

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040983**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.08.26

(21) Номер заявки
201892467

(22) Дата подачи заявки
2017.04.28

(51) Int. Cl. **C12N 15/113** (2010.01)
A61K 31/712 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)

(54) ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ АНАЛОГИ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА LMNA ЧЕЛОВЕКА

(31) 62/330,027

(32) 2016.04.29

(33) US

(43) 2019.05.31

(86) PCT/US2017/030174

(87) WO 2017/190041 2017.11.02

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
САРЕПТА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.;
ДЗЕ ЮНАЙТЕД СТЕЙТС ОФ
ЭМЕРИКА, ЭЗ РЕПРЕЗЕНТЕД
БАЙ ДЗЕ СЕКРЕТЭРИ, ДЕПТ. ОФ
ХЕЛТ ЭНД ХЬЮМАН СЕРВИСИЗ;
ЮНИВЕРСИТИ ОФ МЭРИЛЕНД;
ДЗЕ ПРОДЖЕРИЯ РИСЕРЧ
ФАУНДЕЙШН (US)

(56) WO-A2-2013086441
WO-A1-2012150960
WO-A2-2015175977
WO-A2-2007047913
WO-A2-2011150408

YUE-BEI LUO et al.: "Antisense Oligonucleotide Induction of Progerin in Human Myogenic Cells", PLOS ONE, vol. 9, № 6, 1 June 2014 (2014-06-01), p. e98306, XP055403714, DOI: 10.1371/journal.pone.0098306 the whole document
OSORIO FERNANDO G. et al: "Splicing-Directed Therapy in a New Mouse Model of Human Accelerated Aging", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDI, vol. 3, № 106, 26 October 2011 (2011-10-26), p. 145-155, XP008160111, ISSN: 1946-6234, DOI: 10.1126/SCITRANSLMED.3002847, cited in the application the whole document

(72) Изобретатель:
Эрдос Майкл Р., Цао Кань, Коул
Рисзард, Бествик Ричард Кит,
Коллинз Фрэнсис С., Гордон Лесли Б.
(US)

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

(57) Предложены LMNA-нацеленные антисмысловые олигонуклеотиды для снижения экспрессии одной или более aberrantly сплайсированных изоформ мРНК LMNA, которые кодируют прогерин.

B1

040983

040983

B1

Заявление относительно перечня последовательностей

Перечень последовательностей, связанных с этой заявкой, представлен в текстовом формате вместо бумажной копии и таким образом включен в настоящее описание посредством ссылки. Текстовый файл, содержащий перечень последовательностей, назван 120178_503WO SEQUENCE_LISTING.txt. Текстовый файл, имеющий размер 6,5 КБ, создан 26 апреля 2017 г. и представлен в электронном виде посредством EFS web.

Область техники

Настоящее описание в целом относится к нацеленным на ламин А человека антисмысловым соединениям.

Уровень техники

Синдром прогерии Хатчинсона-Гилфорда (HGPS) - редкое генетическое нарушение, характеризующееся преждевременным атеросклерозом и дегенерацией гладкомышечных клеток (SMC) сосудов. Наиболее заметно HGPS проявляется в виде ускоренного, преждевременного старения пораженных детей. У детей с HGPS проявляются такие прогрессирующие симптомы, как задержка роста, облысение, потеря подкожного жира и аномалии костной ткани. Средняя продолжительность жизни составляет 12 лет, а наиболее распространенной причиной смерти является инфаркт миокарда или инсульт.

Большинство случаев HGPS вызваны одноточечной мутацией в гене ламина А (LMNA), приводящей к получению прогерина, усеченного сплайсингового мутанта ламина А. Одноточечная мутация представляет собой *de novo* молчащую замену (1824>T, Gly608Gly) в экзоне 11 гена ламина А (LMNA). Такая замена активизирует криптический донорный сайт сплайсинга, что приводит к образованию доминант-негативного мутантного белка ламина А с внутренней делецией из 50 аминокислот. Мутантный белок, названный прогерин, накапливается в ядерной мембране, вызывая характерное пузырение ядра (Scaffidi and Misteli, 2005; Cao, Blair et al., 2011).

Известно, что aberrантный сплайсинг можно корректировать с использованием фосфордиамидатных морфолиновых олигонуклеотидов (PMO), а более конкретно переключающих сплайсинг олигонуклеотидов (SSO). SSO блокируют сайты aberrантного сплайсинга путем гибридизации в данных сайтах или вблизи них, тем самым предотвращая распознавание механизмов клеточного сплайсинга. Типичные SSO устойчивы к нуклеазам и получаемая двухцепочечная структура исключает возможность расщепления РНК под действием РНКазы Н. Было показано, что SSO эффективно восстанавливают профиль сплайсинга как *in vitro*, так и *in vivo* для случаев талассемии и мышечной дистрофии Дюшенна (Kinali, Arechavala-Gomez et al., 2009; Svasti, Suwanmanee et al., 2009). Показано, что aberrантный сплайсинг LMNA, связанный с HGPS, должен снижаться за счет коррекции события aberrантного сплайсинга с использованием модифицированных антисмысловых олигонуклеотидов, нацеленных на активированный криптический сайт сплайсинга, как в клеточной культуре (Scaffidi and Misteli, 2005), так и в соответствующей животной модели (Osorio, Navarro et al., 2011).

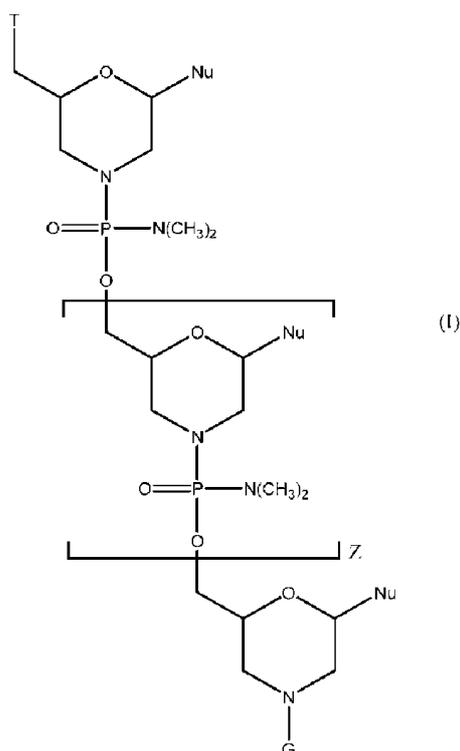
В публикациях PCT WO 2013/086441 и WO 2013/086444 описаны антисмысловые олигомеры, нацеленные на lmna человека, и способы лечения прогероидных ламинопатий с использованием олигонуклеотидных аналогов, нацеленных на lmna, человека, но не описаны антисмысловые олигомерные соединения и способы их применения согласно рассматриваемому описанию.

Принимая во внимание роль LMNA для HGPS, для прекращения экспрессии прогерина требуются олигонуклеотиды, модулирующие сплайсинг пре-мРНК LMNA.

Сущность изобретения

Варианты осуществления настоящего описания в целом относятся к антисмысловым олигомерам, их фармацевтическим композициям и способам их применения, которые модулируют aberrантный сплайсинг пре-мРНК LMNA. В одном аспекте описание относится к модифицированному антисмысловому олигонуклеотиду из от 10 до 40 нуклеотидных оснований. Модифицированный антисмысловый олигонуклеотид включает в себя нацеливающую последовательность, комплементарную целевой области в пределах пре-мРНК LMNA.

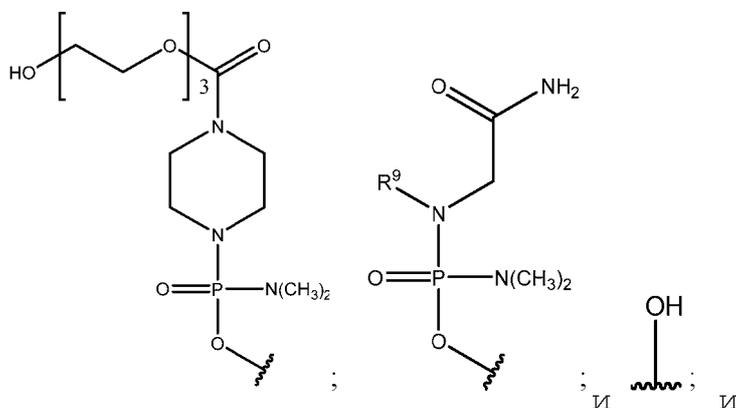
В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер представляет собой соединение формулы (I)



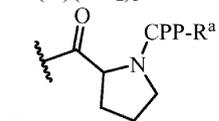
или его фармацевтически приемлемую соль, где каждый Nu представляет собой нуклеотидное основание, которые вместе образуют нацеливающую последовательность;

Z представляет собой целое число от 8 до 38;

T выбран из



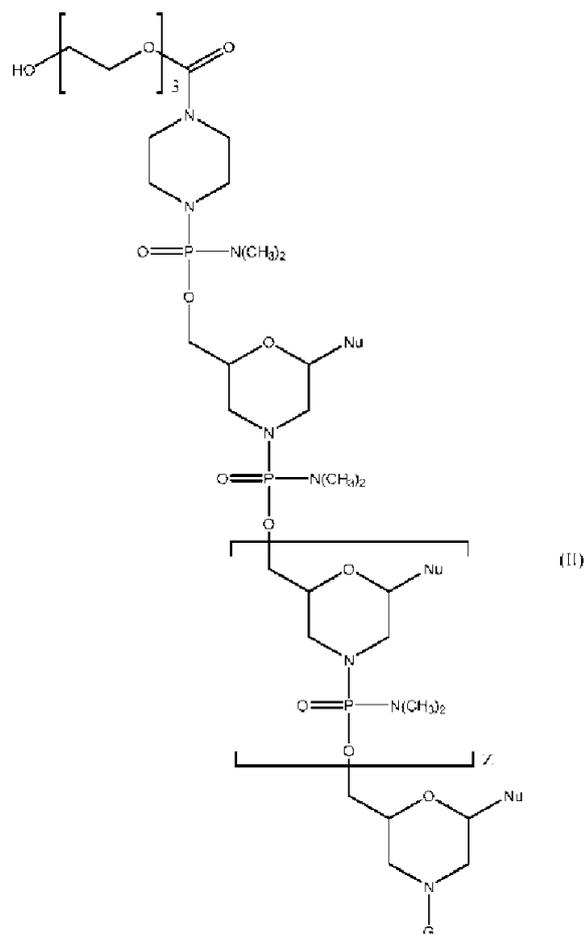
G представляет собой проникающий в клетку пептид (CPP) и линкерный фрагмент, выбранный из $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_5\text{NH}-\text{CPP}-\text{R}^a$, $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_2\text{NH}-\text{CPP}-\text{R}^a$, $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_2\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_5\text{NH}-\text{CPP}-\text{R}^a$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{NH}-\text{CPP}-\text{R}^a$,



где CPP присоединен к линкерному фрагменту амидной связью в карбоксильном конце CPP, а R^a присоединен к аминоконцу CPP амидной связью, где R^a выбран из H, ацетила, бензоила и стеариола.

В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

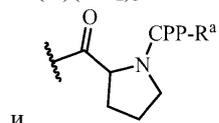
В различных аспектах антисмысловой олигонуклеотид согласно настоящему описанию включает соединение формулы (II)



или его фармацевтически приемлемую соль,
где каждый Nu представляет собой нуклеотидное основание, которые вместе образуют нацеливающую последовательность;

Z представляет собой целое число от 8 до 38; a

G представляет собой проникающий в клетку пептид (CPP) и линкерный фрагмент, выбранный из $-C(O)(CH_2)_5NH-CPP-R^a$, $-C(O)(CH_2)_2NH-CPP-R^a$, $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-CPP-R^a$, $-C(O)CH_2NH-CPP-R^a$,

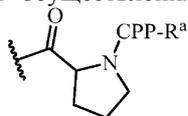


где CPP присоединен к линкерному фрагменту амидной связью в карбоксильном конце CPP, а R^a присоединен к аминоконцу CPP амидной связью, где R^a выбран из H, ацетила, бензоила и стеариола.

В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

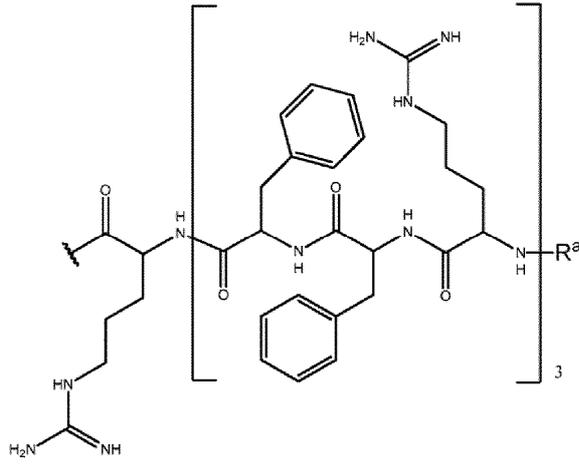
В некоторых вариантах осуществления CPP выбран из SEQ ID NO: 5-21. В некоторых вариантах осуществления G выбран из SEQ ID NO: 22-25.

В различных вариантах осуществления G (как отмечено в формулах (I) и (II)) выбран из

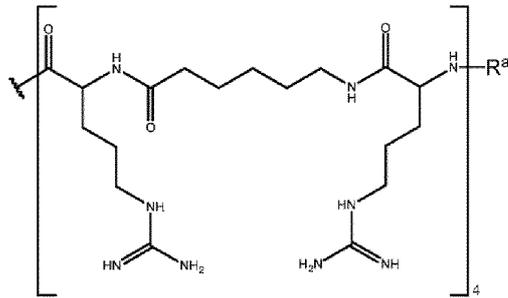


$-C(O)CH_2NH-CPP$ и формулы

где CPP присоединен к линкерному фрагменту амидной связью в карбоксильном конце CPP, а R^a присоединен к аминоконцу CPP амидной связью, и где $CPP-R^a$ выбран из

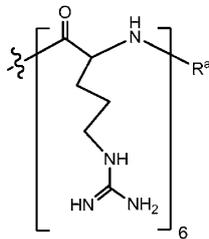


, $(-R-(FFR)_3-R^a)$,



, $(-R(XR)_4-R^a)$,

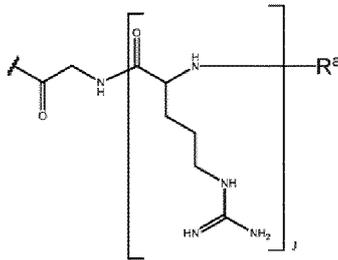
или



$(-R_6-R^a)$, где R^a выбран из H, ацетила, бензоила и стеароила.

В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

В некоторых вариантах осуществления G (как отмечено в формулах (I) и (II)) представлен формулой

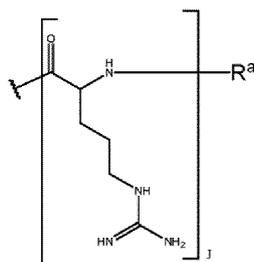


где R^a выбран из H, ацетила, бензоила и стеароила, а

J представляет собой целое число от 4 до 9.

В некоторых вариантах осуществления J равно 6.

В различных вариантах осуществления CPP-R^a (как отмечено в формулах (I) и (II)) представлен формулой

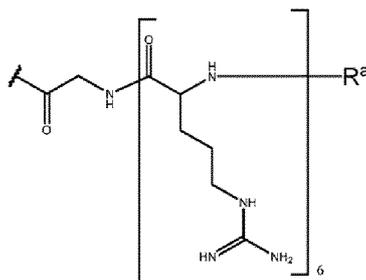


где R^a выбран из H, ацетила, бензоила и стеароида, а J представляет собой целое число от 4 до 9.

В некоторых вариантах осуществления CPP представляет собой SEQ ID NO: 11. В различных вариантах осуществления J равно 6. В некоторых вариантах осуществления R^a выбран из H и ацетила. Например, в некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой H. В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

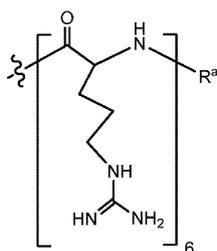
В некоторых вариантах осуществления G выбран из SEQ ID NO: 22-25. В некоторых вариантах осуществления G представляет собой SEQ ID NO: 25.

В некоторых вариантах осуществления G представляет собой -C(O)CH₂NH-R₆-R^a, ковалентно связанный с антисмысловым олигомером настоящего описания в 3'-конце олигомера, где R^a представляет собой H, ацетил, бензоил или стеароил, для кэпирования аминоконца R₆. В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил. В неограничивающих примерах CPP-R^a представляет собой -R₆-R^a, а линкер представляет собой C(O)CH₂NH- (т.е. глицин). Этот конкретный пример G=-C(O)CH₂NH-R₆-R^a также иллюстрируется следующей структурой:



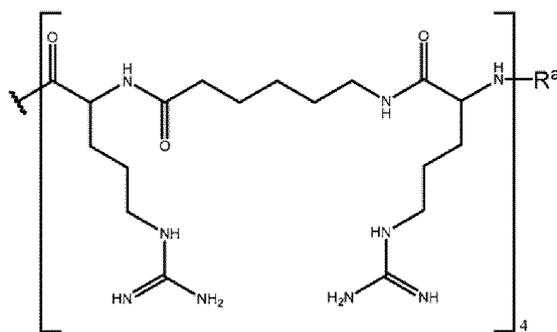
где R^a выбран из H, ацетила, бензоила и стеароида. В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

В различных вариантах осуществления CPP-R^a представляет собой -R₆-R^a, что также иллюстрируется следующей формулой:

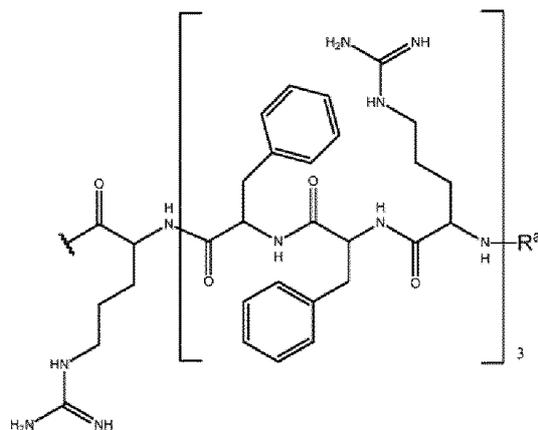


где R^a выбран из H, ацетила, бензоила и стеароида. В некоторых вариантах осуществления CPP представляет собой SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

В некоторых вариантах осуществления CPP-R^a представляет собой -(RXR)₄-R^a, что также иллюстрируется следующей формулой:



В различных вариантах осуществления CPP-R^a представляет собой -R-(FFR)₃-R^a, что также иллюстрируется следующей формулой:



В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность антисмысловых олигомеров настоящего описания, включающая, например, некоторые варианты осуществления антисмысловых олигомеров формулы (I) и (II), выбрана из

- a) SEQ ID NO: 3 (CTGAGCCGCTGGCAGATGCCTTGTC), где Z равно 23; и
- b) SEQ ID NO: 4 (GAGGAGATGGGTCCACCCACCTGGG), где Z равно 23.

В другом аспекте настоящего описания предложены способы лечения заболеваний, таких как заболевания или патологические состояния, связанные с LMNA человека. В некоторых вариантах осуществления такие способы используют для лечения прогероидных заболеваний или связанных патологических состояний, таких как прогероидная ламинопатия (например, HGPS), связанное со старением состояние или сердечно-сосудистое заболевание (такое как атеросклероз).

В дополнительном аспекте в настоящем описании предложены фармацевтические композиции, содержащие антисмысловые олигомеры данного описания и фармацевтически приемлемый носитель.

Таким образом, в дополнительном аспекте в настоящем описании также предложены, в других вариантах осуществления, способы лечения прогероидных ламинопатий путем введения фармацевтической композиции, содержащей антисмысловую олигонуклеотид, описанный в настоящем описании, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Эти и другие аспекты настоящего изобретения станут очевидными при рассмотрении следующего подробного описания. В связи с этим каждая из различных ссылок, указанных в настоящем описании, которые более подробно описывают определенную информацию об уровне техники, процедуры, соединения и/или композиции, тем самым включена в полном объеме посредством ссылки.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показан результат анализа кцПЦР ламина А и прогерина из сердец мышей, получавших лечение РРМО1 (7, 20 или 60 мг/кг), РРМО2 (7, 20 или 60 мг/кг) или контрольным солевым раствором в течение 12 недель.

На фиг. 2 показан результат анализа кцПЦР ламина А и прогерина из нисходящих отделов аорт мышей, получавших лечение РРМО1 (7, 20 или 60 мг/кг), РРМО2 (7, 20 или 60 мг/кг) или контрольным солевым раствором в течение 12 недель.

На фиг. 3 показан результат анализа кцПЦР ламина А и прогерина из четырехглавых мышц мышей, получавших лечение РРМО1 (7, 20 или 60 мг/кг), РРМО2 (7, 20 или 60 мг/кг) или контрольным солевым раствором в течение 12 недель.

На фиг. 4 показан результат анализа кцПЦР ламина А и прогерина из печени мышей, получавших

лечение РРМО1 (7, 20 или 60 мг/кг), РРМО2 (7, 20 или 60 мг/кг) или контрольным солевым раствором в течение 12 недель.

Подробное описание изобретения

Настоящее описание относится к олигонуклеотидам, описанным в настоящем описании, и содержащей их композиции, а также способам *in vitro*, в которых олигонуклеотиды ингибируют экспрессию мРНК мутантного белка LMNA, например, путем модуляции сплайсинга пре-мРНК LMNA.

Определения.

Если не указано иное, все используемые в настоящем описании технические и научные термины имеют общепринятые значения, понятные специалисту в области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Хотя на практике или при тестировании настоящего изобретения могут использоваться способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем описании, описываются типичные способы и материалы. Для целей настоящего изобретения ниже определены следующие термины.

В контексте настоящего описания форма единственного числа используется для обозначения одного или более чем одного (т.е. по меньшей мере одного) грамматического объекта описания. В качестве примера, "элемент" означает один элемент или более одного элемента.

Термин "около" означает численность, уровень, значение, число, частоту, процент, величину, размер, количество, вес или длину, которые варьируются вплоть до 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% от упомянутых численности, уровня, значения, числа, частоты, процента, величины, размера, количества, веса или длины.

Термин "кодирующая последовательность" означает любую нуклеотидную последовательность, участвующую в кодировании полипептидного продукта гена. В противоположность этому, термин "некодирующая последовательность" относится к любой нуклеотидной последовательности, которая не участвует в кодировании полипептидного продукта гена.

Во всем настоящем описании, если контекст не требует иного, слова "включать", "включает" и "включающий" следует понимать как подразумевающие включение указанной стадии или элемента или группы стадий или элементов, но не исключение любой другой стадии, или элемента, или группы стадий или элементов.

Термин "состоящий из" означает включающий и ограничивается любым перечнем того, что следует за фразой "состоящий из". Таким образом, фраза "состоящий из" указывает на то, что перечисленные элементы необходимы или обязательны и что не могут присутствовать никакие другие элементы. Термин "практически состоящий из" означает включение любых элементов, перечисленных после этой фразы, и ограничивается другими элементами, которые не препятствуют или не способствуют активности или действию, указанным в описании для перечисленных элементов. Таким образом, фраза "по существу состоящий из" указывает на то, что перечисленные элементы необходимы или обязательны, но что другие элементы являются необязательными и могут или не могут присутствовать в зависимости от того, влияют ли они фактически или не влияют на активность или действие перечисленных элементов.

Термин "комплементарный" и "комплементарность" относится к полинуклеотидам (т.е. последовательности нуклеотидов), связанных по правилам спаривания оснований. Например, последовательность А-Г-Т является комплементарной последовательности Т-С-А. Комплементарность может быть "частичной", в которой правилам спаривания оснований соответствуют только некоторые основания "нуклеиновых кислот". Или может быть "полная" или "тотальная" комплементарность между нуклеиновыми кислотами. Степень комплементарности между цепями нуклеиновых кислот оказывает значительное влияние на эффективность и силу гибридизации между цепями нуклеиновых кислот. Так как часто требуется идеальная комплементарность, некоторые варианты осуществления могут включать один или более, но предпочтительно 6, 5, 4, 3, 2 или 1 несовпадений по отношению к РНК-мишени. В данное изобретение включены вариации в любом месте олигомера. В некоторых вариантах осуществления обычно предпочтительны вариации возле концов олигомера перед вариациями во внутренней части, и если они имеются, то обычно включают около 6, 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотид 5'- и/или 3'-конца.

Термины "проникающий в клетку пептид" или CPP используются взаимозаменяемо и относятся к катионным проникающим в клетки пептидам, также называемым транспортными пептидами, пептидами-переносчиками или пептидными доменами трансдукции. Пептиды, приведенные в настоящем описании, обладают способностью индуцировать проникновение в клетки в пределах 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% клеток данной популяции клеточных культур, включая все промежуточные целые числа, и обеспечивать при системном введении макромолекулярную транслокацию внутрь множества тканей *in vivo*.

Термины "антисмысловый олигомер", или "антисмысловое соединение", или "антисмысловый олигонуклеотид", или "олигонуклеотид" используются взаимозаменяемо и относятся к последовательности циклических субъединиц, каждая из которых несет фрагмент со спаривающимися основаниями, связанных межсубъединичными связями, позволяющими фрагментам со спаривающимися основаниями гибридизоваться с последовательностью-мишенью в нуклеиновой кислоте (как правило, РНК) за счет спаривания оснований Уотсона-Крика с образованием в пределах целевой последовательности гетеродуп-

лекса нуклеиновая кислота: олигомер. Циклические субъединицы могут основываться на рибозе или другом пентозном сахаре или, в некоторых вариантах осуществления, морфолиновой группе (см. ниже описание морфолиновых олигомеров). Подразумевают также пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК), закрытые нуклеиновые кислоты (ЗНК) и 2'-О-метилолигонуклеотиды, и другие антисмысловые агенты, известные в данной области.

Такой антисмысловый олигомер может конструироваться для блокирования или ингибирования трансляции мРНК или для ингибирования природного сплайс-процессинга пре-мРНК, или для индукции деградации нацеленных мРНК, и можно сказать, что он должен быть "направленным на" или "нацеленным против" последовательности-мишени, с которой гибридизируется. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень представляет собой область, окружающую старт-кодон мРНК AUG, 3' или 5' сайт сплайсинга препроцессированной мРНК или точку ветвления, или включающую их в себя. Внутри экзона или внутри интрона, или в их сочетании, может находиться последовательность-мишень. Последовательность-мишень для сайта сплайсинга может включать последовательность мРНК, чей 5'-конец находится на от 1 до около 25 пар оснований ниже нормального соединения акцептора сплайсинга в препроцессированной мРНК. Примером последовательности-мишени для сайта сплайсинга является любая область препроцессированной мРНК, которая включает сайт сплайсинга, или она содержится целиком внутри кодирующей экзон последовательности, или охватывает акцепторный или донорный сайт сплайсинга. Олигомер чаще называют "нацеленным против" биологически соответствующей мишени, например, в настоящем описании, это пре-мРНК гена LMNA, кодирующего белок ламин А, когда он нацелен против нуклеиновой кислоты мишени описанным выше способом. Примеры нацеливающих последовательностей включают SEQ ID NO: 3 или 4.

В настоящее изобретение включены олигонуклеотиды, которые содержат, по существу состоят из или состоят из одной или более SEQ ID NO: 3 или 4. В настоящее изобретение также включены варианты этих антисмысловых олигомеров, включая варианты олигомеров с 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% (включая все целые числа между значениями) идентичностью последовательности или гомологией последовательности с любой из SEQ ID NO: 3 или 4, и/или варианты, которые отличаются от этих последовательностей на около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, предпочтительно такие варианты, которые модулируют в клетке экспрессию прогерина. В настоящее изобретение также включены олигонуклеотиды любой одной или более SEQ ID NO: 3 или 4, которые содержат соответствующее количество катионных или других модифицированных связей, описанных в настоящем описании, например до около 1 на каждые 2-5 незаряженных связей, например около 4-5 на каждые 10 незаряженных связей, и которые содержат присоединенный к ним проникающий в клетку транспортный пептид, также описанный в настоящем описании.

Обозначение "РМО+" относится к фосфордиамидатным морфолиновым олигомерам, содержащим любое количество (1-пиперазино) фосфинилиденокси, (1-(4-(со-гуанидино-алканоил))-пиперазино)фосфинилиденокси связей (A2 и A3), описанным ранее (см., например, публикацию согласно РСТ WO 2008/036127, которая включена в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки).

Обозначение "РМО-Х" относится к описанным в настоящем описании фосфордиамидатным морфолиновым олигомерам, содержащим по меньшей мере одну (В) связь или по меньшей мере одну из описанных концевых модификаций, как описано в публикации согласно РСТ WO2011/150408 и публикации патента США US2012/0065169, которые включены в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки. Дополнительно используемые в настоящем описании фосфордиамидатные морфолиновые олигомеры РМО-Х могут быть найдены во временной заявке США № 61/561806, поданной 18 ноября 2011 г., которая включена в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки.

Группа "фосфорамидата" содержит атом фосфора с тремя присоединенными атомами кислорода и одним присоединенным атомом азота, тогда как группа "фосфордиамидата" содержит атом фосфора с двумя присоединенными атомами кислорода и двумя присоединенными атомами азота. В незаряженных или модифицированных межсубъединичных связях олигомеров, описанных в настоящем описании и в одновременно находящейся на рассмотрении временной заявке на патент США № 61/349783 и заявке на патент США № 11/801885, один атом азота всегда является боковым к цепи остова. Второй атом азота в фосфордиамидатной связи, как правило, представляет собой азот кольца в кольцевой морфолиновой структуре.

"Тиофосфорамидатные" или "тиофосфордиамидатные" связи представляют собой соответственно фосфорамидатные или фосфордиамидатные связи, в которых один атом кислорода, как правило боковой к остову кислород, замещен атомом серы.

"Межсубъединичная связь" относится к связи, соединяющей две морфолиновые субъединицы, например структура (I).

Термины "заряженный", "незаряженный", "катионный" и "анионный", используемые в настоящем описании, относятся к преобладающему состоянию химического фрагмента при почти нейтральном значении рН, например при около от 6 до 8. Например, данный термин может относиться к преобладающему состоянию химического фрагмента при физиологическом рН, а именно около 7,4.

В рамках изобретения термины "антисмысловой олигонуклеотид", "антисмысловой олигомер" или "олигонуклеотид" относятся к линейной последовательности нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, которые позволяют гибридизироваться нуклеотидным основаниям с последовательностью-мишенью в РНК за счет спаривания оснований по Уотсону-Крику с образованием в пределах последовательности-мишени гетеродуплекса олигомер:РНК. Термины "антисмысловой олигонуклеотид", "модифицированный антисмысловой олигонуклеотид", "антисмысловой олигомер", "олигомер" и "соединение" по отношению к олигомеру могут использоваться взаимозаменяемо. Циклические субъединицы могут основываться на рибозе или другом пентозном сахаре или в некоторых вариантах осуществления морфолиновой группе (см. ниже описание морфолиновых олигомеров).

Термин "олигонуклеотидный аналог" относится к олигонуклеотиду с

(i) модифицированной структурой остова, например остова, отличающегося от стандартной сложнотрифосфодиэфирной связи, встречающейся в природных олиго- и полинуклеотидах; и

(ii) необязательно модифицированными фрагментами сахаров, например морфолиновыми фрагментами вместо рибозных или дезоксирибозных фрагментов.

Олигонуклеотидные аналоги содержат основания, способные к образованию водородных связей путем спаривания оснований по Уотсону-Крику со стандартными полинуклеотидными основаниями, причем остов аналогов представляет основания таким образом, чтобы обеспечивать такое образование водородных связей специфическим по последовательностям способом между молекулой олигонуклеотидного аналога и основаниями в стандартном полинуклеотиде (например, одноцепочечной РНК или одноцепочечной ДНК). Примерами аналогов являются те, которые содержат по существу незаряженный, содержащий фосфор остов.

По существу незаряженный, содержащий фосфор остов в олигонуклеотидном аналоге представляет собой такой остов, в котором большинство субъединичных связей, например, между 50-100%, как правило по меньшей мере от 60 до 100%, или 75%, или 80% его связей, являются незаряженными и содержат один атом фосфора. Антисмысловые олигонуклеотиды и олигонуклеотидные аналоги могут содержать между около 8 и 40 субъединицами, как правило около 8-25 субъединиц, а предпочтительно около от 12 до 25 субъединиц (включая все целые числа и диапазоны между этими значениями). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды могут обладать точной комплементарностью последовательностей к последовательности-мишени или приблизительной комплементарностью, как определено ниже.

"Субъединица" олигонуклеотида относится к одной единице нуклеотида (или нуклеотидного аналога), содержащей фрагмент, спаривающийся с пуриновым или пиримидиновым основанием. Данный термин может относиться к единице нуклеотида с присоединенной межсубъединичной связью или без нее, хотя при упоминании "заряженной субъединицы", заряд обычно находится внутри межсубъединичной связи (например, фосфатная или тиофосфатная связь или катионная связь).

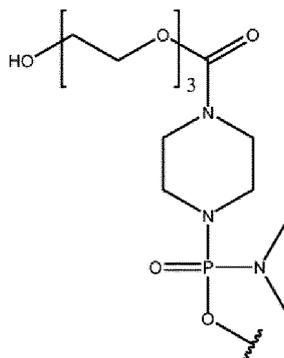
Фрагмент, спаривающийся с пуриновым или пиримидиновым основанием, называемый в настоящем описании также "нуклеотидное основание", "основание" или "основания", может быть аденином, цитозином, гуанином, урацилом, тимином или инозином. В настоящий документ также включены такие основания, как пиридин-4-он, пиридин-2-он, фенил, псевдоурацил, 2,4,6-триметоксибензол, 3-метилурацил, дигидроуридин, нафтил, аминофенил, 5-алкилцитидины (например, 5-метилцитидин), 5-алкилридины (например, риботимидин), 5-галогенуридин (например, 5-бромурин) или 6-азапиримидины или 6-алкилпиримидины (например, 6-метилуридин), пропин, квеозин, 2-тиоуридин, 4-тиоуридин, вибутозин, вибутоксозин, 4-ацетилтидин, 5-(карбоксихидроксиметил)уридин, 5'-карбоксиметиламинометил-2-тиоуридин, 5-карбоксиметиламинометилуридин, β -D-галактозилквеозин, 1-метиладенозин, 1-метилюридин, 2,2-диметилгуанозин, 3-метилцитидин, 2-метиладенозин, 2-метилгуанозин, N6-метиладенозин, 7-метилгуанозин, 5-метоксиаминометил-2-тиоуридин, 5-метиламинометилуридин, 5-метилкарбонилметилуридин, 5-метоксиуридин, 5-метил-2-тиоуридин, 2-метилтио-N6-изопентениладенозин, β -D-маннозилквеозин, уридин-5-оксиуксусная кислота, 2-тиоцитидин, производные треонина и другие (Burgin et al., 1996, Biochemistry, 35:14090; Uhlman & Reuman, выше). В этом аспекте под "модифицированными основаниями" понимают нуклеотидные основания, отличающиеся от аденина (A), гуанина (G), цитозина (C), тимина (T) и урацила (U), проиллюстрированных выше; такие основания можно применять в любом положении антисмысловой молекулы. Специалисты в данной области техники поймут, что в зависимости от применений олигомеров, T и U являются взаимозаменяемыми. К примеру, в случае других антисмысловых химических структур, таких как 2'-O-метил антисмысловые олигонуклеотиды, которые больше похожи на РНК, основания T могут быть показаны как U.

Термин "нацеливающая последовательность" представляет собой последовательность в олигомере или аналоге олигомера, которая является комплементарной (дополнительно означая по существу комплементарность) к "последовательности-мишени" в РНК-геноме. Комплементарной последовательности-мишени может быть целая последовательность антисмыслового олигомера или ее часть. Например, в олигомере с 20-30 основаниями около 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или 29 оснований могут представлять собой нацеливающие последовательности, которые ком-

плементарны целевой области. Как правило, нацеливающая последовательность образована из последовательных оснований в олигомере, но в альтернативном варианте может быть образована из непоследовательных последовательностей, которые при расположении рядом, например, на противоположных концах олигомера, составляет последовательность, которая охватывает последовательность-мишень.

"Нацеливающая последовательность" может быть "почти" или "по существу" комплементарной к последовательности-мишени и по-прежнему функционировать в целях задачи настоящего описания, а именно по-прежнему оставаться "комплементарной". Предпочтительно соединения аналогов олигомеров, примененных в настоящем описании, имеют самое большее одно несовпадение с последовательностью-мишенью на 10 нуклеотидов, а предпочтительно самое большее одно несовпадение на 20 нуклеотидов. В альтернативном варианте примененные антисмысловые олигомеры обладают по меньшей мере 90% идентичностью последовательности, а предпочтительно по меньшей мере 95% идентичностью последовательности, с примерами нацеливающих последовательностей, обозначенных в настоящем описании.

В рамках изобретения термины TEG, EG3 или "триэтиленгликолевый хвост" относятся к фрагментам триэтиленгликоля, конъюгированным с олигонуклеотидом, например, на его 3'- или 5'-конце. Например, в некоторых вариантах осуществления TEG включает фрагмент формулы



"Аминокислотная субъединица" или "аминокислотный остаток" может относиться к аминокислотному остатку (-CO-CHR-NH-) или β-или другому аминокислотному остатку (например, -CO-(CH₂)_nCHR-NH-), где R представляет собой боковую цепь (которая может включать атом водорода), а n составляет от 1 до 7, предпочтительно от 1 до 4.

Термин "аминокислота природного происхождения" относится к аминокислоте, присутствующей в обнаруженных в природе белках, такой как 20 (L)-аминокислот, используемых во время биосинтеза белков, а также другие, например 4-гидроксипролин, гидроксизин, десмозин, изодесмозин, гомоцистеин, цитруллин и орнитин. Термин "искусственные аминокислоты" относится к тем аминокислотам, которые отсутствуют в обнаруженных в природе белках, примеры включают бета-аланин (β-Ala), 6-аминогексановую кислоту (Ahx) и 6-аминопентановую кислоту. Дополнительные примеры "искусственных аминокислот" включают без ограничения (D)-аминокислоты, норлейцин, норвалин, п-фторфенилаланин, этионин и т.п., которые известны специалисту в данной области техники.

"Эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" относится к количеству терапевтического соединения, такого как антисмысловый олигомер, вводимый пациенту-млекопитающему либо в виде однократной дозы, либо в виде части ряда доз, который является эффективным для создания требуемого терапевтического действия (например, сенсбилизации раковой клетки к химиотерапевтическому средству). Для антисмыслового олигомера это действие обычно достигается ингибированием трансляции или естественного сплайсингового процессинга выбранной последовательности-мишени. "Эффективное количество", нацеленное против мРНК LMNA, также относится к количеству, эффективному для модуляции экспрессии прогерина.

Термином "улучшать" или "улучшенный", "увеличивать" или "увеличивающий" или "стимулировать" или "стимулирующий" в целом относится к способности одного из антисмысловых соединений или композиций продуцировать или вызывать в клетке более выраженный физиологический ответ (т.е. последующий каскад эффектов) по сравнению с ответом, вызванным либо в отсутствие антисмыслового соединения, либо контрольным соединением. "Увеличенное" или "улучшенное" значение, как правило, может быть "статистически значимым" значением и может включать увеличение, которое в 1,1; 1,2; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 15; 20; 30; 40; 50 или более раз (например, в 500, 1000 раз) (включая все целые числа и десятые значения между ними и больше 1), например 1,5; 1,6; 1,7; 1,8 и т.д.) больше значения, получаемого без антисмыслового соединения (в отсутствие агента) или с контрольным соединением.

Термин "снижать" или "ингибировать" может в целом относиться к способности одного или более антисмысловых соединений настоящего описания "уменьшать" соответствующий физиологический или клеточный ответ при измерении в соответствии с обычными методиками в диагностической сфере. Соответствующие физиологические или клеточные ответы (in vivo или in vitro) будут очевидны специали-

стам в данной области техники и могут включать, например, снижения в экспрессии прогерина при измерении по уровням мРНК и/или белка. "Уменьшение" в ответе может быть "статистически значимым" по сравнению с ответом, полученным без антисмыслового соединения или от 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% уменьшения, включая все целые числа между этими значениями.

Термин "последовательность-мишень" относится к части целевой РНК, против которой направлен олигонуклеотид или антисмысловый агент, а именно последовательность, с которой будет гибридизироваться комплементарная последовательность путем спаривания оснований по Уотсону-Крику. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень может быть непрерывной областью пре-мРНК, которая включает как интронную, так и экзонную последовательность-мишень. В некоторых других вариантах осуществления последовательность-мишень будет состоять исключительно из либо интронных, либо экзонных последовательностей.

Термин "нацеливающая последовательность" или "антисмысловая нацеливающая последовательность" относится к последовательности в олигонуклеотиде или другом антисмысловом агенте, который является комплементарным (дополнительно означая по существу комплементарный) к последовательности-мишени в РНК-геноме. Целая последовательность антисмыслового соединения или ее часть может быть комплементарной последовательности-мишени.

Например, в олигонуклеотиде с 20-30 основаниями около 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или 29 оснований могут представлять собой нацеливающие последовательности, которые комплементарны области-мишени. Как правило, нацеливающая последовательность образована из последовательных оснований, но в альтернативном варианте может быть образована из непоследовательных последовательностей, которые при расположении рядом, например, на противоположных концах олигонуклеотида, составляет последовательность, которая охватывает последовательность-мишень.

Последовательности-мишени и нацеливающие последовательности описаны как "комплементарные" одна другой, когда гибридизация происходит в антипараллельной конфигурации. "Нацеливающая последовательность" может быть "почти" или "по существу" комплементарной к последовательности-мишени и по-прежнему функционировать для задачи настоящего описания, а именно по-прежнему может оставаться функционально "комплементарной". В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может самое большее иметь одно несовпадение с последовательностью-мишенью на 10 нуклеотидов, а предпочтительно самое большее одно несовпадение на 20 нуклеотидов. В альтернативном варианте олигонуклеотид может обладать по меньшей мере 90% идентичностью последовательности, а предпочтительно по меньшей мере 95% идентичностью последовательности, с типовыми антисмысловыми нацеливающими последовательностями, описанными в настоящем описании.

Олигонуклеотид "специфически гибридизуется" с полинуклеотидом-мишенью, если данный олигомер гибридизуется с мишенью при физиологических условиях с T_m по существу более 45°C, предпочтительно по меньшей мере 50°C и, как правило, 60-80°C или больше. Такая гибридизация предпочтительно соответствует жестким условиям гибридизации. При данном значении ионной силы и pH, T_m представляет собой температуру, при которой 50% последовательности-мишени гибридизуется с комплементарным полинуклеотидом. Опять же такая гибридизация может происходить с "почти" или "по существу" комплементарной последовательностью антисмыслового олигомера к последовательности-мишени, а также с точно соответствующей комплементарной последовательностью.

"Гомология" относится к процентному значению числа аминокислот, которые идентичны консервативным заменам или составляют их. Гомологию можно определять с использованием программ для сравнения последовательностей, таких как GAP (Deveraux et al., 1984, *Nucleic Acids Research* 12, 387-395). Таким образом, последовательности аналогичной или по существу отличной длины по отношению к тем, которые приведены в настоящем описании, можно сравнивать путем вставки гэпов в процессе выравнивания, такие гэпы определяются, например, с помощью алгоритма сравнения, используемого GAP.

Термины "идентичность последовательности" или, например, включающие "последовательность на 50% идентичную к" в рамках изобретения относятся в той мере, что последовательности идентичны на основе сравнения нуклеотида с нуклеотидом или аминокислоты с аминокислотой в пределах окна сравнения. Таким образом, "процент идентичности последовательности" может быть вычислен путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в пределах окна сравнения, определения количества положений, в которых идентичное основание нуклеиновых кислот (например, A, T, C, G, I) или идентичный остаток аминокислоты (например, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gin, Cys и Met) присутствует в обеих последовательностях, для получения числа совпадающих положений, деления числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения (т.е. размер окна) и умножения результата на 100 для получения процента идентичности последовательности.

Термины, используемые для описания взаимосвязей последовательностей между двумя или более полинуклеотидами или полипептидами, включают "эталонную последовательность", "окно сравнения",

"идентичность последовательности", "процент идентичности последовательности" и "по существу идентичная". "Эталонная последовательность" имеет длину по меньшей мере 8 или 10, но чаще от 15 до 18, и чаще по меньшей мере 25 мономерных единиц, включая нуклеотиды и аминокислотные остатки. Поскольку из двух полинуклеотидов каждый может содержать (1) последовательность (т.е. только часть полной полинуклеотидной последовательности), которая одинакова для обоих полинуклеотидов, и (2) последовательность, которая различна для обоих полинуклеотидов, сравнения последовательностей между двумя (или более) полинуклеотидами, как правило, выполняют путем сравнения последовательностей обоих полинуклеотидов по "окну сравнения" для идентификации и сравнения локальных областей сходства последовательностей. "Окно сравнения" относится к концептуальному сегменту из по меньшей мере 6 последовательных положений, обычно от около 50 до около 100, чаще от около 100 до около 150, в которых последовательность сравнивается с эталонной последовательностью с таким же количеством последовательных положений после оптимального выравнивания двух последовательностей. Для оптимального выравнивания двух последовательностей окно сравнения может содержать добавления или делеции (т.е. гэпы) в количестве около 20% или меньше по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит добавления или делеции).

Для выравнивания в окне сравнения оптимальное выравнивание последовательностей можно проводить путем компьютеризированных реализаций алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, выпуск 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, г. Мадисон, штат Висконсин, США) или проверкой и наилучшим выравниванием (т.е. приводящим к наибольшему проценту гомологии по окну сравнения), полученным любым из различных выбранных методов. Можно также сделать ссылку на семейство программ BLAST, например, описанных Altschul et al., 1997, Nucl. Acids Res., 25:3389. Подробное обсуждение вопроса анализа последовательностей можно найти в разделе 19.3 Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Inc., 1994-1998, Chapter 15.

"Устойчивая к нуклеазам" олигомерная молекула (олигомер) относится к молекуле, чей остов по существу устойчив к расщеплению нуклеазами в негибридизированной или гибридизированной форме, под действием внеклеточных и внутриклеточных нуклеаз в организме, а именно олигомер демонстрирует незначительное расщепление нуклеазами или его отсутствие в нормальных для нуклеаз условиях в организме, в который вводится олигомер.

Агент является "активно поглощаемым клетками млекопитающих", когда данный агент может войти в клетку через клеточную мембрану с помощью механизма, отличающегося от пассивной диффузии. Агент может транспортироваться, например, посредством "активного транспорта", который относится к переносу агентов через клеточную мембрану млекопитающих с помощью, например, АТФ-зависимого механизма транспорта или с помощью "облегченного транспорта", который относится к переносу антисмысловых агентов через клеточную мембрану механизмом транспорта, требующим связывания агента с транспортным белком, который затем способствует прохождению связанного агента через мембрану. И для активного, и для облегченного транспорта аналоги олигонуклеотидов предпочтительно обладают по существу незаряженным остовом, как определено ниже.

"Гетеродуплекс" относится к дуплексу между антисмысловым олигонуклеотидом и комплементарной частью целевой РНК. "Устойчивый к нуклеазам гетеродуплекс" относится к гетеродуплексу, образованному связыванием антисмыслового олигомера со своей комплементарной мишенью, так что гетеродуплекс является по существу устойчивым к деградации *in vivo* под действием внутриклеточных и внеклеточных нуклеаз, таких как РНКазы H, способная к разрезанию двухцепочечных комплексов РНК/РНК или ДНК/ДНК.

В рамках изобретения термин "жидкость организма" охватывает множество типов образцов, получаемых у пациента, включающих мочу, слюну, плазму, кровь, спинномозговую жидкость или другие образцы биологического происхождения, такие как клетки кожи или дермальный дебрис, и может относиться к клеткам или фрагментам клеток, суспендированных в образцах, или жидкой среде и ее растворенным веществам.

Термин "относительное количество" используют, когда выполняют сравнение между исследуемым измерением и контрольным измерением. Относительное количество реактива, образующего комплекс в реакции, представляет собой количество, вступающее в реакцию с исследуемым образцом, по сравнению с количеством, вступающим в реакцию с контрольным образцом. Контрольный образец может анализироваться отдельно в том же анализе, или он может составлять часть того же образца (например, нормальной ткани, окружающей злокачественную область в разрезе ткани).

"Лечение" индивида или клетки представляет собой тип вмешательства, обеспечиваемого в качестве средства для изменения у индивида или в клетке естественного течения заболевания или патологии. Лечение включает, но не ограничивается введением, например, фармацевтической композиции, и может выполняться либо профилактически, либо после возникновения патологического события или контакта с этиологическим агентом. Лечение включает любое желательное воздействие на симптомы или патологию заболевания или состояния, связанного с воспалением, среди прочих описанных в настоящем описании.

В настоящее описание также включены "профилактические" виды лечения, которые направлены на снижение скорости прогрессирования заболевания или состояния, подлежащего лечению, задержку проявления такого заболевания или состояния или снижение тяжести их проявлений. "Лечение" или "профилактика" не обязательно указывает на полное искоренение, излечение или предупреждение заболевания или состояния или связанных с ними симптомов.

Ген или продукт гена дикого типа является таким, который чаще всего наблюдается в популяции и, таким образом, произвольно выбран "нормальной" формой или формой "дикого типа" гена.

Нацеливание на LMNA.

Примеры включают антисмысловые олигонуклеотиды, которые нацеливаются на SEQ ID NO: 1 и/или 2, обсуждаемые ниже.

Определенные антисмысловые олигонуклеотиды могут содержать нацеливающую последовательность, которая комплементарна одному или более оснований экзона 11 в гене LMNA человека, включая в себя последовательность дикого типа (SEQ ID NO: 1) и/или последовательность, обнаруженную у пациента с HGPS, как показано в SEQ ID NO: 2. Эти последовательности-мишени показаны ниже в табл. 1.

Таблица 1

Примеры последовательностей-мишеней LMNA

Название	последовательности	SEQ ID NO:
LMNA, экзон 11	GGCTCCCAGTGCAGCAGCTCGGGGGACCCCGCTGA GTACAACCTGCGCTCGCGCACCGTGCTGTGCGGGA CCTGCGGGCAGCCTGCCGACAAGGCATCTGCCAGC GGCTCAGGAGCCAGGTGGGGCGGACCCATCTCCTC TGGCTCTTCTGCCTCCAGTGTACCGGTCACTCGCA GCTACCGCAGTGTGGGGGGCAGTGGGGGTGGCAGC TTCCGGGGACAATCTGGTCACCCGCTCCTACCTCCT GGGCAACTCCAGCCCCCGAACCCAG	1
HGPS, экзон 11	GGCTCCCAGTGCAGCAGCTCGGGGGACCCCGCTGA GTACAACCTGCGCTCGCGCACCGTGCTGTGCGGGA CCTGCGGGCAGCCTGCCGACAAGGCATCTGCCAGC GGCTCAGGAGCCAGGTGGGGTGGACCCATCTCCTC TGGCTCTTCTGCCTCCAGTGTACCGGTCACTCGCA GCTACCGCAGTGTGGGGGGCAGTGGGGGTGGCAGC TTCCGGGGACAATCTGGTCACCCGCTCCTACCTCCT GGGCAACTCCAGCCCCCGAACCCAG	2

Примеры включают антисмысловые олигонуклеотиды, которые полностью комплементарны с LMNA, экзон 11 (SEQ ID NO: 1 или 2), включая в себя также комплементарные криптическому сайту сплайсинга LMNA, экзон 11, подчеркнутый в SEQ ID NO: 1 и 2 в табл. 1 (например, CAGGTGGGGC/T).

В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности между последовательностью-мишенью и антисмысловой нацеливающей последовательностью оказывается достаточной для образования стабильного дуплекса. Область комплементарности антисмысловых олигомеров внутри целевой РНК-последовательности может составлять в длину всего лишь 8-11 оснований, но предпочтительно составляет 12-15 оснований или больше, например 12-20 оснований, 12-25 или 15-25 оснований, включая все целые числа и диапазоны между этими диапазонами значений. Антисмысловый олигомер из около 14-15 оснований в целом оказывается достаточно длинным для содержания уникальной комплементарной последовательности целевой мРНК. В некоторых вариантах осуществления может требоваться минимальная длина комплементарных оснований для достижения необходимого значения T_m связывания, обсуждаемого ниже.

В некоторых вариантах осуществления могут подходить олигомеры длиной 40 оснований, в которых по меньшей мере минимальное количество оснований, например 10-12 оснований, являются комплементарными по отношению к последовательности-мишени. Однако в целом облегченное или активное поглощение клетками оптимизировано при значениях длины олигомеров менее около 30. Для олигомеров РМО, дополнительно описанных ниже, оптимальный баланс между стабильностью связывания и поглощением обычно достигается при длинах 18-30 оснований. В настоящее описание включены антисмысловые олигомеры (например, ПНК, ЗНК, 2'-ОМе, МОЕ, РМО), которые состоят из около 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 оснований, в которых по меньшей мере около 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 последовательных и/или непоследовательных оснований комплементарны последовательности-мишени, описанной в настоящем описании, включая в себя последовательности-мишени SEQ ID NO: 1 и/или 2, или их варианты.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигомеры могут быть на 100% комплементарными нуклеотидной последовательности-мишени пре-мРНК LMNA или они могут включать несовпадения, например для учета вариантов, поскольку гетеродуплекс, образованный между олигомером и последовательностью-мишенью, является достаточно стабильным для противодействия воздействию клеточных нуклеаз и других механизмов деградации или перестановки, которые могут происходить *in vivo*. Олигомерные остовы, которые менее чувствительны к расщеплению нуклеазами, обсуждаются ниже.

Несовпадения при наличии являются менее дестабилизирующими при смещении к концевым областям гибридного дуплекса, чем в его середине. Количество допустимых несовпадений будет зависеть от длины олигомера, процентного содержания пар оснований G:C в дуплексе и положения несовпадения(ий) в дуплексе в соответствии с хорошо понятными принципами стабильности дуплексов. Хотя такой антисмысловый олигомер не обязательно является на 100% комплементарным последовательности-мишени, он является эффективным для стабильного и специфического связывания с последовательностью-мишенью, так что модулируется биологическая активность нуклеотидной мишени, например экспрессии прогеринового(ых) белка(ов).

В некоторых вариантах осуществления, как с олигомерами РМО, антисмысловую активность олигомера можно усиливать путем использования смеси незаряженных и катионных фосфордиамидатных связей. Общее количество катионных связей в олигомере может варьировать от 1 до 10 (включая все целые числа между ними) и быть рассеянным по всему олигомеру. Предпочтительно количество заряженных связей составляет по меньшей мере 2 и не более половины общего количества связей остова, например, в пределах 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 положительно заряженных связей, а предпочтительно каждая заряженная связь разделена вдоль остова по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 незаряженными связями.

Примеры антисмысловых последовательностей для нацеливания на пре-мРНК LMNA человека показаны ниже в табл. 2. Антисмысловые олигонуклеотиды могут содержать все или часть этих нацеливающих последовательностей.

Таблица 2

Примеры HGPS-нацеливающих последовательностей*

Название последовательности	Нацеливающая последовательность 5' - 3'	SEQ ID NO:
Пр11-1	CTGAGCCGCTGGCAGATGCCTTGTC	3
Пр11-2	GAGGAGATGGGTCCACCCACCTGGG	4

Антисмысловые олигонуклеотидные соединения.

Антисмысловые олигонуклеотиды согласно настоящему описанию, как правило,

(a) обладают способностью активно поглощаться клетками млекопитающих, и

(b) сразу после поглощения образовывать дуплекс с целевой РНК с T_m больше около 45°C.

В некоторых вариантах осуществления олигомерный остов может по существу быть незаряженным, а предпочтительно может распознаваться как субстрат для активного или облегченного транспорта через клеточную мембрану. Способность олигомера образовывать стабильный дуплекс с целевой РНК может также относиться к другим особенностям олигомерного остова, включая длину и степень комплементарности антисмыслового олигомера применительно к мишени, соотношение G:C к A:T комплементарных оснований и положений любых некомплементарных оснований.

Способность антисмыслового олигомера противостоять клеточным нуклеазам может способствовать сохранению агента и его максимальной доставке в клеточную цитоплазму.

В антисмысловых олигомерах можно применять разнообразные антисмысловые химические структуры. Примеры олигомерных химических структур включают, без ограничений, фосфорамидатные морфолиновые олигомеры и фосфордиамидатные морфолиновые олигомеры (РМО), тиофосфатные модифицированные олигомеры, 2'-О-метил модифицированные олигомеры, пептидо-нуклеиновую кислоту (ПНК), закрытую нуклеиновую кислоту (ЗНК), тиофосфатные олигомеры, 2'-О-МОЕ модифицированные олигомеры, 2'-фтор-модифицированный олигомер, нуклеиновые кислоты с 2',4'-C-этиленовым мостиком (ЭНК), трицикло-ДНК, трицикло-ДНК-тиофосфатные нуклеотиды, 2'-O-[2-(N-метилкарбамоил)этил]модифицированные олигомеры, морфолиновые олигомеры, пептидконъюгированные фосфорамидатные морфолиновые олигомеры (РРМО), фосфордиамидатные морфолиновые олигомеры с атомом фосфора с (i) ковалентными связями с атомом азота морфолинового кольца и (ii) второй ковалентной связью с (1,4-пиперазин)-1-ильным заместителем или с замещенным (1,4-пиперазин)-1-илом (РМО-плюс), и фосфордиамидатные морфолиновые олигомеры с атомом фосфора с (i) ковалентной связью с атомом азота морфолинового кольца и (ii) второй ковалентной связью с атомом азота кольца 4-аминопиперидин-1-ила (т.е. APN) или производным химических структур 4-аминопиперидин-1-ила (РМО-X), включая комбинации любых из вышеуказанных. В целом в химических структурах ПНК и ЗНК можно применять более короткие нацеливающие последовательности из-за их относительно высокой силы связывания мишени относительно РМО и 2'-О-Ме модифицированных олигомеров. Тиофосфатные и 2'-О-Ме-модифицированные химические структуры можно объединять с образованием 2'-О-Ме-тиофосфатного остова. См., например, публикации согласно РСТ № WO 2013/112053 и WO 2009/008725, которые тем самым включены в настоящее описание полном объеме посредством ссылки.

В некоторых случаях такие антисмысловые олигомеры, как РМО, можно конъюгировать с проникающими в клетки пептидами (СПП) для облегчения внутриклеточной доставки. Пептидконъюгированные РМО называют РРМО и в некоторых вариантах осуществления они включают опи-

санные в публикации согласно РСТ № WO 2012/150960, включенной в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления можно применять последовательность богатого аргинином пептида, конъюгированную или связанную, например, с 3'-терминальным концом антисмыслового олигомера, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления можно применять последовательность богатого аргинином пептида, конъюгированную или связанную, например, с 5'-терминальным концом антисмыслового олигомера, как описано в настоящем описании.

1. Пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК).

Пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК) представляют собой аналоги ДНК, в которой остов является структурно гомоморфным дезоксирибозному остову, состоящему из единиц N-(2-аминоэтил)глицина, к которым присоединены пиримидиновые или пуриновые основания. ПНК, содержащие естественные пиримидиновые или пуриновые основания, гибридизируются с комплементарными олигомерами, подчиняясь правилам Уотсона-Крика для спаривания оснований, и имитируя ДНК в понимании распознавания оснований пар нуклеотидов (Egholm, Buchardt et al., 1993). Остов ПНК формируется пептидными связями вместо фосфодиэфирных связей, делая его хорошо подходящим для антисмысловых применений (см. структуру ниже). Остов является незаряженным, приводя к получению дуплексов ПНК/ДНК или ПНК/РНК, проявляющих термическую стабильность выше нормальной. ПНК не распознаются нуклеазами или протеазами. Неограничивающий пример ПНК показан ниже.



ПНК

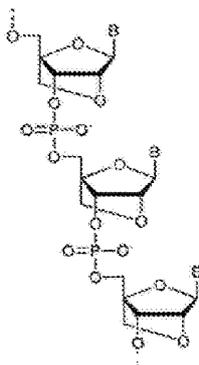
Несмотря на радикальное структурное изменение в природной структуре, ПНК способны к специфическому по последовательности связыванию в спиральной форме с образованием ДНК или РНК. Характеристики ПНК включают высокую аффинность связывания с комплементарной ДНК или РНК, дестабилизирующий эффект, вызванный однонуклеотидным несовпадением, устойчивость к нуклеазам и протеазам, гибридизацию с ДНК и РНК независимо от концентрации солей и образование триплекса-структуры с гомопуриновой ДНК. PANAGENE™ разработали свои патентованные Bts-мономеры ПНК (Bts; бензотриазол-2-сульфонильная группа) и патентованный способ олигомеризации. Олигомеризация ПНК с использованием Bts-мономеров ПНК состоит из повторяющихся циклов снятия защиты, соединения и эпирирования. ПНК можно получать синтезом с применением любой методики, известной из уровня техники. См., например, патенты США № 6969766, 7211668, 7022851, 7125994, 7145006 и 7179896. См. также патенты США № 5539082, 5714331 и 5719262 в отношении получения ПНК. Дальнейшие идеи о соединениях ПНК можно найти в Nielsen et al., Science, 254:1497-1500, 1991. Каждый из вышеуказанных источников полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

2. Закрытые нуклеиновые кислоты (ЗНК).

Антисмысловые олигомерные соединения также могут содержать субъединицы "закрытой нуклеиновой кислоты" (ЗНК). ЗНК представляют собой представителя класса модификаций, названных мостиковой нуклеиновой кислотой (МНК).

МНК характеризуются ковалентной связью, которая закрывает конформацию рибозного кольца в С30-эндо (северном) непланарном положении сахаридного фрагмента. У ЗНК мостик состоит из метилена между положениями 2'-О и 4'-С. ЗНК усиливают предварительную организацию остова и стэкинг оснований для улучшения гибридизации и термической стабильности.

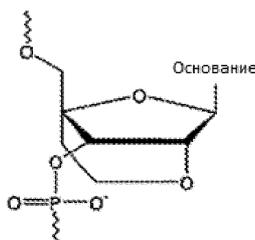
Структуры ЗНК можно найти, например, в Wengel, et al., Chemical Communications, 1998, 455; Tetrahedron, 1998, 54:3607; и Accounts of Chem. Research, 1999, 32:301; Obika, et al., Tetrahedron Letters, 1997, 38:8735; 1998, 39:5401; и Bioorganic Medicinal Chemistry, 2008, 16:9230, которые тем самым включены в полном объеме посредством ссылки. Неограничивающий пример ЗНК показан ниже.



ЗНК

Соединения согласно настоящему описанию могут включать одну или более ЗНК; в некоторых случаях соединения могут целиком состоять из ЗНК. Способы синтеза отдельных нуклеозидных субъединиц ЗНК и их включение в олигомеры описаны, например, в патентах США № 7572582, 7569575, 7084125, 7060809, 7053207, 7034133, 6794499 и 6670461, каждый из которых включен в полном объеме посредством ссылки. Типичные межсубъединичные линкеры включают фосфодиэфирные и тиофосфатные фрагменты; в альтернативном варианте можно применять не содержащие фосфор линкеры. Дополнительные варианты осуществления включают ЗНК, содержащие соединение, в котором каждая субъединица ЗНК отделена субъединицей ДНК. Определенные соединения составлены из чередующихся субъединиц ЗНК и ДНК, в которых межсубъединичный линкер представляет собой тиофосфат.

Другим представителем класса МНК являются нуклеиновые кислоты с 2'О,4'С-этиленовым мостиком (ЭНК). Неограничивающий пример показан ниже.

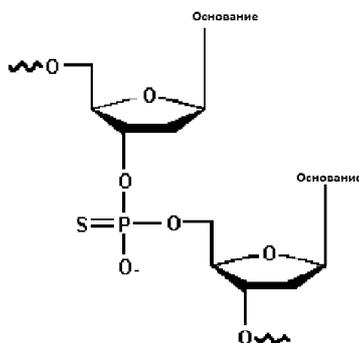


ЭНК

Олигомеры ЭНК и их получение описаны в Obika et al., *Tetrahedron Lett*, 38(50):8735, которая тем самым включена в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки. Соединения описания могут включать одну или более субъединиц ЭНК.

3. Тиофосфаты.

"Тиофосфаты" (или S-олигомеры) представляют собой вариант нормальной ДНК, в которой один из немостиковых атомов кислорода заменен атомом серы. Неограничивающий пример тиофосфата показан ниже.



Сульфуризация межнуклеотидной связи снижает действие эндо-и экзонуклеаз, включая эндонуклеазу POL 1, действующую в направлении от 5' до 3' и от 3' до 5' ДНК, нуклеазы S1 и P1, РНКазы, нуклеазы сыворотки и фосфодиэстеразу змеиного яда. Тиофосфаты получают двумя основными путями: действием раствора элементарной серы в дисульфиде углерода на гидрофосфонат или методом сульфуризации сложных триэфиров фосфитов либо с дисульфидом тетраэтилтиурама (TETD), либо 3Н-1,2-бензодитиол-3-он 1,1-диоксидом (BDTD) (см., например, Iyer et al., *J. Org. Chem.*, 55, 4693-4699, 1990, которая тем самым включена в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки). В последних методах устраняется проблема с нерастворимостью элементарной серы в большинстве органических рас-

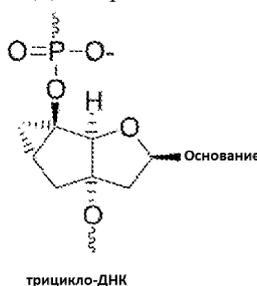
творителей и токсичностью дисульфида углерода. Методы TETD и BDTD также обеспечивают высокую чистоту тиофосфатов.

4. Трицикло-ДНК и трицикло-тиофосфатные нуклеотиды.

Трицикло-ДНК (тц-ДНК) представляют собой класс стерически затрудненных аналогов ДНК, в которых каждый нуклеотид модифицирован введением циклопропанового кольца для ограничения конформационной гибкости остова с целью оптимизации геометрии остова по торсионному углу γ . Содержащие гомооснования аденина и тимина тц-ДНК образуют чрезвычайно стабильные пары оснований А-Т с комплементарными РНК. Трицикло-ДНК и их синтез описаны в публикации заявки на патент согласно РСТ № WO 2010/115993, которая тем самым включена в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки. Соединения описания могут включать одну или более трицикло-ДНК; в некоторых случаях соединения могут целиком состоять из нуклеотидов трицикло-ДНК.

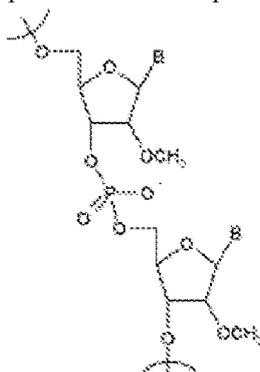
Трицикло-тиофосфатные нуклеотиды представляют собой трицикло-ДНК нуклеотиды с тиофосфатными межсубъединичными связями. Трицикло-тиофосфатные нуклеотиды и их синтез описаны в публикации заявки на патент согласно РСТ № WO 2013/053928, которая тем самым включена в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки. Соединения описания могут включать один или более трицикло-ДНК нуклеотидов; в некоторых случаях соединения могут целиком состоять из трицикло-ДНК нуклеотидов.

Неограничивающий пример трицикло-ДНК/трицикло-тиофосфатного нуклеотида показан ниже.

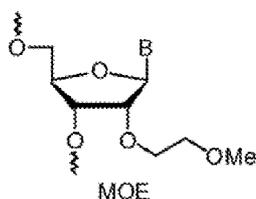


5. 2'-О-метил, 2'-О-МОЕ и 2'-F олигомеры.

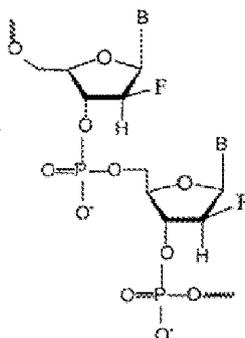
Молекулы "2'-О-Ме олигомера" несут метильную группу на остатке 2'-ОН молекулы рибозы. 2'-О-Ме-РНК демонстрируют такое же (или сходное поведение, что и ДНК, но защищены от деградации нуклеазами. 2'-О-Ме-РНК также можно комбинировать с тиофосфатными олигомерами (РТО) для дополнительной стабилизации. 2'-О-Ме олигомеры (сложный фосфодиэфир или тиофосфат) можно синтезировать в соответствии с обычными методиками уровня техники (см., например, Yoo et al., *Nucleic Acids Res.*, 32:2008-16, 2004, которая тем самым включена в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки. Неограничивающий пример 2'-О-Ме олигомера показан ниже.



2'-О-Ме олигомер может также содержать тиофосфатную связь (2'-О-Ме тиофосфатные олигомеры). 2'-О-метоксиэтил олигомеры (2'-О МОЕ), как и 2'-О-Ме олигомеры, несут метоксиэтильную группу на остатке 2'-ОН молекулы рибозы и обсуждаются в Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 78, 486-504, 1995, которая тем самым включена в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки. Неограничивающий пример 2'-О-МОЕ нуклеотида показан ниже.



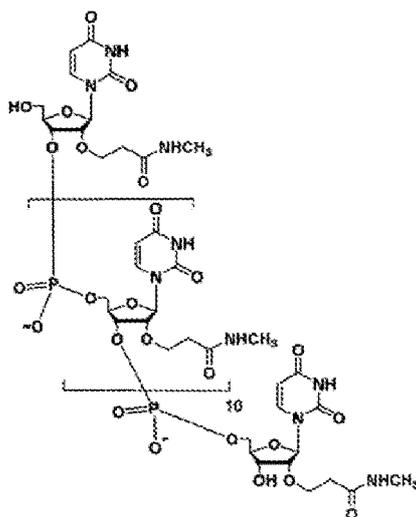
В отличие от предыдущих алкилированных производных 2'-ОН рибозы, 2'-фторолигомеры содержат в положении 2' радикал фтора вместо 2'-ОН. Неограничивающий пример 2'-F олигомера о показан ниже.



2'-Фторолигомеры дополнительно описаны в публикации заявки согласно РСТ № WO 2004/043977, которая тем самым включена в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки.

Соединения описания могут включать одну или более субъединиц 2'-О-метил, 2'-О-МОЕ и 2'-F и могут использовать любую из межсубъединичных связей, описанных в настоящем описании. В некоторых случаях соединение описания может полностью состоять из субъединиц 2'-О-Метил, 2'-О-МОЕ или 2'-F. Один вариант осуществления соединения согласно настоящему описанию полностью состоит из субъединиц 2'-О-Метил.

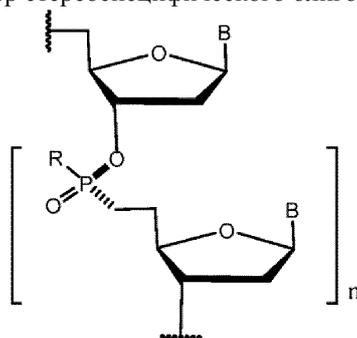
6. 2'-О-[2-(N-метилкарбамоил)этил] олигонуклеотиды (МСЕ) МСЕ представляют собой другой пример 2'-О модифицированных рибонуклеозидов, подходящих в качестве соединений настоящего описания. В данном случае 2'-ОН группа дериватизирована до фрагмента 2-(N-метилкарбамоил)этила для увеличения устойчивости к действию нуклеаз. Неограничивающий пример МСЕ-олигомера показан ниже.



МСЕ и их синтез описаны в Yamada et al., J. Org. Chem., 76(9): 3042-53, которая тем самым включена в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки. Соединения описания могут включать одну или более МСЕ-субъединиц.

7. Стереоспецифические олигомеры.

Стереоспецифические олигомеры, в которых стереохимическая структура каждой фосфоросодержащей связи корректируется методом синтеза таким образом, что по существу получают чистый один олигомер. Неограничивающий пример стереоспецифического олигомера показан ниже.



В вышеприведенном примере каждый атом фосфора олигомера имеет одинаковую стереохимическую структуру. Дополнительные примеры включают олигомеры, описанные выше. Например, ЗНК,

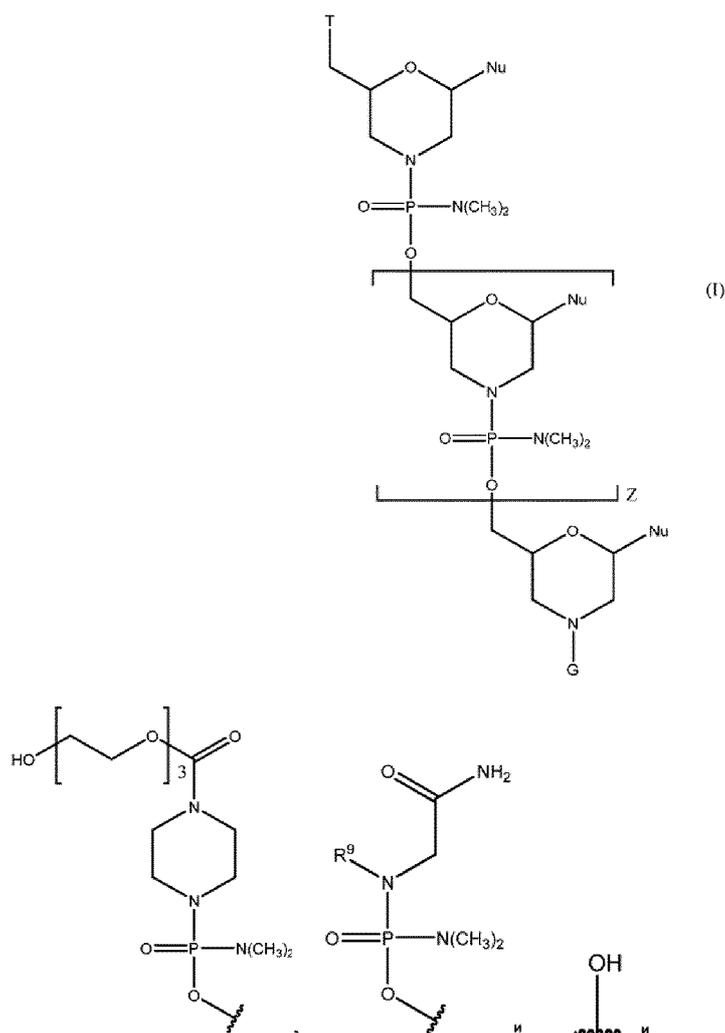
ЭНК, трицикло-ДНК, МСЕ, 2'О-метил, 2'О-МОЕ, 2'-F и морфолиновые олигомеры можно получать со стереоспецифическими фосфорсодержащими межнуклеозидными связями, такими как, например, тиофосфат, сложный фосфодизфир, фосфорамидат, фосфордиамидат и другие фосфорсодержащие межнуклеозидные связи. Стереоспецифические олигомеры, способы получения, хиральноуправляемый синтез, хиральное конструирование и хиральные вспомогательные вещества, используемые при приготовлении таких олигомеров подробно описаны, например, в публикации заявок согласно РСТ № WO 2015/107425, WO 2015/108048, WO 2015/108046, WO 2015/108047, WO 2012/039448, WO 2010/064146, WO 2011/034072, WO 2014/010250, WO 2014/012081, WO 2013/0127858 и WO 2011/005761, которые тем самым включены в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки.

8. Морфолиновые олигомеры.

Морфолиновые олигомеры основаны на олигомере, содержащем морфолиновые субъединицы, удерживающие нуклеотидное основание и, вместо рибозы, содержат морфолиновое кольцо. Примеры межнуклеозидных связей включают, например, фосфорамидатные или фосфордиамидатные межнуклеозидные связи, соединяющие атом азота морфолинового кольца одной морфолиновой субъединицы с 4'-экзоциклическим атомом углерода соседней морфолиновой субъединицей. Каждая морфолиновая субъединица содержит пуриновое или пиримидиновое нуклеотидное основание, эффективное для связывания путем образования специфических для оснований водородных связей с основанием в олигонуклеотиде.

Морфолиновые олигомеры (включая антисмысловые олигомеры) и их синтез подробно описаны, например, в патентах США № 5698685, 5217866, 5142047, 5034506, 5166315, 5185444, 5521063, 5506337; и заявке на патент США № 12/271036, 12/271040; и публикациях согласно РСТ № WO 2009/064471 и WO 2012/043730; и Summerton et al., 1997, *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*, 7:187-195, которые тем самым включены в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки. Внутри олигомерной структуры фосфатные группы обычно обозначают как образующие "межнуклеозидные связи" олигомера. Межнуклеозидная связь природного происхождения РНК и ДНК представляет собой фосфодизфирную связь от 3' до 5' конца. Группа "фосфорамидата" содержит атомы фосфора с тремя присоединенными атомами кислорода и одним присоединенным атомом азота, тогда как группа "фосфордиамидата" содержит атомы фосфора с двумя присоединенными атомами кислорода и двумя присоединенными атомами азота. В незаряженных или катионных межсубъединичных связях морфолиновых олигомеров, описанных в настоящем описании, один атом азота всегда является боковым к цепи остова. Второй атом азота в связи фосфордиамидата, как правило, представляет собой атом азота кольца в кольцевой морфолиновой структуре. РМО-Х относится к фосфордиамидатным морфолиновым олигомерам с атомами фосфора с (i) ковалентной связью с атомом азота морфолинового кольца, и (ii) второй ковалентной связью с атомом азота кольца 4-аминопиперидин-1-ила (т.е. APN) или производного 4-аминопиперидин-1-ила. Примеры олигомеров РМО-Х дополнительно описаны в публикации заявки согласно № РСТ/US 2011/38459 и публикации согласно РСТ № WO 2013/074834, которые тем самым включены в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки. РМО-Х включает РМО-арп или APN, которые относятся к олигомеру РМО-Х, содержащему по меньшей мере одну межнуклеозидную связь, в которой атом фосфора связан с морфолиновой группой и с азотом кольца 4-аминопиперидин-1-ила (т.е. APN). В конкретных вариантах осуществления антисмысловой олигомер, содержащий нацеливающую последовательность, как указано в табл. 2, содержит по меньшей мере одну APN-содержащую связь или содержащую APN-производную связь. Различные варианты осуществления включают морфолиновые олигомеры, которые содержат около 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% содержащих APN/APN-производные связи, причем оставшиеся связи (если менее 100%) являются незаряженными связями, например, около или по меньшей мере около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 из всех межнуклеозидных связей являются содержащими APN/APN-производные связями.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер представляет собой соединение формулы (I)



G представляет собой проникающий в клетку пептид (CPP) и линкерный фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления G выбран из $C(O)(CH_2)_5NH-CPP-R^a$, $-C(O)(CH_2)_2NH-CPP-R^a$,

$-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-CPP-R^a$, $-C(O)CH_2NH-CPP-R^a$ и

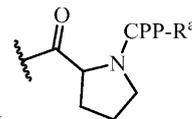
где CPP присоединен к линкерному фрагменту амидной связью в карбоксильном конце CPP, а R^a представляет собой фрагмент, присоединенный к R^a аминоконца CPP амидной связью, где R^a выбран из H, ацетила, бензоила и стеарила.

В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил. В некоторых вариантах осуществления CPP выбран из SEQ ID NO: 5-21. В некоторых вариантах осуществления G выбран из SEQ ID NO: 22-25. В некоторых вариантах осуществления CPP выбран из SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления G представляет собой SEQ ID NO: 25.

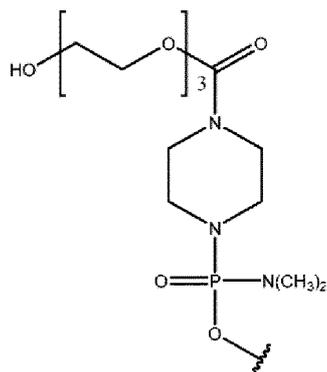
В некоторых вариантах осуществления G выбран из $-C(O)CH_2NH-CPP-R^a$ и

где CPP присоединен к линкерному фрагменту амидной связью в карбоксильном конце CPP, а R^a присоединен к аминоконцу CPP амидной связью, где R^a выбран из H, ацетила, бензоила и стеарила, а CPP выбран из SEQ ID NO: 5-21.

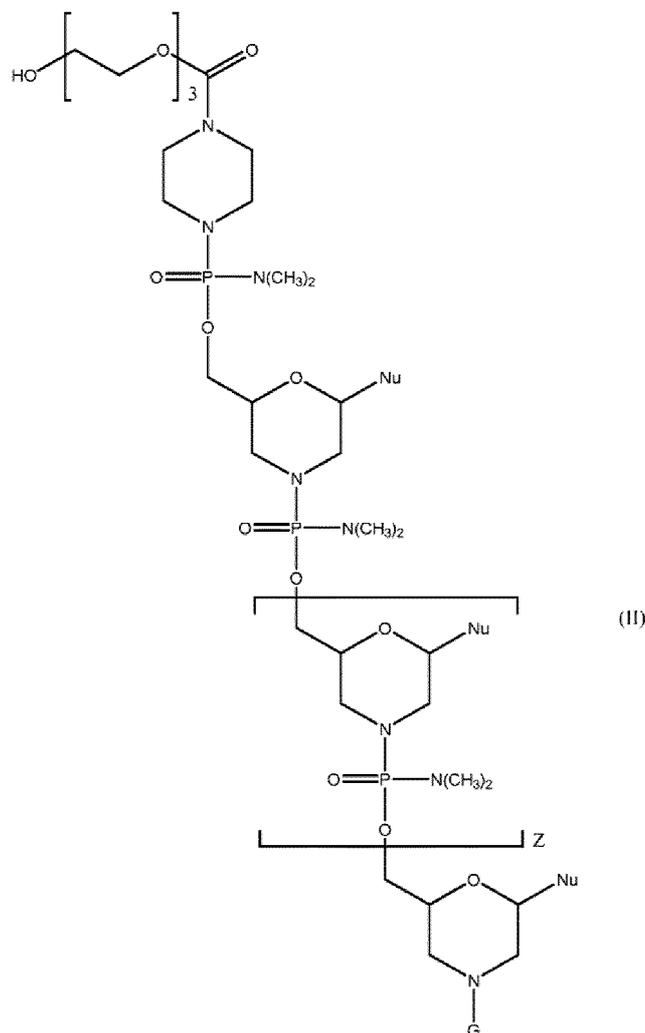
В некоторых вариантах осуществления CPP выбран из SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.



В некоторых вариантах осуществления Т представляет собой



В различных аспектах антисмысловой олигонуклеотид согласно настоящему описанию включает соединение формулы (II)



или его фармацевтически приемлемую соль,
где каждый Nu представляет собой нуклеотидное основание, которые вместе образуют нацеливающую последовательность;

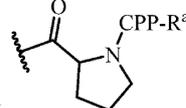
Z представляет собой целое число от 8 до 38; а

G представляет собой проникающий в клетку пептид (CPP) и линкерный фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления G выбран из C(O)(CH₂)₅NH-CPP-R^a, -C(O)(CH₂)₂NH-CPP-R^a,

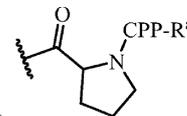
-C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH-CPP-R^a, -C(O)CH₂NH-CPP-R^a и

где CPP присоединен к линкерному фрагменту амидной связью в карбоксильном конце CPP, а



R^a представляет собой фрагмент, присоединенный к R^a аминоконца CPP амидной связью, где R^a выбран из H, ацетила, бензоила и стеарила.

В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил. В некоторых вариантах осуществления CPP выбран из SEQ ID NO: 5-21. В некоторых вариантах осуществления G выбран из SEQ ID NO: 22-25. В некоторых вариантах осуществления CPP выбран из SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления G представляет собой SEQ ID NO: 25.



В некоторых вариантах осуществления G выбран из $-C(O)CH_2NH-CPP-R^a$ и где CPP присоединен к линкерному фрагменту амидной связью в карбоксильном конце CPP, а R^a присоединен к аминоконцу CPP амидной связью, где R^a выбран из H, ацетила, бензоила и стеарила, а CPP выбран из SEQ ID NO: 5-21.

В некоторых вариантах осуществления CPP выбран из SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления G выбран из SEQ ID NO: 24 или 25. В некоторых вариантах осуществления G представляет собой SEQ ID NO: 25.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность антисмысловых олигомеров настоящего описания, включающая, например, некоторые варианты осуществления антисмысловых олигомеров формулы (I) и (II), выбрана из

- SEQ ID NO: 3 (CTGAGCCGCTGGCAGATGCCTTGTC), где Z равно 23; и
- SEQ ID NO: 4 (GAGGAGATGGGTCCACCCACCTGGG), где Z равно 23.

Пептидные транспортеры.

CPP и конъюгаты богатого аргинином пептида и РМО (РРМО).

В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид конъюгирован с проникающим в клетку пептидом (называемым в настоящем описании как CPP). В некоторых вариантах осуществления CPP представляет собой богатый аргинином пептид. Термин "богатый аргинином" относится к CPP с по меньшей мере 2, а предпочтительно 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аргининовыми остатками, каждый необязательно отделен одним или более незаряженными гидрофобными остатками, и необязательно содержащий около 6-14 аминокислотных остатков. Как объясняется ниже, CPP предпочтительно связан в своем карбоксильном конце с 3'- и/или 5'-концом антисмыслового олигонуклеотида посредством линкера, который также может быть одной или более аминокислотами, и предпочтительно также кэпирован в своем аминоконце заместительным R^a , причем R^a выбран из H, ацетила, бензоила или стеарила. В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

Таблица 3

Примеры CPP (SEQ ID NO: 5-21) и комбинаций CPP фрагментов линкеров (SEQ ID NO:22-25)

Название (назначение)	Последовательность	SEQ ID NO.
rTAT	RRRQRRKKR	5
Tat	RKKRRQRRR	6
R ₉ F ₂	RRRRRRRRRFF	7
R ₅ F ₂ R ₄	RRRRRFFRRRR	8
R ₄	RRRR	9
R ₅	RRRRR	10
R ₆	RRRRR	11
R ₇	RRRRRR	12
R ₈	RRRRRRR	13
R ₉	RRRRRRRR	14

(RX) ₈	RXRXRXRXRXRXRXRX	15
(RXR) ₄	RXRXRXRXRXRX	16
(RXR) ₅	RXRXRXRXRXRXRXRX	17
(RXRRBR) ₂	RXRRBRRXRRBR	18
(RAR) ₄ F ₂	RARRARRARRARFF	19
(RGR) ₄ F ₂	RGRRGRRGRGRGFF	20
(RFF) ₃ R	RFFRFFRFFR	21
(RXR) ₄ XB	RXRXRXRXRXRXXB	22
(RFF) ₃ RXB	RFFRFFRFFRXB	23
(RFF) ₃ RG	RFFRFFRFFRG	24
R ₆ G	RRRRRRG	25

X представляет собой 6-аминогексановую кислоту;

V представляет собой β-аланин;

F представляет собой фенилаланин;

G представляет собой глицин;

R представляет собой аргинин;

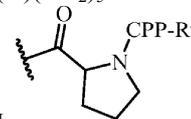
Q представляет собой глутамин;

K представляет собой лизин.

Каждая из SEQ ID NO: 5-25 может дополнительно содержать группу R^a, присоединенную к аминоконцу, где R^a выбран из H, ацетила, бензоила и стеароида. В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

CPP, их синтез и способы конъюгации с олигомером дополнительно описаны в публикации заявки на патент США № 2012/0289457 и публикациях заявок на патенты согласно PCT № WO 2004/097017, WO 2009/005793 и WO 2012/150960, описания которых включены в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки.

В различных вариантах осуществления G (указанный в формулах (I) и (II)), G представляет собой проникающий в клетку пептид (CPP) и линкерный фрагмент, выбранный из -C(O)(CH₂)₅NH-CPP-R^a,

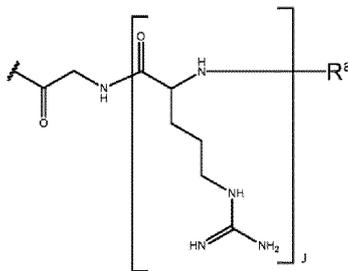


C(O)(CH₂)₂NH-CPP-R^a, -C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH-CPP-R^a, -C(O)CH₂NH-CPP-R^a и

где CPP присоединен к линкерному фрагменту амидной связью в карбоксильном конце CPP, а

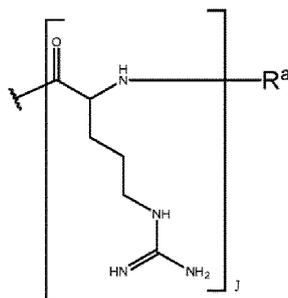
R^a представляет собой фрагмент, присоединенный к R^a аминоконцу CPP амидной связью, где R^a выбран из H, ацетила, бензоила и стеароида. В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил. В некоторых вариантах осуществления CPP содержит или выбран из SEQ ID NO: 5-21. В некоторых вариантах осуществления G содержит или выбран из SEQ ID NO: 22-25. В некоторых вариантах осуществления CPP представляет собой SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления G представляет собой SEQ ID NO: 25.

В некоторых вариантах осуществления G (как отмечено в формулах (I) и (II)) представлен формулой



где R^a выбран из H, ацетила, бензоила и стеароида, а J представляет собой целое число от 4 до 9. В некоторых вариантах осуществления J равно 6.

В различных вариантах осуществления CPP-R^a (как отмечено в формулах (I) и (II)) представлен формулой

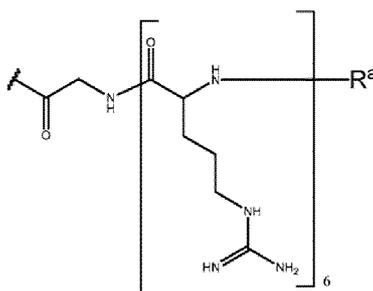


где R^a выбран из H, ацетила, бензоила и стеарила, а J представляет собой целое число от 4 до 9.

В некоторых вариантах осуществления CPP представляет собой SEQ ID NO: 11. В различных вариантах осуществления J равно 6. В некоторых вариантах осуществления R^a выбран из H и ацетила. Например, в некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой H. В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

В некоторых вариантах осуществления G содержит или выбран из SEQ ID NO: 22-25. В некоторых вариантах осуществления G представляет собой SEQ ID NO: 25.

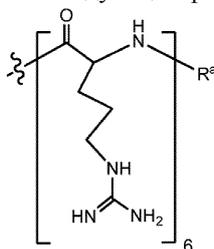
В некоторых вариантах осуществления, включая, например, бессмысловые олигомеры формул (I) и (II), G представляет собой -C(O)CH₂NH-R₆-R^a, ковалентно связанный с бессмысловым олигомером настоящего описания в 3'-конце олигомера, где R^a представляет собой H, ацетил, бензоил или стеариол, для кэпирования аминоконца R₆. В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил. В неограничивающих примерах CPP представляет собой -R₆-R^a, а линкер представляет собой C(O)CH₂NH- (т.е. глицин). Данный конкретный пример G=-C(O)CH₂NH-R₆-R^a также иллюстрируется следующей структурой:



где R^a выбран из H, ацетила, бензоила и стеарила.

В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

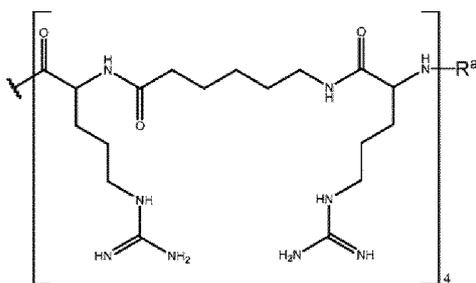
В различных вариантах осуществления CPP-R^a представляет собой -R₆-R^a, где CPP представляет собой SEQ ID NO: 11, что также иллюстрируется следующей формулой



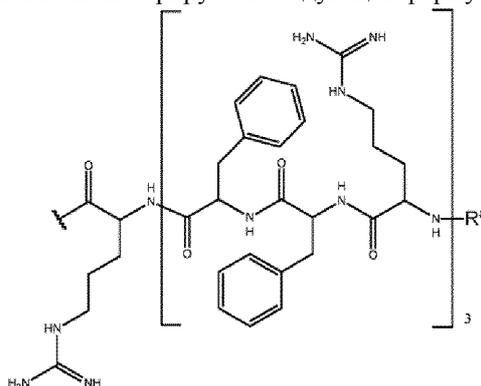
где R^a выбран из H, ацетила, бензоила и стеарила.

В некоторых вариантах осуществления CPP представляет собой SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

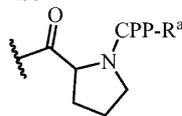
В некоторых вариантах осуществления CPP-R^a представляет собой формулу -(RXR)₄-R^a, где CPP представляет собой SEQ ID NO: 16, что также иллюстрируется следующей формулой:



В различных вариантах осуществления CPP-R^a представляет собой -R-(FFR)₃-R^a, где CPP представляет собой SEQ ID NO: 21, что также иллюстрируется следующей формулой:

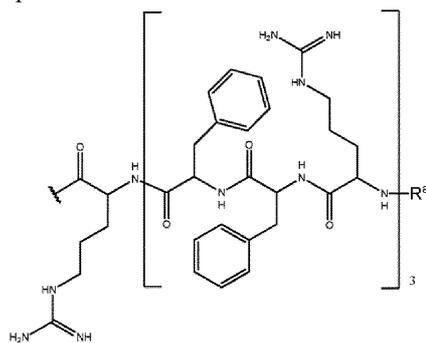


В различных вариантах осуществления G представляет собой проникающий в клетку пептид (CPP) и фрагмент линкера, выбранный из -C(O)(CH₂)₅NH-CPP-R^a, -C(O)(CH₂)₂NH-CPP-R^a,

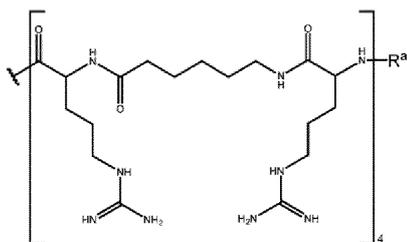


-C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH-CPP-R^a, -C(O)CH₂NH-CPP-R^a и

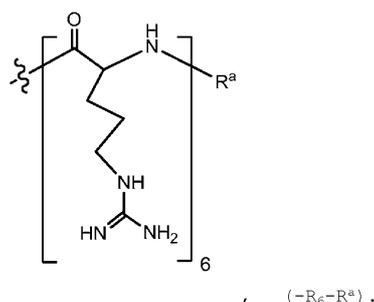
где CPP присоединен к линкерному фрагменту амидной связью в карбоксильном конце CPP, а R^a присоединен к аминоконцу CPP амидной связью, где R^a выбран из H, ацетила, бензоила и стеарила и где CPP-R^a выбран из



, (-R-(FFR)₃-R^a),

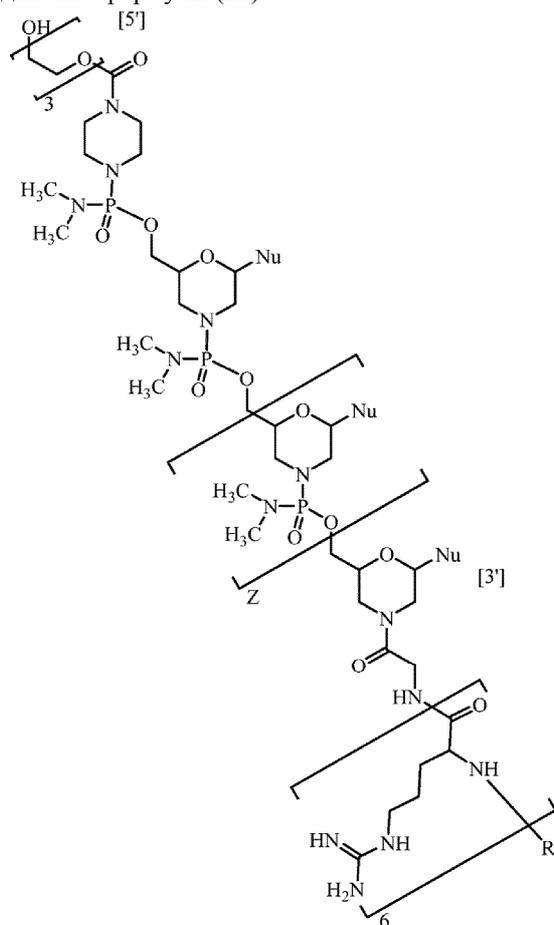


, (- (RXR)₄-R^a), или



В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

Дополнительно в некоторых вариантах осуществления, антисмысловой олигомер согласно описанию представляет собой соединение формулы (III)



(III)

или его фармацевтически приемлемую соль, где каждый Nu представляет собой нуклеотидное основание, которые взятые вместе образуют нацеливающую последовательность (от 5' до 3'), выбранную из

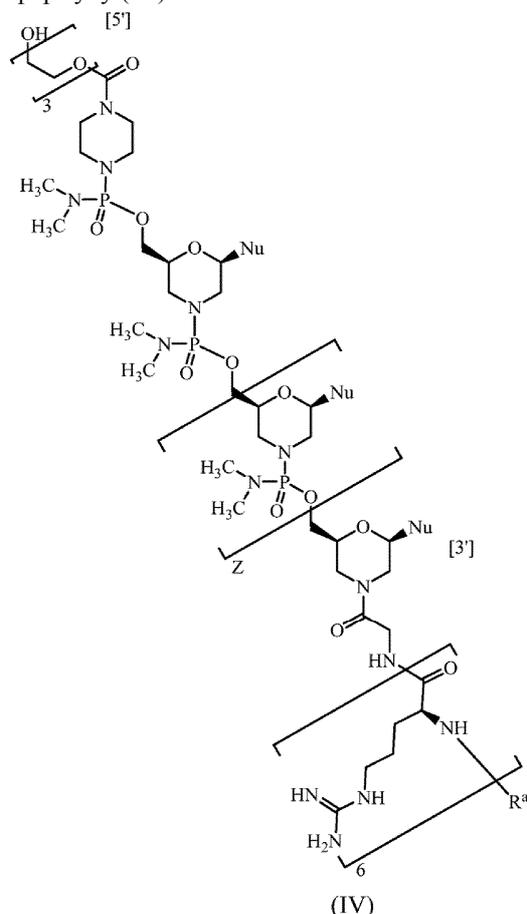
а) SEQ ID NO: 3 (CTGAGCCGCTGGCAGATGCCTTGTC), где Z равно 23; и

б) SEQ ID NO: 4 (GAGGAGATGGGTCCACCCACCTGGG), где Z равно 23; а

R^a выбран из H, ацетила, бензоила и стеарила.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 3 (CTGAGCCGCTGGCAGATGCCTTGTC), а Z равно 23. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4 (GAGGAGATGGGTCCACCCACCTGGG), а Z равно 23. В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигомеры по описанию включают, например, некоторые варианты осуществления антисмысловых олигомеров формулы (III), причем антисмысловый олигомер может иметь формулу (IV)



или его фармацевтически приемлемую соль, где каждый Nu представляет собой нуклеотидное основание, которые взятые вместе образуют нацеливающую последовательность (от 5' до 3') выбранную из

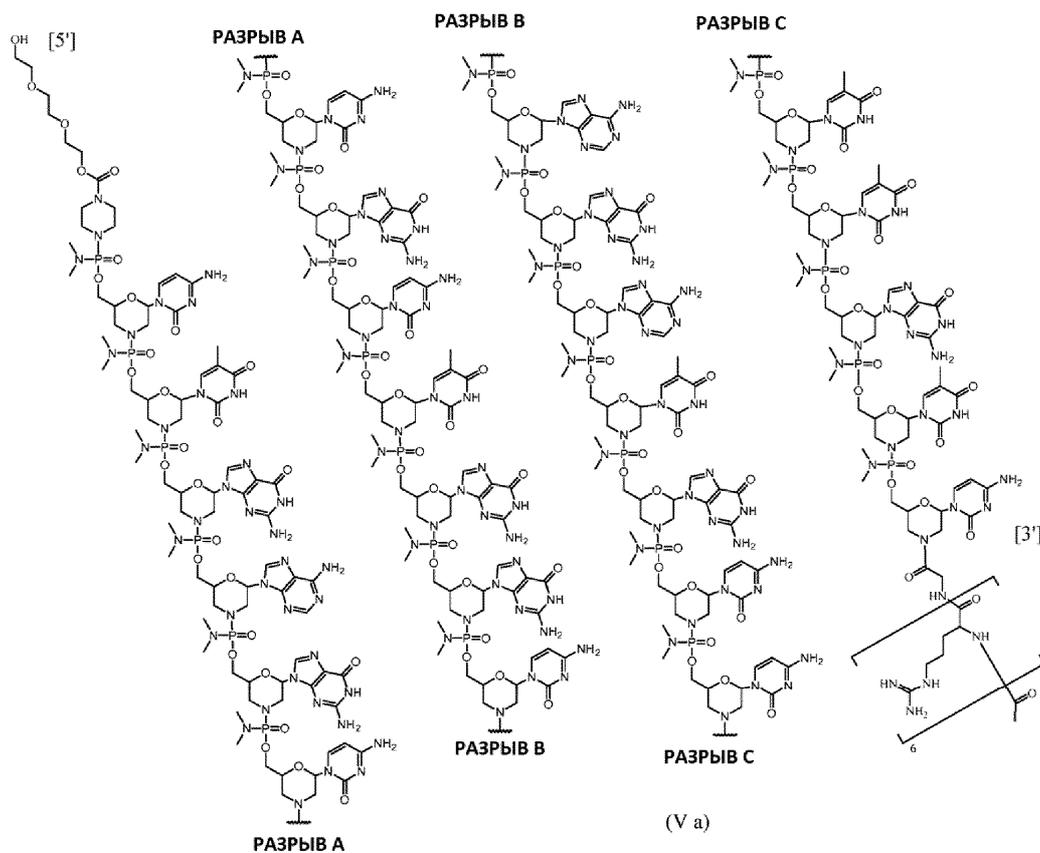
- a) SEQ ID NO: 3 (CTGAGCCGCTGGCAGATGCCTTGTC), где Z равно 23; и
- b) SEQ ID NO: 4 (GAGGAGATGGGTCCACCCACCTGGG), где Z равно 23; а

R^a выбран из H, ацетила, бензоила и стеарила.

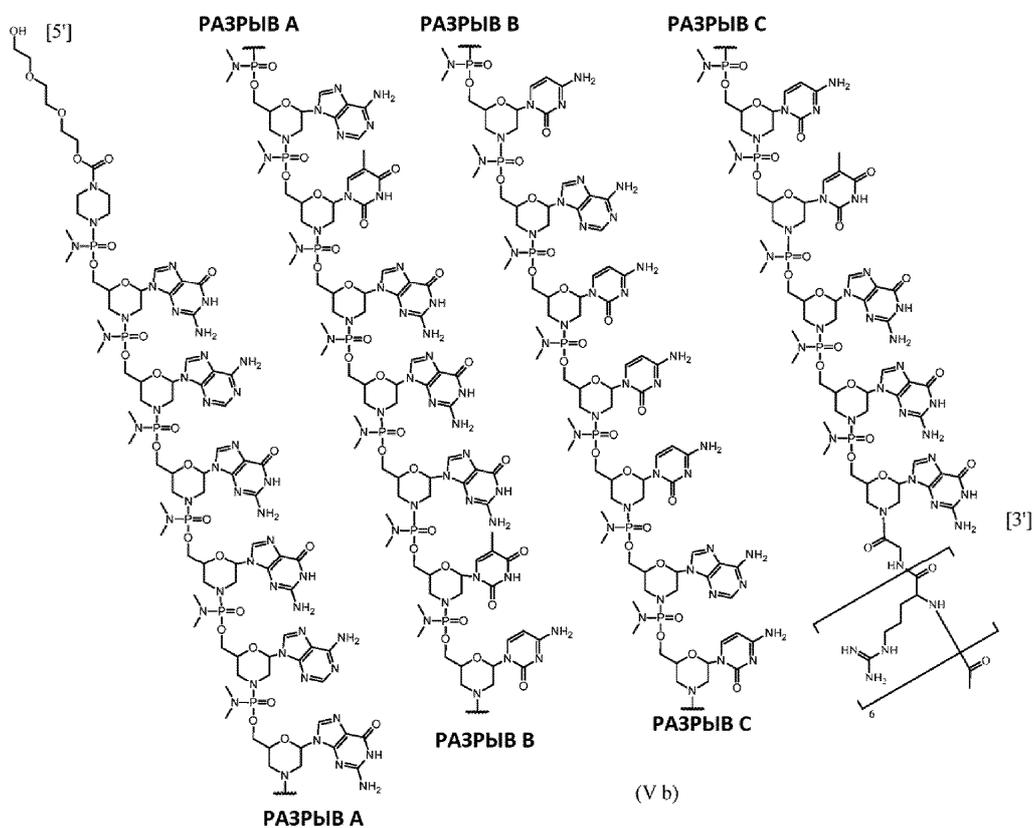
В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 3 (CTGAGCCGCTGGCAGATGCCTTGTC), а Z равно 23. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4 (GAGGAGATGGGTCCACCCACCTGGG), а Z равно 23. В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

В некоторых вариантах осуществления соединение антисмыслового олигомера формулы (III) представляет собой формулу (IV), в которой нацеливающая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 3 (CTGAGCCGCTGGCAGATGCCTTGTC), а Z равно 23. В некоторых вариантах осуществления соединения антисмыслового олигомера формулы (III) представляет собой формулу (IV), в которой нацеливающая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4 (GAGGAGATGGGTCCACCCACCTGGG), а Z равно 23.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер представляет собой соединение формулы (V) или его фармацевтически приемлемую соль, выбранные из



И

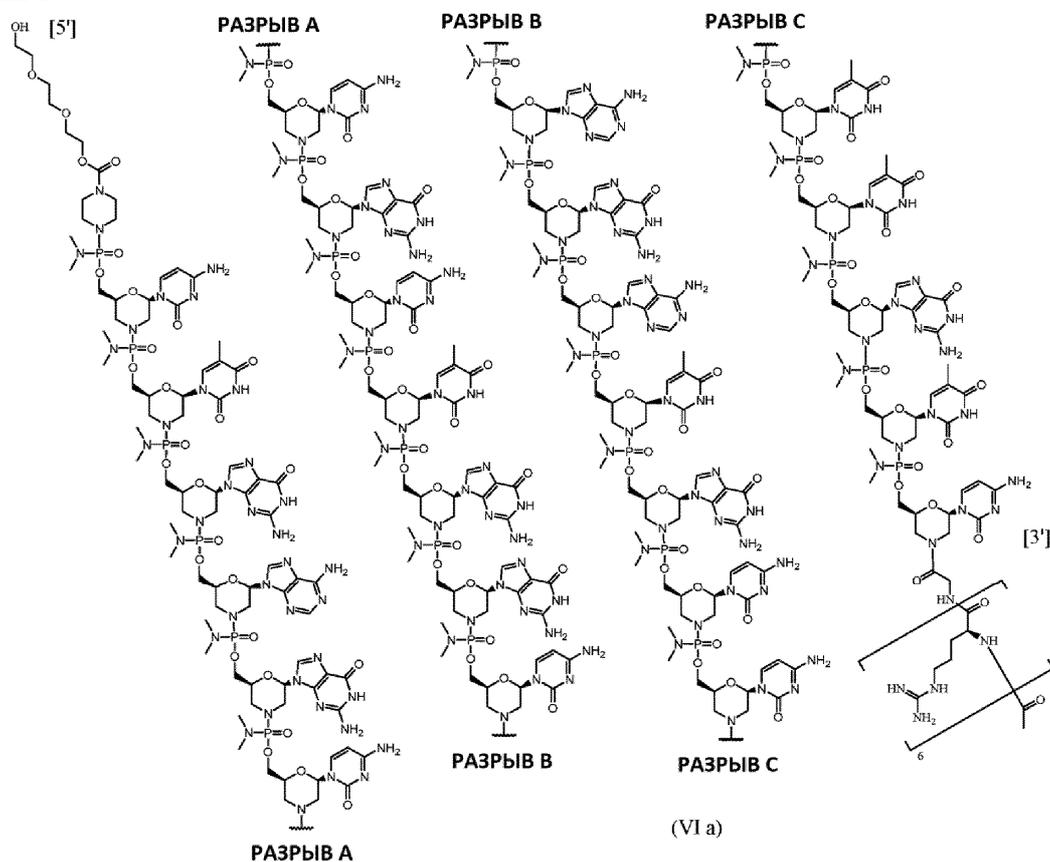


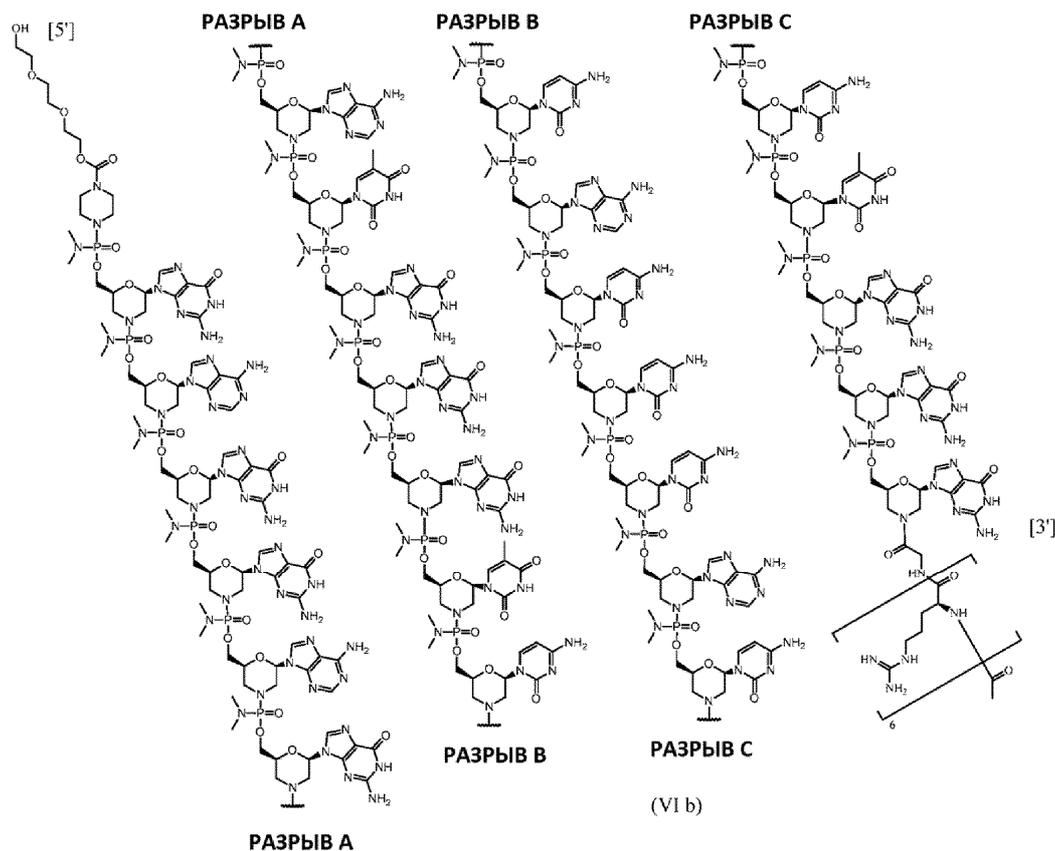
В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (V) представляет собой формулу (Va). В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (V) представ-

ляет собой формулу (Vb).

В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер согласно описанию, включающий, например, соединение формулы (III), формулы (IV), формулы (V), формулы (Va) и формулы (Vb), представляет собой фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль представляет собой соль HCl (хлористоводородной кислоты). Например, в некоторых вариантах осуществления соединение формулы (III) представляет собой соль HCl. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (III) представляет собой соль, содержащую 0,6 HCl. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (IV) представляет собой соль HCl. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (IV) представляет собой соль, содержащую 0,6 HCl. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (V) представляет собой соль HCl. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (V) представляет собой соль, содержащую 0,6 HCl. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (Va) представляет собой соль HCl. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (Va) представляет собой соль, содержащую 0,6 HCl. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (Vb) представляет собой соль HCl. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (Vb) представляет собой соль, содержащую 0,6 HCl.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигомеры по описанию включают, например, некоторые варианты осуществления антисмысловых олигомеров формулы (V), причем антисмысловые олигомеры могут иметь формулу (VI) (или быть их фармацевтически приемлемой солью) и быть выбраны из





В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (VI) представляет собой формулу (VIa). В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (VI) представляет собой формулу (VIb). В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (V) представляет собой формулу (VIa). В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (V) представляет собой формулу (VIb).

В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер согласно описанию, включающий, например, соединение формулы (VI), формулы (VIa) и формулы (VIb), представляет собой фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль представляет собой соль HCl (хлористоводородной кислоты). Например, в некоторых вариантах осуществления соединения формулы (VI) представляет собой соль HCl. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (VI) представляет собой соль, содержащую 0,6 HCl. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (VIa) представляет собой соль HCl. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (VIa) представляет собой соль, содержащую 0,6 HCl. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (VIb) представляет собой соль HCl. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (VIb) представляет собой соль, содержащую 0,6 HCl.

Для ясности структурная формула антисмысловых олигомеров с формулами (V) и (VI) представляет собой непрерывную структурную формулу от 5' до 3', и для облегчения иллюстрирования всей структурной формулы в компактной форме, формулы представлены в настоящем описании с различными проиллюстрированными разрывами, обозначенными "РАЗРЫВ А", "РАЗРЫВ В" и "РАЗРЫВ С". Специалист в данной области понимает, что, например, каждое указание "РАЗРЫВ А" показывает продолжение иллюстрации структурной формулы в этих точках. Такое же утверждение справедливо для каждого случая указания "РАЗРЫВ В" и "РАЗРЫВ С" в структурной формуле антисмысловых олигомеров формул (V) и (VI). Ни один из описанных выше или использованных в настоящем описании проиллюстрированных разрывов не предназначен ни для указания, ни для понимания специалистом в данной области как обозначения прерывания структурной формулы антисмысловых олигомеров формул (V) и (VI). Способы применения и фармацевтические композиции Настоящее описание относится к способам лечения у пациента прогероидных заболеваний, таких как ламинопатии и сходные заболевания или состояния, путем введения антисмыслового олигонуклеотида, описанного в настоящем описании, и фармацевтической композиции, содержащей такие олигонуклеотиды, причем олигонуклеотид ингибирует экспрессию мРНК мутантного белка LMNA путем модуляции сплайсинга пре-мРНК LMNA. В некоторых аспектах, например в этих и сходных способах, можно применять лечение прогероидных ламинопатии в клинических условиях, в которых экспрессия прогерина связана с таким заболеванием, как HGPS. Эти и сходные варианты осуществления также можно комбинировать со способами лечения или уменьшения прогероидных ламинопатий, путем последовательного или параллельного проведения способов согласно

настоящему изобретению с другим лечением.

Описанные в настоящем описании результаты можно распространять на процесс старения и сходные состояния и заболевания, помимо прогероидных ламинопатий. Это возможно благодаря тому, что HGPS во многих отношениях близко связана с процессами естественного старения. HGPS продолжает рассматриваться как подходящая модель старения (Fosell, J., *Pediatr Endocrinol Metab* 13 Suppl, 6:1477-1481, 2000). Например, связь с атеросклерозом является очень сильной, особенно для коронарных артерий. В дополнение к этому, алопеция при HGPS сходна с той, которая наблюдается у пациентов в преклонном возрасте. Дополнительно первичным клеточным признаком HGPS, как описано много лет назад авторами Hayflick и другими (Hayflick, N., *Engl. J. Med.*, 295:1302-1308, 1976), является раннее клеточное старение. Ограниченное число делений клеток у фибробластов при HGPS сходно тому, которое наблюдается у фибробластов, полученных от пожилых индивидов. Этот факт дополнительно изучали при исследовании, показавшем сходства в профилях экспрессии генов фибробластов при HGPS и полученных у пожилых людей фибробластов, которые отличались от полученных у молодых людей фибробластов (Ly et al., *Science*, 287:2486-2492, 2000).

Соответственно понятно, что способ лечения прогероидного заболевания или сходного состояния, описанного в настоящем описании, может включать лечение прогероидной ламинопатии, такой как HGPS, или другого прогероидного заболевания или состояния, связанного со старением состояния, сердечно-сосудистого заболевания или состояния (такого как атеросклероз) и т.п.

Понятно, что эффективная схема лечения *in vivo*, применяющая способы изобретения, может варьировать в соответствии с длительностью, дозой, частотой и путем введения олигонуклеотида, а также состояния пациента, подлежащего лечению (т.е. профилактическое лечение по сравнению с введением в ответ на существующее состояние). Соответственно такая терапия *in vivo* часто будет требовать мониторинг посредством тестов, соответствующих конкретному типу заболевания, подлежащего лечению, и соответствующих корректировок дозы или схемы лечения с целью достижения оптимального терапевтического результата.

В некоторых вариантах осуществления в способах согласно настоящему изобретению используют составы или композиции, подходящие для терапевтической доставки антисмысловых олигомеров, как описано в настоящем описании. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления, в способах согласно настоящему изобретению используют фармацевтически приемлемые композиции, которые содержат терапевтически эффективное количество одного или более из олигомеров или агентов, описанных в настоящем описании, составленных вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями (добавками) и/или разбавителями.

Хотя для олигомера согласно настоящему изобретению возможно самостоятельное введение, предпочтительно вводить это соединение в виде фармацевтического состава (композиции).

Способы доставки молекул нуклеиновых кислот описаны, например, в Akhtar et al., 1992, *Trends Cell Bio.*, 2:139; и *Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics*, ed. Akhtar; Sullivan et al., публикации заявки согласно РСТ № WO 94/02595. Для доставки практически любой молекулы нуклеиновых кислот, включая выделенные олигомеры согласно настоящему изобретению, можно использовать эти и другие протоколы.

Как подробно описано ниже, используемые в способах согласно настоящему изобретению фармацевтические композиции можно специально получать для введения в твердой или жидкой форме, включая адаптированные композиции для следующего:

(1) пероральное введение, например, кисели (водные или неводные растворы или суспензии), таблетки, например предназначенные для буккальной, сублингвальной и системной абсорбции, болусы, порошки, гранулы, пасты для нанесения на язык;

(2) парентеральное введение, например, подкожной, внутримышечной, внутривенной или эпидуральной инъекцией, например в виде стерильного раствора или суспензии или состава замедленного высвобождения;

(3) местное нанесение, например в виде крема, мази, или пластыря или спрея с контролируемым высвобождением, наносимых на кожу;

(4) вагинально или ректально, например в виде пессария, крема или пены;

(5) сублингвально;

(6) через глаза;

(7) трансдермально; или

(8) назально.

Фраза "фармацевтически приемлемый" используется в настоящем описании для обозначения таких соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые в рамках рационального медицинского решения, являются подходящими для применения в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соразмерно разумному соотношению пользы/риска.

Фраза "фармацевтически приемлемый носитель", в рамках изобретения, означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такие как жидкий или твердый наполнитель, разбави-

тель, вспомогательное вещество, технологическую добавку (например, смазывающее вещество, тальк, стеарат магния, кальция или цинка, или стеариновую кислоту), или растворяющийся инкапсулирующий материал, вовлеченный в доставку или транспортировку исследуемого соединения из одного органа или части организма в другой орган или часть организма. Каждый носитель должен быть "приемлемым" в смысле совместимости с другими ингредиентами состава и безвредности для пациента.

Некоторые примеры веществ, которые могут служить фармацевтически приемлемыми носителями, включают без ограничений

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

Дополнительные неограничивающие примеры средств, пригодных для составления с антисмысловыми олигомерами согласно настоящему изобретению включают конъюгированные с ПЭГ нуклеиновые кислоты, конъюгированные с фосфолипидами нуклеиновые кислоты, содержащие липофильные фрагменты нуклеиновые кислоты, тиофосфаты, Р-гликопротеиновые ингибиторы (такие как Плюроник Р85), которые могут усиливать проникновение лекарственных средств в различные ткани; биоразлагаемые полимеры, такие как поли(DL-лактид-когликоид), микросферы для замедленного высвобождения после имплантации (Emerich, DF et al., 1999, *Cell Transplant*, 8, 47-58) Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.; и нагруженные наночастицы, такие как частицы, изготовленные из полибутилцианоакрилата, которые могут доставлять лекарственные средства через гемэнцефалический барьер головного мозга и могут изменять механизмы поглощения нейронами (*Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 23, 941-949, 1999).

Для способов согласно настоящему изобретению также характерно применение композиции, включающей липосому с модифицированной поверхностью, содержащей поли(этиленгликоль) липиды (ПЭГ-модифицированные, разветвленные и неразветвленные или их комбинации, или длительно пребывающие в кровотоке липосомы или стэкс-липосомы). Олигомеры согласно настоящему изобретению также могут включать ковалентно присоединенные молекулы ПЭГ различной молекулярной массы. Эти составы обеспечивают способ увеличения накопления лекарственных средств в целевых тканях. Этот класс носителей лекарственных средств противостоит опсонизации и удалению мононуклеарной фагоцитарной системой (MPS или RES), тем самым обеспечивая более длительные периоды времени циркуляции в кровотоке и усиленное воздействие инкапсулированного лекарственного средства для тканей (Lasic et al., *Chem. Rev.*, 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 1995, 43, 1005-1011). Было показано, что такие липосомы избирательно накапливаются в опухолях, предпочтительно путем просачивания в неоваскуляризованные целевые ткани или захватом ими (Lasic et al., *Science*, 1995, 267, 1275-1276; Oku et al., 1995, *Biochim. Biophys. Acta*, 1238, 86-90). Длительно циркулирующие липосомы усиливают фармакокинетические и фармакодинамические параметры ДНК и РНК, особенно по сравнению с традиционными катионными липосомами, которые, как известно, накапливаются в тканях MPS (Liu et al., *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 24864-24870; Choi et al., публикация согласно РСТ № WO 96/10391; Ansell et al., публикация согласно РСТ № WO 96/10390; Holland et al., публикация согласно РСТ № WO 96/10392). Длительно циркулирующие липосомы также вероятно защищают лекарственные средства от деградации 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.

В дополнительном варианте осуществления способы согласно настоящему изобретению включают олигомерные композиции, созданные для доставки, как описано в патентах США № 6692911, 7163695 и 7070807. В связи с этим в одном варианте осуществления, в настоящем изобретении предложен олигомер согласно настоящему изобретению в композиции, содержащей сополимеры лизина и гистидина (НК), как описано в патенте США № 7163695, 7070807 и 6692911, либо самостоятельно, либо в комбинации с ПЭГ (например, разветвленный ПЭГ или неразветвленный ПЭГ, или смеси их обоих), в комбинации с ПЭГ и нацеливающим фрагментом или любым из вышеприведенного в комбинации с перекрестно-сшивающим агентом. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены антисмысловые олигомеры в композициях, содержащих модифицированный глюконовой кислотой полигистидин или глюконилированный-полигистидин/трансферрин-полилизин. Специалисту в данной области техники также будет понятно, что в композиции можно замещать аминокислоты со свойствами сходными с His и Lys.

В некоторых способах олигомеры, описанные в настоящем описании, могут содержать основную функциональную группу, такую как амино или алкиламино, и таким образом быть способными образовывать фармацевтически приемлемые соли с фармацевтически приемлемыми кислотами. В этом отношении термин "фармацевтически приемлемые соли" относится к относительно нетоксичным, неорганическим и органическим кислотно-аддитивным солям соединений согласно настоящему изобретению. Такие соли можно получать *in situ* в носителе для введения или при производственном процессе получения лекарственной формы, или отдельным проведением реакции очищенного соединения согласно настоящему изобретению в форме его свободного основания с подходящей органической или неорганической кислотой с выделением полученной таким образом соли во время последующего процесса очистки. Репрезентативные соли включают гидробромидные, гидрохлоридные, сульфатные, бисульфатные, фосфатные, нитратные, ацетатные, валератные, олеатные, пальмитатные, стеаратные, лауратные, бензоатные, лактатные, фосфатные, тозилатные, цитратные, малеатные, фумаратные, сукцинатные, тартратные, нафтиллатные, мезилатные, глюкогептонатные, лактобионатные и лаурилсульфонатные соли и т.п. (См., например, Berge et al. (1977), "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci., 66:1-19).

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

В некоторых способах олигомеры согласно настоящему изобретению могут содержать одну или более кислотных функциональных групп и, таким образом, быть способными к образованию фармацевтически приемлемых солей с фармацевтически приемлемыми основаниями. Термин "фармацевтически приемлемые соли" в таких случаях относится к относительно нетоксичным неорганическим и органическим основно-аддитивным солям соединений согласно настоящему изобретению. Такие соли аналогичным образом могут быть получены *in situ* в носителе для введения или при производственном процессе получения лекарственной формы, или отдельным проведением реакции очищенного соединения в форме свободной кислоты с подходящим основанием, таким как гидроксид, карбонат или бикарбонат фармацевтически приемлемого катиона металла, аммиаком или фармацевтически приемлемым органическим первичным, вторичным или третичным амином. Репрезентативные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают соли лития, натрия, калия, кальция, магния и алюминия и т.п. Репрезентативные органические амины, пригодные для образования основно-аддитивных солей, включают этиламин, диэтиламин, этилендиамин, этаноламин, диэтанолламин, пиперазин и т.п. (см., например, Berge et al. выше).

В композициях также могут присутствовать увлажняющие агенты, эмульгаторы и смазывающие вещества, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также красители, антиадгезивные агенты, покрытия, подсластители, вкусовые добавки и ароматизаторы, консерванты и антиоксиданты.

Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают

- (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.;
- (2) маслорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (БГА), бутилированный гидрокситолуол (БГТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и
- (3) металлохелатирующие агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТК), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Составы, используемые в способах по изобретению включают подходящие для перорального, назального, местного (включая буккальное и сублингвальное), ректальное, вагинальное и/или парентеральное введение. Составы можно удобно предоставлять в стандартной дозированной форме и можно получать любыми способами, хорошо известными в области фармации. Количество активного ингредиента,

которое можно комбинировать с веществом носителя для получения разовой лекарственной формы, будет варьировать в зависимости от хозяина, проходящего лечения, конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с веществом носителя для получения разовой лекарственной формы, будет обычно составлять количество соединения, которое производит терапевтическое действие. В целом из 100% это количество будет варьировать от около 0,1% до около 99% активного ингредиента, предпочтительно от около 5% до около 70%, наиболее предпочтительно от около 10% до около 30%.

В некоторых вариантах осуществления используемый в способах согласно настоящему изобретению состав содержит вспомогательное вещество, выбранное из циклодекстринов, целлюлоз, липосом, мицеллообразующих агентов, например желчных кислот, и полимерных носителей, например сложных полиэфиров и полиангидридов; и олигомера согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый состав обладает пероральной биодоступностью олигомера согласно настоящему изобретению.

Способы получения этих составов или композиций включают стадию объединения олигомера согласно настоящему изобретению с носителем и необязательно одним или более вспомогательными ингредиентами. Обычно составы получают путем равномерного и тщательного объединения соединения согласно настоящему изобретению с жидкими носителями или тонкоизмельченными твердыми носителями, или ими обоими, а затем при необходимости формованием продукта.

Используемые в данном изобретении составы, подходящие для перорального введения, могут находиться в форме капсул, саше, пилюль, таблеток, пастилок (с использованием придающей вкус основы, обычно сахарозы и аравийской или трагакантовой камеди), порошков, гранул, или в форме раствора или суспензии в водной или неводной жидкости, или в форме жидкой эмульсии масло-в-воде или вода-в-масле, или в форме эликсира или сиропа, или в форме пастилок (применяя инертную матрицу, такую как желатин и глицерин, или сахароза и аравийская камедь) и/или в виде жидкостей для полоскания рта и т.п., каждый из которых содержит в виде активного ингредиента предварительно определенное количество соединения согласно настоящему изобретению. Олигомер согласно настоящему изобретению также композицию можно вводить в форме болюса, электуария или пасты.

В твердых лекарственных формах, используемых в изобретении для перорального введения (капсулы, таблетки, пилюли, драже, порошки, гранулы, таблетки для рассасывания и т.п.), активный ингредиент можно смешивать с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, такими как цитрат натрия или фосфат дикальция, и/или любым из следующего:

- (1) наполнители или разбавители, такие как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и кремниевая кислота;
- (2) связующие вещества, например, такие как карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и/или аравийская камедь;
- (3) смачивающее вещество, такое как глицерин;
- (4) улучшающие распадаемость таблеток агенты, такие как агар-агар, карбонат кальция, крахмал картофеля или тапиоки, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия;
- (5) замедляющие растворение агенты, такие как парафин;
- (6) ускорители абсорбции, такие как четвертичные аммонийные соединения и поверхностно-активные вещества, такие как полоксамер и лаурилсульфат натрия;
- (7) увлажняющие агенты, например такие как цетиловый спирт, моностеарат глицерина и неионные поверхностно-активные вещества;
- (8) абсорбенты, такие как каолин и бентонитовая глина;
- (9) смазывающие вещества, такие как тальк, стеарат натрия, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия, стеарат цинка, стеарат натрия, стеариновая кислота и их смеси;
- (10) красители; и
- (11) обеспечивающие контролируемое высвобождение агенты, такие как кросповидон или этилцеллюлоза.

В случае капсул, таблеток и пилюль, фармацевтические композиции могут также дополнительно содержать буферные агенты. Твердые композиции подобного типа также могут применяться в качестве наполнителей в мягких и твердых желатиновых капсулах с применением таких вспомогательных веществ как лактоза или молочные сахара, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и т.п.

Таблетку можно изготавливать прессованием или формованием, необязательно с одним или более дополнительными ингредиентами. Прессованные таблетки можно получать, применяя связующий агент (например, желатин или гидроксипропилметилцеллюлоза), смазывающий агент, инертный разбавитель, консервант, разрыхлитель (например, натрий-крахмал гликолят или поперечно-сшитую натрий-карбоксиметилцеллюлозу), поверхностно-активный или диспергирующий агент. Формованные таблетки можно получать формованием в подходящей машине смеси порошкообразного соединения, увлажненной инертным жидким разбавителем.

Таблетки и другие твердые лекарственные формы фармацевтической композиции, используемой в соответствии с настоящим изобретением, такие как драже, капсулы, пилюли и гранулы, необязательно

могут иметь линию разлома или быть приготовлены с покрытием и оболочками, такими как кишечнорастворимые покрытия и другие покрытия, хорошо известные в области приготовления фармацевтических составов. Они также могут быть составлены таким образом, чтобы обеспечивать медленное или контролируемое высвобождение из них активного ингредиента с применением, например, гидроксипропилметилцеллюлозы в варьирующих пропорциях, чтобы обеспечивать желательный профиль высвобождения, других полимерных матриц, липосом и/или микросфер. Их также можно составлять для обеспечения быстрого высвобождения, например лиофилизированные составы. Они могут быть стерилизованы, например фильтрацией сквозь задерживающий бактерии фильтр или введением стерилизующих агентов, в форме стерильных твердых композиций, которые можно растворять в стерильной воде или определенной другой стерильной среде для инъекций непосредственно перед применением. Эти композиции также могут необязательно содержать замутнители и могут относиться к такому типу композиции, в которой высвобождается(ются) только активный(ые) ингредиент(ы) или предпочтительно в определенной части желудочно-кишечного тракта необязательно с замедлением. Примеры инкапсулированных композиций, которые могут применяться, включают полимерные субстанции и воски. Активный ингредиент также может находиться в микроинкапсулированной форме, если это уместно, с одним или более вышеописанными вспомогательными веществами.

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

Кроме инертных разбавителей, композиции для перорального применения могут дополнительно содержать адьюванты, такие как увлажнители, эмульгаторы и суспендирующие агенты, подсластители, вкусовые добавки, красители, ароматизаторы и консерванты.

Суспензии в дополнение к активному(ым) соединению(ям) могут содержать суспендирующие агенты, такие как этоксилированные изостеариловые спирты, полиоксиэтиленсорбит и сложные эфиры сорбитана, микрокристаллическую целлюлозу, мета-гидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант, а также их смеси.

Составы для ректального или вагинального введения можно получать в виде суппозитория, который может быть приготовлен путем смешивания одного или более соединений изобретения с одним или более подходящими нераздражающими вспомогательными веществами или носителями, включая, например, масло какао, полиэтиленгликоль, суппозиторный воск или салицилат, который является твердым при комнатной температуре, но жидким при температуре тела и, таким образом, плавится в прямой кишке или вагинальной полости с высвобождением активного соединения.

Составы или стандартные лекарственные формы для местного или трансдермального введения олигомера, предложенного в настоящем описании, включают порошки, спреи, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластыри и средства для ингаляций. Активные олигомеры можно смешивать в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и любыми консервантами, буферными агентами или пропеллентами, которые могут потребоваться. Мази, пасты, кремы и гели могут содержать, в дополнение к активному соединению этого изобретения, вспомогательные вещества, такие как животные и растительные жиры, масла, воски, парафины, крахмал, трагакант, производные целлюлозы, полиэтиленгликоли, силиконы, бентониты, кремниевую кислоту, тальк и оксид цинка или их смеси.

Порошки и спреи могут содержать в дополнение к соединению согласно настоящему изобретению, вспомогательные вещества, такие как лактоза, тальк, кремниевая кислота, гидроксид алюминия, силикаты кальция и полиамидный порошок или смеси этих субстанций. Спреи могут дополнительно содержать обычные пропелленты, такие как хлорфторуглероды и летучие незамещенные углеводороды, такие как бутан и пропан.

Трансдермальные пластыри имеют дополнительное преимущество, обеспечивающее контролируемую доставку в организм олигомера согласно настоящему изобретению. Такие лекарственные формы могут быть получены путем растворения или диспергирования олигомера в соответствующей среде. Дополнительно могут использоваться усилители абсорбции, чтобы увеличивать поступление агента сквозь кожу. Среди других способов, известных в данной области техники, скоростью такого поступления можно управлять либо с помощью контролирующей скорость мембраны, либо диспергируя агент в полимерной матрице или геле.

Фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, могут содержать один или более олигомеров в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или неводными растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями или стерильными порошками, которые перед применением можно восстанавливать в стерильных растворах

или дисперсиях для инъекций, которые могут содержать сахара, антиоксиданты, буферы, бактериостатические агенты, растворенные вещества, которые придадут составу изотоничность с кровью предполагаемого реципиента, или суспендирующие, или загущающие агенты. Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в фармацевтических композициях по изобретению, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их приемлемые смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения материалов для покрытия, таких как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ.

Эти композиции также могут содержать адъюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Предотвращение воздействия микроорганизмов на рассматриваемые олигомеры можно обеспечивать введением различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и т.п. Также может существовать необходимость во включении в композиции изотонических агентов, таких как сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, продленную абсорбцию инъекционной фармацевтической формы можно обеспечивать путем включения агентов, которые замедляют абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

В некоторых случаях для продления действия лекарственного средства, желателно замедлять абсорбцию лекарственного средства при подкожной или внутримышечной инъекции. Среди других способов, известных в данной области техники, это можно осуществлять посредством применения жидкой суспензии кристаллического или аморфного материала, имеющего плохую растворимость в воде. Скорость абсорбции лекарственного средства, кроме того, зависит от скорости его растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера кристаллов и кристаллической формы. В альтернативном варианте замедленную абсорбцию парентерально вводимой лекарственной формы можно обеспечивать посредством растворения или суспендирования лекарственного средства в масляном носителе.

Инъекционные депо-формы можно получать путем создания микроинкапсулированных матриц рассматриваемых олигомеров в биологически разлагаемых полимерах, таких как полилактид-полиглицид. В зависимости от соотношения олигомера и полимера, а также природы конкретного применяемого полимера, скоростью высвобождения олигомера можно управлять. Примеры других биологически разлагаемых полимеров включают сложные поли(ортоэфиры) и поли(ангидриды). Депо-инъекционные составы также можно получать путем включения лекарственного средства в липосомы или микроэмульсии, которые совместимы с тканями организма.

Когда олигомеры согласно настоящему изобретению вводят в виде фармацевтических средств людям и животным, их можно использовать *per se* или в виде фармацевтической композиции, содержащей, например, от 0,1 до 99% (более предпочтительно от 10 до 30%) активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Как изложено выше, используемые в настоящем изобретении составы или препараты можно применять перорально, парентерально, местно или ректально. Как правило, их используют в формах, подходящих для каждого из способов введения. Например, их вводят в форме таблеток или капсул, инъекционно, ингаляционно, в форме лосьона для глаз, мази, суппозитория и т.д. путем инъекции, инфузии или ингаляции; местно в форме лосьона или мази; и ректально в форме суппозитория.

В рамках изобретения фразы "парентеральное введение" и "вводимые парентерально" означают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции и включают без ограничения внутривенные, внутримышечные, внутриартериальные, интратекальные, внутрикапсулярные, внутриглазные, внутрисердечные, внутрикожные, внутрибрюшинные, транстрахеальные, подкожные, субкутикулярные, внутрисуставные, субкапсулярные, субарахноидальные, внутриспинальные и внутрисуставные инъекцию и инфузию.

Фразы "системное введение", "вводимый системно", "периферическое введение" и "вводимый периферически" в рамках изобретения обозначают введение соединения, лекарственного средства или другого материала способом за исключением непосредственного введения в центральную нервную систему таким образом, что они поступают в систему организма пациента и, следовательно, подвергаются метаболизму и другим подобным процессам, например, при подкожном введении.

Вне зависимости от выбранного пути введения используемые в настоящем изобретении олигомеры, которые можно использовать в подходящей гидратированной форме, и/или фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно получать в фармацевтически приемлемых лекарственных формах традиционными способами, известными специалистам в данной области техники. Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях этого изобретения можно варьировать так, чтобы получать количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения необходимого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и режима введения без проявления неприемлемой для пациента токсичности.

Выборный уровень дозирования будет зависеть от множества факторов, включая активность конкретного применяемого олигомера согласно настоящему изобретению или его сложного эфира, соли или

амида, пути введения, момента времени введения, скорости выведения или метаболизма конкретного применяемого олигомера, скорости и длительности абсорбции, длительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или веществ, используемых в комбинации с конкретным применяемым олигомером, возраста, пола, массы, патологического состояния, общего состояния здоровья и предшествующего анамнеза подлежащего лечению пациента и подобных факторов, хорошо известных в области медицины.

Врач или ветеринар, являющийся специалистом в данной области техники, может легко определять и назначать эффективное количество необходимой фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начать с доз соединений изобретения, применяемых в фармацевтической композиции, с уровнями ниже необходимого для достижения желаемого терапевтического действия, и постепенно повышать дозировку до достижения желаемого действия. В общем подходящая суточная доза композиции изобретения будет представлять собой количество соединения, которое является наименьшей дозой, эффективной для получения терапевтического действия. Такая эффективная доза обычно будет зависеть от описанных выше факторов. В целом для пациента пероральные, внутривенные, интрацеребровентрикулярные и подкожные дозы соединений этого изобретения при применении для указанных воздействий будут находиться в диапазоне от около 0,0001 до около 100 мг на килограмм массы тела в сутки.

При необходимости эффективную суточную дозу активного соединения можно вводить в виде двух, трех, четырех, пяти, шести или более поделенных на части доз, вводимых отдельно через соответствующие интервалы в течение суток, необязательно в единичных лекарственных формах. В определенных ситуациях дозировка представлена одним введением в сутки. В некоторых вариантах осуществления дозировка представлена одним или более введениями, по необходимости, в каждые 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 суток или каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 недель, или каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 месяцев для лечения целевого патологического состояния.

Антисмысловые молекулы можно вводить в клетки различными способами, известными имеющим представление в данной области специалистам, включая, но не ограничиваясь ими, инкапсулирование в липосомы, метод ионофореза или метод включения в другие носители, такие как гидрогели, циклодекстрины, биоразлагаемые нанокапсулы и биоадгезивные микросферы, как описано в настоящем описании и известно в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления для улучшения биологической доступности липофильных (нерастворимых в воде) фармацевтических агентов можно применять технологию микроэмульгирования. Примеры включают триметрин (Dordunoo, S.K. et al., *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 17(12), 1685-1713, 1991 и REV 5901 (Sheen, P.C et al., *J. Pharm Sci*, 80(7), 712-714, 1991). Среди других преимуществ микроэмульгирование обеспечивает биологическую доступность путем предпочтительно направляемой абсорбции в лимфатическую систему, вместо системы кровоснабжения, которая тем самым обходит печень и предотвращает разрушение соединений в гепатобилиарном кровотоке.

В одном аспекте изобретения составы содержат мицеллы, образованные из олигомера, предложенного в настоящем описании, и по меньшей мере одного амфифильного носителя, в которых мицеллы имеют средний диаметр менее около 100 нм. В предпочтительных вариантах осуществления предложены мицеллы со средним диаметром менее около 50 нм и даже в более предпочтительных вариантах осуществления предложены мицеллы со средним диаметром менее около 30 нм или даже менее около 20 нм.

Поскольку предполагаются все подходящие амфифильные носители, в настоящее время предпочтительные носители обычно такие, которые обладают статусом "в целом признанные безопасными" - Generally-Recognized-as-Safe (GRAS) - и которые могут как сольбуилизовать соединение согласно настоящему изобретению, так и микроэмульгировать его на последующей стадии, когда раствор входит в контакт с комплексной водной фазой (такой как находящаяся в желудочно-кишечном тракте человека). Обычно амфифильные ингредиенты, которые удовлетворяют этим требованиям, имеют значения HLB (гидрофильно-липофильный баланс) 2-20, а их структуры содержат алифатические радикалы с прямой цепью в диапазоне от C-6 до C-20. Примерами являются полиэтилен-гликолизированные жирные глицериды и полиэтиленгликоли.

Примеры амфифильных носителей включают насыщенные и мононенасыщенные полиэтиленгликолизированные жирнокислотные глицериды, такие как полученные из различных полностью или частично гидрогенизированных растительных масел. Такие масла могут преимущественно состоять из три-, ди- и моножирнокислотных глицеридов и ди- и моно-полиэтиленгликолевых сложных эфиров соответствующих жирных кислот с особенно предпочтительными композициями жирных кислот, включающих 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 используемый класс амфифильных носителей включает частично этерифицированный сорбитан и/или сорбит с насыщенными или мононенасыщенными жирными кислотами (серия SPAN) или соответствующие этоксилированные аналоги (серия TWEEN).

В частности, могут использоваться доступные в продаже амфифильные носители, включая серию Gelucire, Labrafil, Labrasol или Lauroglycol (все производятся и распространяются Gattefosse Corporation, г. Сен-Прист, Франция), ПЭГ-моно-олеат, ПЭГ-ди-олеат, ПЭГ-моно-лаурат и дилаурат, лецитин, поли-

сорбат 80 и т.д. (производимые и распространяемые рядом компаний в США и во всем мире).

В некоторых вариантах осуществления доставку можно проводить с помощью применения липосом, нанокансул, микрочастиц, микросфер, липидных частиц, везикул и т.п. для введения композиция согласно настоящему изобретению в подходящие клетки-хозяева. В частности, композиции согласно настоящему изобретению можно составлять для доставки либо инкапсулированными в липидную частицу, липосому, везикулу, наносферу, наночастицу, либо подобными способами. Приготовление и применение таких носителей для доставки можно выполнять, используя известные и традиционные методики.

Подходящие для использования в настоящем изобретении гидрофильные полимеры являются теми, которые легко растворимы в воде, могут ковалентно присоединяться к образующему везикулы липиду и которые переносятся *in vivo* без возникновения токсического действия (т.е. являются биосовместимыми). Подходящие полимеры включают полиэтиленгликоль (ПЭГ), полимеры полимолочной кислоты (также называемые полилактид), полигликолевой кислоты (также называемые полигликолид), сополимер полимолочной-полигликолевой кислот и поливинилового спирт. В некоторых вариантах осуществления полимеры имеют молекулярную массу от около 100 или 120 Дальтон до около 5000 или 10000 Дальтон или от около 300 Дальтон до около 5000 Дальтон. В других вариантах осуществления полимер представляет собой полиэтиленгликоль с молекулярной массой от около 100 до около 5000 Дальтон или с молекулярной массой от около 300 до около 5000 Дальтон. В некоторых вариантах осуществления полимер представляет собой полиэтиленгликоль массой 750 Дальтон (ПЭГ(750)). Полимеры также можно определять по количеству содержащихся в них мономеров; в предпочтительной варианте осуществления настоящего изобретения используются полимеры из по меньшей мере около трех мономеров, такие полимеры ПЭГ состоят из трех мономеров (приблизительно 150 Дальтон).

Другие гидрофильные полимеры, которые могут быть пригодны для использования в настоящем изобретении, включают поливинилпирролидон, полиметоксазолин, полиэтилоксазолин, полигидроксипропил метакриламид, полиметакриламид, полидиметилакриламид и производные целлюлоз, такие как гидроксиметилцеллюлоза или гидроксипропилцеллюлоза.

В некоторых вариантах осуществления используемый в настоящем изобретении состав содержит биосовместимый полимер, выбранный из группы, состоящей из полиамидов, поликарбонатов, полиалкиленов, полимеров сложных эфиров акриловой и метакриловой кислот, поливиниловых полимеров, полигликолидов, полисилоксанов, полиуретанов и их сополимеров, целлюлоз, полипропилена, полиэтиленов, полистирола, полимеров молочной кислоты и гликолевой кислоты, полиангидридов, сложных поли(орто)эфиров, поли(масляной кислоты), поли(валериановой кислоты), поли(лактид-со-капролактона), полисахаридов, белков, полигалактуроновых кислот, полицианоакрилатов и их комбинаций, смесей или сополимеров.

Циклодекстрины представляют собой циклические олигосахариды, состоящие из 6, 7, 8 глюкозных единиц, обозначаемых греческими буквами соответственно α , β или γ . Глюкозные единицы связаны α -1,4-гликозидными связями. Вследствие конформации кресла углеводных единиц, все вторичные гидроксильные группы (при C-2, C-3) расположены на одной стороне кольца, тогда как первичные гидроксильные группы при C-6 расположены на другой стороне. В результате внешние поверхности оказываются гидрофильными, делая циклодекстрины водорастворимыми. В противоположность этому полости циклодекстринов оказываются гидрофобными, поскольку они выровнены водородными атомами C-3 и C-5 и эфироподобными атомами кислорода. Эти матрицы обеспечивают комплексообразование со множеством относительно гидрофобных соединений, включая, например, стероидные соединения, такие как 17 α -эстрадиол (см., например, van Uden et al., *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 38:1-3-113 (1994)). Комплексообразование происходит за счет взаимодействий Ван-дер-Ваальса и за счет образования водородных связей. Для получения общего обзора химии циклодекстринов см. Wenz, *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33:803-822 (1994).

Физико-химические свойства производных циклодекстринов сильно зависят от природы и степени замещения. Например, их растворимость в воде колеблется в пределах от нерастворимого (например, триацетил-бета-циклодекстрин) до растворимого на 147% (мас./об.) (G-2-бета-циклодекстрин). В дополнение к этому они растворимы в большинстве органических растворителей. Свойства циклодекстринов дают возможность управлять растворимостью различных компонентов составов путем увеличения или уменьшения их растворимости.

Было описано множество циклодекстринов и способов их получения. Например, Parmeter (I) et al. (патент США № 3453259) и Gramera, et al. (патент США № 3459731) описывали электронейтральные циклодекстрины. Другие производные включают циклодекстрины с катионными свойствами [Parmeter (II), патент США № 3453257], нерастворимые перекрестносвязанные циклодекстрины (Solms, патент США № 3420788) и циклодекстрины с анионными свойствами [Parmeter (III), патент США № 3426011]. Среди производных циклодекстринов с анионными свойствами к исходному циклодекстрину присоединили карбоновые кислоты, фосфористые кислоты, фосфиновые кислоты, фосфоновые кислоты, фосфорные кислоты, тиофосфорные кислоты, тиосульфоновые кислоты и сульфоновые кислоты [см. Parmeter (III), выше]. Кроме того, были описаны производные сульфолкиловых эфиров циклодекст-

рина Stella, et al. (патент США № 5134127).

Липосомы состоят из по меньшей мере одной липидной бислоидной мембраны, содержащей водный внутренний компартмент. Липосомы можно характеризовать по типу мембраны и по размеру. Небольшие одноламеллярные везикулы (SUV) содержат одну мембрану и, как правило, имеют диаметр в диапазоне между 0,02 до 0,05 мкм; более крупные одноламеллярные везикулы (LUV) обычно больше 0,05 мкм. Олиголамеллярные большие везикулы и мультиламеллярные везикулы содержат множество обычно концентрических, мембранных слоев и, как правило, больше 0,1 мкм. Липосомы с несколькими неконцентрическими мембранами, т.е. несколькими меньшими везикулами, содержащимися внутри большей везикулы, называют мультивезикулярными везикулами.

В одном аспекте способов по изобретению используют составы, включающие липосомы, содержащие олигомер согласно настоящему изобретению, причем липосомная мембрана составлена так, чтобы обеспечивать липосому увеличенной несущей способностью. Альтернативно или дополнительно соединение согласно настоящему изобретению может содержаться внутри липосомного бислоя липосомы или адсорбироваться на нем. Олигомер согласно настоящему изобретению может агрегироваться с липидным поверхностно-активным веществом и переноситься внутрь внутреннего пространства липосомы; в этих случаях липосомная мембрана составляется таким образом, чтобы противостоять разрушающим воздействиям агрегата действующего вещества и поверхностно-активного вещества.

В соответствии с одним вариантом осуществления способов по изобретению липидный бислоид липосомы содержит липиды, дериватизированные с полиэтиленгликолем (ПЭГ), так что цепи ПЭГ проходят из внутренней поверхности липидного бислоя во внешнее пространство, инкапсулированное липосомой, и проходит из внешней области липидного бислоя в окружающую среду.

Действующие вещества, содержащиеся внутри липосом представленных способов, находятся в солюбилизированной форме. Агрегаты поверхностно-активного вещества и действующего вещества (такие как эмульсии или мицеллы, содержащие интересующее действующее вещество) могут захватываться во внутреннее пространство липосом в соответствии с настоящим изобретением. Действие поверхностно-активного вещества направлено на диспергирование и солюбилизацию действующего вещества и его можно выбирать из любого подходящего алифатического, циклоалифатического или ароматического поверхностно-активного вещества, включая, но не ограничиваясь, биосовместимыми лизофосфатидилхолинами (LPC) с различающейся длиной цепей (например, от около C14 до около C20). Для образования мицелл также можно применять дериватизированные полимерами липиды, такие как ПЭГ-липиды, так как они будут действовать в направлении ингибирования слияния мицеллы/мембраны и в результате добавления полимера к молекулам поверхностно-активных веществ снижается критическая концентрация мицеллообразования (ККМ) поверхностно-активного вещества, что способствует образованию мицелл. Предпочтительными являются поверхностно-активные вещества с ККМ в микромолярном диапазоне; поверхностно-активные вещества с более высокими ККМ могут применяться для получения мицелл, заключенных в липосомы согласно настоящему изобретению.

Липосомы, используемые в соответствии со способами по изобретению, можно получать любой из множества методик, известных в данной области техники. См., например, патент США № 4235871; опубликованную заявку согласно 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 согласно настоящему изобретению можно получать путем диффузии дериватизированного гидрофильным полимером липида в предварительно сформованные липосомы, например, воздействуя на предварительно сформованные липосомы мицеллами, состоящими из липидопривитых полимеров, с концентрациями липидов, соответствующими конечному мольному процентному содержанию дериватизированного липида, которое требуется в липосоме. Липосомы, содержащие гидрофильный полимер, также можно формировать гомогенизацией, гидратацией липидного слоя или методиками экструзии, как известно в данной области техники.

В другом примере процедуры получения состава действующее вещество сначала диспергируют обработкой ультразвуком в лизофосфатидилхолине или другом поверхностно-активном веществе с низкой ККМ (включая привитые полимерами липиды), которые легко солюбилизуют гидрофобные молекулы. Получаемую мицеллярную суспензию действующего вещества затем используют для регидратации сухого липидного образца, который содержит подходящее мольное процентное содержание привитого полимером липида или холестерина. Суспензию липида и действующего вещества затем вводят в липосомы, используя методики экструзии, как известно в данной области техники, и получаемые липосомы отделяют от неинкапсулированного раствора стандартным разделением на колонке.

В одном аспекте способов по изобретению липосомы получают таким образом, чтобы получать по существу гомогенные размеры в выбранном диапазоне размеров. Один эффективный способ получения нужных размеров включает экструдирование водной суспензии липосом через ряд поликарбонатных мембран с выбранным однородным размером пор; размер пор мембраны приблизительно будет соответствовать наибольшим размерам липосом, полученных экструзией через такую мембрану. См., например, патент США № 4737323 (12 апр., 1988). В некоторых вариантах осуществления для введения полинуклеотидов или белков в клетки можно использовать такие реактивы, как DharmaFECT® и Lipofectamine®.

Характеристики высвобождения состава, используемого в способах по изобретению, зависят от инкапсулированного вещества, концентрации инкапсулированного лекарственного средства и наличия модификаторов высвобождения. Например, высвобождение можно делать зависимым от значения pH, например, используя чувствительное к pH покрытие, которое обеспечивает высвобождение только при низком pH как в желудке или высоком pH как в кишечнике. Для предотвращения возможности высвобождения до прохождения через желудок можно применять кишечнорастворимое покрытие. Для получения начального высвобождения в желудке с последующим поздним высвобождением в кишечнике можно применять множественные покрытия или смеси цианамидов, инкапсулированного в различные материалы. Высвобождением также можно управлять путем включения солей или порообразующих агентов, которые могут увеличивать поглощение воды или высвобождение лекарственного средства посредством диффузии из капсулы. Для контроля скорости высвобождения также могут использоваться вспомогательные вещества, которые модифицируют растворимость лекарственного средства. Можно также включать агенты, которые усиливают разрушение матрицы или высвобождение из матрицы. В зависимости от соединения их можно добавлять к лекарственному средству, добавлять как отдельную фазу (т.е. в виде частиц) или можно совместно растворять в полимерной фазе. В большинстве случаев количество должно находиться между 0,1 и тридцатью процентами (мас./мас. полимера). Типы усилителей разрушения включают неорганические соли, такие как сульфат аммония и хлорид аммония, органические кислоты, такие как лимонная кислота, бензойная кислота и аскорбиновая кислота, неорганические основания, такие как карбонат натрия, карбонат калия, карбонат кальция, карбонат цинка и гидроксид цинка, и органические основания, такие как сульфат протамина, спермин, холин, этаноламин, диэтиламин и триэтиламин и поверхностно-активные вещества, такие как Tween® и Pluronic®. В виде частиц добавляют порообразующие агенты, которые добавляют микроструктуру к матрицам (т.е. водорастворимые соединения, такие как неорганические соли и сахара). Диапазон добавки обычно находится между одним и тридцатью процентами (мас./мас. полимера).

Поглощением также можно управлять путем изменения времени удержания частиц в желудочно-кишечном тракте. Этого можно достигать, например, покрытием частицы или выбором в качестве инкапсулирующего материала мукозально адгезивного полимера. Примеры включают большинство полимеров со свободными карбоксильными группами, такими как хитозан, целлюлозы и особенно полиакрилаты (применимо к данному документу, полиакрилаты относятся к полимерам, включающим акрилатные группы и модифицированные акрилатные группы, такие как цианоакрилаты и метакрилаты).

Олигомер можно получать в составе, содержащемся внутри хирургического или медицинского устройства или импланта, или принимаемого ими для высвобождения. В определенных аспектах имплант можно покрывать или иным образом обрабатывать олигомером. Например, для покрытия импланта композициями настоящего изобретения можно применять гидрогели или другие полимеры, такие как биосовместимые и/или биоразлагаемые полимеры (т.е. композицию можно приспособлять для применения с устройством медицинского назначения путем использования гидрогеля или другого полимера). Полимеры и сополимеры для покрытия медицинских устройств агентом хорошо известны в данной области техники. Например, импланты включают, но не ограничиваются ими, стенты, элюирующие лекарственные средства стенты, шовные нити, протезы, катетеры для сосудов, катетеры для диализа, сосудистые трансплантаты, протезы клапанов сердца, кардиостимуляторы, имплантируемые кардиовертеры-дефибрилляторы, в/в иглы, устройства для соединения и образования костей, такие как штифты, винты, пластины и другие устройства, и матрицы с искусственными тканями для заживления ран.

В дополнение к предложенным в настоящем описании способам олигомеры, используемые в соответствии с изобретением, можно получать в виде составов для введения любым удобным путем с целью применения в медицине или ветеринарии по аналогии с другими фармацевтическими препаратами. Антисмысловые олигомеры и их соответствующие составы можно вводить самостоятельно или в комбинации с другими терапевтическими подходами при лечении воспаления.

В соответствии со способами по изобретению пути доставки антисмыслового олигомера включают, но не ограничиваются ими, различные пути системного введения, включая пероральные и парентеральный пути, например внутривенную, подкожную, внутрибрюшинную и внутримышечную, а также ингаляционную, трансдермальную, легочную и местную доставку. Подходящий путь может определять специалист в данной области, как соответствующий состоянию пациента, подлежащего лечению. Например, подходящий путь для доставки антисмыслового олигомера при лечении патологического состояния кожи может включать местное нанесение, тогда как доставка антисмыслового олигомера для лечения респираторного патологического состояния (например, COPD) может включать ингаляционную, интраназальную или легочную доставку. Олигомер также можно доставлять непосредственно в место воспаления вследствие инфекции или в кровоток.

Антисмысловой олигомер можно вводить в любом удобном носителе, который является физиологически приемлемым. Такая композиция может включать любой из многообразия стандартных фармацевтически приемлемых носителей, применяемых средними специалистами в данной области техники. Примеры включают, но не ограничиваются ими, солевой раствор, забуференный фосфатом солевой раствор (PBS), воду, водный этанол, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода или эмульсии триглицеридов,

таблетки и капсулы. Выбор подходящего физиологически приемлемого носителя будет варьировать в зависимости от выбранного пути введения.

В некоторых случаях, отмеченных выше, липосомы можно использовать для облегчения поглощения антисмыслового олигонуклеотида в клетки (см., например, Williams, S.A., *Leukemia* 10(12):1980-1989, 1996; Lappalainen et al., *Antiviral Res.*, 23:119, 1994; Uhlmann et al., *Antisense oligonucleotides: a new therapeutic principle*, *Chemical Reviews*, vol. 90, № 4, p. 544-584, 1990; Gregoriadis, G., Chapter 14, *Liposomes, Drug Carriers in Biology and Medicine*, p. 287-341, Academic Press, 1979). Гидрогели также можно использовать в качестве носителей для введения антисмыслового олигомера, например, как описано в публикации заявки согласно РСТ № WO 93/01286 или заявки согласно РСТ № US 1992/005305. Альтернативно олигонуклеотиды можно вводить в микрогранулах или микрочастицах (см., например, Wu, G.Y. and Wu, C.H., *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432 (1987)). Альтернативно использование заполненных газом микропузырьков в комплексе с антисмысловыми олигомерами может увеличивать доставку к целевым тканям, как описано в патенте США № 6245747.

Можно также использовать композиции с замедленным высвобождением. Они могут включать полупроницаемые полимерные матрицы в виде сформованных изделий, таких как пленки или микрокапсулы.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловые соединения можно вводить в количестве и способом, эффективным для получения пиковой концентрации в крови по меньшей мере 200-400 нМ антисмыслового олигомера. Как правило, вводят одну или более доз антисмыслового олигомера обычно с регулярными интервалами в течение периода времени от около одной до двух недель. Предпочтительные дозы для перорального введения составляют около 1-100 мг олигомера на 70 кг. В некоторых случаях могут быть необходимы дозы более 100 мг олигомера/одному пациенту. Для внутривенного введения предпочтительные дозы составляют от около 1 до 500 мг олигомера на 70 кг. Антисмысловый олигомер можно вводить с регулярными интервалами в течение короткого периода времени, например ежедневно в течение двух недель или менее. Тем не менее в некоторых случаях олигомер вводят с перерывами в течение более длительного периода времени. Введение может быть последовательным или одновременным с введением антибиотика или другим терапевтическим лечением. Схему лечения можно корректировать (доза, частота, путь и т.д.) согласно указанному на основе результатов иммуноанализов, других биохимических тестов и физиологического исследования пациента, подлежащего лечению.

Все публикации и заявки на патент, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящее описание посредством ссылки в той же мере, как если бы каждая отдельная публикация или заявка на патент были конкретно и отдельно указаны для включения посредством ссылки.

Различные варианты осуществления, описанные выше, можно объединять, получая дополнительные варианты осуществления. Временная заявка на патент США 62/330027, поданная 29 апреля 2016 г., включена в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки. В эти осуществления можно вносить указанные и другие изменения в свете вышеприведенного подробного описания. В целом в следующей формуле изобретения используемые термины не должны толковаться как ограничивающие требования к конкретным вариантам осуществления, раскрытым в описании и формуле изобретения, но должны толковаться как включающие все возможные варианты осуществления вместе с полным объемом эквивалентов, на которые распространяется такая формула изобретения.

Соответственно формула изобретения не ограничивается настоящим описанием.

Несмотря на то, что предыдущее изобретение было довольно подробно описано в качестве иллюстрации и примера в целях ясности понимания, в свете идей настоящего описания средним специалистам в данной области техники будет очевидно, что в это изобретение могут быть внесены некоторые изменения и модификации без отступления от сущности или объема прилагаемой формулы изобретения. Следующие примеры приведены с целью иллюстрации, а не с целью ограничения. Специалисты в данной области техники легко распознают разнообразные некритические параметры, которые можно изменять или модифицировать с получением по существу идентичных результатов.

Перечень последовательностей

Название	Последовательности	SEQ ID NO:
LMNA, экзон 11	GGCTCCCACTGCAGCAGCTCGGGGACCCCGCTGAGTACAACCTGCGCTCGCGCACCGTGTGTGCGGGACCTGCGGGCAGCCTGCCGACAAGGCATCTGCCAGCGGCTCAGGAGCCCAGGTGGGCGGACCCATCTCTTGGCTCTTCTGCTCCAGTGTACGGTCACTCGCAGCTACCGCAGTGTGGGGGCAGTGGGGGTGGCAGCTTCGGGGACAATCTGGTCAACCGCTCCTACCTCCTGGGCAACTCCAGCCCCGAAACCCAG	1
HGPS, экзон 11	GGCTCCCACTGCAGCAGCTCGGGGACCCCGCTGAGTACAACCTGCGCTCGCGCACCGTGTGTGCGGGACCTGCGGGCAGCCTGCCGACAAGGCATCTGCCAGCGGCTCAGGAGCCCAGGTGGGTGGACCCATCTCTTGGCTCTTCTGCTCCAGTGTACGGTCACTCGCAGCTACCGCAGTGTGGGGGCAGTGGGGGTGGCAGCTTCGGGGACAATCTGGTCAACCGCTCCTACCTCCTGGGCAACTCCAGCCCCGAAACCCAG	2
Pr11-1	CTGAGCCGCTGGCAGATGCCTTGTC	3
Pr11-2	GAGGAGATGGGTCCACCCACCTGGG	4
rTAT	RRRQRRKKR	5
Tat	RKKRRQRRR	6
R ₉ F ₂	RRRRRRRRFF	7
R ₅ F ₂ R ₄	RRRRFFRRRR	8
R ₄	RRRR	9
R ₅	RRRRR	10
R ₆	RRRRR	11
R ₇	RRRRRR	12
R ₈	RRRRRRR	13
R ₉	RRRRRRRR	14
(RX) ₈	RXXRXRXRXRXRXRX	15
(RXR) ₄	RXXRXRXRXRXR	16
(RXR) ₅	RXXRXRXRXRXRXR	17
(RXRRBR) ₂	RXXRRBRXRRBR	18
(RAR) ₄ F ₂	RARRARRARRARFF	19
(RGR) ₄ F ₂	RGRRGRGRGRGRFF	20
(RFF) ₃ R	RFFRFFRFFR	21
(RXR) ₄ XB	RXXRXRXRXRXRXB	22
(RFF) ₃ RXB	RFFRFFRFFRFXB	23
(RFF) ₃ RG	RFFRFFRFFFRG	24
R ₆ G	RRRRRG	25

X представляет собой 6-аминогексановую кислоту;

V представляет собой β-аланин;

F представляет собой фенилаланин;

G представляет собой глицин;

R представляет собой аргинин;

Q представляет собой глутамин;

K представляет собой лизин.

Каждая из SEQ ID NO: 5-25 может дополнительно содержать группу R^a, присоединенную к аминоконцу, где R^a выбран из H, ацетила, бензоила и стеарила. В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

Примеры

Материалы.

1. Мышиная модель HGPS.

ВАС-клон человека, RP11-702H12 (RPC1-11 библиотека ВАС человека, ресурсный центр ВСПАС в Исследовательском институте детской больницы Окленда, г. Окленд, штат Калифорния, США), содержит вставку 164,4 т.п. н. геномной ДНК из хромосомы 1q, включая ген LMNA (25,4 т.п. н.) и три других

известных гена UBQLN4, MAPBP1P и RAB25. Рекомбинантный таргетинг ВАС-клона RP11-702H12 выполняли с помощью челночного фрагмента, содержащего мутацию G608G, созданную методом ПЦР из геномной ДНК линии клеток AG11498 фибробластов HGPS (Coriell Cell Repositories, коллекция NIA). Трансгенная мышьяная модель с ВАСG608G человека для экспрессии HGPS мутантного белка LMNA человека, названного прогерином, во всех тканях. Мыши проявляют большую часть такой же патологии, как и пациенты с HGPS. В гетерозиготном состоянии мыши демонстрировали потерю гладкомышечных клеток сосудов (VSMC) в основных артериях с уменьшением нереагирующей эластичности сосудов. В гомозиготном состоянии мыши демонстрируют более прогрессирующую потерю VSMC с адвентициальным утолщением, общей липодистрофией, упругой обезвоженной кожей, редющей шерстью, кифозом, контрактурой суставов и ограничением передвижения. Эти мыши с двумя копиями трансгена преждевременно умирали в возрасте 6-8 месяцев.

2. PPMO.

Соединение	Нацеливающая последовательность (TS)	TS SEQ ID NO:	5	3' CPP	CPP SEQ ID NO
PPMO1	CTGAGCCGCTGGCAGATGCCTTGTC	3	EG3	-Gly-R ₆ -Ac	11
PPMO2	GAGGAGATGGGTCCACCCACCTGGG	4	EG3	-Gly-R ₆ -Ac	11

Gly обозначает глициновый линкер, присоединенный к атому азота кольца 3'-концевой морфолиновой субъединицы амидной связью по карбоксилу глицина, а также присоединенный к карбоксильному концу CPP пептида амидной связью по NH₂ глицина. R представляет собой аргинин, а Ac представляет собой ацетил.

Пример. Анализ ddpcr мышей с hgps с последующим лечением с нацеливающимися на LMNA PPMO.

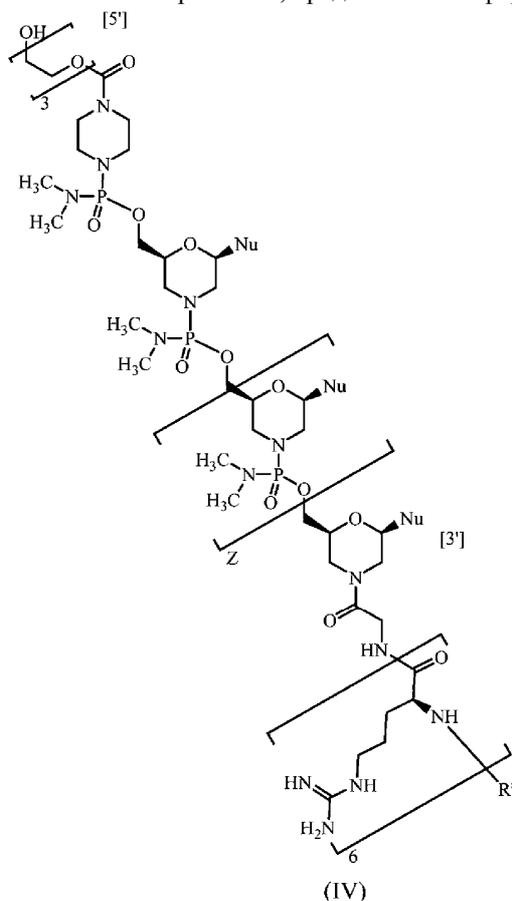
Выполняли эксперименты с капельной цифровой ПЦР (кцПЦР) для измерения уровней экспрессии прогерина и LMNA дикого типа у трансгенных мышей с HGPS с последующим лечением с помощью PPMO1 (SEQ ID NO: 3) и PPMO2 (SEQ ID NO: 4). Всего 37 мышей делили на следующие исследуемые группы.

Группа (кол-во мышей)	Исследуемое соединение	Доза на инъекцию (мг/кг)	Схема лечения	Путь введения
1 (7)	Солевой раствор	0	2x в неделю	В.В. в хвостовую вену
2 (4)	PPMO1	60	2x в неделю	В.В. в хвостовую вену
3 (7)	PPMO1	20	2x в неделю	В.В. в хвостовую вену
4 (4)	PPMO1	7	2x в неделю	В.В. в хвостовую вену
5 (4)	PPMO2	60	2x в неделю	В.В. в хвостовую вену
6 (7)	PPMO2	20	2x в неделю	В.В. в хвостовую вену
7 (4)	PPMO2	7	2x в неделю	В.В. в хвостовую вену

Мышам давали дозы согласно вышеприведенной таблице, начиная с возраста четырех недель, и умерщвляли через 12 недель. Из сердца четырехглавых мышц и аорты экстрагировали РНК, используя стандартную процедуру с тризолом (Ambion). Из 0,5 мкг общей РНК получали кДНК, используя стандартную процедуру синтеза кДНК iScript™ (Bio-Rad), и анализировали на ингибирование сплайсинга методом кцПЦР. Результаты экспериментов представлены на фиг. 1-4.

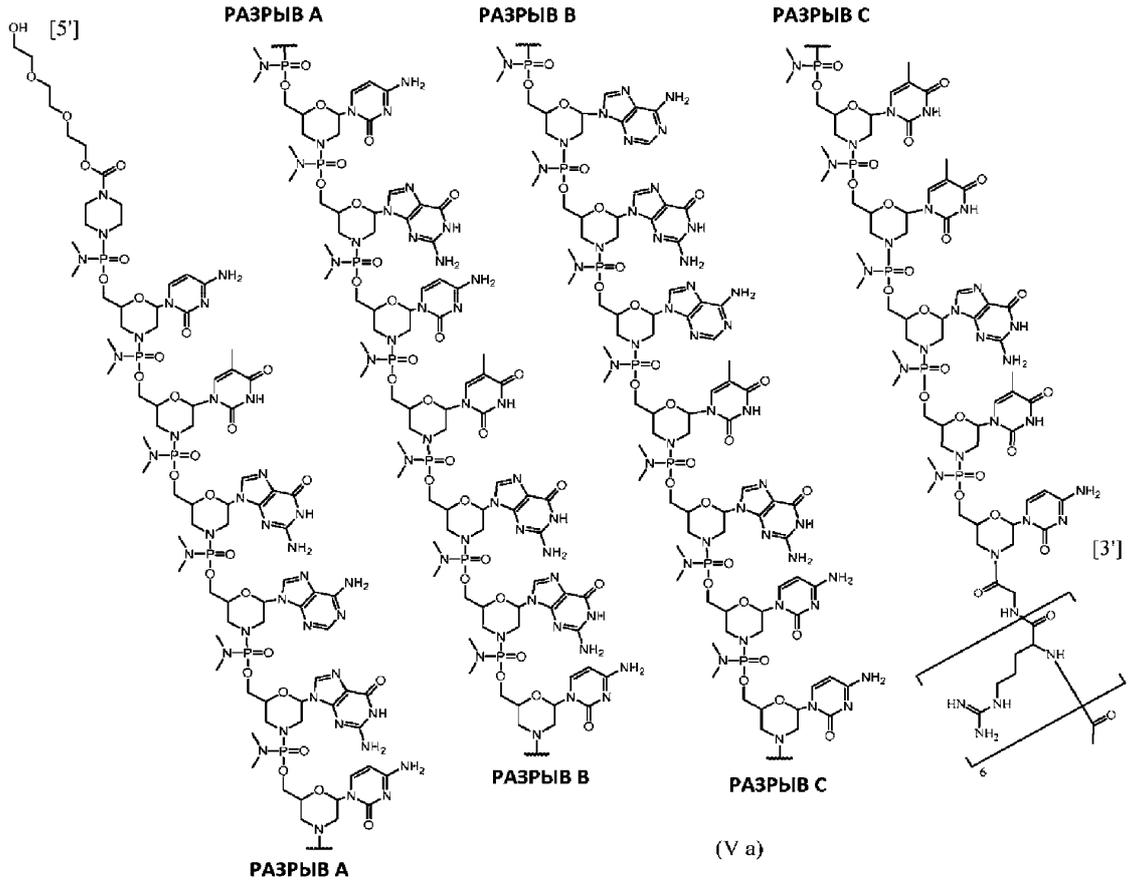
- a) SEQ ID NO: 3 (CTGAGCCGCTGGCAGATGCCTTGTC), где Z равно 23; и
 b) SEQ ID NO: 4 (GAGGAGATGGGTCCACCCACCTGGG), где Z равно 23; а
 R¹ обозначает ацетил.

2. Соединение антисмыслового олигомера по п.1, представленное формулой (IV)

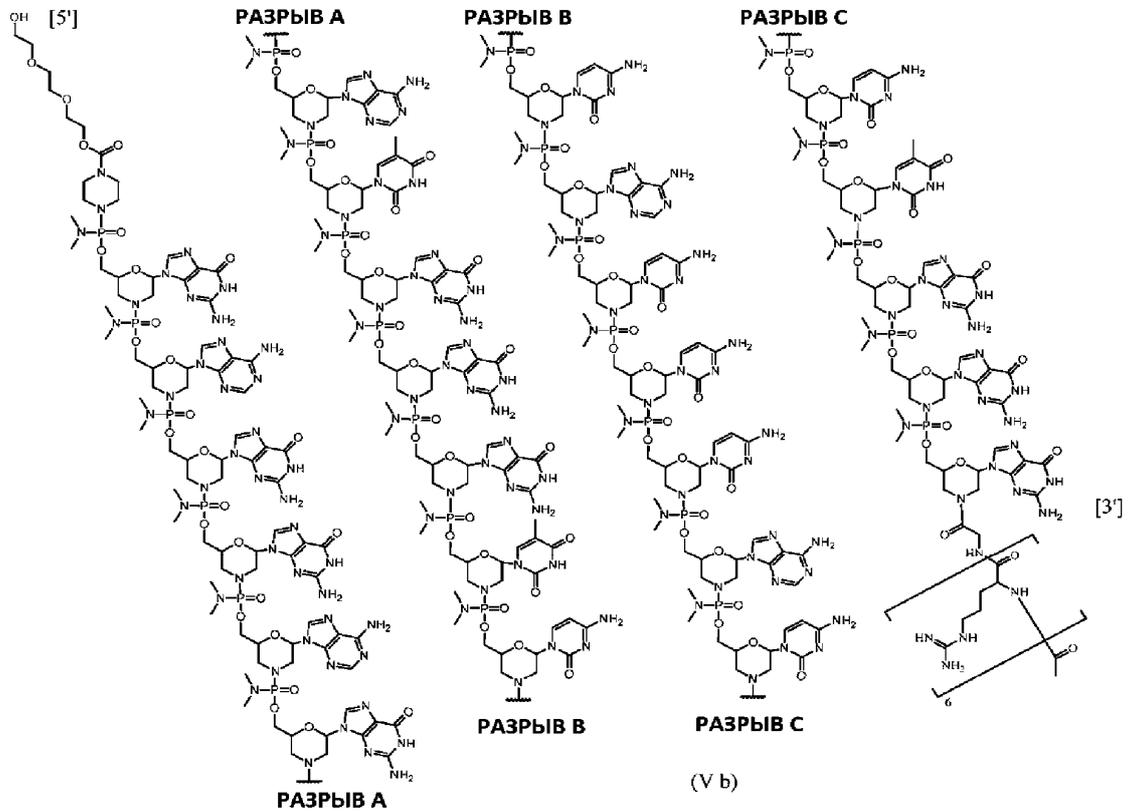


или его фармацевтически приемлемая соль,
 где каждый Nu представляет собой нуклеотидное основание, и взятые вместе они образуют нацеливающую последовательность (от 5' до 3'), причем нацеливающая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 3 (CTGAGCCGCTGGCAGATGCCTTGTC), а Z равно 23.

4. Соединение антисмыслового олигомера по п.1, являющееся

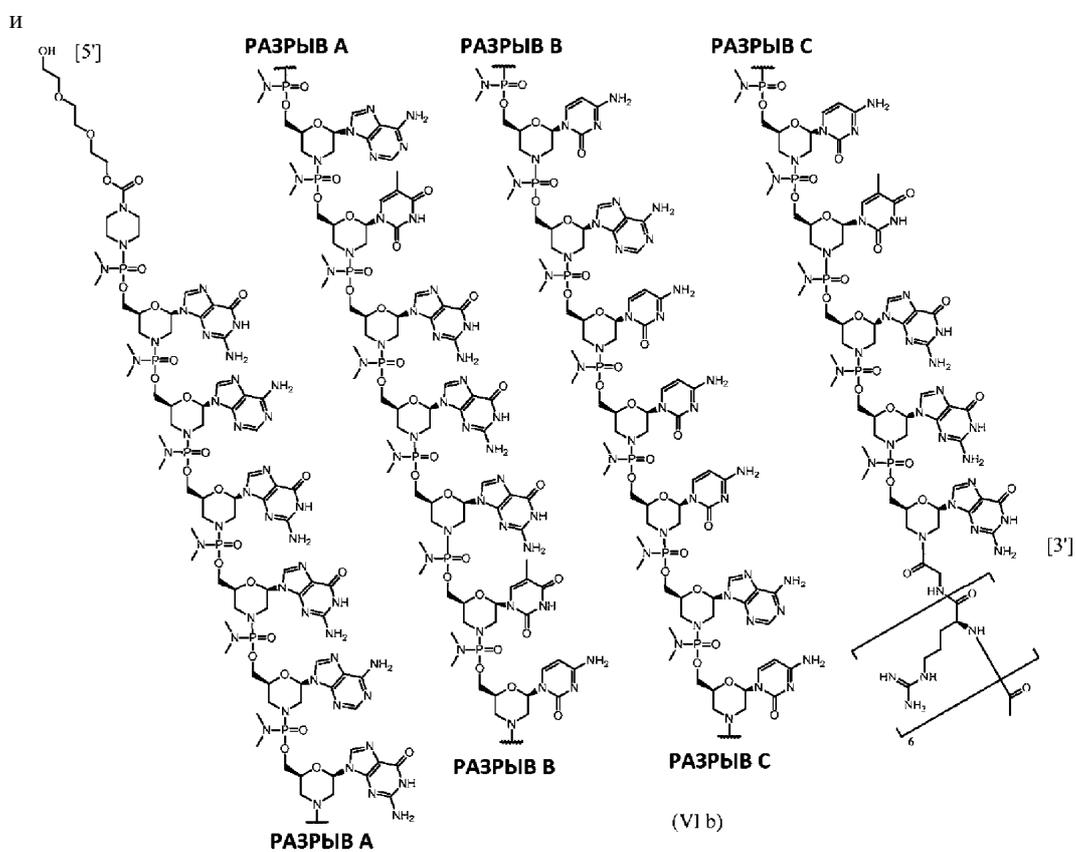
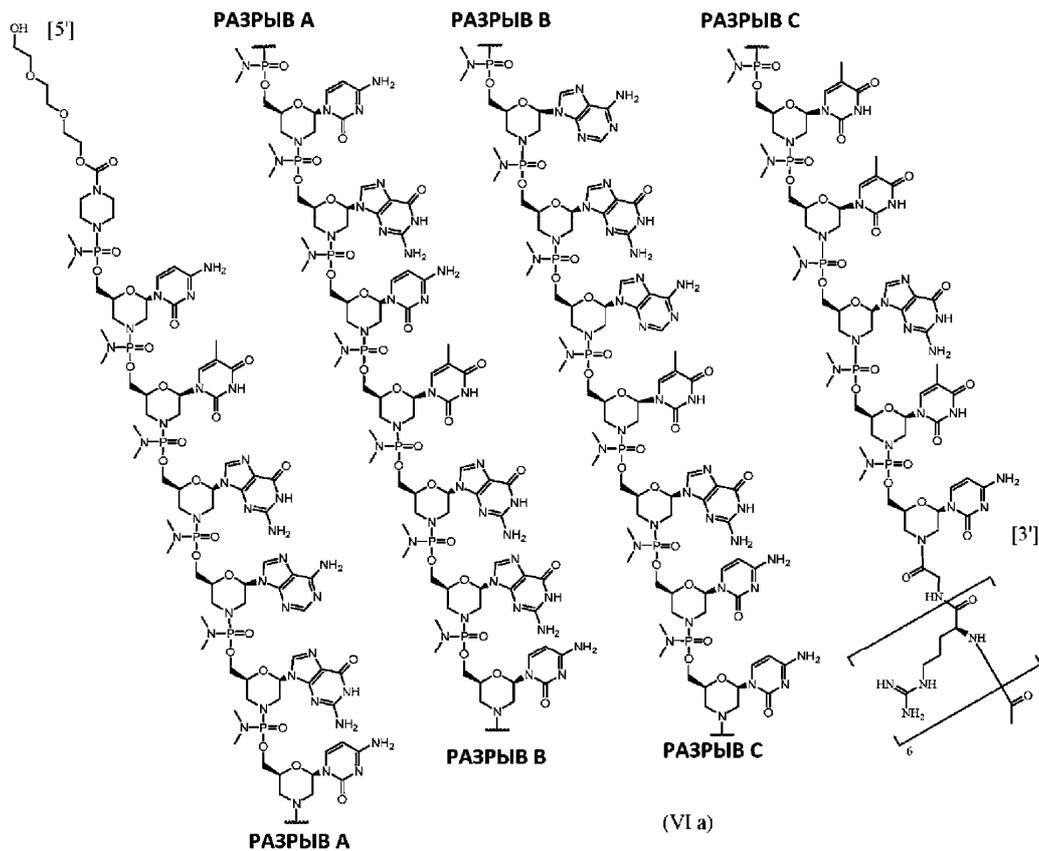


5. Соединение антисмыслового олигомера по п.1, являющееся



6. Соединение антисмыслового олигомера или его фармацевтически приемлемая соль, выбранные

из

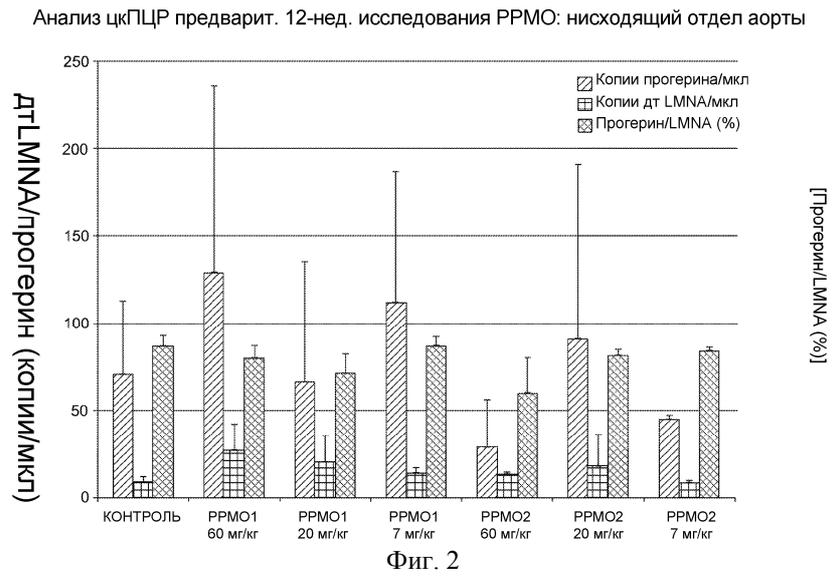
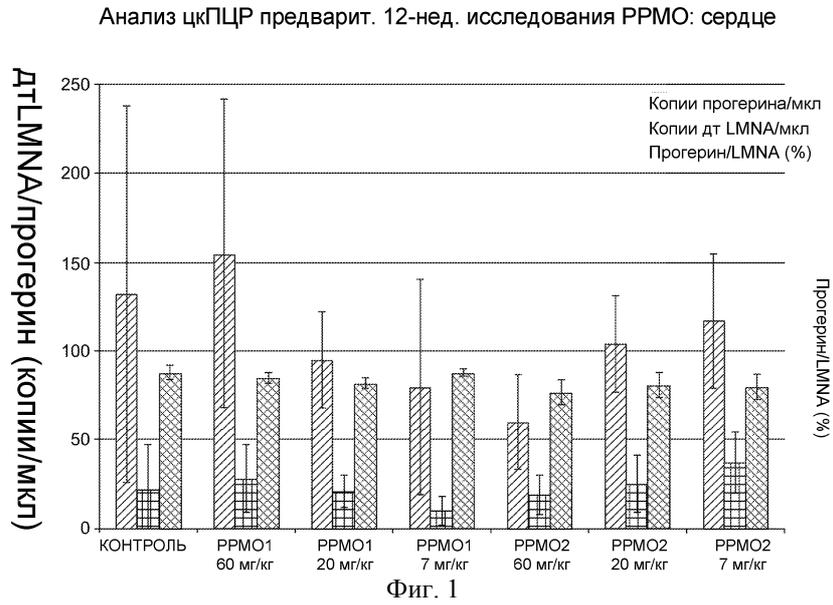


7. Соединение антисмыслового олигомера по любому из пп.1-6, являющееся фармацевтически приемлемой солью с 0,6 HCl.

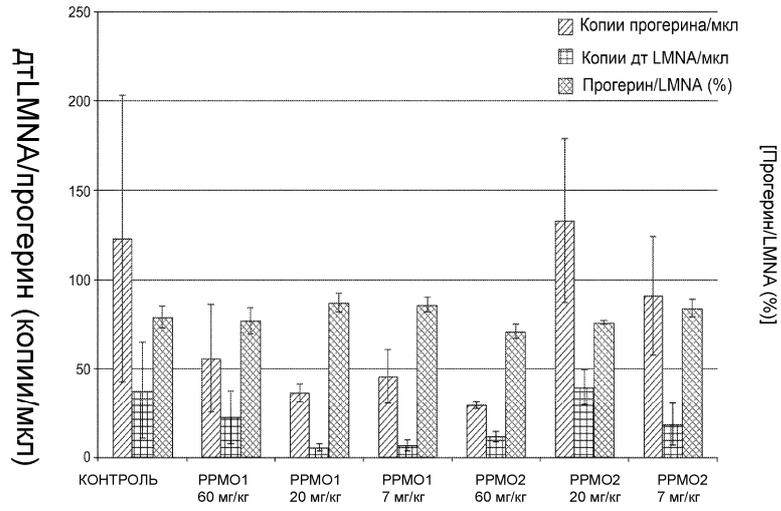
8. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение антисмыслового олигомера по любому

из пп.1-7 и фармацевтически приемлемый носитель.

9. Способ лечения синдрома прогерии Хатчинсона-Гилфорда (HGPS) у пациента, включающий введение пациенту соединения антисмыслового олигомера по любому из пп.1-7 или фармацевтической композиции по п.8.

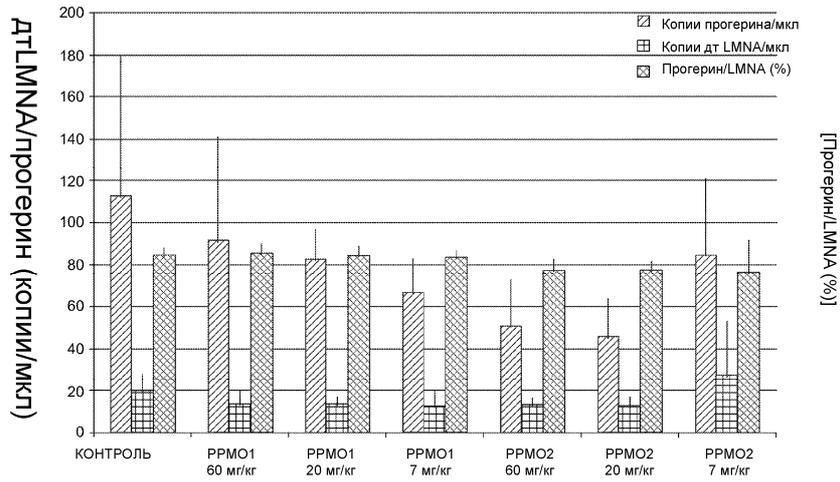


Анализ цкПЦР предварит. 12-нед. исследования РРМО: четырехглавые мышцы



Фиг. 3

Анализ цкПЦР предварит. 12-нед. исследования РРМО: печень



Фиг. 4

