

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202191601 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.01.19

(51) Int. Cl. C12N 15/113 (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.12.11

(54) КОНЬЮГАТЫ ОЛИГОМЕРОВ ДЛЯ ПРОПУСКА ЭКЗОНА ПРИ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ

(31) 62/779,028

(32) 2018.12.13

(33) US

(86) PCT/US2019/065581

(87) WO 2020/123574 2020.06.18

(71) Заявитель:
САРЕПТА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

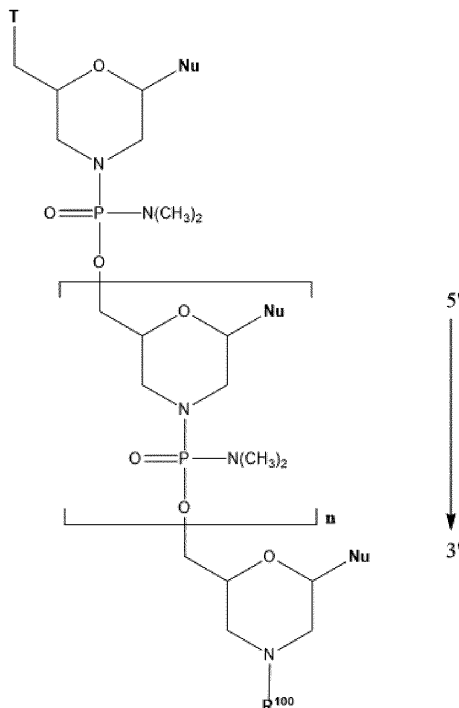
(72) Изобретатель:

Шнелль Фредерик Джозеф, Цай
Баочжун, Десай Анкур, Бестуик
Ричард К. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Описаны антисмысловые олигомеры, комплементарные выбранному целевому сайту в гене дистрофина человека, для индуцирования пропуска экзона 50. В различных аспектах описаны антисмысловые олигомеры в соответствии с формулой (I)



или их фармацевтически приемлемая соль, где T, Nu, n и R¹⁰⁰ определены в данном документе.

A1

202191601

202191601

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-568838EA/061

КОНЬЮГАТЫ ОЛИГОМЕРОВ ДЛЯ ПРОПУСКА ЭКЗОНА ПРИ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/779028, поданной 13 декабря 2018 г. Общие идеи вышеуказанной заявки включены посредством ссылки во всей своей полноте.

**ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПОДАННЫЙ В
ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ ПОСРЕДСТВОМ EFS-WEB**

Содержимое поданного в электронном виде перечня последовательностей (имя: 8171_50_WO00_SL.txt; размер: 10080 байт; дата создания: 6 ноября 2019 г.), поданного вместе с данным документом, включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к новым антисмысловым олигомерам, подходящим для пропуска экзона 50 в гене дистрофина человека, и фармацевтическим композициям на их основе. В настоящем изобретении также предусмотрены способы индукции пропуска экзона 50 с применением новых антисмысловых олигомеров, способы образования дистрофина у субъекта, характеризующегося мутацией гена дистрофина, которая может быть скорректирована посредством пропуска экзона 50, и способы лечения субъекта, характеризующегося мутацией гена дистрофина, которая может быть скорректирована посредством пропуска экзона 50.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

Было обнаружено, что менее тяжелая форма мышечной дистрофии, мышечная дистрофия Беккера (BMD), возникает когда мутация, как правило, делеция одного или более экзонов, приводит к правильному считыванию рамки всего транскрипта дистрофина так, что трансляция mRNA в белок не терминируется преждевременно. Если присоединение вышележащих и нижележащих экзонов при процессинге pre-mRNA мутантного дистрофина сохраняет правильную рамку считывания гена, в результате образуется mRNA, кодирующая белок с короткой внутренней делецией, который сохраняет некоторую активность, что приводит к фенотипу Беккера.

Существует необходимость в антисмысловых олигомерах, которые являются

подходящим для пропуска экзона 50, и соответствующих фармацевтических композициях, которые являются применимыми для терапевтических способов образования дистрофина и лечения DMD.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

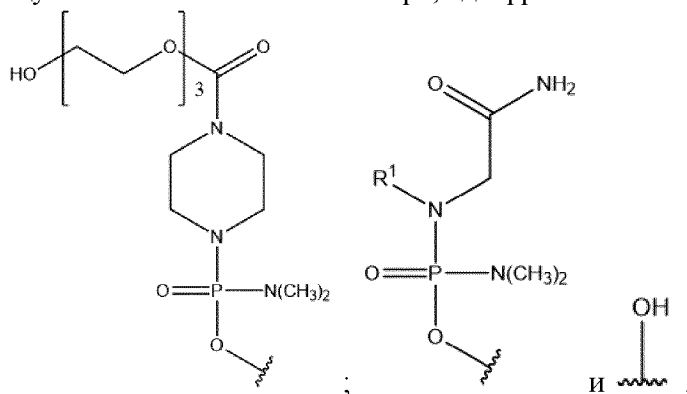
Антисмысловые олигомеры или их фармацевтически приемлемые соли способны к связыванию выбранной мишени для индуцирования пропуска экзона в гене дистрофина человека, где антисмысловой олигомер содержит последовательность оснований, которая комплементарна целевой области экзона 50 pre-mRNA дистрофина, обозначенной как сайт отжига, при этом последовательность оснований и сайт отжига выбраны из:

Сайт отжига	Нацеливающаяся последовательность [от 5' до 3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

где Т представляет собой тимин или урацил. В одном аспекте каждый Т представляет собой тимин.

В некоторых вариантах осуществления каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует нуклеиновым основаниям в одном из следующего: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует нуклеиновым основаниям под SEQ ID NO: 3.

В одном аспекте антисмысловой олигомер содержит фрагмент **T**, присоединенный к 5'-концу антисмыслового олигомера, где фрагмент **T** выбран из:



В определенных вариантах осуществления антисмысловой олигомер конъюгирован с одним или более проникающими в клетку пептидами (названными в данном документе «CPP»). В определенных вариантах осуществления один или более CPP присоединены к концу антисмыслового олигомера. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один CPP присоединен к 5'-концу антисмыслового олигомера. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один CPP присоединен к 3'-концу антисмыслового олигомера. В определенных вариантах осуществления первый CPP присоединен к 5'-концу, а второй CPP присоединен к 3'-концу антисмыслового олигомера.

В некоторых вариантах осуществления CPP представляет собой пептид, богатый аргинином. Термин «богатый аргинином» относится к CPP, имеющему по меньшей мере 2 и предпочтительно 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 остатков аргинина, при этом каждый необязательно отделен одним или более незаряженными гидрофобными остатками, и необязательно содержащему приблизительно 6-14 аминокислотных остатков. Как объясняется ниже, CPP предпочтительно связан на его карбокси-конце с 3'- и/или 5'-концом антисмыслового олигонуклеотида посредством линкера, который также может состоять из одной или более аминокислот, и предпочтительно также кэпирован на его амино-конце заместителем R^a, при этом R^a выбран из H, ацила, ацетила, бензоила или стеароида. В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

Как видно из таблицы ниже, неограничивающие примеры CPP для применения в данном документе включают -(RXR)₄-R^a (SEQ ID NO: 15), -R-(FFR)₃-R^a (SEQ ID NO: 16), -B-X-(RXR)₄-R^a (SEQ ID NO: 17), -B-X-R-(FFR)₃-R^a (SEQ ID NO: 18), -GLY-R-(FFR)₃-R^a (SEQ ID NO: 19), -GLY-R₅-R^a (SEQ ID NO: 20), -R₅-R^a (SEQ ID NO: 21), -GLY-R₆-R^a (SEQ ID NO: 11) и -R₆-R^a (SEQ ID NO: 10), где R^a выбран из H, ацила, ацетила, бензоила и стеароида, и где R представляет собой аргинин, X представляет собой 6-аминогексановую кислоту, B представляет собой β-аланин, F представляет собой фенилаланин, и GLY (или G) представляет собой глицин. CPP «R₅ (SEQ ID NO: 21)» предназначен для обозначения пептида из пяти (5) остатков аргинина, связанных вместе с помощью амидных связей (а не одного заместителя, например, R⁵ (SEQ ID NO: 21)). CPP «R₆ (SEQ ID NO: 10)» предназначен для обозначения пептида из шести (6) остатков аргинина, связанных вместе с помощью амидных связей (а не одного заместителя, например, R⁶ (SEQ ID NO: 10)). В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

Иллюстративные CPP представлены в **таблице 1** (SEQ ID NO: 10, 11 и 15-21).

Таблица 1. Иллюстративные проникающие в клетку пептиды		
Название	Последовательность	SEQ ID NO:
R ₆ G	RRRRRRG	11
R ₆	RRRRRR	10
(RXR) ₄	RXRRXRRXRRXR	15
(RFF) ₃ R	RFFRFFRFFR	16
(RXR) ₄ XB	RXRRXRRXRRXRXB	17

(RFF) ₃ RXB	RFFRFFRFFRXB	18
(RFF) ₃ RG	RFFRFFRFFRG	19
R ₅ G	RRRRRG	20
R ₅	RRRRR	21
R представляет собой аргинин; X представляет собой 6-аминогексановую кислоту; B представляет собой β-аланин; F представляет собой фенилаланин; G представляет собой глицин		

СРР, их синтез и способы конъюгирования с олигомером дополнительно описаны в публикации заявки на патент США № 2012/0289457 и публикациях международной заявки на патент №№ WO 2004/097017, WO 2009/005793 и WO 2012/150960, раскрытие которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид содержит заместитель «Z», определенный как комбинация СРР и линкера. Линкер соединяет СРР на его карбокси-конце с 3'-концом и/или 5'-концом олигонуклеотида. В различных вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид может содержать только один СРР, связанный с 3'-концом олигомера. В других вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид может содержать только один СРР, связанный с 5'-концом олигомера.

Линкер в составе Z может содержать, например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот.

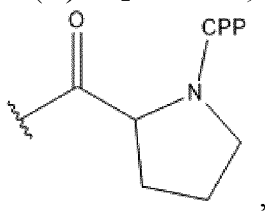
В конкретных вариантах осуществления Z выбран из:

-C(O)(CH₂)₅NH-CPP;

-C(O)(CH₂)₂NH-CPP;

-C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH-CPP;

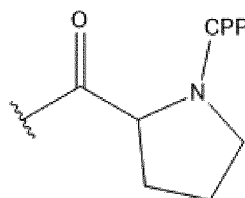
-C(O)CH₂NH-CPP; и формулы:



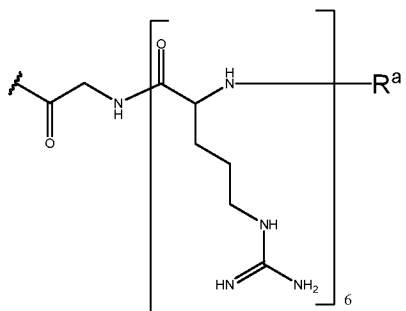
где СРР присоединен к линкерному фрагменту с помощью амидной связи на карбокси-конце СРР.

В различных вариантах осуществления СРР представляет собой пептид, богатый аргинином, описанный в данном документе и показанный в таблице 1. В различных вариантах осуществления богатый аргинином СРР представляет собой -R₅-R^a (*m. e.* пять остатков аргинина; SEQ ID NO: 21), где R^a выбран из H, ацила, ацетила, бензоила и стеарила. В определенных вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил. В различных вариантах осуществления СРР представляет собой SEQ ID NO: 21, а линкер выбран из группы, состоящей из -C(O)(CH₂)₅NH-, -C(O)(CH₂)₂NH-, -

В определенных вариантах осуществления богатый аргинином CPP представляет собой $-R_6-R^a$ (*т. е.* шесть остатков аргинина; SEQ ID NO: 10), где R^a выбран из H, ацила, ацетила, бензоила и стеароида. В определенных вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил. В различных вариантах осуществления CPP выбран из SEQ ID NO: 10, 15 или 16, а линкер выбран из группы, состоящей из $-C(O)(CH_2)_5NH-$, $-C(O)(CH_2)_2NH-$, $-$

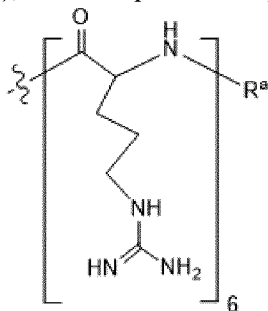


В определенных вариантах осуществления Z представляет собой $-C(O)CH_2NH-R_6-R^a$ («R₆» раскрыт как SEQ ID NO: 10), ковалентно связанный с антисмысловым олигомером по настоящему изобретению на 5'- и/или 3'-конце олигомера, где R^a представляет собой H, ацил, ацетил, бензоил или стеароил для экпирования amino-конца R₆ (SEQ ID NO: 10). В определенных вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил. В таких неограничивающих примерах CPP представляет собой $-R_6-R^a$ (SEQ ID NO: 10), а линкер представляет собой $-C(O)CH_2NH-$ (*m. e.* GLY). Данный конкретный пример Z, представляющий собой $-C(O)CH_2NH-R_6-R^a$ («R₆» раскрыт как SEQ ID NO: 10), также проиллюстрирован следующей структурой:



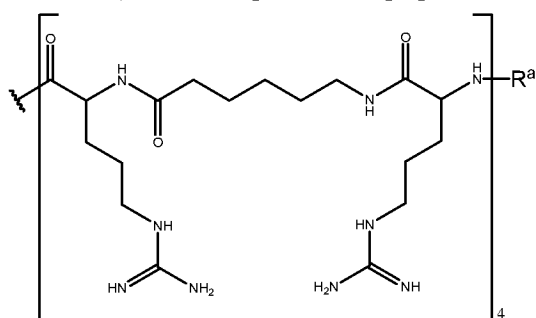
где R^a выбран из H, ацила, ацетила, бензоила и стеароида. В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

В различных вариантах осуществления CPP, представляющий собой $-R_6-R^a$ (SEQ ID NO: 10), также проиллюстрирован следующей формулой:

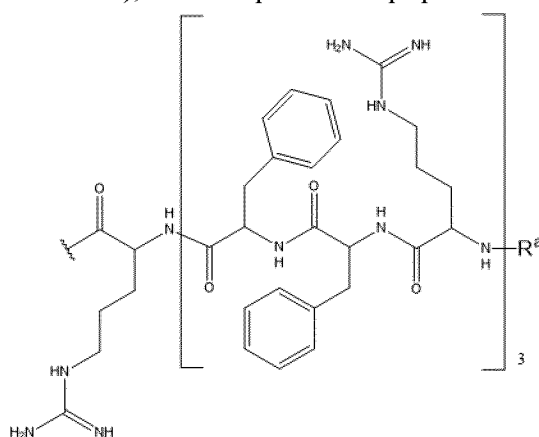


где R^a выбран из H, ацила, ацетила, бензоила и стеароида. В определенных вариантах осуществления CPP представляет собой SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

В некоторых вариантах осуществления CPP, представляющий собой $-(RXR)_4-R^a$ (SEQ ID NO: 15), также проиллюстрирован следующей формулой:

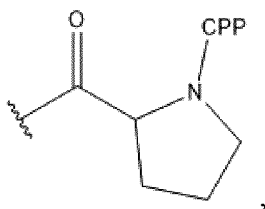


В различных вариантах осуществления CPP, представляющий собой $-R-(FFR)_3-R^a$ (SEQ ID NO: 16), также проиллюстрирован следующей формулой:

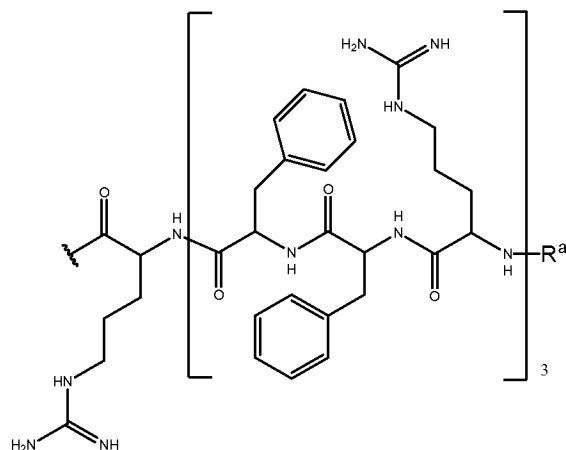


В различных вариантах осуществления Z выбран из:

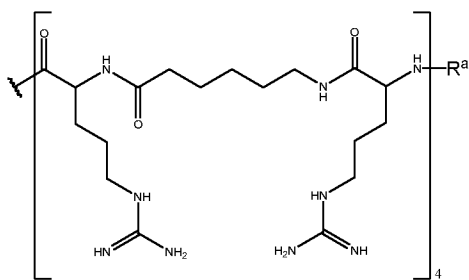
- C(O)(CH₂)₅NH-CPP;
- C(O)(CH₂)₂NH-CPP;
- C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH-CPP;
- C(O)CH₂NH-CPP и формулы:



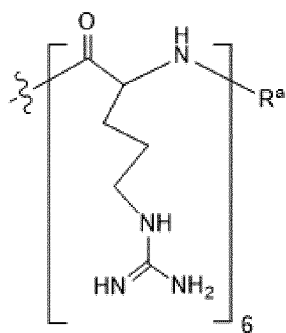
где CPP присоединен к линкерному фрагменту с помощью амидной связи на карбокси-конце CPP, и где CPP выбран из:



, $(-R-(FFR)_3-R^a)$ (SEQ ID NO: 16),



, $(-R(XR)_4-R^a)$ (SEQ ID NO: 15),



и $(-R_6-R^a)$ (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах осуществления R^a

представляет собой ацетил.

В некоторых вариантах осуществления каждый Nu от 1 до n и от 5' до 3' соответствует SEQ ID NO. 3.

В некоторых аспектах нуклеиновые основания модифицированного антисмыслового олигомера связаны с кольцевыми структурами на основе морфолиновой группы, где кольцевые структуры на основе морфолиновой группы присоединены с помощью фосфорсодержащих межсубъединичных связей, присоединяющих азот морфолиновой группы одной кольцевой структуры к 5'-экзоциклическому углероду смежной кольцевой структуры.

В некоторых аспектах нуклеиновые основания антисмыслового олигомера связаны с пептидной нуклеиновой кислотой (PNA), где сахарофосфатный полинуклеотидный остов заменен гибким псевдопептидным полимером, с которым связаны нуклеиновые основания.

В некоторых аспектах по меньшей мере одно из нуклеиновых оснований антисмыслового олигомера связано с запертой нуклеиновой кислотой (LNA), где структура запертой нуклеиновой кислоты представляет собой аналог нуклеотида, который является химически модифицированным, где рибозный фрагмент имеет дополнительный мостик, соединяющий 2'-кислород и 4'-углерод.

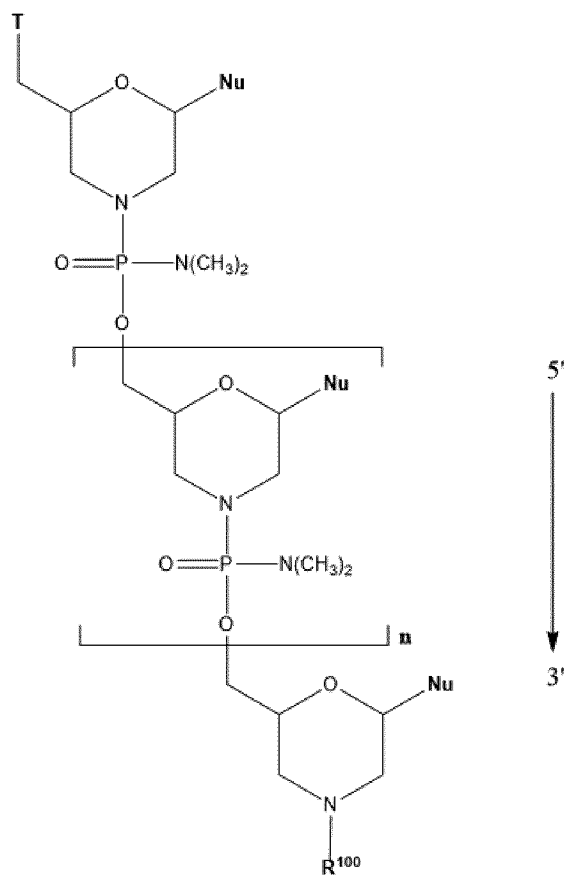
В некоторых аспектах по меньшей мере одно из нуклеиновых оснований антисмыслового олигомера связано с мостиковой нуклеиновой кислотой (BNA), где конформация сахара является ограниченной или запертой вследствие введения дополнительной мостиковой структуры в фуранозный каркас. В некоторых аспектах по меньшей мере одно из нуклеиновых оснований антисмыслового олигомера связано с 2'-O,4'-C-этилен-мостиковой нуклеиновой кислотой (ENA).

В некоторых аспектах модифицированный антисмысловый олигомер может содержать субъединицы незапертой нуклеиновой кислоты (UNA). UNA и олигомеры UNA являются аналогом РНК, в котором связь C2'-C3' в субъединице расщеплена.

В некоторых аспектах модифицированный антисмысловый олигомер содержит один или более фосфотиоатов (или S-олигонуклеотидов), в которых один из атомов немостикового кислорода заменен на атом серы. В некоторых аспектах модифицированный антисмысловый олигомер содержит один или более 2'-O-метил, 2'-O-MOE, MCE и 2'-F, в которых 2'-ОН рибозы замещена группой метила, метоксиэтила, 2-(N-метилкарбамоил)этила или фтора соответственно.

В некоторых аспектах модифицированный антисмысловый олигомер представляет собой трицикло-ДНК (tc-ДНК), которая является аналогом ДНК с ограниченной конформационной свободой, в которой каждый нуклеотид модифицирован посредством введения циклопропанового кольца для ограничения конформационной гибкости остова и оптимизации геометрии торсионного угла γ остова.

В различных аспектах в настоящем изобретении предусмотрены антисмысловые олигомеры в соответствии с формулой (I):

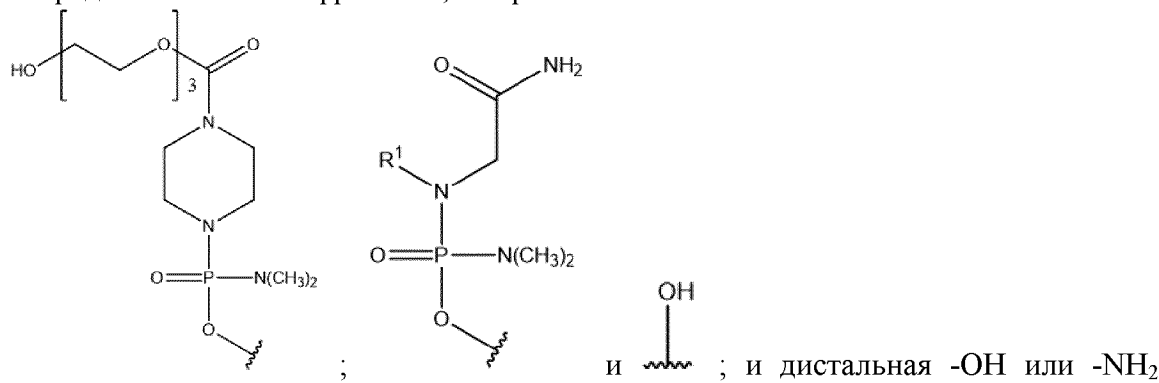


(I),

или их фармацевтически приемлемая соль, где:

каждый **Nu** представляет собой нуклеиновое основание, совместно с другими образующее нацеливающуюся последовательность;

T представляет собой фрагмент, выбранный из:



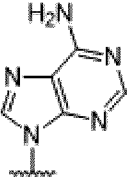
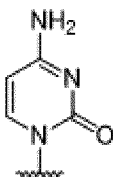
фрагмента **T** необязательно связана с проникающим в клетку пептидом.

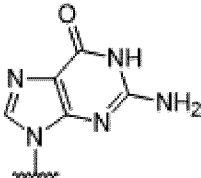
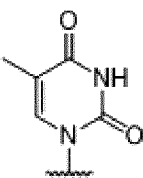
R¹⁰⁰ представляет собой водород или проникающий в клетку пептид;

каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует нуклеиновым основаниям в одном из следующего:

Сайт отжига	Нацеливающаяся последовательность [от 5' до 3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1

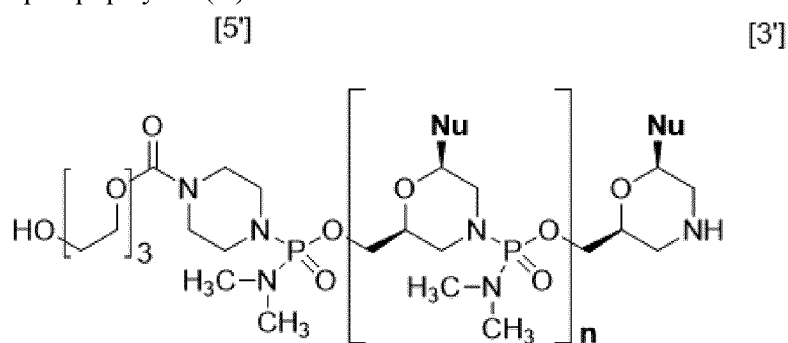
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

где А представляет собой , С представляет собой , G

представляет собой , и Т представляет собой .

В некоторых вариантах осуществления каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует нуклеиновым основаниям в одном из следующего: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует SEQ ID NO. 3.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены антисмысловые олигомеры формулы (II):



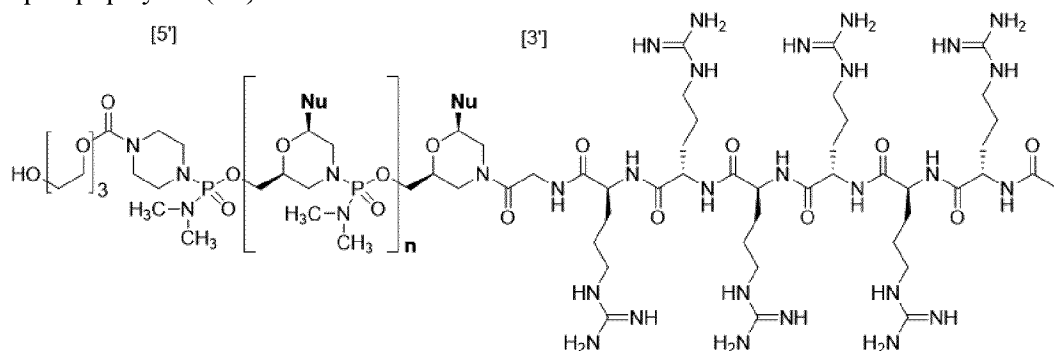
(II),

или их фармацевтически приемлемая соль, где каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует нуклеиновым основаниям в одном из следующего:

Сайт отжига	Нацеливающаяся последовательность [от 5' до 3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1

представляет собой , и Т представляет собой . В некоторых вариантах осуществления дистальная -ОН в формуле (II) связана с проникающим в клетку пептидом.

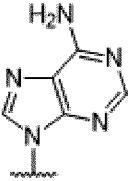
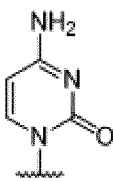
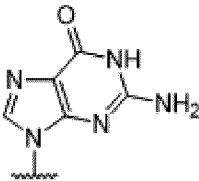
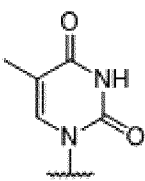
В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены антисмысловые олигомеры формулы (III):



или их фармацевтически приемлемая соль, где каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует нуклеиновым основаниям в одном из следующего:

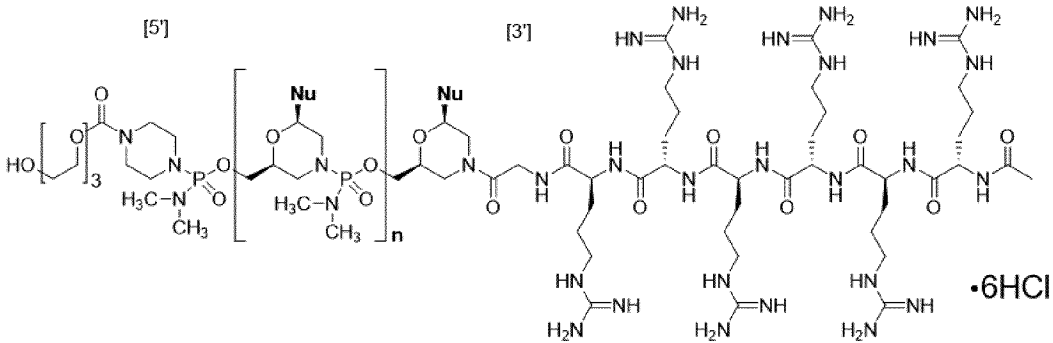
Сайт отжига	Нацеливающаяся последовательность [от 5'	SEQ ID NO:
-------------	--	------------

	до 3']	
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

где А представляет собой , С представляет собой , G представляет собой , и Т представляет собой . В некоторых вариантах осуществления дистальная -ОН в формуле (III) связана с проникающим в клетку пептидом.

В некоторых вариантах осуществления каждый Nu от 1 до n и от 5' до 3' соответствует SEQ ID NO. 3.

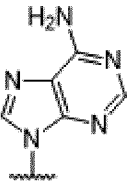
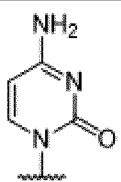
В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены антисмысловые олигомеры формулы (IV):

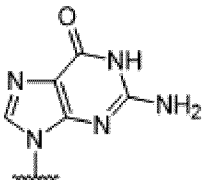
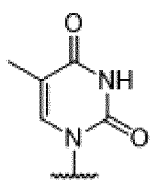


(IV),
где каждый Nu от 1 до n и от 5' до 3' соответствует нуклеиновым основаниям в одном из следующего:

Сайт отжига	Нацеливающаяся последовательность [от 5' до 3']	SEQ ID NO:
-------------	---	------------

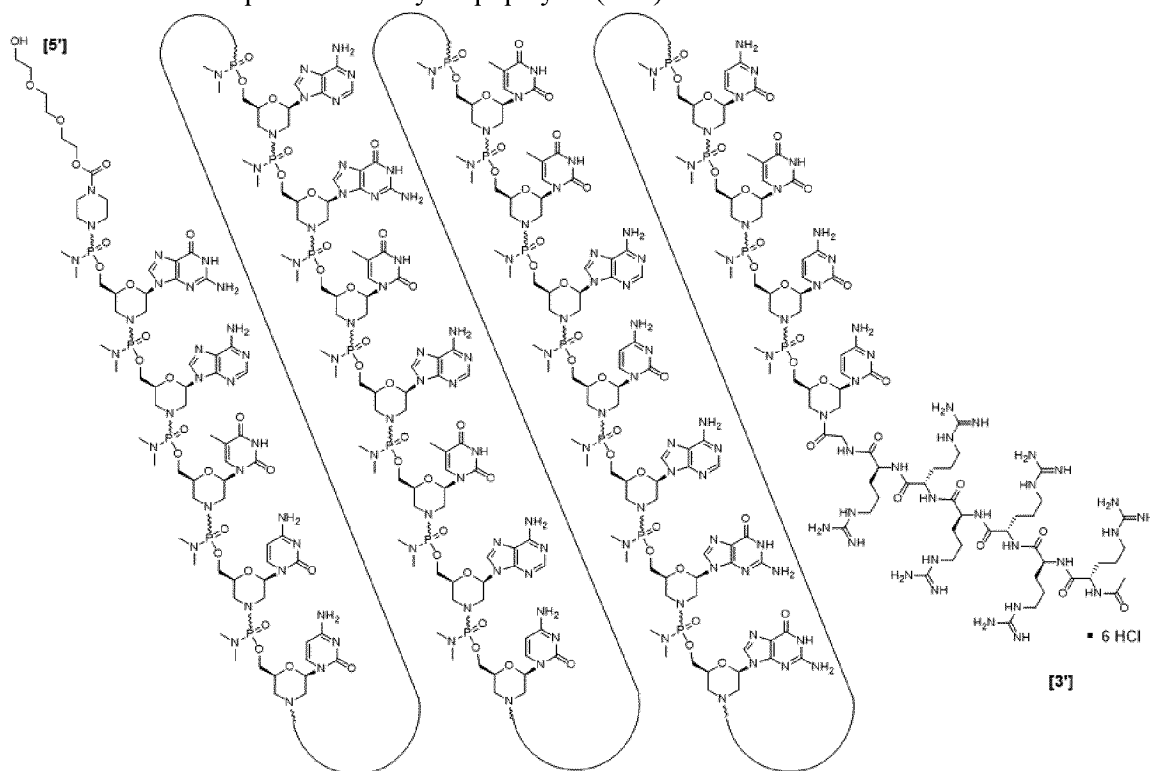
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

где А представляет собой , С представляет собой , G

представляет собой , и Т представляет собой .

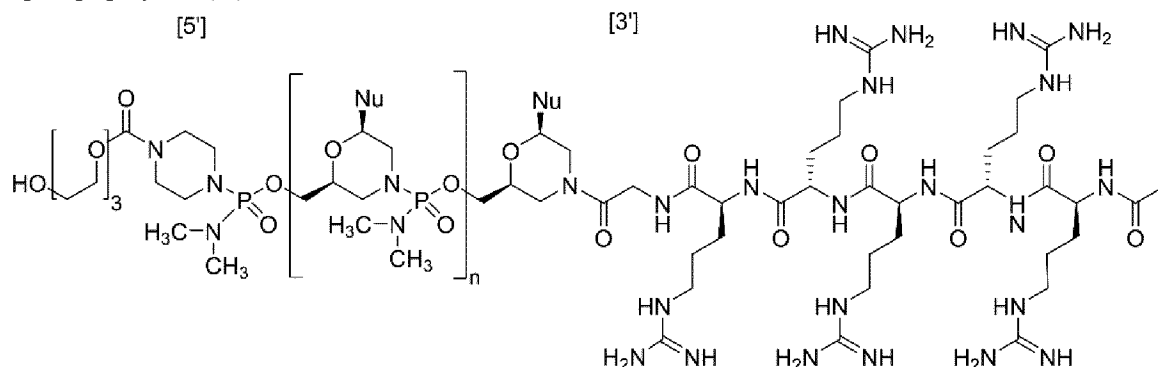
В некоторых вариантах осуществления каждый Nu от 1 до n и от 5' до 3' соответствует SEQ ID NO. 3.

В некоторых вариантах осуществления применительно к формуле (IV) антисмысловой олигомер соответствует формуле (IVa):



(IVa).

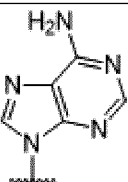
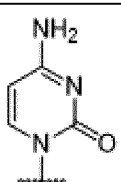
В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены антисмысловые олигомеры формулы (V):

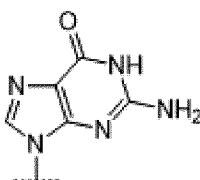
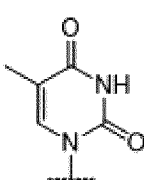


(V),

где каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует нуклеиновым основаниям в одном из следующего:

Сайт отжига	Нацеливающаяся последовательность [от 5' до 3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

где А представляет собой , С представляет собой , G

представляет собой , и Т представляет собой . В некоторых вариантах осуществления каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует SEQ ID NO. 3.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD) у нуждающегося в этом субъекта, где субъект характеризуется мутацией гена дистрофина, которая может быть скорректирована

посредством пропуска экзона 50, при этом способ предусматривает введение субъекту антисмыслового олигомера по настоящему изобретению. В настоящем изобретении также рассмотрено применение антисмысловых олигомеров по настоящему изобретению для изготовления лекарственного препарата для лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD) у нуждающегося в этом субъекта, где субъект характеризуется мутацией гена дистрофина, которая может быть скорректирована посредством пропуска экзона 50.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ восстановления рамки считывания mRNA для индукции образования дистрофина у субъекта, характеризующегося мутацией гена дистрофина, которая может быть скорректирована посредством пропуска экзона 50, при этом способ предусматривает введение субъекту антисмыслового олигомера по настоящему изобретению. В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ исключения экзона 50 из pre-mRNA дистрофина в ходе процессинга mRNA у субъекта, характеризующегося мутацией гена дистрофина, которая может быть скорректирована посредством пропуска экзона 50, при этом способ предусматривает введение субъекту антисмыслового олигомера по настоящему изобретению. В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ связывания экзона 50, интрона 49 и/или интрона 50 pre-mRNA дистрофина у субъекта, характеризующегося мутацией гена дистрофина, которая может быть скорректирована посредством пропуска экзона 50, при этом способ предусматривает введение субъекту антисмыслового олигомера по настоящему изобретению.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен антисмысловой олигомер по настоящему изобретению для применения в терапии. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен антисмысловой олигомер по настоящему изобретению для применения для лечения мышечной дистрофии Дюшенна. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен антисмысловой олигомер по настоящему изобретению для применения для изготовления лекарственного препарата для применения в терапии. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен антисмысловой олигомер по настоящему изобретению для применения для изготовления лекарственного препарата для лечения мышечной дистрофии Дюшенна.

В другом аспекте в настоящем изобретении также предусмотрены наборы для лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD) у нуждающегося в этом субъекта, где субъект характеризуется мутацией гена дистрофина, которая может быть скорректирована посредством пропуска экзона 50, при этом наборы содержат по меньшей мере антисмысловой олигомер по настоящему изобретению, упакованный в подходящий контейнер, и инструкции по его применению.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Варианты осуществления настоящего изобретения, как правило, относятся к улучшенным антисмысловым олигомерам и способам их применения, которые специально разработаны для индуцирования пропуска экзона в гене дистрофина человека. Дистрофин

играет жизненно важную роль в функции мышц, и различные связанные с мышцами заболевания характеризуются мутантными формами этого гена. Следовательно, в определенных вариантах осуществления улучшенные антисмысловые олигомеры, описанные в данном документе, индуцируют пропуск экзонов в мутантных формах гена дистрофина человека, таких как мутантные гены дистрофина, обнаруживаемые при мышечной дистрофии Дюшенна (DMD) и мышечной дистрофии Беккера (BMD).

Вследствие аберрантных событий сплайсинга mRNA, вызванных мутациями, экспрессия этих мутантных генов дистрофина человека приводит либо к образованию дефектного белка дистрофина, либо вообще не приводит к образованию определяемых количеств дистрофина - состояние, которое ведет к различным формам мышечной дистрофии. Чтобы исправить это состояние, антисмысловые олигомеры по настоящему изобретению гибридизируются с выбранными областями предварительно обработанной mRNA мутантного гена дистрофина человека, индуцируют пропуск экзонов и дифференциальный сплайсинг в этой mRNA дистрофина, которая в противном случае аберрантно сплайсируется, и тем самым обеспечивают образование мышечными клетками транскрипта mRNA, который кодирует функциональный белок дистрофин. В определенных вариантах осуществления полученный белок дистрофин необязательно представляет собой форму дистрофина «дикого типа», а скорее представляет собой усеченную, но все еще функциональную форму дистрофина.

Благодаря повышению уровней функционального белка дистрофина в мышечных клетках эти и подобные варианты осуществления пригодны для применения для профилактики и лечения мышечной дистрофии, в частности таких форм мышечной дистрофии, как DMD и BMD, которые характеризуются экспрессией дефектных форм белка дистрофина вследствие аберрантного сплайсинга mRNA. Описанные в данном документе специфические антисмысловые олигомеры дополнительно обеспечивают улучшенное экзон-специфическое нацеливание в отношении дистрофина по сравнению с другими олигомерами и, таким образом, предлагают значительные и практические преимущества по сравнению с альтернативными способами лечения соответствующих форм мышечной дистрофии.

Таким образом, настоящее изобретение относится к антисмысловым олигомерам или их фармацевтически приемлемым солям, способным к связыванию выбранной мишени для индуцирования пропуска экзона в гене дистрофина человека, где антисмысловые олигомеры содержат последовательность оснований, которая комплементарна целевой области экзона 50 pre-mRNA дистрофина, обозначенной как сайт отжига, при этом последовательность оснований и сайт отжига выбраны из:

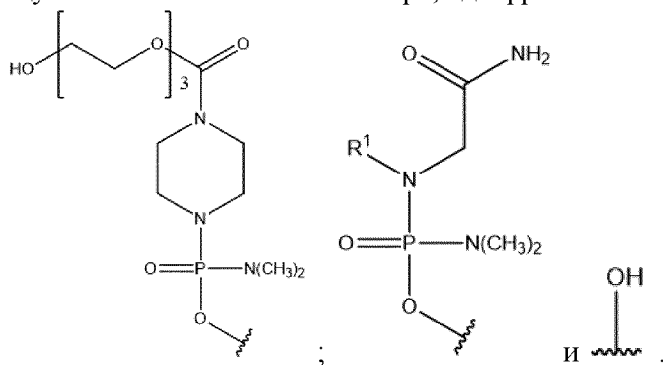
Сайт отжига	Нацеливающаяся последовательность [от 5' до 3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3

H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

где Т представляет собой тимин или урацил.

В некоторых вариантах осуществления каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует нуклеиновым основаниям в одном из следующего: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует нуклеиновым основаниям под SEQ ID NO: 3.

В одном аспекте антисмысловой олигомер содержит фрагмент **T**, присоединенный к 5'-концу антисмыслового олигомера, где фрагмент **T** выбран из:



В определенных вариантах осуществления антисмысловой олигомер конъюгирован с одним или более проникающими в клетку пептидами (названными в данном документе «CPR»). В определенных вариантах осуществления один или более CPR присоединены к концу антисмыслового олигомера. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один CPR присоединен к 5'-концу антисмыслового олигомера. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один CPR присоединен к 3'-концу антисмыслового олигомера. В определенных вариантах осуществления первый CPR присоединен к 5'-концу, а второй CPR присоединен к 3'-концу антисмыслового олигомера.

В некоторых вариантах осуществления CPR представляет собой пептид, богатый аргинином. Термин «богатый аргинином» относится к CPR, имеющему по меньшей мере 2 и предпочтительно 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 остатков аргинина, при этом каждый необязательно отделен одним или более незаряженными гидрофобными остатками, и необязательно содержащему приблизительно 6-14 аминокислотных остатков. Как объясняется ниже, CPR предпочтительно связан на его карбокси-конце с 3'- и/или 5'-концом антисмыслового олигонуклеотида посредством линкера, который также может состоять из одной или более аминокислот, и предпочтительно также кэпирован на его amino-конце заместителем R^a , при этом R^a выбран из H, ацила, ацетила, бензоила или стеароида. В некоторых вариантах

осуществления R^a представляет собой ацетил.

Как видно из таблицы ниже, неограничивающие примеры CPP для применения в данном документе включают -(RXR)₄-R^a (SEQ ID NO: 15), R-(FFR)₃-R^a (SEQ ID NO: 16), -B-X-(RXR)₄-R^a (SEQ ID NO: 17), -B-X-R-(FFR)₃-R^a (SEQ ID NO: 18), -GLY-R-(FFR)₃-R^a (SEQ ID NO: 19), -GLY-R₅-R^a (SEQ ID NO: 20), -R₅-R^a (SEQ ID NO: 21), -GLY-R₆-R^a (SEQ ID NO: 11) и -R₆-R^a (SEQ ID NO: 10), где R^a выбран из H, ацила, бензоила и стеароида, и где R представляет собой аргинин, X представляет собой 6-аминогексановую кислоту, B представляет собой β-аланин, F представляет собой фенилаланин, и GLY (или G) представляет собой глицин. CPP «R₅ (SEQ ID NO: 21)» предназначен для обозначения пептида из пяти (5) остатков аргинина, связанных вместе с помощью амидных связей (а не одного заместителя, например, R⁵ (SEQ ID NO: 21)). CPP «R₆ (SEQ ID NO: 10)» предназначен для обозначения пептида из шести (6) остатков аргинина, связанных вместе с помощью амидных связей (а не одного заместителя, например, R⁶ (SEQ ID NO: 10)). В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

Иллюстративные CPP представлены в **таблице 1** (SEQ ID NO: 10, 11 и 15-21).

Таблица 1. Иллюстративные проникающие в клетку пептиды		
Название	Последовательность	SEQ ID NO:
R ₆ G	RRRRRRG	11
R ₆	RRRRRR	10
(RXR) ₄	RXRRXRRXRRXR	15
(RFF) ₃ R	RFFRFFRFFR	16
(RXR) ₄ XB	RXRRXRRXRRXRXB	17
(RFF) ₃ RXB	RFFRFFRFFRXB	18
(RFF) ₃ RG	RFFRFFRFFRG	19
R ₅ G	RRRRRG	20
R ₅	RRRRR	21
R представляет собой аргинин; X представляет собой 6-аминогексановую кислоту; B представляет собой β-аланин; F представляет собой фенилаланин; G представляет собой глицин		

CPP, их синтез и способы конъюгирования с олигомером дополнительно описаны в публикации заявки на патент США № 2012/0289457 и публикациях международной заявки на патент №№ WO 2004/097017, WO 2009/005793 и WO 2012/150960, раскрытие которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид содержит заместитель «Z», определенный как комбинация CPP и линкера. Линкер соединяет CPP на его карбокси-конце с 3'-концом и/или 5'-концом олигонуклеотида. В различных вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид может содержать только один CPP, связанный с 3'-концом олигомера. В других вариантах осуществления антисмысловой

олигонуклеотид может содержать только один CPP, связанный с 5'-концом олигомера.

Линкер в составе Z может содержать, например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот.

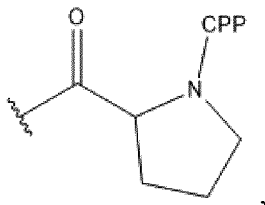
В конкретных вариантах осуществления Z выбран из:

-C(O)(CH₂)₅NH-CPP;

-C(O)(CH₂)₂NH-CPP;

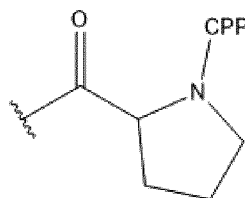
-C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH-CPP;

-C(O)CH₂NH-CPP и формулы:



где CPP присоединен к линкерному фрагменту с помощью амидной связи на карбокси-конце CPP.

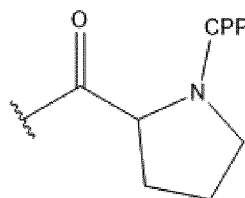
В различных вариантах осуществления CPP представляет собой пептид, богатый аргинином, описанный в данном документе и показанный в таблице 1. В определенных вариантах осуществления богатый аргинином CPP представляет собой -R₅-R^a (*т. е.* пять остатков аргинина; SEQ ID NO: 21), где R^a выбран из H, ацила, ацетила, бензоила и стеарила. В определенных вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил. В различных вариантах осуществления CPP выбран из SEQ ID NO: 15, 16 или 21, а линкер выбран из группы, состоящей из -C(O)(CH₂)₅NH-, -C(O)(CH₂)₂NH-, -



C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH-, -C(O)CH₂NH- и . В некоторых вариантах осуществления линкер содержит 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления CPP представляет собой SEQ ID NO: 21, а линкер представляет собой Gly. В некоторых вариантах осуществления CPP представляет собой SEQ ID NO: 20.

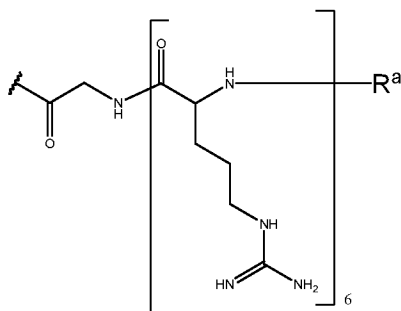
В определенных вариантах осуществления богатый аргинином CPP представляет собой -R₆-R^a (*т. е.* шесть остатков аргинина; SEQ ID NO: 10), где R^a выбран из H, ацила, ацетила, бензоила и стеарила. В определенных вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил. В различных вариантах осуществления CPP выбран из SEQ ID NO: 10, 15 или 16, а линкер выбран из группы, состоящей из -C(O)(CH₂)₅NH-, -C(O)(CH₂)₂NH-, -



$\text{C(O)(CH}_2)_2\text{NHC(O)(CH}_2)_5\text{NH-}$, $\text{-C(O)CH}_2\text{NH-}$ и . В некоторых вариантах осуществления линкер содержит 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот.

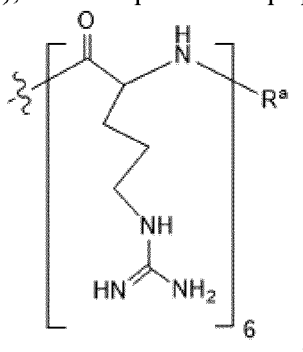
В некоторых вариантах осуществления CPP представляет собой SEQ ID NO: 10, а линкер представляет собой Gly. В некоторых вариантах осуществления CPP представляет собой SEQ ID NO: 11.

В определенных вариантах осуществления Z представляет собой $\text{-C(O)CH}_2\text{NH-R}_6\text{-R}^a$ («R₆» раскрыт как SEQ ID NO: 10), ковалентно связанный с антисмысловым олигомером по настоящему изобретению на 5'- и/или 3'-конце олигомера, где R^a представляет собой H, ацил, ацетил, бензоил или стеариол для экпирования amino-конца R₆ (SEQ ID NO: 10). В определенных вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил. В таких неограничивающих примерах CPP представляет собой $\text{-R}_6\text{-R}^a$ (SEQ ID NO: 10), а линкер представляет собой $\text{-C(O)CH}_2\text{NH-}$ (*m. e.* GLY). Данный конкретный пример Z, представляющий собой $\text{-C(O)CH}_2\text{NH-R}_6\text{-R}^a$ («R₆» раскрыт как SEQ ID NO: 10), также проиллюстрирован следующей структурой:



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

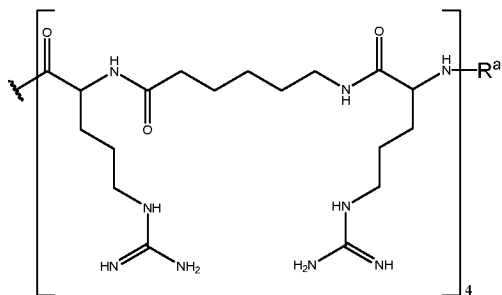
В различных вариантах осуществления CPP, представляющий собой $\text{-R}_6\text{-R}^a$ (SEQ ID NO: 10), также проиллюстрирован следующей формулой:



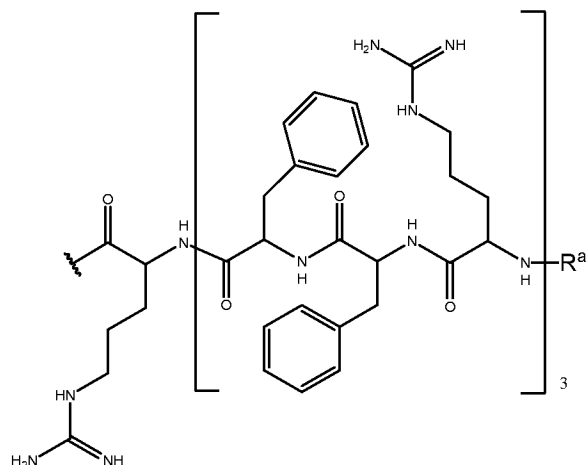
где R^a выбран из H, ацила, ацетила, бензоила и стеариола. В определенных вариантах осуществления CPP представляет собой SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

В некоторых вариантах осуществления CPP, представляющий собой $\text{-(RXR)}_4\text{-R}^a$

(SEQ ID NO: 15), также проиллюстрирован следующей формулой:

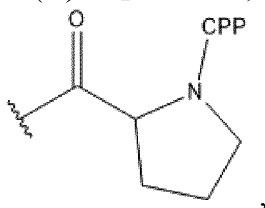


В различных вариантах осуществления CPP, представляющий собой $-R-(FFR)_3-R^a$ (SEQ ID NO: 16), также проиллюстрирован следующей формулой:

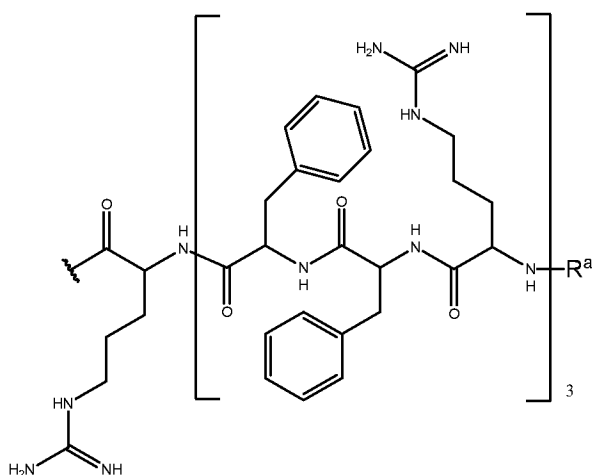


В различных вариантах осуществления Z выбран из:

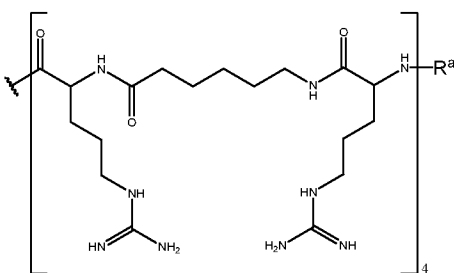
- C(O)(CH₂)₅NH-CPP;
- C(O)(CH₂)₂NH-CPP;
- C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH-CPP;
- C(O)CH₂NH-CPP; и формулы:



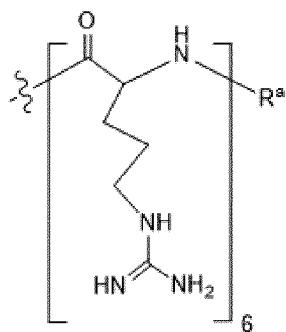
где CPP присоединен к линкерному фрагменту с помощью амидной связи на карбокси-конце CPP, и где CPP выбран из:



, $(-R-(FFR)_3-R^a)$ (SEQ ID NO: 16),



, $(-R(XR)_4-R^a)$ (SEQ ID NO: 15),



или $(-R_6-R^a)$ (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах осуществления

R^a представляет собой ацетил.

В некоторых вариантах осуществления каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует SEQ ID NO. 3.

В некоторых аспектах нуклеиновые основания модифицированного антисмыслового олигомера связаны с кольцевыми структурами на основе морфолиновой группы, где кольцевые структуры на основе морфолиновой группы присоединены с помощью фосфорсодержащих межсубъединичных связей, присоединяющих азот морфолиновой группы одной кольцевой структуры к 5'-экзоциклическому углероду смежной кольцевой структуры. В таком аспекте Т в каждой из последовательностей под SEQ ID NO: 1-9 предпочтительно представляет собой тимин.

В некоторых аспектах нуклеиновые основания антисмыслового олигомера связаны с пептидной нуклеиновой кислотой (PNA), где сахарофосфатный полинуклеотидный остов заменен гибким псевдопептидным полимером, с которым связаны нуклеиновые основания.

В некоторых аспектах по меньшей мере одно из нуклеиновых оснований антисмыслового олигомера связано с запертой нуклеиновой кислотой (LNA), где структуры

запертой нуклеиновой кислоты представляет собой аналоги нуклеотидов, которые являются химически модифицированным, где рибозный фрагмент имеет дополнительный мостик, соединяющий 2'-кислород и 4'-углерод. В таком аспекте каждое нуклеиновое основание, которое связано с LNA в каждой из последовательностей под SEQ ID NO: 1-9, содержит 5-метильную группу.

В некоторых аспектах по меньшей мере одно из нуклеиновых оснований антисмыслового олигомера связано с мостиковой нуклеиновой кислотой (BNA), где конформация сахара является ограниченной или запертой вследствие введения дополнительной мостиковой структуры в фуранозный каркас. В некоторых аспектах по меньшей мере одно из нуклеиновых оснований антисмыслового олигомера связано с 2'-O,4'-C-этилен-мостиковой нуклеиновой кислотой (ENA). В таких аспектах каждое нуклеиновое основание, которое связано с BNA или ENA в каждой из последовательностей под SEQ ID NO: 1-9, содержит 5-метильную группу.

В некоторых аспектах, если это допускается химическими компонентами остова, каждый тимин в SEQ ID NO: 1-9 представляет собой урацил.

Если не указано иное, то все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют такое же значение, как общепринятое специалистами, имеющими обычную квалификацию в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Несмотря на то, что при осуществлении или тестировании настоящего изобретения могут применяться любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, описаны предпочтительные способы и материалы. Для целей настоящего изобретения ниже определены следующие термины.

I. Определения

Используемый в данном документе термин «алкил», если не указано иное, относится к насыщенному разветвленному или неразветвленному углеводороду. В определенных вариантах осуществления алкильная группа представляет собой первичный, вторичный или третичный углеводород. В определенных вариантах осуществления алкильная группа содержит от одного до десяти атомов углерода, *т. е.* представляет собой C₁-C₁₀алкил. В определенных вариантах осуществления алкильная группа содержит от одного до шести атомов углерода, *т. е.* представляет собой C₁-C₆алкил. Термин включает как замещенные, так и незамещенные алкильные группы, включая галогенированные алкильные группы. В определенных вариантах осуществления алкильная группа представляет собой фторированную алкильную группу. Неограничивающие примеры фрагментов, которыми алкильная группа может быть замещена, выбраны из группы, состоящей из галогена (фтора, хлора, брома или йода), гидроксила, амина, алкиламина, ариламина, алкокси, арилокси, нитро, циано, сульфоновой кислоты, сульфата, фосфоновой кислоты, фосфата или фосфоната, либо незащищенных, либо защищенных в случае необходимости, как известно специалистам в данной области техники, например, как указано в Greene, *et al.*, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, Second Edition, 1991, включенном в данный документ посредством ссылки. В определенных вариантах осуществления алкильная

группа выбрана из группы, состоящей из метила, CF₃, CCl₃, CFCI₂, CF₂Cl, этила, CH₂CF₃, CF₂CF₃, пропила, изопропила, бутила, изобутила, втор-бутила, трет-бутила, пентила, изопентила, неопентила, гексила, изогексила, 3-метилпентила, 2,2-диметилбутила и 2,3-диметилбутила.

Фраза «может быть скорректирована посредством пропуска экзона 50», используемая в данном документе относительно субъекта или пациента, предполагает включение субъектов и пациентов, характеризующихся одной или более мутациями в гене дистрофина, которые при отсутствии пропуска экзона 50 pre-mRNA дистрофина вызывают смещение рамки считывания, тем самым нарушая трансляцию pre-mRNA, приводя к неспособности субъекта или пациента образовывать функциональный или полуфункциональный дистрофин. Определение того, характеризуется ли пациент мутацией в гене дистрофина, которая может быть скорректирована посредством пропуска экзона, находится в области компетенции специалиста в данной области техники (см., например, Aartsma-Rus et al. (2009) *Hum Mutat.* 30:293-299; Gurvich et al., *Hum Mutat.* 2009; 30(4) 633-640; и Fletcher et al. (2010) *Molecular Therapy* 18(6) 1218-1223.).

Используемый в данном документе термин «олигомер» относится к последовательности субъединиц, соединенных межсубъединичными связями. В определенных случаях термин «олигомер» используется для обозначения «антисмыслового олигомера». В случае «антисмысловых олигомеров» каждая субъединица состоит из (i) сахара, представляющего собой рибозу или ее производное; и (ii) связанного с ним нуклеотидного основания так, что порядок спаривания фрагментов азотистых оснований образует нуклеотидную последовательность, которая комплементарна целевой последовательности в нуклеиновой кислоте (как правило, РНК) согласно правилу Уотсон-Криковского спаривания оснований, с образованием гетеродуплекса нуклеиновая кислота:олигомер в пределах целевой последовательности при условии, что либо субъединица, либо межсубъединичная связь, либо обе не встречаются в природе. В определенных вариантах осуществления антисмысловой олигомер представляет собой фосфордиамидатный морфолиновый олигомер (РМО). В других вариантах осуществления антисмысловой олигомер представляет собой 2'-О-метилфосфоротиоат. В других вариантах осуществления антисмысловой олигомер по настоящему изобретению представляет собой пептидную нуклеиновую кислоту (PNA), запертую нуклеиновую кислоту (LNA) или мостиковую нуклеиновую кислоту (BNA), такую как 2'-О,4'-С-этилен-мостиковую нуклеиновую кислоту (ЕНА). Другие иллюстративные варианты осуществления описаны в данном документе.

Термины «комплементарный» и «комплементарность» относятся к двум или более олигомерам (т. е. каждый содержит последовательность нуклеиновых оснований), которые связаны друг с другом согласно Уотсон-Криковским правилам спаривания оснований. Например, последовательность нуклеиновых оснований «Т-Г-А (5' □ 3')» является комплементарной последовательности нуклеиновых оснований «А-С-Т (3' □ 5')». Комплементарность может быть «частичной», при которой не все нуклеиновые основания

данной последовательности нуклеиновых оснований совпадают с другой последовательностью нуклеиновых оснований в соответствии с правилами спаривания оснований. Например, в некоторых вариантах осуществления комплементарность между данной последовательностью нуклеиновых оснований и другой последовательностью нуклеиновых оснований может составлять приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. Или, в продолжение примера, может быть «полная» или «абсолютная» (100%) комплементарность между данной последовательностью нуклеиновых оснований и другой последовательностью нуклеиновых оснований. Степень комплементарности между последовательностями нуклеиновых оснований оказывает значительное влияние на эффективность и силу гибридизации между последовательностями.

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

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество составляет от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 200 мг/кг композиции, включающей антисмысловой олигомер, в течение периода лечения субъекта. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество составляет от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 200 мг/кг композиции, включающей антисмысловой олигомер, для увеличения количества дистрофин-положительных волокон у субъекта. В определенных вариантах осуществления эффективное количество составляет от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 200 мг/кг композиции, содержащей антисмысловой олигомер, для стабилизации, поддержания или улучшения пройденной дистанции, например в ходе теста с 6-минутной ходьбой (6MWT), у пациента относительно здорового сверстника.

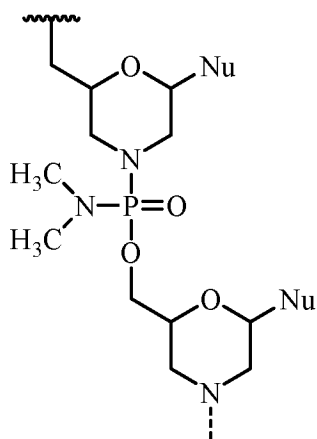
Под «усиливать», или «усиливающий», или «повышение», или «повышающий», или «стимулировать», или «стимулирующий» обычно понимают способность одного или более антисмысловых олигомеров или фармацевтических композиций на основе любого из вышеперечисленного вызывать или обуславливать больший физиологический ответ (т. е. эффекты по ходу транскрипции) в клетке или субъекте по сравнению с ответом, обусловленным либо отсутствием антисмыслового олигомера, либо контрольным соединением. Больший физиологический ответ может включать повышенную экспрессию функциональной формы белка дистрофина или повышенную связанную с дистрофином биологическую активность в мышечной ткани наряду с другими ответами, очевидными из понимания данной области техники и настоящего описания.

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

«Функциональный» белок дистрофин в целом относится к белку дистрофину, обладающему достаточной биологической активностью для снижения прогрессирующей дегенерации мышечной ткани, которая в другом случае характерна для мышечной дистрофии, как правило, по сравнению с измененной или «дефектной» формой белка дистрофина, которая присутствует у определенных субъектов с DMD или BMD. В качестве одного примера, может измеряться активность в культурах мышц *in vitro*, связанная с дистрофином, в соответствии с размером мышечной трубочки, организацией (или дезорганизацией) миофибрилл, сократительной активностью и произвольной кластеризацией рецепторов ацетилхолина (см., например, Brown et al., *Journal of Cell Science*. 112:209-216, 1999). Животные модели также представляют собой ценные ресурсы для исследования патогенеза заболевания и предусматривают средства для тестирования активности, связанной с дистрофином. Две наиболее широко применяемые животные модели для изучения DMD представляют собой мышей линии mdx и собак породы золотистый ретривер с мышечной дистрофией (GRMD), обе из которых являются дистрофин-отрицательными (см., например, Collins & Morgan, *Int J Exp Pathol* 84: 165-172, 2003). Эти и другие животные модели можно использовать для измерения функциональной активности различных форм белка дистрофина. Включая усеченные формы дистрофина, такие как те формы, которые образуются после введения определенных антисмысловых олигомеров для пропуска экзонов по настоящему изобретению.

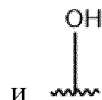
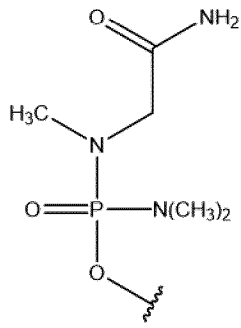
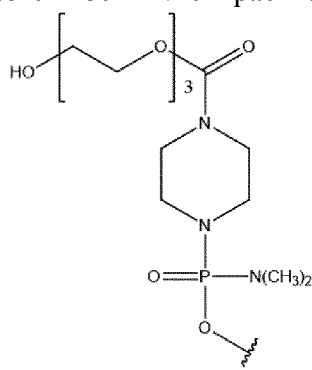
Термины «несовпадение» или «несовпадения» относятся к одному или более нуклеиновым основаниям (либо смежным, либо отдельным) в последовательности нуклеиновых оснований олигомера, которые не совпадают с целевой pre-mRNA в соответствии с правилами спаривания оснований. Хотя абсолютная комплементарность часто является желательной, некоторые варианты осуществления могут включать одно или более, но предпочтительно 6, 5, 4, 3, 2 или 1 несовпадение по отношению к целевой pre-mRNA. К ним относятся вариации в любом участке в пределах олигомера. В определенных вариантах осуществления антисмысловые олигомеры по настоящему изобретению включают вариации в последовательности нуклеиновых оснований вблизи концов, вариации во внутренней части и, если они присутствуют, как правило находятся в пределах приблизительно 6, 5, 4, 3, 2 или 1 субъединицы 5'- и/или 3'-конца. В определенных вариантах осуществления одно, два или три нуклеиновых основания могут быть удалены и все еще обеспечивать связывание с мишенью.

Термины «морфолиновый», «морфолиновый олигомер» и «РМО» относятся к фосфородиамидатному морфолиновому олигомеру со следующей общей структурой:



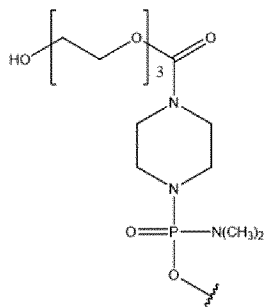
и как описано на фигуре 2 из Summerton, J., et al., *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 7: 187-195 (1997). Описанные в настоящем документе структуры на основе морфолина включают все стереоизомеры и таутомеры с вышеуказанной общей структурой. Характеристики синтеза, структур и связывания морфолиновых олигомеров подробно описаны в патентах США №№ 5698685, 5217866, 5142047, 5034506, 5166315, 5521063, 5506337, 8076476 и 8299206, все из которых включены в данный документ посредством ссылки.

В определенных вариантах осуществления структуры на основе морфолина конъюгированы на 5'- или 3'-конце олигомера с «хвостовым» фрагментом для повышения его стабильности и/или растворимости. Иллюстративные хвостовые фрагменты включают:

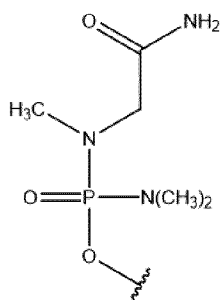


; и . Дистальная -ОН или -NH₂ фрагмента Т необязательно связана с проникающим в клетку пептидом.

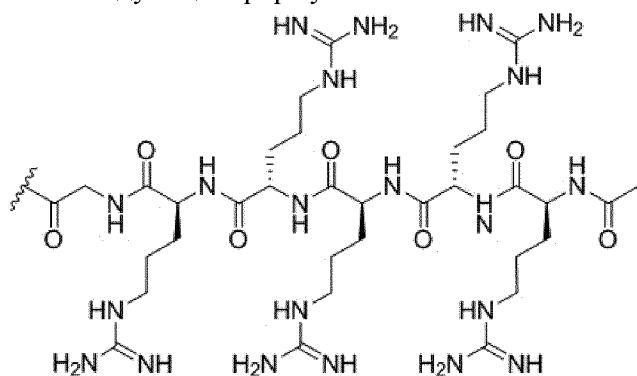
Применительно к приведенным выше иллюстративным хвостовым фрагментам «TEG» или «EG3» относятся к следующему хвостовому фрагменту:



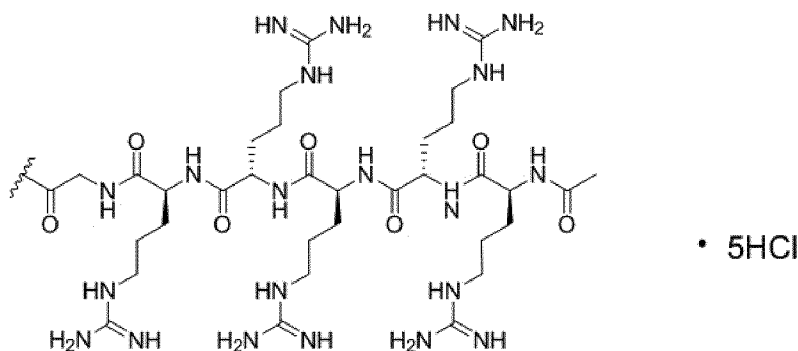
Применительно к приведенным выше иллюстративным хвостовым фрагментам «GT» относится к следующему хвостовому фрагменту:



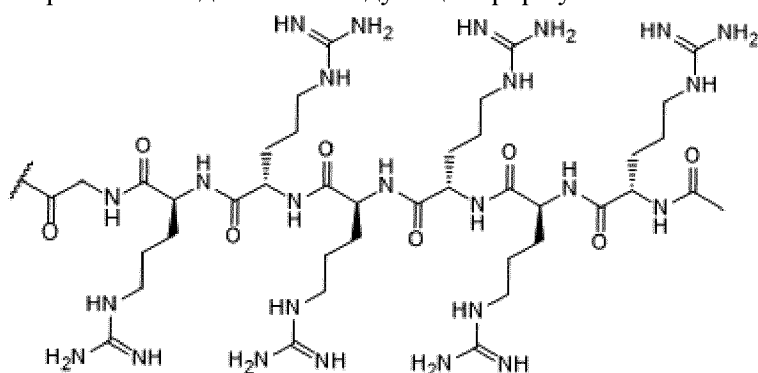
Применяемые в данном документе термины «-G-R₅ (SEQ ID NO: 20)» и «-G-R₅-Ac (SEQ ID NO: 20)» применяются взаимозаменяемо и относятся к пептидному фрагменту, конъюгированному с антисмысловым олигомером по настоящему изобретению. В различных вариантах осуществления «G» представляет собой остаток глицина, конъюгированный с «R₅ (SEQ ID NO: 21)» с помощью амидной связи, и каждый «R» представляет собой остаток аргинина, конъюгированный вместе амидными связями таким образом, что «R₅ (SEQ ID NO: 21)» означает пять (5) остатков аргинина, конъюгированных друг с другом с помощью амидных связей. Остатки аргинина могут характеризоваться любой стереоконфигурацией, например, остатки аргинина могут представлять собой остатки L-аргинина, остатки D-аргинина или смесь остатков D- и L-аргинина. В определенных вариантах осуществления «-G-R₅ (SEQ ID NO: 20)» или «-G-R₅-Ac (SEQ ID NO: 20)» связан с дистальной -OH или NH₂ «хвостового» фрагмента. В определенных вариантах осуществления «-G-R₅ (SEQ ID NO: 20)» или «-G-R₅-Ac (SEQ ID NO: 20)» конъюгированы с азотом морфолинового кольца на 3'-конце морфолиновой субъединицы антисмыслового олигомера PMO по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления «-G-R₅ (SEQ ID NO: 20)» или «-G-R₅-Ac (SEQ ID NO: 20)» конъюгированы с 3'-концом антисмыслового олигомера по настоящему изобретению и предусматривают соединение следующей формулы:



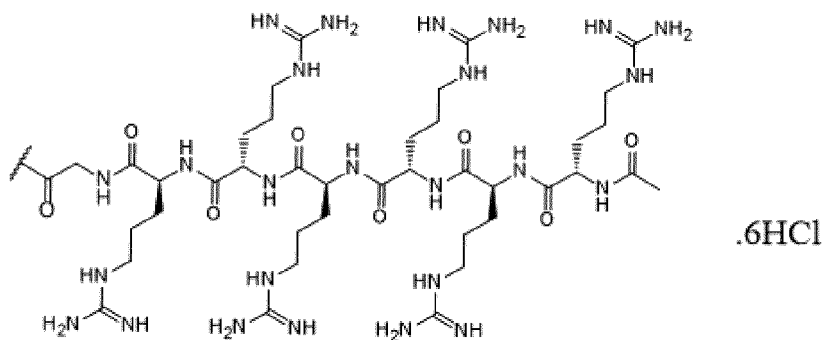
, или его фармацевтически приемлемую соль, или



Применяемые в данном документе термины «-G-R₆ (SEQ ID NO: 11)», и «-G-R₆-Ac (SEQ ID NO: 11)», и «R₆G (SEQ ID NO: 11)» применяются взаимозаменяемо и относятся к пептидному фрагменту, конъюгированному с антисмысловым олигомером по настоящему изобретению. В различных вариантах осуществления «G» представляет собой остаток глицина, конъюгированный с «R₆ (SEQ ID NO: 10)» с помощью амидной связи, и каждый «R» представляет собой остаток аргинина, конъюгированный вместе амидными связями таким образом, что «R₆ (SEQ ID NO: 10)» означает шесть (6) остатков аргинина, конъюгированных друг с другом с помощью амидных связей. Остатки аргинина могут характеризоваться любой стереоконфигурацией, например, остатки аргинина могут представлять собой остатки L-аргинина, остатки D-аргинина или смесь остатков D- и L-аргинина. В определенных вариантах осуществления «-G-R₆ (SEQ ID NO: 11)» или «-G-R₆-Ac (SEQ ID NO: 11)» связан с дистальной -OH или -NH₂ «хвостового» фрагмента. В определенных вариантах осуществления «-G-R₆ (SEQ ID NO: 11)» или «-G-R₆-Ac (SEQ ID NO: 11)» конъюгированы с азотом морфолинового кольца на 3'-конце морфолиновой субъединицы антисмыслового олигомера PMO по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления «-G-R₆ (SEQ ID NO: 11)» или «-G-R₆-Ac (SEQ ID NO: 11)» конъюгированы с 3'-концом антисмыслового олигомера по настоящему изобретению и предусматривают соединение следующей формулы:



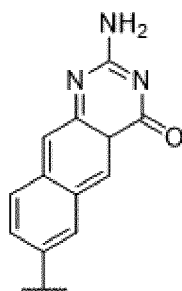
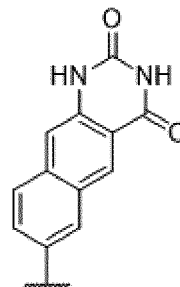
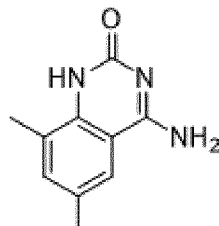
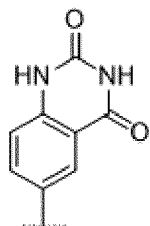
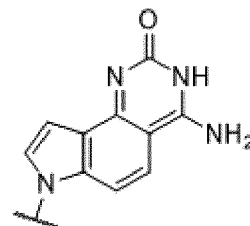
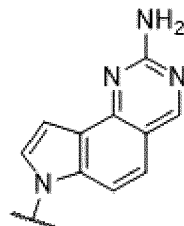
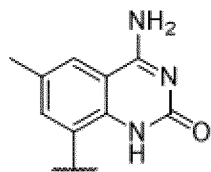
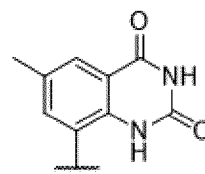
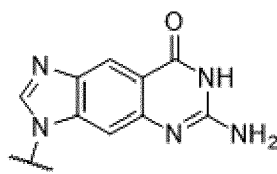
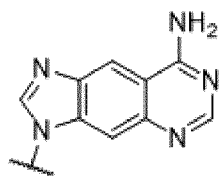
или



Термины «нуклеиновое основание» (Nu), «фрагмент, представляющий собой спаренное основание» или «основание» используются взаимозаменяемо для обозначения пуринового или пиримидинового основания, обнаруженного во встречающихся в природе или «нативных» ДНК или РНК (например, урацила, тимина, аденина, цитозина и гуанина), а также аналогов этих встречающихся в природе пуринов и пиримидинов. Эти аналоги могут придавать олигомеру улучшенные свойства, такие как аффинность связывания. Иллюстративные аналоги включают гипоксантин (основной компонент инозина); 2,6-диаминопурин; 5-метилцитозин; C5-пропинил-модифицированные пиримидины; 10-(9-(аминоэтоксифеноксазинил) (G-зажим) и т. п.

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

Дополнительные примеры фрагментов, представляющих собой спаренные основания, включают без ограничения нуклеиновые основания увеличенного размера, в структуру которых добавлено одно или более бензольных колец. Замены оснований нуклеиновых кислот, описанные в каталоге Glen Research (www.glenresearch.com); Krueger AT *et al.*, Acc. Chem. Res., 2007, 40, 141-150; Kool, ET, Acc. Chem. Res., 2002, 35, 936-943; Benner S.A., *et al.*, Nat. Rev. Genet., 2005, 6, 553-543; Romesberg, F.E., *et al.*, Curr. Opin. Chem. Biol., 2003, 7, 723-733; и Hirao, I., Curr. Opin. Chem. Biol., 2006, 10, 622-627; содержание которых включено в данный документ посредством ссылки, рассматриваются как применимые в антисмысловых олигомерах, описанных в данном документе. Примеры нуклеиновых оснований увеличенного размера включают представленные ниже, а также их таутомерные формы.

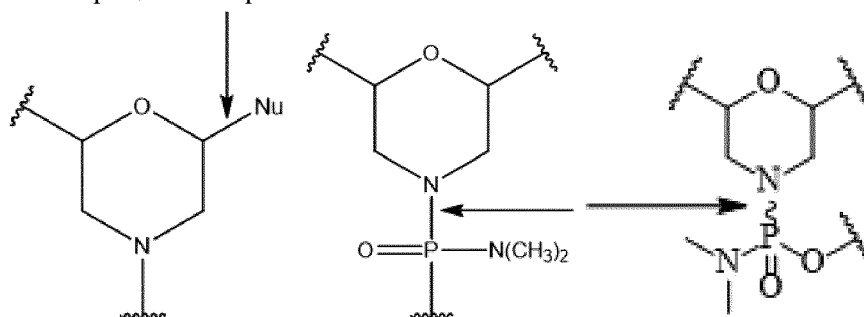


Используемые в данном документе фразы «парентеральное введение» и «введенный парентерально» означают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно посредством инъекции, и включают без ограничения внутривенные, внутримышечные, внутриартериальные, интратекальные, внутрикапсулярные, внутриглазные, внутрисердечные, внутрикожные, интраперитонеальные, транстрахеальные, подкожные, субкутикулярные, внутрисуставные, субкапсулярные, субарахноидальные, интраспинальные и внутригрудинные инъекцию и инфузию.

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

Прямая связь или волнистая связь, прочерченные к хиральному атому углерода или

фосфора в структурной формуле, используемые в данном документе, указывают на то, что стереохимия хирального атома углерода или фосфора является неопределенной и предназначена для включения всех форм хирального центра и/или их смесей. Примеры таких иллюстраций изображены ниже.



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

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

Термин «восстановление» в отношении синтеза или образования дистрофина обычно относится к образованию белка дистрофина, включая усеченные формы дистрофина, у пациента с мышечной дистрофией после лечения антисмысловым олигомером, описанным в данном документе. Процент дистрофин-положительных волокон у пациента после лечения может быть определен посредством мышечной биопсии с применением известных методик. Например, мышечная биопсия может быть проведена на подходящей мышце, такой как двуглавая мышца плеча, у пациента.

Анализ процентной доли дистрофин-положительных волокон может быть проведен

перед лечением и/или после лечения или в моменты времени в течение всего курса лечения. В некоторых вариантах осуществления биопсию после лечения проводят на мышце, противоположной той, на которой биопсию проводили перед лечением. Анализ экспрессии дистрофина до и после лечения может быть проведен с использованием любого подходящего метода анализа дистрофина. В некоторых вариантах осуществления иммуногистохимическое выявление проводят на срезах ткани, полученных после проведения мышечной биопсии, с применением антитела, которое представляет собой маркер для дистрофина, такого как моноклональное или поликлональное антитело. Например, можно применять антитело MANDYS106, которое является высокочувствительным маркером для дистрофина. Можно применять любое подходящее вторичное антитело.

В некоторых вариантах осуществления процент дистрофин-положительных волокон рассчитывают посредством деления количества положительных волокон на общее количество подсчитанных волокон. Образцы нормальных мышц содержат 100% дистрофин-положительных волокон. Следовательно, процент дистрофин-положительных волокон может быть выражен в виде процентной доли относительно нормальных волокон. Для контроля присутствия следовых количеств дистрофина в мышце до лечения, а также ревертантных волокон может быть установлен исходный уровень с использованием срезов мышц пациента до лечения при подсчете дистрофин-положительных волокон в мышцах после лечения. Это может быть использовано в качестве порогового значения для подсчета дистрофин-положительных волокон в срезах мышц этого пациента после лечения. В других вариантах осуществления окрашенные антителами срезы тканей также можно использовать для количественного определения дистрофина с помощью программного обеспечения для анализа изображений Bioquant (Bioquant Image Analysis Corporation, Нашвилл, Теннесси). Общую интенсивность сигнала флуоресценции дистрофина можно представить в виде процентной доли от нормы. Кроме того, для определения процентной доли дистрофин-положительных волокон можно использовать анализ способом вестерн-блоттинга с помощью моноклональных или поликлональных антител к дистрофину. Например, можно использовать антитело к дистрофину NCL-Dys1 от Leica Biosystems. Процентную долю дистрофин-положительных волокон можно также анализировать посредством определения экспрессии компонентов саркогликанового комплекса (β , γ) и/или нейрональной NOS.

В некоторых вариантах осуществления лечение с помощью антисмыслового олигомера по настоящему изобретению замедляет или понижает прогрессирующее нарушение функции и/или недостаточность дыхательных мышц у пациентов с DMD, появление которых следовало бы ожидать без применения лечения. В некоторых вариантах осуществления лечение с помощью антисмыслового олигомера по настоящему изобретению может понижать или устранять необходимость во вспомогательной вентиляции, осуществления которой следовало бы ожидать без применения лечения. В некоторых вариантах осуществления измерения дыхательной функции для отслеживания течения заболевания, а также оценка потенциальных терапевтических вмешательств

включают максимальное давление при вдохе (MIP), максимальное давление при выдохе (MEP) и форсированную жизненную емкость легких (FVC). С помощью показателей MIP и MEP измеряют уровень давления, который человек может создавать во время вдоха и выдоха, соответственно, и они являются чувствительными показателями силы дыхательных мышц. MIP представляет собой показатель слабости мышцы, представляющей собой диафрагму.

В некоторых вариантах осуществления MEP может снижаться до проявления изменений в других тестах функции легких, включая MIP и FVC. В определенных вариантах осуществления MEP может быть ранним признаком нарушения дыхательной функции. В определенных вариантах осуществления FVC можно использовать для измерения общего объема воздуха, выдохнутого во время усиленного выдоха после максимального вдоха. У пациентов с DMD FVC повышается наряду с физическим ростом до раннего подросткового возраста. Однако по мере того, как рост замедляется или останавливается вследствие прогрессирования заболевания и прогрессирует мышечная слабость, жизненная емкость легких входит в нисходящую фазу и снижается после достижения возраста 10-12 лет со средней скоростью, составляющей приблизительно 8-8,5 процентов в год. В определенных вариантах осуществления прогнозируемый процент MIP (MIP с коррекцией по весу), прогнозируемый процент MEP (MEP с коррекцией по возрасту) и прогнозируемый процент FVC (FVC с коррекцией по возрасту и росту) являются вспомогательными анализами.

Используемые в данном документе термины «субъект» и «пациент» включают любое животное, у которого проявляется симптом или которое подвержено риску проявления симптома, который можно лечить антисмысловым олигомером по настоящему изобретению, такое как субъект (или пациент), который имеет или подвержен риску наличия DMD или BMD или любых симптомов, связанных с такими состояниями (например, потеря мышечных волокон). Подходящие субъекты (пациенты) включают лабораторных животных (таких как мышь, крыса, кролик или морская свинка), сельскохозяйственных животных и домашних животных или питомцев (таких как кошка или собака). Включены приматы, отличные от человека, и, предпочтительно, пациенты-люди (или субъекты). Также включены способы образования дистрофина у субъекта (или пациента), характеризующегося мутацией гена дистрофина, которая может быть скорректирована посредством пропуска экзона 50.

Используемые в данном документе фразы «системное введение», «введенный системно», «периферическое введение» и «введенный периферически» означают введение соединения, лекарственного средства или другого материала, отличное от введения непосредственно в центральную нервную систему, в результате которого они поступают в организм пациента и, таким образом, подвергаются метаболизму и другим подобным процессам, например, подкожное введение.

Фраза «нацеливающаяся последовательность» или «последовательность оснований» относится к последовательности нуклеиновых оснований олигомера, которая

комплементарна последовательности нуклеотидов в целевой pre-mRNA. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения последовательность нуклеотидов в целевой pre-mRNA представляет собой сайт отжига экзона 50, интрона 49 и/или интрона 50 в pre-mRNA дистрофина, обозначенный как H50D(+04-18), H50D(+07-18), H50D(+07-16), H50D(+07-17), H50A(-19+07), H50D(+07-15), H50A(-02+23), H50D(+06-18) или H50D(+07-20). В одном варианте осуществления сайт отжига, на который нацеливается антисмысловый олигомер, описанный в данном документе, представляет собой H50D(+07-16).

«Лечение» субъекта (например, млекопитающего, такого как человек) или «обработка» клетки представляет собой любой тип вмешательства, применяемый в попытке изменить природное течение болезни у субъекта или в клетке. Лечение включает без ограничения введение олигомера или фармацевтической композиции на его основе и может быть осуществлено либо профилактически, либо после начала патологического события или контакта с этиологическим агентом. Лечение включает любой желаемый эффект в отношении симптомов или патологии заболевания или состояния, связанного с белком дистрофином, как при определенных формах мышечной дистрофии, и может включать, например, минимальные изменения или улучшения в одном или более измеряемых маркеров заболевания или состояния, подвергающегося лечению. Также включены «профилактические» способы лечения, которые могут быть направлены на снижение скорости прогрессирования заболевания или состояния, подлежащего лечению, задержку наступления этого заболевания или состояния или уменьшение тяжести его начала. «Лечение» или «профилактика» не обязательно означает полное устранение, излечение или предотвращение заболевания или состояния или связанных с ним симптомов.

В некоторых вариантах осуществления лечение антисмысловым олигомером по настоящему изобретению обеспечивает повышение образования нового дистрофина, задерживает прогрессирование заболевания, замедляет или снижает потерю способности передвигаться, снижает мышечное воспаление, снижает повреждение мышц, улучшает функцию мышц, снижает потерю легочной функции и/или усиливает регенерацию мышц, которых следовало бы ожидать в отсутствие лечения. В некоторых вариантах осуществления лечение позволяет сохранить на том же уровне, задержать или замедлить прогрессирование заболевания. В некоторых вариантах осуществления лечение позволяет сохранить способность передвигаться или снижает потерю способности передвигаться. В некоторых вариантах осуществления лечение позволяет сохранить легочную функцию или снижает потерю легочной функции. В некоторых вариантах осуществления лечение позволяет сохранить или увеличить устойчиво пройденную дистанцию у пациента, как измерено с помощью, например, теста с 6-минутной ходьбой (6MWT). В некоторых вариантах осуществления лечение позволяет сохранить или уменьшить время, необходимое для прохождения/пробега 10 метров (т. е. тест, включающий прохождение/пробегание 10 метров). В некоторых вариантах осуществления лечение позволяет сохранить или уменьшить время, необходимое для подъема из положения лежа (т. е. тест для оценки времени,

необходимого для подъема). В некоторых вариантах осуществления лечение позволяет сохранить или уменьшить время, необходимое для поднятия по четырем стандартным ступенькам (*т. е.* тест, включающий поднятие по четырем ступенькам). В некоторых вариантах осуществления лечение позволяет сохранить или снизить мышечное воспаление у пациента, как измерено с помощью, например, MRI (например, MRI мышц ноги). В некоторых вариантах осуществления с помощью MRI измеряют T2 и/или жировую фракцию для идентификации мышечной дегенерации. С помощью MRI можно идентифицировать изменения в структуре мышц и их составе, вызванные воспалением, отеком, повреждением мышцы и жировой инфильтрацией.

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

Потеря функции мышц у пациентов с DMD может происходить несмотря на нормальный рост и развитие в детстве. Действительно, дети младшего возраста с DMD могут демонстрировать повышение пройденной дистанции во время 6MWT в течение курса длительностью приблизительно 1 год, несмотря на прогрессирующее нарушение функции мышц. В некоторых вариантах осуществления 6MWD у пациентов с DMD сравнивается с типично развивающимися контрольными субъектами и с существующими нормативными данными о подходящих по возрасту и полу субъектах. В некоторых вариантах осуществления нормальный рост и развитие могут быть вычислены с применением уравнения, основывающегося на возрасте и росте, согласовывающегося с нормативными данными. Такое уравнение можно использовать для преобразования 6MWD в процент-прогнозируемое (прогнозируемое в %) значение у субъектов с DMD. В определенных

вариантах осуществления анализ прогнозируемых в % данных 6MWD представляет собой способ определения нормального роста и развития и может демонстрировать, что повышение функции в раннем возрасте (например, меньшем или равном 7-ми годам) представляет собой скорее устойчивые, нежели улучшенные способности у пациентов с DMD (Henricson et al. PLoS Curr., 2012, version 2, включен в данный документ посредством ссылки).

Была предложена и опубликована номенклатурная система антисмысловых молекул для того, чтобы различать различные антисмысловые молекулы (см. Mann et al., (2002) J Gen Med 4, 644-654). Эта номенклатура стала особенно актуальной при тестировании нескольких незначительно отличающихся антисмысловых молекул, направленных на один и тот же целевой участок, как показано ниже:

H#A/D(x:y).

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

II. Антисмысловые олигомеры

A. Антисмысловые олигомеры, разработанные для индуцирования пропуска экзона 50

В определенных вариантах осуществления антисмысловые олигомеры по настоящему изобретению комплементарны целевой области экзона 50, интрона 49 и/или интрона 50 гена дистрофина и индуцируют пропуск экзона 50. В частности, настоящее изобретение относится к антисмысловым олигомерам, комплементарным целевой области экзона 50, интрона 49 и/или интрона 50 pre-mRNA дистрофина, обозначенной как сайт отжига. В некоторых вариантах осуществления сайт отжига выбран из H50D(+04-18), H50D(+07-18), H50D(+07-16), H50D(+07-17), H50A(-19+07), H50D(+07-15), H50A(-02+23), H50D(+06-18) или H50D(+07-20). В некоторых вариантах осуществления сайт отжига представляет собой H50D(+07-16).

Антисмысловые олигомеры по настоящему изобретению нацелены на pre-mRNA дистрофина и индуцируют пропуск экзона 50 таким образом, что он исключается из зрелого сплайсированного транскрипта mRNA или подвергается пропуску. При пропуске экзона 50 нарушенная рамка считывания восстанавливается до мутации внутри рамки считывания.

Несмотря на то, что DMD включает различные генетические подтипы, антисмысловые олигомеры согласно настоящему раскрытию были специально разработаны для пропуска экзона 50 pre-mRNA дистрофина. Мутации DMD, которые могут быть скорректированы посредством пропуска экзона 50, включают подгруппу пациентов с DMD (4%).

Последовательность нуклеиновых оснований антисмыслового олигомера, которая индуцирует пропуск экзона 50, разработана таким образом, что она комплементарна специфической целевой последовательности внутри экзона 50, интрона 49 и/или интрона 50 pre-mRNA дистрофина. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер представляет собой РМО, где каждое морфолиновое кольцо РМО связано с нуклеиновым основанием, включая, например, нуклеиновые основания, обнаруженные в ДНК (аденин, цитозин, гуанин и тимин).

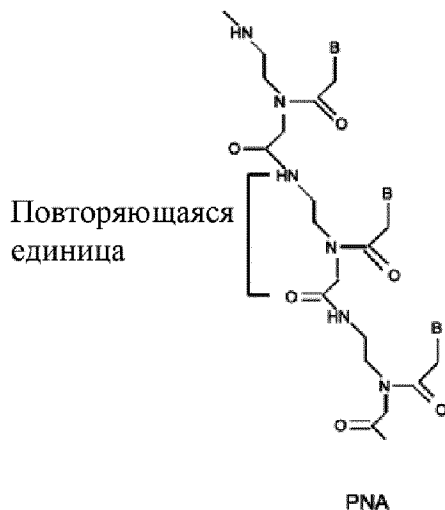
В. Особенности химических компонентов олигомеров

Антисмысловые олигомеры по настоящему изобретению могут использовать различные химические компоненты антисмысловых олигомеров. Примеры химических компонентов олигомеров включают без ограничения морфолиновые олигомеры, модифицированные фосфоротиоатом олигомеры, 2'-О-метил-модифицированные олигомеры, пептидную нуклеиновую кислоту (PNA), запертую нуклеиновую кислоту (LNA), фосфоротиоатные олигомеры, 2'-О-МОЕ-модифицированные олигомеры, 2'-фтор-модифицированный олигомер, 2'-О,4'-С-этилен-мостиковые нуклеиновые кислоты (ЕНА), трицикло-ДНК, фосфоротиоатные субъединицы трицикло-ДНК, 2'-О-[2-(N-метилкарбамоил)этил]-модифицированные олигомеры, включая комбинации любых из вышеперечисленных. Модифицированные фосфоротиоатом и 2'-О-Ме-модифицированные химические компоненты могут быть объединены с получением 2'-О-Ме-фосфоротиоатного остова. См., например, публикации РСТ №№ WO/2013/112053 и WO/2009/008725, которые включены посредством ссылки во всей своей полноте. При условии, что это допускается используемыми химическими компонентами, каждый Т в последовательности под любым из SEQ ID NO: 1-9 может являться урацилом. При условии, что это допускается используемыми химическими компонентами, соответствующие нуклеиновые основания в последовательности под любым из SEQ ID NO: 1-9 могут содержать 5-метильную группу. Иллюстративные варианты осуществления химических компонентов олигомеров по настоящему изобретению дополнительно описаны ниже.

1. Пептидные нуклеиновые кислоты (PNA)

Пептидные нуклеиновые кислоты (PNA) представляют собой аналоги ДНК, остов которых характеризуется структурным сходством с остовом, состоящим из дезоксирибозы, состоящие из единиц N-(2-аминоэтил)глицина, к которым присоединены пиримидиновые или пуриновые основания. PNA, содержащие природные пиримидиновые и пуриновые основания, гибридизуются с комплементарными олигомерами согласно Уотсон-Криковским правилам спаривания оснований и имитируют ДНК в отношении распознавания пар оснований. Остов PNA образован пептидными связями, а не фосфодиэфирными связями, что делает их хорошо подходящими для антисмыслового

применения (см. структуру ниже). Остов является незаряженным, в результате чего образуются дуплексы PNA/DNA или PNA/RNA, которые демонстрируют повышенную термостабильность по сравнению с нормальной термостабильностью. PNA не распознаются нуклеазами или протеазами. Неограничивающий пример PNA изображен ниже.



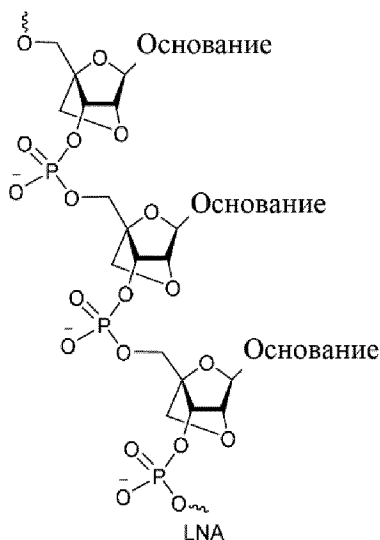
Несмотря на радикальное структурное изменение по сравнению с природной структурой, PNA способны к специфическому в отношении последовательности связыванию в форме спирали с ДНК или РНК. Характеристики PNA включают высокую аффинность связывания с комплементарной ДНК или РНК, дестабилизирующий эффект, вызванный несовпадением одной пары оснований, устойчивость к действию нуклеаз и протеаз, гибридизацию с ДНК или РНК независимо от концентрации соли и образование триплекса с гомопуриновой ДНК. В PANAGENE™ разработали свои собственные мономеры PNA Bts (Bts; бензотиазол-2-сульфонильная группа) и собственный способ олигомеризации. Олигомеризация PNA с применением мономеров PNA Bts состоит из повторяющихся циклов снятия защиты, связывания и экзирования. PNA можно получать синтетически с применением любой методики, известной из уровня техники. См., например, патент США №№: 6969766; 7211668; 7022851; 7125994; 7145006; и 7179896. См. также патенты США №№: 5539082; 5714331; и 5719262 для получения PNA. Дополнительные сведения о соединениях PNA можно найти в Nielsen *et al.*, *Science*, 254:1497-1500, 1991. Каждый из вышеуказанных источников включен посредством ссылки во всей своей полноте.

2. Запертые нуклеиновые кислоты (LNA)

Антисмысловые олигомеры также могут содержать субъединицы «запертых нуклеиновых кислот» (LNA). «LNA» являются представителями класса модифицированных соединений, называемых мостиковыми нуклеиновыми кислотами (BNA). BNA характеризуется ковалентной связью, которая блокирует конформацию рибозного кольца в C3'-эндо («северном») изломе плоскости углеводного кольца. В случае LNA мостик состоит из метилена, находящегося между положениями 2'-О и 4'-С. LNA обеспечивает улучшение в отношении предварительной организации остова и стэкинга

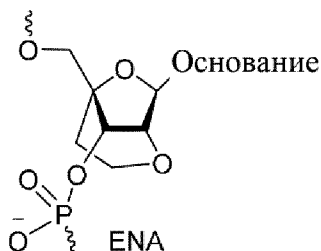
оснований с повышением уровня гибридизации и термической стабильности.

Структуры LNA можно найти, например, в Wengel, *et al.*, *Chemical Communications* (1998) 455; Koshkin *et al.*, *Tetrahedron* (1998) 54:3607; Jesper Wengel, *Accounts of Chem. Research* (1999) 32:301; Obika, *et al.*, *Tetrahedron Letters* (1997) 38:8735; Obika, *et al.*, *Tetrahedron Letters* (1998) 39:5401; и Obika, *et al.*, *Bioorganic Medicinal Chemistry* (2008) 16:9230, которые включены посредством ссылки во всей своей полноте. Неограничивающий пример LNA изображен ниже.



Антисмысловые олигомеры по настоящему изобретению могут включать одну или более LNA; в некоторых случаях антисмысловые олигомеры могут полностью состоять из LNA. Способы синтеза отдельных нуклеозидных субъединиц LNA и их включения в олигомеры описаны, например, в патентах США №№ 7572582, 7569575, 7084125, 7060809, 7053207, 7034133, 6794499 и 6670461, каждый из которых включен посредством ссылки во всей своей полноте. Типичные межсубъединичные линкеры включают фосфодиэфирные и фосфоротиоатные фрагменты; в качестве альтернативы можно использовать линкеры, не содержащие фосфор. Дополнительные варианты осуществления включают содержащий LNA антисмысловой олигомер, где каждая субъединица LNA отделена субъединицей ДНК. Определенные антисмысловые олигомеры состоят из чередующихся субъединиц LNA и ДНК, где межсубъединичный линкер представляет собой фосфоротиоат.

2'O,4'C-этилен-мостиговые нуклеиновые кислоты (ENA) являются еще одним представителем класса BNA. Неограничивающий пример изображен ниже.

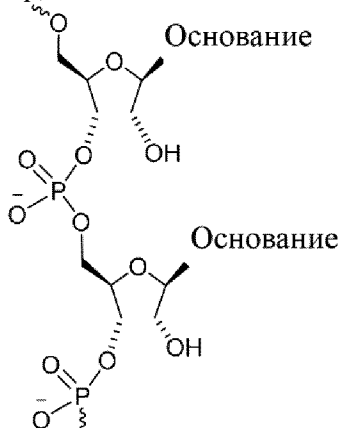


Олигомеры ENA и их получение описаны в Obika *et al.*, *Tetrahedron Lett* (1997) 38 (50): 8735, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Антисмысловые олигомеры по настоящему изобретению могут включать одну или более

субъединиц ENA.

3. Незапертая нуклеиновая кислота (UNA)

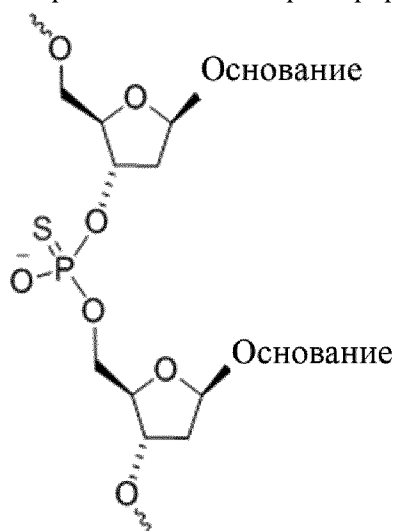
Антисмысловые олигомеры также могут содержать субъединицы незапёртой нуклеиновой кислоты (UNA). UNA и олигомеры UNA являются аналогом РНК, в котором связь C2'-C3' в субъединице расщеплена. В то время как LNA является конформационно ограниченной (по сравнению с ДНК и РНК), UNA является очень гибкой. UNA раскрыты, например, в WO 2016/070166. Неограничивающий пример UNA изображен ниже.



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

4. Фосфоротиоаты

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



Сульфирование межнауклеотидной связи снижает действие эндо- и экзонуклеаз, включая 5'-3' и 3'-5' ДНК-экзонуклеазу POL 1, нуклеазы S1 и P1, РНКазы, сывороточные нуклеазы и фосфодиэстеразу змеиного яда. Фосфоротиоаты получают двумя основными путями: посредством действия раствора элементарной серы в сероуглероде на гидрофосфонат или с помощью способа сульфуризации триэфиров фосфита либо с

тетраэтилтиурамдисульфидом (TETD), либо с 3Н-1,2-бензодитиол-3-он-1,1-диоксидом (BDTD) (см., например, Iyer *et al.*, *J. Org. Chem.* 55, 4693-4699, 1990, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). С помощью более поздних способов избегают проблемы нерастворимости элементарной серы в большинстве органических растворителей и токсичности сероуглерода. Способы с применением TETD и BDTD также обеспечивают получение фосфоротиоатов более высокой чистоты.

5. Трицикло-ДНК и трициклофосфоротиоатные субъединицы

Трицикло-ДНК (tc-ДНК) представляют собой класс аналогов ДНК с ограниченной конформационной свободой, в которых каждый нуклеотид модифицирован посредством введения циклопропанового кольца для ограничения конформационной гибкости остова и оптимизации геометрии торсионного угла γ остова. Содержащие один вид оснований аденин- и тиминсодержащие tc-ДНК образуют очень стабильные пары оснований А-Т с комплементарными РНК. Трицикло-ДНК и их синтез описаны в публикации международной патентной заявки № WO 2010/115993, которая настоящим включена посредством ссылки во всей своей полноте. Антисмысловые олигомеры по настоящему изобретению могут включать одну или более субъединиц трицикло-ДНК; в некоторых случаях антисмысловые олигомеры могут полностью состоять из субъединиц трицикло-ДНК.

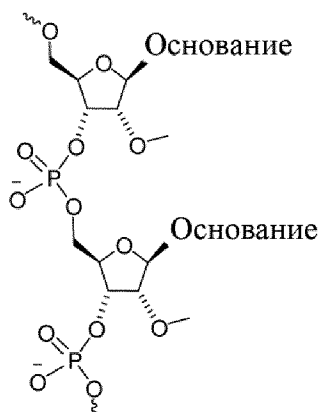
Трициклофосфоротиоатные субъединицы представляют собой субъединицы трицикло-ДНК с фосфоротиоатными межсубъединичными связями. Трициклофосфоротиоатные субъединицы и их синтез описаны в публикации международной патентной заявки № WO 2013/053928, которая настоящим включена посредством ссылки во всей своей полноте. Антисмысловые олигомеры по настоящему изобретению могут включать одну или более субъединиц трицикло-ДНК; в некоторых случаях антисмысловые олигомеры могут полностью состоять из субъединиц трицикло-ДНК. Неограничивающий пример трицикло-ДНК/трициклофосфоротиоатной субъединицы изображен ниже.



6. 2'-О-Метил-, 2'-О-МОЕ- и 2'-F-олигомеры

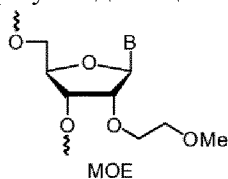
Молекулы «2'-О-Ме-олигомера» несут метильную группу при остатке 2'-ОН молекулы рибозы. 2'-О-Ме-РНК показывают такое же (или подобное) поведение, что и ДНК, но они защищены от разрушения нуклеазой. 2'-О-Ме-РНК также могут быть объединены фосфоротиоатными олигомерами (РТО) для дополнительной стабилизации. 2'-О-Ме-Олигомеры (фосфодизфир или фосфоротиоат) могут быть синтезированы в

соответствии со стандартными методиками в данной области техники (см., например, Yoo *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 32:2008-16, 2004, который включен посредством ссылки во всей своей полноте). Неограничивающий пример 2'-О-Ме-олигомера изображен ниже.

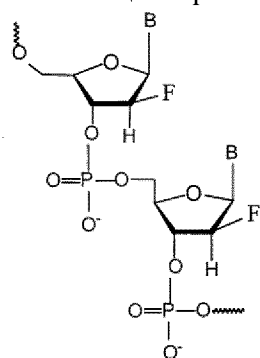


2'-O-Me

2'-О-Метоксиэтил-олигомеры (2'-О-МОЕ) несут метоксиэтильную группу при остатке 2'-ОН молекулы рибозы и обсуждаются в Martin *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 78, 486-504, 1995, который включен посредством ссылки во всей своей полноте. Неограничивающий пример субъединицы 2'-О-МОЕ изображен ниже.



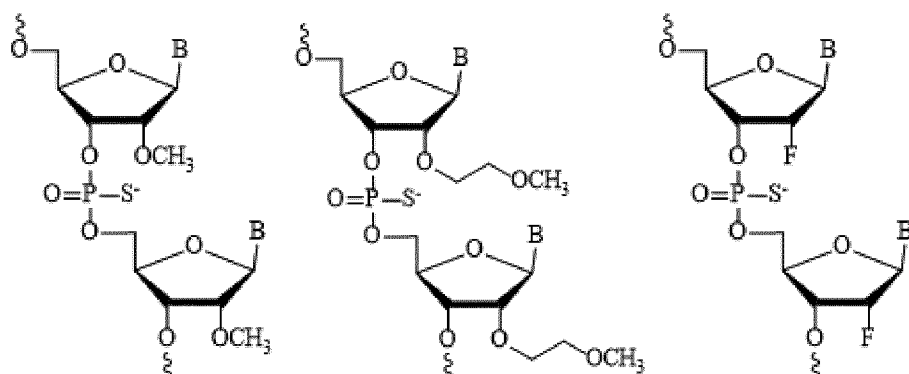
2'-Фтор-олигомеры (2'-F) содержат фтор-радикал в положении 2' вместо 2'-ОН. Неограничивающий пример 2'-F-олигомера изображен ниже.



2'-F

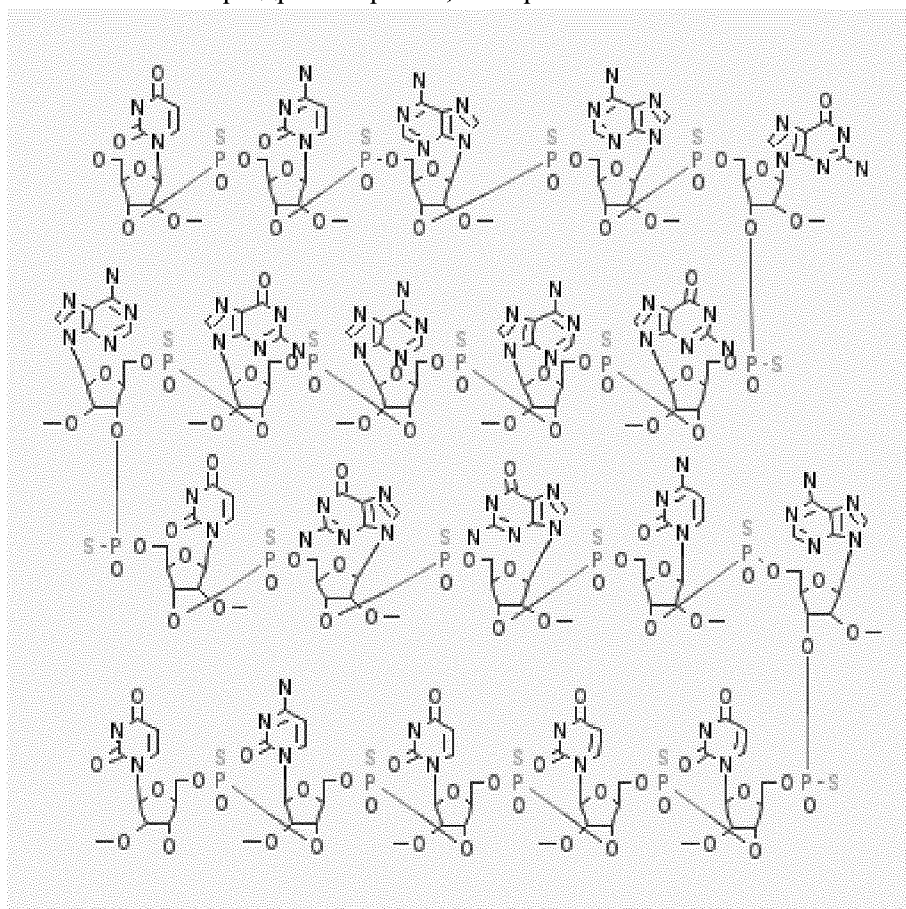
2'-Фтор-олигомеры дополнительно описаны в WO 2004/043977, который включен посредством ссылки во всей своей полноте.

2'-О-Метил, 2'-О-МОЕ и 2'-F-олигомеры также могут содержать одну или более фосфоротиоатных (PS) связей, как изображено ниже.

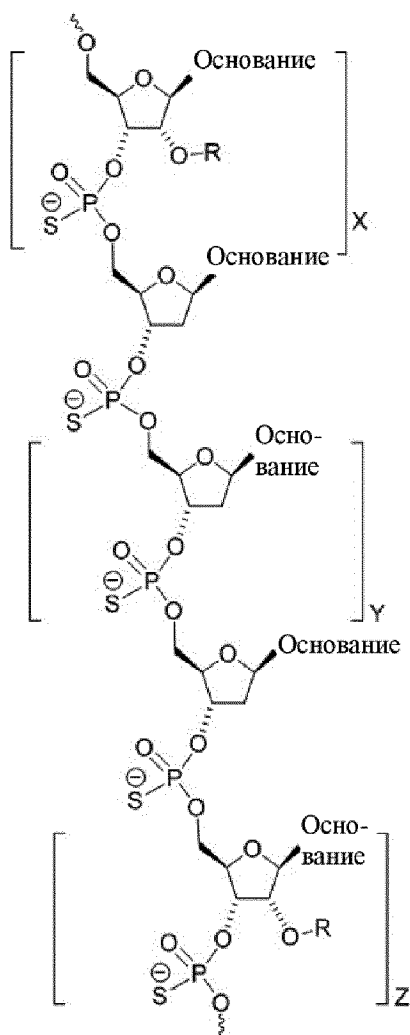


2'-O-Метил-PS 2'-O-MOE-PS 2'-F-PS

Дополнительно 2'-O-метил-, 2'-O-MOE- и 2'-F-олигомеры могут содержать межсубъединичные PS-связи на протяжении всей структуры олигомера, например, как в 2'-O-метил-PS-олигомере дрисаперсене, изображенном ниже.



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



где:

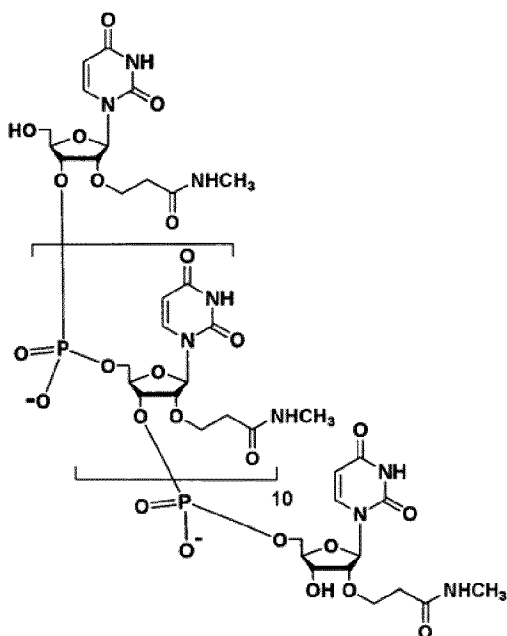
R представляет собой $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ (метоксиэтил или MOE); и

X, Y и Z обозначают число нуклеотидов, содержащихся в каждой из обозначенных областей с 5'-сегментом, центральным гэпом и 3'-сегментом соответственно.

Антисмысловые олигомеры по настоящему изобретению могут содержать одну или более 2'-О-метил-, 2'-О-MOE- и 2'-F-субъединиц и могут использовать любые межсубъединичные связи, описанные в данном документе. В некоторых случаях антисмысловой олигомер по настоящему изобретению может полностью состоять из 2'-О-метил-, 2'-О-MOE или 2'-F-субъединиц. Один вариант осуществления антисмысловых олигомеров по настоящему изобретению полностью состоит из 2'-О-метил-субъединиц.

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

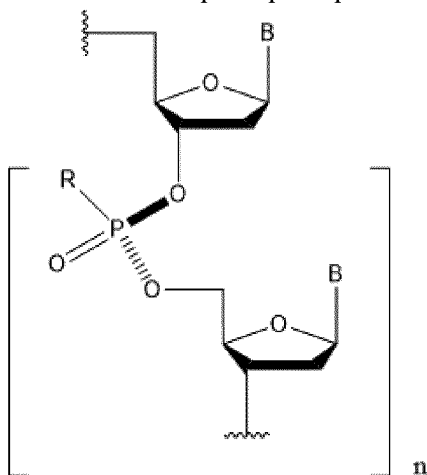
MCE представляют собой другой пример 2'-О-модифицированных рибонуклеозидов, применимых в антисмысловых олигомерах по настоящему изобретению. В данном случае 2'-ОН подвергают дериватизации с получением 2-(N-метилкарбамоил)этильного фрагмента для повышения устойчивости к действию нуклеаз. Неограничивающий пример MCE-олигомера изображен ниже.



МСЕ и их синтез описаны в Yamada *et al.*, *J. Org. Chem.* (2011) 76(9):3042-53, который включен посредством ссылки во всей своей полноте. Антисмысловые олигомеры по настоящему изобретению могут включать одну или более субъединиц МСЕ.

8. Стереоспецифические олигомеры

Стереоспецифические олигомеры представляют собой олигомеры, стереохимия каждой фосфорсодержащей связи в которых определяется способом синтеза таким образом, что это приводит к получению практически стереохимически чистого олигомера. Неограничивающий пример стереоспецифического олигомера изображен ниже.



В вышеприведенном примере каждый атом фосфора в олигомере характеризуется одинаковой стереоконфигурацией. Дополнительные примеры включают олигомеры, описанные в данном документе. Например, LNA, ENA, трицикло-ДНК, МСЕ, 2'-О-метил-, 2'-О-МОЕ-, 2'-F-олигомеры и олигомеры на основе морфолина можно получать со стереоспецифическими фосфорсодержащими межнуклеозидными связями, такими как, например, фосфотриатные, фосфодиэфирные, фосфорамидатные, фосфородиамидатные или другие фосфорсодержащие межнуклеозидные связи. Стереоспецифические олигомеры, способы получения, синтез с контролем хиральности, разработка хиральности и хиральные

вспомогательные вещества для применения для получения таких олигомеров подробно описаны, например, в WO2017192664, WO2017192679, WO2017062862, WO2017015575, WO2017015555, WO2015107425, WO2015108048, WO2015108046, WO2015108047, WO2012039448, WO2010064146, WO2011034072, WO2014010250, WO2014012081, WO20130127858 и WO2011005761, каждый из которых настоящим включен посредством ссылки во всей своей полноте.

Стереоспецифические олигомеры могут содержать фосфорсодержащие межнуклеозидные связи в конфигурации R_p или S_p . Хиральные фосфорсодержащие связи, в которых пространственная конфигурация связей является контролируемой, называются «стереохимически чистыми», в то время как хиральные фосфорсодержащие связи, в которых пространственная конфигурация связей не является контролируемой, называются «стереохимически произвольными». В определенных вариантах осуществления олигомеры по настоящему изобретению содержат множество стереохимически чистых и стереохимически произвольных связей таким образом, что полученный олигомер содержит стереохимически чистые субъединицы в предварительно определенных положениях олигомера. Пример расположения стереохимически чистых субъединиц предусмотрен в публикации международной патентной заявки номер WO 2017/062862 A2 на фигурах 7А и 7В. В одном варианте осуществления все хиральные фосфорсодержащие связи в олигомере являются стереохимически произвольными. В одном варианте осуществления все хиральные фосфорсодержащие связи в олигомере являются стереохимически чистыми.

В одном варианте осуществления олигомера с n хиральных фосфорсодержащих связей (где n представляет собой целое число, равное 1 или больше) все n хиральных фосфорсодержащих связей в олигомере являются стереохимически произвольными. В одном варианте осуществления олигомера с n хиральных фосфорсодержащих связей (где n представляет собой целое число, равное 1 или больше) все n хиральных фосфорсодержащих связей в олигомере являются стереохимически чистыми. В одном варианте осуществления олигомера с n хиральных фосфорсодержащих связей (где n представляет собой целое число, равное 1 или больше) по меньшей мере 10% (с округлением до ближайшего целого числа) из n фосфорсодержащих связей в олигомере являются стереохимически чистыми. В одном варианте осуществления олигомера с n хиральных фосфорсодержащих связей (где n представляет собой целое число, равное 1 или больше) по меньшей мере 20% (с округлением до ближайшего целого числа) из n фосфорсодержащих связей в олигомере являются стереохимически чистыми. В одном варианте осуществления олигомера с n хиральных фосфорсодержащих связей (где n представляет собой целое число, равное 1 или больше) по меньшей мере 30% (с округлением до ближайшего целого числа) из n фосфорсодержащих связей в олигомере являются стереохимически чистыми. В одном варианте осуществления олигомера с n хиральных фосфорсодержащих связей (где n представляет собой целое число, равное 1 или больше) по меньшей мере 40% (с округлением до ближайшего целого числа) из n фосфорсодержащих связей в олигомере являются стереохимически чистыми. В одном варианте осуществления олигомера с n

[illegible]

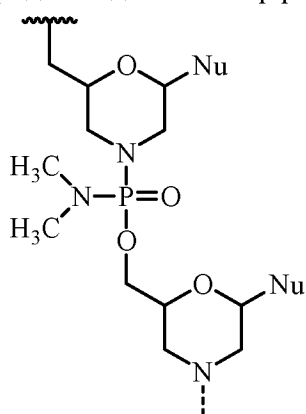
фосфорсодержащими связями (где n представляет собой целое число, равное 1 или больше) олигомер содержит по меньшей мере 19 смежных стереохимически чистых фосфорсодержащих связей в одной и той же стереоориентации (*m. e.* либо S_P , либо R_P). В одном варианте осуществления олигомера с n хиральными фосфорсодержащими связями (где n представляет собой целое число, равное 1 или больше) олигомер содержит по меньшей мере 20 смежных стереохимически чистых фосфорсодержащих связей в одной и той же стереоориентации (*m. e.* либо S_P , либо R_P).

В одном варианте осуществления олигомера с n хиральными фосфорсодержащими связями (где n представляет собой целое число, равное 1 или больше) олигомер содержит по меньшей мере 2 смежных стереохимически чистых фосфорсодержащих связей в одной и той же стереоориентации (*m. e.* либо S_P , либо R_P) и по меньшей мере 2 смежных стереохимически чистых фосфорсодержащих связей в другой стереоориентации. Например, олигомер может содержать по меньшей мере 2 смежных стереохимически чистых фосфорсодержащих связей в ориентации S_P и по меньшей мере 2 смежных стереохимически чистых фосфорсодержащих связей в ориентации R_P .

В одном варианте осуществления олигомера с n хиральными фосфорсодержащими связями (где n представляет собой целое число, равное 1 или больше) олигомер содержит по меньшей мере 2 смежных стереохимически чистых фосфорсодержащих связей в одной и той же стереоориентации, характеризующихся поочередным расположением. Например, олигомер может содержать следующее в данном порядке: 2 или более R_P , 2 или более S_P и 2 или более R_P и т. д.

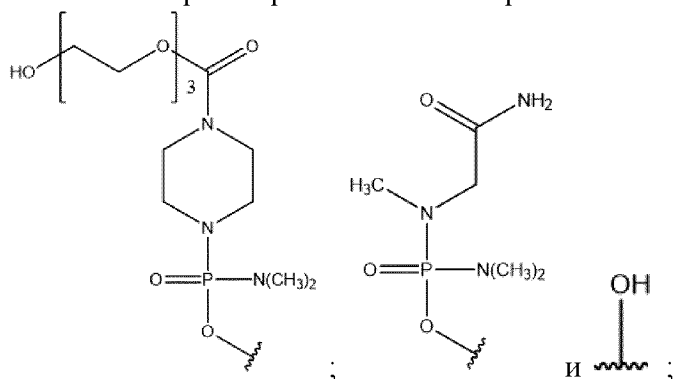
9. Морфолиновые олигомеры

Иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к фосфородиамидатным морфолиновым олигомерам со следующей общей структурой:



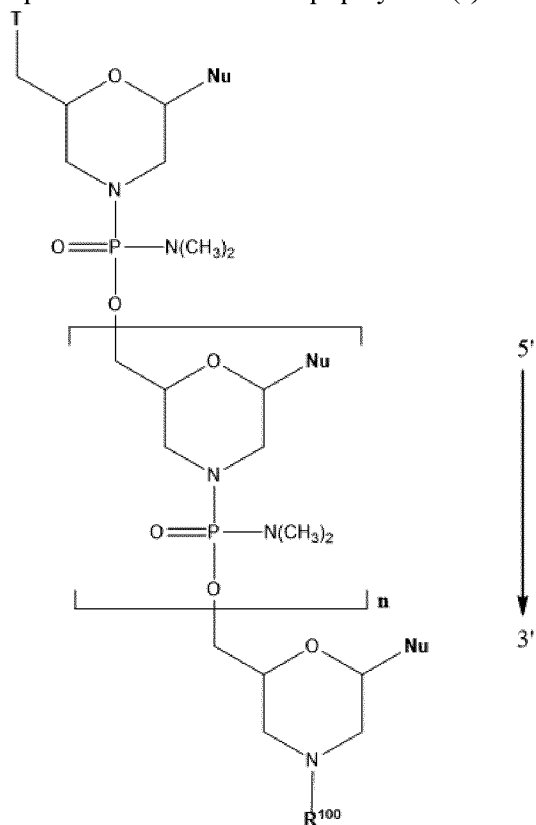
и как описано на фигуре 2 из Summerton, J., *et al.*, *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 7: 187-195 (1997). Структуры на основе морфолина, описанные в данном документе, предназначены для охвата всех стереоизомеров и таутомеров с вышеуказанной общей структурой. Характеристики синтеза, структур и связывания морфолиновых олигомеров подробно описаны в патентах США №№ 5698685, 5217866, 5142047, 5034506, 5166315, 5521063, 5506337, 8076476 и 8299206, все из которых включены в данный документ посредством ссылки.

В определенных вариантах осуществления структуры на основе морфолина конъюгированы на 5'- или 3'-конце олигомера с «хвостовым» фрагментом для повышения его стабильности и/или растворимости. Иллюстративные хвостовые фрагменты включают:



и дистальная -ОН или -NH₂ «хвостового» фрагмента необязательно связана с проникающим в клетку пептидом.

В различных аспектах в настоящем изобретении предусмотрены антисмысловые олигомеры в соответствии с формулой (I):

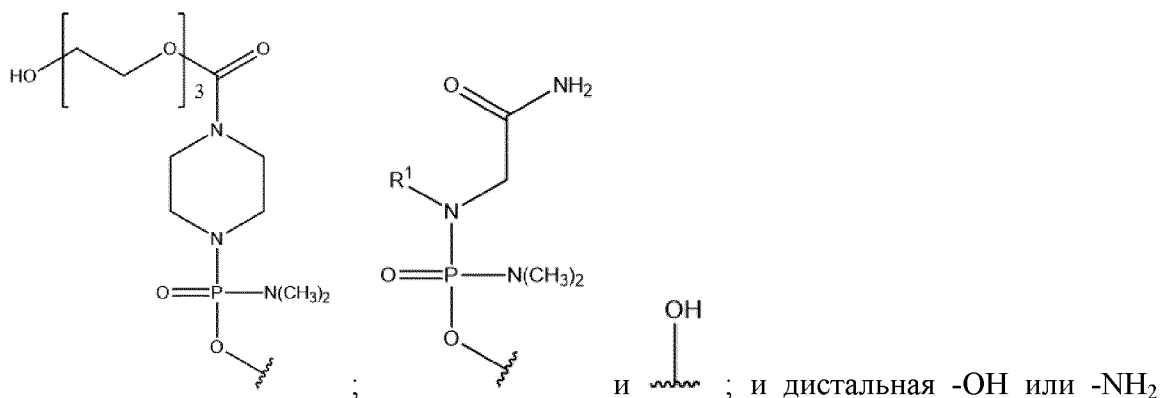


(I),

или их фармацевтически приемлемая соль, где:

каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, совместно с другими образующее нацеливающуюся последовательность;

T представляет собой фрагмент, выбранный из:

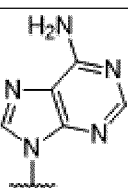
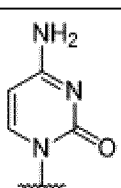


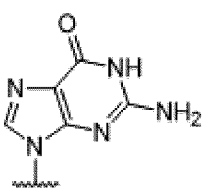
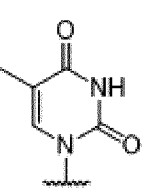
фрагмента Т необязательно связана с проникающим в клетку пептидом;

R¹⁰⁰ представляет собой водород или проникающий в клетку пептид;

каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует нуклеиновым основаниям в одном из следующего:

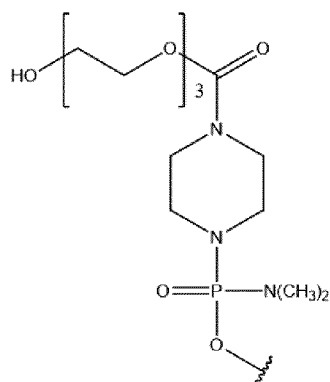
Сайт отжига	Нацеливающаяся последовательность [от 5' до 3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

где А представляет собой , С представляет собой , G

представляет собой , и Т представляет собой .

В некоторых вариантах осуществления каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует одному из следующего: SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8 или SEQ ID NO. 9. В некоторых вариантах осуществления каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует SEQ ID NO. 3.

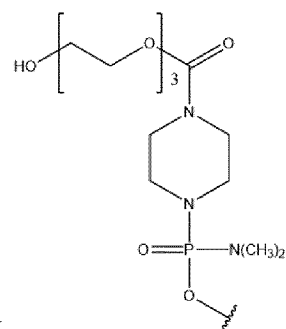
В различных вариантах осуществления Т представляет собой



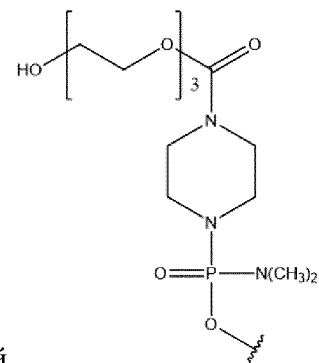
; и дистальная -ОН фрагмента Т необязательно связана с проникающим в клетку пептидом.

В различных вариантах осуществления R^{100} представляет собой водород. В различных других вариантах осуществления R^{100} представляет собой проникающий в клетку пептид. В различных вариантах осуществления R^{100} представляет собой $-R^5$ (SEQ ID NO: 21). В различных других вариантах осуществления R^{100} представляет собой $-G-R^5$ (SEQ ID NO: 20). В различных вариантах осуществления R^{100} представляет собой $-R^6$ (SEQ ID NO: 10). В различных других вариантах осуществления R^{100} представляет собой $-G-R^6$ (SEQ ID NO: 11).

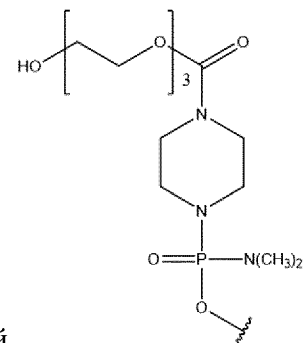
В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (I) находится в форме свободного основания. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (I) представляет собой ее фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (I) представляет собой его соль HCl (хлористоводородной кислоты). В определенных вариантах осуществления соль HCl представляет собой соль 1 HCl, 2 HCl, 3 HCl, 4 HCl, 5 HCl или 6 HCl. В определенных вариантах осуществления соль HCl представляет собой соль 6 HCl.



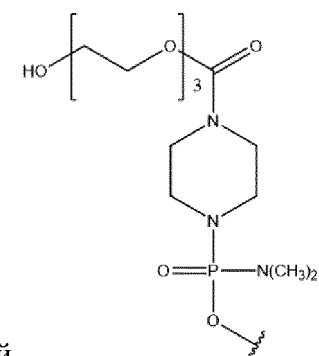
В различных вариантах осуществления Т представляет собой ;
и дистальная -ОН фрагмента Т необязательно связана с проникающим в клетку пептидом,
и R^{100} представляет собой проникающий в клетку пептид.



В различных вариантах осуществления Т представляет собой
, и R¹⁰⁰ представляет собой проникающий в клетку пептид.

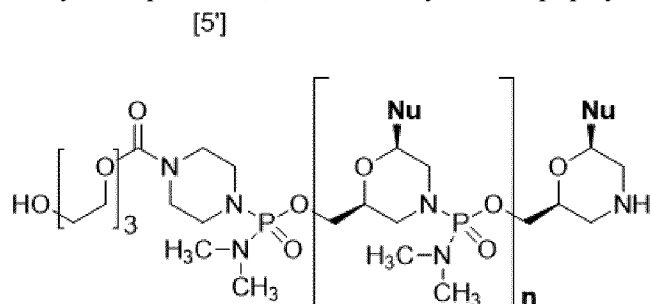


В различных вариантах осуществления Т представляет собой
и R¹⁰⁰ представляет собой -G-R⁵ (SEQ ID NO: 20).



В различных вариантах осуществления Т представляет собой
, и R¹⁰⁰ представляет собой -G-R⁶ (SEQ ID NO: 11).

В некоторых вариантах осуществления представлен антисмысловой олигомер по
настоящему изобретению, соответствующий формуле (II):

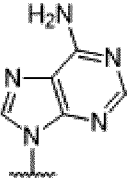
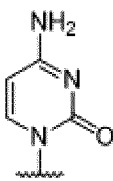


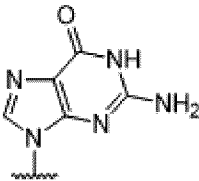
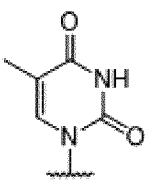
(II),

или его фармацевтически приемлемая соль, где каждый Nu от 1 до n и от 5' до 3' соответствует нуклеиновым основаниям в одном из следующего:

Сайт отжига	Нацеливающаяся последовательность [от 5'	SEQ ID NO:
-------------	--	------------

	до 3']	
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

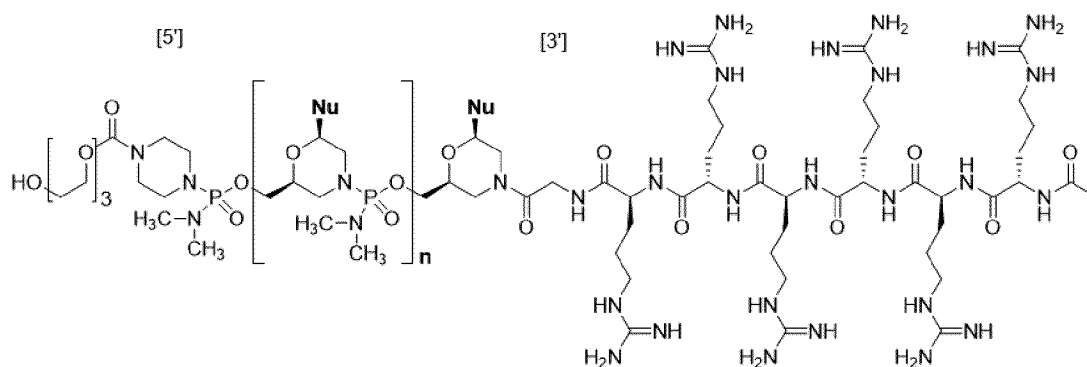
где А представляет собой , С представляет собой , G

представляет собой , и Т представляет собой . В некоторых вариантах осуществления дистальная -ОН в формуле (II) связана с проникающим в клетку пептидом.

В некоторых вариантах осуществления каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует одному из следующего: SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8 или SEQ ID NO. 9. В некоторых вариантах осуществления каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует SEQ ID NO. 3.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (II) находится в форме свободного основания. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (II) представляет собой форму ее фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (II) представляет собой его соль HCl (хлористоводородной кислоты). В определенных вариантах осуществления соль HCl представляет собой соль 1 HCl, 2 HCl, 3 HCl, 4 HCl, 5 HCl или 6 HCl. В определенных вариантах осуществления соль HCl представляет собой соль 6 HCl.

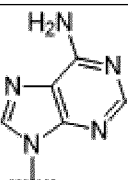
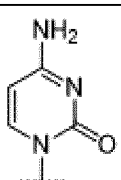
В некоторых вариантах осуществления представлен антисмысловой олигомер по настоящему изобретению, соответствующий формуле (III):

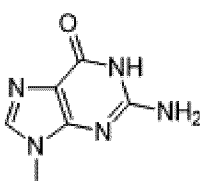
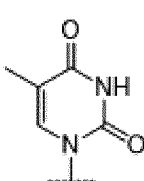


(III),

или его фармацевтически приемлемая соль, где каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует нуклеиновым основаниям в одном из следующего:

Сайт отжига	Нацеливающаяся последовательность [от 5' до 3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

где А представляет собой , С представляет собой , G

представляет собой , и Т представляет собой . В некоторых вариантах осуществления дистальная -ОН в формуле (III) связана с проникающим в клетку пептидом.

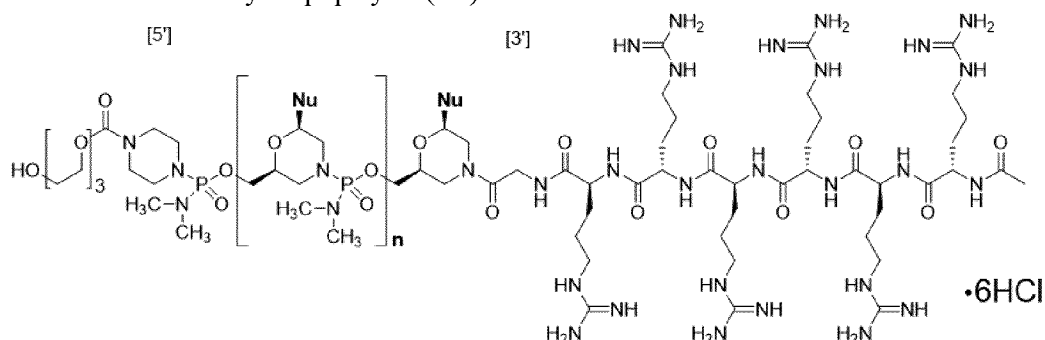
В некоторых вариантах осуществления дистальная -ОН в формуле (III) необязательно связана с проникающим в клетку пептидом.

В некоторых вариантах осуществления каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует одному из следующего: SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8 или SEQ ID NO. 9. В некоторых вариантах осуществления каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует SEQ

ID NO. 3.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (III) находится в форме свободного основания. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (III) представляет собой ее фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (III) представляет собой его соль HCl (хлористоводородной кислоты). В определенных вариантах осуществления соль HCl представляет собой соль 6 HCl.

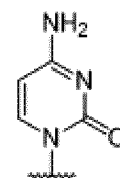
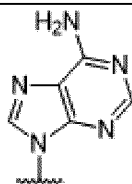
В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер по настоящему изобретению соответствует формуле (IV):



(IV),

где каждый Nu от 1 до n и от 5' до 3' соответствует нуклеиновым основаниям в одном из следующего:

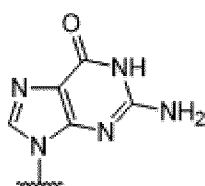
Сайт отжига	Нацеливающаяся последовательность [от 5' до 3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9



где A представляет собой

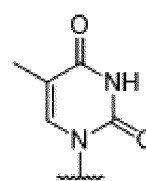
, C представляет собой

, G



представляет собой

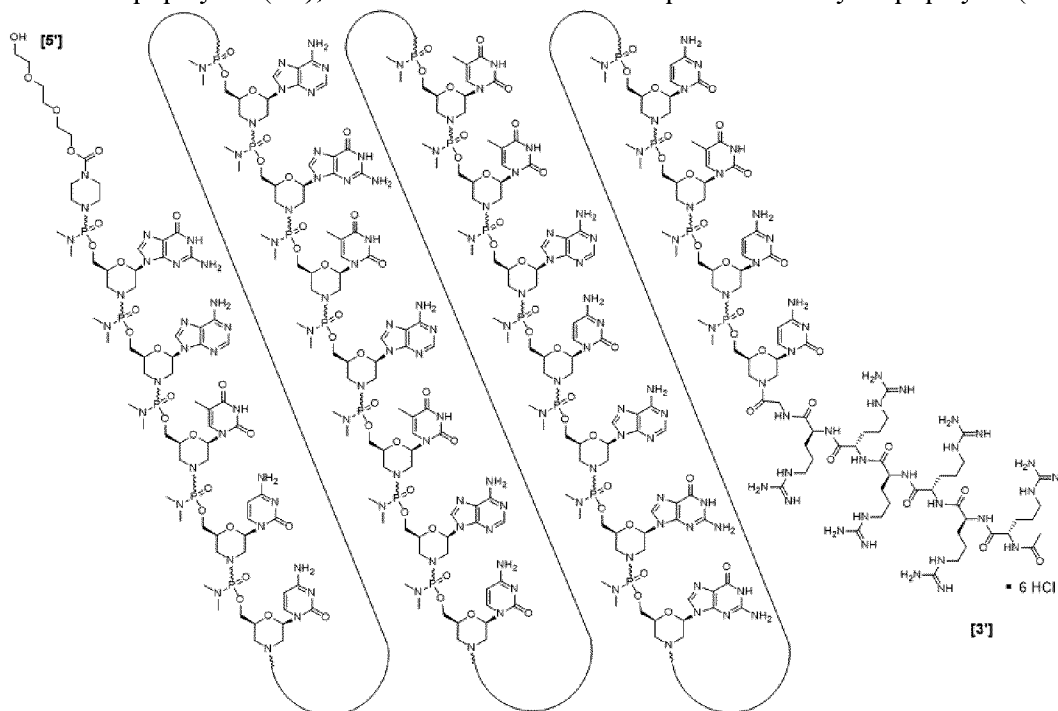
, и T представляет собой



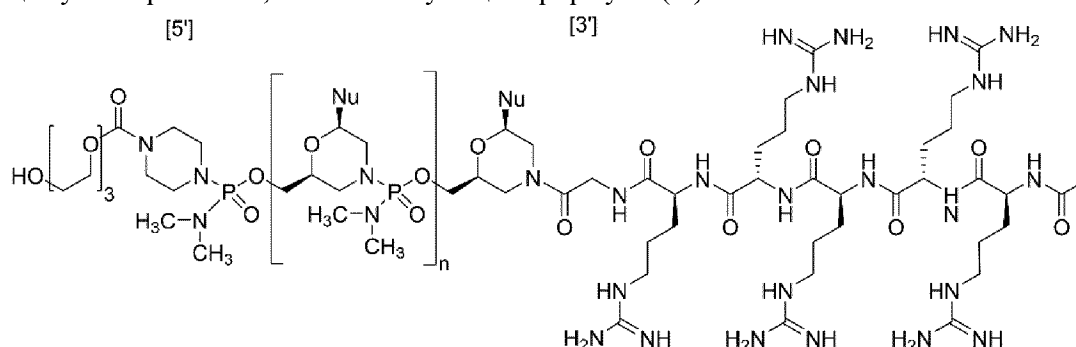
В некоторых вариантах осуществления дистальная -ОН в формуле (IV) необязательно связана с проникающим в клетку пептидом.

В некоторых вариантах осуществления каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует одному из следующего: SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8 или SEQ ID NO. 9. В некоторых вариантах осуществления каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует SEQ ID NO. 3.

В некоторых вариантах осуществления включая, например, некоторые варианты осуществления формулы (IV), антисмысловой олигомер соответствует формуле (IVa):



В некоторых вариантах осуществления представлен антисмысловой олигомер по настоящему изобретению, соответствующий формуле (V):

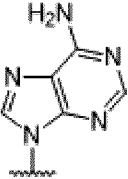
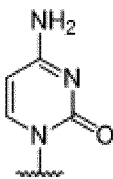


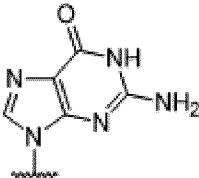
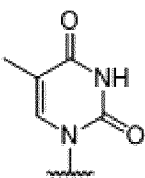
(V),

или его фармацевтически приемлемая соль, где каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует нуклеиновым основаниям в одном из следующего:

Сайт отжига	Нацеливающаяся последовательность [от 5' до 3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1

H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

где А представляет собой , С представляет собой , G

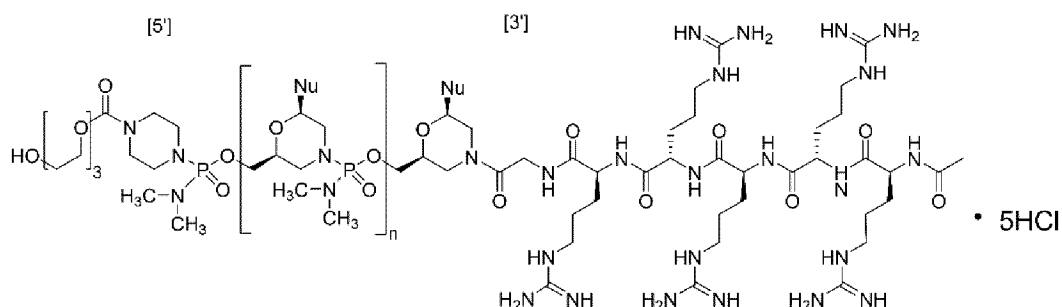
представляет собой , и Т представляет собой . В некоторых вариантах осуществления дистальная -ОН в формуле (IV) связана с проникающим в клетку пептидом.

В некоторых вариантах осуществления дистальная -ОН в формуле (V) необязательно связана с проникающим в клетку пептидом.

В некоторых вариантах осуществления каждый Nu от 1 до n и от 5' до 3' соответствует одному из следующего: SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8 или SEQ ID NO. 9. В некоторых вариантах осуществления каждый Nu от 1 до n и от 5' до 3' соответствует SEQ ID NO. 3.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (V) находится в форме свободного основания. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (V) представляет собой ее фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (V) представляет собой его соль HCl (хлористоводородной кислоты). В определенных вариантах осуществления соль HCl представляет собой соль 5 HCl.

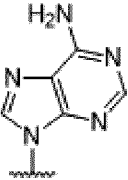
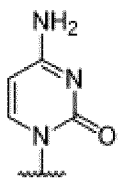
В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер по настоящему изобретению соответствует формуле (VI):

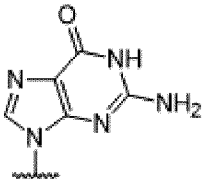
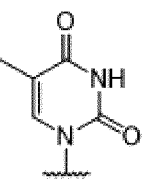


(VI),

где каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует нуклеиновым основаниям в одном из следующего:

Сайт отжига	Нацеливающаяся последовательность [от 5' до 3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

где А представляет собой , С представляет собой , G

представляет собой , и Т представляет собой .

В некоторых вариантах осуществления дистальная -ОН в формуле (VI) необязательно связана с проникающим в клетку пептидом.

В некоторых вариантах осуществления каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует одному из следующего: SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8 или SEQ ID NO. 9. В некоторых вариантах осуществления каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует SEQ ID NO. 3.

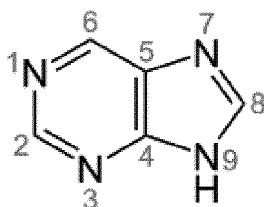
10. Модификации и замены нуклеиновых оснований

В определенных вариантах осуществления антисмысловые олигомеры по

настоящему изобретению состоят из нуклеиновых оснований РНК и нуклеиновых оснований ДНК (часто называемых в данной области техники просто «основанием»). Основания РНК широко известны как аденин (А), урацил (U), цитозин (C) и гуанин (G). Основания ДНК широко известны как аденин (А), тимин (Т), цитозин (C) и гуанин (G). В различных вариантах осуществления антисмысловые олигомеры по настоящему изобретению состоят из цитозина (C), гуанина (G), тимина (Т), аденина (А), 5-метилцитозина (5mC), урацила (U) и гипоксантина (I).

В определенных вариантах осуществления одно или более оснований РНК или оснований ДНК в олигомере могут быть модифицированы или заменены на основание, отличное от основания РНК или основания ДНК. Олигомеры, содержащие модифицированное или замененное основание, включают олигомеры, в которых одно или более пуриновых или пиримидиновых оснований, наиболее часто встречающихся в нуклеиновых кислотах, заменены на менее распространенные или неприродные основания.

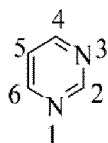
Пуриновые основания содержат пиримидиновое кольцо, конденсированное с имидазольным кольцом, что описывается следующей общей формулой.



Пурин

Аденин и гуанин являются двумя пуриновыми нуклеиновыми основаниями, наиболее часто встречающимися в нуклеиновых кислотах. Другие встречающиеся в природе пурины включают без ограничения N⁶-метиладенин, N²-метилгуанин, гипоксантин и 7-метилгуанин.

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



Пиримидиновая основа

Цитозин, урацил и тимин являются пиримидиновыми основаниями, наиболее часто встречающимися в нуклеиновых кислотах. Другие встречающиеся в природе пиримидины включают без ограничения 5-метилцитозин, 5-гидроксиметилцитозин, псевдоурацил и 4-тиоурацил. В одном варианте осуществления олигомеры, описанные в данном документе, содержат тиминовые основания вместо урацила.

Другие подходящие основания включают без ограничения 2,6-диаминопурин, оротовую кислоту, агматидин, лизидин, 2-тиопиримидины (*например* 2-тиоурацил, 2-тиотимин), G-зажим и его производные, 5-замещенные пиримидины (*например* 5-

галогенурацил, 5-пропинилурацил, 5-пропинилцитозин, 5-аминометилурацил, 5-гидроксиметилурацил, 5-аминометилцитозин, 5-гидроксиметилцитозин, Super T), 7-деазагуанин, 7-деазааденин, 7-аза-2,6-диаминопурин, 8-аза-7-деазагуанин, 8-аза-7-деазааденин, 8-аза-7-деаза-2,6-диаминопурин, Super G, Super A и N4-этилцитозин или их производные; N²-циклопентилгуанин (cPent-G), N²-циклопентил-2-аминопурин (cPent-AP) и N²-пропил-2-аминопурин (Pr-AP), псевдоурацил или их производные; и вырожденные или универсальные основания, такие как 2,6-дифтортолуол, или отсутствующие основания, например, участки с удаленными основаниями (*например*, 1-дезоксирибоза, 1,2-дидезоксирибоза, 1-дезоксид-2-О-метилрибоза; или производные пирролидина, в которых атом кислорода кольца был заменен на атом азота (азарибоза)). Примеры производных Super A, Super G и Super T можно найти в патенте США № 6683173 (Epoch Biosciences), который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Было показано, что cPent-G, cPent-AP и Pr-AP снижают иммуностимулирующие эффекты при включении в siRNA (Peacock H. *et al. J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 9200). Псевдоурацил представляет собой встречающийся в природе изомеризованный вариант урацила с С-гликозидом вместо обычного N-гликозида как в урidine. Псевдоуридинсодержащая синтетическая mRNA может характеризоваться улучшенным профилем безопасности по сравнению с уридинсодержащей mPvNA (WO 2009127230, включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Определенные нуклеиновые основания являются особенно пригодными для повышения аффинности связывания антисмысловых олигомеров по настоящему изобретению. К ним относятся 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2-, N-6- и O-6-замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Было показано, что замены 5-метилцитозина повышают стабильность дуплекса нуклеиновой кислоты на 0,6-1,2°C, и в настоящее время эти замены являются предпочтительными заменами оснований, особенно в комбинации с модификациями 2'-О-метоксиэтилсахара. Дополнительные иллюстративные модифицированные нуклеиновые основания включают основания, где по меньшей мере один атом водорода нуклеинового основания заменен на фтор.

11. Фармацевтически приемлемые соли антисмысловых олигомеров

Определенные варианты осуществления антисмысловых олигомеров, описанные в данном документе, могут включать основную функциональную группу, такую как амино или алкиламино, и, таким образом, иметь способность к формированию фармацевтически приемлемых солей с фармацевтически приемлемыми кислотами. Термин «фармацевтически приемлемые соли» в связи с этим относится к относительно нетоксичным, неорганическим и органическим солям присоединения кислоты антисмысловых олигомеров по настоящему изобретению. Такие соли могут быть получены *in situ* в среде-носителе для введения или в процессе изготовления лекарственной формы, или посредством осуществления отдельной реакции очищенного антисмыслового олигомера по настоящему изобретению в форме его свободного основания с подходящей

органической или неорганической кислотой, и выделения полученной таким образом соли во время последующего очищения. Иллюстративные соли включают соли, представляющие собой гидробромид, гидрохлорид, сульфат, бисульфат, фосфат, нитрат, ацетат, валерат, олеат, пальмитат, стеарат, лаурат, бензоат, лактат, тозилат, цитрат, малеат, фумарат, сукцинат, тартрат, нафтилат, мезилат, глюкогептонат, лактобионат и лаурилсульфонат и т. п. (См., например, Berge *et al.* (1977) "Pharmaceutical Salts", *J. Pharm. Sci.* 66:1-19).

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

В определенных вариантах осуществления антисмысловые олигомеры по настоящему изобретению могут содержать одну или более кислотных функциональных групп и, таким образом, способны к образованию фармацевтически приемлемых солей с фармацевтически приемлемыми основаниями. Термин «фармацевтически приемлемые соли» в данных случаях относится к относительно нетоксичным, неорганическим и органическим солям присоединения основания антисмысловых олигомеров по настоящему изобретению. Такие соли могут быть получены *in situ* в среде-носителе для введения или в процессе изготовления лекарственной формы, или посредством осуществления отдельной реакции очищенного антисмыслового олигомера в его форме свободной кислоты с подходящим основанием, таким как гидроксид, карбонат или бикарбонат фармацевтически приемлемого катиона металла, с аммиаком или с фармацевтически приемлемым органическим первичным, вторичным или третичным амином. Иллюстративные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают соли лития, натрия, калия, кальция, магния и алюминия и т. п. Иллюстративные органические амины, пригодные для образования солей присоединения основания, включают этиламин, диэтиламин, этилендиамин, этаноламин, диэтаноламин, пиперазин и т. п. (См., например, Berge *et al.*, *выше*).

III. Составы и способы введения

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает составы или фармацевтические композиции, подходящие для терапевтической доставки антисмысловых олигомеров, как описано в данном документе. Следовательно, в определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает

фармацевтически приемлемые композиции, которые содержат терапевтически эффективное количество одного или более антисмысловых олигомеров, описанных в данном документе, составленных вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями (добавками) и/или разбавителями. Несмотря на то, что существует возможность введения отдельно антисмыслового олигомера по настоящему изобретению, предпочтительным является введение антисмыслового олигомера в виде фармацевтического состава (композиции). В одном варианте осуществления антисмысловой олигомер в составе соответствует соединению формулы (III) или его фармацевтически приемлемой соли.

Способы доставки молекул нуклеиновых кислот, которые можно применять в отношении антисмысловых олигомеров по настоящему изобретению, описаны, например, в Akhtar *et al.*, 1992, *Trends Cell Bio.*, 2:139; *Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics*, ed. Akhtar, 1995, CRC Press; и Sullivan *et al.*, PCT WO 94/02595. Такие и другие протоколы могут быть использованы для доставки фактически любой молекулы нуклеиновой кислоты, включая антисмысловые олигомеры по настоящему изобретению.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть специально составлены для введения в твердой или жидкой форме, включая те, которые адаптированы для следующих способов введения: (1) пероральное введение, например, жидкие лекарственные формы (водные или отличные от водных растворы или суспензии), таблетки (предназначенные для трансбуккальной, сублингвальной или системной абсорбции), болюсы, порошки, гранулы, пасты для нанесения на язык; (2) парентеральное введение, например, посредством подкожной, внутримышечной, внутривенной или эпидуральной инъекции в виде, например, стерильного раствора или суспензии, или состава с замедленным высвобождением; (3) местное нанесение, например, в виде крема, мази или пластыря с контролируемым высвобождением, или спрея, наносимого на кожу; (4) интравагинально или интаректально, например, в виде вагинального суппозитория, крема или пены; (5) сублингвально; (6) окулярно; (7) трансдермально; или (8) назально.

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

полиэферы, поликарбонаты и/или полиангидриды; и (22) другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах.

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

В настоящем изобретении также предусмотрено применение композиции, содержащей поверхностно-модифицированные липосомы, содержащие поли(этиленгликоль) («PEG»), липиды (модифицированные с помощью PEG, разветвленные и неразветвленные или их комбинации, или длительно циркулирующие липосомы или стелс-липосомы). Конъюгаты олигомеров по настоящему изобретению также могут содержать ковалентно присоединенные PEG-молекулы с различными значениями молекулярной массы. Эти составы обеспечивают способ повышения накопления лекарственных средств в целевых тканях. Данный класс носителей лекарственных средств противодействует опсонизации и устранению мононуклеарной фагоцитарной системой (MPS или RES), тем самым способствуя более длительным периодам времени циркуляции в крови и усилению воздействия на ткань инкапсулированным лекарственным средством (Lasic *et al.* *Chem. Rev.* 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* 1995, 43, 1005-1011). Было показано, что такие липосомы селективно накапливаются в опухолях, предположительно за счет экстравазации и захвата в неоваскуляризованных целевых тканях (Lasic *et al.*, *Science* 1995, 267, 1275-1276; Oku *et al.*, 1995, *Biochim. Biophys. Acta*, 1238, 86-90). Длительно циркулирующие липосомы усиливают фармакокинетику и фармакодинамику ДНК и РНК, в частности, 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.*, международная публикация PCT № WO 96/10391; Ansell *et al.*, международная публикация PCT № WO 96/10390; Holland *et al.*, международная публикация PCT № WO 96/10392). Длительно циркулирующие липосомы также, вероятно, защищают лекарственные средства от деградации под действием нуклеаз в большей степени по сравнению с катионными липосомами, благодаря их способности избегать накопления в метаболически агрессивных тканях MPS, таких как печень и селезенка.

В дополнительном варианте осуществления настоящее раскрытие включает

фармацевтические композиции на основе антисмыслового олигомера, полученные для доставки, как описано в патентах США №№ 6692911; 7163695 и 7070807. В связи с этим, в одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен антисмысловый олигомер по настоящему изобретению в композиции, содержащей сополимеры лизина и гистидина (НК) (как описано в патентах США №№ 7163695; 7070807 и 6692911) либо отдельно, либо в комбинации с PEG (например, разветвленным или неразветвленным PEG или смесью обоих), в комбинации с PEG и нацеливающимся фрагментом или любым из вышеуказанного в комбинации со сшивающим средством. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает антисмысловые олигомеры в фармацевтических композициях, содержащих конъюгат глюконовая кислота-модифицированный полигистидин или конъюгат глюконолированный полигистидин/трансферрин-полилизин. Специалисту в данной области техники также будет понятно, что аминокислоты со свойствами, подобными свойствам His и Lys, могут быть заменены внутри композиции.

Также в композициях могут присутствовать смачивающие средства, эмульгаторы и смазывающие средства (такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния), красящие средства, средства для высвобождения, средства для нанесения покрытий, подсластители, ароматизирующие средства, парфюмерные средства, 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) жирорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т. п.; и (3) металл-хелатирующие средства, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т. п.

Составы по настоящему изобретению включают составы, подходящие для перорального, назального, местного (включая трансбуккальное и сублингвальное), ректального, вагинального и/или парентерального введения. Составы могут с целью удобства быть представлены в стандартной лекарственной форме и могут быть получены с помощью любых способов, хорошо известных в области фармацевтики. Количество активного ингредиента, которое можно объединять с материалом-носителем для получения лекарственной формы для однократного применения, будет варьироваться в зависимости от субъекта, подлежащего лечению, и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое можно объединять с материалом-носителем для получения лекарственной формы для однократного применения, как правило, будет представлять собой то количество активного ингредиента, которое обеспечивает терапевтический эффект. Как правило, это количество будет находиться в диапазоне от приблизительно 0,1 процента до приблизительно девяносто девяти процентов активного ингредиента, предпочтительно от приблизительно 5 процентов до приблизительно 70 процентов,

наиболее предпочтительно от приблизительно 10 процентов до приблизительно 30 процентов.

В определенных вариантах осуществления состав по настоящему изобретению содержит вспомогательное вещество, выбранное из циклодекстринов, целлюлоз, липосом, мицеллообразующих средств, например, желчных кислот, и полимерных носителей, например, сложных полиэфиров и полиангидридов; и антисмысловой олигомер по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления антисмысловой олигомер в составе соответствует формуле (IV). В одном варианте осуществления антисмысловой олигомер в составе соответствует формуле (IVa). В определенных вариантах осуществления вышеуказанный состав превращает антисмысловой олигомер по настоящему изобретению в перорально биодоступный.

Способы получения этих составов или фармацевтических композиций включают стадию объединения антисмыслового олигомера по настоящему изобретению с носителем и, необязательно, одним или более вспомогательными ингредиентами. Как правило, составы получают посредством равномерного и тщательного объединения антисмыслового олигомера по настоящему изобретению с жидкими носителями или тонкоизмельченными твердыми носителями, или и с теми и другими, а затем, при необходимости, придания продукту формы.

Составы по настоящему изобретению, подходящие для перорального введения, могут быть в форме капсул, крахмальных капсул, пилюль, таблеток, пастилок для рассасывания (с применением ароматизированной основы, обычно сахарозы и аравийской камеди или трагаканта), порошков, гранул или в виде раствора или суспензии в водной или отличной от водной жидкости, или в виде жидкой эмульсии типа «масло в воде» или «вода в масле», или в виде настойки или сиропа, или в виде пастилок (с применением инертной основы, такой как желатин и глицерин, или сахарозы и аравийской камеди) и/или в виде жидкостей для полоскания рта и т. п., при этом каждый содержит предварительно определенное количество антисмыслового олигомера по настоящему изобретению в качестве активного ингредиента. Антисмысловой олигомер по настоящему изобретению также можно вводить в виде болюса, электуария или пасты.

В твердых лекарственных формах по настоящему изобретению для перорального введения (капсулы, таблетки, пилюли, драже, порошки, гранулы, таблетки для рассасывания и т. п.) активный ингредиент может быть смешан с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, такими как цитрат натрия или дикальцийфосфат и/или любыми из следующих: (1) наполнители или добавки, такие как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремниевая кислота; (2) связующие, такие как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и/или аравийская камедь; (3) увлажняющие средства, такие как глицерин; (4) разрыхлители, такие как агар-агар, карбонат кальция, картофельный или тапиоковый крахмал, альгиновая кислота, определенные силикаты и карбонат натрия; (5) средства, замедляющие растворение, такие как парафин; (6) средства, ускоряющие

абсорбцию, такие как соединения четвертичного аммония и поверхностно-активные вещества, такие как полоксамер и лаурилсульфат натрия; (7) смачивающие средства, такие как, например, цетиловый спирт, моностеарат глицерина и неионные поверхностно-активные вещества; (8) абсорбенты, такие как каолиновая и бентонитовая глина; (9) смазывающие средства, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия, стеарат цинка, стеарат натрия, стеариновая кислота и их смеси; (10) красящие средства; и (11) средства для контролируемого высвобождения, такие как кросповидон или этилцеллюлоза. В случае капсул, таблеток и пилюль фармацевтические композиции могут также содержать буферные средства. Твердые фармацевтические композиции подобного типа могут также применяться в качестве наполнителей в желатиновых капсулах с мягкой и твердой оболочкой с использованием таких вспомогательных веществ, как лактоза или молочные сахара, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и т.п.

Таблетку можно получать посредством прессования или формования, необязательно с одним или более вспомогательными ингредиентами. Прессованные таблетки можно получать с применением связующего средства (*например*, желатина или гидроксипропилметилцеллюлозы), смазывающего средства, инертного разбавителя, консерванта, разрыхлителя (*например*, крахмалгликолята натрия или сшитой натрийкарбоксиметилцеллюлозы), поверхностно-активного или диспергирующего средства. Формованные таблетки можно получать посредством формования в подходящем устройстве смеси порошкообразного соединения, смоченного инертным жидким разбавителем.

Таблетки и другие твердые лекарственные формы фармацевтических композиций по настоящему изобретению, такие как драже, капсулы, пилюли и гранулы, могут необязательно быть делимыми или полученными с покрытиями и оболочками, такими как энтеросолюбильные покрытия и другие покрытия, хорошо известные в области фармацевтического составления. Их также можно составлять таким образом, чтобы обеспечивать медленное или контролируемое высвобождение активного ингредиента в них с применением, *например*, гидроксипропилметилцеллюлозы в различных пропорциях для обеспечения желаемого профиля высвобождения, других полимерных матриц, липосом и/или микросфер. Их можно составлять для быстрого высвобождения, *например*, лиофилизировать. Их можно стерилизовать, *например*, посредством фильтрации с помощью задерживающего бактерии фильтра или посредством включения стерилизующих средств в форме стерильных твердых фармацевтических композиций, которые могут быть растворены в стерильной воде или некоторых других стерильных инъекционных средах непосредственно перед применением. Эти фармацевтические композиции могут также необязательно содержать замутняющие средства и могут представлять собой композицию, которая высвобождает активный(активные) ингредиент(ингредиенты) только или предпочтительно в определенном участке желудочно-кишечного тракта, необязательно с задержкой. Примеры капсулирующих композиций, которые можно применять, включают

полимерные вещества и воски. Активный ингредиент может также находиться в микроинкапсулированной форме, если необходимо, с одним или более вышеописанными вспомогательными веществами.

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

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

Суспензии, в дополнение к активным соединениям, могут содержать суспендирующие средства, такие как, например, этоксилированные изостеариловые спирты, полиоксиэтиленсорбит и сложные эфиры сорбитана, микрокристаллическую целлюлозу, метгидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант, а также их смеси.

Составы для ректального или вагинального введения могут быть представлены в виде суппозитория, который может быть получен посредством смешивания одного или более соединений по настоящему изобретению с одним или более подходящими не вызывающими раздражения вспомогательными веществами или носителями, содержащими, например, какао-масло, полиэтиленгликоль, суппозиторный воск или салицилат, и который представляет собой твердое вещество при комнатной температуре, но жидкое при температуре тела и, следовательно, расплавится в прямой кишке или вагинальной полости и высвободит активное соединение.

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

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

Трансдермальные пластыри имеют дополнительное преимущество, заключающееся в обеспечении контролируемой доставки антисмыслового олигомера по настоящему изобретению в организм. Такие лекарственные формы могут быть получены путем растворения или диспергирования олигомера в подходящей среде. Усиливающие абсорбцию средства также можно применять для повышения поступления средства через кожу. Скорость такого поступления можно контролировать либо посредством обеспечения контролирующей скорость мембраны, либо диспергирования средства в полимерной матрице или геле, наряду с другими способами, известными из уровня техники.

Фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, могут содержать один или более конъюгатов олигомеров по настоящему изобретению в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или отличными от водных растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями, или стерильными порошками, которые могут быть восстановлены в стерильные инъекционные растворы или дисперсии непосредственно перед применением, которые могут содержать сахара, спирты, антиоксиданты, буферы, бактериостатические средства, растворы, которые придают составу изотонические свойства по отношению к крови предполагаемого реципиента, или суспендирующие средства или загустители. Примеры подходящих водных и отличных от водных носителей, которые можно применять в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т. п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Подходящую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрывающих материалов, таких как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ. В одном варианте осуществления антисмысловой олигомер в фармацевтической композиции соответствует формуле (IV). В одном варианте осуществления антисмысловой олигомер в фармацевтической композиции соответствует формуле (IVa)

Такие фармацевтические композиции также могут содержать вспомогательные средства, такие как консерванты, смачивающие средства, эмульгирующие средства и диспергирующие средства. Предотвращение действия микроорганизмов на рассматриваемые конъюгаты олигомеров можно обеспечивать посредством включения различных противобактериальных и противогрибковых средств, например, парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и т. п. Также может быть желательным включение в композиции изотонических средств, таких как сахара, хлорид натрия и т. п.

Кроме того, пролонгированная абсорбция инъекционной фармацевтической формы может быть осуществлена посредством включения средств, которые задерживают абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

В некоторых случаях, с целью пролонгирования действия лекарственного средства желательно замедлить абсорбцию лекарственного средства при подкожной или внутримышечной инъекции. Это может быть достигнуто путем применения жидкой суспензии кристаллического или аморфного материала, малорастворимого в воде, помимо прочих способов, известных в данной области техники. Скорость абсорбции лекарственного средства в таком случае зависит от скорости его растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размеров кристаллов и кристаллической формы. В качестве альтернативы, замедленной абсорбции парентерально вводимых форм лекарственного средства достигают посредством растворения или суспендирования лекарственного средства в масляной среде-носителе.

Инъекционные депо-формы можно получать посредством образования заключенных в микрокапсулу матриц рассматриваемых конъюгатов олигомеров в биodeградируемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. Скорость высвобождения олигомера можно контролировать в зависимости от соотношения олигомера и полимера и природы конкретного используемого полимера. Примеры других биodeградируемых полимеров включают поли(ортоэфиры) и поли(ангидриды). Инъекционные депо-составы также можно получать посредством захвата лекарственного средства в липосомах или микроэмульсиях, которые совместимы с тканями организма.

Если антисмысловые олигомеры по настоящему изобретению вводят в качестве лекарственных препаратов людям и животным, их можно вводить в чистом виде или в виде фармацевтической композиции, содержащей, например, 0,1-99% (более предпочтительно 10-30%) антисмыслового олигомера в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Составы или препараты по настоящему изобретению можно вводить перорально, парентерально, местно или ректально. Их, как правило, вводят в формах, подходящих для каждого пути введения. Например, их вводят в форме таблеток или капсул, путем инъекции, ингаляции, в виде лосьона для глаз, мази, суппозитория или инфузии; местно с помощью лосьона или мази или ректально с помощью суппозитория.

Независимо от выбранного пути введения антисмысловые олигомеры по настоящему изобретению, которые могут применяться в подходящей гидратированной форме, и/или фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть составлены в фармацевтически приемлемые лекарственные формы с помощью традиционных способов, известных специалистам в данной области техники. Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут варьироваться таким образом, чтобы с получением количества активного ингредиента, которое является эффективным для достижения желаемого терапевтического ответа в случае конкретного пациента, композиция и способ

введения не были неприемлемо токсичными для пациента.

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

Врач или ветеринар, являющийся обычным специалистом в данной области техники, может легко определить и назначить необходимое эффективное количество фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начинать введение доз антисмысловых олигомеров по настоящему изобретению, применяемых в фармацевтической композиции, с более низких уровней, чем требующиеся для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозу до тех пор, пока желаемый эффект не будет достигнут. В целом, подходящая суточная доза антисмыслового олигомера по настоящему изобретению будет представлять собой такое количество антисмыслового олигомера, которое является наименьшей дозой, эффективной для достижения терапевтического эффекта. Такая эффективная доза, как правило, будет зависеть от факторов, описанных в данном документе. Как правило, дозы для перорального, внутривенного, интрацеребровентрикулярного и подкожного введения антисмысловых олигомеров по настоящему изобретению для пациента, в случае их применения для достижения указанных эффектов, будут находиться в диапазоне от приблизительно 0,0001 до приблизительно 100 мг на килограмм веса тела в день.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигомеры по настоящему изобретению вводят в дозах, обычно составляющих от приблизительно 1 до приблизительно 200 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления дозы для внутривенного введения составляют от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 200 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (I) вводят в дозах, обычно составляющих от приблизительно 1 до приблизительно 200 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления дозы антисмыслового олигомера формулы (I) для внутривенного введения составляют от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 200 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (II) вводят в дозах, обычно составляющих от приблизительно 1 до приблизительно 200 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления дозы антисмыслового олигомера формулы (II) для внутривенного введения составляют от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 200 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (III) вводят в дозах, обычно составляющих от приблизительно 1 до приблизительно 200 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления дозы антисмыслового олигомера формулы (III) для

внутривенного введения составляют от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 200 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (IV) вводят в дозах, обычно составляющих от приблизительно 1 до приблизительно 200 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления дозы антисмыслового олигомера формулы (IV) для внутривенного введения составляют от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 200 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (IVa) вводят в дозах, обычно составляющих от приблизительно 1 до приблизительно 200 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления дозы антисмыслового олигомера формулы (IVa) для внутривенного введения составляют от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 200 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (V) вводят в дозах, обычно составляющих от приблизительно 1 до приблизительно 200 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления дозы антисмыслового олигомера формулы (V) для внутривенного введения составляют от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 200 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (VI) вводят в дозах, обычно составляющих от приблизительно 1 до приблизительно 200 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления дозы антисмыслового олигомера формулы (VI) для внутривенного введения составляют от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 200 мг/кг.

Как понятно из уровня техники, введения, осуществляемые еженедельно, один раз в две недели, один раз в три недели или ежемесячно, могут выполняться в виде одного или более введений или частей дозы, как рассмотрено в данном документе.

Молекулы нуклеиновой кислоты и антисмысловые олигомеры, описанные в данном документе, можно вводить в клетки посредством разнообразных способов, известных специалистам в данной области техники, включая без ограничения инкапсулирование в липосомы, с помощью ионофореза или путем внедрения в другие среды-носители, такие как гидрогели, циклодекстрины, биологически разлагаемые нанокапсулы и биоадгезивные микросферы, описанные в данном документе и известные из уровня техники. В определенных вариантах осуществления для улучшения биодоступности липофильных (нерастворимых в воде) фармацевтических средств может применяться технология получения микроэмульсий. Примеры включают Trimetrine (Dordunoo, S. K., *et al.*, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 17(12), 1685-1713, 1991) и REV 5901 (Sheen, P. C., *et al.*, *J Pharm Sci* 80(7), 712-714, 1991). Помимо других преимуществ, получение микроэмульсии обеспечивает повышенную биодоступность за счет направления процесса всасывания преимущественно в лимфатическую систему, а не в кровеносную систему, что таким образом позволяет миновать печень и предотвращает разрушение соединений в гепатобилиарной системе.

В одном аспекте настоящего изобретения составы содержат мицеллы, образованные из олигомера, предусмотренного в данном документе, и по меньшей мере одного амфифильного носителя, в котором мицеллы имеют средний диаметр менее приблизительно 100 нм. Более предпочтительные варианты осуществления

предусматривают мицеллы, имеющие средний диаметр менее приблизительно 50 нм, и еще более предпочтительные варианты осуществления предусматривают мицеллы, имеющие средний диаметр менее приблизительно 30 нм или даже менее приблизительно 20 нм.

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

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

Коммерчески доступные амфифильные носители могут являться особенно пригодными, включая серию Gelucire, Labrafil, Labrasol или Lauroglycol (изготовление и дистрибуция всех из них осуществляется Gattefosse Corporation, Сен-Прист, Франция), PEG-моноолеат, PEG-диолеат, PEG-монолаурат и дилаурат, лецитин, полисорбат 80 и т. д. (производство и дистрибуция осуществляется рядом компаний в США и по всему миру).

В определенных вариантах осуществления доставку можно осуществлять посредством применения липосом, нанокапсул, микрочастиц, микросфер, липидных частиц, везикул и т. п. для введения фармацевтических композиций по настоящему изобретению в подходящие клетки-хозяева. В частности, фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно составлять для доставки инкапсулированными в любое из липидной частицы, липосомы, везикулы, наносферы, наночастицы или т. п. Составление и применение таких сред-носителей для доставки можно осуществлять с применением известных и традиционных методик.

Гидрофильные полимеры, подходящие для применения в настоящем изобретении, представляют собой таковые, которые являются легко растворимыми в воде, могут

ковалентно присоединяться к везикулообразующему липиду, и которые являются переносимыми *in vivo* без токсических эффектов (*т. е.* являются биологически совместимыми). Подходящие полимеры включают поли(этиленгликоль) (PEG), полимолочную (также называемую полилактидом), полигликолевую (также называемую полигликолидом) кислоту, сополимер полимолочной и полигликолевой кислоты и поливиниловый спирт. В определенных вариантах осуществления полимеры характеризуются средневесовой молекулярной массой от приблизительно 100 или 120 дальтон до приблизительно 5000 или 10000 дальтон или от приблизительно 300 дальтон до приблизительно 5000 дальтон. В других вариантах осуществления полимер представляет собой поли(этиленгликоль), характеризующийся средневесовой молекулярной массой от приблизительно 100 до приблизительно 5000 дальтон, или характеризующийся средневесовой молекулярной массой от приблизительно 300 до приблизительно 5000 дальтон. В определенных вариантах осуществления полимер представляет собой поли(этиленгликоль), характеризующийся средневесовой молекулярной массой приблизительно 750 дальтон, например, ПЭГ(750). Полимеры можно также определить с помощью числа мономеров в нем; при этом в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения применяются полимеры из по меньшей мере приблизительно трех мономеров, при этом такие представляющие собой PEG полимеры, состоящие из трех мономеров, характеризуются молекулярной массой приблизительно 132 дальтон.

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

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

Циклодекстрины представляют собой циклические олигосахариды, состоящие из 6, 7 или 8 глюкозных структурных единиц, обозначенных греческой буквой α , β или γ соответственно. Глюкозные структурные единицы соединены посредством α -1,4-глюкозидных связей. Как следствие конформации «кресла» сахарных структурных единиц, все вторичные гидроксильные группы (в C-2, C-3) расположены на одной стороне кольца, тогда как все первичные гидроксильные группы в C-6 расположены на другой стороне. В

результате внешние поверхности являются гидрофильными, что делает циклодекстрины водорастворимыми. Напротив, полости циклодекстринов являются гидрофобными, поскольку они выложены водородом при атомах С-3 и С-5, и атомами кислорода, образующими простую эфирную связь. Такие матрицы обеспечивают образование комплекса со множеством относительно гидрофобных соединений, в том числе, например, стероидными соединениями, такими как 17 α -эстрадиол (см., например, van Uden *et al. Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 38:1-3-113 (1994)). Комплексообразование осуществляется посредством Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий и посредством образования водородной связи. Для общего обзора химии циклодекстринов см., Wenz, Agnew. *Chem. Int. Ed. Engl.*, 33:803-822 (1994).

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

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

Липосомы состоят из по меньшей мере одной липидной двухслойной мембраны, окружающей водный внутренний компартмент. Липосомы могут характеризоваться типом мембраны и размером. Малые моноламеллярные везикулы (SUV) имеют одну мембрану и, как правило, находятся в диапазоне от 0,02 до 0,05 мкм в диаметре; большие моноламеллярные везикулы (LUV), как правило, больше 0,05 мкм. Большие олиголамеллярные везикулы и мультиламеллярные везикулы имеют множество, обычно концентрических, слоев мембраны и, как правило, больше 0,1 мкм. Липосомы с несколькими неконцентрическими мембранами, *т. е.* несколькими более мелкими везикулами, содержащимися внутри большей везикулы, называются мультивезикулярными везикулами.

Один аспект настоящего изобретения относится к составам, содержащим липосомы,

которые содержат антисмысловой олигомер по настоящему изобретению, где липосомальная мембрана составлена с обеспечением липосомы с повышенной переносной способностью. В качестве альтернативы или в дополнение, антисмысловой олигомер по настоящему изобретению может содержаться внутри липосомного бислоя липосомы или быть адсорбирован на нем. Антисмысловой олигомер по настоящему изобретению может быть агрегирован с липидным поверхностно-активным веществом и переноситься в пределах внутреннего пространства липосомы; в таких случаях липосомальная мембрана составлена с обеспечением устойчивости к разрушительным эффектам агрегата активное средство-поверхностно-активное вещество.

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

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

Липосомы в соответствии с настоящим изобретением можно получать посредством любой из ряда разнообразных методик, которые известны из уровня техники. См., например, патент США № 4235871; опубликованную РСТ-заявку WO 96/14057; New RRC, Liposomes: A practical approach, IRL Press, Oxford (1990), p.33-104; и Lasic DD, Liposomes from physics to applications, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1993. Например, липосомы по настоящему изобретению можно получать посредством диффузии липида, дериватизированного гидрофильным полимером, в предварительно образованные липосомы, например, посредством воздействия на предварительно образованные липосомы мицеллами, состоящими из липид-привитых полимеров, при концентрациях липида,

соответствующих конечному молярному проценту дериватизированного липида, который является необходимым в липосоме. Липосомы, содержащие гидрофильный полимер, могут также быть образованы посредством методик гомогенизации, гидратации липидного поля или экструзии, известных из уровня техники.

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

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

Характеристики высвобождения состава по настоящему изобретению зависят от материала для инкапсуляции, концентрации инкапсулированного лекарственного средства и наличия модификаторов высвобождения. Например, на высвобождение можно влиять таким образом, чтобы оно являлось зависимым от pH, например, с применением чувствительного в отношении pH покрытия, которое опосредует высвобождение только при низком значении pH, как в желудке, или более высоком значении pH, как в кишечнике. Энтеросолюбильное покрытие можно применять для предотвращения осуществления высвобождения пока состав не пройдет через желудок. Множество покрытий или смесей цианамида, инкапсулированного в различных материалах, можно применять для получения первоначального высвобождения в желудке, за которым следует последующее высвобождение в кишечнике. На высвобождение также можно влиять посредством включения солей или порообразующих средств, которые могут повысить поглощение воды или высвобождение лекарственного средства посредством диффузии из капсулы. Вспомогательные вещества, которые модифицируют растворимость лекарственного средства, могут также применяться для контроля скорости высвобождения. Средства, которые усиливают разрушение матрицы или высвобождение из матрицы могут также быть включены. Их можно добавлять к лекарственному средству, добавлять в виде отдельной

фазы (*т. е.* в виде частиц) или можно совместно растворять в полимерной фазе в зависимости от соединения. В большинстве случаев количество должно составлять от 0,1 до 30 процентов (вес./вес. полимера). Типы средств, усиливающих разрушение, включают неорганические соли, такие как сульфат аммония и хлорид аммония, органические кислоты, такие как лимонная кислота, бензойная кислота и аскорбиновая кислота, неорганические основания, такие как карбонат натрия, карбонат калия, карбонат кальция, карбонат цинка и гидроксид цинка, и органические основания, такие как протаминсульфат, спермин, холин, этаноламин, диэтанолламин и триэтанолламин, и поверхностно-активные вещества, такие как Tween® и Pluronic®. Порообразующие средства, которые обеспечивают микроструктуру матрицам (*т. е.* водорастворимые соединения, такие как неорганические соли и сахара), добавляют в виде частиц. Диапазон, как правило, составляет от одного до тридцати процентов (вес./вес. полимера).

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

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

В дополнение к способам, предусмотренным в данном документе, антисмысловые олигомеры для применения в соответствии с настоящим изобретением можно составлять для введения посредством любого подходящего пути применения в медицине человека или ветеринарной медицине, аналогично с другими фармацевтическими средствами. Антисмысловые олигомеры и соответствующие составы на их основе можно вводить по

отдельности или в комбинации с другими терапевтическими стратегиями в лечении мышечной дистрофии, такими как трансплантация миобластов, средства терапии на основе стволовых клеток, введение аминогликозидных антибиотиков, ингибиторы протеосом и повышающие регуляцию средства терапии (например, повышающие регуляцию атрофина, аутосомного паралога дистрофина).

В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство можно вводить до, одновременно или последовательно с введением антисмыслового олигомера по настоящему изобретению. Например, антисмысловые олигомеры можно вводить в комбинации со стероидом и/или антибиотиком. В определенных вариантах осуществления антисмысловые олигомеры вводят пациенту, который получает фоновую стероидную терапию (например, периодическую или постоянную/непрерывную фоновую стероидную терапию). Например, в некоторых вариантах осуществления пациент подвергался лечению кортикостероидом до введения антисмыслового олигомера и продолжает получать стероидную терапию. В некоторых вариантах осуществления стероид представляет собой глюкокортикоид или преднизон.

Описанные пути введения предназначены быть только ориентировочными, поскольку специалист в данной области техники сможет легко определить оптимальный путь введения и любую величину дозы для любого конкретного животного и условия. Были предприняты многочисленные подходы для введения нового функционального генетического материала в клетки как *in vitro*, так и *in vivo* (Friedmann (1989) *Science*, 244:1275-1280). Такие подходы включают интеграцию гена, подлежащего экспрессии, в модифицированные ретровирусы (Friedmann (1989) *выше*; Rosenberg (1991) *Cancer Research* 51(18), suppl.: 5074S-5079S); интеграцию в отличные от ретровируса векторы (например, аденоассоциированные вирусные векторы) (Rosenfeld, *et al.* (1992) *Cell*, 68:143-155; Rosenfeld, *et al.* (1991) *Science*, 252:431-434) или доставку трансгена, связанного с гетерологичным энхансерным элементом промотора посредством липосом (Friedmann (1989), *выше*; Brigham, *et al.* (1989) *Am. J. Med. Sci.*, 298:278-281; Nabel, *et al.* (1990) *Science*, 249:1285-1288; Hazinski, *et al.* (1991) *Am. J. Resp. Cell Molec. Biol.*, 4:206-209; и Wang and Huang (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 84:7851-7855); связанных с лиганд-специфическими транспортными системами на основе катиона (Wu и Wu (1988) *J. Biol. Chem.*, 263:14621-14624) или применение «оголенной» ДНК, векторов экспрессии (Nabel *et al.* (1990), *выше*; Wolff *et al.* (1990) *Science*, 247:1465-1468). Непосредственная инъекция трансгенов в ткань обеспечивает только локализованную экспрессию (Rosenfeld (1992) *выше*; Rosenfeld *et al.* (1991) *выше*; Brigham *et al.* (1989) *выше*; Nabel (1990) *выше*; и Hazinski *et al.* (1991) *выше*). Группа Brigham *et al.* (*Am. J. Med. Sci.* (1989) 298:278-281 и *Clinical Research* (1991) 39 (реферат)) описывала трансфекцию *in vivo* только легких мышей после либо внутривенного, либо внутритрахеального введения комплекса ДНК-липосома. Примером обзорной статьи о процедурах генной терапии человека является Anderson, *Science* (1992) 256:808-813.

В дополнительном варианте осуществления фармацевтические композиции по

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

IV. Способы применения

Восстановление рамки считывания дистрофина с применением пропуска экзона

На возможный терапевтический подход для лечения DMD, обусловленной мутациями со сдвигом рамки считывания в гене *DMD*, указывает слабая форма дистрофинопатии, известная как BMD, которая обусловлена мутацией с сохранением рамки считывания. Способность превратить мутацию со сдвигом рамки считывания в мутацию с сохранением рамки считывания гипотетически может обеспечить сохранение рамки считывания mRNA и образование укороченного изнутри, но все еще функционального белка дистрофина. Антисмысловые олигомеры по настоящему изобретению разработаны для достижения этой цели.

Гибридизация антисмыслового олигомера формулы (I) формулы (II), формулы (III), формулы (IV), формулы (IVa), формулы (V), формулы (VI) с целевой последовательностью pre-mRNA препятствует образованию сплайсингового комплекса pre-mRNA и приводит к удалению экзона 50 из зрелой mRNA. Структура и конформация антисмысловых олигомеров по настоящему изобретению обеспечивают специфическое в отношении последовательности образование пар оснований с комплементарной последовательностью.

Нормальная mRNA дистрофина, содержащая все 79 экзонов, образует нормальный белок дистрофина. Форма каждого экзона отображает распределение кодонов между экзонами; следует отметить, что один кодон состоит из трех нуклеотидов. Экзоны прямоугольной формы начинаются и заканчиваются полными кодонами. Экзоны в форме стрелок начинаются с полного кодона, но заканчиваются расщепленным кодоном, содержащим только нуклеотид № 1 кодона. Нуклеотиды № 2 и № 3 этого кодона содержатся в следующем экзоне, начало которого представлено в форме шеврона.

Клинические результаты для анализа эффекта антисмыслового олигомера, который комплементарен целевой области экзона 50, интрона 49 и/или интрона 50 pre-mRNA дистрофина человека и индуцирует пропуск экзона 50, включают процент дистрофин-положительных волокон (PDPF), испытание с шестиминутной ходьбой (6MWT), потерю способности к передвижению (LOA), амбулаторную оценку North Star (NSAA), испытания легочной функции (PFT), способность подниматься (из положения лежа) без внешней поддержки, образование дистрофина *de novo* и другие функциональные измерения.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены способы образования дистрофина у субъекта, характеризующегося мутацией гена дистрофина, которая может быть скорректирована посредством пропуска экзона 50, при этом способ предусматривает введение субъекту антисмыслового олигомера или его фармацевтически приемлемой соли, описанных в данном документе. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены способы восстановления рамки считывания mRNA для индуцирования образования белка дистрофина у субъекта с мышечной дистрофией Дюшенна (DMD), который характеризуется мутацией гена дистрофина, которая может быть скорректирована посредством пропуска экзона 50. Продуцирование белка может быть определено с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (RT-PCR), анализа методом вестерн-блоттинга или иммуногистохимии (ИНС).

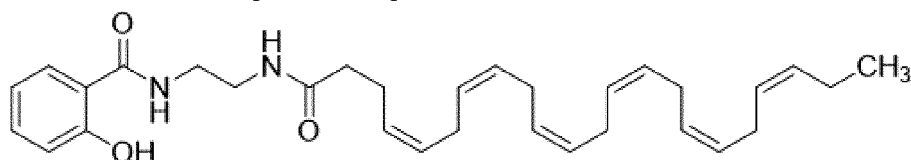
В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены способы лечения DMD у субъекта, нуждающегося в этом, где субъект характеризуется мутацией гена дистрофина, которая может быть скорректирована посредством пропуска экзона 50, при этом способ предусматривает введение субъекту антисмыслового олигомера или его фармацевтически приемлемой соли, описанных в данном документе. В различных вариантах осуществления эффективность лечения субъекта измеряют по задержке прогрессирования заболевания. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения субъекта измеряют по сохранению способности к передвижению у субъекта или снижению потери способности к передвижению у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способность к передвижению измеряют с применением испытания с 6-минутной ходьбой (6MWT). В определенных вариантах осуществления способность к передвижению измеряют с применением амбулаторной оценки North Star (NSAA).

В различных вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены способы сохранения легочной функции или уменьшения потери легочной функции у субъекта с DMD, где субъект характеризуется мутацией гена DMD, которая может быть скорректирована посредством пропуска экзона 50, при этом способ предусматривает введение субъекту антисмыслового олигомера или его фармацевтически приемлемой соли, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления функцию легких измеряют как максимальное давление фазы выдоха (MEP). В определенных вариантах осуществления функцию легких измеряют как максимальное давление фазы вдоха (MIP). В некоторых вариантах осуществления функцию легких измеряют как форсированную

жизненную емкость легких (FVC).

В дополнительном варианте осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить совместно с углеводом в способах по настоящему изобретению либо в том же составе, либо в виде отдельного состава, как предусмотрено в Han *et al.*, *Nat. Comms.* 7, 10981 (2016), полный объем которого включен в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть введены совместно с 5% углевода гексозы. Например, фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут быть введены совместно с 5% глюкозы, 5% фруктозы или 5% маннозы. В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть введены совместно с 2,5% глюкозы и 2,5% фруктозы. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть введена совместно с углеводом, выбранным из арабинозы, присутствующей в количестве 5% по объему, глюкозы, присутствующей в количестве 5% по объему, сорбита, присутствующего в количестве 5% по объему, галактозы, присутствующей в количестве 5% по объему, фруктозы, присутствующей в количестве 5% по объему, ксилита, присутствующего в количестве 5% по объему, маннозы, присутствующей в количестве 5% по объему, комбинации глюкозы и фруктозы, каждая из которых присутствует в количестве 2,5% по объему, и комбинации глюкозы, присутствующей в количестве 5,7% по объему, фруктозы, присутствующей в количестве 2,86% по объему, и ксилита, присутствующего в количестве 1,4% по объему.

В различных вариантах осуществления антисмысловой олигомер по настоящему изобретению вводят совместно с терапевтически эффективным количеством нестероидного противовоспалительного соединения. В некоторых вариантах осуществления нестероидное противовоспалительное соединение представляет собой ингибитор NF- κ B. Например, в некоторых вариантах осуществления ингибитор NF- κ B может представлять собой CAT-1004 или его фармацевтически приемлемую соль. В различных вариантах осуществления ингибитор NF- κ B может представлять собой конъюгат салицилата и ДНА. В некоторых вариантах осуществления ингибитор NF- κ B представляет собой CAT-1041 или его фармацевтически приемлемую соль. В определенных вариантах осуществления ингибитор NF- κ B представляет собой конъюгат салицилата и ЕРА. В различных вариантах осуществления ингибитор NF- κ B представляет собой



или его

фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления нестероидное противовоспалительное соединение представляет собой ингибитор TGF- β . Например, в определенных вариантах осуществления ингибитор TGF- β представляет собой HT-100.

В определенных вариантах осуществления описан антисмысловой олигомер, как описано в данном документе, для применения в терапии. В определенных вариантах осуществления описан антисмысловой олигомер, как описано в данном документе, для применения для лечения мышечной дистрофии Дюшенна. В определенных вариантах осуществления описан антисмысловой олигомер, как описано в данном документе, для применения для изготовления лекарственного препарата для применения в терапии. В определенных вариантах осуществления описан антисмысловой олигомер, как описано в данном документе, для применения для изготовления лекарственного препарата для лечения мышечной дистрофии Дюшенна.

V. Наборы

В настоящем изобретении также предусмотрены наборы для лечения пациента с генетическим заболеванием, где набор содержит по меньшей мере антисмысловую молекулу (например, антисмысловой олигомер, содержащий последовательность оснований, изложенную под любым из SEQ ID NO. 1-9), упакованную в подходящий контейнер, вместе с инструкциями по ее применению. Наборы также могут содержать второстепенные реагенты, такие как буферы, стабилизаторы и т. д. Специалисты, имеющие обычную квалификацию в данной области техники, поймут, что варианты применения вышеуказанного способа имеют широкое применение для идентификации антисмысловых молекул, подходящих для применения в лечении множества других заболеваний. В одном варианте осуществления набор содержит антисмысловой олигомер, соответствующий любой из формул (I)-(VI).

Примеры

Несмотря на то, что приведенное выше описание более подробно раскрыто с помощью иллюстраций и примеров в целях ясности понимания, для специалиста в данной области техники будет очевидно, с учетом идей, представленных в настоящем документе, что применительно к нему могут быть выполнены определенные изменения и модификации без отступления от сущности или объема прилагаемой формулы изобретения. Следующие примеры приведены только в качестве иллюстрации, а не для ограничения. Специалисты в данной области техники легко обнаружат ряд некритичных параметров, которые могут быть изменены или модифицированы с получением по сути аналогичных результатов.

Материалы и способы

Получение морфолиновых субъединиц

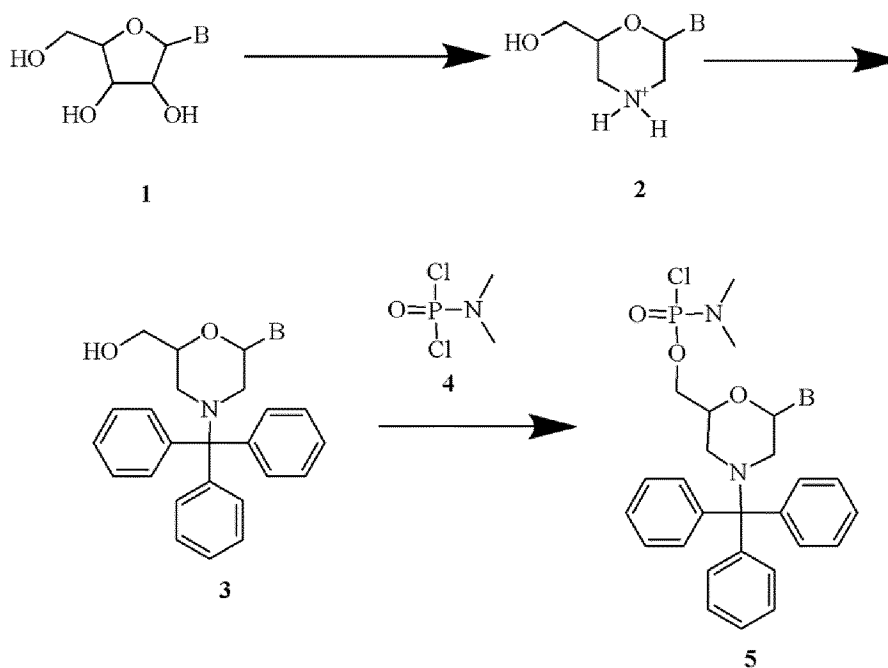


Схема 1. Общий путь синтеза субъединиц РМО

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

Реакция 3 с активированным соединением фосфора 4 приводит к образованию морфолиновых субъединиц, имеющих необходимый связующий фрагмент 5.

Соединения структуры 4 можно получить с применением любого количества способов, известных специалистам в данной области. Затем осуществляют связывание с морфолиновым фрагментом, как описано выше.

Соединения структуры 5 можно использовать в твердофазном синтезе олигомеров для получения олигомеров, содержащих межсубъединичные связи. Такие способы хорошо известны в данной области техники. Вкратце, соединение структуры 5 может быть

модифицировано на 5'-конце, чтобы оно содержало линкер для связи с твердой подложкой. После нанесения защитную группу **5** (*например*, тритил) на 3'-конце удаляют, и свободный амин вступает в реакцию с активированным фосфорным фрагментом второго соединения структуры **5**. Эту последовательность действий повторяют до тех пор, пока не будет получена необходимая последовательность олигомера. Защитная группа в 3'-концевой области может быть удалена или оставлена, если модификация в положении 3' является необходимой. Олигомер может быть удален с твердой подложки с применением любого количества способов, например, обработки основанием для расщепления связи с твердой подложкой.

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

Получение морфолиновых олигомеров

Получение соединений по настоящему изобретению может быть проведено с применением следующего протокола в соответствии со схемой 2.

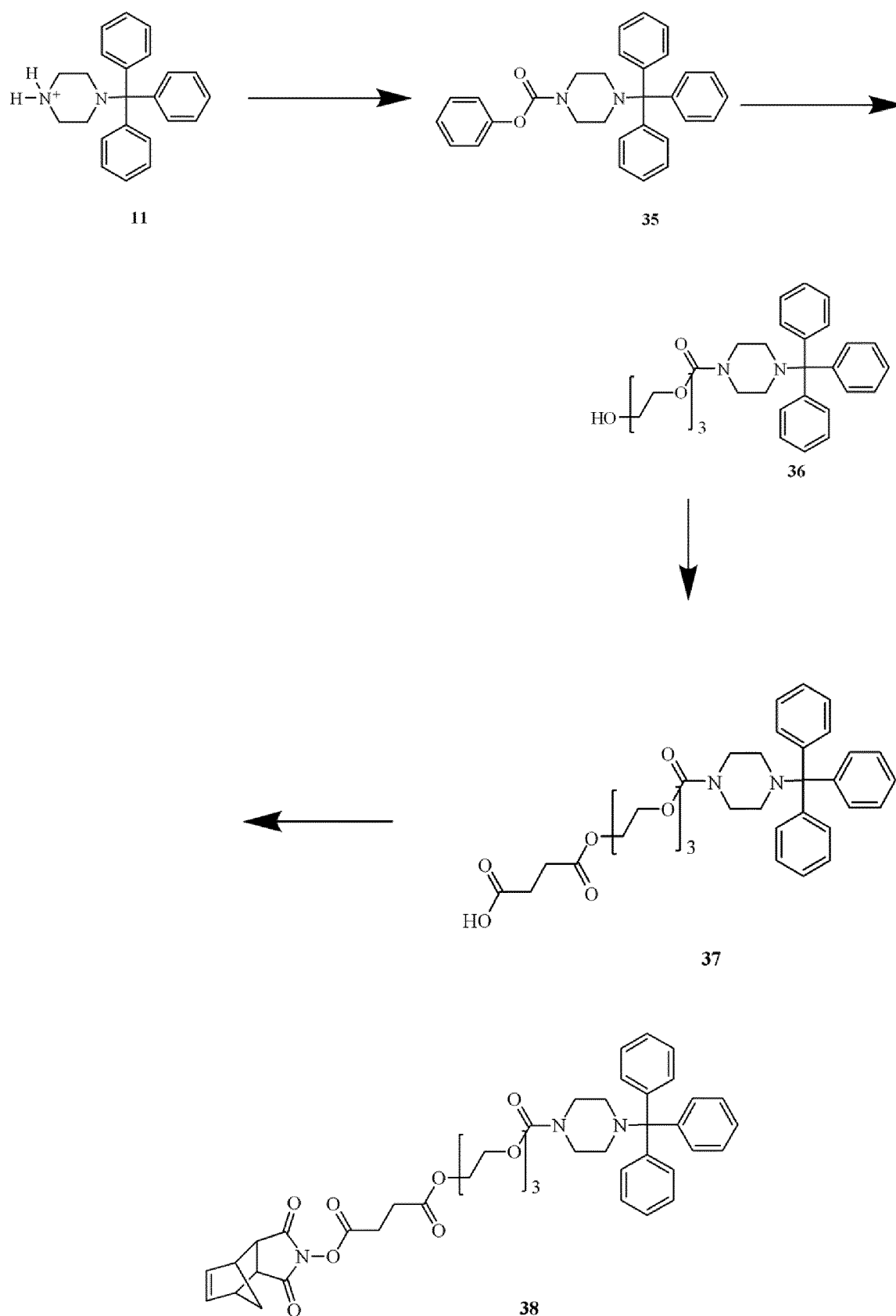


Схема 2: Получение кислоты активированного «хвоста»

Получение фенилкарбамата тритилпиперазина **35**. К охлажденной суспензии соединения **11** в дихлорметане (6 мл/г **11**) добавляют раствор карбоната калия (3,2 экв.) в

воде (4 мл/г карбоната калия). К этой двухфазной смеси медленно добавляют раствор фенилхлорформиата (1,03 экв.) в дихлорметане (2 г/г фенилхлорформиата). Реакционную смесь нагревают до 20°C. По завершении реакции (1-2 ч.) слои разделяют. Органический слой промывают водой и высушивают над безводным карбонатом калия. Продукт **35** выделяют посредством кристаллизации из ацетонитрила.

Получение карбаматного спирта **36**. Гидрид натрия (1,2 экв.) суспендируют в 1-метил-2-пирролидиноне (32 мл/г гидроксида натрия). К этой суспензии можно добавлять триэтиленгликоль (10,0 экв.) и соединение **35** (1,0 экв.). Полученную суспензию нагревают до 95°C. По завершении реакции (1-2 ч.) смесь охлаждают до 20°C. К этой смеси добавляют 30% дихлорметан/метил-*трет*-бутилового эфира (об.:об.) и воду. Содержащий продукт органический слой последовательно промывают водным раствором NaOH, водным раствором янтарной кислоты и насыщенным водным раствором хлорида натрия. Продукт **36** выделяют посредством кристаллизации из дихлорметана/метил-трет-бутилового эфира/гептана.

Получение кислоты «хвоста» **37**. К раствору соединения **36** в тетрагидрофуране (7 мл/г **36**) добавляют ангидрид янтарной кислоты (2,0 экв.) и DMAP (0,5 экв.). Смесь нагревают до 50°C. По завершении реакции (5 ч.) смесь охлаждают до 20°C и доводят pH до 8,5 водным раствором NaHCO₃. Добавляют метил-*трет*-бутиловый эфир и продукт подвергают экстракции в водный слой. Добавляют дихлорметан и pH смеси водного слоя доводят до 3 водным раствором лимонной кислоты. Содержащий продукт органический слой промывают смесью цитратного буфера с pH=3 и насыщенного водного раствора хлорида натрия. Этот раствор **37** дихлорметана применяют без выделения для получения соединения **38**.

Получение **38**. К раствору соединения **37** добавляют имид N-гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбоновой кислоты (HONB) (1,02 экв.), 4-диметиламинопиридин (DMAP) (0,34 экв.) и затем гидрохлорид 1-(3-диметиламинопропил)-*N'*-этилкарбодиимида (EDC) (1,1 экв.). Смесь нагревают до 55°C. По завершении реакции (4-5 ч.) смесь охлаждают до 20°C и последовательно промывают 0,2 М лимонной кислотой/солевым раствором 1:1 и солевым раствором. Раствор дихлорметана подвергают замене растворителя на ацетон и затем на *N*, *N*-диметилформамид, и продукт выделяют посредством осаждения из ацетона/*N*, *N*-диметилформамида в насыщенный водный раствор хлорида натрия. Неочищенный продукт несколько раз повторно суспендировали несколько в воде для удаления остаточного *N*, *N*-диметилформамида и солей.

Способ А синтеза РМО: применение дисульфидного якоря.

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

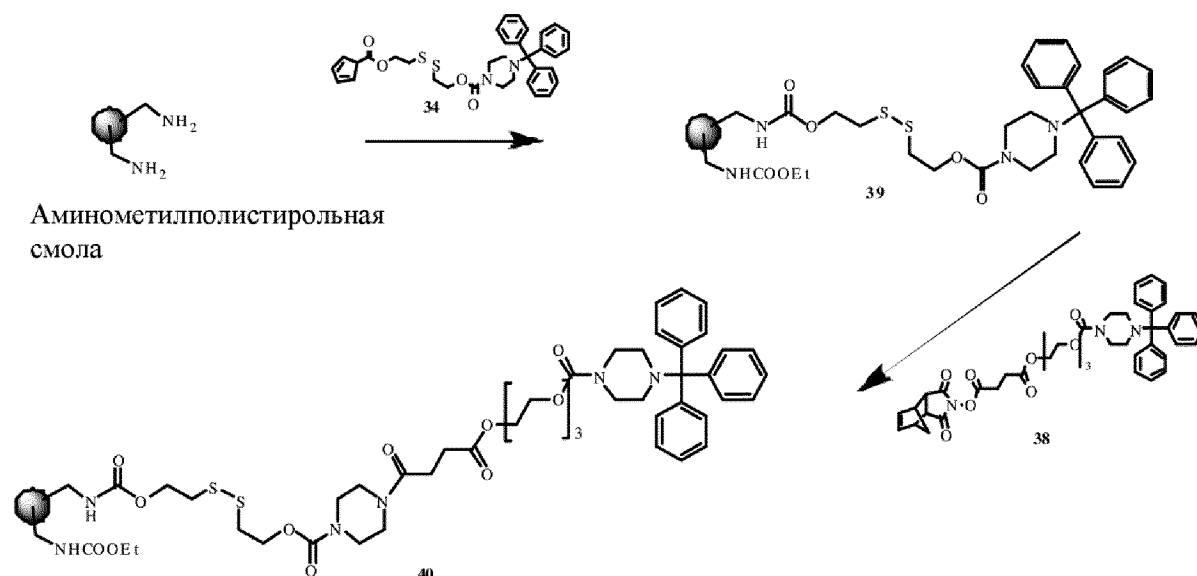


Схема 3: получение твердой подложки для синтеза морфолиновых олигомеров

Эту процедуру можно выполнять в силанизированном сосуде с рубашкой для синтеза пептидов (ChemGlass, Нью-Джерси, США) со стеклянной фриттой крупной пористости (40-60 мкм), верхнеприводной мешалкой и 3-ходовым тефлоновым запорным краном для обеспечения возможности барботации N_2 через фритту или вакуумной экстракции.

Стадии обработки/промывки смолы в следующей процедуре состоят из двух основных операций: псевдооживления смолы или использования реактора с перемешиваемым слоем и экстракции растворителя/раствора. Для псевдооживления смолы запорный кран устанавливают таким образом, чтобы обеспечить восходящий ток N_2 через фритту, и добавляют в реактор указанные реагенты для обработки/промывки смолы и обеспечивали их проникновение и полное смачивание смолы. Затем начинают перемешивание и перемешивают суспензию смолы в течение указанного времени. Для экстракции растворителя/раствора прекращают перемешивание и подачу N_2 и запускают вакуумный насос, и затем устанавливают запорный кран в положение, обеспечивающее возможность удаления реагентов для обработки/промывки смолы в емкость для отходов. Объемы всех реагентов для обработки/промывки смолы составляют 15 мл/г смолы, если не указано иное.

К аминотилполистирольной смоле (100-200 меш; емкость $\sim 1,0$ ммоль/г на основе замещения азота; 75 г, 1 экв., Polymer Labs, Великобритания, part #1464-X799) в силанизированном сосуде с рубашкой для синтеза пептидов добавляли 1-метил-2-пирролидинон (NMP; 20 мл/г смолы), и оставляли смолу для набухания при перемешивании в течение 1-2 ч. После удаления растворителя для набухания смолу промывают дихлорметаном ($2 \times 1-2$ мин.), 5% диизопропилэтиламином в 25% изопропанол/дихлорметане ($2 \times 3-4$ мин.) и дихлорметаном ($2 \times 1-2$ мин.). После вакуумирования последней промывки смолу обрабатывают раствором дисульфидного якоря **34** в 1-метил-2-пирролидиноне (0,17 M; 15 мл/г смолы, $\sim 2,5$ экв.), и смесь

смола/реагент нагревают при 45°C в течение 60 ч. По завершении реакции прекращают нагревание и удаляют раствор якоря, и промывают смолу 1-метил-2-пирролидиноном (4×3-4 мин.) и дихлорметаном (6×1-2 мин.). Смолу обрабатывают раствором 10% (об./об.) диэтилдикарбоната в дихлорметане (16 мл/г; 2×5-6 мин.) и затем промывают дихлорметаном (6×1-2 мин.). Смолу **39** высушивают в потоке N₂ в течение 1-3 ч. и затем в вакууме до достижения постоянной массы ($\pm 2\%$).

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

Известную массу высушенной смолы (25 ± 3 мг) переносят в силинизированную мерную колбу объемом 25 мл и добавляют ~5 мл 2% (об./об.) трифторуксусной кислоты в дихлорметане. Содержимое перемешивают путем осторожных круговых движений и затем оставляют на 30 минут. Объем доводят до 25 мл посредством добавления 2% (об./об.) трифторуксусной кислоты в дихлорметане, и содержимое тщательно перемешивают. С помощью пипетки прямого вытеснения аликвоту тритилсодержащего раствора (500 мкл) переносят в мерную колбу объемом 10 мл и доводят объем до 10 мл посредством добавления метансульфоновой кислоты.

Содержание тритиловых катионов в конечном растворе измеряют по УФ-поглощению при 431,7 нм и рассчитывают емкость смолы, выраженную в тритильных группах на грамм смолы (мкмоль/г), с использованием соответствующих объемов, разведения, коэффициента экстинкции (ϵ : 41 мкмоль⁻¹см⁻¹) и массы смолы. Анализ проводят в трех повторностях, и рассчитывают среднюю емкость.

Процедура определения емкости смолы, описанная в этом примере, обеспечит смолу с емкостью примерно 500 мкмоль/г. Емкость 300-400 мкмоль/г получали в случае, когда стадию введения дисульфидного якоря выполняли в течение 24 ч. при комнатной температуре.

Загрузка «хвоста». «Хвост» может быть введен на твердую подложку с использованием тех же условий и объемов, что и для получения аминометилполистиролдисульфидной смолы. Сначала со смолы после ее загрузки якорем снимают защиту в кислых условиях и нейтрализуют полученный материал перед проведением реакции связывания. Для стадии связывания раствор **38** (0,2 М) в DMF, содержащий 4-этилморфолин (NEM, 0,4 М), используют вместо 1-метил-2-пирролидинона для раствора дисульфидного якоря. Через 2 ч. при 45°C смолу **39** дважды промывают 5% диизопропилэтиламином в 25% изопропанол/дихлорметане и один раз DCM. К смоле добавляют раствор бензойного ангидрида (0,4 М) и NEM (0,4 М). Через 25 мин. рубашку реактора охлаждают до комнатной температуры и смолу дважды промывают 5% диизопропилэтиламином в 25% изопропанол/дихлорметане и восемь раз DCM. Смолу **40** фильтруют и сушат в условиях высокого вакуума. Емкость смолы **40** определяется как емкость исходной аминометилполистиролдисульфидной смолы **39**, используемой при

загрузке «хвоста».

Твердофазный синтез. Морфолиновые олигомеры получают на произведенном на заказ BioAutomation 128AVB (Плейно, штат Техас) на полипропиленовых реакционных колонках BioComma объемом 4 мл (Part # CT003-BC). Вокруг колонок, когда они находятся на синтезаторе, помещают алюминиевый блок с каналами для потока воды. AVB128 альтернативно добавляет растворы реагентов/промывочные растворы, выдерживает их в течение определенного времени и опорожняет колонки с помощью вакуума.

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

Получают следующие растворы реагентов:

раствор для детритилирования: 1% 4-цианопиридин и трифторуксусная кислота (вес/вес) в растворе дихлорметана/трифторэтанола 4:1;

раствор для нейтрализации: 3% диизопропилэтиламин в растворе дихлорметана/изопропанола 5:1; и

раствор для проведения реакции связывания: 0,18 М (или 0,24 М для олигомеров, предусматривающих достижение длины более 20 субъединиц) активированной морфолиновой субъединицы с требуемым основанием и типом связи с раствором 0,4 М N-этилморфолина в 1,3-диметилимидазолидиноне (DMI).

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

На синтезаторе с блоком, установленным на 42°C, к каждой колонке, содержащей 30 мг аминотилполистиролдисульфидной смолы (или смолы с «хвостом»), добавляли 2 мл 1-метил-2-пирролидинона и оставляли при комнатной температуре на 30 мин. После выполняемой 2 раза промывки 2 мл дихлорметана может быть осуществлен представленный далее цикл синтеза.

Стадия Объем Доставка Время выдерживания

Детритилирование 1,5 мл коллектор 15 секунд

Детритилирование 1,5 мл коллектор 15 секунд

Детритилирование 1,5 мл коллектор 15 секунд

Детритилирование 1,5 мл коллектор 15 секунд

Детритилирование 1,5 мл коллектор 15 секунд

Детритилирование 1,5 мл коллектор 15 секунд

Детритилирование 1,5 мл коллектор 15 секунд

DCM 1,5 мл коллектор 30 секунд

Нейтрализация 1,5 мл коллектор 30 секунд

Нейтрализация 1,5 мл коллектор 30 секунд

Нейтрализация 1,5 мл коллектор 30 секунд
 Нейтрализация 1,5 мл коллектор 30 секунд
 Нейтрализация 1,5 мл коллектор 30 секунд
 Нейтрализация 1,5 мл коллектор 30 секунд
 DCM 1,5 мл коллектор 30 секунд
 Связывание 350-500 мкл шприц 40 минут
 DCM 1,5 мл коллектор 30 секунд
 Нейтрализация 1,5 мл коллектор 30 секунд
 Нейтрализация 1,5 мл коллектор 30 секунд
 DCM 1,5 мл коллектор 30 секунд
 DCM 1,5 мл коллектор 30 секунд
 DCM 1,5 мл коллектор 30 секунд

Последовательности отдельных олигомеров программируют в синтезаторе таким образом, чтобы на каждую колонку подавался необходимый раствор для связывания (А, С, G, Т или I) в надлежащей последовательности. После включения в олигомер, находящийся на колонке, последней субъединицы колонку извлекают из блока и выполняют последний цикл вручную с использованием раствора для связывания, состоящего из 4-метокситрифенилметилхлорида (0,32 М в DMI) и 0,89 М 4-этилморфолина.

Отщепление от смолы и удаление защитных групп оснований и основной цепи. После метокситритилирования смолу промывают 8 раз 2 мл 1-метил-2-пирролидинона. Добавляют один мл раствора для отщепления, состоящего из 0,1 М 1,4-дителиотреитола (DTT) и 0,73 М триэтиламина в 1-метил-2-пирролидиноне, колонку закрывают и оставляют при комнатной температуре на 30 мин. По истечении этого времени раствор сливали во флакон Wheaton объемом 12 мл. Хорошо отжатую смолу дважды промывают 300 мкл раствора для отщепления. К раствору добавляют 4,0 мл конц. водного раствора аммиака (хранимого при -20°C), флакон плотно закрывают (покрытой тефлоном завинчивающейся крышкой) и взбалтывают смесь для перемешивания раствора. Флакон помещают в сушильный шкаф при 45°C на 16-24 ч. для проведения отщепления защитных групп оснований и основной цепи.

Очистка неочищенного продукта. Упакованный во флаконы раствор после аммонолиза вынимают из сушильного шкафа и дают остыть до комнатной температуры. Раствор разбавляли 20 мл 0,28% водного раствора аммиака и пропускали через колонку размером 2,5×10 см, содержащую смолу Масгоргер HQ (BioRad). Солевой градиент (А: 0,28% аммиака с В: 1 М хлоридом натрия в 0,28% аммиаке; 0-100% В за 60 мин.) использовали для элюирования защищенного метокситритилом олигомера. Объединенные фракции объединяют и подвергают дополнительной обработке в зависимости от требуемого продукта.

Деметокситритилирование морфолиновых олигомеров. Объединенные фракции после очистки Масгоргер обрабатывают 1 М H_3PO_4 для понижения pH до 2,5. После предварительного перемешивания образцы выдерживают при комнатной температуре в

течение 4 мин., при этом их нейтрализуют до pH 10-11 с помощью 2,8% раствора аммиака/воды. Полученные продукты очищают с помощью твердофазной экстракции (SPE).

Заполнение и кондиционирование колонки для SPE. Amberchrome CG-300M (Dow Chemicals (Rohm and Haas); Мидленд, Мичиган) (3 мл) заполняют колонки объемом 20 мл с фриттой (хроматографические колонки BioRad Econo-Pac (732-1011)), и смолу промывают 3 мл следующего: 0,28% NH_4OH /80% ацетонитрил; 0,5 М NaOH /20% этанол; вода; 50 мМ H_3PO_4 /80% ацетонитрил; вода; 0,5 NaOH /20% этанол; вода; 0,28% NH_4OH .

Очистка с помощью SPE. Раствор после демеокситритилирования наносили на колонку и три раза промывали смолу 8 мл 0,28% водного раствора аммиака. Под колонку можно помещать флакон Wheaton (объемом 12 мл) и можно элюировать продукт путем двух промывок 2 мл 45% ацетонитрила в 0,28% водном растворе аммиака.

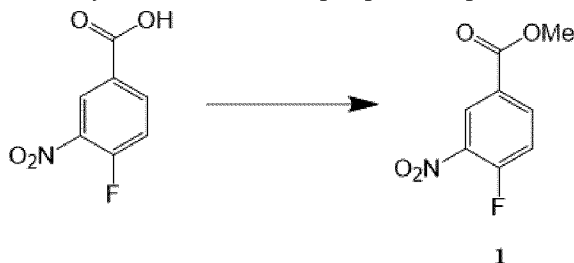
Выделение продукта. Растворы замораживают в сухом льду и флаконы помещают в лиофилизатор на по меньшей мере два дня с получением рыхлого белого порошка. Образцы затем растворяют в воде, фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (Pall Life Sciences, шприцевой фильтр Acrodisc диаметром 25 мм с мембраной HT Tuffryn с диаметром пор 0,2 мкм) с использованием шприца, и оптическую плотность (OD) измеряют на УФ-спектрофотометре для определения значения единиц OD для присутствующего олигомера, а также дозирования образцов для анализа. Затем растворы помещают обратно во флаконы Wheaton для лиофилизации.

Анализ морфолиновых олигомеров с помощью MALDI. Для определения состава фракций при очистке, а также для подтверждения идентичности (молекулярной массы) олигомеров можно использовать масс-спектрометрию MALDI-TOF. Анализ образцов можно проводить после их разбавления раствором 3,5-диметокси-4-гидроксикоричной кислоты (синапиновой кислоты), 3,4,5-тригидроксиацетофенона (THAP) или альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты (HCCA) в качестве матриц.

Способ В синтеза РМО: Применение якоря нитрокарбоксифенилпропила (NCP2)

Синтез якоря NCP2

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

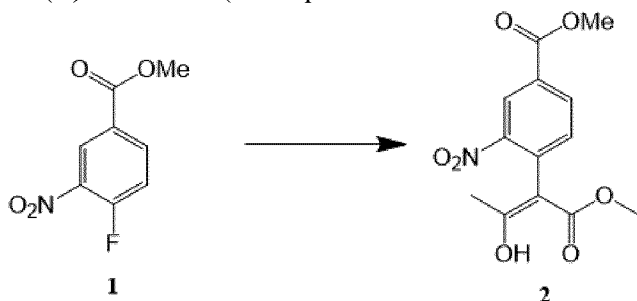


12,7 кг 4-фтор-3-нитробензойной кислоты, 40 кг метанола и 2,82 кг концентрированной серной кислоты можно добавлять в колбу объемом 100 л. Смесь перемешивают при нагревании с обратным холодильником (65°C) в течение 36 часов. Реакционную смесь охлаждают до 0°C. Кристаллы могут образовываться при приблизительно 38°C. Смесь выдерживают при 0°C в течение 4 часов и затем фильтруют в

атмосфере азота. Колбу объемом 100 л промывали и осадок на фильтре промывали 10 кг метанола, охлажденного до 0°C. Твердый осадок на фильтре сушили на воронке в течение 1 часа, переносили на поддоны и сушили в вакуумном сушильном шкафу при комнатной температуре до постоянной массы.

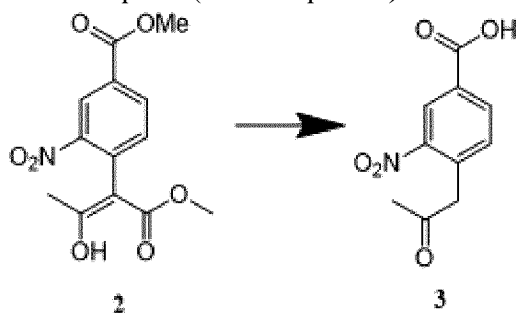
2. Получение 3-нитро-4-(2-оксопропил)-бензойной кислоты

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



В колбу объемом 100 л можно добавлять 3,98 кг метил-4-фтор-3-нитробензоата (1) с предыдущей стадии, 9,8 кг DMF и 2,81 кг метилацетоацетата. Смесь перемешивают и охлаждают до 0°C. Добавляют 3,66 кг DBU в течение приблизительно 4 часов, в то время как температуру поддерживают на уровне 5°C или ниже. Смесь перемешивают в течение дополнительного 1 часа. Добавляют раствор 8,15 кг лимонной кислоты в 37,5 кг очищенной воды, в то время как температуру реакционной смеси поддерживают на уровне 15°C или ниже. После добавления реакционную смесь перемешивают в течение дополнительных 30 минут и затем фильтруют в атмосфере азота. Влажный осадок на фильтре возвращают в колбу объемом 100 л вместе с 14,8 кг очищенной воды. Суспензию перемешивают в течение 10 минут и затем фильтруют. Влажный осадок снова возвращают в колбу объемом 100 л, суспендируют с 14,8 кг очищенной воды в течение 10 минут и фильтруют с получением неочищенного (Z)-метил-4-(3-гидрокси-1-метокси-1-оксобут-2-ен-2-ил)-3-нитробензоата.

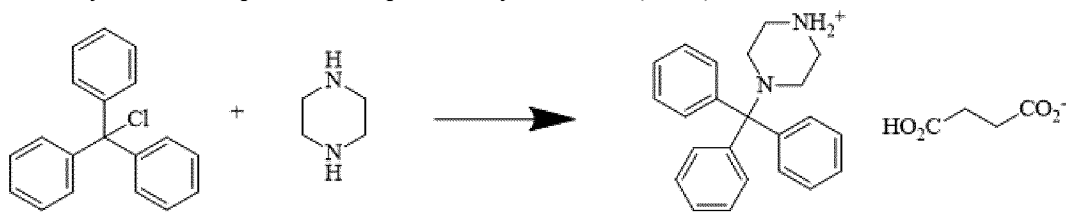
В. 3-Нитро-4-(2-оксопропил)бензойная кислота



Неочищенный (Z)-метил-4-(3-гидрокси-1-метокси-1-оксобут-2-ен-2-ил)-3-нитробензоат можно вносить в реакционную колбу объемом 100 л в атмосфере азота. Добавляют 14,2 кг 1,4-диоксана и затем перемешивают. Добавляют раствор 16,655 кг концентрированной HCl и 13,33 кг очищенной воды (6 M HCl) в течение 2 часов при поддержании температуры реакционной смеси ниже 15°C. Когда добавление завершают, реакционную смесь нагревают с обратным холодильником (80°C) в течение 24 часов, охлаждают до комнатной температуры и фильтруют в атмосфере азота. Твердый осадок на

фильтре ресуспендируют с помощью 14,8 кг очищенной воды, фильтруют, снова ресуспендируют с помощью 14,8 кг очищенной воды и фильтруют. Твердое вещество возвращают в колбу объемом 100 л с 39,9 кг DCM и нагревают с обратным холодильником при перемешивании в течение 1 часа. Для растворения оставшихся твердых веществ добавляли 1,5 кг очищенной воды. Нижний органический слой отделяют в предварительно нагретую колбу объемом 72 л, затем возвращают в чистую сухую колбу объемом 100 л. Раствор охлаждают до 0°C, выдерживают в течение 1 часа, затем фильтруют. Твердый осадок на фильтре дважды промывают раствором 9,8 кг DCM и 5 кг гептана, затем сушат на воронке. Твердое вещество переносят на поддоны и сушат до достижения постоянной массы, которая составляет 1,855 кг 3-нитро-4-(2-оксопропил)-бензойной кислоты.

3. Получение N-тритилпиперазина сукцината (NTP)

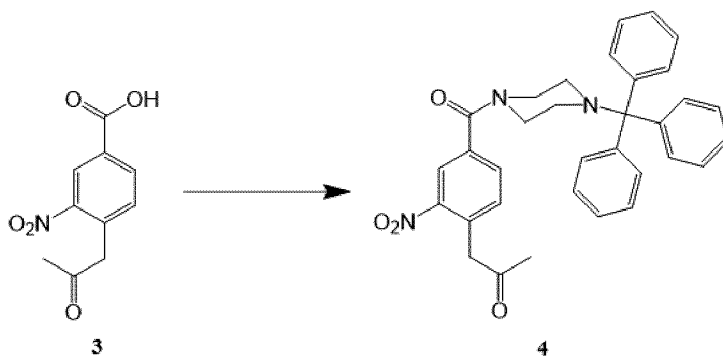


1,805 кг трифенилметилхлорида и 8,3 кг толуола (раствор ТРС) можно вносить в колбу объемом 72 л с рубашкой в атмосфере азота. Смесь перемешивают до растворения твердых веществ. Добавляют 5,61 кг пиперазина, 19,9 кг толуола и 3,72 кг метанола в реакционную колбу с рубашкой объемом 100 л в атмосфере азота. Смесь перемешивают и охлаждают до 0°C. Раствор ТРС медленно добавляют порциями в течение 4 часов, в то время как температуру реакционной смеси поддерживают на уровне 10°C или ниже. Смесь перемешивают в течение 1,5 часа при 10°C, затем обеспечивают нагревание до 14°C. 32,6 кг очищенной воды можно вносить в колбу объемом 72 л, затем переносить в колбу объемом 100 л, в то время как внутренняя температура партии поддерживается на уровне $20 \pm 5^\circ\text{C}$. Обеспечивают разделение слоев и нижний водный слой отделяют и убирают для хранения. Органический слой три раза подвергают экстракции с использованием 32 кг очищенной воды для каждого раза, и водные слои отделяют и объединяют с сохраненным водным раствором.

Оставшийся органический слой охлаждают до 18°C и к нему медленно добавляют порциями раствор 847 г янтарной кислоты в 10,87 кг очищенной воды. Смесь перемешивают в течение 1,75 часа при $20 \pm 5^\circ\text{C}$. Смесь фильтруют и твердые вещества промывают 2 кг ТВМЕ и 2 кг ацетона, затем сушат на воронке. Осадок на фильтре дважды ресуспендируют с помощью 5,7 кг ацетона, фильтруют и промывают с помощью 1 кг ацетона между процедурами ресуспендирования. Твердое вещество сушат на воронке, затем переносят на поддоны и сушат в вакуумном сушильном шкафу при комнатной температуре до достижения постоянной массы.

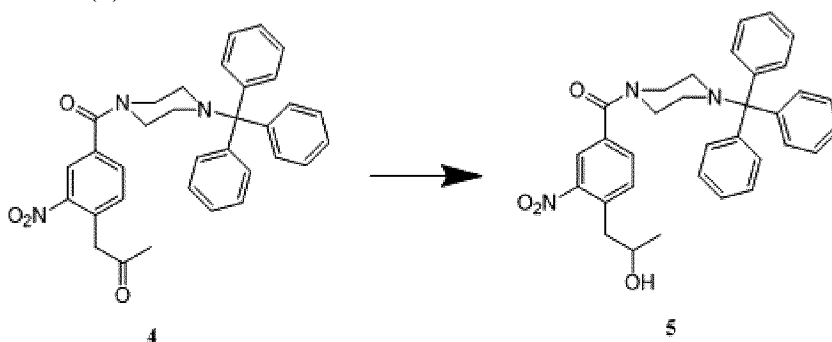
4. Получение (4-(2-гидроксипропил)-3-нитрофенил)(4-тритилпиперазин-1-ил)метанона

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



В колбу объемом 100 л с рубашкой в атмосфере азота можно добавлять 2 кг 3-нитро-4-(2-оксопропил)бензойной кислоты (**3**), 18,3 кг DCM и 1,845 кг гидрохлорида N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида (EDC.HCl). Раствор перемешивают до образования гомогенной смеси. Добавляют 3,048 кг NTP в течение 30 минут при комнатной температуре и перемешивают в течение 8 часов. К реакционной смеси добавляют 5,44 кг очищенной воды и перемешивают в течение 30 минут. Обеспечивали разделение слоев, и нижний органический слой, содержащий продукт, сливают и убирают на хранение. Водный слой дважды подвергали экстракции с помощью 5,65 кг DCM. Объединенные органические слои промывают раствором 1,08 кг хлорида натрия в 4,08 кг очищенной воды. Органический слой высушивают над 1,068 кг сульфата натрия и фильтруют. Сульфат натрия промывают с помощью 1,3 кг DCM. Объединенные органические слои суспендируют с 252 г силикагеля и фильтруют через фильтровальную воронку, содержащую слой из 252 г силикагеля. Слой силикагеля промывали с помощью 2 кг DCM. Объединенные органические слои выпаривают на роторном испарителе, и затем к остатку добавляют 4,8 кг THF и выпаривают на роторном испарителе до получения 2,5 объемов неочищенного 1-(2-нитро-4(4-тримилпиперазин-1-карбонил)фенил)пропан-2-она в THF.

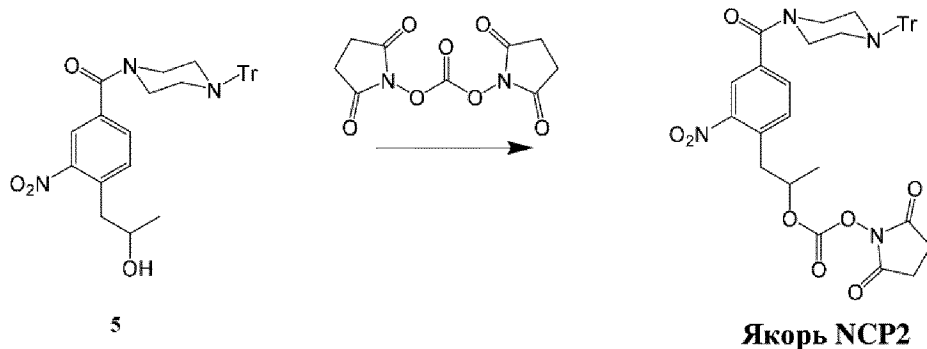
В. Получение (4-(2-гидроксипропил)-3-нитрофенил)(4-тримилпиперазин-1-ил)метанона (**5**)



3600 г **4** из предыдущей стадии и 9800 г THF можно добавлять в колбу объемом 100 л с рубашкой в атмосфере азота. Перемешиваемый раствор охлаждают до $\leq 5^{\circ}\text{C}$. Раствор разбавляют 11525 г этанола и добавляют 194 г борогидрида натрия в течение приблизительно 2 часов при $\leq 5^{\circ}\text{C}$. Реакционную смесь перемешивают в течение дополнительных 2 часов при $\leq 5^{\circ}\text{C}$. Реакционную смесь гасят раствором 1,1 кг хлорида аммония в 3 кг воды путем медленного добавления для поддержания температуры на

уровне $\leq 10^{\circ}\text{C}$. Реакционную смесь перемешивают в течение дополнительных 30 минут, фильтруют для удаления неорганических веществ, повторно загружают в колбу объемом 100 л с рубашкой и экстрагируют с помощью 23 кг DCM. Органический слой отделяют и водный слой еще дважды экстрагируют с помощью 4,7 кг DCM для каждой экстракции. Объединенные органические слои промывают раствором 800 г хлорида натрия в 3 кг воды, затем высушивают над 2,7 кг сульфата натрия. Суспензию фильтруют и осадок на фильтре промывают 2 кг DCM. Объединенные фильтраты концентрируют до 2,0 объемов, разбавляют 360 г этилацетата и выпаривают. Неочищенный продукт загружают в колонку с силикагелем из 4 кг оксида кремния, заполненную DCM в атмосфере азота и элюируют 2,3 кг этилацетата в 7,2 кг DCM. Объединенные фракции выпаривают и остаток растворяют в 11,7 кг толуола. Раствор в толуоле фильтруют и осадок на фильтре дважды промывают, используя каждый раз 2 кг толуола. Осадок на фильтре высушивают до достижения постоянной массы.

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



4,3 кг соединения **5** (масса скорректирована на основе остаточного толуола посредством ^1H ЯМР; все реагенты, указанные ниже, соответственно масштабированы) и 12,7 кг пиридина можно вносить в колбу объемом 100 л с рубашкой в атмосфере азота. К полученному добавляют 3,160 кг DSC (78,91 вес % по данным ^1H ЯМР), при этом внутреннюю температуру поддерживают на уровне $\leq 35^{\circ}\text{C}$. Реакционную смесь выдерживают в течение приблизительно 22 часов при температуре окружающей среды и затем фильтруют. Осадок на фильтре промывают 200 г пиридина. В двух партиях, каждая из которых содержит $\frac{1}{2}$ объема фильтрата, промывочную жидкость фильтрата можно медленно вносить в колбу объемом 100 л с рубашкой, содержащую раствор 11 кг лимонной кислоты и 50 кг воды, и перемешивать в течение 30 минут для обеспечения образования твердого осадка. Твердое вещество собирают с помощью фильтровальной воронки, дважды промывают с использованием 4,3 кг воды на каждую промывку и сушат на фильтровальной воронке в вакууме.

Объединенные твердые вещества можно вносить в колбу объемом 100 л с рубашкой, и растворять в 28 кг DCM, и промывать раствором 900 г карбоната калия в 4,3 кг воды. Через 1 час обеспечивали разделение слоев и водный слой удаляли. Органический слой промывают 10 кг воды, отделяют и сушат над 3,5 кг сульфата натрия. DCM фильтруют,

выпаривают и высушивают в вакууме с получением 6,16 кг якоря NCP2.

Синтез смолы, загруженной якорем NCP2

Приблизительно 52 л NMP и 2300 г аминотетрагидрофурановой смолы можно загружать в реактор для твердофазного синтеза объемом 75 л с тефлоновым запорным краном. Смола перемешивают в NMP до набухания в течение приблизительно 2 часов, затем сливают. Смола дважды промывают с помощью 4 л DCM на каждую промывку, затем дважды с помощью 39 л нейтрализующего раствора на каждую промывку, затем дважды с помощью 39 л DCM на каждую промывку. Раствор якоря NCP2 медленно добавляют к перемешиваемому раствору смолы, перемешивают в течение 24 часов при комнатной температуре и сливают. Смола промывают четыре раза с помощью 39 л NMP на каждую промывку и шесть раз с помощью 39 л DCM на каждую промывку. Смола обрабатывают и перемешивают с $\frac{1}{2}$ эквивалентного раствора диэтилдикарбоната (DEDC) в течение 30 минут, высушивают, и обрабатывают, и перемешивают со 2-й половиной эквивалентного раствора DEDC в течение 30 минут, и сливают. Смола шесть раз промывают 39 л DCM на каждую промывку, затем сушат в сушильном шкафу до достижения постоянной массы, составившей 3573,71 г смолы, загруженной якорем.

Получение морфолинового олигомера с использованием якоря NCP2

50 л полученного в результате твердофазного синтеза неочищенного лекарственного вещества РМО

1. Материалы

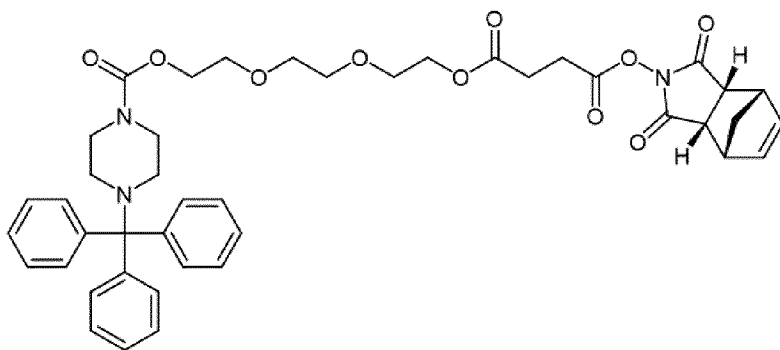
Таблица 2: Исходные материалы

Название материала	Химическое название	Номер CAS	Химическая формула	Молекулярная масса
Активированная А-субъединица	Сложный эфир фосфорамидохлоридной кислоты и <i>N, N</i> -диметил-, [6-[6-(бензоиламино)-9H-пурин-9-ил]-4-(трифенилметил)-2-морфолинил]метила	1155373-30-0	$C_{38}H_{37}ClN_7O_4P$	722,2
Активированная С-субъединица	Сложный эфир фосфорамидохлоридной кислоты и <i>N, N</i> -диметил-, [6-[4-(бензоиламино)-2-оксо-1(2H)-пиримидинил]-4-(трифенилметил)-2-морфолинил]метила	1155373-31-1	$C_{37}H_{37}ClN_5O_5P$	698,2

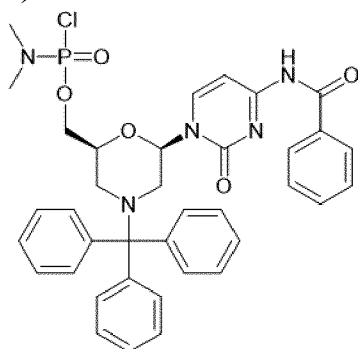
Активированная DPG-субъединица	Сложный эфир пропановой кислоты и 2,2-диметил-4-[[[9-[6-[[[хлор-(диметиламино)-фосфинил]-окси]-метил]-4-(трифенилметил)-2-морфолинил]-2-[(2)-фенилацетил)-амино]-9Н-пурин-6-ил]-окси]-метил]-фенила	1155309-89-9	$C_{51}H_{53}ClN_7O_7P$	942,2
Активированная T-субъединица	Сложный эфир фосфорамидохлоридной кислоты и <i>N, N</i> -диметил-, [6-(3,4-дигидро-5-метил-2,4-диоксо-1(2H)-пиримидинил)]-4-(трифенилметил)-2-морфолинил]метила	1155373-34-4	$C_{31}H_{34}ClN_4O_5P$	609,1
Активированный «хвост» EG3	Сложный эфир бутандиовой кислоты и 1-[3aR,4S,7R,7aS)-1,3,3a,4,7,7a-гексагидро-1,3-диоксо-4,7-метано-2H-изоиндол-2-ил]-4-[2-[2-[2-[[[4-(трифенилметил)-1-пиперазинил]-карбонил]-окси]-этокси]-этокси]-этила]	1380600-06-5	$C_{43}H_{47}N_3O_{10}$	765,9

Химическая структура исходных веществ

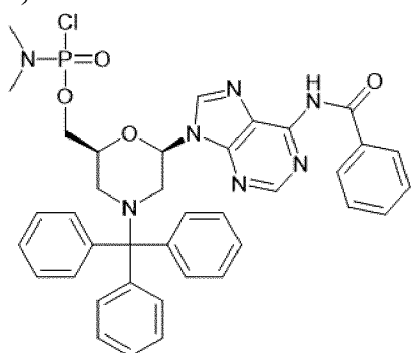
А. Активированный «хвост» EG3



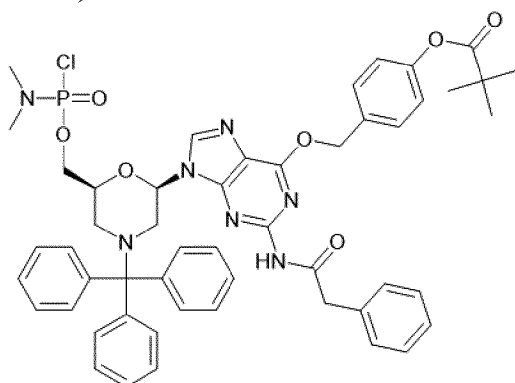
В. Активированная С-субъединица (в отношении получения см. патент США № 8067571)



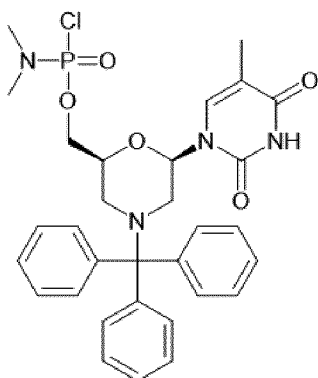
С. Активированная А-субъединица (в отношении получения см. патент США № 8067571)



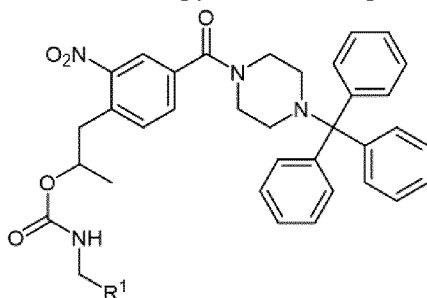
Д. Активированная DPG-субъединица (в отношении получения см. WO 2009/064471)



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



F. Смола, загруженная якорем



где R¹ представляет собой среду-подложку.

Таблица 3. Описание растворов для твердофазного олигомерного синтеза неочищенного лекарственного вещества РМО

Название раствора	Состав раствора
Раствор якоря NCP2	37,5 л NMP и 1292 г якоря NCP2
Кэппирующий раствор DEDC	4,16 л диэтилдикарбоната (DEDC), 3,64 л NEM и 33,8 л DCM
Раствор CУTFA	2,02 кг 4-цианопиридина, 158 л DCM, 1,42 л TFA, 39 л TFE и 2 л очищенной воды
Раствор для нейтрализации	35,3 л IPA, 7,5 л DIPEA и 106,5 л DCM
Раствор для расщепления	1530,04 г DTT, 6,96 л NMP и 2,98 л DBU

2. Синтез неочищенного лекарственного вещества РМО

А. Набухание смолы

Аликвоту 750 г загруженной якорем смолы и 10,5 л NMP можно вносить в силианизированный реактор объемом 50 л и перемешивать в течение 3 часов. NMP сливают и загруженную якорем смолу дважды промывают с помощью 5,5 л DCM для каждой промывки и дважды с помощью 5,5 л 30% TFE/DCM для каждой промывки.

В. Цикл 0: присоединение «хвоста» EG3

Загруженную якорем смолу промывают три раза с помощью 5,5 л 30% TFE/DCM для каждой промывки и сливают, промывают с помощью 5,5 л раствора CУTFA в течение 15

минут и сливают, и снова промывают с помощью 5,5 л раствора CYTFA в течение 15 минут без сливания, к которому можно добавлять 122 мл NEM/DCM в соотношении 1:1, и суспензию перемешивают в течение 2 минут и сливают. Смолу дважды промывают 5,5 л нейтрализующего раствора в течение 5 минут и высушивают, затем дважды с помощью 5,5 л DCM для каждой промывки и сливают. Раствор 706,2 г активированного «хвоста» EG3 и 234 мл NEM в 3 л DMI можно добавлять к смоле и перемешивать в течение 3 часов при к. т. и сливать. Смолу дважды промывают с помощью 5,5 л раствора для нейтрализации в течение 5 минут на каждую промывку и один раз с помощью 5,5 л DCM и сливают. Раствор 374,8 г бензойного ангидрида и 195 мл NEM в 2680 мл NMP можно вносить и перемешивать в течение 15 минут и сливать. Смолу перемешивают с 5,5 л нейтрализующего раствора в течение 5 минут, затем один раз промывают с помощью 5,5 л DCM и дважды с помощью 5,5 л 30% TFE/DCM для каждой промывки. Смолу суспендируют в 5,5 л 30% TFE/DCM и выдерживают в течение 14 часов.

С. Циклы присоединения субъединицы 1-n

Таблица 4 - присоединение субъединицы общего основания

Цикл №: Субъединица (SU)	Обработка перед присоединением				Цикл присоединения		Обработка после присоединения	
	1	2	3	4			1	2
	Промывка с помощью 30% TFE/DCM	Раствор ¹ CYTFA	Раствор для нейтрал изации	Пром ывка с помо щью DCM	Колич ество SU (г) NEM (л) DMI (л)	Время присоед инения RT (часы)	Пром ывка с помо щью DCM	Пром ывка с помо щью 30% TFE/D CM
1:С	5,5 л	а) 5,5 л б) 5,5 л, 122 мл	3×5,5 л	5,5 л	536,7 г; 195 мл NEM; 3,2 л DMI	5	5,5 л	2X5,5 л

¹ мл указывает на количество NEM/DCM в соотношении 1:1

i. Обработки перед присоединением

Перед каждым циклом присоединения смолу: 1) промывают 30% TFE/DCM; 2) а) обрабатывают раствором CYTFA в течение 15 минут и сливают и б) обрабатывают раствором CYTFA в течение 15 минут, к которому добавляют NEM/DCM 1:1,

перемешивают и сливают; 3) трижды перемешивают с раствором для нейтрализации и 4) дважды промывают DCM.

ii. Обработки после присоединения

После сливания раствора каждой субъединицы смолу: 1) промывают DCM; и 2) дважды промывают 30% TFE/DCM. Если смолу выдерживают в течение периода времени до следующего цикла присоединения, второй промывочный раствор TFE/DCM не сливают и смола остается в указанном промывочном растворе TFE/DCM.

iii. Циклы присоединения активированных субъединиц

Каждый цикл присоединения проводят, как в общем описано для исходного присоединения мономера С (цитозин) в таблице 2 для каждой содержащей основание субъединицы.

iv. Окончательная промывка IPA

После того, как заключительная стадия присоединения выполнена, смолу промывают 8 раз с использованием 19,5 л IPA для каждой промывки и высушивают в вакууме при комнатной температуре в течение приблизительно 63,5 часов с получением сухой массы 5579,8 г.

С. Расщепление

Указанную выше смолу, связанную с неочищенным лекарственным веществом РМО, разделяют на две партии, причем каждую партию обрабатывают указанным далее образом. Партию смолы 2789,9 г: 1) перемешивают с 10 л NMP в течение 2 часов, затем NMP сливают; 2) трижды промывают 10 л 30% TFE/DCM каждый раз; 3) обрабатывают 10 л раствора CYTFA в течение 15 минут; и 4) обрабатывают 10 л раствора CYTFA в течение 15 минут, к которому затем добавляют 130 мл NEM/DCM 1:1, и перемешивают в течение 2 минут и сливают. Смолу трижды обрабатывают 10 л раствора для нейтрализации для каждого раза, шесть раз промывают 10 л DCM и восемь раз 10 л NMP для каждого раза. Смолу обрабатывают раствором для расщепления 1530,4 г DTT и 2980 DBU в 6,96 л NMP в течение 2 часов чтобы отделить неочищенное лекарственное вещество РМО от смолы. Раствор для расщепления сливают и оставляют в отдельном сосуде. Реактор и смолу промывают 4,97 л NMP, который объединяют с раствором для расщепления.

D. Снятие защиты

Объединенные раствор для расщепления и промывочный раствор на основе NMP переносят в контейнер высокого давления, в который добавляют 39,8 л NH_4OH ($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$), который охлажден до температуры от -10°C до -25°C в морозильной камере. Контейнер высокого давления герметично закрывают и нагревают до 45°C в течение 16 часов, затем оставляют охлаждаться до 25°C . Этот раствор для снятия защиты, содержащий неочищенное лекарственное вещество РМО, разбавляют в соотношении 3:1 очищенной водой и доводят pH до 3,0 с помощью 2 М фосфорной кислоты, затем до pH 8,03 с помощью NH_4OH .

E. Очистка неочищенного лекарственного вещества РМО

Раствор для снятия защиты из приведенной выше части D, содержащий

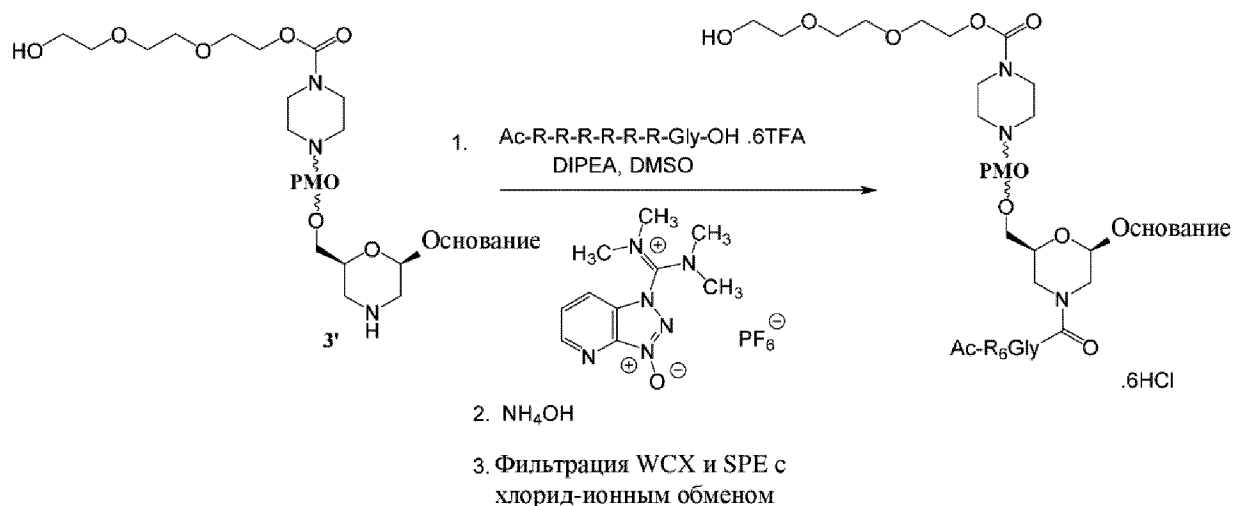
неочищенное лекарственное вещество, загружают в колонку с анионообменной смолой ToyoPearl Super-Q 650S (Tosoh Bioscience) и элюируют градиентом 0-35% В на 17 объемов колонки (буфер А: 10 mM гидроксид натрия; буфер В: 1 М хлорид натрия в 10 mM гидроксиде натрия), и фракции приемлемой чистоты (C18 и SCX HPLC) объединяют в очищенный раствор лекарственного продукта.

Раствор очищенного лекарственного вещества обессоливают и лиофилизируют с получением очищенного лекарственного вещества РМО.

Таблица 5.Сокращения

Сокращение	Название
CYTFA	4-Цианопиридин-трифторуксусная кислота
CPP	Проникающий в клетку пептид
DBU	1,8-Диазабициклоундец-7-ен
DCM	Дихлорметан
DEDC	Диэтилдикарбоната
DIPEA	N, N-Диизопропилэтиламин
DMI	1,3-Диметил-2-имидазолидинон
DMSO	Диметилсульфоксид
DTT	DL-дитиотреитол
HPLC	Высокоэффективная жидкостная хроматография
IPA	Изопропиловый спирт
MW	Молекулярная масса
NEM	N-Этилморфолин
NMP	N-Метил-2-пирролидон
SAX	Сильный анионообменник
SCX	Сильный катионообменник
SPE	Твердофазная экстракция
К. т.	Комнатная температура
TFA	2,2,2-Трифторуксусная кислота
TFE	2,2,2-Трифторэтанол

Конъюгирование CPP («R6Gly» раскрыт как SEQ ID NO: 11)



Аналитические процедуры. Масс-спектры время-пролетной матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI-TOF-MS) можно регистрировать на Bruker Autoflex™ Speed с использованием матрицы на основе синапиновой кислоты (SA). SCX-HPLC можно проводить на системе Thermo Dionex UltiMate® 3000, оснащенной детектором с матрицей из 3000 диодов и колонкой ProPac™ SCX-20 (250 x 4 мм), с использованием скорости потока 1,0 мл/мин. (pH=2; температура колонки 30°C). Подвижные фазы могут представлять собой **A** (25% ацетонитрил в воде, содержащей 24 мМ H₃PO₄) и **B** (25% ацетонитрил в воде, содержащей 1 М KCl и 24 мМ H₃PO₄). Можно использовать градиентное элюирование, предусматривающее 0 мин., 35% **B**; 2 мин., 35% **B**; 22 мин., 80% **B**; 25 мин., 80% **B**; 25,1 мин., 35% **B**; 30 мин., 35% **B**.

Ac-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-Gly-OH (SEQ ID NO: 11) гексатрифторацетат (614,7 мг, 0,354 ммоль), и 1-[бис(диметиламино)метиле]-1*H*-1,2,3-триазоло[4,5-*b*]пиридиный-3-оксида гексафторфосфат (HATU, 134,4 мг, 0,354 ммоль), и диметилсульфоксид (DMSO, 20 мл) добавляют к смеси РМО (свежевысушенной посредством лиофилизации в течение двух дней). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 3 минут, затем добавляют *N,N*-диизопропилэтиламин (DIPEA, 68,5 мг, 0,530 ммоль). Через 5 минут мутная смесь становится прозрачным раствором. Реакцию можно контролировать посредством SCX-HPLC. Через 2 часа добавляют 20 мл 10% раствора гидроксида аммония (2,8% NH₃*H₂O). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение дополнительных 2 часов. Реакцию останавливают путем добавления 400 мл воды. К раствору добавляют трифторэтанол (2,0 мл).

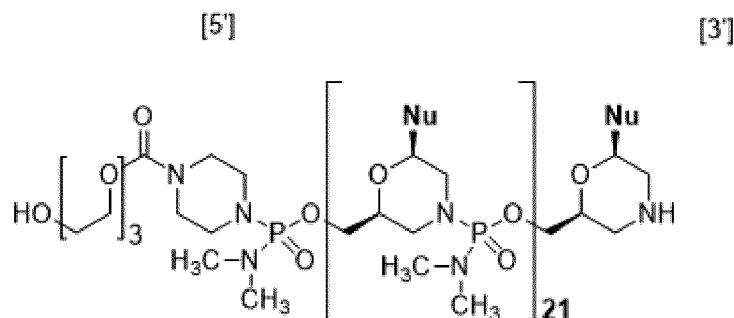
Раствор разделяют на две порции и каждую порцию можно очищать с помощью колонки WCX (10 г смолы на колонку). Каждую колонку WCX сначала промывают с помощью 20% ацетонитрила в воде (об./об.) для удаления исходного вещества РМО. Промывки (225 мл для каждой колонки) можно прекращать, когда масс-спектрометрический анализ MALDI-TOF показывает отсутствие сигнала РМО. Затем каждую колонку промывают водой (100 мл для каждой колонки). Необходимый продукт можно элюировать с помощью 2,0 М гуанидина-HCl (140 мл для каждой колонки). Очищенные растворы объединяют вместе, а затем разделяют на две части и каждую из них

обессоливают с помощью колонки для SPE (10 г смолы для каждой колонки).

Колонки для SPE сначала можно промывать с помощью 1,0 М водного раствора NaCl (100 мл для каждой колонки) с образованием гексагидрохлоридной солевой формы. Затем каждую колонку для SPE промывают водой (200 мл для каждой колонки). Конечный обессоленный продукт можно элюировать с помощью 50% ацетонитрила в воде (об./об., 150 мл для каждой колонки). Ацетонитрил можно удалять посредством откачки при пониженном давлении. Полученный в результате водный раствор можно лиофилизировать с получением необходимого продукта в виде гексагидрохлоридной соли.

Пример 1. РМО

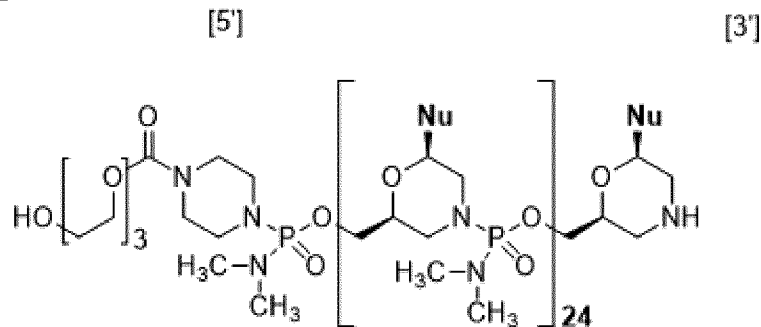
С применением описанных выше способов синтеза РМО синтезировали следующие РМО#1, РМО#2 и РМО#3:



РМО#1,

где каждый Nu от 1 до 22 и от 5' до 3' представляет собой H50D(+04-18) (SEQ ID NO: 1):

№ положения от 5' к 3'	N и	№ положения от 5' к 3'	N и	№ положения от 5' к 3'	N и	№ положения от 5' к 3'	N и	№ положения от 5' к 3'	N и
1	G	6	C	11	A	16	T	21	G
2	G	7	C	12	T	17	A	22	C
3	G	8	A	13	A	18	C		
4	A	9	G	14	C	19	A		
5	T	10	T	15	T	20	G		



РМО#2,

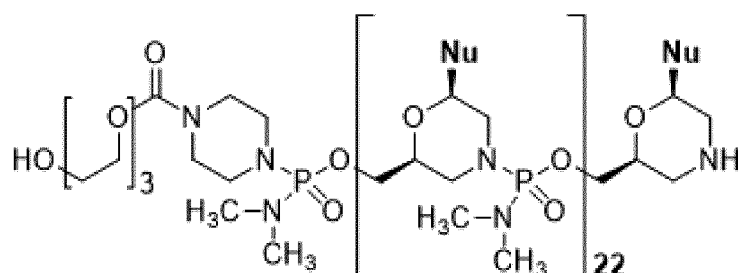
где каждый Nu от 1 до 25 и от 5' до 3' представляет собой H50D(+07-18) (SEQ ID

NO: 2):

№ положения от 5' к 3'	N и	№ положения от 5' к 3'	N и	№ положения от 5' к 3'	N и	№ положения от 5' к 3'	N и	№ положения от 5' к 3'	N и
1	G	6	C	11	A	16	T	21	G
2	G	7	C	12	T	17	A	22	C
3	G	8	A	13	A	18	C	23	T
4	A	9	G	14	C	19	A	24	C
5	T	10	T	15	T	20	G	25	C

[5]

[3]

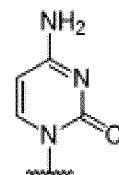
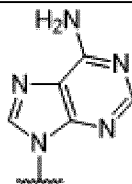


PMO#3,

где каждый Nu от 1 до 23 и от 5' до 3' представляет собой H50D(+07-16) (SEQ ID

NO: 3):

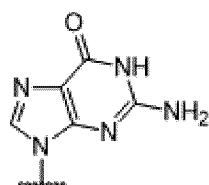
№ положения от 5' к 3'	N и	№ положения от 5' к 3'	N и	№ положения от 5' к 3'	N и	№ положения от 5' к 3'	N и	№ положения от 5' к 3'	N и
1	G	6	A	11	A	16	C	21	T
2	A	7	G	12	C	17	A	22	C
3	T	8	T	13	T	18	G	23	C
4	C	9	A	14	T	19	G		
5	C	10	T	15	A	20	C		



где A представляет собой

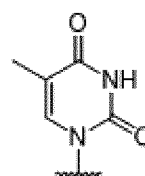
, C представляет собой

, G



представляет собой

, и T представляет собой



РМО#1 (SEQ ID NO: 1) обеспечивал получение продукта с характеристиками растворимости, которые являлись слишком ограниченными для предоставления возможности составления лекарственного продукта, тогда как РМО#2 (SEQ ID NO: 2) обеспечивал получение продукта, изготовление которого нельзя было осуществлять с достаточными выходом и чистотой.

В отличие от синтеза РМО#1 и РМО#2 синтез РМО#3 (который отличается от РМО#2 только 2 основаниями со стороны 5'-конца) не приводил к возникновению проблем, связанных с растворимостью или очисткой, позволяя проводить последующий синтез РРМО#3 из РМО#3 (пример 2 ниже).

Нацеливающаяся последовательность (5'-3')	SEQ ID NO:	Проблемы, связанные с изготовлением РМО
GGGATCCAGTATACTTACAGGC	1	<u>Растворимость.</u> Неочищенный РМО выпадал в осадок после хранения, демонстрируя ограниченную растворимость и стабильность раствора, делая нецелесообразным последующий синтез РРМО и использование в качестве кандидатного лекарственного продукта.
GGGATCCAGTATACTTACAGGCTCC	2	<u>Очистка.</u> Неочищенный РМО не удавалось подвергнуть очистке до подходящего уровня чистоты, требуемого для последующего синтеза РРМО и использования в качестве кандидатного лекарственного продукта.
GATCCAGTATACTTACAGGCTCC	3	<u>Отсутствуют</u> (чистота 91%; растворим в воде)

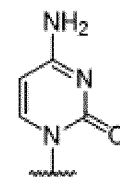
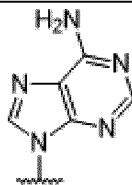
Аналогичный способ применяли для синтеза РМО#4, РМО#5, РМО#6, РМО#7, РМО#8 и РМО#9.

Пример 2. РРМО#3

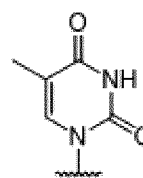
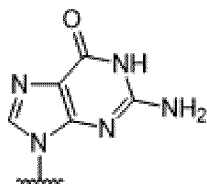
С применением протокола, описанного выше, синтезировали РРМО#3 из РМО#3 (SEQ ID NO: 3):

где каждый Nu от 1 до 23 и от 5' до 3' представляет собой SEQ ID NO: 3:

№ положения от 5' к 3'	N и	№ положения от 5' к 3'	N и	№ положения от 5' к 3'	N и	№ положения от 5' к 3'	N и	№ положения от 5' к 3'	N и
1	G	6	A	11	A	16	C	21	T
2	A	7	G	12	C	17	A	22	C
3	T	8	T	13	T	18	G	23	C
4	C	9	A	14	T	19	G		
5	C	10	T	15	A	20	C		



где A представляет собой , C представляет собой , G



представляет собой

Два соединения, которые нацелены на экзон 50 дистрофина человека (*DMD*), как и в таблице ниже, представляющие собой РМО#3 и РРМО#3, оба из которых имеют одинаковую последовательность, оценивали на предмет пропуска экзона 50 *DMD* в мРНК почечных трубочках здорового человека.

Последовательности РМО#3 и РРМО#3

Название	Нацеливающаяся последовательность (TS)	SEQ ID NO.	5'	3'
PMO#3	GATCCAGTATACTTACAGGCTCC	3	EG3	H
PPMO#3	GATCCAGTATACTTACAGGCTCC	3	EG3	-G-R ₆ (SEQ ID NO: 11)

В частности, миобласты здорового человека (пассаж 5-6, SKB-F-SL, приобретенные у Zen-Bio, Inc.) культивировали до достижения 80-90% конфлюэнтности в среде SKM-M перед иницированием дифференцировки путем инкубирования в среде с низким содержанием сыворотки крови (SKM-D, Zen-Bio, Inc.) Через пять дней после дифференцировки зрелые мышечные трубочки инкубировали с вышеуказанными соединениями при различных концентрациях (т. е. 40 мкМ, 20 мкМ, 10 мкМ, 5 мкМ, 2,5 мкМ и 1,25 мкМ). После девяти часов инкубирования мышечные трубочки промывали PBS и лизировали с помощью буфера RLT из набора RNeasy Micro (номер по кат. 74004, Qiagen), дополненного 1% β -меркаптоэтанолом. Общую РНК выделяли в соответствии с рекомендацией производителя, за исключением того, что для элюирования РНК использовали 20 мкл воды, не содержащей РНКаз.

Чтобы определить пропуск экзона 50 *DMD*, обеспечиваемый обоими соединениями, проводили одностадийную RT-PCR по конечной точке. Синтез cDNA и PCR-амплификацию проводили с применением 100 нг общей РНК, геноспецифических праймеров и системы одностадийной RT-PCR SuperScript III с ДНК-полимеразой *Taq* Platinum (номер по кат. 12574-026, Invitrogen). Геноспецифические праймеры были разработаны для нацеливания на экзоны 49 и 52 *DMD* человека (прямой праймер: CCA GCC ACT CAG CCA GTG AAG (SEQ ID NO: 12); обратный праймер: CGA TCC GTA ATG ATT GTT CTA GCC (SEQ ID NO: 13)). Синтез cDNA и PCR-амплификацию выполняли с помощью амплификаторов реального времени BioRad CFX96 с использованием программы, представленной в таблице 6. Экспрессию продуктов PCR с пропуском и без пропуска оценивали путем загрузки 22 мкл продукта PCR в ДНК-чип DNA Extended Range LabChip в составе системы LabChip GX, подготовленный с использованием реагента DNA 1K (номер по кат. 760517 и CLS760673, Perkin Elmer) в соответствии с инструкциями производителя. Процент пропуска экзона 50 *DMD* рассчитывается как процент молярности (нмоль/л) для соответствующей пропущенной экзону 50 полосы по сравнению с суммарной молярностью для соответствующих пропущенному и непропущенному экзонам полос.

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

Таблица 6. Программа амплификатора, применяемая для амплификации ампликонов, ассоциированных с *DMD*, с пропуском экзона 50 или без такового

Стадия	Температура	Время
1. Обратная транскрипция	55°C	30 мин
2. Инактивация обратной транскриптазы	94°C	2 мин
3. Денатурация	94°C	45 сек
4. Отжиг	59°C	45 сек

5. Элонгация	68°C	1 мин
6. Повторение стадий 3-4	45 циклов	
7. Конечная элонгация	68°C	10 мин
8. Хранение	4°C	∞

Результаты, демонстрирующие то, что РРМО#3 в значительной степени увеличивает пропуск экзона 50 *DMD* по сравнению с РМО#3, представлены в таблице ниже (в виде соотношения пропусков, обеспечиваемых РРМО#3 и РМО#).

Таблица 7. Процент пропуска экзона 50 *DMD*, обеспечиваемого РМО#3 и РРМО#3, в мышечных трубочках человека

Соединение/ доза (мкМ)	Относительный показатель пропуска экзона					
	1,25	2,5	5	10	20	40
РМО#3	1	1	1	1	1	1
РРМО#3	2,6	3,2	3,0	2,4	2,1	1,9

Данные в приведенной выше таблице 7 показывают, что в результате более высокий уровень пропуска экзона 50 обеспечивался в мышечных трубочках, когда клетки обрабатывали РРМО#3 по сравнению с обработкой РМО#3 при всех концентрациях. Данное улучшение может быть дополнительно продемонстрировано в сравнительном испытании *in vivo*, как например в исследовании с приматами, отличными от человека (NHP), из примера 4, где NHP обрабатывали РРМО#3 или РМО#3 и измеряли уровень пропуска экзона 50 в различных соответствующих мышечных тканях (более подробно см. в примере 4).

Пример 4. Пропуск экзона 50 у NHP

Чтобы дополнительно продемонстрировать эффективность пропуска экзонов при применении антисмысловых олигомеров РРМО, использовали приматов, отличных от человека. В частности, макакам-крабоедам, имеющим интактные мышечные ткани, внутривенно вводили РРМО#3 (пример 2), РМО#3 (пример 1) или солевой раствор.

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

При каждом запланированном вскрытии или проведении эвтаназии *in extremis* собирали и немедленно замораживали фрагменты диафрагмы, гладких мышц двенадцатиперстной кишки, пищевода и аорты, четырехглавой мышцы, дельтовидной мышцы, двуглавой мышцы и сердца. Процентную долю пропуска экзона 50 определяли с помощью RT-PCR, как описано выше.

Пример 5. Обеспечиваемый с помощью РМО пропуск экзона 50 *in vitro*

Получали серию РМО (SEQ ID NO 1-7; РМО #1 - #7) и тестировали в отношении

эффективности обеспечения пропуска экзона 50. Вкратце, первичные миобласты человека культивировали с применением стандартных методик. Лиофилизированные РМО повторно суспендировали в воде без нуклеаз; измерения для подтверждения молярности и в отношении растворов РМО осуществляли с применением спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). РМО в диапазоне доз доставляли в миобластные клетки (например, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10 и 20 мкМ) с применением нуклеопорации в соответствии с инструкциями изготовителя и набора РЗ (Lonza), и обеспечивали их инкубирование в течение ночи в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ перед проведением экстрагирования РНК. РНК экстрагировали из обработанных РМО клеток с применением 96-луночного набора для выделения РНК RNeasy от GE Healthcare и подвергали RT-PCR с применением стандартных методик с использованием праймеров, которые обеспечивали амплификацию экзонов 49-52 DMD человека. Уровень пропуска измеряли с применением биоанализатора Caliper LabChip, и % пропуска экзона (т. е. интенсивность полосы продукта, образовавшегося вследствие пропуска экзона, относительно полноразмерного продукта ПЦР) рассчитывали с помощью уравнения: $[\text{продукт, образовавшийся вследствие пропуска экзона 50} / (\text{сумма продуктов, образовавшихся вследствие пропуска экзона 50 и без пропуска экзона 50}) * 100]$, и значения EC₅₀ рассчитывали на основе процентной доли пропуска, индуцированного при каждой концентрации. Как показано в таблице 8, олигомеры РМО по настоящему изобретению, разработанные для нацеливания на акцепторную или донорную области сплайсинга экзона 50, обеспечивали пропуск экзона 50, при этом РМО#1, РМО#2 и РМО#3 обеспечивали активность, характеризующуюся наивысшими уровнями пропуска экзона 50 (EC₅₀<1,0 мкМ).

Таблица 8

SEQ ID NO:	Соединение	Активность (EC ₅₀ ⁽¹⁾)
1	РМО#1 (+04-18)	****
2	РМО#2 (+07-18)	****
3	РМО#3 (+07-16)	****
4	РМО#4 (+07-17)	**
5	РМО#5 (-19+07)	**
6	РМО#6 (+07-15)	*
7	РМО#7 (-02+23)	*

(1) **** = EC₅₀<1,0 мкМ; ** = EC₅₀ от 1,0 до 3,0 мкМ; * = EC₅₀ 3,0 мкМ или больше.

Следует понимать, что приведенное выше подробное описание и сопутствующие примеры являются лишь иллюстративными, и их не следует рассматривать как ограничивающие объем настоящего изобретения, который определяется исключительно прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами.

Различные изменения и модификации раскрытых вариантов осуществления будут очевидными для специалистов в данной области техники. Такие изменения и модификации,

включая без ограничения относящиеся к химическим структурам, заместителям, производным, промежуточным соединениям, синтезу, композициям, составам или способам применения согласно настоящему изобретению, могут быть выполнены без отступления от его сущности или объема.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ*

Описание	Идентификатор РМО	Идентификатор РРМО	Последовательность (от 5' до 3' или от N- конца до С-конца)	SEQ ID NO
H50D(+04-18)	РМО#1	РРМО#1	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	1
H50D(+07-18)	РМО#2	РРМО#2	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	2
H50D(+07-16)	РМО#3	РРМО#3	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	3
H50D(+07-17)	РМО#4	РРМО#4	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	4
H50A(-19+07)	РМО#5	РРМО#5	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	5
H50D(+07-15)	РМО#6	РРМО#6	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	6
H50A(-02+23)	РМО#7	РРМО#7	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	7
H50D(+06-18)	РМО#8	РРМО#8	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	8
H50D(+07-20)	РМО#9	РРМО#9	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	9
R ₆			RRRRRR	10
R ₆ G			RRRRRRG	11
Прямой праймер, связывающийся с экзоном 49			CCAGCCACTCAGC CAGTGAAG	12

человека				
Обратный праймер, связывающийся с экзоном 52 человека			CGATCCGTAATGA TTGTTCTAGCC	13
PMO-G	PMO-G	PPMO-G	GTTGCCTCCGGTT CTGAAGGTGTTC	14
(RXR) ₄			RXRRXRRXRRXR	15
(RFF) ₃ R			RFFRFFRFFR	16
(RXR) ₄ XB			RXRRXRRXRRXR XB	17
(RFF) ₃ RXB			RFFRFFRFFRXB	18
(RFF) ₃ RG			RFFRFFRFFRG	19
R ₅ G			RRRRRG	20
R ₅			RRRRR	21
Интрон 49 - экзон 50 - интрон 50	atcttcaaagtgttaatcgaataagtaatgtgtatgcttttctgttaaagAGGAAGTT AGAAGATCTGAGCTCTGAGTGGAAGGCGGTAAACCG TTTACTTCAAGAGCTGAGGGCAAAGCAGCCTGACCTA GCTCCTGGACTGACCACTATTGGAGCCTgtaagtatactggatc ccattctcttggctctagctatttgttcaaaag			22

* В зависимости от химических компонентов, используемых для связывания нуклеиновых оснований, Т может представлять собой тимин или урацил.

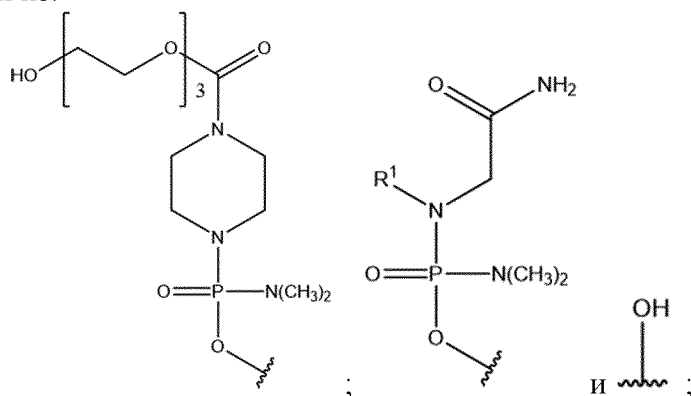
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль, способные к связыванию выбранной мишени для индуцирования пропуска экзона в гене дистрофина человека, где антисмысловой олигомер содержит последовательность оснований, которая комплементарна целевой области экзона 50 pre-mRNA дистрофина, обозначенной как сайт отжига, при этом последовательность оснований и сайт отжига выбраны из:

Сайт отжига	Нацеливающаяся последовательность [от 5' до 3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

где Т в каждой из последовательностей под SEQ ID NO: 1-9 представляет собой тимин или урацил.

2. Антисмысловой олигомер по п. 1, где антисмысловой олигомер содержит фрагмент Т, присоединенный к 5'-концу антисмыслового олигомера, при этом фрагмент Т выбран из:



и при этом антисмысловой олигомер необязательно связан с проникающим в клетку пептидом;

и при этом антисмысловой олигомер индуцирует пропуск экзона в гене дистрофина человека, или его фармацевтически приемлемая соль.

3. Антисмысловой олигомер по любому из пп. 1-2, где проникающий в клетку пептид присоединен к 3'-концу антисмыслового олигомера.

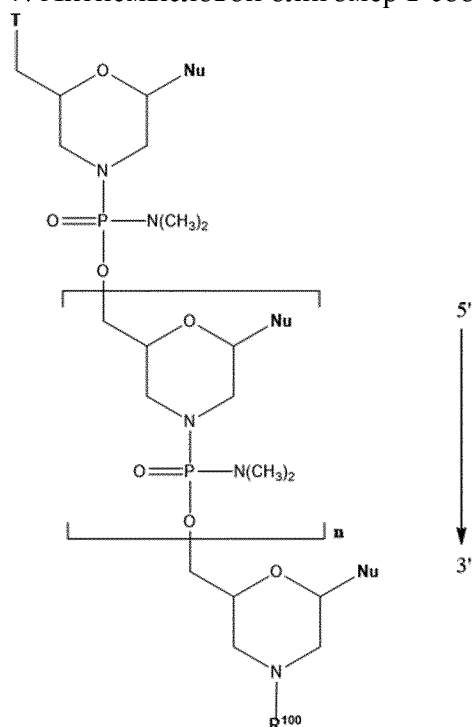
4. Антисмысловой олигомер по п. 3, где проникающий в клетку пептид представляет собой пептид, богатый аргинином.

5. Антисмысловой олигомер по п. 4, где пептид, богатый аргинином, выбран из

группы, состоящей из $-(RXR)_4-R^a$ (SEQ ID NO: 15), $R-(FFR)_3-R^a$ (SEQ ID NO: 16), $-B-X-(RXR)_4-R^a$ (SEQ ID NO: 17), $-B-X-R-(FFR)_3-R^a$ (SEQ ID NO: 18), $-GLY-R-(FFR)_3-R^a$ (SEQ ID NO: 19), $-GLY-R_5-R^a$ (SEQ ID NO: 20), $-R_5-R^a$ (SEQ ID NO: 21), $-GLY-R_6-R^a$ (SEQ ID NO: 11) и $-R_6-R^a$ (SEQ ID NO: 10), где R^a выбран из H, ацила, бензоила и стеароила, и где R представляет собой аргинин, X представляет собой 6-аминогексановую кислоту, B представляет собой β -аланин, F представляет собой фенилаланин, и GLY (или G) представляет собой глицин.

6. Антисмысловой олигомер по любому из пп. 1-5, где нуклеиновые основания антисмыслового олигомера связаны с кольцевыми структурами на основе морфолиновой группы.

7. Антисмысловой олигомер в соответствии с формулой (I):

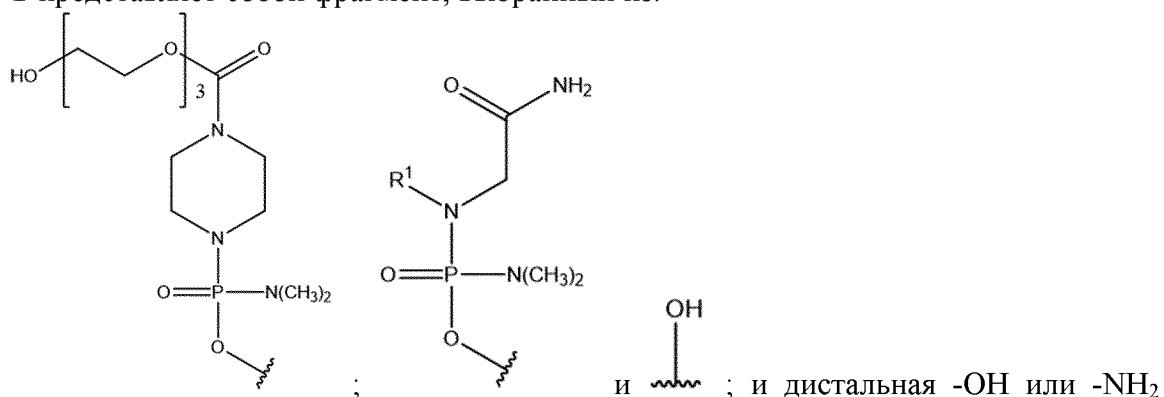


(I),

или его фармацевтически приемлемая соль, где:

каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, совместно с другими образующее нацеливающую последовательность;

T представляет собой фрагмент, выбранный из:

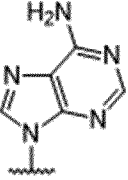
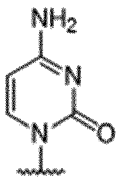


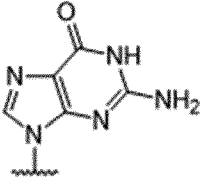
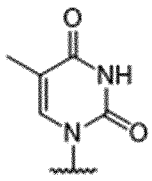
фрагмента Т необязательно связана с проникающим в клетку пептидом;

R^{100} представляет собой водород или проникающий в клетку пептид;

каждый Nu от 1 до n и от 5' до 3' соответствует нуклеиновым основаниям в одном из следующего:

Сайт отжига	Нацеливающаяся последовательность [от 5' до 3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

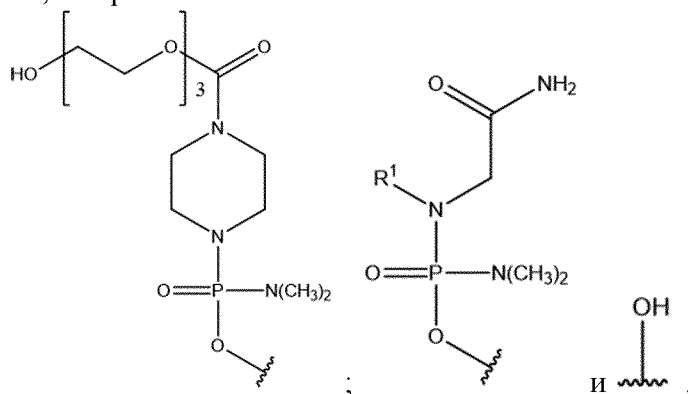
где А представляет собой , С представляет собой , G

представляет собой , и Т представляет собой .

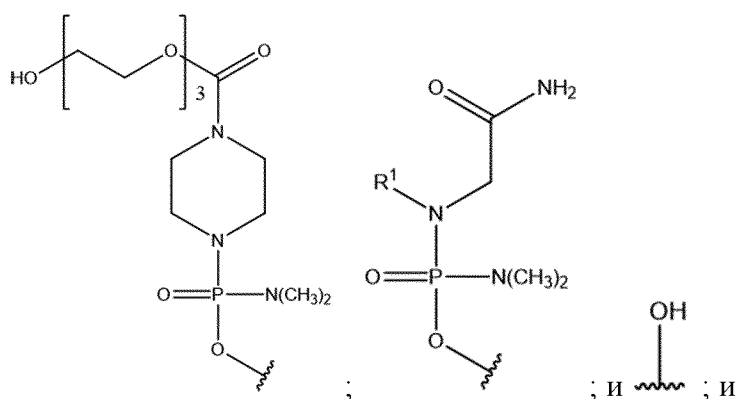
8. Антисмысловой олигомер по п. 7, где каждый Nu от 1 до n и от 5' до 3' соответствует SEQ ID NO: 3.

9. Антисмысловой олигомер по п. 7 или п. 8, где антисмысловой олигомер содержит один проникающий в клетку пептид.

10. Антисмысловой олигомер по любому из пп. 7-9, где Т представляет собой фрагмент, выбранный из:

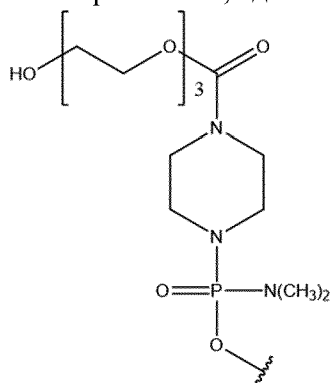


11. Антисмысловой олигомер по любому из пп. 7-10, где Т представляет собой фрагмент, выбранный из:



R^{100} представляет собой проникающий в клетку пептид.

12. Антисмысловой олигомер по п. 11, где:



T представляет собой

R^{100} представляет собой проникающий в клетку пептид.

13. Антисмысловой олигомер по любому из пп. 7-12, где проникающий в клетку пептид представляет собой пептид, богатый аргинином.

14. Антисмысловой олигомер по п. 13, где пептид, богатый аргинином, выбран из группы, состоящей из $-(RXR)_4-R^a$ (SEQ ID NO: 15), $R-(FFR)_3-R^a$ (SEQ ID NO: 16), $-B-X-(RXR)_4-R^a$ (SEQ ID NO: 17), $-B-X-R-(FFR)_3-R^a$ (SEQ ID NO: 18), $-GLY-R-(FFR)_3-R^a$ (SEQ ID NO: 19), $-GLY-R_5-R^a$ (SEQ ID NO: 20), $-R_5-R^a$ (SEQ ID NO: 21), $-GLY-R_6-R^a$ (SEQ ID NO: 11) и $-R_6-R^a$ (SEQ ID NO: 10), где R^a выбран из H, ацила, бензоила и стеароида, и где R представляет собой аргинин, X представляет собой 6-аминогексановую кислоту, B представляет собой β -аланин, F представляет собой фенилаланин, и GLY (или G) представляет собой глицин.

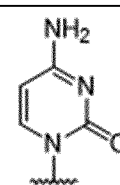
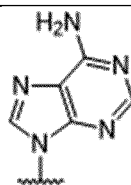
15. Антисмысловой олигомер по любому из пп. 7-14, где антисмысловой олигомер находится в форме свободного основания.

16. Антисмысловой олигомер по любому из пп. 7-14, где антисмысловой олигомер представляет собой его фармацевтически приемлемую соль.

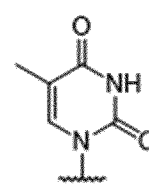
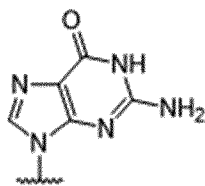
17. Антисмысловой олигомер в соответствии с формулой (III):



Сайт отжига	Нацеливающаяся последовательность [от 5' до 3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9



где A представляет собой , C представляет собой , G



представляет собой , и Т представляет собой , и дистальная -ОН в формуле (III) необязательно связана с проникающим в клетку пептидом.

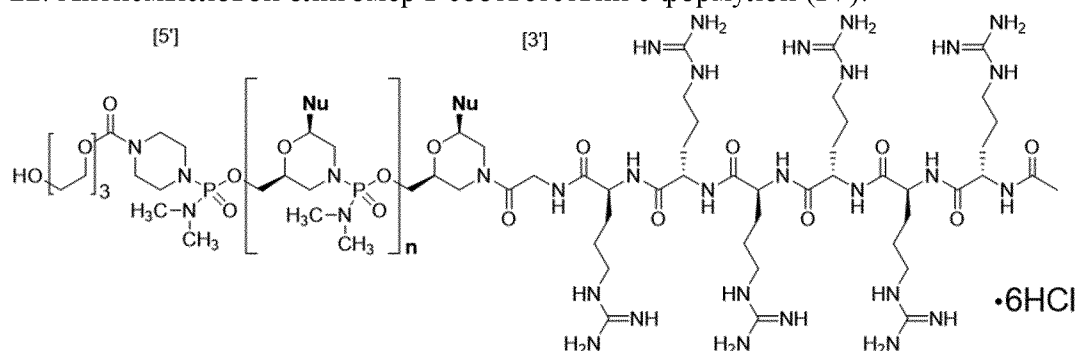
18. Антисмысловой олигомер по п. 17, где каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' в формуле (III) соответствует SEQ ID NO: 3.

19. Антисмысловой олигомер по любому из пп. 17-18, где антисмысловой олигомер находится в форме свободного основания.

20. Антисмысловой олигомер по любому из пп. 17-18, где антисмысловой олигомер представляет собой его фармацевтически приемлемую соль.

21. Антисмысловой олигомер по п. 20, где каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует SEQ ID NO: 3.

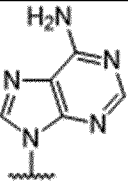
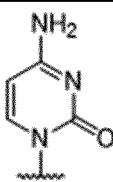
22. Антисмысловой олигомер в соответствии с формулой (IV):

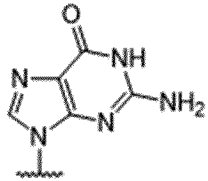
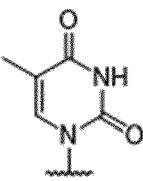


(IV),

где каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует нуклеиновым основаниям в одном из следующего:

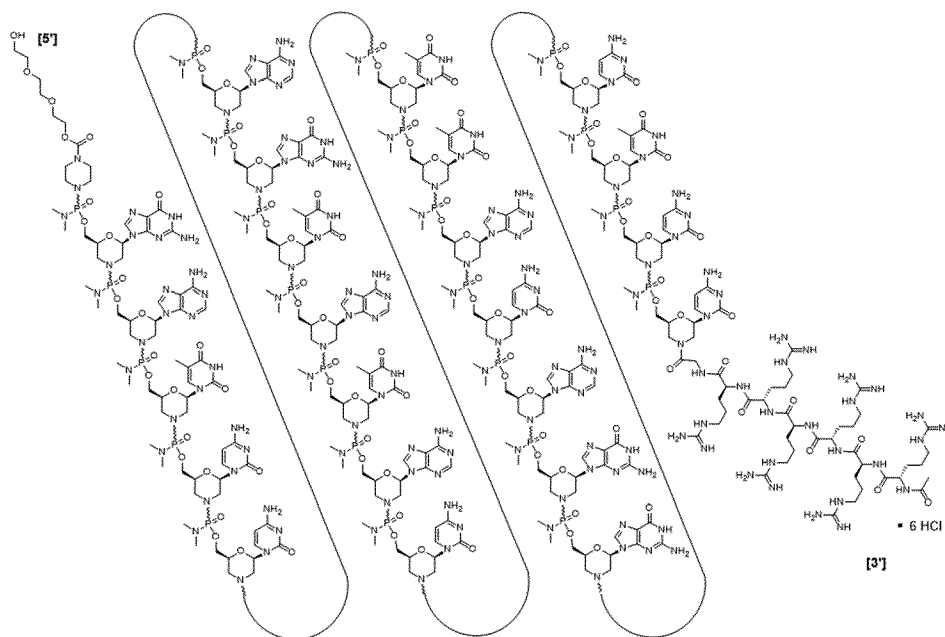
Сайт отжига	Нацеливающаяся последовательность [от 5' до 3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

где А представляет собой , С представляет собой , G

представляет собой , и Т представляет собой , и дистальная -ОН в формуле (IV) необязательно связана с проникающим в клетку пептидом.

23. Антисмысловой олигомер по п. 22, где каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' в формуле (IV) соответствует SEQ ID NO: 3.

24. Антисмысловой олигомер по п. 22, где антисмысловой олигомер соответствует структуре формулы (IVa):



(IVa).

25. Фармацевтическая композиция, содержащая антисмысловой олигомер по любому из пп. 1-24 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель.

26. Способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD) у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества антисмыслового олигомера по любому из пп. 1-24 или фармацевтической композиции по п. 25.

27. Способ по п. 26, где субъект характеризуется мутацией гена дистрофина, которая может быть скорректирована посредством пропуска экзона 50.

28. Способ восстановления рамки считывания mRNA для индукции образования дистрофина у субъекта, при этом способ предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества антисмыслового олигомера по любому из пп. 1-24 или фармацевтической композиции по п. 25.

29. Способ по п. 28, где субъект характеризуется мутацией гена дистрофина, которая может быть скорректирована посредством пропуска экзона 50.

По доверенности