осуществления повышение образования дистрофина может составлять приблизительно 0,1%-0,5%, 0,5%-0,9%, 0,8%-1%, 0,9%-1,2%, 0,9%-1,0%, 0,9%-1,01%, 1%-1,01%, 1%-1,5%, 1,5%-2%, 1,9%-2,0%, 1,9%-2,01%, 2%-2,01%, 2%,-2,5%, 2,5%-3%, 2,9%-3,0%, 2,9%-3,01%, 2%-3,01%, 3%-3,5%, 3,5%-4%, 4%-4,5%, 4,5%-5%, 5%-6%, 6%-7%, 7%-8%, 8%-9%, 9%-10%, 1%-2%, 1%-3%, 1%-5%, 2%-4%, 2%-5%, 4%-6%, 5%,-8%, 8%-10%, 1%-5%, 2%-6%, 3%-7%, 4%-8%, 5%-10%, 10%-12%, 12%-15%, 15%-20%, 17%-20%, 20%-22%, 20%-25%, 25%-30% или 30%-35% относительно здорового сверстника.

[79] Потеря мышечной функции у пациентов с DMD может развиваться несмотря на нормальный рост и развитие в детстве. Действительно, дети младшего возраста с DMD могут демонстрировать повышение пройденной дистанции во время 6MWT в течение курса длительностью приблизительно 1 год, несмотря на развивающееся нарушение функций мышц. В некоторых вариантах осуществления 6MWD у пациентов с DMD сравнивается с типично развивающимися контрольными субъектами и с существующими нормативными данными о подходящих по возрасту и полу субъектов. В некоторых вариантах осуществления нормальный рост и развитие могут быть вычислены с применением уравнения, основывающегося на возрасте и росте, согласовывающегося с нормативными данными. Такое уравнение может использоваться для преобразования 6MWD в процент-прогнозируемое (прогнозируемое в %) значение у субъектов с DMD. В определенных вариантах осуществления анализ прогнозируемых в % данных 6MWD представляет собой способ для вычисления нормального роста и развития, и может показывать, что повышение функции в раннем возрасте (например, меньшем или равном 7-ми годам), представляет собой скорее устойчивые нежели улучшенные способности у пациентов с DMD (Henricson et al. PLoS Curr., 2012, version 2, включено в данный документ посредством ссылки).

[80] Была предложена и опубликована номенклатурная система антисмысловых молекул для того, чтобы различать различные антисмысловые молекулы (см. Mann et al., (2002) J Gen Med 4, 644-654). Данная номенклатура стала особенно уместной при испытании нескольких немного различных антисмысловых молекул, все из которых направлены на один и тот же целевой участок, как показано ниже:

H#A/D(x:y).

[81] Первая буква обозначает вид (например, H: человек, M: мышь, C: собака). «#» обозначает номер целевого экзона дистрофина. «A/D» указывает на акцепторный или донорный сайт сплайсинга в начале или конце экзона соответственно. (x y) представляют координаты отжига, где «-» или «+» указывают на интронные или экзонные последовательности соответственно. Например, A(-6+18) будет указывать последние 6 оснований интрона, предшествующего целевому экзону, и первые 18 оснований целевого экзона. Ближайшим сайтом сплайсинга будет являться акцептор, поэтому таким

координатам будет предшествовать «А». Описывающие координаты ренатурации на донорном сайте сплайсинга могут представлять собой D(+2-18), где последние 2 экзонных основания и первые 18 интронных оснований соответствуют сайту гибридизации антисмысловой молекулы. Полностью экзонные координаты ренатурации, которые были бы представлены A(+65+85), подразумевают сайт между 65 и 85 нуклеотидами от начала экзона.

II. Антисмысловые олигонуклеотиды

[82] Антисмысловые олигонуклеотиды, которые нацелены на пре-mRNA гена дистрофина для обеспечения пропуска экзона 45, применяют в соответствии со способами настоящего изобретения.

[83] Такой антисмысловой олигонуклеотид может быть разработан для блокирования или ингибирования трансляции mRNA или для ингибирования природного сплайс-процессинга пре-mRNA, и, можно сказать, «направлен на» или «нацелен на» целевую последовательность, с которой он гибридизируется. Целевая последовательность представляет собой, как правило, область, включающую старт-кодон AUG mRNA, подавляющий трансляцию олигомер или сайт сплайсинга предварительно обработанной mRNA, подавляющий сплайсинг олигомер (SSO). Целевая последовательность для сайта сплайсинга может включать последовательность mRNA, включая от 1 до приблизительно 25 пар оснований на 5' конце по ходу транскрипции нормального соединения акцепторного сайта сплайсинга у предварительно обработанной mRNA. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность может являться любым участком предварительно обработанной mRNA, который включает сайт сплайсинга или содержится полностью внутри экзона, кодируя последовательность или соединяя акцепторный или донорный сайт сплайсинга. Олигомер в более общем смысле, можно сказать, «нацелен на» биологически соответствующую цель, такую как белок, вирус или бактерия, если он нацелен на нуклеиновую кислоту цели способом, описанным выше.

[84] В определенных вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид специфически гибридизируется с экзоном 45 целевого участка пре-mRNA дистрофина и индуцирует пропуск экзона 45. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид, который гибридизируется с экзоном 45 целевого участка пре-mRNA дистрофина и индуцирует пропуск экзона 45, представляет собой фосфордиамидат морфолиновых олигомеров.

[85] В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид представляет собой касимерсен.

[86] Касимерсен принадлежит к отдельному классу терапевтических средств на основе новых синтетических антисмысловых РНК, называемых фосфордиамидатами морфолиновых олигомеров (РМО), которые представляют собой результат переработки природной структуры нуклеиновой кислоты. Касимерсен представляет собой РМО, который гибридизируется с экзоном 45 целевого участка пре-mRNA дистрофина и индуцирует пропуск экзона 45. Касимерсен может быть получен посредством

постадийного твердофазного синтеза, применяя способы, подробно описанные в вышеприведенных источниках, и дополнительно в международной заявке на патент с регистрационным № PCT/US2017/040017, полный объем которой полностью включен в данный документ посредством ссылки.

[87] РМО предоставляет возможность клинических преимуществ на основе неклинических наблюдений *in vivo*. РМО включает модификации сахарного кольца РНК, которые защищают его от ферментативного расщепления нуклеазами с целью обеспечивать стабильность *in vivo*. РМО выделяются из природных нуклеиновых кислот и других классов антисмысловых олигонуклеотидов, частично, с применением 6-членных синтетических морфолиновых колец, которые замещают 5-членные рибофуранозильные кольца, обнаруживаемые в РНК, ДНК и множестве других синтетических антисмысловых олигонуклеотидах РНК.

[88] Считается, что незаряженные фосфордиамидатные связи, специфичные для РМО, потенциально способствуют понижению нецелевого связывания с белками. РМО имеют незаряженные фосфордиамидатные связи, которые связывают каждое морфолиновое кольцо вместо отрицательно заряженной тиофосфатной связи, применяемой в других синтетических антисмысловых олигонуклеотидах РНК, находящихся на стадии клинических исследований.

[89] Осуществление возможного терапевтического подхода для лечения DMD, обусловленной мутациями вне рамки считывания в гене DMD, предполагается с помощью слабой формы дистрофинопатии, известной как BMD, которая обусловлена мутацией в рамке считывания. Способность превратить мутацию вне рамки считывания в мутацию внутри рамки считывания гипотетически может сохранить рамку считывания mRNA и образовать укороченный изнутри, но все еще функциональный белок дистрофина. Касимерсен был разработан для достижения этой цели.

[90] Касимерсен нацелен на пре-mRNA дистрофина и индуцирует пропуск экзона 45 так, что он исключен или пропущен в зрелом транскрипте mRNA, прошедшем сплайсинг. При пропуске экзона 45 нарушенная рамка считывания восстанавливается до мутации внутри рамки считывания. Несмотря на то, что DMD включает различные генетические подтипы, касимерсен был специально разработан для пропуска экзона 45 пре-mRNA дистрофина.

[91] Последовательность 22 нуклеиновых оснований касимерсина разработана, чтобы быть комплементарной к специфическому сайту отжига дистрофина пре-mRNA и индуцировать пропуск экзона 45 во время обработки. Каждое морфолиновое кольцо касимерсена связано с одним из четырех гетероциклических нуклеиновых оснований, найденных в ДНК (аденин, цитозин, гуанин и тимин).

[92] Гибридизация касимерсена с целевой последовательностью пре-mRNA препятствует образованию сплайсингового комплекса пре-mRNA и приводит к удалению экзона 45 из зрелой mRNA. Структура и конформация касимерсена допускают специфическое к последовательности связывание оснований с комплементарной

последовательностью. Например, этеплирсен, который представляет собой РМО, который был разработан для пропуска экзона 51 пре-mRNA дистрофина, допускает специфическое к последовательности связывание оснований с комплементарной последовательностью, содержащейся в экзоне 51 пре-mRNA дистрофина.

Восстановление рамки считывания дистрофина с применением пропуска экзона

[93] Нормальная mRNA дистрофина, содержащая все 79 экзонов, образует нормальный белок дистрофина.

[94] mRNA дистрофина, в которой не хватает целых экзонов из гена дистрофина, как правило, приводит к DMD.

[95] Другой РМО для пропуска экзона, этеплирсен, пропускает экзон 51 для восстановления рамки считывания mRNA. Поскольку экзон 49 заканчивается полным кодоном и экзон 52 начинается с первого нуклеотида кодона, делеция экзона 51 посредством пропуска экзона восстанавливает рамку считывания, что приводит к образованию укороченного изнутри белка дистрофина с неповрежденным сайтом связывания дистрогликана.

[96] Осуществимость уменьшения тяжести заболевания у людей с фенотипом DMD с применением пропуска экзона для восстановления открытой рамки считывания mRNA дистрофина подтверждается неклиническими исследованиями. Множество исследований на животных моделях DMD, в которых животные страдают дистрофией, показали, что восстановление дистрофина посредством пропуска экзона приводит надежным улучшениям в мышечной силе и функции (Sharp 2011; Yokota 2009; Wu 2008; Wu 2011; Barton-Davis 1999; Goyenville 2004; Gregorevic 2006; Yue 2006; Welch 2007; Kawano 2008; Reay 2008; van Putten 2012). Убедительный пример этого следует из исследования, в котором уровни дистрофина, после терапии с помощью пропуска экзона (с применением РМО) сравнивали с мышечной функцией в той же ткани. У страдающих дистрофией мышцей mdx мышцы tibialis anterior (ТА), обрабатываемые мышечным-специфическим РМО, сохранили ~75% от их максимального запаса силы после индуцирующего стресс сокращения, при этом не проходившие обработку противоположные ТА мышцы сохранили только ~25% от их максимального запаса силы ($p < 0,05$) (Sharp 2011). В другом исследовании 3 страдающих дистрофией собаки CXMD получали (на 2-5 месяцев жизни) терапию на основе пропуска экзона с применением РМО, специфического для их генетической мутации, раз в неделю в течение 5-7 недель или раз в две недели в течение 22 недель. После терапии на основе пропуска экзона все 3 собаки демонстрировали обширную, экспрессию дистрофина в скелетных мышцах по всему организму, а также сохраняли или улучшали способность передвигаться (испытание с бегом на 15 м) относительно исходного уровня. Для сравнения, не проходившие обработку подходящие по возрасту собаки CXMD показывали заметное уменьшение в способности передвигаться в течение курса исследования (Yokota 2009).

[97] РМО демонстрировали большую активность в отношении пропуска экзона при эквивалентных концентрациях, чем тиофосфаты, как у мышцей mdx, так и в

гуманизированной мышинной модели DMD (hDMD), которая предусматривает экспрессию полного транскрипта DMD человека (Heemskirk 2009).

[98] Клинические результаты для анализа эффекта антисмыслового олигонуклеотида, который специфически гибридизируется с экзоном 45 целевого участка пре-mRNA дистрофина и индуцирует пропуск экзона 45, включают повышение процента дистрофин-положительных волокон (PDPF), улучшение результата в испытании с шестиминутной ходьбой (6MWT), уменьшение потери способности передвигаться (LOA), улучшение амбулаторной оценки North Star (NSAA), улучшение результатов испытания легочной функции (PFT), улучшение способности подниматься (из положения лежа) без внешней поддержки, улучшение в образовании дистрофина *de novo* и улучшение других функциональных измерений относительно исходного уровня.

III. Составы и способы введения

[99] В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает составы или фармацевтические композиции, подходящие для терапевтической доставки антисмысловых олигонуклеотидов, как описано в данном документе. Следовательно, в определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает фармацевтически приемлемые композиции, которые содержат терапевтически эффективное количество одного или нескольких антисмысловых олигонуклеотидов, описанных в данном документе, составленных вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями (добавками) и/или разбавителями. Несмотря на то, что является возможным введение отдельно антисмыслового олигонуклеотида по настоящему изобретению, предпочтительным является введение соединения в виде фармацевтического состава (композиции).

[100] Способы доставки молекул нуклеиновых кислот описаны, например, в Akhtar et al., 1992, Trends Cell Bio., 2:139; and Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar; Sullivan et al., PCT WO 94/02595. Такие и другие протоколы могут быть использованы для доставки фактически любой молекулы нуклеиновой кислоты, включая антисмысловые олигонуклеотиды по настоящему изобретению.

[101] Как подробно описано ниже, фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть специально составлены для введения в твердой или жидкой форме, включая те, которые адаптированы для следующих видов введения: (1) пероральное введение, например, дозы лекарства (водные или неводные растворы или суспензии), таблетки, например те, которые предназначены для трансбуккальной, сублингвальной и системной абсорбции, болюсы, порошки, гранулы, пасты для нанесения на язык; (2) парентеральное введение, например посредством подкожной, внутримышечной, внутривенной или эпидуральной инъекции в виде, например, стерильного раствора или суспензии, или состава с замедленным высвобождением; (3) местное нанесение, например в виде крема, мази или пластыря с замедленным высвобождением, или спрея, наносимого на кожу; (4) интравагинально или ректально, например в виде вагинального суппозитория, крема или пенистого вещества; (5)

сублингвально; (6) через глаза; (7) трансдермально или (8) назально.

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

[103] Дополнительные неограничивающие примеры средств, подходящих для включения в составы с антисмысловыми олигонуклеотидами по настоящему изобретению, включают: PEG-конъюгированные нуклеиновые кислоты, конъюгированные с фосфолипидом нуклеиновые кислоты, нуклеиновые кислоты, содержащие липофильные фрагменты, тиофосфаты, ингибиторы Р-гликопротеина (такие как Pluronic P85), которые могут усиливать доступ лекарственных средств в различные ткани; биологически разлагаемые полимеры, такие как микросферы сополимера (DL лактида и гликолида) для доставки с замедленным высвобождением после имплантации (Emerich, D F et al., 1999, Cell Transplant, 8, 47-58) Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.; и загруженные наночастицы, такие как те, которые сделаны из полибутилцианоакрилата, которые могут доставлять лекарственные средства через гемато-энцефалический барьер, и могут изменять механизмы нейронного поглощения (Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999).

[104] Настоящее изобретение также показывает применение композиции, содержащей поверхностно модифицированные липосомы, содержащие поли(этиленгликоль) липиды (PEG-модифицированные, разветвленные и неразветвленные или их комбинации, или долго циркулирующие липосомы или стелс-липосомы). Антисмысловые олигонуклеотиды по настоящему изобретению могут также содержать ковалентно присоединенные PEG-молекулы с различными молекулярными массами. Такие составы предоставляют способ для повышения накопления лекарственных средств в целевых тканях. Данный класс носителей лекарственных средств противодействует опсонизации и устранению мононуклеарной фагоцитарной системой (MPS или RES), тем самым способствуя более длительным периодам времени циркуляции в крови и усилению воздействия на ткань инкапсулированным лекарственным средством (Lasic et al. Chem.

Rev. 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata et al., Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 1005-1011). Было показано селективное накапливание таких липосом в опухолях, предположительно посредством экстравазации из сосудов в ткани и захвату в новообразованных целевых тканях (Lasic et al., Science 1995, 267, 1275-1276; Oku et al., 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1238, 86-90). Долго циркулирующие липосомы усиливают фармакокинетику и фармакодинамику ДНК и РНК, в частности, по сравнению с традиционными катионными липосомами, для которых известно о накапливании в тканях MPS (Liu et al., J. Biol. Chem. 1995, 42, 24864-24870; Choi et al., международная публикация РСТ № WO 96/10391; Ansell et al., международная публикация РСТ № WO 96/10390; Holland et al., международная публикация РСТ № WO 96/10392). Долго циркулирующие липосомы также способны защищать лекарственные средства от расщепления нуклеазами в большей степени по сравнению с катионными липосомами, на основе их способности избегать накопления в метаболически агрессивных тканях MPS, таких как печень и селезенка.

[105] В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение включает фармацевтические композиции антисмыслового олигонуклеотида, полученные для доставки, как описано в патенте США №№ 6692911, 7163695 и 7070807. В связи с этим в одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен олигомер по настоящему изобретению в композиции, содержащей сополимеры лизина и гистидина (НК) (как описано в патентах США №№ 7163695; 7070807 и 6692911) либо отдельно, либо в комбинации с PEG (например, разветвленным или неразветвленным PEG или смесью обоих), в комбинации с PEG и нацеливающимся фрагментом или любым из вышеуказанного в комбинации со сшивающим средством. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает антисмысловые олигонуклеотиды в фармацевтических композициях, содержащих модифицированную глюконовую кислоту полигистидин или гликозилированный полигистидин/конъюгат трансферрин-полилизин. Специалисту в данной области техники также будет понятно, что аминокислоты со свойствами, подобными His и Lys, могут быть замещены внутри композиции.

[106] Определенные варианты осуществления антисмысловых олигонуклеотидов, описанные в данном документе, могут включать основную функциональную группу, такую как amino или алкиламино, и, таким образом, иметь способность к формированию фармацевтически приемлемых солей с фармацевтически приемлемыми кислотами. Термин «фармацевтически приемлемые соли» в связи с этим относится к относительно нетоксичным, неорганическим и органическим солям присоединения кислоты соединений по настоящему изобретению. Такие соли могут быть получены *in situ* в среде-носителе для введения или в процессе изготовления лекарственной формы, или посредством осуществления отдельной реакции очищенного соединения по настоящему изобретению в форме его свободного основания с подходящей органической или неорганической кислотой, и выделения полученной таким образом соли во время последующего очищения. Иллюстративные соли включают соли гидробромида, гидрохлорида, сульфата,

бисульфата, фосфата, нитрата, ацетата, валерата, олеата, пальмитата, стеарата, лаурата, бензоата, лактата, фосфата, тозилата, цитрата, малеата, фумарата, сукцината, тартрата, нафтилата, мезилата, глюкогептоната, лактобионата и лаурилсульфоната и т. п. (См., например, Berge et al. (1977) «Pharmaceutical Salts», J. Pharm. Sci. 66:1-19).

[107] Фармацевтически приемлемые соли исследуемых антисмысловых олигонуклеотидов включают традиционные нетоксичные соли или четвертичные аммониевые соли соединений, например, полученные из нетоксичных органических или неорганических кислот. Например, такие традиционные нетоксичные соли включают те, которые получены из неорганических кислот, таких как гидрохлоридная, бромистоводородная, серная, сульфаминовая, фосфорная, азотная т. п.; и соли, полученные из органических кислот, таких как уксусная, пропионовая, янтарная, гликолевая, стеариновая, молочная, яблочная, винная, лимонная, аскорбиновая, пальмитиновая, малеиновая, гидроксималеиновая, фенилуксусная, глутаминовая, бензойная, салициловая, сульфаниловая, 2-ацетоксибензойная, фумаровая, толуолсульфоновая, метансульфоновая, этандисульфоновая, щавелевая, изотиновая и т. п.

[108] В определенных вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды по настоящему изобретению могут содержать одну или несколько кислотных функциональных групп и, таким образом, способны к образованию фармацевтически приемлемых солей с фармацевтически приемлемыми основаниями. Термин «фармацевтически приемлемые соли» в данных случаях относится к относительно нетоксичным, неорганическим и органическим солям присоединения основания соединений по настоящему изобретению. Такие соли могут быть получены *in situ* в среденосителе для введения или в процессе изготовления лекарственной формы, или посредством осуществлением отдельной реакции очищенного соединения в его форме свободной кислоты с подходящим основанием, таким как гидроксид, карбонат или бикарбонат фармацевтически приемлемого катиона металла, с аммиаком или с фармацевтически приемлемым органическим первичным, вторичным или третичным амином. Иллюстративные щелочи или соли щелочноземельных металлов включают литиевые, натриевые, калиевые, кальциевые, магниевые, алюминийевые соли и т. п. Иллюстративные органические амины, пригодные для образования соли присоединения основания, включают этиламин, диэтиламин, этилендиамин, этаноламин, диэтанолламин, пиперазин и т. п. (См., например, Berge et al., выше).

[109] Также в композиции могут присутствовать смачивающие средства, эмульгаторы и смазывающие средства, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также красящие средства, разделительные средства, средства для нанесения покрытий, подсластители, ароматизирующие и парфюмерные средства, консерванты и антиоксиданты.

[110] Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т. п.; (2) жирорастворимые

антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т. п.; и (3) металл-хелатирующие средства, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т. п.

[111] Составы по настоящему изобретению включают составы, подходящие для перорального, назального, местного (включая трансбуккальное и сублингвальное), ректального, вагинального и/или парентерального введения. Составы могут с целью удобства быть представлены в стандартной лекарственной форме и могут быть получены с помощью любого способа, хорошо известного в области фармацевтики. Количество активного ингредиента, которое может быть объединено с материалом носителя с образованием однократной лекарственной формы, будет различаться в зависимости от хозяина, который подвергается лечению, конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое может быть объединено с материалом носителя с образованием однократной лекарственной формы будет в общем представлять собой то количество соединения, которое обеспечивает терапевтический эффект. В общем, в диапазоне ста процентов данное количество находится в диапазоне от приблизительно 0,1 процента до приблизительно девяносто девяти процентов активного ингредиента, предпочтительно от приблизительно 5 процентов до приблизительно 70 процентов, наиболее предпочтительно от приблизительно 10 процентов до приблизительно 30 процентов.

[112] В определенных вариантах осуществления состав по настоящему изобретению содержит вспомогательное вещество выбранное из циклодекстринов, целлюлоз, липосом, мицеллообразующих средств, например, желчных кислот, и полимерных носителей, например, сложных полиэфиров и полиангидридов; и олигомер по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления вышеуказанный состав превращает олигомер по настоящему изобретению в перорально биодоступный.

[113] Способы получения таких составов или фармацевтических композиций включают стадию объединения антисмыслового олигонуклеотида по настоящему изобретению с носителем и, необязательно, одним или несколькими вспомогательными ингредиентами. В целом, составы получены вследствие однотипного и непосредственного объединения соединения по настоящему изобретению с жидкими носителями или мелкодисперсными твердыми носителями, или и теми и другими, и затем, при необходимости, придавания продукту формы.

[114] Составы по настоящему изобретению, подходящие для перорального введения, могут иметь форму капсул, облаток, пилюль, таблеток, пастилок для рассасывания (с применением ароматизированной основы, обычно сахарозы и аравийской камеди или трагаканта), порошков, гранул или быть в виде раствора или суспензии в водной или неводной жидкости, или в виде жидкой эмульсии типа «масло в воде» или «вода в масле», или в виде настойки или сиропа, или в виде пастилок (с применением

инертной основы, такой как желатин и глицерин, или сахарозы и аравийской камеди) и/или в виде жидкости для полоскания рта и т. п., где каждый содержит предварительно определенное количество соединения по настоящему изобретению в качестве активного ингредиента. Антисмысловой олигонуклеотид по настоящему изобретению может также вводиться в виде болюса, электуария или пасты.

[115] В твердых лекарственных формах по настоящему изобретению для перорального введения (капсулы, таблетки, пилюли, драже, порошки, гранулы, таблетки для рассасывания и т. п.) активный ингредиент может быть смешан с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, такими как цитрат натрия или дикальцийфосфат, и/или любыми из следующих: (1) наполнители или добавки, такие как виды крахмала, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремниевая кислота; (2) связывающие средства, такие как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и/или аравийская камедь; (3) увлажняющие средства, такие как глицерин; (4) разрыхлители, такие как агар-агар, карбонат кальция, картофельный крахмал или тапиоковый крахмал, альгиновая кислота, определенные силикаты и карбонат натрия; (5) замедляющие средства растворов, такие как парафин; (6) ускорители абсорбции, такие как соединения четвертичного аммония и поверхностно-активные вещества, такие как полоксамер и лаурилсульфат натрия; (7) смачивающие средства, такие как, например, цетиловый спирт, глицеролмоностеарат и неионогенные поверхностно-активные вещества; (8) абсорбенты, такие как каолиновая и бентонитовая глина; (9) смазывающие средства, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия, стеарат цинка, стеарат натрия, стеариновая кислота и их смеси; (10) красящие средства; и (11) средства контролируемого высвобождения, такие как кросповидон или этилцеллюлоза. В случае с капсулами, таблетками и пилюлям, фармацевтические композиции могут также содержать буферные средства. Твердые фармацевтические композиции подобного типа могут также использоваться в качестве наполнителей в желатиновых капсулах с мягкой и твердой оболочкой с применением таких вспомогательных веществ как лактоза или молочные сахара, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и т. п.

[116] Таблетка может быть получена посредством прессования или формирования, необязательно, с помощью одного или нескольких вспомогательных ингредиентов. Сделанные под действием давления таблетки могут быть получены с применением связывающего средства (например, желатина или гидроксипропилметилцеллюлозы), смазывающего средства, инертного разбавителя, консерванта, разрыхлителя (например, крахмалгликолята натрия или сшитой натрий-карбоксиметилцеллюлозы), поверхностно активного или диспергирующего средства. Формированные таблетки могут быть получены посредством формирования в подходящем устройстве с помощью смеси порошкообразного соединения, увлажненной с помощью инертного жидкого разбавителя.

[117] Таблетки и другие твердые лекарственные формы фармацевтических композиций по настоящему изобретению, такие как драже, капсулы, пилюли и гранулы,

могут необязательно иметь отметку для деления или быть полученными с помощью нанесения покрытий и оболочек, таких как кишечнорастворимые оболочки и другие оболочки, хорошо известные в области составления фармацевтических составов. Они могут также составляться таким образом для обеспечения медленного или контролируемого высвобождения активного ингредиента в них с применением, например, гидроксипропилметилцеллюлозы в различных пропорциях для обеспечения необходимого профиля высвобождения, других полимерных матрикс, липосом и/или микросфер. Они могут составляться для быстрого высвобождения, например, лиофилизироваться. Их можно стерилизовать, например, посредством фильтрации с помощью задерживающего бактерии фильтра или посредством включения стерилизующих средств в форме стерильных твердых фармацевтических композиций, которые могут быть растворены в стерильной воде или некоторых других стерильных инъекционных средах, непосредственно перед применением. Такие фармацевтические композиции могут также необязательно содержать затемняющие средства и могут принадлежать к типу композиции, которая высвобождает активный ингредиент(ы) только или предпочтительно в определенных участках желудочно-кишечного тракта необязательно с задержкой. Примеры включенных композиций, которые могут использоваться, включают полимерные вещества и воски. Активный ингредиент может также находиться в микроинкапсулированной форме, если необходимо, с одним или несколькими вышеописанными вспомогательными веществами.

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

[119] Помимо инертных разбавителей фармацевтические композиции для перорального применения могут также включать вспомогательные средства, такие как смачивающие средства, эмульгирующие и суспендирующие средства, подсластители, ароматизирующие, красящие, парфюмерные и консервирующие средства.

[120] Суспензии, в дополнение к активным соединениям, могут содержать суспендирующие средства как, например, этоксилированные изостеариловые спирты, полиоксиэтиленовый сорбитол и сложные эфиры сорбитана, микрокристаллическую целлюлозу, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант и их смеси.

[121] Составы для ректального или вагинального введения могут быть

представлены в виде суппозитория, который может быть получен смешиванием одного или нескольких соединений по настоящему изобретению с одним или несколькими подходящими не вызывающими раздражающего действия вспомогательными веществами или носителями, содержащими, например, какао масло, полиэтиленгликоль суппозиторный воск или салицилат, и который представляет собой твердое вещество при комнатной температуре, но жидкое при температуре тела и, следовательно, расплавится в прямой кишке или вагинальной полости и высвободит активное соединение.

[122] Составы или лекарственные формы для местного или трансдермального введения олигомера, предусмотренного в данном документе, включают порошки, спреи, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластыри и средства для ингаляции. Активные антисмысловые олигонуклеотиды могут быть смешаны в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми консервантами, буферами или распыляющими веществами, которые могут быть необходимы. Мази, пасты, кремы и гели могут содержать, в дополнение к активному соединению по настоящему изобретению, вспомогательные вещества, такие как жиры животного и растительного происхождения, масла, воски, парафины, крахмал, трагакант, производные целлюлозы, полиэтиленгликоли, силиконы, бентониты, кремниевую кислоту, тальк и оксид цинка или их смеси.

[123] Порошки и спреи могут содержать, в дополнение к олигомеру по настоящему изобретению, вспомогательные вещества, такие как лактозу, тальк, кремниевую кислоту, гидроксид алюминия, силикат кальция и полиамидный порошок или смеси таких веществ. Спреи могут дополнительно содержать стандартные распыляющие вещества, такие как хлорфторуглеводороды, и летучие незамещенные углеводороды, такие как бутан и пропан.

[124] Трансдермальные пластыри имеют дополнительное преимущество обеспечения контролируемой доставки олигомера по настоящему изобретению в организм. Такие лекарственные формы могут быть получены посредством растворения или диспергирования олигомера в надлежащей среде. Усиливающие абсорбцию средства также могут применяться для повышения поступления средства через кожу. Скорость такого поступления может контролироваться либо обеспечением регулирующей скорости мембраны, либо диспергированием средства в полимерной матрице или геле, наряду с другими способами, известными из уровня техники.

[125] Фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, могут содержать один или несколько антисмысловых олигонуклеотидов по настоящему изобретению в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или неводными растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями, или стерильными порошками, которые могут быть повторно растворены в стерильные инъекционные растворы или дисперсии непосредственно перед применением, которые могут содержать сахара, спирты, антиоксиданты, буферные растворы, бактериостатические средства, растворы, которые

придают составу изотонические свойства по отношению к крови предполагаемого реципиента, или суспендирующие или загустительные средства. Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые могут использоваться в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т. п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Подходящая текучесть может быть сохранена, например, посредством применения покрывающих материалов, таких как лецитин, посредством сохранения необходимых размеров частиц, в случае с дисперсиями, и посредством применения поверхностно-активных веществ.

[126] Такие фармацевтические композиции могут также содержать вспомогательные вещества, такие как консерванты, смачивающие средства, эмульгирующие средства и диспергирующие средства. Предотвращение действия микроорганизмов на исследуемые антисмысловые олигонуклеотиды может быть обеспечено посредством включения различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабена, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и т. п. Также может быть необходимо включение в композиции изотонических средств, таких как сахара, хлорид натрия и т. п. Кроме того, длительная абсорбция инъекционной фармацевтической формы может быть осуществлена посредством включения средств, которые задерживают абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

[127] В некоторых случаях, с целью продлить эффект лекарственного средства, необходимо замедлить абсорбцию лекарственного средства, введенного посредством подкожной или внутримышечной инъекции. Это может быть достигнуто посредством применения жидкой суспензии кристаллического или аморфного материала, имеющего слабую растворимость в воде, наряду с другими способами, известными из уровня техники. Скорость абсорбции лекарственного средства в таком случае зависит от скорости ее растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размеров кристаллов и кристаллической формы. В качестве альтернативы замедленная абсорбция парентерально вводимых форм лекарственного средства достигнута посредством растворения или суспендирования лекарственного средства в масляной среде-носителе.

[128] Инъекционные депо-формы могут быть получены посредством формирования заключенных в микрокапсулу матриц исследуемого антисмыслового олигонуклеотида внутри биологически разлагаемых полимеров, таких как полилактид-полигликолид. Скорость высвобождения олигомера может контролироваться в зависимости от соотношения олигомера к полимеру и природы конкретного используемого полимера. Примеры других биологически разлагаемых полимеров включают поли(ортоэфиры) и поли(ангидриды). Инъекционные составы-депо могут также быть получены посредством захвата лекарственного средства в липосомах или микроэмульсиях, которые совместимы с тканями организма.

[129] Если антисмысловые олигонуклеотиды по настоящему изобретению вводятся

в качестве лекарственных препаратов людям и животным, их можно вводить в чистом виде или в виде фармацевтической композиции, содержащей, например, 0,1-99% (более предпочтительно 10-30%) активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

[130] Как указано выше, составы или препараты по настоящему изобретению можно вводить перорально, парентерально, местно или ректально. Их, как правило, вводят в формах, подходящих для каждого пути введения. Например, их вводят в форме таблеток или капсул посредством инъекции, ингаляции, с помощью глазной примочки, мази, суппозитория, и т. д., введения посредством инъекции, инфузии или ингаляции; местно с помощью глазной примочки или мази; и ректально с помощью суппозитория.

[131] Независимо от выбранного пути введения антисмысловые олигонуклеотиды по настоящему изобретению, которые могут применяться в подходящей гидратированной форме, и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, могут быть составлены в фармацевтически приемлемые лекарственные формы с помощью традиционных способов, известных специалистам в данной области техники. Действительные уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут изменяться так, чтобы с получением количества активного ингредиента, которое является эффективным для достижения необходимого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиция и способ введения не были неприемлемо токсичными для пациента.

[132] Выбранный уровень дозировки будет зависеть от разнообразных факторов, включая активность конкретного олигомера, используемого в настоящем изобретении, или его сложного эфира, соли или амида, пути введения, времени введения, скорости выведения или метаболизма конкретного используемого олигомера, скорости и степени абсорбции, продолжительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, применяемых в комбинации с конкретным используемым олигомером, возраста, пола, веса, состояния, общего состояния здоровья и ранее собранного анамнеза пациента, проходящего лечение, и похожих факторов, хорошо известных в области медицины.

[133] Врач или ветеринар, имеющий обычную квалификацию в уровне техники, может легко определить и предписать эффективное необходимое количество фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может изначально установить величину соединений по настоящему изобретению, используемых в фармацевтической композиции, с уровней меньших, чем необходимо, чтобы достичь необходимого терапевтического эффекта, и постепенно повышать величину дозы до достижения необходимого эффекта. В целом, подходящая суточная доза соединения по настоящему изобретению будет являться тем количеством соединения, которое представляет собой наименьшую эффективную дозу для образования терапевтического эффекта. Такая эффективная доза, в общем, будет зависеть от факторов, описанных выше. В общем, пероральная, внутривенная, интрацеребровентрикулярная и подкожная дозы

соединений по настоящему изобретению для пациента, когда применяются для указанных эффектов, будут находиться в диапазоне от приблизительно 0,0001 до приблизительно 100 мг на килограмм веса тела в сутки.

[134] В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды по настоящему изобретению вводят в дозах, в общем, от приблизительно 4 до 100 мг/кг, от приблизительно 10 до 100 мг/кг или от приблизительно 20 до 100 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления парентеральные дозы с помощью, например, внутривенного введения, составляют от приблизительно 0,5 мг до 100 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды вводят в дозах, составляющих приблизительно 4 мг/кг, 10 мг/кг, 11 мг/кг, 12 мг/кг, 14 мг/кг, 15 мг/кг, 17 мг/кг, 20 мг/кг, 21 мг/кг, 25 мг/кг, 26 мг/кг, 27 мг/кг, 28 мг/кг, 29 мг/кг, 30 мг/кг, 31 мг/кг, 32 мг/кг, 33 мг/кг, 34 мг/кг, 35 мг/кг, 36 мг/кг, 37 мг/кг, 38 мг/кг, 39 мг/кг, 40 мг/кг, 41 мг/кг, 42 мг/кг, 43 мг/кг, 44 мг/кг, 45 мг/кг, 46 мг/кг, 47 мг/кг, 48 мг/кг, 49 мг/кг, 50 мг/кг, 51 мг/кг, 52 мг/кг, 53 мг/кг, 54 мг/кг, 55 мг/кг, 56 мг/кг, 57 мг/кг, 58 мг/кг, 59 мг/кг, 60 мг/кг, 65 мг/кг, 70 мг/кг, 75 мг/кг, 80 мг/кг, 85 мг/кг, 90 мг/кг, 95 мг/кг или 100 мг/кг, включая все промежуточные целые числа. В некоторых вариантах осуществления олигомер вводят в дозе, составляющей приблизительно 4 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления олигомер вводят в дозе, составляющей приблизительно 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления олигомер вводят в дозе, составляющей приблизительно 20 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления олигомер вводят в дозе, составляющей приблизительно 30 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления олигомер вводят в дозе, составляющей приблизительно 40 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления олигомер вводят в дозе, составляющей приблизительно 50 мг/кг.

[135] При необходимости эффективная суточная доза активного соединения может вводиться как две, три, четыре, пять, шесть или больше частей дозы, вводимых по отдельности, с допустимыми интервалами в течение дня, необязательно, в стандартных лекарственных формах. При определенных обстоятельствах введение дозы проводят один раз в сутки. В некоторых вариантах осуществления введение дозы проводят один или несколько раз каждые 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 дней или каждые 1 или 2 недели, по мере необходимости, для сохранения необходимого уровня экспрессии функционального белка дистрофина. В определенных вариантах осуществления введение дозы проводят один раз каждую неделю. В определенных вариантах осуществления введение дозы проводят один или несколько раз в две недели. В некоторых вариантах осуществления введение дозы проводят один раз каждые две недели.

[136] В различных вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды вводят еженедельно в дозе, составляющей приблизительно 4 мг/кг. В различных вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды вводят еженедельно в дозе, составляющей приблизительно 10 мг/кг. В различных вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды вводят еженедельно в дозе, составляющей приблизительно 20 мг/кг. В различных вариантах осуществления антисмысловые

олигонуклеотиды вводят еженедельно в дозе, составляющей приблизительно 30 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды вводят еженедельно в дозе, составляющей приблизительно 40 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды вводят еженедельно в дозе, составляющей приблизительно 50 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды вводят еженедельно в дозе, составляющей приблизительно 60 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды вводят еженедельно в дозе, составляющей 80 мг/кг. Используемое в данном документе выражение еженедельно подразумевает принятое в данной области значение каждой недели.

[137] В различных вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды вводят каждые две недели в дозе, составляющей приблизительно 4 мг/кг. В различных вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды вводят каждые две недели в дозе, составляющей приблизительно 10 мг/кг. В различных вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды вводят каждые две недели в дозе, составляющей приблизительно 20 мг/кг. В различных вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды вводят каждые две недели в дозе, составляющей приблизительно 30 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды вводят каждые две недели в дозе, составляющей приблизительно 40 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды вводят каждые две недели в дозе, составляющей приблизительно 50 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды вводят каждые две недели в дозе, составляющей приблизительно 60 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды вводят каждые две недели в дозе, составляющей приблизительно 80 мг/кг. Используемое в данном документе выражение каждые две недели подразумевает принятое в данной области значение каждых двух недель.

[138] Молекулы нуклеиновой кислоты можно вводить в клетки посредством разнообразных способов, известных специалистам в данной области техники, включая без ограничения инкапсулирование в липосомы, с помощью ионофореза или путем внедрения в другие среды-носители, такие как гидрогели, циклодекстрины, биологически разлагаемые нанокапсулы и биоадгезивные микросферы, описанные в данном документе и известные из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления технологию микроэмульгирования можно использовать для улучшения биологической доступности липофильных (нерастворимых в воде) фармацевтических средств. Примеры включают Trimetrine (Dordunoo, S. K., et al., *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 17(12), 1685-1713, 1991) и REV 5901 (Sheen, P. C., et al., *J Pharm Sci* 80(7), 712-714, 1991). Среди других преимуществ микроэмульгирование обеспечивает повышенную биологическую доступность посредством направления абсорбции преимущественно в лимфатическую систему вместо системы кровообращения, которая при этом обходит печень и предотвращает разрушение соединений в области кровотока гепатобилиарной системы.

[139] В одном аспекте настоящего изобретения составы содержат мицеллы, образованные из олигомера, предусмотренного в данном документе, и по меньшей мере одного амфифильного носителя, в котором мицеллы имеют средний диаметр менее приблизительно 100 нм. Более предпочтительные варианты осуществления предусматривают мицеллы, имеющие средний диаметр менее приблизительно 50 нм, и еще более предпочтительные варианты осуществления предусматривают мицеллы, имеющие средний диаметр менее приблизительно 30 нм или даже менее приблизительно 20 нм.

[140] Хотя рассматриваются все подходящие амфифильные носители, предпочтительными в настоящее время носителями обычно являются те, которые имеют статус признанных полностью безвредным (GRAS), и которые могут как растворять соединение по настоящему изобретению, так и микроэмульгировать его на более поздней стадии, когда раствор вступает в контакт со сложной водной фазой (такой как фаза, обнаруженная в желудочно-кишечном тракте человека). Как правило, амфифильные ингредиенты, которые удовлетворяют данным требованиям, характеризуются значениями HLB (гидрофильно-липофильного баланса), составляющими 2-20, и их структуры содержат прямоцепочечные алифатические радикалы в диапазоне от C-6 до C-20. Примерами являются полиэтилен-гликолизированные глицериды жирных кислот и полиэтиленгликоли.

[141] Примеры амфифильных носителей включают насыщенные и мононенасыщенные полиэтилен-гликолизированные глицериды жирных кислот, такие как полученные из различных полностью или частично гидрогенизированных растительных масел. Такие масла могут преимущественно состоять из три-, ди- и моноглицеридов жирных кислот и сложных ди- и моноэфиров полиэтиленгликоля соответствующих жирных кислот, при этом, в частности, предпочтительный состав жирных кислот включает каприновую кислоту 4-10, каприновую кислоту 3-9, лауриновую кислоту 40-50, миристиновую кислоту 14-24, пальмитиновую кислоту 4-14 и стеариновую кислоту 5-15%. Другой пригодный класс амфифильных носителей включает частично этерифицированные сорбитан и/или сорбит, с насыщенными или мононенасыщенными жирными кислотами (серия SPAN) или соответствующие этоксилированные аналоги (серия TWEEN).

[142] Коммерчески доступные амфифильные носители могут являться особенно пригодными, включая серию Gelucire, Labrafil, Labrasol или Lauroglycol (все изготовлены и распространены Gattefosse Corporation, Сен-Прист, Франция), PEG-моноолеат, PEG-диолеат, PEG-монолаурат и дилаурат, лецитин, полисорбат 80 и т. д. (произведены и распространены рядом компаний в США и по всему миру).

[143] В некоторых вариантах осуществления доставку можно осуществлять посредством применения липосом, нанокапсул, микрочастиц, микросфер, липидных частиц, везикул и т. п. для введения фармацевтических композиций по настоящему изобретению в подходящие клетки-хозяева. В частности, фармацевтические композиции

по настоящему изобретению можно составлять для доставки инкапсулированными в любое из липидной частицы, липосомы, везикулы, наносферы, наночастицы или т. п. Составление и применение таких сред-носителей для доставки можно осуществлять с применением известных и традиционных методик.

[144] Гидрофильные полимеры, подходящие для применения в настоящем изобретении, представляют собой таковые, которые являются легко растворимыми в воде, могут ковалентно присоединяться к везикулообразующему липиду, и которые являются переносимыми *in vivo* без токсических эффектов (т. е. являются биологически совместимыми). Подходящие полимеры включают полиэтиленгликоль (PEG), полимолочную (также называемую полилактидом), полигликолевую кислоту (также называемую полигликолидом), сополимер полимолочной и полигликолевой кислоты и поливиниловый спирт. В определенных вариантах осуществления полимеры характеризуются молекулярной массой от приблизительно 100 или 120 дальтон до приблизительно 5000 или 10000 дальтон или от приблизительно 300 дальтон до приблизительно 5000 дальтон. В других вариантах осуществления полимер представляет собой полиэтиленгликоль, характеризующийся молекулярной массой от приблизительно 100 до приблизительно 5000 дальтон, или характеризующийся молекулярной массой от приблизительно 300 до приблизительно 5000 дальтон. В некоторых вариантах осуществления полимер представляет собой полиэтиленгликоль с молекулярной массой 750 дальтон (PEG(750)). Полимеры можно также определить с помощью числа мономеров в нем; при этом в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения применяются полимеры из по меньшей мере приблизительно трех мономеров, при этом такие полимеры, представляющие собой PEG, состоят из трех мономеров (примерно 150 дальтон).

[145] Другие гидрофильные полимеры, которые могут являться подходящими для применения в настоящем изобретении, включают поливинилпирролидон, полиметоксазолин, полиэтилоксазолин, полигидроксипропилметакриламид, полиметакриламид, полидиметилакриламид и дериватизированные виды целлюлозы, такие как гидроксиметилцеллюлоза или гидроксипропилцеллюлоза.

[146] В некоторых вариантах осуществления состав по настоящему изобретению содержит биологически совместимый полимер, выбранный из группы, состоящей из полиамидов, поликарбонатов, полиалкиленов, полимеров акриловых и метакриловых сложных эфиров, поливиниловых полимеров, полигликолидов, полисилоксанов, полиуретанов и их сополимеров, видов целлюлозы, полипропилена, полиэтиленов, полистирола, полимеров молочной кислоты и гликолевой кислоты, полиангидридов, сложных полиортоэфиров, полимасляной кислоты, поливалериановой кислоты, сополимера лактида и капролактона, полисахаридов, белков, полигиалуроновых кислот, полицианоакрилатов и их смесей сухих компонентов, смесей в виде жидкости или сополимеров.

[147] Циклодекстрины представляют собой циклические олигосахариды,

состоящие из 6, 7 или 8 глюкозных структурных единиц, обозначенных греческой буквой α , β или γ соответственно. Глюкозные структурные единицы соединены посредством α -1,4-глюкозидных связей. Как следствие конформации «кресла» сахарных структурных единиц, все вторичные гидроксильные группы (в C-2, C-3) расположены на одной стороне кольца, тогда как все первичные гидроксильные группы в C-6 расположены на другой стороне. В результате внешние поверхности являются гидрофильными, что делает циклодекстрины водорастворимыми. Напротив, полости циклодекстринов являются гидрофобными, поскольку они выложены водородом при атомах C-3 и C-5, и атомами кислорода, образующими простую эфирную связь. Такие матрицы обеспечивают образование комплекса со множеством относительно гидрофобных соединений, в том числе, например, стероидными соединениями, такими как 17α -эстрадиол (см., например, van Uden et al. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 38:1-3-113 (1994)). Комплексообразование осуществляется посредством Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий и посредством образования водородной связи. Для общего обзора химии циклодекстринов, см. Wenz, Agnew. *Chem. Int. Ed. Engl.*, 33:803-822 (1994).

[148] Физико-химические свойства производных циклодекстрина сильно зависят от типа и степени замещения. Например, их растворимость в воде находится в диапазоне от нерастворимого (например, триацетил-бета-циклодекстрин) до растворимого на 147% (вес./об.) (G-2-бета-циклодекстрин). Кроме того, они являются растворимыми во множестве органических растворителей. Свойства циклодекстринов обеспечивают контроль над растворимостью различных компонентов состава посредством повышения или снижения их растворимости.

[149] Были описаны многочисленные циклодекстрины и способы их получения. Например, Parmeter (I), et al. (патент США № 3453259) и Gramera, et al. (патент США № 3459731) описали электронейтральные циклодекстрины. Другие производные включают циклодекстрины с катионными свойствами [Parmeter (II), патент США № 3453257], нерастворимые сшитые циклодекстрины (Solms, патент США № 3420788) и циклодекстрины с анионными свойствами [Parmeter (III), патент США № 3426011]. Среди производных циклодекстрина с анионными свойствами к исходному циклодекстрину добавляли карбоновые кислоты, фосфорные кислоты, фосфинистые кислоты, фосфоновые кислоты, фосфорные кислоты, тиофосфоновые кислоты, тиосульфоновые кислоты и сульфоновые кислоты [см. Parmeter (III) выше]. Кроме того, производные циклодекстрина на основе сульфоалкилового эфира были описаны Stella, et al. (патент США № 5134127).

[150] Липосомы состоят из по меньшей мере одной липидной двухслойной мембраны, окружающей водный внутренний компартмент. Липосомы могут характеризоваться типом мембраны и размером. Малые моноламеллярные везикулы (SUV) имеют одну мембрану и, как правило, находятся в диапазоне от 0,02 до 0,05 мкм в диаметре; большие моноламеллярные везикулы (LUV), как правило, больше 0,05 мкм. Большие олиголамеллярные везикулы и мультиламеллярные везикулы имеют множество, обычно концентрических, слоев мембраны и, как правило, больше 0,1 мкм. Липосомы с

несколькими неконцентрическими мембранами, т. е. несколькими более мелкими везикулами, содержащимися внутри большей везикулы, называются мультивезикулярными везикулами.

[151] Один аспект настоящего изобретения относится к составам, содержащим липосомы, которые содержат антисмысловой олигонуклеотид по настоящему изобретению, где липосомальная мембрана составлена с обеспечением липосомы с повышенной переносной способностью. В качестве альтернативы или в дополнение, соединение по настоящему изобретению может содержаться внутри липосомного бислоя липосомы или быть адсорбировано на нем. Антисмысловой олигонуклеотид по настоящему изобретению может быть агрегирован с липидным поверхностно-активным веществом и переноситься в пределах внутреннего пространства липосомы; в таких случаях липосомальная мембрана составлена с устойчивостью к разрушительным эффектам агрегата активное средство-поверхностно-активное вещество.

[152] В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения липидный бислой липосомы содержит липиды, образующие производное с полиэтиленгликолем (PEG), таким образом, что цепи PEG простираются от внутренней поверхности липидного бислоя во внутреннюю поверхность, инкапсулированную липосомой, и простираются из внешней поверхности липидного бислоя в окружающую среду.

[153] Активные средства, содержащиеся внутри липосом по настоящему изобретению, находятся в растворенной форме. Агрегаты поверхностно-активного вещества и активного средства (например, эмульсии или мицеллы, содержащие активное средство, представляющее интерес) могут быть захвачены внутри внутреннего пространства липосом в соответствии с настоящим изобретением. Поверхностно-активное вещество действует с диспергированием и растворением активного средства, и может быть выбрано из любого подходящего алифатического, циклоалифатического или ароматического поверхностно-активного вещества, включающего без ограничения биологически совместимые лизофосфатидилхолины (LPG) с различными длинами цепи (например, от приблизительно C14 до приблизительно C20). Полимер-derivatизированные липиды, такие как PEG-липиды, могут также использоваться для образования мицелл, поскольку они будут действовать с обеспечением подавления слияния мицелла/мембрана, и поскольку добавление полимера к молекулам поверхностно-активного вещества уменьшает критическую концентрацию мицелл («СМС») поверхностно-активного вещества и способствует образованию мицелл. Предпочтительными являются поверхностно-активные вещества с СМС в микромолярном диапазоне; поверхностно-активные вещества с более высокой СМС можно применять для получения мицелл, захваченных внутри липосом по настоящему описанию.

[154] Липосомы в соответствии с настоящим изобретением можно получать посредством любой из разнообразия методик, которые известны из уровня техники. См., например, патент США № 4235871; опубликованные заявки по PCT WO 96/14057; New

RRC, *Liposomes: A practical approach*, IRL Press, Oxford (1990), pages 33-104; Lasic DD, *Liposomes from physics to applications*, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1993. Например, липосомы по настоящему изобретению можно получать посредством рассеивания липида, образующего производное с гидрофильным полимером, на предварительно образованные липосомы, например, посредством воздействия на предварительно образованные липосомы мицеллами, состоящими из липид-привитых полимеров, при концентрациях липида, соответствующих конечному молярному проценту дериватизированного липида, который является необходимым в липосоме. Липосомы, содержащие гидрофильный полимер, могут также быть образованы посредством методик гомогенизации, гидратации липидного поля или экструзии, известных из уровня техники.

[155] В другой иллюстративной процедуре составления активного средства сначала диспергируют посредством разрушения ультразвуком лизофосфатидилхолина или другого поверхностно-активного вещества с низкой СМС (включая полимер-привитые липиды), которые легко растворяют гидрофобные молекулы. Полученную в результате мицеллярную суспензию активного средства затем применяют для регидратации высушенного липидного образца, который содержит подходящий молярный процент полимер-привитого липида или холестерина. Суспензию липида и активного средства затем формируют в липосомы с применением методик экструзии, известных из уровня техники, и полученные в результате липосомы отделяют от неинкапсулированного раствора посредством стандартного разделения с помощью колонки.

[156] В одном аспекте настоящего изобретения липосомы получают с по существу однородными размерами в выбранном диапазоне размеров. Один эффективный способ сортировки по размеру включает экструдирование водной суспензии липосом с помощью ряда поликарбонатных мембран, имеющих выбранный однородный размер пор; размер пор мембраны будет четко соответствовать самым большим размерам липосом, полученным посредством экструзии с помощью той мембраны. См., например, патент США № 4737323 (12 апреля 1988 г.). В некоторых вариантах осуществления реагенты, такие как DharmaFECT® и Lipofectamine® можно применять для введения полинуклеотидов или белков в клетки.

[157] Характеристики высвобождения состава по настоящему изобретению зависят от материала для инкапсуляции, концентрации инкапсулированного лекарственного средства и наличия модификаторов высвобождения. Например, на высвобождение можно влиять таким образом, чтобы оно являлось зависимым от pH, например, с применением чувствительного в отношении pH покрытия, которое опосредует высвобождение только при низком значении pH, как в желудке, или более высоком значении pH, как в кишечнике. Кишечнорастворимое покрытие можно применять для предотвращения осуществления высвобождения пока состав не пройдет через желудок. Множество покрытий или смесей цианамиды, инкапсулированного в различных материалах, можно применять для получения первоначального высвобождения в желудке, за которым следует последующее высвобождение в кишечнике. На высвобождение также можно влиять

посредством включения солей или порообразующих средств, которые могут повысить поглощение воды или высвобождение лекарственного средства посредством диффузии из капсулы. Вспомогательные вещества, которые модифицируют растворимость лекарственного средства, могут также применяться для контроля скорости высвобождения. Средства, которые усиливают разрушение матрицы или высвобождение из матрицы могут также быть включены. Их можно добавлять к лекарственному средству, добавлять в виде отдельной фазы (т. е. в виде частиц), или можно совместно растворять в полимерной фазе в зависимости от соединения. В большинстве случаев количество должно составлять от 0,1 до тридцати процентов (вес./вес. полимера). Типы средств, усиливающих разрушение, включают неорганические соли, такие как сульфат аммония и хлорид аммония, органические кислоты, такие как лимонная кислота, бензойная кислота и аскорбиновая кислота, неорганические основания, такие как карбонат натрия, карбонат калия, карбонат кальция, карбонат цинка и гидроксид цинка, и органические основания, такие как протаминсульфат, спермин, холин, этаноламин, диэтанолламин и триэтанолламин, и поверхностно-активные вещества, такие как Tween® и Pluronic®. Порообразующие средства, которые обеспечивают микроструктуру матрицам (т. е. водорастворимые соединения, такие как неорганические соли и сахара), добавляют в виде частиц. Диапазон, как правило, составляет от одного до тридцати процентов (вес./вес. полимера).

[158] На поглощение можно также влиять посредством изменения времени удержания частиц в кишке. Этого можно достичь, например, посредством покрытия частицы адгезивным в отношении слизистой оболочки полимером или выбрав его в качестве инкапсулирующего материала. Примеры включают большинство полимеров со свободными карбоксильными группами, такие как хитозан, виды целлюлозы и, в частности, полиакрилаты (используемые в данном документе полиакрилаты относятся к полимерам, включающим акрилатные группы и модифицированные акрилатные группы, такие как цианоакрилаты и метакрилаты).

[159] Антисмысловой олигонуклеотид может быть составлен с содержанием внутри хирургического или медицинского устройства или имплантата или приспособлен для высвобождения посредством них. В определенных аспектах имплантат может быть покрыт или иным образом обработан антисмысловым олигонуклеотидом. Например, гидрогели или другие полимеры, такие как биологически совместимые и/или биоразлагаемые полимеры, можно применять для покрытия имплантата фармацевтическими композициями по настоящему изобретению (т. е. композиция может быть приспособлена для применения посредством медицинского устройства с применением гидрогеля или другого полимера). Полимеры и сополимеры для покрытия медицинских устройств средством хорошо известны из уровня техники. Примеры имплантатов включают без ограничения стенты, стенты, выделяющие лекарственное средство, нити, протез, сосудистые катетеры, катетеры для диализа, сосудистые трансплантаты, искусственные клапаны сердца, кардиостимуляторы, имплантируемые кардиовертердефибрилляторы, IV-иглы, устройства для выправления и образования

кости, такие как стержни, винты, пластины и другие устройства, и искусственные тканевые матрицы для заживления раны.

[160] В дополнение к способам, предусмотренным в данном документе, антисмысловые олигонуклеотиды для применения в соответствии с настоящим изобретением можно составлять для введения посредством любого подходящего пути применения в медицине человека или ветеринарной медицине, аналогично с другими фармацевтическими средствами. Антисмысловые олигонуклеотиды и соответствующие составы на их основе можно вводить по отдельности или в комбинации с другими терапевтическими стратегиями в лечении мышечной дистрофии, такими как трансплантация миообласта, средства терапии на основе стволовых клеток, введение аминокликозидных антибиотиков, ингибиторы протеосом и повышающие регуляцию средства терапии (например, повышающие регуляцию атрофина, аутосомного паралога дистрофина).

[161] В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство можно вводить до, одновременно или последовательно с введением антисмыслового олигонуклеотида по настоящему изобретению. Например, антисмысловые олигонуклеотиды можно вводить в комбинации со стероидом и/или антибиотиком. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды вводят пациенту, который получает фоновую стероидную терапию (например, периодическую или постоянную/непрерывную фоновую стероидную терапию). Например, в некоторых вариантах осуществления пациента лечили кортикостероидом до введения антисмыслового олигомера и он продолжал получать стероидную терапию. В некоторых вариантах осуществления стероид представляет собой глюкокортикоид или преднизон.

[162] Описанные пути введения предназначены быть только ориентировочными, поскольку специалист в данной области техники сможет легко определить оптимальный путь введения и любую величину дозы для любого конкретного животного и условия. Были предприняты многочисленные подходы для введения нового функционального генетического материала в клетки как *in vitro*, так и *in vivo* (Friedmann (1989) *Science*, 244:1275-1280). Такие подходы включают интеграцию гена, подлежащего экспрессии, в модифицированные ретровирусы (Friedmann (1989) выше; Rosenberg (1991) *Cancer Research* 51(18), suppl.: 5074S-5079S); интеграцию в отличные от ретровируса векторы (например, аденоассоциированные вирусные векторы) (Rosenfeld, et al. (1992) *Cell*, 68:143-155; Rosenfeld, et al. (1991) *Science*, 252:431-434) или доставку трансгена, связанного с гетерологичным энхансерным элементом промотора посредством липосом (Friedmann (1989), выше; Brigham, et al. (1989) *Am. J. Med. Sci.*, 298:278-281; Nabel, et al. (1990) *Science*, 249:1285-1288; Hazinski, et al. (1991) *Am. J. Resp. Cell Molec. Biol.*, 4:206-209; и Wang and Huang (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 84:7851-7855); связанных с лиганд-специфическими транспортными системами на основе катиона (Wu и Wu (1988) *J. Biol. Chem.*, 263:14621-14624) или применение «оголенной» ДНК, векторов экспрессии (Nabel et al. (1990), выше; Wolff et al. (1990) *Science*, 247:1465-1468). Непосредственная инъекция

трансгенов в ткань обеспечивает только локализованную экспрессию (Rosenfeld (1992) выше); Rosenfeld et al. (1991) выше; Brigham et al. (1989) выше; Nabel (1990) выше; и Nazinski et al. (1991) выше). Группа Brigham et al. (Am. J. Med. Sci. (1989) 298:278-281 и Clinical Research (1991) 39 (реферат)) описывали трансфекцию *in vivo* только легких мышцей после либо внутривенного, либо интратрахеального введения комплекса ДНК-липосома. Примером обзорной статьи о процедурах генной терапии человека является Anderson, Science (1992) 256:808-813.

[163] В дополнительном варианте осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут дополнительно содержать углеводов, что предусмотрено в Han et al., Nat. Comms. 7, 10981 (2016), полный объем которого включен в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать 5% углевода гексозы. Например, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать 5% глюкозы, 5% фруктозы или 5% маннозы. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать 2,5% глюкозы и 2,5% фруктозы. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать углеводов, выбранный из: арабинозы, присутствующей в количестве 5% по объему, глюкозы, присутствующей в количестве 5% по объему, сорбита, присутствующего в количестве 5% по объему, галактозы, присутствующей в количестве 5% по объему, фруктозы, присутствующей в количестве 5% по объему, ксилита, присутствующего в количестве 5% по объему, маннозы, присутствующей в количестве 5% по объему, комбинации глюкозы и фруктозы, каждая из которых присутствует в количестве 2,5% по объему, и комбинации глюкозы, присутствующей в количестве 5,7% по объему, фруктозы, присутствующей в количестве 2,86% по объему, и ксилита, присутствующего в количестве 1,4% по объему.

IV. Наборы

[164] Настоящее изобретение также предусматривает наборы для лечения пациента с генетическим заболеванием (например, DMD), при этом набор содержит по меньшей мере антисмысловую молекулу (например, касимерсен), упакованную в подходящий контейнер, вместе с инструкциями для ее применения. Наборы также могут содержать второстепенные реагенты, такие как буферы, стабилизаторы и т. д. Специалисты, имеющие обычную квалификацию в данной области техники, поймут, что варианты применения вышеуказанного способа имеют широкое применение для идентификации антисмысловых молекул, подходящих для применения в лечении множества других заболеваний.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. СУЩНОСТЬ

Идентификатор ClinicalTrials.gov: NCT02500381

[165] Основная цель исследования состоит в оценке эффективности касимерсена (SRP-4045) и голодирсена (SRP-4053) по сравнению с плацебо у пациентов с мышечной

дистрофией Дюшенна (DMD) с мутациями, представляющими собой делеции вне рамки считывания, поддающимися лечению посредством пропуска экзона 45 и экзона 53 соответственно.

Тип исследования: интервенционный

План исследования. Распределение: рандомизированное.

Модель вмешательства: параллельное назначение.

Маскировка: четырехкратная (участник, медицинский работник, исследователь, оценщик результатов).

Первичная цель: лечение.

Официальное название: двойное слепое, плацебо-контролируемое, многоцентровое исследование с открытым дополнительным лечением для оценки эффективности и безопасности SRP-4045 и SRP-4053 у пациентов с мышечной дистрофией Дюшенна.

Материалы и способы

[166] Касимерсен (a/k/a SRP-4045) представляет собой РМО с химической структурой, описанной в данном документе, и поставлялся Sarepta Therapeutics, Inc. Лекарственный продукт на основе касимерсена составляли при концентрации 50 мг/мл в виде стерильного изотонического забуференного фосфатом водного раствора, который поставляли в ампулах для однократного применения. Лекарственный продукт разбавляли физиологическим раствором (0,9% раствор хлорида натрия для инъекций) перед введением посредством IV-инфузии в условиях клиники.

Пациенты. Пригодность

[167] Пригодные пациенты были в возрасте 7-13 лет с делециями вне рамки считывания гена DMD, которые поддаются лечению посредством пропуска экзона 45.

Критерии включения

Диагностирована DMD, подтвержденная генотипически.

Принимает стабильную дозу кортикостероидов в течение по меньшей мере 24 недель.

Неповрежденные мышцы правого и левого бицепса или 2 альтернативные группы мышц плеча.

Средний результат 6MWT составляет 300 метров или больше и составляет 450 метров или меньше.

Стабильная легочная и сердечная функция: форсированная жизненная емкость легких (FVC) составляет 50% от прогнозированной или больше и фракция выброса левого желудочка (LVEF) составляет более 50%.

Критерии исключения

Предшествующее лечение с помощью SMT C1100 (BMN-195) в любой момент времени.

Лечение посредством генной терапии в любой момент времени.

Предшествующее лечение с помощью PRO045 или PRO053 в пределах 24 недель до недели 1.

Текущее или предшествующее лечение с помощью любых других экспериментальных средств (отличных от дефлазакорта) в пределах 12 недель до недели 1.

Участие в любом другом интервенционном исследовании DMD в пределах 12 недель до недели 1.

Обширное хирургическое вмешательство в пределах 3 месяцев до недели 1.

Наличие другого клинически значимого заболевания.

Существенное изменение режима физической терапии в пределах 3 месяцев до недели 1.

План исследования

[168] Пациенты с делециями, поддающимися лечению посредством пропуска экзона 45, получали внутривенные (IV) инфузии касимерсена (SRP-4045) в дозе 30 мг/кг в течение не более 96 недель в период двойного слепого исследования. После этого следовал период с открытым дополнительным лечением, в который все пациенты получали открытое дополнительно интенсивное лечение касимерсеном (SRP-4045) в виде IV инфузии в дозе 30 мг/кг/неделя в течение 48 недель в OL-период (не дольше, чем до недели 144 исследования).

Первичные показатели результатов: изменение от исходного уровня общей пройденной дистанции во время теста с 6-минутной ходьбой (6MWT) в неделю 96 [временной период: от исходного уровня до недели 96].

Вторичные показатели результатов

Изменение от исходного уровня общей пройденной дистанции во время теста с 6-минутной ходьбой (6MWT) в неделю 144 (неделя 48 OL-периода) [временной период: от исходного уровня до недели 144].

Изменение от исходного уровня уровней белка дистрофина, определенное посредством вестерн-блоттинга в недели 48 или 96 [временной период: от исходного уровня до недель 48 или 96].

Изменение от исходного уровня уровней интенсивности дистрофина, определенное посредством иммуногистохимического исследования (ИНС) в недели 48 или 96 [временной период: от исходного уровня до недель 48 или 96].

Способность независимо подниматься с пола [временной период: неделя 96, неделя 144].

Время потери способности передвигаться (LOA) [временной период: исходный уровень, неделя 96, неделя 144].

Изменение от исходного уровня общего показателя амбулаторной оценки North Star (NSAA) в неделю 96 и неделю 144 [временной период: исходный уровень, неделя 96, неделя 144]. NSAA представляет собой функциональную шкалу, разработанную на основе шкалы оценки двигательной способности Хаммерсмита, специально для применения в отношении детей с мышечной дистрофией Дюшенна (DMD), которые могут ходить. Она состоит из 17 видов активности, оцененных на 0 (без возможности осуществления), 1 (осуществление с модификациями), 2 (нормальное движение). С помощью шкалы оценивают виды активности, необходимые для сохранения способности ходить (например, подниматься с пола), виды активности, которые могут быть сложными даже на раннем этапе заболевания (например, стоять на пятках), и виды активности, известные тем, что их выполнение становится все более сложным со временем (встать из кресла, ходить). Общий показатель NSAA находится в диапазоне 0-34, где показатель 34 означает нормальную функцию.

Изменение от исходного уровня процента форсированной жизненной емкости легких (FVC%), прогнозируемое в неделю 96 и неделю 144 [временной период: исходный уровень, неделя 96, неделя 144].

Промежуточный анализ

[169] Пациентов с делециями, поддающихся лечению посредством пропуска экзона 45, рандомизировали для получения еженедельной внутривенной (IV) инфузии касимерсена в дозе 30 мг/кг (N=27) или плацебо (N=16) в течение 96 недель. Промежуточный анализ проводили с использованием данных биопсий мышцы бицепса, полученных на исходном уровне и во время лечения в неделю 48.

Основные результаты промежуточного анализа включают следующее.

Среднее количество белка дистрофина (% нормального дистрофина, измеренный посредством вестерн-блоттинга) увеличилось до 1,736% от нормы по сравнению со средним значением на исходном уровне, составляющим 0,925% от нормы ($p < 0,001$).

Статистически значимое отличие в среднем изменении от исходного уровня до недели 48 относительно белка дистрофина наблюдали у группы, получавшей лечение касимерсеном, по сравнению с группой, получавшей плацебо ($p = 0,009$ (анализ чувствительности) $p = 0,004$ (основной способ анализа)).

Среди 22 пациентов, получавших касимерсен, которых тестировали на увеличение количества mRNA, образовавшейся после пропуска экзона, в исходном анализе с применением полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (RT-PCR), все проявляли увеличение в отношении пропуска экзона 45 ($p < 0,001$) по сравнению с их исходными уровнями, представляя 100% частоту ответа.

В исходном анализе наблюдали статистически значимую положительную корреляцию между пропуском экзона 45 и продуцированием дистрофина (ранговая корреляция Спирмена=0,635, $p < 0,001$).

В анализе с участием всех 27 пациентов, получавших касимерсен, которых тестировали на увеличение количества mRNA, образовавшейся после пропуска экзона, с

применением полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (RT-PCR), все проявляли увеличение в отношении пропуска экзона 45 ($p < 0,001$) по сравнению с их исходными уровнями, представляя 100% частоту ответа.

В анализе с участием всех 27 пациентов наблюдали статистически значимую положительную корреляцию между пропуском экзона 45 и продуцированием дистрофина (ранговая корреляция Спирмена=0,627, $p < 0,001$).

Исследование продолжали и поддерживали его слепым для сбора дополнительных данных об эффективности и безопасности.

Пример 2.

[170] Основная цель исследования состоит в оценке безопасности и переносимости касимерсена и оценке фармакокинетических параметров (PK) касимерсена у пациентов DMD на поздней стадии и подтвержденными мутациями, которые поддаются лечению посредством пропуска экзона 45.

Способы

[171] В многоцентровое, рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое, исследование фазы 1/2 с подбором дозы включали пациентов DMD на поздней стадии и подтвержденными мутациями, поддающимися лечению посредством пропуска экзона 45.

[172] Во время периода двойного слепого исследования с подбором дозы пациентов рандомизировали (2:1) для получения касимерсена или плацебо в течение ≈ 12 недель. Пациенты, рандомизированные для получения касимерсена, получали 4 дозы с возрастающими уровнями (4, 10, 20 и 30 мг/кг), вводимые раз в неделю посредством внутривенной (IV) инфузии в течение ≥ 2 недель на уровень дозы. После периода двойного слепого исследования с подбором дозы безопасность и эффективность еженедельной дозы касимерсена, составляющей 30 мг/кг, оценивали в периоде с открытым дополнительным лечением в течение не более дополнительных 132 недель.

Пациенты. Пригодность

[173] Пригодные пациенты были мужчинами в возрасте 7-21 года с клиническим диагнозом DMD, которые имели подтвержденную генетическую мутацию, поддающуюся лечению посредством пропуска экзона 45, имели стабильную легочную и сердечную функцию, принимали или не принимали перорально стабильную дозу кортикостероидов в течение ≥ 24 недель до начала исследования и не могли ходить или не были способны пройти ≥ 300 метров в тесте с 6-минутной ходьбой.

Оценки исследования

[174] Оценки безопасности включали нежелательные явления, возникшие в ходе лечения (TEAE), отклонения клинических лабораторных показателей от нормы, отклонения от нормы жизненно важных признаков и физических показателей и клинически значимое ухудшение на электрокардиограммах и эхокардиограммах.

[175] Оценки PK включали площадь под кривой зависимости концентрации от времени (AUC), общий клиренс организма (CL), максимальную наблюдаемую

концентрацию (C_{\max}), период полувыведения в конечной фазе ($t_{1/2}$), время максимальной наблюдаемой концентрации (t_{\max}) и объем распределения в равновесном состоянии (V_{ss}).

[176] Данные оценивали и представляли с применением краткого описания и описательных статистических данных.

[177] РК-параметры для касимерсена рассчитывали с применением некомпартментного анализа для визитов, когда РК-измерения проводили последовательно.

Результаты

[178] Из 12 включенных в исследование пациентов 11 (91,7%) закончили исследование. Пациенты, рандомизированные для лечения касимерсеном, в целом были немного старше и имели заболевание на более поздней стадии, чем пациенты, рандомизированные для получения плацебо (таблица 1).

Таблица 1

Параметр	Плацебо (n=4)	Касимерсен (n=8)	Всего (n=12)
Среднее значение (SD) возраста, у	12,0 (2,2)	14,4 (3,3)	13,6 (3,1)
Раса, n %			
Европеоид	4 (100)	6 (75,0)	10 (83,3)
Монголоид	0	2 (25,0)	2 (16,7)
Этническая принадлежность, n (%)			
Испанец или латиноамериканец	0	1 (12,5)	1 (8,3)
Не испанец или латиноамериканец	4 (100)	7 (87,5)	11 (91,7)
Среднее значение ВМІа (SD), кг/м ²	21,9 (1,2)	25,9 (4,8)	24,6 (4,3)
Средняя дистанция в 6MWT ^{a, b} (SD), метры	115,0 (134,2)	0,9 (2,5)	39,1 (90,0)
Средний показатель времени со времени диагноза DMD(SD), месяцы	91,8 (33,7)	136,1 (47,9)	121,3 (47,4)
Средняя	84,5 (38,3)	80,1 (34,5)	81,6 (34,1)

КОЛ-ВО. ТЕАЕ, в зависимос ти от тяжести								
Слабое	11	9	3	9	13	26	47	159
Умеренн ое	0	0	0	1	1	3	4	14
Тяжелое	0	0	0	0	2	2	2	2

^aТЕАЕ, о которых сообщалось для пациентов, получавших лечение касимерсеном в период двойного слепого исследования, также включены в краткое описание для периода лечения касимерсеном.

^bНе было пациентов, прекративших прием исследуемого лекарственного средства или уменьшавших дозу исследуемого лекарственного средства вследствие ТЕАЕ, и во время исследования не происходило смертей.

[181] Не было пациентов, прекративших прием исследуемого лекарственного средства или уменьшавших дозу исследуемого лекарственного средства вследствие ТЕАЕ. Большинство ТЕАЕ были легкой тяжести во время периода как двойного слепого (88,7%) лечения, так и периода с открытым дополнительным лечением (90,9%). Боль во время процедуры и назофарингит были наиболее распространенными ТЕАЕ, о которых сообщалось во время периода двойного слепого лечения и периода с открытым дополнительным лечением, соответственно (таблицы 3 и 4).

Таблица 3. Сообщалось о нежелательных явлениях, возникших в ходе лечения, у $\geq 25\%$ пациентов либо из группы, получавшей плацебо, либо из общей группы, получавшей касимерсен, во время периода двойного слепого лечения^a

Пациенты, n (%)	Плацебо (n=4)	Касимерсен 4 мг/кг (недели 1-2) (n=8)	Касимерсен 10 мг/кг (недели 3-4) (n=8)	Касимерсен 20 мг/кг (недели 5-6) (n=8)	Касимерсен 30 мг/кг (недели 7-8) (n=8)	Касимерсен 30 мг/кг (с недели 7 до конца периода двойного слепого исследования) (n=8)	Всего (N=8)
≥ 1 ТЕАЕ	4 (100)	5 (62,5)	3 (37,5)	3 (37,5)	4 (50,0)	7 (87,5)	8 (100)
Боль во время	1 (25,0)	0	0	2 (25,0)	2 (25,0)	3 (37,5)	4 (50,0)

процедуры							
Головная боль	0	1 (12,5)	0	0	1 (12,5)	2 (25,0)	3 (37,5)
Рвота	0	0	0	2 (25,0)	1 (12,5)	2 (25,0)	3 (37,5)
Тошнота	0	1 (12,5)	1 (12,5)	1 (12,5)	0	0	2 (25,0)
Назофарингит	1 (25,0)	1 (12,5)	0	0	1 (12,5)	1 (12,5)	1 (12,5)
Боль в конечности	1 (25,0)	0	0	0	1 (12,5)	1 (12,5)	1 (12,5)
Папиллома кожи	1 (25,0)	0	0	0	1 (12,5)	1 (12,5)	1 (12,5)
Контактный дерматит	2 (50,0)	0	0	0	0	0	0
Боль в спине	1 (25,0)	0	0	0	0	0	0
Растяжение связок	1 (25,0)	0	0	0	0	0	0
Боль в ротоглотке	1 (25,0)	0	0	0	0	0	0
Разноцветный лишай	1 (25,0)	0	0	0	0	0	0

^aВключены только ТЕАЕ с датой начала проявления после введения первой дозы исследуемого лекарственного средства до первой дозы во время периода с открытым дополнительным лечением.

Таблица 4. Сообщалось о нежелательных явлениях, возникших в ходе лечения, у $\geq 25\%$ пациентов в общей группе, получавшей лекарственное средство касимерсен в период двойного слепого лечения, период с открытым дополнительным лечением^a

Пациенты, n (%)	Общая группа, получавшая касимерсен (N=12)
≥ 1 ТЕАЕ	12 (100)
Назофарингит	9 (75,0)
Кашель	4 (33,3)
Головная боль	4 (33,3)
Боль во время процедуры	4 (33,3)

Инфекция верхних дыхательных путей	4 (33,3)
Рвота	4 (33,3)
Тошнота	3 (25,0)
Боль в конечности	3 (25,0)
Боль в ротоглотке	3 (25,0)
Сыпь	3 (25,0)
Перелом большеберцовой кости	3 (25,0)

^aВключены только ТЕАЕ с датой начала проявления после введения первой дозы касимерсена.

[182] Связанные с лечением ТЕАЕ включали 1 случай дефицита железа умеренной степени тяжести и 1 случай гиперемии легкой степени тяжести у 2 пациентов, получавших лечение касимерсеном, и контактный дерматит легкой степени тяжести у 1 пациента, который получил плацебо. Связанные с касимерсеном ТЕАЕ возвращались к норме во время периода исследования; связанные с плацебо ТЕАЕ продолжались на момент завершения исследования.

[183] Пять серьезных ТЕАЕ (перелом большеберцовой кости у 1 пациента, бактериемия, септическая эмболия и тромбоз полой вены у 1 пациента, и перелом бедренной кости у 1 пациента) проявлялись у пациентов, получавших касимерсен в дозе 30 мг/кг во время периодов объединенного лечения. Считалось, что все 5 явлений не были связаны с лечением, возвращались к норме во время исследования и не возникали снова при дальнейшем введении дозы.

[184] Не наблюдали патернов, склонностей или отклонений от нормы в отношении гематологии, коагулопатии, химических компонентов или других клинических лабораторных параметров. Не отмечали сердечного сигнала во время проведения импульса или функциональной оценки с помощью эхокардиограммы. Сообщалось об одном случае временной желудочковой тахикардии, но явление считали несвязанным с лечением касимерсеном и эхокардиограмма нормализовалась без осложнений.

Фармакокинетика

[185] Среднее значение концентрации касимерсена в плазме крови в отношении профилей времени было подобным в неделю 7 и неделю 60 для уровня дозы 30 мг/кг. Все РК-параметры были подобными в недели 7 и 60 для уровня дозы касимерсена 30 мг/кг (таблица 5).

Таблица 5. Краткое описание ключевых некомпартментных РК-параметров касимерсена в плазме крови в зависимости от уровня дозы и недели

Параметр	Неделя 1 Касимерсен 4 мг/кг (n=8)	Неделя 3 Касимерсен 10 мг/кг (n=8)^a	Неделя 5 Касимерсен 20 мг/кг (n=8)	Неделя 7 Касимерсен 30 мг/кг (n=8)	Неделя 60 Касимерсен 30 мг/кг (n=12)
C_{max}, нг/мл	13,700 (25,0)	39,400 (11,7)	64,400 (27,4)	119,000 (33,6)	115,000 (31,5)

t_{\max} , ч.	1.1 (0,9-1,2)	1.03 (0,9-1,2)	1.03 (0,8-1,2)	0.94 (0,8-1,2)	0,95 (0,8-1,1)
AUC_{∞} , ч·нг/мл	23,300 (29,5)	58,300 (16,0)	101,000 (17,7)	189,000 (27,5)	182,000 (33,9)
V_{ss} , л/кг	0,369 (24,4)	0,343 (12,5)	0,407 (23,4)	0,319 (31,4)	0,367 (28,9)
CL, л/ч./кг	0,177 (29,1)	0,181 (15,9)	0,205 (18,5)	0,163 (27,7)	0,180 (35,0)
$t_{1/2}$, ч.	2,92 (0,985)	3,29 (0,640)	3,71 (0,616)	3,82 (0,741)	3,45 (0,359)

Значений представлены в виде геометрического среднего (геометрический коэффициент вариации доли в процентах) для всех параметров кроме t_{\max} и $t_{1/2}$. t_{\max} представлен в виде медианы (минимум - максимум); $t_{1/2}$ представлен в виде среднего (стандартное отклонение).

^aВ неделю 3 n= 7 для AUC_{∞} , V_{ss} , CL и $t_{1/2}$.

AUC_{∞} , площадь под кривой зависимости концентрации от времени от момента времени 0 экстраполирована до бесконечности.

Краткое описание

[186] В данном исследовании касимерсен в дозе 30 мг/кг хорошо переносился пациентами с DMD на поздней стадии и с подтвержденными мутациями, поддающимися лечению посредством пропуска экзона 45. Наиболее распространенные ТЕАЕ были легкой степени тяжести, сообщалось о нескольких связанных с лечением ТЕАЕ и не было пациентов, прекративших прием исследуемого лекарственного средства или уменьшавших дозу исследуемого лекарственного средства вследствие ТЕАЕ. Не сообщалось о клинически значимых отклонениях лабораторных показателей от нормы или ухудшении на электрокардиограммах и эхокардиограммах. РК-анализ касимерсена дает основания предположить, что после недельной дозы 30 мг/кг практически не происходит накопления.

[187] Все публикации и заявки на патент, приведенные в настоящем описании, включены в данный документ посредством ссылки как если бы каждая отдельная публикация или заявка на патент были точно и по отдельности указаны для включения посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD) у пациента, нуждающегося в этом, который имеет мутацию гена DMD, которая поддается лечению посредством пропуска экзона 45, предусматривающий введение пациенту дозы касимерсена или его фармацевтически приемлемой соли.
2. Способ по п. 1, где дозу вводят при величине дозы приблизительно 30 мг/кг веса тела пациента.
3. Способ по пп. 1-2, где дозу вводят в виде однократной дозы.
4. Способ по пп. 1-3, где дозу вводят один раз в неделю.
5. Способ по любому из предыдущих пунктов, где пациент имеет мутацию гена DMD, которая выбрана из группы, состоящей из: экзонов 7-42, 12-42, 18-42, 44-46, 44-47, 44-48, 44-49, 44-51, 44-53, 44-55, 44-57 или 44-59 или экзона 44.
6. Способ по любому из предыдущих пунктов, где пациенту длительно вводят касимерсен.
7. Способ по любому из предыдущих пунктов, где пациенту вводят касимерсен в течение по меньшей мере 48 недель.
8. Способ по любому из предыдущих пунктов, где пациент принимает стабильную дозу кортикостероидов в течение по меньшей мере 6 месяцев до введения касимерсена.
9. Способ по любому из предыдущих пунктов, где касимерсен или его фармацевтически приемлемая соль составлены в виде фармацевтической композиции.
10. Способ по любому из предыдущих пунктов, где касимерсен или его фармацевтически приемлемая соль составлены в виде фармацевтической композиции при концентрации приблизительно 50 мг/мл.
11. Способ по п. 10, где касимерсен или его фармацевтически приемлемая соль составлены в виде фармацевтической композиции при концентрации приблизительно 50 мг/мл и представлены в лекарственной форме в количестве приблизительно 100 мг/2 мл.
12. Способ по п. 11, где лекарственная форма содержится во флаконе для однократного применения.
13. Способ по пп. 10-12, где касимерсен или его фармацевтически приемлемая соль составлены в виде фармацевтической композиции, содержащей касимерсен или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель.
14. Способ по п. 13, где фармацевтически приемлемый носитель представляет собой забуференный фосфатом раствор.
15. Способ восстановления рамки считывания mRNA с индуцированием пропуска экзона у пациента с мышечной дистрофией Дюшенна (DMD), нуждающегося в этом, который имеет мутацию в гене DMD, которая поддается лечению посредством пропуска экзона 45, включающий введение пациенту дозы касимерсена или его фармацевтически приемлемой соли.
16. Способ по п. 15, где дозу вводят при величине дозы приблизительно 30 мг/кг веса тела пациента.

17. Способ по пп. 15-16, где дозу вводят один раз в неделю.

18. Способ по любому из пп. 15-17, где пациенту вводят касимерсен в течение по меньшей мере 48 недель.

19. Способ повышения образования дистрофина у пациента с мышечной дистрофией Дюшенна (DMD), нуждающегося в этом, который имеет мутацию в гене DMD, которая поддается лечению посредством пропуска экзона 45, включающий введение пациенту дозы касимерсена или его фармацевтически приемлемой соли.

20. Способ по п. 19, где дозу вводят при величине дозы приблизительно 30 мг/кг веса тела пациента.

21. Способ по пп. 19-20, где дозу вводят один раз в неделю.

22. Способ по пп. 19-21, где пациенту вводят касимерсен в течение по меньшей мере 48 недель.

23. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий подтверждение того, что пациент имеет мутацию в гене DMD, которая поддается лечению посредством пропуска экзона 45, до введения касимерсена.

24. Касимерсен или его фармацевтически приемлемая соль для применения при лечении мышечной дистрофии Дюшенна (DMD) у пациента, нуждающегося в этом, при этом пациент имеет мутацию гена DMD, которая поддается лечению посредством пропуска экзона 45, где лечение включает введение пациенту однократной внутривенной дозы касимерсена, составляющей приблизительно 30 мг/кг, один раз в неделю.

25. Касимерсен или его фармацевтически приемлемая соль для применения при восстановлении рамки считывания mRNA с индуцированием пропуска экзона у пациента с мышечной дистрофией Дюшенна (DMD), нуждающегося в этом, при этом пациент имеет мутацию гена DMD, которая поддается лечению посредством пропуска экзона 45, где лечение включает введение пациенту однократной внутривенной дозы касимерсена, составляющей приблизительно 30 мг/кг, один раз в неделю.

26. Касимерсен или его фармацевтически приемлемая соль для применения при повышении образования дистрофина у пациента с мышечной дистрофией Дюшенна (DMD), нуждающегося в этом, при этом пациент имеет мутацию гена DMD, которая поддается лечению посредством пропуска экзона 45, где лечение включает введение пациенту однократной внутривенной дозы касимерсена, составляющей приблизительно 30 мг/кг, один раз в неделю.

По доверенности