

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202291835** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2022.10.20**

(22) Дата подачи заявки  
**2020.12.18**

(51) Int. Cl. *A61K 48/00* (2006.01)  
*A61P 21/00* (2006.01)  
*A61P 43/00* (2006.01)  
*C12N 15/113* (2010.01)  
*A61K 31/7088* (2006.01)  
*A61K 31/712* (2006.01)  
*A61K 31/7125* (2006.01)

---

**(54) АНТИСМЫСЛОВАЯ НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, ОБЕСПЕЧИВАЮЩАЯ ПРОПУСК ЭКЗОНОВ**

---

(31) **2019-229763**

(32) **2019.12.19**

(33) **JP**

(86) **PCT/JP2020/047340**

(87) **WO 2021/125311 2021.06.24**

(71) Заявитель:

**НИППОН СИНЯКУ КО.,  
ЛТД.; НЭШНЛ СЕНТЕР  
ОФ НЬЮРОЛОДЖИ ЭНД  
САЙКАЙЭТРИ (JP)**

(72) Изобретатель:

**Ватанабе Наоки, Тоне Юитиро,  
Такеда Син'ити, Аоки Йосицугу (JP)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к антисмысловому олигомеру, способному вызывать одновременный пропуск множества экзонов в представляющей интерес пре-мРНК, и к фармацевтической композиции, содержащей этот олигомер. Настоящее изобретение также относится к антисмысловому олигомеру или к его фармацевтически приемлемой соли или гидрату, которые вызывают одновременный пропуск двух или более следующих друг за другом экзонов из представляющей интерес пре-мРНК, где антисмысловый олигомер содержит последовательность оснований, комплементарную последовательности оснований области, включающей область, расположенную рядом с донором любого интрона в представляющей интерес пре-мРНК, или области, включающей область, расположенную рядом с акцептором любого интрона в представляющей интерес пре-мРНК, или ее неполной последовательности оснований.

**A1**

**202291835**

**202291835**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574378EA/032

### АНТИСМЫСЛОВАЯ НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, ОБЕСПЕЧИВАЮЩАЯ ПРОПУСК ЭКЗОНОВ

Область техники

[0001]

Настоящее изобретение относится к антисмысловому олигомеру, способному обеспечивать одновременный пропуск множества экзонов в гене-мишени, и к фармацевтической композиции, содержащей этот олигомер.

#### Предпосылки создания изобретения

[0002]

В последние годы особое внимание уделяется терапии с пропуском экзона, которая включает пропуск экзона гена, имеющего мутацию, вызывающую заболевание, в результате чего продуцируется белок, обладающий частичными функциями, что способствует излечиванию заболевания. Примерами заболеваний, которые можно лечить с помощью такой терапии с пропуском экзонов, является мышечная дистрофия Дюшенна (МДД).

[0003]

МДД является наиболее распространенной формой наследственного прогрессирующего мышечного заболевания, которым страдает приблизительно один из 3500 новорожденных мальчиков. Хотя у пациентов с МДД двигательные функции редко отличаются от таких функций у здоровых людей в младенчестве и в детстве, однако, мышечная слабость наблюдается у детей приблизительно в возрасте от 4 до 5 лет. Затем у пациентов с МДД мышечная слабость прогрессирует с возрастом до полной потери способности передвигаться приблизительно к 12 годам и приводит к летальному исходу из-за сердечной или дыхательной недостаточности в возрасте 20 лет. А поэтому, крайне необходимо разработать эффективное терапевтическое средство.

[0004]

Известно, что МДД вызывается мутацией в гене дистрофина. Ген дистрофина расположен на X-хромосоме и представляет собой крупный ген, состоящий из 2,2 миллиона пар оснований ДНК. ДНК транскрибируется в пре-мРНК, а интроны удаляются посредством сплайсинга с образованием мРНК из 13993 оснований, в которой 79 экзонов соединены вместе. Эта мРНК транслируется в 3685 аминокислот с образованием белка дистрофина. Белок дистрофин ассоциируется с поддержанием стабильности мембран в мышечных клетках и необходим для того, чтобы мышечные клетки были менее хрупкими. У пациентов с МДД имеется мутация в гене дистрофина, а поэтому функциональный белок дистрофин редко экспрессируется в мышечных клетках пациентов. Следовательно, структура мышечных клеток не может сохраняться во время мышечного сокращения в организме у пациентов с МДД, что приводит к большому притоку ионов кальция в мышечные клетки. А поэтому, некроз и фиброз мышечных клеток прогрессируют, в

результате чего мышечным клетки все труднее поддаются регенерации.

[0005]

Мышечная дистрофия Беккера (МДБ) также вызывается мутацией в гене дистрофина. Симптомы такого заболевания включают мышечную слабость, но обычно они слабо выражены и прогрессируют медленнее по сравнению с симптомами МДД. Во многих случаях, такое заболевание начинает развиваться во взрослом возрасте. Считается, что различия в клинических симптомах между МДД и МДБ зависят от того, происходит ли сдвиг рамки считывания аминокислот при трансляции мРНК дистрофина в белок дистрофина в результате мутации (Непатентный документ 1). Более конкретно, при МДД, присутствие мутации сдвигает рамку считывания аминокислот, в результате чего экспрессия функционального белка дистрофина прекращается, тогда как при МДБ, белок дистрофина, который способен функционировать, хотя и не в полной мере, но все же вырабатывается, потому что рамка считывания аминокислот сохраняется, а часть экзона удаляется в результате мутации.

[0006]

Предполагается, что пропуск экзона будет служить способом лечения МДД. Этот способ включает модификацию сплайсинга для восстановления аминокислотной рамки считывания мРНК дистрофина и индуцирования экспрессии белка дистрофина с частично восстановленной функцией (Непатентный документ 2). Часть аминокислотной последовательности, которая будет транслироваться из экзона, служащего мишенью для пропуска экзона, будет потеряна. По этой причине, белок дистрофина, экспрессируемый при таком лечении, становится короче, чем обычно, но поскольку рамка считывания аминокислот сохраняется, то функция стабилизации мышечных клеток частично сохраняется. Следовательно, предполагается, что пропуск экзона будет приводить к МДД с симптомами, сходными с симптомами МДБ, которая протекает мягче. Способ с пропуском экзона прошел испытания на животных, а именно, на мышах или собаках, и в настоящее время проходит клинические испытания с участием пациентов с МДД.

[0007]

Пропуск экзона может быть вызван связыванием антисмысловых нуклеиновых кислот, нацеленных на сайт(ы), окружающий(е) либо 5'-, либо 3'-сайт сплайсинга, либо на оба сайта, либо на сайты, находящиеся внутри экзона. Экзон будет включен в мРНК только в том случае, если оба ее сайта сплайсинга распознаются сплайсосомным комплексом. Таким образом, пропуск экзона может быть вызван нацеливанием антисмысловых нуклеиновых кислот на сайты, окружающие сайты сплайсинга. Кроме того, считается, что связывание белка SR, богатого серином и аргинином, с энхансером экзонного сплайсинга (ESE), необходимо для распознавания экзона по механизму сплайсинга. Соответственно, пропуск экзона также может быть вызван нацеливанием на ESE.

[0008]

Поскольку мутации гена дистрофина могут варьироваться у различных пациентов с МДД, однако, необходимо разработать антисмысловые нуклеиновые кислоты на основе

участка или типа соответствующей генетической мутации. Имеется множество сообщений об антисмысловой нуклеиновой кислоте, которая индуцирует пропуск экзона посредством нацеливания на одну последовательность оснований для одного экзона в гене дистрофина (Патентные документы 1-6 и Непатентные документы 1 и 2). Также сообщалось, что если антисмысловые нуклеиновые кислоты двух типов, которые нацелены на один и тот же экзон в гене дистрофина, смешиваются и позволяют функционировать соответствующим образом (двойное нацеливание), то активность пропуска может быть повышена по сравнению с использованием каждой антисмысловой нуклеиновой кислоты отдельно (Патентный документ 7).

[0009]

Особое внимание привлек способ, называемый пропуском нескольких экзонов, который включает пропуск множества экзонов (группы экзонов), а не одного экзона, как было описано выше. Этот способ позволяет вводить широкий спектр мутаций в ген дистрофина посредством пропуска экзонов. Так, например, экзоны с 45 по 55 в гене дистрофина известны как «горячие точки» генетической мутации, и сообщалось, что пропуск этих 11 экзонов позволяет вылечить приблизительно 60% пациентов с МДД, имеющих делеционную мутацию (Непатентный документ 3). Известно, что у большинства пациентов с врожденным отсутствием экзонов с 45 по 55 не наблюдается симптомов или эти симптомы проявляются слабо, хотя у них и развивается МДБ (Непатентный документ 4). Таким образом, предполагается, что препараты, способные индуцировать пропуск экзонов с 45 по 55, являются перспективными в качестве терапевтических средств для лечения МДД.

[0010]

Так, например, способ, проводимый с использованием антисмысловых нуклеиновых кислот, соответственно, нацеленных на все экзоны в области, которая является мишенью для пропуска экзонов (Непатентные документы 5, 7, 8 и 10), и способ, проводимый с использованием антисмысловых нуклеиновых кислот, соответственно, нацеленных на два разных экзона на 3'-стороне и 5'-стороне области, которая является мишенью для пропуска экзонов (Непатентные документы 6 и 9 и Патентный документ 8), описаны как способы индуцирования пропуска множества экзонов.

[0011]

Однако, до сих пор не появлялось каких-либо сообщений о том, что антисмысловая нуклеиновая кислота, нацеленная на область, включающую соседние области донора интрона или соседние области акцептора, будет индуцировать пропуск нескольких экзонов.

Список цитируемой литературы

Патентные документы

[0012]

Патентный документ 1: Международная публикация WO 2004/048570.

Патентный документ 2: Международная публикация WO2009/139630.

Патентный документ 3: Международная публикация WO 2010/048586.

Патентный документ 4: Публикации патента США № 2010/0168212.

Патентный документ 5: Международная публикация WO 2011/057350.

Патентный документ 6: Международная публикация WO2006/000057.

Патентный документ 7: Международная публикация WO 2007/135105.

Патентный документ 8: Международная публикация WO 2004/083446.

Непатентные документы

[0013]

Непатентный документ 1: Annemieke Aartsma-Rus et al., (2002) *Neuromuscular Disorders* 12: S71-S77

Непатентный документ 2: Wilton SD, et al., *Molecular Therapy* 2007: 15: p. 1288-96

Непатентный документ 3: Christophe Beroud et al., *Human Mutation*, 28(2), 2007, 196-202

Непатентный документ 4: Yusuke Echigoya et al., *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 4(2), 2015, e225.

Непатентный документ 5: Yoshitsugu Aoki et al., *PNAS*, 109(34), 2012, 13763-13768.

Непатентный документ 6: Laura van Vliet et al., *BMC Medical Genetics*, 9, 105, 2008

Непатентный документ 7: Joshua Lee et al., *PLoS ONE*, 13(5), e0197084, 2018

Непатентный документ 8: Joshua Lee et al., *Methods in Molecular Biology*, 1828, 141-150, 2018

Непатентный документ 9: Annemieke Aartsma-Rus et al., *Am. J. Hum. Genet.* 74(1), 83-92, 2004

Непатентный документ 10: Yusuke Echigoya et al., *Molecular Therapy*, 27(11), 1-13, 2019.

Описание сущности изобретения

Техническая проблема

[0014]

С учетом вышеизложенного было бы желательно разработать лекарственные средства для лечения пациентов с различными мутациями посредством одновременного пропуска множества экзонов (группы экзонов) в представляющей интерес пре-мРНК.

Решение проблемы

[0015]

В результате детальных исследований технических аспектов, представленных в вышеупомянутых документах, и структуры гена дистрофина, авторами настоящего изобретения было обнаружено, что антисмысловая нуклеиновая кислота, нацеленная на конкретную область в пре-мРНК дистрофина человека, способна вызывать одновременный пропуск множества экзонов в последовательности экзонов с 45 по 55. На основании этого, авторами настоящего изобретения было осуществлено настоящее изобретение.

[0016]

В частности, настоящее изобретение включает:

[1]

Антисмысловый олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат,

которые вызывают одновременный пропуск любых двух или более следующих друг за другом экзонов, выбранных из группы, состоящей из экзонов с 45-го по 55-й в пре-мРНК дистрофина человека;

антисмысловой олигомер, содержащий последовательность оснований, комплементарную последовательности оснований по меньшей мере одной области, выбранной из группы, состоящей из областей R1- R24, представленных

областью R<sub>n</sub> (где n означает нечетное число от 1 до 23), которая состоит из последовательности оснований NX в направлении выше от 3'-конца экзона NA<sub>n</sub> и последовательности оснований NY в направлении ниже от 5'-конца интрона NB<sub>n</sub> в пре-мРНК дистрофина человека, и

областью R<sub>n</sub> (где n означает четное число от 2 до 24), которая состоит из последовательности оснований NX в направлении выше от 3'-конца интрона NA<sub>n</sub> и последовательности оснований NY в направлении ниже от 5'-конца интрона NB<sub>n</sub> в пре-мРНК дистрофина человека,

или его неполную последовательность оснований, где  
 если n равно 1, то NA=44, NB=44, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 2, то NA=44, NB=45, NX=600 и NY=50,  
 если n равно 3, то NA=45, NB=45, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 4, то NA=45, NB=46, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 5, то NA=46, NB=46, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 6, то NA=46, NB=47, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 7, то NA=47, NB=47, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 8, то NA=47, NB=48, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 9, то NA=48, NB=48, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 10, то NA=48, NB=49, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 11, то NA=49, NB=49, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 12, то NA=49, NB=50, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 13, то NA=50, NB=50, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 14, то NA=50, NB=51, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 15, то NA=51, NB=51, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 16, то NA=51, NB=52, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 17, то NA=52, NB=52, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 18, то NA=52, NB=53, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 19, то NA=53, NB=53, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 20, то NA=53, NB=54, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 21, то NA=54, NB=54, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 22, то NA=54, NB=55, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 23, то NA=55, NB=55, NX=20 и NY=400, или  
 если n равно 24, то NA=55, NB=56, NX=400 и NY=50.

[2]





(a) любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389,

(b) последовательности оснований, которая гибридизуется в жестких условиях с последовательностью оснований, комплементарной любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389,

(c) последовательности оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований, или

(d) неполной последовательности оснований любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из последовательностей оснований (a), (b) и (c).

[4]

Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль, или его гидрат согласно любому из [1]-[3], где

антисмысловой олигомер представляет собой антисмысловой олигомер, содержащий два или более олигомерных звеньев, связанных друг с другом, где

каждый из олигомерных звеньев содержит последовательность оснований, комплементарную последовательности оснований любой области, выбранной из группы, состоящей из областей R1-R24, или ее частичной последовательности оснований, и соответствующие последовательности оснований олигомерных звеньев не являются последовательными и ни перекрываются друг с другом.

[5]

Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль, или его гидрат согласно любому из [1]-[3], где

антисмысловой олигомер представляет собой антисмысловой олигомер, содержащий два или более олигомерных звеньев, связанных друг с другом, где

каждый из олигомерных звеньев содержит последовательность оснований, комплементарную

(a) любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389,

(b) последовательности оснований, которая гибридизуется в жестких условиях с последовательностью оснований, комплементарной любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389,

(c) последовательности оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований, или

(d) неполной последовательности оснований любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из последовательностей оснований (a), (b) и (c),

и где соответствующие последовательности оснований олигомерных звеньев не являются последовательными и не перекрываются друг с другом.

[6]

Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или его гидрат согласно [4] или [5], где каждый из олигомерных звеньев содержит последовательность оснований, комплементарную последовательности оснований длиной от 5 до 20 оснований в этой области.

[7]

Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или его гидрат согласно любому из [1]-[3], где антисмысловой олигомер состоит из

(1) любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-111, 113-177, 179, 180, 182, 183, 185-193, 195-198, 200-223 и 225-232, или

(2) последовательности оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-111, 113-177, 179, 180, 182, 183, 185-193, 195-198, 200-223 и 225-232, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований.

[8]

Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль, или его гидрат согласно любому из [1]-[3] и [7], где антисмысловой олигомер состоит из любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 26, 27, 28, 29, 35, 38, 39, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 58, 59, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 80, 82, 86, 92, 97, 98, 100, 102, 113, 119, 121, 122, 124, 125, 126, 128, 130, 131, 132, 139, 142, 144, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 225, 228, 231 и 232.

[9]

Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или его гидрат согласно любому из [1]-[3], [7] и [8], где антисмысловой олигомер состоит из любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 11, 27, 28, 35, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 54, 55, 59, 63, 64, 65, 66, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 102, 113, 119, 128, 131, 132, 139, 142, 161, 162, 163, 225 и 228.

[10]

Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль, или его гидрат согласно любому из [1]-[9], где антисмысловой олигомер представляет собой олигонуклеотид.

[11]

Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль, или его гидрат согласно [10], где сахарная часть и/или часть фосфатной связи по меньшей мере одного нуклеотида, составляющего олигонуклеотид, являются модифицированными.

[12]

Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль, или его

гидрат согласно [10] или [11], где сахарная часть по меньшей мере одного нуклеотида, составляющего олигонуклеотид, представляет собой рибозу, в которой 2'-ОН-группа заменена любой одной группой, выбранной из группы, состоящей из -OR, -R, -R'OR, -SH, -SR, -NH<sub>2</sub>, -NHR, -NR<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br и I,

(где R представляет собой алкил или арил, а R' представляет собой алкилен).

[13]

Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль, или его гидрат согласно любому из [10]-[12], где фрагмент фосфатной связи по меньшей мере одного нуклеотида, составляющего олигонуклеотид, представляет собой любой фрагмент, выбранный из группы, состоящей из фосфортиоатной связи, фосфордитиоатной связи, алкилфосфонатной связи, фосфорамидатной связи и боранофосфатной связи.

[14]

Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль, или его гидрат согласно любому из [1]-[9], где антисмысловой олигомер представляет собой морфолино-олигомер.

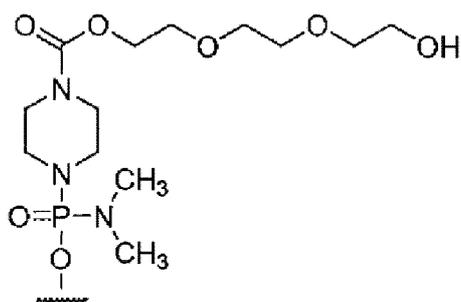
[15]

Антисмысловой олигомер, или его фармацевтически приемлемую соль, или его гидрат согласно [14], где антисмысловой олигомер представляет собой фосфордиамидатный морфолино-олигомер.

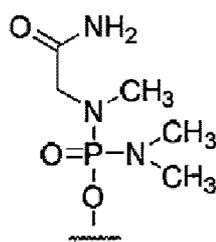
[16]

Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль, или его гидрат согласно [14] или [15], где 5'-конец представляет собой любую из химических формул (1)-(3), представленных ниже:

[Формула 1]



(1)



(2)



(3)

[17]

Антисмысловой олигомер-супрессор или его фармацевтически приемлемую соль или его гидрат, которые подавляют одиночный пропуск любого одного экзона, выбранного из группы, состоящей из экзона с 45-го по 55-й в пре-мРНК дистрофина человека, где антисмысловой олигомер-супрессор содержит последовательность оснований, комплементарную

(а) любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей

из SEQ ID NO: 370-384,

(b) последовательности оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 370-384, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований, или

(c) частичной последовательности оснований (a) или (b).

[18]

Антисмысловой олигомер-супрессор или его фармацевтически приемлемую соль или его гидрат согласно [17], где антисмысловой олигомер-супрессор состоит из

(1) любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 257-275, или (2) последовательности оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 257-275, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований.

[19]

Антисмысловой олигомер-супрессор, или его фармацевтически приемлемую соль или его гидрат согласно [17] или [18], где антисмысловой олигомер-супрессор состоит из любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 260, 261 и 263.

[20]

Антисмысловой олигомер-супрессор или его фармацевтически приемлемую соль, или его гидрат согласно любому из [17]-[19], где антисмысловой олигомер-супрессор представляет собой олигонуклеотид.

[21]

Антисмысловой олигомер-супрессор или его фармацевтически приемлемую соль, или его гидрат согласно [20], где сахарная часть и/или часть фосфатной связи по меньшей мере одного нуклеотида, составляющего олигонуклеотид, являются модифицированными.

[22]

Антисмысловой олигомер-супрессор или его фармацевтически приемлемую соль, или его гидрат согласно [20] или [21], где сахарная часть по меньшей мере одного нуклеотида, составляющего олигонуклеотид, представляет собой рибозу, в которой 2'-ОН-группа заменена любой одной группой, выбранной из группы, состоящей из -OR, -R, -R'OR, -SH, -SR, -NH<sub>2</sub>, -NHR, -NR<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>,

-CN, -F, -Cl, -Br и -I,

(где R представляет собой алкил или арил, а R' представляет собой алкилен).

[23]

Антисмысловой олигомер-супрессор или его фармацевтически приемлемую соль или его гидрат согласно любому из [20]-[22], где фрагмент фосфатной связи по меньшей мере одного нуклеотида, составляющего олигонуклеотид, представляет собой любой фрагмент, выбранный из группы, состоящей из фосфортиоатной связи, фосфордитиоатной

связи, алкилфосфонатной связи, фосфорамидатной связи и боранофосфатной связи.

[24]

Антисмысловой олигомер-супрессор или его фармацевтически приемлемую соль, или его гидрат согласно любому из [17]-[19], где антисмысловой олигомер-супрессор представляет собой морфолино-олигомер.

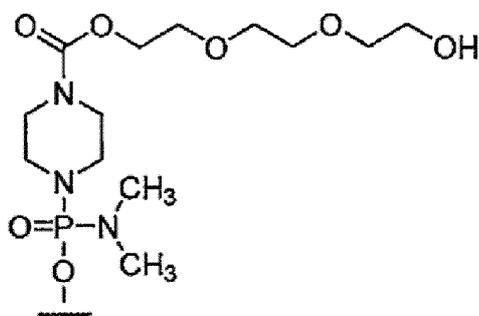
[25]

Антисмысловой олигомер-супрессор или его фармацевтически приемлемую соль, или его гидрат согласно [24], где антисмысловой олигомер-супрессор представляет собой фосфордиамидатный морфолино-олигомер.

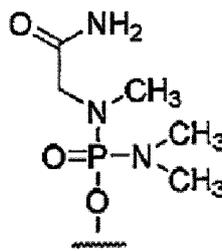
[26]

Антисмысловой олигомер-супрессор или его фармацевтически приемлемую соль, или его гидрат согласно [24] или [25], где 5'-конец представляет собой любую из химических формул (1)-(3), представленных ниже:

[Формула 2]



(1)



(2)



(3)

[27]

Фармацевтическую композицию, содержащую антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль, или его гидрат согласно любому из [1]-[16].

[28]

Фармацевтическую композицию согласно [27], дополнительно содержащую антисмысловой олигомер-супрессор или его фармацевтически приемлемую соль, или его гидрат согласно любому из [17]-[26].

[29]

Фармацевтическую композицию, содержащую антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль, или его гидрат согласно любому из [1]-[16], и антисмысловой олигомер-супрессор, или его фармацевтически приемлемую соль, или его гидрат согласно любому из [17] - [26].

[30]

Фармацевтическую композицию согласно [28] или [29], где:

(1) антисмысловой олигомер представляет собой олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 75, а антисмысловой олигомер-супрессор представляет собой олигомер, состоящий из

SEQ ID NO: 260,

(2) антисмысловой олигомер представляет собой олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 75, а антисмысловой олигомер-супрессор представляет собой олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 261, или

(3) антисмысловой олигомер представляет собой олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 75, а антисмысловой олигомер-супрессор представляет собой олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 263.

[31]

Фармацевтическую композицию согласно любому из [27]-[30], дополнительно содержащую фармацевтически приемлемый носитель.

[32]

Фармацевтическую композицию согласно любому из [27]-[31] для лечения мышечной дистрофии.

[33]

Фармацевтическую композицию согласно любому из [27]-[32] для введения пациенту-человеку.

[34]

Способ лечения мышечной дистрофии, включающий введение пациенту, страдающему мышечной дистрофией, антисмыслового олигомера или его фармацевтически приемлемой соли, или его гидрата согласно любому из [1]-[16], или фармацевтической композиции согласно любому из [27]-[33].

[35]

Способ лечения согласно [34], где пациентом с мышечной дистрофией является пациент с мутацией, поддающейся пропуску экзонов с 45 по 55 в гене дистрофина.

[36]

Способ лечения согласно [34] или [35], где пациентом является человек.

[37]

Применение антисмыслового олигомера или его фармацевтически приемлемой соли, или его гидрата согласно любому из [1]-[16], или фармацевтической композиции согласно любому из [27]-[33] в целях приготовления лекарственного средства для лечения мышечной дистрофии.

[38]

Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль, или его гидрат согласно любому из [1]-[16], или фармацевтическую композицию согласно любому из [27]-[33] для применения в целях лечения мышечной дистрофии.

[39]

Антисмысловой олигомер, или его фармацевтически приемлемую соль, или его гидрат, или фармацевтическую композицию согласно [38], где лечение включает пропуск любых двух или более следующих друг за другом экзонов, выбранных из группы, состоящей из экзонов с 45-го по 55-й в пре-мРНК дистрофина человека.

[40]

Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль, или его гидрат, или фармацевтическую композицию согласно [38] или [39], где пациентом, проходящим лечение мышечной дистрофии, является человек.

[41]

Способ повышения эффективности пропуска двух или более следующих друг за другом экзонов, где указанный способ включает:

ингибирование последовательности-сайленсера сплайсинга, последовательности сайта сплайсинга или последовательности сайта ветвления представляющей интерес пре-мРНК, если два или более следующих друг за другом экзона пропущены и з представляющей интерес пре-мРНК.

[42]

Способ согласно [41], где последовательность-сайленсер сплайсинга представляет собой последовательность распознавания гетерогенного ядерного рибонуклеопротеина A1 (hnRNPA1).

[43]

Способ согласно [41] или [42], где представляющей интерес пре-мРНК является пре-мРНК дистрофина человека.

[44]

Способ согласно любому из [41]-[43], где два или более следующих друг за другом экзона выбраны из группы, состоящей из экзонов с 45-го экзона по 55-й в пре-мРНК дистрофина человека.

[45]

Способ согласно [44], где пропуск двух или более следующих друг за другом экзонов представляющей интерес пре-мРНК осуществляют с использованием антисмыслового олигомера, или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата согласно любому из [1] - [16].

[46]

Способ согласно [44] или [45], где специфическое ингибирование последовательности-сайленсера сплайсинга, последовательности сайта сплайсинга или последовательности сайта ветвления осуществляют с использованием антисмыслового олигомера-супрессора или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата согласно любому из [17]-[26].

[0017]

Настоящее изобретение может также включать следующие варианты:

[47]

антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат, которые обеспечивают одновременный пропуск двух или более следующих друг за другом экзонов из представляющей интерес пре-мРНК,

антисмысловой олигомер, содержащий последовательность оснований,

комплементарную последовательности оснований любой области, выбранной из группы, состоящей из:

(1) области, состоящей из последовательности из 20 оснований в направлении выше от 3'-конца любого экзона и последовательности из 400 оснований в направлении ниже от 5'-конца интрона, который примыкает к 3'-концу экзона в представляющей интерес пре-мРНК, или

(2) области, состоящей из последовательности из 400 оснований или 600 оснований в направлении выше от 3'-конца любого интрона и последовательности из 50 оснований в направлении ниже от 5'-конца экзона, который примыкает к 3'-концу интрона в представляющей интерес пре-мРНК,

или его неполную последовательность оснований.

[48]

Антисмысловый олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или его гидрат согласно [47], где представляющей интерес пре-мРНК является пре-мРНК дистрофина человека.

Предпочтительные эффекты изобретения

[0018]

Настоящее изобретение относится к антисмысловому олигомеру, который обеспечивает одновременный пропуск множества экзонов в мишени. В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения пациентов, имеющих различные мутации, посредством одновременного пропуска множества экзонов в представляющей интерес пре-мРНК. В своем альтернативном варианте, настоящее изобретение относится к антисмысловому олигомеру-супрессору, который подавляет одиночный пропуск экзона в представляющей интерес пре-мРНК, или к фармацевтической композиции, содержащей этот олигомер. Этот альтернативный вариант обеспечивает высокоэффективное одновременное пропуск экзонов с 45 по 55 в пре-мРНК дистрофина человека.

Краткое описание чертежей

[0019]

[Фигура 1] Фигура 1 представляет собой диаграмму, где показаны результаты исследования пропуска экзонов с 45 по 55 в пре-мРНК дистрофина человека в клетках RD (в клетках рабдомиосаркомы человека) с помощью ОТ-ПЦР.

[Фигура 2] Фигура 2 представляет собой диаграмму, где показаны результаты исследования пропуска экзонов с 45 по 55 в пре-мРНК дистрофина человека в клетках RD с помощью ОТ-ПЦР.

[Фигура 3] Фигура 3 представляет собой диаграмму, где показаны результаты исследования пропуска экзонов с 45 по 55 в пре-мРНК дистрофина человека в клетках RD с помощью ОТ-ПЦР.

[Фигура 4] Фигура 4 представляет собой диаграмму, где показаны результаты исследования пропуска экзонов с 45 по 55 в пре-мРНК дистрофина человека в клетках RD



[Фигура 18] Фигура 18 представляет собой диаграмму, где показаны результаты исследования пропуска множества экзонов с 45 по 55 и пропуска одного экзона 45 в пре-мРНК дистрофина человека в клетках RD с помощью ОТ-ПЦР.

[Фигура 19] Фигура 19 представляет собой диаграмму, где показаны результаты исследования пропуска множества экзонов, выбранных из экзонов с 45 по 49 и пропуска одного экзона 45 в пре-мРНК дистрофина человека в клетках RD с помощью ОТ-ПЦР.

[Фигура 20] Фигура 20 представляет собой диаграмму, где показаны результаты исследования пропуска множества экзонов, выбранных из экзонов с 45 по 49 в пре-мРНК дистрофина человека в клетках RD с помощью ОТ-ПЦР, и вычисления общего количества соответствующих пропущенных экзонов 45 и 46, экзонов с 45 по 47, экзонов с 45 по 48 и экзонов с 45 по 49 (общие продукты с пропуском множества экзонов). Считается, что каждое такой пропуск дает терапевтический эффект.

[Фигура 21] Фигура 21 представляет собой диаграмму, где показаны результаты исследования пропуска множества экзонов, выбранных из экзонов с 45 по 52 и пропуска одного экзона 45 в пре-мРНК дистрофина человека в клетках RD с помощью ОТ-ПЦР.

[Фигура 22] Фигура 22 представляет собой диаграмму, где показаны результаты исследования пропуска множества экзонов, выбранных из экзонов с 45 по 52 в пре-мРНК дистрофина человека в клетках RD с помощью ОТ-ПЦР, и вычисления общего количества соответствующих пропущенных экзонов с 45 по 47, экзонов с 45 по 48, экзонов с 45 по 49, экзонов с 45 по 50, экзонов с 45 по 51 и экзонов с 45 по 52 (слева) или общего количества соответствующих пропущенных экзонов с 45 по 47, экзонов с 45 по 48, экзонов с 45 по 49 и экзонов с 45 по 51 (справа). Каждый из таких пропущенных экзонов с 45 по 47, экзонов с 45 по 48, экзонов с 45 по 49 и экзонов с 45 по 51 дает терапевтический эффект.

Описание вариантов осуществления изобретения

[0020]

Далее приводится подробное описание настоящего изобретения. Варианты осуществления изобретения, описанные ниже, приводятся лишь в иллюстративных целях и не должны рассматриваться как ограничение объема нижеследующих вариантов осуществления изобретения. Настоящее изобретение может быть также осуществлено различными способами, не выходящими за рамки сущности изобретения.

[0021]

### 1. Антисмысловой олигомер

Настоящее изобретение относится к антисмысловому олигомеру, или его фармацевтически приемлемой соли, или его гидрату, которые обеспечивают одновременный пропуск двух или более следующих друг за другом экзонов из представляющей интерес пре-мРНК, где

антисмысловой олигомер содержит последовательность оснований, комплементарную последовательности оснований любой области, выбранной из группы, состоящей из

(1) области, состоящей из последовательности из 20 оснований в направлении выше

от 3'-конца любого экзона и последовательности из 400 оснований в направлении ниже от 5'-конца интрона, который примыкает к 3'-концу экзона в представляющей интерес пре-мРНК, или

(2) области, состоящей из последовательности из 400 оснований или 600 оснований в направлении выше от 3'-конца любого интрона и последовательности из 50 оснований в направлении ниже от 5'-конца экзона, который находится рядом с 3'-концом интрона в представляющей интерес пре-мРНК,

или к его неполной последовательности оснований.

[0022]

Используемый здесь термин «обеспечивает одновременный пропуск» двух или более последовательно расположенных экзонов включает не только одновременное удаление соответствующих экзонов из пре-мРНК, но также и последовательное удаление соответствующих экзонов в течение периода времени превращения пре-мРНК в зрелую мРНК. В частности, термин «обеспечивает одновременный пропуск» двух или более последовательно расположенных экзонов означает удаление множества (двух или более) следующих друг за другом экзонов из пре-мРНК.

[0023]

Используемый здесь термин «два или более следующих друг за другом экзонов» означает множество экзонов, число которых увеличивается один за другим (общее число экзонов упоминается здесь как Тэкзон), и которые включены в представляющую интерес пре-мРНК. Номер экзона означает номер, присвоенный экзонам в порядке от 5'-конца к 3'-концу, причем, экзон, находящийся в самом верхнем положении пре-мРНК, определяется как первый экзон, за которым следуют второй, третий и т.п. В случае пропуска двух и более следующих друг за другом экзонов в определенном гене, его экзон имеет номера  $a_1, \dots$ , где  $a_j$  может быть представлен последовательностью  $\{a_j\}$ . Общий термин  $a_j$  в последовательности  $\{a_j\}$  представлен нижеследующей формулой:

[Формула 1]

$$a_j = m + (j - 1)$$

где  $m$  означает заданное натуральное число, которое удовлетворяет уравнению  $1 \leq m \leq (\text{Тэкзон} - 1)$ , а  $j$  - означает натуральное число, которое удовлетворяет уравнению  $2 \leq (m+j) \leq \text{Тэкзон} + 1$ .

Если представляющей интерес пре-мРНК является, например, пре-мРНК дистрофина человека, то Тэкзон равен 79.

В одном варианте осуществления изобретения,  $j$  означает заданное натуральное число, выбранное из чисел от 1 до 11. В другом варианте осуществления изобретения,  $j$  равно 11,  $j$  равно 10,  $j$  равно 9,  $j$  равно 8,  $j$  равно 7,  $j$  равно 6,  $j$  равно 5,  $j$  равно 4,  $j$  равно 3,  $j$  равно 2 или  $j$  равно 1.

[0024]

Используемый здесь термин «ген» означает ген генома, а также включает кДНК, пре-мРНК и мРНК. Предпочтительно, ген представляет собой пре-мРНК. Используемый

здесь термин «пре-мРНК» означает молекулу РНК, которая содержит экзон и интрон, транскрибированные из гена-мишени в геноме, и является предшественником мРНК.

[0025]

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к антисмысловому олигомеру или его фармацевтически приемлемой соли или гидрату, которые обеспечивают одновременный пропуск любых двух или более следующих друг за другом экзонов, выбранных из группы, состоящей из экзонов с 45-го по 55-й в пре-мРНК дистрофина чело века (далее в тексте, антисмысловый олигомер, его фармацевтически приемлемая соль и гидрат также имеют общее название «антисмысловый олигомер согласно изобретению»); и такой антисмысловый олигомер согласно изобретению может означать любой антисмысловый олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или его гидрат).

[0026]

Пре-мРНК дистрофина человека представляет собой молекулу РНК, содержащую экзон и интрон, транскрибированные с гена дистрофина в геноме человека, и является предшественником мРНК. Специалисты в данной области могут получить информацию о последовательности оснований пре-мРНК дистрофина человека по аналогии с геномной последовательностью гена дистрофина человека (номер доступа GenBank NG\_012232.1).

[0027]

В геноме человека, ген дистрофина человека находится в локусе Xp21.2. Ген дистрофина человека имеет размер приблизительно 3,0 м.п.о. и является самым большим геном из известных генов человека. Однако, кодирующие области гена дистрофина человека имеют размер всего лишь приблизительно 14 т.п.о., распределенных в виде 79 экзонов по всему гену дистрофина человека (Roberts, RG, et al., Genomics, 16: 536-538 (1993)). Пре-мРНК, которая является транскриптом гена дистрофина человека, подвергается сплайсингу с образованием зрелой мРНК размером приблизительно 14 т.п.о. Последовательность оснований зрелой мРНК человеческого гена дистрофина дикого типа является известной (№ доступа в GenBank NM\_004006).

[0028]

Антисмысловый олигомер согласно вышеизложенному варианту осуществления изобретения нацелен по меньшей мере на любую одну область, выбранную из группы, состоящей из областей с R1 по R24, представленных:

областью R<sub>n</sub> (где n представляет собой нечетное число от 1 до 23), которая состоит из последовательности оснований NX в направлении выше от 3'-конца экзона NA и последовательности оснований NY в направлении ниже от 5'-конца интрона NB в пре-мРНК дистрофина человека, и

областью R<sub>n</sub> (где n представляет собой четное число от 2 до 24), которая состоит из последовательности оснований NX в направлении выше от 3'-конца интрона NA и последовательности оснований NY в направлении ниже от 5'-конца экзона NB в пре-мРНК дистрофина человека.

Далее, каждая из областей с R1 по R24 или все эти области называются «областью-

мишенью антисмыслового олигомера согласно изобретению» или, в качестве синонима, «областью-мишенью согласно изобретению».

Используемый здесь термин «нацеливание» означает, что предполагаемая последовательность оснований представляет собой последовательность оснований, комплементарную последовательности оснований области-мишени или неполной последовательности оснований последовательности-мишени.

[0029]

Антисмысловый олигомер согласно изобретению в соответствии с предшествующим вариантом осуществления изобретения содержит последовательность оснований, комплементарную последовательности оснований по меньшей мере одной области, выбранной из группы, состоящей из областей-мишеней R1-R24 согласно изобретению, или неполной последовательности оснований.

[0030]

Примеры области-мишени R<sub>n</sub> согласно изобретению в соответствии с предшествующим вариантом осуществления изобретения включают области, в которых:

если n равно 1, то NA=44, NB=44, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 2, то NA=44, NB=45, NX=600 и NY=50,  
 если n равно 3, то NA=45, NB=45, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 4, то NA=45, NB=46, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 5, то NA=46, NB=46, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 6, то NA=46, NB=47, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 7, то NA=47, NB=47, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 8, то NA=47, NB=48, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 9, то NA=48, NB=48, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 10, то NA=48, NB=49, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 11, то NA=49, NB=49, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 12, то NA=49, NB=50, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 13, то NA=50, NB=50, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 14, то NA=50, NB=51, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 15, то NA=51, NB=51, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 16, то NA=51, NB=52, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 17, то NA=52, NB=52, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 18, то NA=52, NB=53, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 19, то NA=53, NB=53, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 20, то NA=53, NB=54, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 21, то NA=54, NB=54, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 22, то NA=54, NB=55, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 23, то NA=55, NB=55, NX=20 и NY=400, или  
 если n равно 24, то NA=55, NB=56, NX=400 и NY=50.

[0031]

В другом варианте осуществления изобретения, примеры области-мишени R<sub>n</sub> согласно изобретению включают, но не ограничиваются ими, области, в которых:

если n равно 1, то NA=44, NB=44, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 2, то NA=44, NB=45, NX=600 и NY=19,  
 если n равно 3, то NA=45, NB=45, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 4, то NA=45, NB=46, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 5, то NA=46, NB=46, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 6, то NA=46, NB=47, NX=400 и NY=37,  
 если n равно 7, то NA=47, NB=47, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 8, то NA=47, NB=48, NX=400 и NY=19,  
 если n равно 9, то NA=48, NB=48, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 10, то NA=48, NB=49, NX=400 и NY=42,  
 если n равно 11, то NA=49, NB=49, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 12, то NA=49, NB=50, NX=400 и NY=44,  
 если n равно 13, то NA=50, NB=50, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 14, то NA=50, NB=51, NX=400 и NY=25,  
 если n равно 15, то NA=51, NB=51, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 16, то NA=51, NB=52, NX=400 и NY=24,  
 если n равно 17, то NA=52, NB=52, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 18, то NA=52, NB=53, NX=400 и NY=34,  
 если n равно 19, то NA=53, NB=53, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 20, то NA=53, NB=54, NX=400 и NY=43,  
 если n равно 21, то NA=54, NB=54, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 22, то NA=54, NB=55, NX=400 и NY=25,  
 если n равно 23, то NA=55, NB=55, NX=20 и NY=400, или  
 если n равно 24, то NA=55, NB=56, NX=400 и NY=50.

[0032]

В другом варианте осуществления изобретения, R1-R24, которые являются примерами области-мишени R<sub>n</sub> согласно изобретению, представляют собой, но не ограничиваются ими, следующие области.

Так, например, в определенном варианте осуществления изобретения:

область R1 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 20 оснований в направлении выше от 3'-конца 44-го экзона и последовательности из 400 оснований в направлении ниже от 5'-конца 44-го интрона в пре-мРНК дистрофина человека,

область R2 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 600 оснований в направлении выше от 3'-конца 44-го интрона и последовательности из 50 оснований в направлении ниже от 5'-конца 45-го экзона в пре-мРНК дистрофина человека,

область R3 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 20 оснований в направлении выше от 3'-конца 45-го экзона и последовательности из 400 оснований в направлении ниже от 5'-конца 45-го интрона в пре-мРНК дистрофина человека,



20 оснований в направлении выше от 3'-конца 52-го экзона и последовательности из 400 оснований в направлении ниже от 5'-конца 52-го интрона в пре-мРНК дистрофина человека,

область R18 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 400 оснований в направлении выше от 3'-конца 52-го интрона и последовательности из 50 оснований в направлении ниже от 5'-конца 53-го экзона в пре-мРНК дистрофина человека,

область R19 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 20 оснований в направлении выше от 3'-конца 53-го экзона и последовательности из 400 оснований в направлении ниже от 5'-конца 53-го интрона в пре-мРНК дистрофина человека,

область R20 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 400 оснований в направлении выше от 3'-конца 53-го интрона и последовательности из 50 оснований в направлении ниже от 5'-конца 54-го экзона в пре-мРНК дистрофина человека,

область R21 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 20 оснований в направлении выше от 3'-конца 54-го экзона и последовательности из 400 оснований в направлении ниже от 5'-конца 54-го интрона в пре-мРНК дистрофина человека,

область R22 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 400 оснований в направлении выше от 3'-конца 54-го интрона и последовательности из 50 оснований в направлении ниже от 5'-конца 55-го экзона в пре-мРНК дистрофина человека,

область R23 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 20 оснований в направлении выше от 3'-конца 55-го экзона и последовательности из 400 оснований в направлении ниже от 5'-конца 55-го интрона в пре-мРНК дистрофина человека, или

область R24 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 400 оснований в направлении выше от 3'-конца 55-го интрона и последовательности из 50 оснований в направлении ниже от 5'-конца 56-го экзона в пре-мРНК дистрофина человека.

[0033]

В альтернативном варианте осуществления изобретения, R1-R24, которые являются примерами области-мишени R<sub>n</sub> согласно изобретению, представляют собой, но не ограничиваются ими, следующие области.

Так, например, в определенном варианте осуществления изобретения:

область R1 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 20 оснований в направлении выше от 3'-конца 44-го экзона и последовательности из 400 оснований в направлении ниже от 5'-конца 44-го интрона в пре-мРНК дистрофина человека,

область R2 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 600 оснований в направлении выше от 3'-конца 44-го интрона и последовательности из 19 оснований в направлении ниже от 5'-конца 45-го экзона в пре-мРНК дистрофина человека,

область R3 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 20 оснований в направлении выше от 3'-конца 45-го экзона и последовательности из 400 оснований в направлении ниже от 5'-конца 45-го интрона в пре-мРНК дистрофина человека,

область R4 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 400 оснований в направлении выше от 3'-конца 45-го интрона и последовательности из 50



область R18 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 400 оснований в направлении выше от 3'-конца 52-го интрона и последовательности из 34 оснований в направлении ниже от 5'-конца 53-го экзона в пре-мРНК дистрофина человека,

область R19 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 20 оснований в направлении выше от 3'-конца 53-го экзона и последовательности из 400 оснований в направлении ниже от 5'-конца 53-го интрона в пре-мРНК дистрофина человека,

область R20 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 400 оснований в направлении выше от 3'-конца 53-го интрона и последовательности из 43 оснований в направлении ниже от 5'-конца 54-го экзона в пре-мРНК дистрофина человека,

область R21 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 20 оснований в направлении выше от 3'-конца 54-го экзона и последовательности из 400 оснований в направлении ниже от 5'-конца 54-го интрона в пре-мРНК дистрофина человека,

область R22 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 400 оснований в направлении выше от 3'-конца 54-го интрона и последовательности из 25 оснований в направлении ниже от 5'-конца 55-го экзона в пре-мРНК дистрофина человека,

область R23 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 20 оснований в направлении выше от 3'-конца 55-го экзона и последовательности из 400 оснований в направлении ниже от 5'-конца 55-го интрона в пре-мРНК дистрофина человека, или

область R24 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 400 оснований в направлении выше от 3'-конца 55-го интрона и последовательности из 50 оснований в направлении ниже от 5'-конца 56-го экзона в пре-мРНК дистрофина человека.

[0034]

В альтернативном варианте осуществления изобретения, R1-R24, которые являются примерами области-мишени R<sub>n</sub> согласно изобретению, представляют собой, но не ограничиваются ими, следующие области:

(A1) Область R1

Область R1 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -20 оснований до +400 оснований, если граница между 3'-концом экзона 44 и 5'-концом интрона 44 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «+», а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «-» (минус). В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -20 оснований до -1 основания, принадлежит экзону 44, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +400 оснований, принадлежит интрону 44.

(A2) Область R2

Область R2 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -600 оснований до +50 оснований, если граница между 3'-концом интрона 44 и 5'-концом экзона 45 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область

последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -600 оснований до -1 основания, принадлежит интрону 44, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +50 оснований, принадлежит экзону 45.

(A3) Область R3

Область R3 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -20 оснований до +400 оснований, если граница между 3'-концом экзона 45 и 5'-концом интрона 45 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -20 оснований до -1 основания, принадлежит экзону 45, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +400 оснований, принадлежит интрону 45.

(A4) Область R4

Область R4 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до +50 оснований, если граница между 3'-концом интрона 45 и 5'-концом экзона 46 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрону 45, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +50 оснований, принадлежит экзону 46.

(A5) Область R5

Область R5 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -20 оснований до +400 оснований, если граница между 3'-концом экзона 46 и 5'-концом интрона 46 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -20 оснований до -1 основания, принадлежит экзону 46, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +400 оснований, принадлежит интрону 46.

(A6) Область R6

Область R6 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до +50 оснований, если граница между 3'-концом интрона 46 и 5'-концом экзона 47 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрону 46, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +50 оснований, принадлежит экзону 47.

**(A7) Область R7**

Область R7 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -20 оснований до +400 оснований, если граница между 3'-концом экзона 47 и 5'-концом интрона 47 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -20 оснований до -1 основания, принадлежит экзону 47, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +400 оснований, принадлежит интрону 47.

**(A8) Область R8**

Область R8 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до +50 оснований, если граница между 3'-концом интрона 47 и 5'-концом экзона 48 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрону 47, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +50 оснований, принадлежит экзону 48.

**(A9) Область R9**

Область R9 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -20 оснований до +400 оснований, если граница между 3'-концом экзона 48 и 5'-концом интрона 48 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -20 оснований до -1 основания, принадлежит экзону 48, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +400 оснований, принадлежит интрону 48.

**(A10) Область R10**

Область R10 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до +50 оснований, если граница между 3'-концом интрона 48 и 5'-концом экзона 49 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрону 48, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +50 оснований, принадлежит экзону 49.

**(A11) Область R11**

Область R11 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -20 оснований до +400 оснований, если граница между 3'-концом экзона 49 и 5'-концом интрона 49 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-

стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -20 оснований до -1 основания, принадлежит экзону 49, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +400 оснований, принадлежит интрону 49.

(A12) Область R12

Область R12 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до +50 оснований, если граница между 3'-концом интрона 49 и 5'-концом экзона 50 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрону 49, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +50 оснований, принадлежит экзону 50.

(A13) Область R13

Область R13 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -20 оснований до +400 оснований, если граница между 3'-концом экзона 50 и 5'-концом интрона 50 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -20 оснований до -1 основания, принадлежит экзону 50, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +400 оснований, принадлежит интрону 50.

(A14) Область R14

Область R14 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до +50 оснований, если граница между 3'-концом интрона 50 и 5'-концом экзона 51 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрону 50, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +50 оснований, принадлежит экзону 51.

(A15) Область R15

Область R15 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -20 оснований до +400 оснований, если граница между 3'-концом экзона 51 и 5'-концом интрона 51 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -20 оснований до -1 основания, принадлежит экзону 51, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +400 оснований, принадлежит

интрон 51.

(A16) Область R16

Область R16 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до +50 оснований, если граница между 3'-концом интрона 51 и 5'-концом экзона 52 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрон 51, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +50 оснований, принадлежит экзону 52.

(A17) Область R17

Область R17 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -20 оснований до +400 оснований, если граница между 3'-концом экзона 52 и 5'-концом интрона 52 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -20 оснований до -1 основания, принадлежит экзону 52, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +400 оснований, принадлежит интрон 52.

(A18) Область R18

Область R18 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до +50 оснований, если граница между 3'-концом интрона 52 и 5'-концом экзона 53 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрон 52, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +50 оснований, принадлежит экзону 53.

(A19) Область R19

Область R19 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -20 оснований до +400 оснований, если граница между 3'-концом экзона 53 и 5'-концом интрона 53 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -20 оснований до -1 основания, принадлежит экзону 53, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +400 оснований, принадлежит интрон 53.

(A20) Область R20

Область R20 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до +50 оснований, если граница между 3'-концом интрона 53 и 5'-концом экзона

54 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрону 53, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +50 оснований, принадлежит экзону 54.

(A21) Область R21

Область R21 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -20 оснований до +400 оснований, если граница между 3'-концом экзона 54 и 5'-концом интрона 54 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -20 оснований до -1 основания, принадлежит экзону 54, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +400 оснований, принадлежит интрону 54.

(A22) Область R22

Область R22 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до +50 оснований, если граница между 3'-концом интрона 54 и 5'-концом экзона 55 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрону 54, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +50 оснований, принадлежит экзону 55.

(A23) Область R23

Область R23 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -20 оснований до +400 оснований, если граница между 3'-концом экзона 55 и 5'-концом интрона 55 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -20 оснований до -1 основания, принадлежит экзону 55, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +400 оснований, принадлежит интрону 55.

(A24) Область R24

Область R24 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до +50 оснований, если граница между 3'-концом интрона 55 и 5'-концом экзона 56 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит

интрону 55, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +50 оснований, принадлежит экзону 56.

[0035]

В альтернативном аспекте изобретения, R2, R6, R8, R10, R12, R14, R16, R18, R20 и R22, которые являются примерами области-мишени R<sub>n</sub> согласно изобретению, представляют собой, но не ограничиваются ими, следующие области:

(A2) Область R2

Область R2 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -600 оснований до +19 оснований, если граница между 3'-концом интрона 44 и 5'-концом экзона 45 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -600 оснований до -1 основания, принадлежит интрону 44, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +19 оснований, принадлежит экзону 45.

(A6) Область R6

Область R6 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до +37 оснований, если граница между 3'-концом интрона 46 и 5'-концом экзона 47 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрону 46, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +19 оснований, принадлежит экзону 47.

(A8) Область R8

Область R8 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до +19 оснований, если граница между 3'-концом интрона 47 и 5'-концом экзона 48 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрону 47, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +19 оснований, принадлежит экзону 48.

(A10) Область R10

Область R10 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до +42 оснований, если граница между 3'-концом интрона 48 и 5'-концом экзона 49 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит

интрон 48, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +42 оснований, принадлежит экзону 49.

(A12) Область R12

Область R12 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до +44 оснований, если граница между 3'-концом интрона 49 и 5'-концом экзона 50 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрон 49, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +44 оснований, принадлежит экзону 50.

(A14) Область R14

Область R14 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до +25 оснований, если граница между 3'-концом интрона 50 и 5'-концом экзона 51 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрон 50, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +25 оснований, принадлежит экзону 51.

(A16) Область R16

Область R16 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до +24 оснований, если граница между 3'-концом интрона 51 и 5'-концом экзона 52 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрон 51, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +24 оснований, принадлежит экзону 52.

(A18) Область R18

Область R18 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до +34 оснований, если граница между 3'-концом интрона 52 и 5'-концом экзона 53 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрон 52, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +34 оснований, принадлежит экзону 53.

(A20) Область R20

Область R20 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400

оснований до +43 оснований, если граница между 3'-концом интрона 53 и 5'-концом экзона 54 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрону 53, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +43 оснований, принадлежит экзону 54.

(A22) Область R22

Область R22 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до +25 оснований, если граница между 3'-концом интрона 54 и 5'-концом экзона 55 определяется как положение основания 0; область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус), а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) обозначена «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрону 54, а область, определяемая диапазоном от +1 основания до +25 оснований, принадлежит экзону 55.

[0036]

Конкретные примеры последовательностей оснований областей R1-R24 приведены ниже. Используемые здесь термины тимин «Т» и урацил «U» являются синонимами. Это существенно не влияет на активность пропуска экзона антисмысловым олигомером согласно изобретению, независимо от того, используются ли тимин «Т» или урацил «U». Таким образом, как описано в настоящей заявке, в настоящее изобретение также включены идентичные последовательности оснований, даже если «Т» заменен на «U», и представлены одними и теми же SEQ ID NO. В приведенных ниже таблицах, «U» может быть описан как «Т» даже в последовательности оснований пре-мРНК. Специалисты в данной области могут идентифицировать последовательность РНК, заменив соответствующим образом «Т» на «U».

[0037]

[Таблица 1]

Область	Последовательность оснований области-мишени	SEQ ID NO
R1	<p>Область рядом с донором интрона 44 (в пределах от -20 до +400 оснований от 5'-конца интрона 44 в качестве положения основания)</p> <p>AATACAAATGGTATCTTAAGGTAAGTCTTTGATTTGTTTTTCGAAATTGATTTTATCTTC  AGCACATCTGGACTCTTTAACTTCTTAAAGATCAGGTTCTGAAGGGTGATGGAAATTA  TTGACTGTTGTTGTCATCATTATATTACTAGAAAAGAAAATTATCATAATGATAATATTAGA  GCACGGTGCATGGACTTTTTGTGTCAGGATGAGAGAGTTTGCCTGGACGGAGCTGGTTTA  TCTGATAAACTGCAAAATATAATTGAATCTGTGACAGAGGGAAGCATCGTAACAGCAAGGT  GTTTTGTGGCTTTGGGGCAGTGTGATTTCCGGCTTTATGTTGGAACCTTCCAGAAGGAGA  ACTTGTGGCATACTTAGCTAAAATGAAGTTGCTAGAAATATCCATCATGATAAA</p>	SEQ No. 233
R2	<p>Область рядом с акцептором интрона 44 (в пределах от -600 до +50 оснований от 3'-конца интрона 44 в качестве положения основания)</p> <p>TCTTGATGGGATGCTCCTGAAAAGCAATTAATTCTCAGTTTTTTGTGGCTTCTAATGCAAAA  TACATTGACGCACACAGAATTTGAAATGAATTTTCTTCTAATATAGCAATTAATTTTATTT  AAATATCTCTAGAGTTTTTTTTTAATACTGTGACTAACCTATGTTTGTCTTTTTACCTC  TCGTATCCACGATCACTAAGAAACCCAAATACTTTGTTTCATGTTTAAATTTTACAACATTT  CATAGACTATTAALCATGGAACATCCTTGTGGGGACAAGAAATCGAATTTGCTCTTGAAAA  GGTTTCCAACATAATTGATTTGTAGGACATTATAACATCCTCTAGCTGACAAGCTTACAAAA  ATAAAAACTGGAGCTAACCGAGAGGGTGCITTTTTCCCTGACACATAAAAGGTGTCTTTCT  GTCTTGTATCCTTTGGATATGGGCATGTCAGTTTCATAGGGAAATTTTACATGGAGCTTT  TGATTTCTTTCTTTGCCAGTACAACCTGCATGTGGTAGCACACTGTTTAACTTTTCTCAA  ATAAAAAGACATGGGGCTTCATTTTTGTTTTGCCTTTTTGGTATCTTACAGGAACTCCAGG  ATGGCATTGGGCAGCGGCAAACTGTTGTCAAACTTCAA</p>	SEQ No. 234
R3	<p>Область рядом с донором интрона 44 (в пределах от -20 до +400 оснований от 5'-конца интрона 45 в качестве положения основания)</p> <p>CTGTCAGACAGAAAAAGAGGTAGGGCGACAGATCTAATAGGAATGAAACATTTTAGCAG  ACTTTTTAAGCTTTCTTTAGAAGAATATTTTCATGAGAGATTATAAGCAGGGTGAAGGCAC  TAACATTAAGAACCTATCAACCATTAATCAACAGCAGTAAAGAAATTTTTATTTCTTTT  TTTCATATACTAAAATATATACTTGTGGCTAGTTAGTGGTTTTCTGCTATTTAAACTTGA  AGTTTGCTTTAAAAATCACCATGATTCCTTAAAGGTGAATATCTTCAATATATTTAACT  TCAACAAGCTGAATCTCAGTTGTTTTCAAGAAGATTTTAAAGCAATTTATAAATGATTG  TTTTGTAGGAAAGACAGATCTTTGCTTAGTTTTAAAAATAGCTATGAATATGAC</p>	SEQ No. 235
R4	<p>Область рядом с акцептором интрона 45 (в пределах от -400 до +50 оснований от 3'-конца интрона 44 в качестве положения основания)</p> <p>ATTACAGGCGCTGCCACCAAACCTGGCAAATTTTTGTATTTTTAGTGTAGACGGGGTTTC  ACCATATTTGCCAGGCTGGTCGCAAACCTCTGACCTCAAGTGATCCGCCACATCGGCCTC  CCTAAGCGCTAGGGTTACAGGCATGAGCCACTGCGCCTGGCCAGGAATTTTGAATCAGAA  TTTTCTTGTTCGATTTTAACTCTTTATCATTTAGAGATTCTTGAAATATTGAAATTA  TGTTCAAAGTGAATGAATTTTCTTAAATATGATGGTTAACATCTTTTAAATGCTTATT  TTTAAATGGCATGTTTGTGTCAGTTTGCATTAACAAATAGTTTGAAGAACTATGTTGGA  AAAAAAAAATAACAATTTTATCTTTCTTCCAGGCTAGAAGAACAAAAGAATATCTGTG  AGAATTTCAAAGAGATTTAAATG</p>	SEQ No. 236
R5	<p>Область рядом с донором интрона 46 (в пределах от -20 до +400 оснований от 5'-конца интрона 46 в качестве положения основания)</p> <p>AAAAGCTTGAGCAAGTCAAGGTAATTTTATTTTCTCAAATCCCCAGGGCTGCTTGCATA  AAGAAGTATATGAATCTATTTTTTAATTCATCATTGGTTTTCTGCCATTAGGTTATTCA  TAGTTCCTTGCTAAAGTGTTTTTCTCACAACCTTATTTCTTCTTAAACCTGCAGTTCTGAA  CCAGTGCACATAAGAACATATGTATATATGTGTGTGTGATTTATATATACACACACAC</p>	SEQ No. 237

	ATATTGCATCTATACATCTACACATATAGATGTATAGATTCAATATGTCTAAATGTATATA ATTACAGTTTTTATCTTTGATTTGAAATTAATTTTATAGATTTTACTTGAGAACTTCAACA TTCATATAATTTTAAAACTGAAGACCAGATTGTGGAATCATAAAATCTAAATC	
R6	Область рядом с акцептором интрона 46 (в пределах от -400 до +50 оснований от 3'-конца интрона 46 в качестве положения основания) ATAATGCAATTTCTCAGCAGCAAGCTACGGTATGCTATGGCATGCTATGATACCCAAGAGG CTGATGAATTTGTTCCATTGTTCTATTTCTGATAGAGAGATAGGTTTTCAGACACTAACT TATTTGGAGTGTGCTTTACCATCTCATTTTTTCTCTAAAAAATTTATGAGGGATAAT ATAATCGTTATTTTCTACAGAGATTTACTACTGAGGGGGTGAGTGTTCAGTCAATCAG CTCTGTGCTCAGATAGAAAAGTGTGGTATTTGAGGTACCCTGGGCCCTCGGTCAAGTCC CTTCATTTTGATAGACTAATCAATAGAAGCAAGGTAAGTGGAAATTTGCTGTAAAT TCATTTTAAACGTTGTTGCATTTGTCTGTTTCAGTTACTGGTGAAGAGTTGCCCTGCC CAGGGAATTTCAAACAATAAA	SEQ No. 238
R7	Область рядом с донором интрона 47 (в пределах от -20 до +400 оснований от 5'-конца интрона 47 в качестве положения основания) CAAATCTCCAGTGGATAAAGGTTAGACATTAACCATCTTCCGTCACATGTGTTAAATGT TGCAAGTATTTGTATGATTTTTGTTTCTGGGTGCTTCATTGGTGGGGAGGAGGCTGGTA TGTGGATTGTTGTTTTGTTTTTTTTAACCTGACCGTTTGCITTTGGCTATATGTTTTG TTGTGGCTAGAAAAATGATGATGGTGAATGGCTTTACATTAATGACCAAATGCCAAAAT TATACCACAATTTTTGCATAAATTTCTGAAGAATCAGACTGAAGAAATGGCGAAGTAT TTAATTCAGTGGCCAGGCATGACTGACAGTATTTAAGCTGAAAGGACGTGGTCTGGTTCT AGTTAAACAAGTGTATAAATCAAATTAATTTTACACCTGTGGTATGGACT	SEQ No. 239
R8	Область рядом с акцептором интрона 47 (в пределах от -400 до +50 оснований от 3'-конца интрона 47 в качестве положения основания) TATTCATTTTTATAACTGCAAAGGAAGCGGTATGGCATATAATACACAACACACCAGTAT ATTTAGTAACTGAGTGAATAAATGAAAGATGATTTTCTTTACTTTATCAGTTGCAGTTGGC TATGCCTTTTGTGTAAGGTGTGTGTTTTGAAATTTCAAAGGATTTAGTTTCTTTAAAGCA AAGAATTTTTGTAGCAGGTTAATGAATAATTTGAATACATTTGGTTAAATCCCAACATGTA ATATATGTAATAATCAATATTATGCTGCTAAAATAACACAAATCAGTAAGATTCGTAAT ATTTTCATGATAAATAACTTTGAAAATATATTTTTAAACATTTTGGCTTATGCCTTGAGAA TTATTTACCTTTTTAAATGATTTTCTTTTCCAGGTTTCCAGAGCTTTACCTGAGAAAACA GGAGAAATGAAGCTCAAATAAA	SEQ No. 240
R9	Область рядом с донором интрона 48 (в пределах от -20 до +400 оснований от 5'-конца интрона 48 в качестве положения основания) AAGGACCATTTGACGTTACGGTAGGGAACTTTTTGCITTAATAATTTTTGTCTTTTTAAG AAAAATGGCAATATCACTGAATTTTCTCATTTGGTATCATTATTAAGACAAAATATTACT TGTTAAAGTGTGGTAAGGAAGACTTTATTCAGGATAACCACAATAGGCACAGGGACCACTG CAATGGAGTATTACAGGAGGTTGGATAGAGAGAGATTGGGCTCAACTCTAAATACAGCACA GTGGAAGTAGGAATTTATACCCAAGCAGCAGTGTAGGAGTCAGTAGATGGAAAATTTATAA GAGGAAACATCAGGGGTAAGTGGGATTCTGGCTAAACCAACCTCACAGGATTTCTGCTGAA GATAGGCCAGGTTATCTTATCAGACAACCCCTTGGGGAATGGTGGAGAATACTG	SEQ No. 241
R10	Область рядом с акцептором интрона 48 (в пределах от -400 до +50 оснований от 3'-конца интрона 48 в качестве положения основания) TACTAAACACAGAAATTTGTAATAAATAAGTGTATAAAAGTAAATGAACATTAGGATTAT TGAGATTATTGTAGCTAAAAGTAGTGTATTTATCATATAAATTTATGTTAATAAATTTGATTG TCATTTATGCATTTTACTTTTTGAAAAGTAGTTAATGCCTGTGTTTCTATATGAGTATTA TATAATTCAGAAGATATTGGATGAATTTTTTTAAGTTAATGTGTTTTCACATCTCTGTT TCTTTTCTCTGCACAAAAGCTACATTTTGTGCCCTTATGTACCAGGCAGAAATTTGATCT GCAATACATGTGGAGTCTCAAAGGATATTTAAATTTAGTAATTTTATTGCTAACTGTGA AGTTAATCTGCATATATGGGTTCTTTTCCCAGGAAACTGAAATAGCAGTTCAAGCTAAA CAACCGGATGTGGAAGAGATTTT	SEQ No. 242

R11	<p>Область рядом с донором интрона 49 (в пределах от -20 до +400 оснований от 5'-конца интрона 49 в качестве положения основания)</p> <p>CAGCCACTCAGCCAGTGAAGGTAATGAAGCAACCTCTAGCAATATCCATTACCTCATAATG GGTTATGCTTCCCCTGTGTACATTTGCCATTGACGTGGACTATTTATAATCAGTGAATA ACTTGTAAAGGAAATACTGGCCATACTGTAATAGCAGAGGCAAAGCTGTCTTTTGTATCAGC ATATCCTATTTATATATTGTGATCTTAAGGCTATTAAACGAGTCATTGCTTTAAAGGACTCA TTTCTGTCCCTGGTGTGCTGCCATCAATACAAAAGTAGTCCCACCTTCAAGGTAGATTAAT TCTTTGGGGCTTTATIGCTTTGCTTGGCAGCCTTGATGCTTTTCATATTGTTGGTTAAT TCAAATCAAGCTACTGCATCATAGTGTCTGTCTCCAACAGCTGTAAAGAATCAC</p>	SEQ No. 243
R12	<p>Область рядом с акцептором интрона 49 (в пределах от -400 до +50 оснований от 3'-конца интрона 49 в качестве положения основания)</p> <p>ATATAATTGACTGGGGGTGAGCCAGTACATTAGGATTTTCTAAAGTTATCTGGATAATTT TAGTATGCAACCACAATAGATACTCTTCAAGAATTAAGCTAGTTGCTGAGAGGGAACGT TTTTGTTGGTTTGTTCACATAATGTTGCACTCTACTTCTTTAAATAAAATATGCCTG GAGAAAGGGTTTTTGTATGGAGCAATTGATAAATATTTGTAGGGTGGTTGGCTAAAAAAT TATAATCCTTTAAAGAAATCTACCCACTAAAGTAAATTTAGAAGTAAATATAATAGA AATCCAATAATATATTCACCAATGGATTAAGATGTTGATGAATATCTTCAAAGTGTAA TCGAATAAGTAATGTGTATGCTTTTCTGTTAAAGAGGAAGTTAGAAGATCTGAGCTCTGAG TGGAAAGCGGTAACCGTTACT</p>	SEQ No. 244
R13	<p>Область рядом с донором интрона 50 (в пределах от -20 до +400 оснований от 5'-конца интрона 50 в качестве положения основания)</p> <p>ACTGACCACTATTGGAGCCTGTAAGTATACTGGATCCCATTCTCTTTGGCTCTAGCTATTT GTTCAAAAAGTCCAACATGAAGTGATGACTGGGTGAGAGAGAAAATTTGTTTCAATTCTAA AGATAGAGATAAACCTTTGTGTTATTGACTGTGCAAAAAGTCTTAGAGTACATTCCTTGG AATTGACTCTGATTCAAAGTGTGTCATGACAACGGGATATGGGAGTGTCTCTGGAGATA CACCCACAAGGAAGAGAAGAGCACAAGGGAGATTGTGGGAGAGTCTGAAATGTGATTTGTC TGCAGCAGAGCCCTAAGCCAGTCTCGCAGGAGCCCTACATCTGGGCTGGCTGTGCAGAGCT GTCTGAAATGTCAGGCAGTGGGCCTGGCCCTTGATTTCTGATCCAGCCAGCCA</p>	SEQ No. 245
R14	<p>Область рядом с акцептором интрона 50 (в пределах от -400 до +50 оснований от 3'-конца интрона 50 в качестве положения основания)</p> <p>TCTTGAATAAAAAAAAAAATAAGTAAATTTATTTCCCTGGCAAGGTCTGAAAACTTTTGTT TTCTTTACCACTTCCACAATGTATATGATTGTTACTGAGAAGGCTTATTTAACTTAAGTTA CTTGTCCAGGCATGAGAATGAGCAAAATCGTTTTTAAAAAATGTTAAATGTATATTAAT GAAAAGGTTGAATCTTTTCATTTTCTACCATGATTGCTAAACAAGTATCCACATTTGTTA GAAAAAGATATATAATGTCATGAATAAGAGTTTGGCTCAAAATGTTACTCTTCAATTAAT TTGACTTATTGTTATTGAAATGGCTCTTAGCTTGTGTTTCTAATTTTCTTTTCTTCT TTTTCTTTTGGCAAAAACCCAAAATATTTAGCTCCTACTCAGACTGTTACTCTGGTGA CACAACCTGTGGTTACTAAGGAA</p>	SEQ No. 246
R15	<p>Область рядом с донором интрона 51 (в пределах от -20 до +400 оснований от 5'-конца интрона 51 в качестве положения основания)</p> <p>AGATGATCATCAAGCAGAAGGTATGAGAAAAATGATAAAAGTTGGCAGAAGTTTTCTTT AAAATGAGATTTTCCACCAATCACTTACTCTCCTAGACCATTTCCACCAGTCTTAGG CAACTGTTTCTCTCAGCAAAACACATTACTCTCACTATTGAGCCTAAGTATAATCAAGGA TATAAATTAATGCAATAACAAAAGTAGCCATACATTA AAAAGGAAATATACAAAAAAA AAAAAAGGAGCAGAAACCTTACAAGAATAGTTGTCTCAGTTAAATTTACTAACAACCT GGTATTTTAAAAATCTATTTATACCAATAAGTCACTCACTGAGCTATTTACATTTAA CTGTTTGTGTTGGCACTACGCAGCCCAACATATTGCAGAATCAAAATATAATAGT</p>	SEQ No. 247
R16	<p>Область рядом с акцептором интрона 51 (в пределах от -400 до +50 оснований от 3'-конца интрона 51 в качестве положения основания)</p> <p>TTTAAATAAATAACCTTAATTTTGGCGTCAACAGAAATGATATTATAAGTATAAATAGT TATCTATCTTTTAAATACATTGTCGTAATTCAGAATAACATTTCTTACTCAAGGCATTGAG ACAGTGGTTAAGTAATCCGAGGTAATCCGGAATGTCTCCATTTGAGCCTTTAAATGAAGA</p>	SEQ No. 248

	AAATCTATAGTCAAGATTTTCATTTGAAATATTTTTGATATCTAAGAATGAAACATATTTCTGTTAAATTGTTTTCTATAAACCCCTTATACAGTAACATCTTTTTTATTTCTAAAAGTGT TTGGCTGGTCTCACAATTGACTTTACTTTGTATTATGTAAGGAATACACAACCGCTGAA GAACCCCTGATACTAAGGGATATTTGTTCTTACAGGCAACAATGCAGGATTTGGAACAGAGG CGTCCCCAGTTGGAAGAACTCAT	
R17	Область рядом с донором интрона 52 (в пределах от -20 до +400 оснований от 5'-конца интрона 52 в качестве положения основания) AACAAATCATTACGGATCGAAGTAAGTTTTTAAACAAGCATGGGACACACAAAGCAAGATGC ATGACAAGTTTCAATAAAAACTTAAGTTCATATATCCCCCTCACATTTATAAAAAATAATGT GAAATAATGTAAATGATAACAATTGTGCTGAGATTTTCAGTCCATAATGTTACCTTTTAA TAAATGAATGTAATTCATTGAATAGAAGAAATACATTTTTAAATCAATTCAGGGCTTATA TAGTTGCAAAGCATGCATTGATGGGTGTGGTGACCACAGTGTGGCAGAACATTTGTGGCAG AACATTTGTTCTTTAGTTGTCATCTGGGCTGGCATCCATGGAGATGCCAGTCTCTCCCTCA TATCCTTGGCTGTTGGTCCAAGCAGGCAGTGGCTTCTCCTGGGCCATCTTTCA	SEQ No. 249
R18	Область рядом с акцептором интрона 52 (в пределах от -400 до +50 оснований от 3'-конца интрона 52 в качестве положения основания) CAAACCTCCTGTGGCAACAGAAAGCCCTCAGGCAATGAAATGCTGGCACTGGGAAATCAGGC TGATGGGTGCTGAAGTGGCAAGGATGAGGGGATATGGATATTCTGCTGTAGTGTCTTTCTA ACAGATGATTCATATTTGTTCTAGGGATCAAGAATTGAGTTAAAAATTTATATATATGTT CATGTTCTATGTACCTTCAGGAAAAATAATTTAACAGAACTAATATTTGCCATCAAAAAA GCAAAGAATCCTGTTGTTTCATCATCTAGCCATAACACAATGAATAATTTTTTAAATAAGC AACATAAATGTGAGATAACGTTTGGAGTTACATTTAAATGTCTCCTCCAGACTAGCATT TACTACTATATATTTATTTTCTTTTATTCTAGTTGAAAGAATTCAGAATCAGTGGGATG AAGTACAAGAACACCTTCAGAAC	SEQ No. 250
R19	Область рядом с донором интрона 53 (в пределах от -20 до +400 оснований от 5'-конца интрона 53 в качестве положения основания) AGAAAATCACAGAAACCAAGGTTAGTATCAAAGATACCTTTTTAAAAATAAAATACTGGTTA CATTTGATAAAATATACCATAGATTGTAATTTAATGATGTTTAAATGTAAAGTTATTAACA GAAAATCACGTTAAAGCTGAAATGAACAGTAGACTTTGTATATTTATTTCTTAGAGACAG AGTCTCACTGTCAACCAGGCTAAAGTGCAGTGGCACAAATCATAGCTCACTGAGCCTGAAC TCTGGGGCTCAAGCAGTCTCCTGCCTCAGCCTCCCTAGTAGCTGGGACTACTAGCCAGGC GTGTACCACCAGCCTGGCTAATTTTTTAAAAATTTTGTCTTCTGTAGAGATGGGTCTT GAACCTTTGGCCTCAAGCAATTCCTTCTTGGCCTCCCAAAGCACTAGGATT	SEQ No. 251
R20	Область рядом с акцептором интрона 53 (в пределах от -400 до +50 оснований от 3'-конца интрона 53 в качестве положения основания) CAACAAGTTAATGAAGAGGGAAGAAATGATGAGGTTTTTTTCTTCAAATGTTGTATA TGTCACATATTCAACAATTATATATGAGCTTATTTTGTAGTTTTTTCTCTTGTGATAAA AACAAATTAAGCCACTTTATTGCCAATTAATTGCTACTAAGTTGAAATACTTGATACTGGT TATTGCTCAAGATGCTGCATTTGAAAAGTTTGTCTGAAAGGTGGGTTACCTTATACTGTC ATGATTGACTAAATCATATGGTAGGTTAAAAGCAATCTAATATATGATTCTGACCTGAGG ATTCAGAAGCTGTTTACGAAGTATTTAAGACACTCCAACSTAGAGATTTTCATAAAAAAAC TGACATTCATTCTCTTTCTCATAAAAACTATAGCAGTTGGCCAAAGACCTCCGCCAGTGG CAGACAAATGTAGATGTGGCAAA	SEQ No. 252
R21	Область рядом с донором интрона 54 (в пределах от -20 до +400 оснований от 5'-конца интрона 54 в качестве положения основания) TGGAGAAGCATTCTAAAAGGTATGAATTACATTTTCTAAAACACTGTTGGCTGTAAT AATGGGGTGGTGAACCTGGATGGACCATGAGGATTTGTTTTCCAATCCAGCTAAAACCTGGA GCTTGGGAGGGTTCAAGACGATAAATACCAACTAACTCACGGACTGGCTCAGACTTCTA TTTTAAAAACGAGGAACATAAGATCTCATTTGCCCGCTGCACAAAAGTAGTGACATAACC AAGAGATTAACAAAAAGCAAAATACTGATTTATAGCTAGAAGAGCCATTTATCAGTCTAC TTTGATACTCTATCCAAAGGAATATCTTTCTATCTCATCATGGCCACACTGCCTTACCT GTTATCTGATAAATAAGTCACTTTGGGATTCATGATAGAGTTATAGCTGTACAT	SEQ No. 253

R22	<p>Область рядом с акцептором интрона 54 (в пределах от -400 до +50 оснований от 3'-конца интрона 54 в качестве положения основания)</p> <p>TCTCAAATTTGGCAGTATATTA AAAATAAGCTTTCAA AATTGACCAACAAAACTACAAAA  TTGAAAAAAGGTA CTTTGAAC TTTT CACATGTTCAAATATATGTATATATATTTT CACATAT  ATATATGAAACCTCCTCTGTGGAGAGGGGTTTATAGAAATCTGTAATTGTCATTCTTGCAT  GCCTTCCCCCATA CAAAACGCCTTTAAGTTAAATAAAAAATGAAAGTAAATAGACTGCACAAT  ATTATAGTTGTTGCTTAAAGGAAGAGCTGTAGCAACAAC TCA CCCCATTGTTGGTATATTA  CAATTTAGTTCCCTCCATCTTTCTTTTTATGGAGTTCACTAGGTGCACCATTCTGATATT  TAATAATTGCATCTGAACATTTGGTCCITTTGCAGGGTGAGTGAGCGAGAGGCTGCTTTGGA  AGAAACTCATAGATTA CTGCAAC</p>	SEQ No. 254
R23	<p>Область рядом с донором интрона 55 (в пределах от -20 до +400 оснований от 5'-конца интрона 55 в качестве положения основания)</p> <p>AGCTGATGAAACAATGGCAAGTAAGTCAGGCATTTCCGCTTTAGCACTCTTGTGGATCCAA  TTGAAACAATTC CAGCATTTTGTACTTGTAACTGACAAGCCAGGGACAAAA CAAAATAGTTG  CTTTTATACAGCCTGATGTATTTTCGGTATTTGGACAAGGAGGAGAGGGCAGAGGGAGAAG  GAAACATCATT TATAATCCACTTAAACCCCTCGTCTTAGAAAAAGTACATGCTCTGACCA  GGAAAA CATTTCATATAAAAACCAGAGCTTCGGTCAAGGAGAAACTTTGCTCAGAGAAATA  ACTTAGGGATTGGTTTATTAATTTTAAAAAGTTGACATTTT GAGTGT TATTTAATATTT  TACAGGGAAAGCATCTGTATGAATTGTCTGTTTATTTAGCGTTGCTAACTGAA</p>	SEQ No. 255
R24	<p>Область рядом с акцептором интрона 55 (в пределах от -400 до +50 оснований от 3'-конца интрона 55 в качестве положения основания)</p> <p>ACTTGATCCATATAGTAATGAAATTATTGGCACTGGGGTACACTTTATCATAGAATTTTAT  TGCCATCACTTCCATAAAATAACATTTTGTCCATAGACTAGAAGATATAACTTGTGAA  CTTTATAAAGTTATAAATACATTA CTTTCCAAC TATAATGGCAAGGAATAAATCTATTAC  AACTAATAAGATGCCATTTTAAATCTACATAATAACAGGAGAAGGCAATACGCCAAGAAA  AGGGATTTGAGATGTATCTTCTTGTAGTTTAGCCTGATTGAAATGTCTTTTGAAC TAATA  ATTATTTATATTTGCAATTTCTCAAATTCACATTCATCGCTTGTCTTTTGTGTTGGTAA  TTCTGCACATATTTCTTCTTCTGCTGTCTCTAGGACCTCCAAGGTGAAATTGAAGTCA C  ACAGATGTTTATCACAACCTGGA</p>	SEQ No. 256

[0038]

В альтернативном аспекте изобретения, конкретными примерами последовательностей оснований областей R2, R6, R8, R10, R12, R14, R16, R18, R20 и R22 являются следующие последовательности.

[0039]

[Таблица 2]

Область	Последовательность оснований области-мишени	SEQ ID NO
R2	<p>Область рядом с акцептором интрона 44 (в пределах от -600 до +19 оснований от 3'-конца интрона 44 в качестве положения основания)</p> <p>TCTTGATGGGATGCTCCTGAAAGCAATTAATTCAGTTTTTTGTGGCTTCTAATGCAAAA  TACATTGACGCAGACAGAATTTGAAATGAATTTTCTTCTAATATAGCAATTAATTTATTT  AAATATCTCTAGAGTTTTTTTTAACTGTGACTAACCTATGTTGTTCTTTTTACACCTC  TCGTATCCACGATCACTAAGAAACCCAAATACTTTGTTTCATGTTAAATTTTACAACATTT  CATAGACTATTAACATGGAACATCCTTGTGGGACAAGAAATCGAATTTGCTCTTGA AAA  GGTTTCCAACSTAATTGATTTGTAGGACATTATAACATCCTCTAGCTGACAAGCTTACAAAA  ATAAAAACTGGAGCTAACCGAGAGGGTGCCTTTTTCCCTGACACATAAAAGGTGTCTTTCT  GTCTTGTATCCTTTGGATATGGGCATGTCAGTTTCATAGGGAATTTTACATGGAGCTTT  TGTATTTCTTTCTTTGCCAGTACAACCTGCATGTGTTAGCACACTGTTTAATCTTTTCTCAA  ATAAAAAGACATGGGGCTTCATTTTTGTTTTGCCCTTTTTGGTATCTTACAGGAACTCCAGG  ATGGCATTG</p>	SEQ No. 341
R6	<p>Область рядом с акцептором интрона 46 (в пределах от -400 до +37 оснований от 3'-конца интрона 46 в качестве положения основания)</p> <p>ATAATGCAATTTCTCAGCAGCAAGCTACGGTATGCTATGGCATGCTATGATACCCAAAGGG  CTGATGAATTTGTTCCATTGTTCTATTTCTGATAGAGAGATAGGTTTTCCAGACACTAAT  TTATTTGGAGTGTGGCTTACCATCTCATTTTTTCTCTTAAAAAATTTATGAGGGATAAT  ATAATCGTTTATTTTACAGAGATTTATCTACTGAGGGGGTGAAGTGTTCAGTCAATCAG  CTCTGTGCTCAGATAGAAAACCTGTTGGTATTTGAGGTACCCTGGCCCTCGGTCAAGTCC  CTTCATTTTGATAGACTAATCAATAGAAGCAAAGCAAGGTAGTTGGAATTTGCTGTAAAT  TCATTTTAAACGTTGTTGCATTTGTCTGTTTTCAGTTACTGGTGGAGAGTTGCCCTGCCG  CAGGGAATTC</p>	SEQ No. 385
R8	<p>Область рядом с акцептором интрона 47 (в пределах от -400 до +19 оснований от 3'-конца интрона 47 в качестве положения основания)</p> <p>TATTCATTTTTATACTGCAAAGGAAGCGCGTATGGCATATAATACACAACACACCAGTAT  ATTTAGTAACTGAGTGAATAAATGAAAGATGATTTCTTTACTTTATCAGTTGCAGTTGGC  TATGCCCTTGTGTAAGGTGTGTGTTTTGAAATTTCCAAAAAGGTATTAGTTTCTTTAAAGCA  AAGAATTTTGTAGCAGGTTAATGAATAATTTGAAATACATTGGTTAAATCCCAACATGTA  ATATATGTAATAATCAATATTATGCTGCTAAAAATAACACAAATCAGTAAGATTTCTGTAAT  ATTTTCATGATAAATAACTTTTGAATAATATTTTTAAACATTTTGGCTTATGCCCTTGAGAA  TTATTTACCTTTTTAAAAATGATTTTCTTTTCAGGTTTCCAGAGCTTTACCTG</p>	SEQ No. 386
R10	<p>Область рядом с акцептором интрона 48 (в пределах от -400 до +42 оснований от 3'-конца интрона 48 в качестве положения основания)</p> <p>TACTAAACACAGAATTTTGTAAAACAATAAGTGTATAAAGTAAAATGAACATTAGGATTAT  TGAGATTATTGTAGCTAAAACCTAGTGTTTATTCATATAAAATTATGTTAATAAATTTGATTG  TCATTATTGCATTTTACTTTTTTGAAGTAGTTAATGCCTGTGTTTCTATATGAGTATTA  TATAATTCAAGAAGATATTGGATGAATTTTTTTTTAAGTTAATGTGTTTCCATCTCTGTT  TCTTTTCTCTGCACCAAAAGCTACATTTTTGTGCCCTTATGTACCAGGCAGAAAATTGATCT  GCAATACATGTGGAGTCTCCAAGGTATATTTAAATTTAGTAATTTTATTGCTAACTGTGA  AGTTAATCTGCACATATAGGGTCTTTTCCCAGGAAACTGAAATAGCAGTTCAAGCTAAA  CAACCGGATGTGGAA</p>	SEQ No. 387
R12	<p>Область рядом с акцептором интрона 49 (в пределах от -400 до +44 оснований от 3'-конца интрона 49 в качестве положения основания)</p> <p>ATATAATTGACTGGGGGTGAGCCAGTACATTAGGATTTTCTAAAGTTATCTGGATAATTT  TAGTATGCAACCACAATAGATACTTCAAGAATTAAGCTAGTTGCTGAGAGGGAACCTGTT  TTTTGTGGTTTGTTCACATAATGTTTGCACCTACTTCTTTAAATAAAATTTATGCCCTG  GAGAAAGGGTTTTGTATGGAGCAATTGATAAATATTTGTAGGGTGGTTGGCTAAAATAAT  TATAATTCCTTTAAAGAAATTTACCCACTAAAGTTAATTTAGAAGTAAAATAATAGA</p>	SEQ No. 388

	AATCCAATAATATATATCCACCAATGGATTAAGATGTTTCATGAATTATCTTCAAAGTGTAA TCGAATAAGTAATGTGTATGCTTTTCTGTAAAGAGGAAGTTAGAAGATCTGAGCTCTGAG TGAAGGGGTAACCG	
R14	Область рядом с акцептором интрона 50 (в пределах от -400 до +25 оснований от 3'-конца интрона 50 в качестве положения основания) TCTTGAATAAAAAAAAAAATAAGTAAAATTTATTTCCCTGGCAAGGTCTGAAAACSTTTTGT TTCTTTACCACCTCCACAATGTATATGATTGTTACTGAGAAGGCTTATTTAACTTAAGTTA CTTGTCCAGGCATGAGAATGAGCAAAATCGTTTTTTAAAAAATTGTTAAATGTATATTAAT GAAAAGGTTGAATCTTTTCATTTTCTACCATGTATTGCTAAACAAAGTATCCACATTGTTA GAAAAGATATATAATGTCATGAATAAGAGTTTGGCTCAAATGTTACTCTTCAATTAAT TTGACTTATTGTTATTGAAATTGGCTCTTAGCTTGTGTTCTAATTTTTCTTTTTCTTCT TTTTCTTTTTGCAAAAACCCAAATATTTAGCTCCTACTCAGACTGTTACTCTGGTGA CAC	SEQ No. 342
R16	Область рядом с акцептором интрона 51 (в пределах от -400 до +24 оснований от 3'-конца интрона 51 в качестве положения основания) TTAAAAATAAATAACCTTAATTTTGACGTCACACAGAATGATATTATAAGTATAAATAGT TATCTATCTTTAAATACATTGTCGTAATTCAGAATAACATTTCTTACTCAAGGCATTGAG ACAGTGGTTAAAGTAATCCGAGGTACTCCGGAATGTCTCCATTTGAGCCTTTAAATGAAGA AAATCTATAGTCAAGATTTTCATTTGAAATATTTTTGATATCTAAGAATGAAACATATTTCT CTGTTAAATGTTTTCTATAAACCCCTTATACAGTAAACATCTTTTTTATTCTAAAAGTGT TTGGCTGGCTCACAATTTACTTTACTTTGATTATGTAAGGAATACACAACCGCTGAA GAACCTGATACTAAGGGATATTTGTTCTTACAGGCAACAATGCAGGATTTGGAACAGAGG CGTCCCAGTTGGAAGAACTCA	SEQ No. 343
R18	Область рядом с акцептором интрона 52 (в пределах от -400 до +34 оснований от 3'-конца интрона 52 в качестве положения основания) CAAACTCCTGTGGCAACAGAAAGCCTTCAGGCAATGAAATGCTGGCACTGGGAAATCAGGC TGATGGGTGCTGAAAGTGGCAAGGATGAGGGGATATGGATATTCTGCTGTAGTGTCTTTCTA ACAGATGATTCATATTTGGTTCTAGGGATCAAGAATTGAGTTAAAATTTTATATATATGTT GATGTTCTATGTCACCTTCAGGAAAATAATTTAACAGAAAATAATTTTGCATCAAAAAA GCAAGAATCCTGTTGTTTCATCCTTAGCCATAACACAATGAATAATTTTAAATAAGC AACATAAATGTGAGATAACGTTTGGAAAGTTACATTTAAATGTCTCCTCCAGACTAGCATT TACTACTATATATTTATTTTCTTTTTATTCTAGTTGAAAGAATTGAGAATCAGTGGGATG AAGTACA	SEQ No. 344
R20	Область рядом с акцептором интрона 53 (в пределах от -400 до +43 оснований от 3'-конца интрона 53 в качестве положения основания) CAACAAGTTAATGAAGAGGGAAAGAAATGTATGAGGTTTTTTTCGTTCAAATGTTGTATA TGTCACATATTCAACAATTATATATGAGCTTATTTTTGTAGTTTTTTCTCTTGTGATAAA AACAATTAAGCCACTTTATTGCCAATTAATTGCTACTAAGTTGAAATACTTGATACTGCT TATTGCTCAAGATGCTCCATTTGAAAAGTTTGTCTGAAAGGTGGTTACCTTATACTGTC ATGATTGACTAAATCATATGGTAGGTTAAAAGCAATCTAATATATGTATTCTGACCTGAGG ATTCAGAAGCTGTTTACGAAATTTTTAAGACACTCCAAGTAGAGATTCATAAAAAAACC TGACATTCATTCTCTTTTCATAAAAAATCTATAGCAGTTGGCCAAAGACCTCCGCCAGTGG CAGACAAATGTAGATG	SEQ No. 389
R22	Область рядом с акцептором интрона 54 (в пределах от -400 до +25 оснований от 3'-конца интрона 54 в качестве положения основания) TCTCAAATTTGGCAGTATATAAAAATAAGCTTTCAAATGACCAACAAAACTACA AAA TTGAAAAAAGGTACTTTGAACTTTCACATGTTCAAATATATGTATATATATTTACATAT ATATATGAAACCTCCTCTGTGGAGAGGGTTTATAGAAATCTGTAATTGTCATTCTTGCAT GCCTTCCCCATACAAAACGCCTTAAAGTTAAATAAAAAATGAAAGTAAATAGACTGCACAAT ATTATAGTTCTGCTTAAAGGAAGAGCTGTAGCAACAACCTCACCCCATTTGTTGCTATATTA CAATTTAGTTCTCCATCTTTCTTTTTATGGAGTTCACTAGGTGCACCATTCTGATATT TAATAATTGCATCTGAACATTTGGTCTTTGCAGGGTGAAGTGAAGCGAGAGGCTGCTTG	SEQ No. 345

[0040]

В еще одном альтернативном аспекте изобретения, антисмысловой олигомер согласно изобретению нацелен по меньшей мере на любую одну область, выбранную из группы, состоящей из областей R1-R24, представленных:

областью R<sub>n</sub> (где n представляет собой нечетное число от 1 до 23), которая состоит

из последовательности оснований NY в направлении ниже от 5'-конца NB-интрона в пре-мРНК дистрофина человека, и

областью Rn (где n представляет собой четное число от 2 до 24), которая состоит из последовательности оснований NX в направлении выше от 3'-конца NA-интрона в пре-мРНК дистрофина человека.

[0041]

В приведенном выше варианте осуществления изобретения, примерами области-мишени Rn согласно изобретению являются, но не ограничиваются ими, области, где

если n равно 1, то NB=44 и NY=400,  
 если n равно 2, то NA=44 и NX=600,  
 если n равно 3, то NB=45 и NY=400,  
 если n равно 4, то NA=45 и NX=400,  
 если n равно 5, то NB=46 и NY=400,  
 если n равно 6, то NA=46 и NX=400,  
 если n равно 7, то NB=47 и NY=400,  
 если n равно 8, то NA=47 и NX=400,  
 если n равно 9, то NB=48 и NY=400,  
 если n равно 10, то NA=48 и NX=400,  
 если n равно 11, то NB=49 и NY=400,  
 если n равно 12, то NA=49 и NX=400,  
 если n равно 13, то NB=50 и NY=400,  
 если n равно 14, то NA=50 и NX=400,  
 если n равно 15, то NB=51 и NY=400,  
 если n равно 16, то NA=51 и NX=400,  
 если n равно 17, то NB=52 и NY=400,  
 если n равно 18, то NA=52 и NX=400,  
 если n равно 19, то NB=53 и NY=400,  
 если n равно 20, то NA=53 и NX=400,  
 если n равно 21, то NB=54 и NY=400,  
 если n равно 22, то NA=54 и NX=400,  
 если n равно 23, то NB=55 и NY=400, или  
 если n равно 24, то NA=55 и NX=400.

[0042]

R1-R24, которые являются примерами области-мишени Rn согласно изобретению в соответствии с вышеизложенным вариантом осуществления изобретения, представляют собой, но не ограничиваются ими, следующие области:

например, в определенном варианте осуществления изобретения,

область R1 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 400 оснований в направлении ниже от 5'-конца 44-го интрона в пре-мРНК дистрофина человека,



400 оснований в направлении ниже от 5'-конца 51-го интрона в пре-мРНК дистрофина человека,

область R16 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 400 оснований в направлении выше от 3'-конца 51-го интрона в пре-мРНК дистрофина человека,

область R17 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 400 оснований в направлении ниже от 5'-конца 52-го интрона в пре-мРНК дистрофина человека,

область R18 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 400 оснований в направлении выше от 3'-конца 52-го интрона в пре-мРНК дистрофина человека,

область R19 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 400 оснований в направлении ниже от 5'-конца 53-го интрона в пре-мРНК дистрофина человека,

область R20 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 400 оснований в направлении выше от 3'-конца 53-го интрона в пре-мРНК дистрофина человека,

область R21 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 400 оснований в направлении ниже от 5'-конца 54-го интрона в пре-мРНК дистрофина человека,

область R22 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 400 оснований в направлении выше от 3'-конца 54-го интрона в пре-мРНК дистрофина человека,

область R23 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 400 оснований в направлении ниже от 5'-конца 55-го интрона в пре-мРНК дистрофина человека, или

область R24 представляет собой область, которая состоит из последовательности из 400 оснований в направлении выше от 3'-конца 55-го интрона в пре-мРНК дистрофина человека.

[0043]

В другом варианте осуществления изобретения, R1-R24, которые являются примерами области-мишени R<sub>n</sub> согласно изобретению в соответствии с предшествующим вариантом осуществления изобретения, представляют собой, но не ограничиваются ими, следующие области:

(A1) Область R1

Область R1 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от +1 основания до +400 оснований, если граница между 3'-концом экзона 44 и 5'-концом интрона 44 определяется как положение основания 0; а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) от положения основания обозначена знаком «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от +1 основания до +400 оснований, принадлежит

интрон 44.

(A2) Область R2

Область R2 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -600 оснований до -1 основания, если граница между 3'-концом интрона 44 и 5'-концом экзона 45 определяется как положение основания 0; а область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус). В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -600 оснований до -1 основания, принадлежит интрон 44.

(A3) Область R3

Область R3 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от +1 основания до +400 оснований, если граница между 3'-концом экзона 45 и 5'-концом интрона 45 определяется как положение основания 0; а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) от положения основания обозначена знаком «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от +1 основания до +400 оснований, принадлежит интрон 45.

(A4) Область R4

Область R4 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до -1 основания, если граница между 3'-концом интрона 45 и 5'-концом экзона 46 определяется как положение основания 0; а область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус). В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрон 45.

(A5) Область R5

Область R5 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от +1 основания до +400 оснований, если граница между 3'-концом экзона 46 и 5'-концом интрона 46 определяется как положение основания 0; а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) от положения основания обозначена знаком «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от +1 основания до +400 оснований, принадлежит интрон 46.

(A6) Область R6

Область R6 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до -1 основания, если граница между 3'-концом интрона 46 и 5'-концом экзона 47 определяется как положение основания 0; а область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус). В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрон 46.

(A7) Область R7

Область R7 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от +1 основания до +400 оснований, если граница между 3'-концом экзона 47 и 5'-концом интрона 47 определяется как положение основания 0; а область последовательности оснований на 3'-

стороне (ниже) от положения основания обозначена знаком «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от +1 основания до +400 оснований, принадлежит интрону 47.

(A8) Область R8

Область R8 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до -1 основания, если граница между 3'-концом интрона 47 и 5'-концом экзона 48 определяется как положение основания 0; а область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус). В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрону 47.

(A9) Область R9

Область R9 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от +1 основания до +400 оснований, если граница между 3'-концом экзона 48 и 5'-концом интрона 48 определяется как положение основания 0; а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) от положения основания обозначена знаком «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от +1 основания до +400 оснований, принадлежит интрону 48.

(A10) Область R10

Область R10 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до -1 основания, если граница между 3'-концом интрона 48 и 5'-концом экзона 49 определяется как положение основания 0; а область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус). В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрону 48.

(A11) Область R11

Область R11 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от +1 основания до +400 оснований, если граница между 3'-концом экзона 49 и 5'-концом интрона 49 определяется как положение основания 0; а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) от положения основания обозначена знаком «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от +1 основания до +400 оснований, принадлежит интрону 49.

(A12) Область R12

Область R12 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до -1 основания, если граница между 3'-концом интрона 49 и 5'-концом экзона 50 определяется как положение основания 0; а область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус). В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрону 49.

(A13) Область R13

Область R13 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от +1 основания

до +400 оснований, если граница между 3'-концом экзона 50 и 5'-концом интрона 50 определяется как положение основания 0; а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) от положения основания обозначена знаком «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от +1 основания до +400 оснований, принадлежит интрону 50.

(A14) Область R14

Область R14 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до -1 основания, если граница между 3'-концом интрона 50 и 5'-концом экзона 51 определяется как положение основания 0; а область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус). В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрону 50.

(A15) Область R15

Область R15 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от +1 основания до +400 оснований, если граница между 3'-концом экзона 51 и 5'-концом интрона 51 определяется как положение основания 0; а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) от положения основания обозначена знаком «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от +1 основания до +400 оснований, принадлежит интрону 51.

(A16) Область R16

Область R16 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до -1 основания, если граница между 3'-концом интрона 51 и 5'-концом экзона 52 определяется как положение основания 0; а область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус). В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрону 51.

(A17) Область R17

Область R17 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от +1 основания до +400 оснований, если граница между 3'-концом экзона 52 и 5'-концом интрона 52 определяется как положение основания 0; а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) от положения основания обозначена знаком «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от +1 основания до +400 оснований, принадлежит интрону 52.

(A18) Область R18

Область R18 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до -1 основания, если граница между 3'-концом интрона 52 и 5'-концом экзона 53 определяется как положение основания 0; а область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус). В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрону 52.

## (A19) Область R19

Область R19 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от +1 основания до +400 оснований, если граница между 3'-концом экзона 53 и 5'-концом интрона 53 определяется как положение основания 0; а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) от положения основания обозначена знаком «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от +1 основания до +400 оснований, принадлежит интрону 53.

## (A20) Область R20

Область R20 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до -1 основания, если граница между 3'-концом интрона 53 и 5'-концом экзона 54 определяется как положение основания 0; а область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус). В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрону 53.

## (A21) Область R21

Область R21 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от +1 основания до +400 оснований, если граница между 3'-концом экзона 54 и 5'-концом интрона 54 определяется как положение основания 0; а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) от положения основания обозначена знаком «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от +1 основания до +400 оснований, принадлежит интрону 54.

## (A22) Область R22

Область R22 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до -1 основания, если граница между 3'-концом интрона 54 и 5'-концом экзона 55 определяется как положение основания 0; а область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус). В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрону 54.

## (A23) Область R23

Область R23 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от +1 основания до +400 оснований, если граница между 3'-концом экзона 55 и 5'-концом интрона 55 определяется как положение основания 0; а область последовательности оснований на 3'-стороне (ниже) от положения основания обозначена знаком «+». В соответствии с этим, область, определяемая диапазоном от +1 основания до +400 оснований, принадлежит интрону 55.

## (A24) Область R24

Область R24 представляет собой область, находящуюся в диапазоне от -400 оснований до -1 основания, если граница между 3'-концом интрона 55 и 5'-концом экзона 56 определяется как положение основания 0; а область последовательности оснований на 5'-стороне (выше) от положения основания обозначена знаком «-» (минус). В соответствии

с этим, область, определяемая диапазоном от -400 оснований до -1 основания, принадлежит интрону 55.

[0044]

В приведенном выше варианте осуществления изобретения, конкретные примеры последовательностей оснований областей R1-R24 представляют собой следующие последовательности:

[0045]

[Таблица 3]

Область	Последовательность оснований области-мишени	SEQ ID NO
R1	<p>Область рядом с донором интрона 44 (в пределах от +1 до +400 оснований от 5'-конца интрона 44 в качестве положения оснований)</p> <p>GTAAGTCTTTGATTTGTTTTTCGAAATTGATTTATCTTCAGCACATCTGGACTCTTTAACTTTCTTAAAGATCAGGTTCTGAAGGGTGATGAAATTACTTTTGGACTGTTGTTGTCATCATATATTACTAGAAAGAAAATTATCATAATGATAATATTAGAGCACGGTCTATGGACTTTTGTGTCTAGGATGAGAGAGTTGCCTGGACGGAGCTGGTTTATCTGATAAACTGCAAAATATAATTGAATCTGTCACAGAGGGAAGCATCGTAACAGCAAGGTGTTTTGTGGCTTTGGGGCAGTGTGATTTTCGGCTTTATGTTGGAACCTTTCAGAAAGGAGAAGTTGTGGCATACTTAGCTA AAATGAAGTTGCTAGAAATATCCATCATGATAAA</p>	SEQ No. 346
R2	<p>Область рядом с донором интрона 44 (в пределах от -600 до -1 основания от 3'-конца интрона 44 в качестве положения оснований)</p> <p>TCTTGATGGGATGCTCCTGAAAGCAATTAATTCAGTTTTTGTGGCTTCTAATGCAAAA TACATTGACGCAGACAGAATTTGAAATGAATTTCTTCTAATATAGCAATTAATTTTATTT AAATATCTCTAGAGTTTTTTTTTAATACTGTGACATAACCTATGTTTGTCTTTTTTACCTC TCGTATCCACGATCATAAGAAAACCAATACTTTGTTTCAATGTTTAAATTTTACAACATTT CATAGACTATTAACATGGAACATCCTTGTGGGGACAAGAAATCGAATTTGCTCTTGAAAA GGTTTCCAACTAATTGATTTGTAGGACATTATAACATCCTCTAGCTGACAAGCTTACAAAA ATAAAAACCTGGAGCTAACCGAGAGGGTGCTTTTTCCCTGACACATAAAAGGTGTCTTTCT GTCTGTATCCTTTGGATATGGGCATGTCAGTTTCATAGGGAAATTTTACATGGAGCTTT TGATTTCTTTCTTTGCCAGTACAACCTGCATGTGGTAGCACACTGTTTAACTTTTTCTCAA ATAAAAAGACATGGGGCTTCATTTTTGTTTTGCCTTTTTGGTATCTTACAG</p>	SEQ No. 347
R3	<p>Область рядом с донором интрона 45 (в пределах от +1 до +400 оснований от 5'-конца интрона 45 в качестве положения оснований)</p> <p>GTAGGGCGACAGATCTAATAGGAATGAAAACATTTTAGCAGACTTTTTAAGCTTTCTTTAG AAGAATATTTTCATGAGAGATTATAAGCAGGCTGAAAGGCATAACATTAAGAACCTATCA ACCATTAATCAACAGCAGTAAAGAAATTTTTTATTTCTTTTTTTCATATACTAAAATATAT ACTTGTGGCTAGTTAGTGGTTTTCTGCTATTTAAACTTGAAGTTTGCCTTAAAAATCACC CATGATTGCTTAAAGGTGAATATCTTCAATATATTTAACTTCAACAAGCTGAATCTCAGT TGTTTTTCAAGAAGATTTTAGAAAGCAATTAATAATGATTGTTTTGTAGGAAAGACAGATC TTTGCTTAGTTTTAAAAATAGCTATGAATATGAC</p>	SEQ No. 348
R4	<p>Область рядом с акцептором интрона 45 (в пределах от -400 до -1 основания от 3'-конца интрона 45 в качестве положения оснований)</p> <p>ATTACAGGGCGCTGCCACCAAACCTGGCAAATTTTTGATTTTTAGTGTAGACGGGGTTTC ACCATATTTGCCAGGCTGGTCGCAAACCTCTGACCTCAAGTGATCCGCCACATCGGCCTC CCTAAGCGCTAGGGTTACAGGCATGAGCCACTGCGCCTGGCCAGGAATTTTGAATCAGAA TTTTTCTTGTTCGATTTAATCTCTTATCAITTAGAGATTCTGAAATATTGAAATTAATTT TGTTCAAAGTGAATGAATTTCTTAAATTAATGATGGTTAACATCTTTTAAATTTGCTTATT TTTAAATTTGCCATGTTTGTGTCAGTTTGCATTAACAAATAGTTTGAGAACTATGTTGGA AAAAAAAATAACAATTTTATCTTTCTTTCCAG</p>	SEQ No. 349
R5	<p>Область рядом с донором интрона 46 (в пределах от +1 до +400 оснований от 5'-конца интрона 46 в качестве положения оснований)</p> <p>GTAATTTTATTTTCTCAAATCCCCAGGGCTGCTTGCATAAAGAAGTATATGAATCTATT TTTTAATTCATCATTGGTTTTCTGCCATTAGGTTATTCATAGTTCCCTGCTAAAGTGT TTTCTCACAACCTTTATTTCTTAAACCCTGCAGTTCTGAACCAGTGCACATAAGAACATA TGATATATGTGTGTGTGATTTATATATACACACACATATTGCATCTATACATCTA CACATATAGATGTATAGATTCAATATGTCTAAATGTATATAATTCACAGTTTTTATCTTTG ATTTGAAATTAATTTAGATTTTACTTGAGAAGTTTCAACAACCTCATATAATTTAAAAAC GAAGACCAGATTGTGGAATCATAAAATCTAAATC</p>	SEQ No. 350

R6	<p>Область рядом с акцептором интрона 46 (в пределах от -400 до -1 основания от 3'-конца интрона 46 в качестве положения оснований)</p> <p>ATAATGCAATTTCTCAGCAGCAAGCTACGGTATGCTATGGCATGCTATGATACCCAAGAGG  CTGATGAATTTGTTACATTGTTCTATTTCTGATAGAGAGATAGGTTTTTCAGACACTAACT  TTATTTGGAGTGTGCTTTACCATCTCACATTTTCTCTTAAAAAATTTATGAGGGATAAT  ATAATCGTTTATTTCTACAGAGATTTATCTACTGAGGGGTGAGTGTTCAGTCAATCAG  CTCTGTCTCAGATAGAAAACCTGTTGGTATTTGAGGTACCACTGGGCCCTCGGTCAAGTCG  CTTCATTTTGATAGACTAATCAATAGAAGCAAAGACAAGGTAGTTGGAATTGTCTGTAAT  TCATTTAAACGTTGTTGCATTTGTCTGTTTCAG</p>	SEQ No. 351
R7	<p>Область рядом с донором интрона 47 (в пределах от +1 до +400 оснований от 5'-конца интрона 47 в качестве положения оснований)</p> <p>GTTAGACATTAACCATCTCTTCCGTCACATGTGTTAAATGTTGCAAGTATTTGTATGTATT  TTGTTTCCTGGGTGCTTCATTTGGTCGGGGAGGAGGCTGGTATGTGGATTGTGTTTTGTTT  TGTTTTTTAAACCTGACCGTTTGCTTTGGCTATAATGTTTTGTTGTGGGTAGAAAAAATGAT  GATGGTGAATGGCTTACATTAATGACCAAATGCCAAAATTTATACCACAATTTTTGTCAT  AAATTTCTGAAGAATCAGACTGAAGAAATGGCGAAGTATTTAATTCAGTGGCCAGGCAT  GTAAGTACAGTATTTAAGCTGAAAGGACGTGGTCTGGTCTAGTTAAACAAGTGTCTATAAA  TCAAAATTAATTTACACCTGTGGTATGGACT</p>	SEQ No. 352
R8	<p>Область рядом с акцептором интрона 47 (в пределах от -400 до -1 основания от 3'-конца интрона 47 в качестве положения оснований)</p> <p>TATTCATTTTATAACTGCAAAGGAAGCGCGTATGGCATATAATACACAACACACCAGTAT  ATTTAGTAACTGAGTGAATAAATGAAAGATGTATTTCTTTACTTTATCAGTTGCAGTTGGC  TATGCCTTTGTGTAAGGTGTGTGTTTTGAAATTCAAAAAGGTATAGTTTCTTTAAAGCA  AAGAATTTTGTAGCAGGTTAATGAATAATTTGAATACATTGGTTAAATCCCAACATGTA  ATATATGTAATAATCAATATTATGCTGCTAAAATAACACAATCAGTAAGATTCTGTAAT  ATTTCAAGATAAAATAACTTTTGAATAATATTTTAAACATTTTGGCTTATGCCTTGAGAA  TTATTTACCTTTTAAATGTATTTCCCTTTCAG</p>	SEQ No. 353
R9	<p>Область рядом с донором интрона 48 (в пределах от +1 до +400 оснований от 5'-конца интрона 48 в качестве положения оснований)</p> <p>GTAGGGAACTTTTGCTTTAAATATTTTTGTCTTTTTAAGAAAAATGGCAATATCACTGA  ATTTTCTCATTTGGTATCATTATTTAAAGACAAAATATTACTTGTAAAGTGTGGTAAAGGAA  GACTTTATTCAGGATAACCAACAATAGGCACAGGGACCACTGCAATGGAGTATTACAGGAGG  TTGGATAGAGAGAGATTGGGCTCAACTCTAAATACAGCACAGTGAAGTAGGAATTTATAG  CCAAGGAGCAGTGTAGGAGTCAGTAGATGGAATAATTTAAGAGGAAACATCAGGGGTAAG  TGGGATTCTGGCTAAACCAACCTCACAGGATTTCTGCTGAAGATAGGCCAGGGTTATCTTA  TCAGACAACCCTTGGGGAATGGTGGAGAATACTG</p>	SEQ No. 354
R10	<p>Область рядом с акцептором интрона 48 (в пределах от -400 до -1 основания от 3'-конца интрона 48 в качестве положения оснований)</p> <p>TACTAAACACAGAATTTTGTAACAATAAGTGTATAAAGTAAATGAACATTAGGATTAT  TGAGATTATTGTAGCTAAAACCTAGTGTATTATTCATATAAATTTATGTTAATAAATTTGATTG  TCATTTATGCAATTTACTTTTTTGAAGAGTAGTTAATGCCTGTGTTTCTATATGAGTATTA  TATAATTCAAGAAGATAATTGGATGAATTTTTTTAAAGTTAATGTGTTTACATCTCTGTT  TCTTTTCTCTGCACAAAAGCTACATTTTTGTGCCCTTATGTACCAGGCAGAAATTTGATCT  GCAATACATGTGGAGTCTCCAAGGTATATTTAAATTTAGTAATTTTATTGCTAACTGTGA  AGTTAATCTGCACATATGGGTTCTTTCCCCAG</p>	SEQ No. 355
R11	<p>Область рядом с донором интрона 49 (в пределах от +1 до +400 оснований от 5'-конца интрона 49 в качестве положения оснований)</p> <p>GTAATGAAGCAACCTCTAGCAATATCCATTACCTCATAATGGGTATGCTTCCCTCTTGT  ACATTTGCCATTGACGTGGACTATTTATAATCAGTGAATAACTTGAAGGAAATACTGGC  CATACTGTAATAGCAGAGGCAAAGCTGTCTTTTGTATCAGCATATCCTATTTATATTTGT  GATCTTAAAGGCTATTAACGAGTCATTGCTTTAAAGGACTCATTCTGTCTGGTGTGCTGC  CATCAATACAAAAGTAGTCCCACCTCAAGGTAGATTAATTTCTTTGGGGCTTTATTGCTT</p>	SEQ No. 356

	TGCTTGCCAGCCTTGATGCTTTTCATATTGTTTGGTTTAATTCAAATCAAGCTACTGCATC ATAGTGTCTGTCTCCAACAGCTGTAAAGAATCAC	
R12	Область рядом с акцептором интрона 49 (в пределах от -400 до -1 основания от 3'-конца интрона 49 в качестве положения оснований) ATATAATTGACTGGGGGTGAGCCAGTACATTAGGATTTTCCATAAAGTTATCTGGATAATTT TAGTATGCAACCACAATAGATACTCTTCAAGAATTAAGCTAGTTGCTGAGAGGGAACGTGT TTTTGTGGTTTTGTTTCACTAATGTTTGCCTCTACTTCCTTAAATAAAAATATGCCTG GAGAAAAGGGTTTTGTATGGAGCAATTGATAAATATTTGTAGGGTGGTTGGCTAAAATAAT TATAATTCCTTTAAAAGAAATTCACCCACTAAAGTTAATTTAGAAGTAAAATATAATAGA AATCCAATAATATATTCACCAATGGATTAAGATGTTTCATGAATTATCTTCAAAGTGTAA TCGAATAAGTAATGTGTATGCTTTCTGTAAAG	SEQ No. 357
R13	Область рядом с донором интрона 50 (в пределах от +1 до +400 оснований от 5'-конца интрона 50 в качестве положения оснований) GTAAGTATACTGGATCCCATTTCTCTTTGGCTCTAGCTATTTGTTCAAAAAGTGCAACTATGA AGTGATGACTGGGTGAGAGAGAAAATTTGTTTCAATTCTAAAGATAGAGATAAACCTTTGT GTTATTGACTGTGCAAAAAGTCTTAGAGTACATTCCTTGGAAATGACTCTGATTCAAAGT GTTGCATGACAACGGGATATGGGAGTGTCTCTGGAGATACACCCACAAGGAAGAGAAGA GCACAAGGGAGATTGTGGGAGAGTCTGAAATGTGATTTGTCTGCAGCAGAGGCCAAGCCA GTCTCGCAGGAGCCCTACATCTGGGCTGGCTGTGCAGAGCTGTCTGAATTGCAGGCAGTG GGCCTGGCCCTTGTATTCTGATCCAGCCAGCCA	SEQ No. 358
R14	Область рядом с акцептором интрона 50 (в пределах от -400 до -1 основания от 3'-конца интрона 50 в качестве положения оснований) TCTTGAATAAAAAAAAAAATAAGTAAAAATTTATTTCCCTGGCAAGGTCTGAAAACTTTTGT TTCTTTACCACTTCCACAATGTATATGATTGTTACTGAGAAGGCTTATTTAACTTAAGTTA CTTGTCAGGCATGAGAATGAGCAAAATCGTTTTTAAAAAATGTTAAATGTATATTAAT GAAAAGGTTGAATCTTTTCATTTTCTACCATGTAATGCTAAACAAAGTATCCACATTGTTA GAAAAAGATATATAATGTCATGAATAAGAGTTTGGCTCAAATGTTACTCTTCAATTAAT TTGACTTATTGTTATTGAAATGGCTCTTTAGCTTGTGTTTCTAAATTTTCTTTTCTTCT TTTTTCTTTTTGCAAAAACCCAAAAATTTTATG	SEQ No. 359
R15	Область рядом с донором интрона 51 (в пределах от +1 до +400 оснований от 5'-конца интрона 51 в качестве положения оснований) GTATGACAAAAAATGATAAAAAGTTGGCAGAAGTTTTCTTTAAAAATGAAGATTTTCCACCA ATCCTTTACTCTCCTAGACCATTTCCACCAGTCTTAGGCAACTGTTTCTCTCTCAGCA AACACATTACTCTCACTATTCAGCCTAAGTATAATCAAGGATATAAATTAATGCAATAAC AAAAGTAGCCATACATTA AAAAGGAAATATACAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAGAAACC TTACAAGAATAGTTGTCTCAGTAAATTTACTAAACAACCTGGTATTTAAAAATCTATTT TATACCAAATAAGTCACTCAACTGAGCTATTTACATTTAAACTGTTTGTGTTTGGCACTACG CAGCCCAACATATTGCAGAATCAAAATATAATAGT	SEQ No. 360
R16	Область рядом с акцептором интрона 51 (в пределах от -400 до -1 основания от 3'-конца интрона 51 в качестве положения оснований) TTTTAAATAAATATACCTTAATTTTGACGTCACACAGAATGATATTATAAGTATAAATAGT TATCTATCTTTAAATACATTTGTCGTAATTCAGAATAACATTTCTTACTCAAGGCATTCAG ACAGTGGTTTAAAGTAATCCGAGGTA CTCCGGAATGTCTCCATTTGAGCCTTTAAATGAAGA AAATCTATAGTCAAGATTTTCATTTGAAATATTTTGATATCTAAGAATGAAACATATTTT CTGTTAAATGTTTTCTATAAACCTTATACAGTAACATCTTTTTTATTTCTAAAAGTGT TTGGCTGGTCTCACAATGTACTTTACTTTGTATTATGTA AAAAGGAATACACAACGCTGAA GAACCTGATACTAAGGATATTTGTTCTTACAG	SEQ No. 361
R17	Область рядом с донором интрона 52 (в пределах от +1 до +400 оснований от 5'-конца интрона 52 в качестве положения оснований) GTAAGTTTTTAAACAAGCATGGGACACACAAGCAAGATGCATGACAAGTTTCAATAAAAA CTTAAGTTCATATATCCCCCTCACA TTTATAAAAAATAATGTGAAATAATTGTAATGATAA CAATTTGCTGAGATTTTCAGTCCATAATGTTACTTTTTAATAAATGAATGTAATTCATT	SEQ No. 362

	GAATAGAAGAAATACATTTTTAAATCAATTCAGGGCTTATATAGTTGCAAAGCATGCATTG ATGGGTGTGGTGACCACAGTGTGGCAGAACATTTGTTCCTTAGTTGT CATCTGGGCTGGCATCCATGGAGATGCCAGTCTCTCCCTCATATCCTTGGGTGTTGGTCCA AGCAGGCAGTGGCTTCTTCTGGGCCATCTTTCA	
R18	Область рядом с акцептором интрона 52 (в пределах от -400 до -1 основания от 3'-конца интрона 52 в качестве положения оснований) CAAACCTCTGTGGCAACAGAAAGCCTTCAGGCAATGAAATGCTGGCACTGGGAAATCAGGC TGATGGGTGCTGAAGTGGCAAGGATGAGGGGATATGGATATTTCTGCTGTAGTGCCTTTCTA ACAGATGATTCATATTTGGTTCTAGGGATCAAGAATTGAGTTAAAAATTTATATATATGTT GATGTTCTATGTCACCTTCAGGAAAAAATTTAACAGAACTAATATTTGCCATCAAAAA GCAAAGAATCCTGTTGTTTCATCATCTAGCCATAACACAATGAATAATTTTTAAATAAGC AACATAAATGTGAGATAACGTTTGGAAAGTTACATTTAAAAATGTCTCCTCCAGACTAGCATT TACTACTATATATTTATTTTCTTTTATTCTAG	SEQ No. 363
R19	Область рядом с донором интрона 53 (в пределах от +1 до +400 оснований от 5'-конца интрона 53 в качестве положения оснований) GTTAGTATCAAAGATACCTTTTTAAAAATAAAATACTGGTTACATTTGATAAAAATTATACCA TAGATTCTAATTTAATGATGTTTAAATGTAAGTTATTAACAGAAAAATCACGTTAAAGCTGA AATGAACAGTAGACTTTGTATATTTTCTTAGAGACAGAGTCTCACTGTACCCAGGC TAAAGTCAGTGGCACAATCATAGCTCACTGAGCCTTGAACCTGGGGCTCAAGCAGTCCCT CCTGCCCTCAGCCTCCCTAGTAGCTGGGACTACTAGCCAGGCGTGAACCACCGCCTGGCT AATTTTTAAAAAATTTTGTCTGTAGAGATGGGTTCTTGAACCTTTGGCCTCAAGCAA TTCTCTTCTTGGCCTCCCAAAGCACTAGGATT	SEQ No. 364
R20	Область рядом с акцептором интрона 53 (в пределах от -400 до -1 основания от 3'-конца интрона 53 в качестве положения оснований) CAACAAGTTAATGAAGAGGGAAAGAAATGTATGAGGTTTTTTTCGTTCAAATGTTGTTATA TGTCACATATTTCAACAATTATATATGAGCTTATTTTGTAGTTTTTTCTCTTGTGATAAA AACAAATTAAGCCACTTTATTGCCAATTAATTGCTACTAAGTGAATACTTGATACTGGT TATTGCTCAAGATGCTGCATTTGAAAAGTTTGTCTGAAAGGTGGGTTACCTTATACTGTC ATGATTCACTAAATCATATGGTAGCTTAAAAGCAATCTAATATATGATTCTGACCTGAGG ATTCAGAAGCTGTTTACGAAGTATTTAAGACACTCCAAGTAGAGATTTCAAAAAAAAC TGACATTCATTCTTTCTCATAAAAAATCTATAG	SEQ No. 365
R21	Область рядом с донором интрона 54 (в пределах от +1 до +400 оснований от 5'-конца интрона 54 в качестве положения оснований) GTATGAATTACATTTATTTCTAAAACTACTGTTGGCTGTAATAATGGGGTGGTGAACCTGGA TGGACCATGAGGATTTGTTTTTCCAATCCAGCTAAACTGGAGCTGGGAGGGTTCAAGACG ATAAATACCAACTAAACTCACGGACTTGGCTCAGACTTCTATTTAAAAACGAGGAACATA AGATCTCATTTGCCCGCTGTCACAAAAGTAGTGACATAACCAAGAGATTAACAAAAAGCA AAATACTGATTTATAGCTAGAAGAGCCATTTATCAGTCTACTTTGATAACTSTATCCAAAG GAAATCTTTCTATCTCATCATGGCGCACACTGCCCTTACCTGTTATCTGATAAATAAGTCA CTTTGGGATTCATGATAGAGTTATAGCTGTACAT	SEQ No. 366
R22	Область рядом с акцептором интрона 54 (в пределах от -400 до -1 основания от 3'-конца интрона 54 в качестве положения оснований) TCTCAAATTTGGCAGTATATTAATAAATAAGCTTTCAAATTTGACCAACAAAACTACAAAA TTGAAAAAAGGTACTTTGAACCTTTCACATGTTCAAATATATGTATATATATTTACATAT ATATATGAAACCTCCTCTGTGGAGAGGGTTTATAGAAATCTGTAATTGTCATTCTTGCAT GCCTTCCCCATACAAACGCCTTTAAGTTAAATAAAAAATGAAAGTAAATAGACTGCACAAT ATTATAGTTGTTGCTTAAAGGAAGAGCTGTAGCAACAACCTACCCCATTTGTTGGTATATTA CAATTTAGTTCCCTCCATCTTTCTTTTTATGGAGTCTACTAGGTGCACCATTCTGATATT TAATAATTGCATCTGAAACATTTGGTCTTTGTCAG	SEQ No. 367
R23	Область рядом с донором интрона 55 (в пределах от +1 до +400 оснований от 5'-конца интрона 55 в качестве положения оснований)	

	GTAAGTCAGGCATTTCCGCTTTAGCACTCTTGTGGATCCAATTGAACAATTCTCAGCATT GTACTTCTAACTGACAAGCCAGGGACAAAACAATAAGTTGCTTTTATACAGCCTGATGTA TTTCGGTATTTGGACAAGGAGGAGAGAGGGAGAGGGAGAAGGAAACATCATTATAATTCC ACTTAACACCCCTCGTCTTAGAAAAAGTACATGCTCTGACCAGGAAAACATTTGCATATAAA ACCAGAGCTTCGGTCAAGGAGAAAACCTTTCAGAGAAAATAACTTAGGGATTGGTTTATTA AATTTTAAAAGTTGACATTTTTGACTGTTTATTTAATATTTTACAGGAAAAGCATCTGTAT GAATTGCTGTTTTATTAGCGTTCCTAACTGAA	SEQ No. 368
R24	Область рядом с акцептором интрона 55 (в пределах от -400 до -1 основания от 3'-конца интрона 55 в качестве положения оснований) ACTTGATCCATATAGTAATGAAATTATTGGCACTGGGGTACACTTTATCATAGAATTTTAT TGCCATCACTTCCATAAAAATAATACATTTTGTCCATAGACTAGAAGATATAAATTGTGAA CTTTATAAAGTTATAAATACATTACTTTCCAACTCATAATGGCAAGGAATAAATCTATTAC AACTAATAAGATGCCATTTTAAATCTACATAATAACAGGAGAAGGCAATACGCCAAGAAA AGGGATTTGAGATGTATCTTCTTGTAGTTTAGCCTGATTGAAATGTCTTTTGAACATAA ATTTATATATTTGCAATTCTCCAAATTCACATTCATCGCTTGTCTTTTGTGTTGTTAA TTCTGCACATATTCTTCTTCCCTGCTGCTCTGTAG	SEQ No. 369

[0046]

Области-мишени R1-R24 антисмыслового олигомера согласно изобретению включают как области дикого типа (например, области, представленные SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389), так и области мутантного типа по отношению к пре-мРНК дистрофина человека. Такой мутантный тип конкретно имеет любую одну последовательность оснований, выбранную из группы, состоящей из последовательностей оснований (B0) и (B1)-(B16), представленных ниже:

(B0) последовательность оснований, которая гибридизуется в жестких условиях с последовательностью оснований, комплементарной любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389;

(B1) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований;

(B2) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 86% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389, и имеет длину в пределах  $\pm 14\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований;

(B3) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 87% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389, и имеет длину в пределах  $\pm 13\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований;

(B4) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 88% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389, и имеет длину в пределах  $\pm 12\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований;

(B5) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 89% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID



NO: 233-256, 341-369 и 385-389, и имеет длину в пределах  $\pm 1\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований; и

(B16) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 99,5% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389, и имеет длину в пределах  $\pm 0,5\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований.

[0047]

Используемый здесь термин «последовательность оснований, которая гибридизуется в жестких условиях» означает, например, последовательность оснований, полученную путем гибридизации колоний, гибридизации методом бляшек, Саузерн-гибридизации или т.п., с использованием в качестве зонда всей последовательности оснований или ее части, комплементарной, например, любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389. Метод гибридизации, который может быть применен, включает способы, описанные, например, в руководстве «Sambrook & Russell», *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 3*, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, 2001, «Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 1987-1997», и т.п.

[0048]

Используемый здесь термин «комплементарная последовательность оснований» не ограничивается последовательностью оснований, которая образует пары оснований Уотсона-Крика с предполагаемой последовательностью оснований, а также включает последовательность оснований, которая образует с ними пары оснований с неоднозначным спариванием. В данном случае, пара оснований Уотсона-Крика означает пару оснований, которая образует водородную связь между аденином и тиминном, между аденином и урацилом или между гуанином и цитозином, а пара оснований с неоднозначным спариванием означает пару оснований, которая образует водородную связь между гуанином и урацилом, между инозином и урацилом, между инозином и аденином или между инозином и цитозином. Термин «комплементарная последовательность оснований» не обязательно должна иметь 100% комплементарность предполагаемой последовательности оснований и может содержать, например, 1, 2, 3, 4 или 5 некомплементарных оснований предполагаемой последовательности оснований или может представлять собой последовательность оснований, которая будет короче на 1 основание, 2 основания, 3 основания, 4 основания или 5 оснований, чем предполагаемая последовательность оснований.

[0049]

Используемый здесь термин «жесткие условия» может означать любые из условий низкой жесткости, условий умеренной жесткости или условий высокой жесткости. Термин «условия низкой жесткости» означает, например,  $5\times$ SSC,  $5\times$ раствор Денхардта, 0,5% ДСН, 50% формамид при  $32^\circ\text{C}$ . Термин «условия умеренной жесткости» означает, например,  $5\times$ SSC,  $5\times$ раствор Денхардта, 0,5% ДСН, 50% формамида при  $42^\circ\text{C}$  или  $5\times$ SSC 1% ДСН,

50 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 50% формамида при 42°C. Термин «условия высокой жесткости» означает, например, 5×SSC, 5× раствор Денхардта, 0,5% ДСН, 50% формамида при 50°C или 0,2×SSC, 0,1% ДСН при 65°C. При этом предполагается, что в этих условиях, последовательности оснований с более высокой идентичностью будут эффективно получены при более высоких температурах, хотя это зависит от множества факторов, влияющих на жесткость гибридизации, включая температуру, концентрацию зонда, длину зонда, ионную силу, время, концентрацию соли и другие факторы, и специалисты в данной области могут соответствующим образом выбрать эти факторы для достижения аналогичной жесткости.

Если для гибридизации используются коммерчески доступные наборы, то может быть использована, например, система прямого мечения и детектирования Alkphos (GE Healthcare). В этом случае, согласно прилагаемому протоколу, после инкубирования с меченым зондом в течение ночи, мембрана может быть промыта первичным промывочным буфером, содержащим 0,1% (масс./об.) ДСН, при 55°C, что позволит выявить гибридизацию. Альтернативно, если зонд метят дигоксигенином (DIG) с использованием имеющегося в продаже реагента (например, ПЦР-смеси для мечения (Roche Diagnostics) и т.п.) при получении зонда на основе всей последовательности или ее части, комплементарной любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389, то гибридизация может быть детектирована с помощью набора для обнаружения нуклеиновых кислот DIG (Roche Diagnostics) или т.п.

[0050]

Идентичность между последовательностями оснований может быть определена с использованием алгоритма BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), Karlin and Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873, 1993). Были разработаны программы, называемые BLASTN и BLASTX, на основе алгоритма BLAST (Altschul SF, et al: J. Mol. Biol. 215: 403, 1990). Если последовательность оснований анализируют с использованием BLASTN, то параметрами являются, например, оценка=100 и длина слова=12. Если используются программы BLAST и BLAST с пробелами, то для каждой программы используются параметры по умолчанию.

[0051]

Антисмысловый олигомер согласно изобретению содержит последовательность оснований, комплементарную последовательности оснований по меньшей мере одной области, выбранной из группы, состоящей из областей-мишеней R1-R24 согласно изобретению, или ее неполную последовательность оснований. Термин «неполная» относится, за исключением полноразмерной области, по меньшей мере к любой одной области, выбранной из группы, состоящей из областей-мишеней R1-R24, то есть, неполной области по меньшей мере любой одной области, выбранной из группы, состоящей из областей-мишеней R1-R24. Неполная область может иметь, без каких-либо ограничений, длину 10-60 оснований, 10-55 оснований, 10-50 оснований, 10-45 оснований, 10-40 оснований, 10-35 оснований, 10-30 оснований, 10-25 оснований, 15-60 оснований, 15-55



оснований, 29 оснований, 28 оснований, 27 оснований, 26 оснований, 25 оснований, 24 основания, 23 основания, 22 основания, 21 основание, 20 оснований, 19 оснований, 18 оснований, 17 оснований, 16 оснований, 15 оснований, 14 оснований, 13 оснований, 12 оснований, 11 оснований, 10 оснований, 9 оснований, 8 оснований, 7 оснований, 6 оснований или 5 оснований. Эти длины могут быть увеличены или уменьшены на 1, 2 или 3 основания.

[0052]

Антисмысловой олигомер согласно изобретению обладает активностью, обеспечивающей одновременный пропуск любых двух или более следующих друг за другом экзонов, выбранных из группы, состоящей из экзонов с 45-го по 55-й в пре-мРНК дистрофина человека. Используемый здесь термин «пропуск двух или более следующих друг за другом экзонов и 3 представляющей интерес пре-мРНК» означает «пропуск нескольких экзонов» или «множественный пропуск», и эта активность называется «активностью пропуска множества экзонов» или «активностью множественного пропуска».

[0053]

Используемый здесь термин «любые два или более следующих друг за другом экзонов, выбранных из группы, состоящей из экзонов с 45-го по 55-й», означает множество экзонов, число которых увеличивается один за другим для 11 экзонов от 45-го до 55-го экзона, включенных в пре-мРНК. Номер экзона означает номер, присвоенный экзонам в порядке от 5'-конца к 3'-концу, где, экзон, находящийся в самом верхнем положении пре-мРНК, определяется как первый экзон, за которым следуют второй, третий . . . и 79-й экзон из 79 экзонов, входящих в пре-мРНК дистрофина человека. Интрон имеет тот же номер, что и экзон, расположенный на его 5'-стороне. В частности, 45-й интрон фланкирован 45-м экзоном, расположенным на его 5'-стороне, и 46-м экзоном, расположенным на 3'-стороне. Используемый здесь термин «n-й» экзон или интрон означает n-й экзон или интрон, если считать от 5'-конца до 3'-конца в пре-мРНК.

[0054]

В Таблице 4 показаны комбинации экзонов, включенных в любые два или более следующих друг за другом экзонов, выбранных из группы, состоящей из экзона с 45-го по 55-й.

[0055]

[Таблица 4]

Комбинация_	Включенные экзоны	Комбинация	Включенные экзоны
Комбинация 1	45, 46	Комбинация 29	48-50
Комбинация 2	45-47	Комбинация 30	48-51
Комбинация 3	45-48	Комбинация 31	48-52
Комбинация 4	45-49	Комбинация 32	48-53

Комбинация 5	45-50	Комбинация 33	48-54
Комбинация 6	45-51	Комбинация 34	48-55
Комбинация 7	45-52	Комбинация 35	49, 50
Комбинация 8	45-53	Комбинация 36	49-51
Комбинация 9	45-54	Комбинация 37	49-52
Комбинация 10	45-55	Комбинация 38	49-53
Комбинация 11	46, 47	Комбинация 39	49-54
Комбинация 12	46-48	Комбинация 40	49-55
Комбинация 13	46-49	Комбинация 41	50, 51
Комбинация 14	46-50	Комбинация 42	50-52
Комбинация 15	46-51	Комбинация 43	50-53
Комбинация 16	46-52	Комбинация 44	50-54
Комбинация 17	46-53	Комбинация 45	50-55
Комбинация 18	46-54	Комбинация 46	51, 52
Комбинация 19	46-55	Комбинация 47	51-53
Комбинация 20	47, 48	Комбинация 48	51-54
Комбинация 21	47-49	Комбинация 49	51-55
Комбинация 22	47-50	Комбинация 50	52, 53
Комбинация 23	47-51	Комбинация 51	52-54
Комбинация 24	47-52	Комбинация 52	52-55
Комбинация 25	47-53	Комбинация 53	53, 54
Комбинация 26	47-54	Комбинация 54	53-55
Комбинация 27	47-55	Комбинация 55	54, 55
Комбинация 28	48, 49		

[0056]

Среди комбинаций экзонов, описанных в Таблице 4, например, комбинации 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 18, 20, 21, 23, 25, 27, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 41, 43, 45, 46, 50, 52 или 55 представляют собой схему пропуска, которая, как ожидается, будет оказывать более сильное терапевтическое воздействие на МДЦ. Предполагается, что пропуск нескольких экзонов в такой комбинации будет оказывать терапевтический эффект у большинства пациентов с МДЦ.

[0057]

Любые два или более следующих друг за другом экзона, выбранных из группы, состоящей из экзонов с 45-го по 55-й, могут включать множество групп последовательно

расположенных экзонов и могут представлять собой, например, но не ограничиваются ими, (Пример 1) экзоны 45 и 46 (первая группа экзонов) и экзоны с 48 по 53 (вторая группа экзонов), или (Пример 2) экзоны 46 и 47 (первая группа экзонов), экзоны 49 и 50 (вторая группа экзонов) и экзоны с 52 по 54 (третья группа экзонов).

[0058]

В настоящем изобретении, термин «активность, вызывающая пропуск» (то есть, активность множественного пропуска) означает, если взять в качестве примера пре-мРНК дистрофина человека, активность продуцирования мРНК дистрофина человека, имеющей делецию любых двух или более последовательно расположенных экзонов, выбранных из группы, состоящей из экзонов с 45-го по 55-го в пре-мРНК дистрофина человека.

Другими словами, эта активность означает, что при связывании антисмыслового олигомера согласно изобретению с сайтом-мишенью в пре-мРНК дистрофина человека, 5'-концевой нуклеотид экзона, находящийся непосредственно ниже удаляемых экзонов, связывается с 3'-концевым нуклеотидом экзона, находящегося непосредственно перед делетируемыми экзонами, если пре-мРНК подвергается сплайсингу, что приводит к образованию зрелой мРНК без сдвига рамки считывания кодона (то есть, зрелой мРНК с делецией экзонов без сдвига рамки считывания).

[0059]

Антисмысловый олигомер согласно изобретению обладает активностью множественного пропуска в физиологических условиях. Термин «в физиологических условиях» относится к условиям, имитирующим среду *in vivo* в отношении pH, солевого состава и температуры. Такими условиями являются, например, температура от 25 до 40°C, предпочтительно 37°C, pH от 5 до 8, предпочтительно pH 7,4 и концентрация хлорида натрия 150 мМ. Если индуцируется множественный пропуск, то один или более, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 антисмысловых олигомеров могут быть использованы в комбинации в качестве антисмыслового олигомера согласно изобретению.

[0060]

Наличие множественного пропуска или его отсутствие может быть подтверждено путем введения антисмыслового олигомера согласно изобретению в клетку, экспрессирующую дистрофин (например, в клетки рабдомиосаркомы человека), амплификации области, окружающей экзоны 45-55 мРНК гена дистрофина человека из общей РНК в дистрофин-экспрессирующей клетке с помощью ОТ-ПЦР и проведения гнездовой ПЦР или анализа последовательности амплифицированного продукта ПЦР. Эффективность множественного пропуска может быть определена следующим образом. мРНК гена дистрофина человека собирают из тестируемых клеток, а затем в мРНК определяют количество полинуклеотидов «А» полосы, в которой пропущены любые два или более следующих друг за другом экзонов среди экзонов с 45 по 55, количество полинуклеотидов «В» полосы, в которой пропущен любой один экзон среди экзонов с 45 по 55, и количество полинуклеотидов «С» полосы, в которой пропуск отсутствует. Эффективность вычисляют с использованием измеренных величин «А», «В» и «С» по

следующему уравнению:

$$\text{Эффективность пропуска (\%)} = A / (A + B + C) \times 100$$

[0061]

Так, например, эффективность множественного пропуска экзонов с 45 по 55 может быть определена с использованием прямого праймера для экзона 44 и обратного праймера для экзона 56, для оценки количества полинуклеотидов «А» полосы, в которой пропущены множество экзонов с 45 по 55; с использованием прямого праймера для экзона 44 и обратного праймера для экзона 46, для оценки количества полинуклеотидов «В» полосы, в которой пропущен один экзон 45, и с использованием прямого праймера для экзона 44 и обратного праймера для экзона 46, для оценки количества полинуклеотидов «С» полосы, в которой пропуск отсутствует, с последующим вычислением по уравнению с использованием этих измеренных величин «А», «В» и «С».

[0062]

Количество экзонов, подлежащих делеции в мРНК дистрофина человека посредством антисмыслового олигомера согласно изобретению, составляет 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11. Такая делеция представляет собой тип делеции, при которой различные паттерны делеции могут присутствовать в смеси, полученной в одном эксперименте по пропуску или полученной путем обработки с пропуском. Так, например, смесь мРНК с делецией 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 экзонов получают путем введения антисмыслового олигомера согласно изобретению в клетки, экспрессирующие пре-мРНК дистрофина человека, и сбора такой мРНК.

[0063]

В определенном варианте осуществления изобретения, термин «активность, вызывающая пропуск», может быть определен ниже как (C1)-(C10).

[0064]

(C1) Любые два следующих друг за другом экзона, выбранные из группы, состоящей из экзонов с 45-го по 55-й в пре-мРНК дистрофина человека, пропускают с эффективностью 5% или выше, 10% или выше, 15% или выше, 20% или выше, 25% или выше, 30% или выше, 35% или выше, 40% или выше, 45% или выше, 50% или выше, 55% или выше, 60% или выше, 65% или выше, 70% или выше, 75% или выше, 80% или выше, 85% или выше, 90% и выше или 95% или выше.

В данном случае, два следующих друг за другом экзона могут быть 45-м и 46-м экзонам, 46-м и 47-м экзонам, 47-м и 48-м экзонам, 48-м и 49-м экзонам, 49-м и 50-м экзонам, 50-м и 51-м экзонам, 51-м и 52-м экзонам, 52-м и 53-м экзонам, 53-м и 54-м экзонам или 54-м и 55-м экзонам.

[0065]

(C2) Любые три следующих друг за другом экзона, выбранные из группы, состоящей из экзонов с 45-го по 55-й в пре-мРНК дистрофина человека, пропускают с эффективностью 5% или выше, 10% или выше, 15% или выше, 20% или выше, 25% или выше, 30% или выше, 35% или выше, 40% или выше, 45% или выше, 50% или выше, 55% или выше, 60% или

выше, 65% или выше, 70% или выше, 75% или выше, 80% или выше, 85% или выше, 90% или выше или 95% или выше.

В данном случае, три следующих друг за другом экзона могут представлять собой экзоны с 45-го по 47-й, экзоны с 46-го по 48-й, экзоны с 47-го по 49-й, экзоны с 48-го по 50-й, экзоны с 49-го по 51-й, экзоны с 50-го по 52-й, экзоны с 51-го по 53-й, экзоны с 52-го по 54-й или экзоны с 53-го по 55-й.

[0066]

(С3) Любые четыре следующих друг за другом экзона, выбранные из группы, состоящей из экзонов с 45-го по 55-й в пре-мРНК дистрофина человека, пропускают с эффективностью 5% или выше, 10% или выше, 15% или выше, 20% или выше, 25% или выше, 30% или выше, 35% или выше, 40% или выше, 45% или выше, 50% или выше, 55% или выше, 60% или выше, 65% или выше, 70% или выше, 75% или выше, 80% или выше, 85% или выше, 90% или выше или 95% или выше.

В данном случае, четыре следующих друг за другом экзона могут представлять собой экзоны с 45-го по 48-й, экзоны с 46-го по 49-й, экзоны с 47-го по 50-й, экзоны с 48-го по 51-й, экзоны с 49-го по 52-й, экзоны с 50-го по 53-й, экзоны с 51-го по 54-й или экзоны с 52-го по 55-й.

[0067]

(С4) Любые пять следующих друг за другом экзона, выбранных из группы, состоящей из экзонов с 45-го по 55-й в пре-мРНК дистрофина человека, пропускают с эффективностью 5% или выше, 10% или выше, 15% или выше, 20% или выше, 25% или выше, 30% или выше, 35% или выше, 40% или выше, 45% или выше, 50% или выше, 55% или выше, 60% или выше, 65% или выше, 70% или выше, 75% или выше, 80% или выше, 85% или выше, 90% или выше или 95% или выше.

В данном случае, пять следующих друг за другом экзонов могут представлять собой экзоны с 45-го по 49-й, экзоны с 46-го по 50-й, экзоны с 47-го по 51-й, экзоны с 48-го по 52-й, экзоны с 49-го по 53-й, экзоны с 50-го по 54-й или экзоны с 51-го по 55-й.

[0068]

(С5) Любые шесть следующих друг за другом экзонов, выбранных из группы, состоящей из экзонов с 45-го по 55-й в пре-мРНК дистрофина человека, пропускают с эффективностью 5% или выше, 10% или выше, 15% или выше, 20% или выше, 25% или выше, 30% или выше, 35% или выше, 40% или выше, 45% или выше, 50% или выше, 55% или выше, 60% или выше, 65% или выше, 70% или выше, 75% или выше, 80% или выше, 85% или выше, 90% или выше или 95% или выше.

В данном случае, шесть следующих друг за другом экзонов могут представлять собой экзоны с 45-го по 50-й, экзоны с 46-го по 51-й, экзоны с 47-го по 52-й, экзоны с 48-го по 53-й, экзоны с 49-го по 54-й, или экзоны с 50-го по 55-й.

[0069]

(С6) Любые семь следующих друг за другом экзонов, выбранные из группы, состоящей из экзонов с 45-го по 55-й в пре-мРНК дистрофина человека, пропускают с

эффективностью 5% или выше, 10% или выше, 15% или выше, 20% или выше, 25% или выше, 30% или выше, 35% или выше, 40% или выше, 45% или выше, 50% или выше, 55% или выше, 60% или выше, 65% или выше, 70% или выше, 75% или выше, 80% или выше, 85% или выше, 90% или выше или 95% или выше.

В данном случае, семь следующих друг за другом экзонов могут представлять собой экзоны с 45-го по 51-й, экзоны с 46-го по 52-й, экзоны с 47-го по 53-й, экзоны с 48-го по 54-й, или экзоны с 49-го по 55-й.

[0070]

(С7) Любые восемь следующих друг за другом экзонов, выбранных из группы, состоящей из экзонов с 45-го по 55-й в пре-мРНК дистрофина человека, пропускают с эффективностью 5% или выше, 10% или выше, 15% или выше, 20% или выше, 25% или выше, 30% или выше, 35% или выше, 40% или выше, 45% или выше, 50% или выше, 55% или выше, 60% или выше, 65% или выше, 70% или выше, 75% или выше, 80% или выше, 85% или выше, 90% или выше или 95% или выше.

В данном случае, восемь следующих друг за другом экзонов могут представлять собой экзоны с 45-го по 52-й, экзоны с 46-го по 53-й, экзоны с 47-го по 54-й или экзоны с 48-го по 55-й.

[0071]

(С8) Любые девять следующих друг за другом экзонов, выбранных из группы, состоящей из экзонов с 45-го по 55-й в пре-мРНК дистрофина человека, пропускают с эффективностью 5% или выше, 10% или выше, 15% или выше, 20% или выше, 25% или выше, 30% или выше, 35% или выше, 40% или выше, 45% или выше, 50% или выше, 55% или выше, 60% или выше, 65% или выше, 70% или выше, 75% или выше, 80% или выше, 85% или выше, 90% или выше или 95% или выше.

В данном случае, девять следующих друг за другом экзонов могут представлять собой экзоны с 45-го по 53-й, экзоны с 46-го по 54-й или экзоны с 47-го по 55-й.

[0072]

(С9) Любые десять следующих друг за другом экзонов, выбранных из группы, состоящей из экзонов с 45-го по 55-й в пре-мРНК дистрофина человека, пропускают с эффективностью 5% или выше, 10% или выше, 15% или выше, 20% или выше, 25% или выше, 30% или выше, 35% или выше, 40% или выше, 45% или выше, 50% или выше, 55% или выше, 60% или выше, 65% или выше, 70% или выше, 75% или выше, 80% или выше, 85% или выше, 90% или выше или 95% или выше.

В данном случае, десять следующих друг за другом экзонов могут представлять собой экзоны с 45-го по 54-й или экзоны с 46-го по 55-й.

[0073]

(С10) Одиннадцать следующих друг за другом экзонов, выбранных из группы, состоящей из экзонов с 45-го по 55-й в пре-мРНК дистрофина человека, пропускают с эффективностью 5% или выше, 10% или выше, 15% или выше, 20% или выше, 25% или выше, 30% или выше, 35% или выше, 40% или выше, 45% или выше, 50% или выше, 55%

или выше, 60% или выше, 65% или выше, 70% или выше, 75% или выше, 80% или выше, 85% или выше, 90% или выше или 95% или выше.

В данном случае, одиннадцать следующих друг за другом экзонов могут представлять собой экзоны с 45-го по 55-й.

[0074]

Антисмысловой олигомер согласно изобретению может иметь длину 10-60 оснований, 10-55 оснований, 10-50 оснований, 10-45 оснований, 10-40 оснований, 10-35 оснований, 10-30 оснований, 10-25 оснований, 15-60 оснований, 15-55 оснований, 15-50 оснований, 15-45 оснований, 15-40 оснований, 15-35 оснований, 15-30 оснований, 15-25 оснований, 16-60 оснований, 16-55 оснований, 16-50 оснований, 16-45 оснований, 16-40 оснований, 16-35 оснований, 16-30 оснований, 16-25 оснований, 17-60 оснований, 17-55 оснований, 17-50 оснований, 17-45 оснований, 17-40 оснований, 17-35 оснований, 17-30 оснований, 17-25 оснований, 18-60 оснований, 18-55 оснований, 18-50 оснований, 18-45 оснований, 18-40 оснований, 18-35 оснований, 18-30 оснований, 18-25 оснований, 19-60 оснований, 19-55 оснований, 19-50 оснований, 19-45 оснований, 19-40 оснований, 19-35 оснований, 19-30 оснований, 19-25 оснований, 20-60 оснований, 20-55 оснований, 20-50 оснований, 20-45 оснований, 20-40 оснований, 20-35 оснований, 20-30 оснований, 20-25 оснований, 15-30 оснований, 15-29 оснований, 15-28 оснований, 15-27 оснований, 15-26 оснований, 15-25 оснований, 15-24 оснований, 15-23 оснований, 15-22 оснований, 15-21 основания, 15-20 оснований, 15-19 оснований, 15-18 оснований, 16-30 оснований, 16-29 оснований, 16-28 оснований, 16-27 оснований, 16-26 оснований, 16-25 оснований, 16-24 оснований, 16-23 оснований, 16-22 оснований, 16-21 основание, 16-20 оснований, 16-19 оснований, 16-18 оснований, 17-30 оснований, 17-29 оснований, 17-28 оснований, 17-27 оснований, 17-26 оснований, 17-25 оснований, 17-24 оснований, 17-23 оснований, 17-22 оснований, 17-21 основания, 17-20 оснований, 17-19 оснований, 17-18 оснований, 18-30 оснований, 18-29 оснований, 18-28 оснований, 18-27 оснований, 18-26 оснований, 18-25 оснований, 18-24 оснований, 18-23 оснований, 18-22 оснований, 18-21 основания, 18-20 оснований, 18-19 оснований, 19-30 оснований, 19-29 оснований, 19-28 оснований, 19-27 оснований, 19-26 оснований, 19-25 оснований, 19-24 оснований, 19-23 оснований, 19-22 оснований, 19-21 основания, 19-20 оснований, 20-30 оснований, 20-29 оснований, 20-28 оснований, 20-27 оснований, 20-26 оснований, 20-25 оснований, 20-24 оснований, 20-23 оснований, 20-22 оснований, 20-21 основания, 60 оснований, 59 оснований, 58 оснований, 57 оснований, 56 оснований, 55 оснований, 54 основания, 53 основания, 52 основания, 51 основания, 50 оснований, 49 оснований, 48 оснований, 47 оснований, 46 оснований, 45 оснований, 44 основания, 43 основания, 42 основания, 41 основание, 40 оснований, 39 оснований, 38 оснований, 37 оснований, 36 оснований, 35 оснований, 34 основания, 33 основания, 32 основания, 31 основание 30 оснований, 29 оснований, 28 оснований, 27 оснований, 26 оснований, 25 оснований, 24 основания, 23 основания, 22 основания, 21 основание, 20 оснований, 19 оснований, 18 оснований, 17 оснований, 16 оснований, 15 оснований, 14 оснований, 13 оснований, 12 оснований, 11 оснований или 10 оснований, но

указанная длина не имеет ограничений. Эти длины могут быть увеличены или уменьшены на 1, 2 или 3 основания.

[0075]

Один из вариантов антисмыслового олигомера согласно изобретению представляет собой связанный антисмысловой олигомер, сконструированный так, чтобы он содержал множество связанных друг с другом олигомерных звеньев, его фармацевтически приемлемую соль или его гидрат (далее называемые «связанным антисмысловым олигомером» согласно изобретению). Термин «олигомерные звенья» означает соответствующие олигомеры, составляющие связанный антисмысловой олигомер согласно изобретению. В частности, термин «олигомерные звенья» означает фрагменты (звенья), содержащие последовательности оснований, которые гибридизуются с последовательностями-мишенями оснований, содержащими следующие друг за другом основания, если связанный антисмысловой олигомер согласно изобретению связывается с последовательностями-мишенями оснований в пре-мРНК дистрофина человека.

[0076]

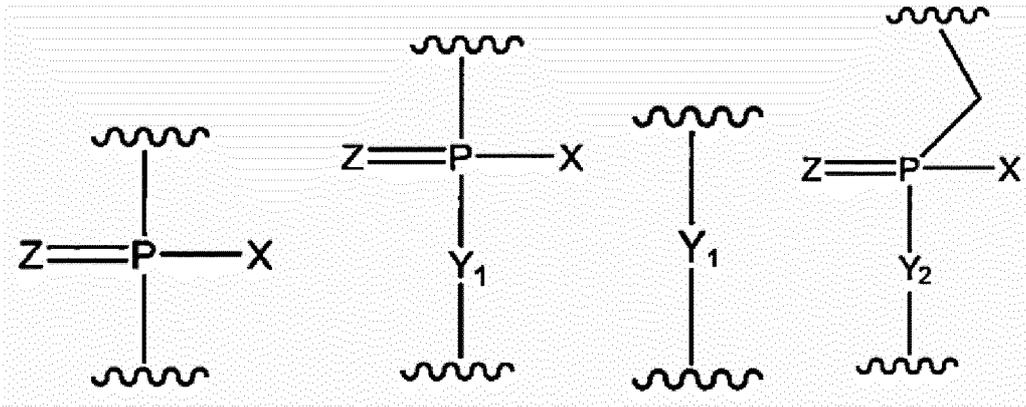
В частности, связанный антисмысловой олигомер согласно изобретению представляет собой антисмысловой олигомер, содержащий два или более олигомерных звеньев, связанных друг с другом, или его фармацевтически приемлемую соль, или его гидрат, где:

каждое из олигомерных звеньев содержит последовательность оснований, комплементарную последовательности оснований любой области, выбранной из группы, состоящей из областей R1-R24 (которые могут включать области дикого типа, представленные SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389 и их мутантные типы), или их неполную последовательность оснований, и соответствующие последовательности оснований олигомерных звеньев не являются смежными и не перекрываются друг с другом.

[0077]

Олигомерные звенья могут быть связаны посредством линкера, который не способствует гибридизации, либо они могут быть связаны напрямую без линкера. Если олигомерные звенья связаны непосредственно друг с другом, то 3'-конец звена, расположенный на 5'-стороне, и 5'-конец звена, расположенный на 3'-стороне, образуют фосфатную связь или любую из следующих групп.

[Формула 3]



где X представляет собой  $-\text{OH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{R}^1$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_2\text{R}^1$ ,  $-\text{S}-\text{CH}_2\text{R}^1$ ,  $-\text{NR}^2\text{R}^3$  или F;

$\text{R}^1$  представляет собой H или алкил;

$\text{R}^2$  и  $\text{R}^3$  могут быть одинаковыми или различными, и каждый из них представляет собой H, алкил, циклоалкил или арил;

$\text{Y}_1$  представляет собой O, S,  $\text{CH}_2$  или  $\text{NR}^1$ ;

$\text{Y}_2$  представляет собой O, S или  $\text{NR}^1$ ;

Z представляет собой O или S.

[0078]

В связанном антисмысловом олигомере согласно изобретению, олигомерные звенья могут быть соответственно нацелены на последовательности оснований, включенные в отдельные области среди областей R1-R24, либо они могут быть соответственно нацелены на последовательности-мишени оснований, включенные в одну и ту же область. В связанном антисмысловом олигомере согласно изобретению, соответствующие последовательности оснований олигомерных звеньев не являются смежными и не перекрываются друг с другом. Соответствующие последовательности оснований олигомерных звеньев, которые не являются смежными, представляют собой соответствующие последовательности оснований-мишеней олигомерных звеньев, составляющих связанный антисмысловый олигомер согласно изобретению и не являющихся смежными, как последовательности оснований в пре-мРНК дистрофина человека. Таким образом, если соответствующие последовательности-мишени оснований олигомерных звеньев сравнивают с последовательностью оснований пре-мРНК дистрофина человека, то по меньшей мере одно основание встраивается между последовательностями-мишенями оснований в качестве последовательности оснований в пре-мРНК дистрофина человека. С другой стороны, соответствующие последовательности оснований олигомерных звеньев, которые не перекрываются друг с другом, представляют собой соответствующие последовательности-мишени оснований олигомерных звеньев, которые не перекрываются друг с другом в пре-мРНК дистрофина человека. При этом, допускается случайное присутствие спаренных приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 оснований между соответствующими последовательностями оснований олигомерных звеньев.

[0079]

Связанный антисмысловой олигомер согласно изобретению может быть сконструирован так, чтобы каждое олигомерное звено содержало последовательность оснований, комплементарную

(D1) любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389,

(D2) последовательности оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(D3) последовательности оснований, которая гибридизуется в жестких условиях с последовательностью оснований, комплементарной любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389, или

(D4) неполной последовательности оснований любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из последовательностей оснований (D1), (D2) и (D3), где соответствующие последовательности оснований олигомерных звеньев не являются смежными и не перекрываются друг с другом.

[0080]

Связанный антисмысловой олигомер согласно изобретению может содержать, как описано выше, последовательность оснований, комплементарную любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из (D1), (D2), (D3) и (D4). Последовательность оснований (D2) представляет собой мутант последовательности оснований (D1), и ее примерами также являются:

(D2-1) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой одной последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(D2-2) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 86% идентична любой одной последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389, и имеет длину в пределах  $\pm 14\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(D2-3) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 87% идентична любой одной последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389, и имеет длину в пределах  $\pm 13\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(D2-4) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 88% идентична любой одной последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389, и имеет длину в пределах  $\pm 12\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(D2-5) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 89% идентична



любой одной последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389, и имеет длину в пределах  $\pm 1\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований, и

(D2-16) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 99,5% идентична любой одной последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389, и имеет длину в пределах  $\pm 0,5\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований.

[0081]

Таким образом, каждый из олигомерных звеньев, составляющих связанный антисмысловый олигомер согласно изобретению, может содержать последовательность оснований, комплементарную любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из последовательностей оснований (D1), (D2-1)-(D2-16), (D3) и (D4).

[0082]

Связанный антисмысловый олигомер согласно изобретению может содержать, как описано выше, последовательность оснований, комплементарную любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из (D1), (D2), (D3) и (D4). Последовательность оснований (D4) относится к неполной последовательности оснований любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из последовательностей оснований (D1), (D2) и (D3). Что касается (D4), то термин «неполный» означает неполную область следующих друг за другом оснований, за исключением полноразмерной последовательности, (D1), (D2) или (D3). Неполная область может иметь длину, которая составляет, но не ограничивается ими, 5-25 оснований, 5-24 оснований, 5-23 оснований, 5-22 оснований, 5-21 оснований, 5-20 оснований, 5-19 оснований, 5-18 оснований, 5-17 оснований, 5-16 оснований, 5-15 оснований, 5-14 оснований, 5-13 оснований, 5-12 оснований, длина 7-25 оснований, 7-24 основания, 7-23 оснований, 7-22 оснований, 7-21 основания, 7-20 оснований, 7-19 оснований, 7-18 оснований, 7-17 оснований, 7-16 оснований, 7-15 оснований, 7-14 оснований, 7-13 оснований, 7-12 оснований, 9-25 оснований, 9-24 оснований, 9-23 оснований, 9-22 оснований, 9-21 основание, 9-20 оснований, 9-19 оснований, 9-18 оснований, 9-17 оснований, 9-16 оснований, 9-15 оснований, 9-14 оснований, 9-13 оснований, 9-12 оснований, 10-25 оснований, 10-24 оснований, 10-23 оснований, 10-22 оснований, 10-21 основания, 10-20 оснований, 10-19 оснований, 10-18 оснований, 10-17 оснований, 10-16 оснований, 10-15 оснований, 10-14 оснований, 10-13 оснований, 10-12 оснований, 25 оснований, 24 основания, 23 основания, 22 основания, 21 основание, 20 оснований, 19 оснований, 18 оснований, 17 оснований, 16 оснований, 15 оснований, 14 оснований, 13 оснований, 12 оснований, 11 оснований, 10 оснований, 9 оснований, 8 оснований, 7 оснований, 6 оснований или 5 оснований. Эти длины могут быть увеличены или уменьшены на 1, 2 или 3 основания.

[0083]

Размер каждого олигомерного звена может составлять, но не ограничивается ими, 5-

30 оснований, 5-29 оснований, 5-28 оснований, 5-27 оснований, 5-26 оснований, 5-25 оснований, 5-24 оснований, 5-23 оснований, 5-22 оснований, 5-21 основания, 5-20 оснований, 5-19 оснований, 5-18 оснований, 5-17 оснований, 5-16 оснований, 5-15 оснований, 5-14 оснований, 5-13 оснований, 5-12 оснований, 7-30 оснований, 7-29 оснований, 7-28 оснований, 7-27 оснований, 7-26 оснований, 7-25 оснований, 7-24 оснований, 7-23 оснований, 7-22 оснований, 7-21 основания, 7-20 оснований, 7-19 оснований, 7-18 оснований, 7-17 оснований, 7-16 оснований, 7-15 оснований, 7-14 оснований, 7-13 оснований, 7-12 оснований, 9-30 оснований, 9-29 оснований, 9-28 оснований, 9-27 оснований, 9-26 оснований, 9-25 оснований, 9-24 оснований, 9-23 оснований, 9-22 оснований, 9-21 основания, 9-20 оснований, 9-19 оснований, 9-18 оснований, 9-17 оснований, 9-16 оснований, 9-15 оснований, 9-14 оснований, 9-13 оснований, 9-12 оснований, 10-30 оснований, 10-29 оснований, 10-28 оснований, 10-27 оснований, 10-26 оснований, 10-25 оснований, 10-24 оснований, 10-23 оснований, 10-22 оснований, 10-21 оснований, 10-20 оснований, 10-19 оснований, 10-18 оснований, 10-17 оснований, 10-16 оснований, 10-15 оснований, 10-14 оснований, 10-13 оснований, 10-12 оснований, 30 оснований, 29 оснований, 28 оснований, 27 оснований, 26 оснований, 25 оснований, 24 основания, 23 основания, 22 основания, 21 основание, 20 оснований, 19 оснований, 18 оснований, 17 оснований, 16 оснований, 15 оснований, 14 оснований, 13 оснований, 12 оснований, 11 оснований, 10 оснований, 9 оснований, 8 оснований, 7 оснований, 6 оснований, 5 оснований. Эти длины могут быть увеличены или уменьшены на 1, 2 или 3 основания. Олигомерные звенья могут иметь одинаковые или разные размеры.

[0084]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, связанный антисмысловой олигомер согласно изобретению может представлять собой антисмысловой олигомер, состоящий из:

(E1) любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-21, 80-111 и 225-232, или

(E2) последовательности оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-21, 80-111 и 225-232, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований, или

его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

[0085]

В данном случае, последовательность оснований (E2) представляет собой последовательность оснований мутантного типа (E1), и примерами таких мутантов также являются:

(E2-1) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой одной последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-21, 80-111 и 225-232, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,



(E2-12) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 96% идентична любой одной последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-21, 80-111 и 225-232, и имеет длину в пределах  $\pm 4\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(E2-13) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 97% идентична любой одной последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-21, 80-111 и 225-232, и имеет длину в пределах  $\pm 3\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(E2-14) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 98% идентична любой одной последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-21, 80-111 и 225-232, и имеет длину в пределах  $\pm 2\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(E2-15) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 99% идентична любой одной последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-21, 80-111 и 225-232, и имеет длину в пределах  $\pm 1\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований, и

(E2-16) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 99,5% идентична любой одной последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-21, 80-111 и 225-232, и имеет длину в пределах  $\pm 0,5\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований.

[0086]

Таким образом, связанный антисмысловой олигомер согласно изобретению может состоять из любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из последовательностей оснований (E1) и (E2-1)-(E2-16).

[0087]

Предпочтительно, связанный антисмысловой олигомер согласно изобретению содержит любую одну последовательность оснований, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-21, 80-111 и 225-232. В определенном варианте осуществления изобретения, связанный антисмысловой олигомер согласно изобретению состоит из любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-21, 80-111 и 225-232.

[0088]

Кроме того, антисмысловой олигомер согласно изобретению может представлять собой антисмысловой олигомер, состоящий из:

(E'1) любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-111, 113-177, 179, 180, 182, 183, 185-193, 195-198, 200-223 и 225-232 или

(E'2) последовательности оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-111, 113-177, 179, 180, 182, 183, 185-193, 195-198, 200-223 и 225-232, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований, или

его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

[0089]

В данном случае, последовательность оснований (E'2) представляет с о б о й последовательность оснований мутантного типа (E'1), и примерами таких мутантов также являются:

(E'2-1) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-111, 113-177, 179, 180, 182, 183, 185-193, 195-198, 200-223 и 225-232, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(E'2-2) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 86% идентична любой последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-111, 113-177, 179, 180, 182, 183, 185-193, 195-198, 200-223 и 225-232, и имеет длину в пределах  $\pm 14\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(E'2-3) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 87% идентична любой последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-111, 113-177, 179, 180, 182, 183, 185-193, 195-198, 200-223 и 225-232, и имеет длину в пределах  $\pm 13\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(E'2-4) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 88% идентична любой последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-111, 113-177, 179, 180, 182, 183, 185-193, 195-198, 200-223 и 225-232, и имеет длину в пределах  $\pm 12\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(E'2-5) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 89% идентична любой последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-111, 113-177, 179, 180, 182, 183, 185-193, 195-198, 200-223 и 225-232, и имеет длину в пределах  $\pm 11\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(E'2-6) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 90% идентична любой последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-111, 113-177, 179, 180, 182, 183, 185-193, 195-198, 200-223 и 225-232, и имеет длину в пределах  $\pm 10\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(E'2-7) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 91% идентична любой последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-111, 113-177, 179, 180, 182, 183, 185-193, 195-198, 200-223 и 225-232, и имеет длину в пределах  $\pm 9\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(E'2-8) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 92% идентична любой последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-111, 113-177, 179, 180, 182, 183, 185-193, 195-198, 200-223 и 225-232, и имеет длину в пределах  $\pm 8\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(E'2-9) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 93% идентична любой последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-111, 113-177, 179, 180, 182, 183, 185-193, 195-198, 200-223 и 225-232, и имеет длину в

пределах  $\pm 7\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(E'2-10) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 94% идентична любой последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-111, 113-177, 179, 180, 182, 183, 185-193, 195-198, 200-223 и 225-232, и имеет длину в пределах  $\pm 6\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(E'2-11) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 95% идентична любой последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-111, 113-177, 179, 180, 182, 183, 185-193, 195-198, 200-223 и 225-232, и имеет длину в пределах  $\pm 5\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(E'2-12) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 96% идентична любой последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-111, 113-177, 179, 180, 182, 183, 185-193, 195-198, 200-223 и 225-232, и имеет длину в пределах  $\pm 4\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(E'2-13) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 97% идентична любой последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-111, 113-177, 179, 180, 182, 183, 185-193, 195-198, 200-223 и 225-232, и имеет длину в пределах  $\pm 3\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(E'2-14) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 98% идентична любой последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-111, 113-177, 179, 180, 182, 183, 185-193, 195-198, 200-223 и 225-232, и имеет длину в пределах  $\pm 2\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(E'2-15) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 99% идентична любой последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-111, 113-177, 179, 180, 182, 183, 185-193, 195-198, 200-223 и 225-232, и имеет длину в пределах  $\pm 1\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований, и

(E'2-16) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 99,5% идентична любой последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-111, 113-177, 179, 180, 182, 183, 185-193, 195-198, 200-223 и 225-232, и имеет длину в пределах  $\pm 0,5\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований.

[0090]

Таким образом, антисмысловой олигомер согласно изобретению может состоять из любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из последовательностей оснований (E'1) и (E'2-1)-(E'2-16).

[0091]

Предпочтительно, антисмысловой олигомер согласно изобретению содержит любую одну последовательность оснований, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-111, 113-177, 179, 180, 182, 183, 185-193, 195-198, 200-223 и 225-232. В определенном варианте осуществления изобретения, антисмысловой олигомер согласно изобретению состоит из любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-111, 113-177, 179, 180, 182, 183, 185-193, 195-198, 200-223 и 225-232.

[0092]

В определенном варианте осуществления изобретения, антисмысловой олигомер согласно изобретению может представлять собой антисмысловой олигомер, состоящий из:

(E"1) любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 26, 27, 28, 29, 35, 38, 39, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 58, 59, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 80, 82, 86, 92, 97, 98, 100, 102, 113, 119, 121, 122, 124, 125, 126, 128, 130, 131, 132, 139, 142, 144, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 225, 228, 231 и 232 или

(E"2) последовательности оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой одной последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 26, 27, 28, 29, 35, 38, 39, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 58, 59, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 80, 82, 86, 92, 97, 98, 100, 102, 113, 119, 121, 122, 124, 125, 126, 128, 130, 131, 132, 139, 142, 144, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 225, 228, 231 и 232, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

[0093]

В данном случае, последовательность (E"2) представляет собой последовательность оснований мутантного типа (E"1), и примерами таких мутантов также являются:

(E"2-1) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 26, 27, 28, 29, 35, 38, 39, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 58, 59, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 80, 82, 86, 92, 97, 98, 100, 102, 113, 119, 121, 122, 124, 125, 126, 128, 130, 131, 132, 139, 142, 144, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 225, 228, 231 и 232, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(E"2-2) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 86% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 26, 27, 28, 29, 35, 38, 39, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 58, 59, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 80, 82, 86, 92, 97, 98, 100, 102, 113, 119, 121, 122, 124, 125, 126, 128, 130, 131, 132, 139, 142, 144, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 225, 228, 231 и 232, и имеет длину в пределах  $\pm 14\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(E"2-3) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 87% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 26, 27, 28, 29, 35, 38, 39, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 58, 59, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 80, 82, 86, 92, 97, 98, 100, 102, 113, 119, 121, 122, 124, 125, 126, 128, 130, 131, 132, 139, 142, 144, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 225, 228, 231 и 232, и имеет длину в пределах  $\pm 13\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(E"2-4) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 88% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 26, 27, 28, 29, 35, 38, 39, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 58, 59, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 80, 82, 86, 92, 97, 98, 100, 102, 113, 119, 121, 122, 124, 125, 126, 128, 130, 131, 132, 139, 142, 144, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 225, 228, 231 и 232, и имеет длину в пределах  $\pm 12\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(E"2-5) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 89% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 26, 27, 28, 29, 35, 38, 39, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 58, 59, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 80, 82, 86, 92, 97, 98, 100, 102, 113, 119, 121, 122, 124, 125, 126, 128, 130, 131, 132, 139, 142, 144, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 225, 228, 231 и 232, и имеет длину в пределах  $\pm 11\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(E"2-6) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 90% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 26, 27, 28, 29, 35, 38, 39, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 58, 59, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 80, 82, 86, 92, 97, 98, 100, 102, 113, 119, 121, 122, 124, 125, 126, 128, 130, 131, 132, 139, 142, 144, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 225, 228, 231 и 232, и имеет длину в пределах  $\pm 10\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(E"2-7) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 91% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 26, 27, 28, 29, 35, 38, 39, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 58, 59, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 80, 82, 86, 92, 97, 98, 100, 102, 113, 119, 121, 122, 124, 125, 126, 128, 130, 131, 132, 139, 142, 144, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 225, 228, 231 и 232, и имеет длину в пределах  $\pm 9\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(E"2-8) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 92% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 26, 27, 28, 29, 35, 38, 39, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 58, 59, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 80, 82, 86, 92, 97, 98, 100, 102, 113, 119, 121, 122, 124, 125, 126, 128, 130, 131, 132, 139, 142, 144, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 225, 228, 231 и 232, и имеет длину в пределах  $\pm 8\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(E"2-9) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 93% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 26, 27, 28, 29, 35, 38, 39, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 58, 59, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 80, 82, 86, 92, 97, 98, 100, 102, 113, 119, 121, 122, 124, 125, 126, 128, 130, 131, 132, 139, 142, 144, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 154,



55, 58, 59, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 80, 82, 86, 92, 97, 98, 100, 102, 113, 119, 121, 122, 124, 125, 126, 128, 130, 131, 132, 139, 142, 144, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 225, 228, 231 и 232, и имеет длину в пределах  $\pm 1\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований, и

(E"2-16) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 99,5% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 26, 27, 28, 29, 35, 38, 39, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 58, 59, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 80, 82, 86, 92, 97, 98, 100, 102, 113, 119, 121, 122, 124, 125, 126, 128, 130, 131, 132, 139, 142, 144, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 225, 228, 231 и 232, и имеет длину в пределах  $\pm 0,5\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований.

[0094]

Таким образом, антисмысловый олигомер согласно изобретению может состоять из любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из последовательностей оснований (E"1) и (E"2-1)-(E"2-16).

[0095]

В определенном варианте осуществления изобретения, антисмысловый олигомер согласно изобретению может представлять собой антисмысловый олигомер, состоящий из:

(E"1) любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 11, 27, 28, 35, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 54, 55, 59, 63, 64, 65, 66, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 102, 113, 119, 128, 131, 132, 139, 142, 161, 162, 163, 225 и 228 или

(E"2) последовательности оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 11, 27, 28, 35, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 54, 55, 59, 63, 64, 65, 66, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 102, 113, 119, 128, 131, 132, 139, 142, 161, 162, 163, 225 и 228, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

[0096]

В данном случае, последовательность оснований (E"2) представляет собой последовательность оснований мутантного типа (E"1), и примерами таких мутантов также являются:

(E"2-1) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 11, 27, 28, 35, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 54, 55, 59, 63, 64, 65, 66, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 102, 113, 119, 128, 131, 132, 139, 142, 161, 162, 163, 225 и 228, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(E"2-2) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 86% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 11, 27, 28, 35, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 54, 55, 59, 63, 64, 65, 66, 68, 74, 75,



68, 74, 75, 76, 77, 78, 102, 113, 119, 128, 131, 132, 139, 142, 161, 162, 163, 225 и 228, и имеет длину в пределах  $\pm 6\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(E<sup>'''</sup>2-11) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 95% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 11, 27, 28, 35, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 54, 55, 59, 63, 64, 65, 66, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 102, 113, 119, 128, 131, 132, 139, 142, 161, 162, 163, 225 и 228, и имеет длину в пределах  $\pm 5\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(E<sup>'''</sup>2-12) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 96% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 11, 27, 28, 35, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 54, 55, 59, 63, 64, 65, 66, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 102, 113, 119, 128, 131, 132, 139, 142, 161, 162, 163, 225 и 228, и имеет длину в пределах  $\pm 4\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(E<sup>'''</sup>2-13) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 97% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 11, 27, 28, 35, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 54, 55, 59, 63, 64, 65, 66, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 102, 113, 119, 128, 131, 132, 139, 142, 161, 162, 163, 225 и 228, и имеет длину в пределах  $\pm 3\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(E<sup>'''</sup>2-14) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 98% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 11, 27, 28, 35, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 54, 55, 59, 63, 64, 65, 66, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 102, 113, 119, 128, 131, 132, 139, 142, 161, 162, 163, 225 и 228, и имеет длину в пределах  $\pm 2\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(E<sup>'''</sup>2-15) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 99% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 11, 27, 28, 35, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 54, 55, 59, 63, 64, 65, 66, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 102, 113, 119, 128, 131, 132, 139, 142, 161, 162, 163, 225 и 228, и имеет длину в пределах  $\pm 1\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований, и

(E<sup>'''</sup>2-16) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 99,5% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 11, 27, 28, 35, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 54, 55, 59, 63, 64, 65, 66, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 102, 113, 119, 128, 131, 132, 139, 142, 161, 162, 163, 225 и 228, и имеет длину в пределах  $\pm 0,5\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований.

[0097]

Таким образом, бессмысленный олигомер согласно изобретению может состоять из любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из последовательностей оснований (E<sup>'''</sup>1) и (E<sup>'''</sup>2-1)-(E<sup>'''</sup>2-16).

[0098]

Предпочтительно, бессмысленный олигомер согласно изобретению представляет собой бессмысленный олигомер, содержащий любую одну последовательность оснований, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 26, 27, 28, 29, 35,

38, 39, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 58, 59, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 80, 82, 86, 92, 97, 98, 100, 102, 113, 119, 121, 122, 124, 125, 126, 128, 130, 131, 132, 139, 142, 144, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 225, 228, 231 и 232, или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антисмысловой олигомер согласно изобретению представляет собой антисмысловой олигомер, состоящий из любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 26, 27, 28, 29, 35, 38, 39, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 58, 59, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 80, 82, 86, 92, 97, 98, 100, 102, 113, 119, 121, 122, 124, 125, 126, 128, 130, 131, 132, 139, 142, 144, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 225, 228, 231 и 232, или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

[0099]

Более предпочтительно, антисмысловой олигомер согласно изобретению представляет собой антисмысловой олигомер, содержащий любую одну последовательность оснований, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 11, 27, 28, 35, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 54, 55, 59, 63, 64, 65, 66, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 102, 113, 119, 128, 131, 132, 139, 142, 161, 162, 163, 225 и 228, или его фармацевтически приемлемую соль, или гидрат. В определенном варианте осуществления изобретения, антисмысловой олигомер согласно изобретению представляет собой антисмысловой олигомер, состоящий из любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 11, 27, 28, 35, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 54, 55, 59, 63, 64, 65, 66, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 102, 113, 119, 128, 131, 132, 139, 142, 161, 162, 163, 225 и 228, или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

[0100]

В одном варианте осуществления изобретения, связанный антисмысловой олигомер согласно изобретению представляет собой антисмысловой олигомер, содержащий любую одну последовательность оснований, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 80, 82, 86, 92, 97, 98, 100, 102, 225, 228, 231 и 232, или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат. В определенном варианте осуществления изобретения, связанный антисмысловой олигомер согласно изобретению состоит из любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 80, 82, 86, 92, 97, 98, 100, 102, 225, 228, 231 и 232. Более предпочтительно, связанный антисмысловой олигомер согласно изобретению содержит любую последовательность оснований, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 102, 225 и 228. В определенном варианте осуществления изобретения, связанный антисмысловой олигомер согласно изобретению представляет собой антисмысловой олигомер, состоящий из любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 102, 225 и 228, или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

[0101]

Антисмысловой олигомер согласно изобретению содержит последовательность

оснований, комплементарную последовательности оснований по меньшей мере одной области, выбранной из группы, состоящей из областей R1-R24, или ее неполной последовательности оснований. Любая последовательность оснований, выбранная из группы, состоящей из (E1) и (E2-1) - (E2-16), из группы, состоящей из (E'1) и (E'2-1) - (E'2-16), из группы, состоящей из (E''1) и (E''2-1) - (E''2-16), или из группы, состоящей из (E'''1) и (E'''2-1) - (E'''2-16), может быть выбрана в качестве последовательности оснований, комплементарной последовательности оснований каждой области, включенной в области R1-R24, или ее неполной последовательности оснований. Так, например, в качестве последовательностей оснований, комплементарных последовательностям оснований областей R1- R24, или их неполных последовательностей оснований, может быть использована последовательность оснований, комплементарная последовательности оснований каждой области или ее неполной последовательности оснований областей R4-R24, и последовательность оснований, выбранная из группы, состоящей из (E1) и (E2-1)-(E2-16), и включенная в каждую из областей R1-R3, может быть использована в качестве областей R1-R3.

[0102]

Антисмысловой олигомер согласно изобретению (включая связанный антисмысловой олигомер согласно изобретению) может представлять собой олигонуклеотид, морфолино-олигомер или олигомер на основе пептид-содержащей нуклеиновой кислоты (PNA) (далее также называемый «антисмысловым олигонуклеотидом согласно изобретению», «антисмысловым морфолино-олигомером согласно изобретению» или «антисмысловым олигомером на основе пептид-содержащей нуклеиновой кислоты»).

[0103]

Антисмысловой олигонуклеотид согласно изобретению представляет собой антисмысловой олигомер, состоящий из нуклеотидов в качестве составных звеньев. Такие нуклеотиды могут представлять собой любые из рибонуклеотидов, дезоксирибонуклеотидов и модифицированных нуклеотидов.

[0104]

Модифицированный нуклеотид означает нуклеотид, имеющий полностью или частично модифицированные азотистые основания, сахарные фрагменты и/или фрагменты фосфатной связи, которые составляют рибонуклеотид или дезоксирибонуклеотид.

[0105]

Азотистыми основаниями являются, например, аденин, гуанин, гипоксантин, цитозин, тимин, урацил и их модифицированные основания. Примерами таких модифицированных оснований являются, но не ограничиваются ими, псевдоурацил, 3-метилурацил, дигидроурацил, 5-алкилцитозины (например, 5-метилцитозин), 5-алкилурацилы (например, 5-этилурацил), 5-галогенурацилы (например, 5-бромуррацил), 6-азапиримидин, 6-алкилпиримидины (например, 6-метилурацил), 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксихидроксиметил)урацил, 5'-карбоксиметиламинометил-2-тиоурацил, 5-карбоксиметиламинометилурацил, 1-метиладенин, 1-метилгипоксантин, 2,2-

диметилгуанин, 3-метилцитозин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, N6-метиладенин, 7-метилгуанин, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, 5-метиламинометилурацил, 5-метилкарбонилметилурацил, 5-метилоксиурацил, 5-метил-2-тиоурацил, 2-метилтио-N6-изопентениладенин, урацил-5-оксиуксусная кислота, 2-тиоцитозин, пурин, 2,6-диаминопурин, 2-аминопурин, изогуанин, индол, имидазол, ксантин и т.п.

[0106]

Модификация сахарного фрагмента может включать, например, модификации в 2'-положении рибозы и модификации в других положениях сахара. Модификация в 2'-положении рибозы включает модификацию с заменой 2'-ОН рибозы на -OR, -R, -R'OR, -SH, -SR, -NH<sub>2</sub>, -NHR, -NR<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br или -I, где R представляет собой алкил или арил, а R' представляет собой алкилен.

Модификация других положений сахара включает, например, но не ограничивается ими, замену O в 4'-положении рибозы или дезоксирибозы на S, создание мостика между 2'-и 4'-положениями сахара, например, LNA (блокированной нуклеиновой кислоты) или ENA (нуклеиновой кислоты с 2'-O,4'-C-этиленовым мостиком).

[0107]

Модификация фрагмента фосфатной связи включает, например, модификацию с заменой фосфодиэфирной связи на фосфортиоатную связь, фосфордитиоатную связь, алкилфосфонатную связь, фосфорамидатную связь или боранофосфатную связь (см., например, Erya et al: *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2008, 18, 9154-9160) (см., например, Японские внутренние повторные публикации заявок РСТ №№ 2006/129594 и 2006/038608).

[0108]

Используемый здесь термин «алкил» предпочтительно означает алкил с прямой или разветвленной цепью, содержащий от 1 до 6 атомов углерода. Конкретные примеры включают метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил, н-пентил, изопентил, неопентил, трет-пентил, н-гексил и изогексил. Алкил может быть, но необязательно, замещенным. Примерами таких заместителей являются галоген, алкокси, циано и нитро. Алкил может быть замещен 1-3 заместителями.

[0109]

Используемый здесь циклоалкил предпочтительно представляет собой циклоалкил, содержащий от 3 до 12 атомов углерода. Конкретные примеры включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил, циклооктил, циклодецил и циклододецил.

[0110]

Используемый здесь галоген включает фтор, хлор, бром и йод.

[0111]

Используемый здесь алкокси представляет собой алкокси с прямой или разветвленной цепью, имеющий от 1 до 6 атомов углерода, такой как метокси, этокси, н-пропокси, изопропокси, н-бутокси, изобутокси, втор-бутокси, трет-бутокси, н-пентилокси, изопентилокси, н-гексилокси, изогексилокси и т.п. Среди прочих, предпочтительным

является алкокси, содержащий от 1 до 3 атомов углерода.

[0112]

Используемый здесь арил предпочтительно представляет собой арил, содержащий от 6 до 10 атомов углерода. Конкретные примеры включают фенил,  $\alpha$ -нафтил и  $\beta$ -нафтил. Среди прочих, предпочтительным является фенил. Арил может быть, но необязательно, замещенным. Примерами таких заместителей являются алкил, галоген, алкокси, циано и нитро. Арил может быть замещен одним-тремя такими заместителями.

[0113]

Используемый здесь алкилен предпочтительно представляет собой алкилен с прямой или разветвленной цепью, содержащий от 1 до 6 атомов углерода. Конкретные примеры включают метилен, этилен, триметилен, тетраметилен, пентаметилен, гексаметилен, 2-(этил)триметилен и 1-(метил)тетраметилен.

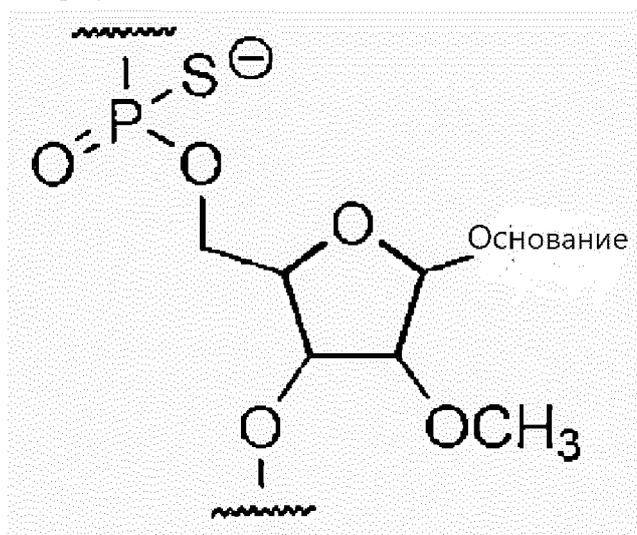
[0114]

Используемый здесь ацил включает алканоил или ароил с прямой или разветвленной цепью. Примеры алканоила включают формил, ацетил, 2-метилацетил, 2,2-диметилацетил, пропионил, бутирил, изобутирил, пентаноил, 2,2-диметилпропионил, гексаноил и т.п. Примеры ароила включают бензоил, толуоил и нафтоил. Ароил может быть, но необязательно, замещен в замещаемых положениях и может быть замещен алкилом(алкилами).

[0115]

Предпочтительно, антисмысловой олигонуклеотид согласно изобретению представляет собой антисмысловой олигомер согласно изобретению, содержащий группу, представленную приведенной ниже общей формулой, в качестве составного звена, где группа -ОН в положении 2'-рибозы замещена метокси, а фрагмент фосфатной связи представляет собой фосфоротиоатную связь:

[Формула 4]



где **Основание** означает основание, которое представляет собой азотистое основание.

[0116]

Антисмысловой олигонуклеотид согласно изобретению может быть легко синтезирован с применением различных автоматизированных синтезаторов (например, АКТА oligopilot plus 10/100 (GE Healthcare)). В качестве альтернативы, синтез может также быть поручен специалистам другой организации (например, Promega Corp. или Takara Co.) и т.п.

[0117]

Антисмысловой морфолино-олигомер согласно изобретению представляет собой антисмысловой олигомер, содержащий составное звено, представленное приведенной ниже общей формулой:

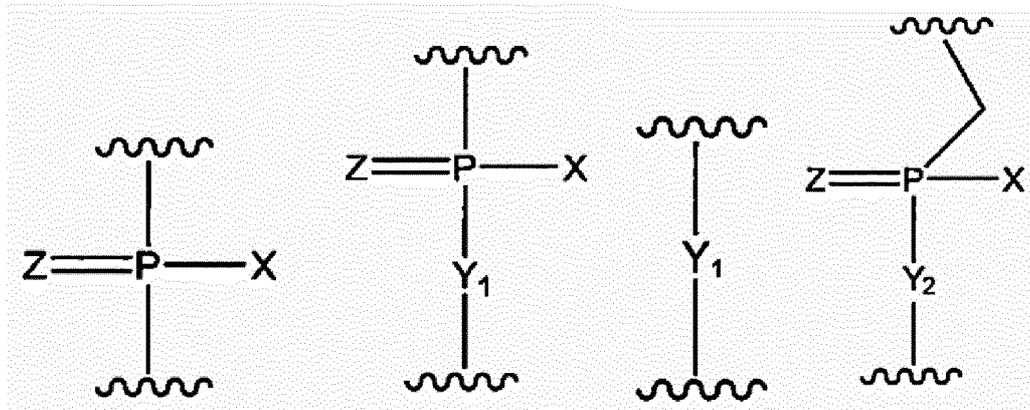
[Формула 5]



где **Основание** означает основание, определенное выше, и,

W означает группу, представленную любой из следующих групп:

[Формула 6]



где X представляет собой  $-\text{CH}_2\text{R}^1$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_2\text{R}^1$ ,  $-\text{S}-\text{CH}_2\text{R}^1$ ,  $-\text{NR}^2\text{R}^3$  или F;  
 $\text{R}^1$  представляет собой H или алкил;

каждый из  $R^2$  и  $R^3$ , которые могут быть одинаковыми или различными, представляет собой H, алкил, циклоалкил или арил;

$Y_1$  представляет собой O, S,  $CH_2$  или  $NR^1$ ;

$Y_2$  представляет собой O, S или  $NR^1$ ;

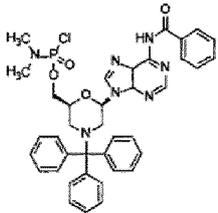
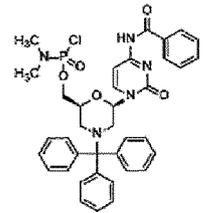
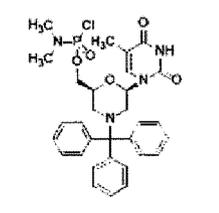
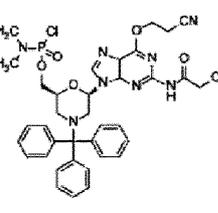
Z представляет собой O или S.

[0118]

Примерами морфолино-мономерных соединений, которые используются в синтезе антисмыслового морфолино-олигомера согласно изобретению, являются, но не ограничиваются ими, морфолино-мономерное соединение (A), морфолино-мономерное соединение (C), морфолино-мономерное соединение (T) и морфолино-мономерное соединение (G), представленные в Таблице 5.

[0119]

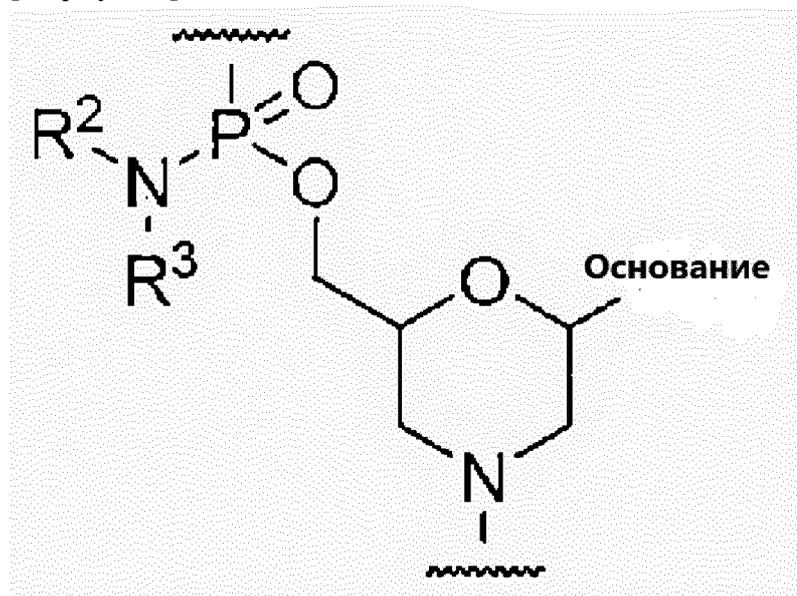
[Таблица 5]

Морфолино-мономерное соединение (A)	Морфолино-мономерное соединение (C)	Морфолино-мономерное соединение (T)	Морфолино-мономерное соединение (G)
			

[0120]

В настоящем изобретении, морфолино-олигомер предпочтительно представляет собой олигомер, содержащий группу, представленную приведенной ниже общей формулой, в качестве составного звена (фосфородиамидатный морфолино-олигомер (далее обозначаемый «РМО»)).

[Формула 7]



где Основание,  $R^2$  и  $R^3$  являются такими же, как было определено выше.

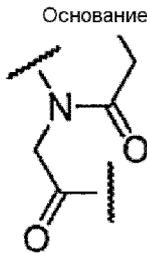
[0121]

Морфолино-олигомер может быть получен по методике, описанной, например, в WO 1991/009033 или в WO 2009/064471. В частности, РМО может быть получен по методике, описанной в WO 2009/064471 или WO 2013/100190.

[0122]

Антисмысловой олигомер на основе пептид-содержащей нуклеиновой кислоты согласно изобретению представляет собой антисмысловой олигомер, имеющий группу, представленную ниже общей формулой в качестве составного звена:

[Формула 8]



где Основание имеет такое же значение, как это определено выше.

Олигомер на основе пептид-содержащей нуклеиновой кислоты может быть получен как описано, например, в следующих литературных источниках:

- 1) P.E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science*, 254, 1497 (1991)
- 2) M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, *JACS*, 114, 1895 (1992)
- 3) K.L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpius, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, *J. Org. Chem.*, 59, 5767 (1994)
- 4) L. Christensen, R. Fitzpatrick, B. Gildea, K. H. Petersen, H. F. Hansen, T. Koch, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, J. Coull, R. H. Berg, *J. Pept. Sci.*, 1, 175 (1995)
- 5) T. Koch, H. F. Hansen, P. Andersen, T. Larsen, H. G. Batz, K. Otteson, H. Orum, *J. Pept. Res.*, 49, 80 (1997)

[0123]

Антисмысловой олигомер согласно изобретению (включая связанный антисмысловой олигомер согласно изобретению) может быть получен в форме его фармацевтически приемлемой соли, в форме его гидрата или в форме гидрата фармацевтически приемлемой соли.

[0124]

Примерами фармацевтически приемлемой соли антисмыслового олигомера согласно изобретению являются соли щелочных металлов, такие как соли натрия, калия и лития; соли щелочноземельных металлов, такие как соли кальция и магния; соли металлов, такие как соли алюминия, железа, цинка, меди, никеля, кобальта и т.п.; соли аммония; соли органических аминов, такие как соли трет-октиламина, дибензиламина, морфолина, глюкозамина, алкилового эфира фенилглицина, этилендиамина, N-метилглюкамина, гуанидина, диэтиламина, триэтиламина, дициклогексиламина, N, N'-

дибензилэтилендиамина, хлорпрокаина, прокаина, диэтанолamina, N- бензил-фенетиламина, пиперазина, тетраметиламмония, трис(гидроксиметил)аминометана; гидрогалогенидные соли, такие как соли гидрофторидов, гидрохлоридов, гидробромидов и гидроиодидов; соли неорганических кислот, такие как нитраты, перхлораты, сульфаты, фосфаты и т.п.; сульфонаты низших алканов, такие как метансульфонаты, трифторметансульфонаты и этансульфонаты; арилсульфонаты, такие как бензолсульфонаты и п-толуолсульфонаты; соли органических кислот, такие как ацетаты, малаты, фумараты, сукцинаты, цитраты, тартраты, оксалаты, малеаты и т.п.; и соли аминокислот, такие как соли глицина, лизина, аргинина, орнитина, глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты. Эти соли могут быть получены известными способами. Альтернативно, антисмысловой олигомер согласно изобретению может быть получен в форме гидрата.

[0125]

## 2. Антисмысловой олигомер-супрессор

Другой вариант настоящего изобретения относится к антисмысловому олигомеру-супрессору, который подавляет пропуск одного экзона (далее называемое «одиночным пропуском»). Антисмысловой олигомер-супрессор может подавлять одиночный пропуск и тем самым усиливать эффект пропуска множества экзонов антисмысловым олигомером. Одиночный пропуск означает пропуск только одного экзона, а не одновременный пропуск множества экзонов.

[0126]

В частности, настоящее изобретение относится к антисмысловому олигомеру-супрессору или к его фармацевтически приемлемой соли или гидрату, которые подавляют пропуск любого одного экзона, выбранного из группы, состоящей из 45-55-го экзона в пре-мРНК дистрофина человека. Далее, антисмысловой олигомер-супрессор и его фармацевтически приемлемая соль, а также гидрат антисмыслового олигомера или его соль также будут называться общим термином «антисмысловой олигомер-супрессор согласно изобретению». Антисмысловой олигомер-супрессор согласно изобретению может относиться к каждому из антисмысловых олигомеров-супрессоров, или к его фармацевтически приемлемой соли или гидрату.

[0127]

Антисмысловой олигомер-супрессор согласно изобретению подавляет одиночный пропуск посредством нацеливания на сайт последовательности-сайленсера сплайсинга, последовательности сайта ветвления или последовательности сайта сплайсинга в пре-мРНК дистрофина человека и ингибирования сплайсинга. Антисмысловой олигомер-супрессор согласно изобретению снижает эффективность одиночного пропуска предполагаемого экзона по сравнению с контролем.

[0128]

Так, например, антисмысловой олигомер-супрессор, который подавляет одиночный пропуск любого одного экзона, выбранного из группы, состоящей из экзонов с 45-го по 55-

й, нацелен на последовательность-сайленсер сплайсинга любого из экзонов с 44-го по 56-й или последовательность-сайленсер сплайсинга, последовательность сайта ветвления или последовательность сайта сплайсинга любого из интронов с 44-го по 55-й.

[0129]

Используемая здесь последовательность-сайленсер сплайсинга представляет собой элемент последовательности оснований, функция которого заключается в подавлении распознавания экзона в пре-мРНК. Примерами последовательности-сайленсера сплайсинга являются последовательности распознавания белков или белковых комплексов, такие как гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A1 (hnRNP A1), hnRNP A2/B1, DAZAP1, hnRNP I, Fox-1, Fox-2, hnRNP H1, hnRNP H2, hnRNP H3, hnRNP L, Sam68 и SRp40.

[0130]

Используемый здесь сайт сплайсинга представляет собой границу между экзоном и интроном. Сайт сплайсинга может быть предсказан по 5'-концу интрона, начинающемуся с GU, AU и т.п., и по 3'-концу интрона, заканчивающемуся AG, AC или т.п.

[0131]

Используемый здесь сайт ветвления представляет собой последовательность внутри интрона, которая инициирует атаку на 5'-сайт сплайсинга во время реакции сплайсинга и образует ковалентную связь. Последовательность сайта ветвления относится к последовательности оснований в интроне, содержащем сайт ветвления.

[0132]

Примерами последовательности-сайленсера сплайсинга, последовательности сайта ветвления или последовательности сайта сплайсинга, которые представляют собой мишень (далее именуемую «супрессорной последовательностью») для антисмыслового олигомера-супрессора согласно изобретению, являются последовательности оснований, приведенные ниже (SEQ ID NO: 370-384 и 390). Положения последовательности супрессора, последовательности сайта ветвления и последовательности сайта сплайсинга могут быть детектированы с помощью компьютерных программ, таких как SpliceAid (Francesco Piva et al., *Bioinformatics*, 25 (9), 1211-1213, 2009), SpliceAid-2 (Francesco Piva et al., *Human Mutation*, 33 (1), 81-85, 2012), SpliceAid-F (Matteo Giulietti et al., *Nucleic Acids Res.*, 41, D125-D131, 2012), ATtTRACT-a (Girolamo Giudice et al., *Database (Oxford)*, baw035, 2016), SROOGLE (Schrage Schwartz et al., *Nucleic Acids Res.*, 37, W189-W192, 2009), Reg RNA (Hsi-Yuan Huang et al., *Nucleic Acids Res.*, 34, W429-W434, 2006), Reg RNA 2.0 (Tzu-Hao Chang et al., *BMC bioinformatics*, 14 (Suppl 2), S4, 2013), Human Splicing Finder (Francois-Olivier Desmet et al., *Nucleic Acids Res.*, 37, 9, e67, 2009) или SVM-BPfinder (Andre Corvelo et al., *PLoS Comput Biol.*, 6, 11, e1001016, 2010).

[0133]

[Таблица 6]

SEQ ID NO	Название белка или белкового комплекса или связанного сайта последовательности	Последовательность оснований
370	hnRNP A1	UAGGA
371		UAGGAU
372		UAGGAA
373		UAGGCA
374		UAGGCU
375		UAGGGA
376		UAGGGC
377		UAGGGU
378		GGUAGGGC
379		AGAAC
380		Fox-1
381	UGACUG	
382	UGCAUG	
383	Сайт ветвления	yUpAy
384	Сайт сплайсинга	GU
390		AG

y: A or U, n: A, G, C, U, or T

[0134]

В данном случае, конкретные примеры последовательности-сайленсера сплайсинга включают SEQ ID NO: 370-382. Примерами мутантов SEQ ID NO: 370-382 также являются:

(F1) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой одной последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 370-382, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины л ю б о й выбранной последовательности оснований,

(F2) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 86% идентична любой одной последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 370-382, и имеет длину в пределах  $\pm 14\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(F3) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 87% идентична любой одной последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 370-382, и имеет длину в пределах  $\pm 13\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(F4) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 88% идентична любой одной последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 370-382, и имеет длину в пределах  $\pm 12\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(F5) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 89% идентична любой одной последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 370-382, и имеет длину в пределах  $\pm 11\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(F6) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 90% идентична



любой одной последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 370-382, и имеет длину в пределах  $\pm 0,5\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований.

[0135]

В определенном варианте осуществления настоящего изобретения, последовательность-сайленсер сплайсинга может представлять собой последовательность распознавания гетерогенного ядерного рибонуклеопротеина A1 (hnRNP A1). Примеры последовательности распознавания hnRNP A1a человека показаны в SEQ ID NO: 370-379.

[0136]

В данном случае, конкретные примеры последовательности сайта сплайсинга включают SEQ ID NO: 384 и 390. Примерами мутантов SEQ ID NO: 384 и 390 также является:

(G1) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности оснований SEQ ID NO: 384 или 390 и имеет длину в пределах  $\pm 20\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований.

[0137]

В данном случае, конкретные примеры последовательности сайта ветвления включают SEQ ID NO: 383. Примерами мутанта SEQ ID NO: 383 также является:

(H1) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности оснований SEQ ID NO: 383 и имеет длину в пределах  $\pm 20\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований.

[0138]

Что касается супрессорной последовательности мутантного типа, то следующие области-мишени также включены в последовательность-мишень оснований антисмыслового олигомера-супрессора согласно изобретению:

(I1) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 370-384 и 390, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(I2) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 86% идентична любой последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 370-384 и 390, и имеет длину в пределах  $\pm 14\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(I3) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 87% идентична любой последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 370-384 и 390, и имеет длину в пределах  $\pm 13\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(I4) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 88% идентична любой последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 370-384 и 390, и имеет длину в пределах  $\pm 12\%$  от длины любой одной выбранной



последовательности оснований,

(I15) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 99% идентична любой последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 370-384 и 390, и имеет длину в пределах  $\pm 1\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований, и

(I16) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 99,5% идентична любой последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 370-384 и 390, и имеет длину в пределах  $\pm 0,5\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований.

[0139]

В одном варианте осуществления изобретения, антисмысловой олигомер-супрессор согласно изобретению содержит последовательность оснований, комплементарную любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из последовательностей оснований, представленных SEQ ID NO: 370-384 и 390, и последовательности оснований мутантного типа, показанных выше в (I1)-(I16), или их неполных последовательностей оснований. В другом варианте осуществления изобретения, антисмысловой олигомер-супрессор согласно изобретению состоит из последовательности оснований, комплементарной любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из последовательностей оснований, представленных SEQ ID NO: 370-384 и 390, или их неполной последовательности оснований.

Используемый здесь термин «неполный» имеет такое же определение, как и в разделе, относящемся к антисмысловому олигомеру согласно изобретению.

[0140]

В другом варианте осуществления изобретения, антисмысловой олигомер-супрессор согласно изобретению представляет собой антисмысловой олигомер-супрессор, состоящий из

(J1) любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 257-275, или

(J2) последовательности оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой одной последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 257-275, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований, или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

[0141]

В данном случае, последовательность оснований (J2) представляет собой последовательность оснований мутантного типа (J1). Такой мутант также включает:

(J2-1) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 257-275, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(J2-2) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 86% идентична



любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 257-275, и имеет длину в пределах  $\pm 4\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(J2-13) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 97% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 257-275, и имеет длину в пределах  $\pm 3\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(J2-14) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 98% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 257-275, и имеет длину в пределах  $\pm 2\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(J2-15) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 99% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 257-275, и имеет длину в пределах  $\pm 1\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований, и

(J2-16) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 99,5% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 257-275, и имеет длину в пределах  $\pm 0,5\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований.

[0142]

Таким образом, еще один вариант антисмыслового олигомера-супрессора согласно изобретению представляет собой антисмысловый олигомер-супрессор, состоящий из любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из (J1) и (J2-1)-(J2-16), или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

[0143]

Еще один вариант антисмыслового олигомера-супрессора согласно изобретению представляет собой антисмысловый олигомер-супрессор, состоящий из:

(J'1) любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 260, 261 и 263, или

(J'2) последовательности оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 260, 261 и 263, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований, или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

[0144]

В данном случае, последовательность оснований (J'2) представляет собой последовательность оснований мутантного типа (J'1). Такой мутант также включает:

(J'2-1) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 260, 261 и 263, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,



(J'2-12) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 96% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 260, 261 и 263, и имеет длину в пределах  $\pm 4\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(J'2-13) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 97% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 260, 261 и 263, и имеет длину в пределах  $\pm 3\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(J'2-14) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 98% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 260, 261 и 263, и имеет длину в пределах  $\pm 2\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований,

(J'2-15) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 99% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 260, 261 и 263, и имеет длину в пределах  $\pm 1\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований, и

(J'2-16) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 99,5% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 260, 261 и 263, и имеет длину в пределах  $\pm 0,5\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований.

[0145]

Таким образом, еще одним вариантом антисмыслового олигомера-супрессора согласно изобретению является антисмысловый олигомер-супрессор, состоящий из любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из (J'1) и (J'2-1)-(J'2-16), или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат.

[0146]

Антисмысловый олигомер-супрессор согласно изобретению усиливает эффект множественного пропуска в физиологических условиях. Термин «в физиологических условиях» относится к условиям, имитирующим среду *in vivo* с точки зрения pH, солевого состава и температуры. Такими условиями являются, например, температура от 25 до 40°C, а предпочтительно 37°C, pH от 5 до 8, а предпочтительно pH 7,4 и концентрация хлорида натрия 150 mM.

[0147]

Способность антисмыслового олигомера-супрессора согласно изобретению усиливать эффект пропуска множества экзонов может быть подтверждена с использованием (i) экспериментальной системы для пропуска множества экзонов посредством только антисмыслового олигомера согласно изобретению и (ii) экспериментальной системы для пропуска множества экзонов посредством антисмыслового олигомера согласно изобретению и антисмыслового олигомера-супрессора согласно изобретению, так, чтобы другие условия между ними были

одинаковыми, и путем наблюдения различий между эффектом пропуска множества экзонов, наблюдаемым с использованием экспериментальной системы (ii) и эффектом пропуска множества экзонов, наблюдаемым с использованием экспериментальной системы (i).

[0148]

Эффект множественного пропуска оценивали, как указано в Разделе «1. Антисмысловой олигомер», который относится к антисмысловому олигомеру согласно изобретению.

[0149]

Антисмысловой олигомер-супрессор согласно изобретению имеет длину 10-60 оснований и может иметь длину, без каких-либо ограничений, 10-55 оснований, 10-50 оснований, 10-45 оснований, 10-40 оснований, 10-35 оснований, 10-30 оснований, 10-25 оснований, 15-60 оснований, 15-55 оснований, 15-50 оснований, 15-45 оснований, 15-40 оснований, 15-35 оснований, 15-30 оснований, 15-25 оснований, от 16-60 оснований, 16-55 оснований, 16-50 оснований, 16-45 оснований, 16-40 оснований, 16-35 оснований, 16-30 оснований, 16-25 оснований, 17-60 оснований, 17-55 оснований, 17-50 оснований, 17-45 оснований, 17-40 оснований, 17-35 оснований, 17-30 оснований, 17-25 оснований, 18-60 оснований, 18-55 оснований, 18-50 оснований, 18-45 оснований, 18-40 оснований, 18-35 оснований, 18-30 оснований, 18-25 оснований, 19-60 оснований, 19-55 оснований, 19-50 оснований, 19-45 оснований, 19-40 оснований, 19-35 оснований, 19-30 оснований, 19-25 оснований, 20-60 оснований, 20-55 оснований, 20-50 оснований, 20-45 оснований, 20-40 оснований, 20-35 оснований, 20-30 оснований, 20-25 оснований, 15-30 оснований, 15-29 оснований, 15-28 оснований, 15-27 оснований, 15-26 оснований, 15-25 оснований, 15-24 оснований, 15-23 оснований, 15-22 оснований, 15-21 основание, 15-20 оснований, 15-19 оснований, 15-18 оснований, 16-30 оснований, 16-29 оснований, 16-28 оснований, 16-27 оснований, 16-26 оснований, 16-25 оснований, 16-24 оснований, 16-23 оснований, 16-22 оснований, 16-21 основания, 16-20 оснований, 16-19 оснований, 16-18 оснований, 17-30 оснований, 17-29 оснований, 17-28 оснований, 17-27 оснований, 17-26 оснований, 17-25 оснований, 17-24 оснований, 17-23 оснований, 17-22 оснований, 17-21 основание, 17-20 оснований, 17-19 оснований, 17-18 оснований, 18-30 оснований, 18-29 оснований, 18-28 оснований, 18-27 оснований, 18-26 оснований, 18-25 оснований, 18-24 оснований, 18-23 основания, 18-22 оснований, 18-21 основания, 18-20 оснований, 18-19 оснований, 19-30 оснований, 19-29 оснований, 19-28 оснований, 19-27 оснований, 19-26 оснований, 19-25 оснований, 19-24 оснований, 19-23 оснований, 19-22 оснований, 19-21 основания, 19-20 оснований, 20-30 оснований, 20-29 оснований, 20-28 оснований, 20-27 оснований, 20-26 оснований, 20-25 оснований, 20-24 оснований, 20-23 оснований, 20-22 оснований, 20-21 основания, 60 оснований, 59 оснований, 58 оснований, 57 оснований, 56 оснований, 55 оснований, 54 основания, 53 основания, 52 основания, 51 основание, 50 оснований, 49 оснований, 48 оснований, 47 оснований, 46 оснований, 45 оснований, 44 основания, 43 основания, 42 основания, 41 основание, 40 оснований, 39 оснований, 38 оснований, 37

оснований, 36 оснований, 35 оснований, 34 основания, 33 основания, 32 основания, 31 основание, 30 оснований, 29 оснований, 28 оснований, 27 оснований, 26 оснований, 25 оснований, 24 основания, 23 основания, 22 основания, 21 основание, 20 оснований, 19 оснований, 18 оснований, 17 оснований, 16 оснований, 15 оснований, 14 оснований, 13 оснований, 12 оснований, 11 оснований или 10 оснований. Эти длины могут быть увеличены или уменьшены на 1, 2 или 3 основания.

[0150]

Антисмысловой олигомер-супрессор согласно изобретению может представлять собой связанный антисмысловой олигомер, сконструированный так, чтобы он содержал множество связанных друг с другом олигомерных звеньев, или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат. Олигомерные звенья могут быть связаны посредством линкера, который не способствует гибридизации, либо они могут быть связаны непосредственно без линкера, как указано выше. Если антисмысловой олигомер-супрессор согласно изобретению является связанным, то соответствующие последовательности оснований олигомерных звеньев не являются смежными и не перекрываются друг с другом.

[0151]

Антисмысловой олигомер-супрессор согласно изобретению может представлять собой олигонуклеотид, морфолино-олигомер или олигомер на основе пептид-содержащей нуклеиновой кислоты (PNA).

[0152]

Если антисмысловой олигомер-супрессор согласно изобретению представляет собой олигонуклеотид (далее называемый «антисмысловым олигонуклеотидом-супрессором согласно изобретению»), то антисмысловой олигонуклеотид-супрессор согласно изобретению представляет собой антисмысловой олигомер-супрессор, состоящий из нуклеотидов в качестве составных звеньев. Такие нуклеотиды могут представлять собой любые из рибонуклеотидов, дезоксирибонуклеотидов и модифицированных нуклеотидов.

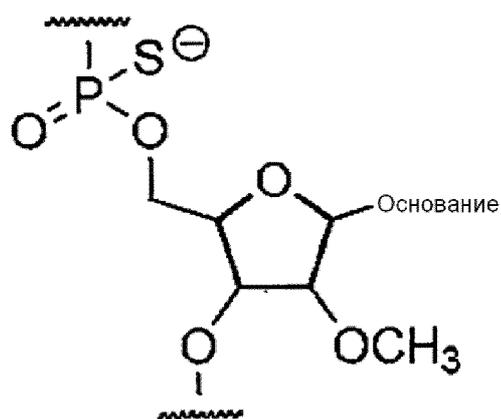
[0153]

Модифицированный нуклеотид является таким, как это указано выше.

[0154]

Предпочтительно, антисмысловой олигонуклеотид-супрессор согласно изобретению представляет собой антисмысловой олигомер-супрессор согласно изобретению, содержащий группу, представленную приведенной ниже общей формулой, в качестве составного звена, где группа -ОН в положении 2'-рибозы замещена метокси, а фрагмент фосфатной связи представляет собой фосфоротиоатную связь:

[Формула 9]



где основание определено выше.

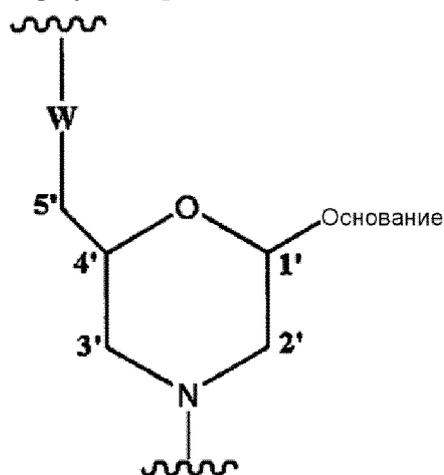
[0155]

Антисмысловой олигонуклеотид-супрессор согласно изобретению может быть легко синтезирован с применением различных автоматизированных синтезаторов (например, АКТА oligopilot plus 10/100 (GE Healthcare)). В качестве альтернативы, синтез может также быть поручен специалистам другой организации (например, Promega Corp. или Takara Co.) и т.п.

[0156]

Если антисмысловой олигомер-супрессор согласно изобретению представляет собой морфолино-олигомер (далее называемый «антисмысловым морфолино-олигомером-супрессором согласно изобретению»), то антисмысловой морфолино-олигомер-супрессор согласно изобретению представляет собой антисмысловой олигомер-супрессор, имеющий группу, представленную ниже общей формулой, в качестве составного звена:

[Формула 10]



где Основание и W определены выше.

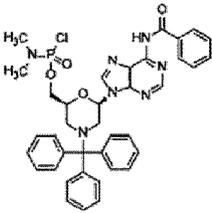
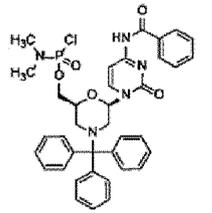
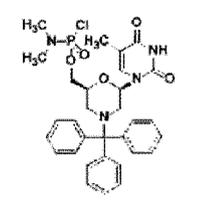
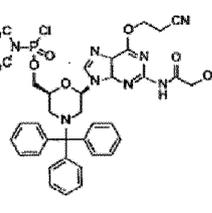
[0157]

Примерами морфолино-мономерных соединений, которые используются в синтезе антисмыслового морфолино-олигомера-супрессора согласно изобретению, являются, но не ограничиваются ими, морфолино-мономерное соединение (A), морфолино-мономерное

соединение (C), морфолино-мономерное соединение (T), и морфолино-мономерное соединение (G), представленные в Таблице 7.

[0158]

[Таблица 7]

Морфолино-мономерное соединение (A)	Морфолино-мономерное соединение (C)	Морфолино-мономерное соединение (T)	Морфолино-мономерное соединение (G)
			

[0159]

В антисмысловом морфолино-олигомере-супрессоре согласно изобретению, предпочтительно, морфолино-олигомер представляет собой РМО.

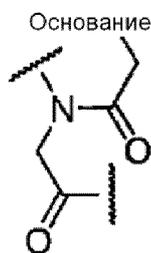
[0160]

Морфолино-олигомер может быть получен методом, описанным, например, в WO 1991/009033 или WO 2009/064471. В частности, РМО может быть получен методом, описанным в WO 2009/064471 или в WO 2013/100190.

[0161]

Если антисмысловый олигомер-супрессор согласно изобретению представляет собой олигомер на основе пептид-содержащей нуклеиновой кислоты (далее называемый «антисмысловым олигомером-супрессором на основе пептид-содержащей нуклеиновой кислоты согласно изобретению»), то антисмысловый олигомер-супрессор на основе пептид-содержащей нуклеиновой кислоты согласно изобретению представляет собой антисмысловый олигомер-супрессор, имеющий группу, представленную ниже общей формулой (I) в качестве составного звена:

[Формула 11]



где Основание определено выше.

Олигомер на основе пептид-содержащей нуклеиновой кислоты может быть получен как описано выше.

[0162]

Антисмысловый олигомер-супрессор согласно изобретению может быть получен в

форме его фармацевтически приемлемой соли, в форме его гидрата или в форме гидрата фармацевтически приемлемой соли.

[0163]

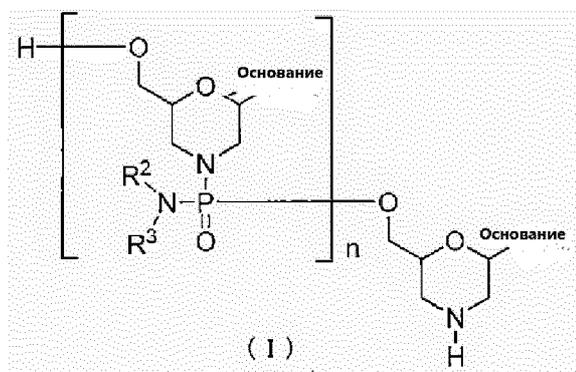
Примерами фармацевтически приемлемой соли антисмыслового олигомера-супрессора согласно изобретению являются соли щелочных металлов, такие как соли натрия, калия и лития; соли щелочноземельных металлов, такие как соли кальция и магния; соли металлов, такие как соли алюминия, железа, цинка, меди, никеля, кобальта и т.п.; соли аммония; соли органических аминов, такие как соли трет-октиламина, дибензиламина, морфолина, глюкозамина, алкилового эфира фенилглицина, этилендиамина, N-метилглюкамина, гуанидина, диэтиламина, триэтиламина, дициклогексиламина, N, N'-дибензилэтилендиамина, хлорпрокаина, прокаина, диэтанолламина, N-бензилфенетиламина, пиперазина, тетраметиламмония, трис(гидроксиэтил)аминометана; гидрогалогенидные соли, такие как соли гидрофторидов, гидрохлоридов, гидробромидов и гидроиодидов; соли неорганических кислот, такие как нитраты, перхлораты, сульфаты, фосфаты и т.п.; сульфонаты низших алканов, такие как метансульфонаты, трифторметансульфонаты и этансульфонаты; арилсульфонаты, такие как бензолсульфонаты и п-толуолсульфонаты; соли органических кислот, такие как ацетаты, малаты, fumarаты, сукцинаты, цитраты, тартраты, оксалаты, малеаты и т.п.; и соли аминокислот, такие как соли глицина, лизина, аргинина, орнитина, глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты. Эти соли могут быть получены известными способами. Альтернативно, антисмысловый олигомер-супрессор согласно изобретению может быть получен в форме гидрата.

[0164]

[Способ получения РМО]

Каждый антисмысловый олигомер согласно изобретению и антисмысловый олигомер-супрессор согласно изобретению может представлять собой РМО. Вариантом РМО является, например, соединение, представленное приведенной ниже общей формулой (I) (далее это соединение обозначается как РМО (I)).

[Формула 12]



где основания,  $R^2$  и  $R^3$  определены выше; и,

$n$  означает заданное целое число от 1 до 99, а предпочтительно, заданное целое число от 18 до 28.



комбинация антисмыслового олигомера согласно изобретению и антисмыслового олигомера-супрессора согласно изобретению. Антисмысловый олигомер, содержащийся в фармацевтической композиции согласно изобретению или в фармацевтической комбинации согласно изобретению, может представлять собой любой антисмысловый олигомер согласно изобретению, а предпочтительно, он представляет собой, но не ограничивается ими, антисмысловый олигомер, состоящий из любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-111, 113-177, 179, 180, 182, 183, 185-193, 195-198, 200-223 и 225-232, более предпочтительно, антисмысловый олигомер, состоящий из любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 26, 27, 28, 29, 35, 38, 39, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 58, 59, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 80, 82, 86, 92, 97, 98, 100, 102, 113, 119, 121, 122, 124, 125, 126, 128, 130, 131, 132, 139, 142, 144, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 225, 228, 231 и 232, а еще более предпочтительно, антисмысловый олигомер, состоящий из любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 11, 27, 28, 35, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 54, 55, 59, 63, 64, 65, 66, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 102, 113, 119, 128, 131, 132, 139, 142, 161, 162, 163, 225 и 228.

Антисмысловый олигомер-супрессор, содержащийся в фармацевтической композиции согласно изобретению или в фармацевтической комбинации согласно изобретению, может представлять собой любой антисмысловый олигомер-супрессор согласно изобретению, а предпочтительно, он представляет собой, но не ограничивается ими, антисмысловый олигомер-супрессор, состоящий из любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 257-275, более предпочтительно SEQ ID NO: 1, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 26 или 27, а еще более предпочтительно, антисмысловый олигомер-супрессор, состоящий из любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 260, 261 и 263.

Если фармацевтическая композиция согласно изобретению содержит антисмысловый олигомер согласно изобретению и антисмысловый олигомер-супрессор согласно изобретению, то предпочтительно, фармацевтическая композиция содержит комбинацию антисмыслового олигомера согласно изобретению и антисмыслового олигомера-супрессора согласно изобретению, описанных выше. Предпочтительно, фармацевтическая комбинация согласно изобретению включает комбинацию антисмыслового олигомера согласно изобретению и антисмыслового олигомера-супрессора согласно изобретению, описанных выше.

[0170]

В фармацевтической комбинации согласно изобретению, примерами комбинации антисмыслового олигомера согласно изобретению и антисмыслового олигомера-супрессора согласно изобретению являются:

(K1) комбинация, в которой антисмысловый олигомер представляет собой олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 75, а антисмысловый олигомер-супрессор представляет собой

олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 260,

(K2) комбинация, в которой антисмысловой олигомер представляет собой олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 75, а антисмысловой олигомер-супрессор представляет собой олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 261,

(K3) комбинация, в которой антисмысловой олигомер представляет собой олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 75, а антисмысловой олигомер-супрессор представляет собой олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 263,

(K4) комбинация, в которой антисмысловой олигомер представляет собой олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 65, а антисмысловой олигомер-супрессор представляет собой олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 260,

(K5) комбинация, в которой антисмысловой олигомер представляет собой олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 65, а антисмысловой олигомер-супрессор представляет собой олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 261,

(K6) комбинация, в которой антисмысловой олигомер представляет собой олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 65, а антисмысловой олигомер-супрессор представляет собой олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 263,

(K7) комбинация, в которой антисмысловой олигомер представляет собой олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 55 и 59, а антисмысловой олигомер-супрессор представляет собой олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 260,

(K8) комбинация, в которой антисмысловой олигомер представляет собой олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 55 и 59, а антисмысловой олигомер-супрессор представляет собой олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 261, и

(K9) комбинация, в которой антисмысловой олигомер представляет собой олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 55 и 59, а антисмысловой олигомер-супрессор представляет собой олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 263.

Фармацевтическая композиция согласно изобретению может содержать антисмысловой олигомер согласно изобретению и антисмысловой олигомер-супрессор согласно изобретению в этих комбинациях.

[0171]

Каждая из фармацевтической композиции согласно изобретению и фармацевтической комбинации согласно изобретению может быть использована для лечения, например, мышечной дистрофии Дюшенна, мышечной дистрофии Беккера, мышечной дистрофии тазового и плечевого поясов (LGMD), врожденной мышечной дистрофии, мышечной дистрофии Эмери-Дрейфуса, плече-лопаточно-лицевой мышечной дистрофии, офтальмофарингеальной мышечной дистрофии, церебральной аутосомно-доминантной артериопатии с инфарктом в субкортикальной области и лейкоэнцефалопатией (CADASIL) и синдрома Альпорта. Фармацевтическая комбинация согласно изобретению и фармацевтическая композиция согласно изобретению могут быть введены пациенту-человеку, а, в частности, пациенту с мышечной дистрофией. Пациентом, получающим фармацевтическую комбинацию согласно изобретению или

фармацевтическую композицию согласно изобретению, может быть человек, имеющий мутацию, которая приводит к пропуску двух или более экзонов, выбранных из группы, состоящей из экзонов с 45 по 55 в гене дистрофина.

[0172]

В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к способу лечения мышечной дистрофии, который включает введение пациенту с мышечной дистрофией антисмыслового олигомера согласно изобретению или комбинации антисмысловых олигомеров согласно изобретению и антисмыслового олигомера-супрессора согласно изобретению.

В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к способу лечения мышечной дистрофии, который включает введение пациенту с мышечной дистрофией фармацевтической композиции согласно изобретению или фармацевтической комбинации согласно изобретению.

Способ лечения может включать пропуск любых двух или более следующих друг за другом экзонов, выбранных из группы, состоящей из экзона с 45-го по 55-й в пре-мРНК дистрофина человека. В этом способе лечения, пациентом с мышечной дистрофией может быть пациент с мутацией, которая способствует пропуску экзона 45-55 в гене дистрофина. Пациентом может быть человек, а именно, человек, имеющий мутацию, которая способствует пропуску экзона с 45 по 55 в гене дистрофина.

[0173]

Настоящее изобретение также относится к применению антисмыслового олигомера согласно изобретению или комбинации антисмыслового олигомера согласно изобретению и антисмыслового олигомера-супрессора согласно изобретению, или фармацевтической композиции согласно изобретению, или фармацевтической комбинации согласно изобретению в целях приготовления лекарственного средства для лечения мышечной дистрофии.

[0174]

Настоящее изобретение также относится к антисмысловому олигомеру согласно изобретению или комбинации антисмыслового олигомера согласно изобретению и антисмыслового олигомера-супрессора согласно изобретению, или к фармацевтической композиции согласно изобретению, или к фармацевтической комбинации согласно изобретению для использования в целях лечения мышечной дистрофии. Лечение может включать пропуск любых двух или более следующих друг за другом экзонов, выбранных из группы, состоящей из экзонов с 45-го по 55-й в пре-мРНК дистрофина человека. Пациентом, проходящим лечение мышечной дистрофии, может быть пациент с мутацией, которая способствует пропуску экзонов с 45 по 55 в гене дистрофина. Пациентом может быть человек, то есть, пациент, имеющий мутацию, которая способствует пропуску экзона с 45 по 55 в гене дистрофина.

[0175]

Способ введения антисмыслового олигомера согласно изобретению или

комбинации антисмыслового олигомера согласно изобретению и антисмыслового олигомера-супрессора согласно изобретению, или фармацевтической композиции согласно изобретению, или фармацевтической комбинации согласно изобретению не имеет конкретных ограничений при условии, что такой способ будет фармацевтически приемлемым, и он может быть выбран в зависимости от способа лечения. Предпочтительными, с точки зрения легкости доставки в мышечные ткани, являются внутривенное введение, внутриартериальное введение, внутримышечное введение, подкожное введение, пероральное введение, введение в ткани, трансдермальное введение и т.п. Кроме того, лекарственные формы, подходящие для введения композиций согласно изобретению, не имеют конкретных ограничений, и включают, например, различные инъекции, пероральные средства, капли, ингаляции, мази, лосьоны и т.п.

[0176]

При введении антисмыслового олигомера согласно изобретению и/или антисмыслового олигомера-супрессора согласно изобретению пациентам с мышечной дистрофией предпочтительно, чтобы композиция согласно изобретению содержала носитель, способствующий доставке олигомера в мышечные ткани. Такой носитель не имеет конкретных ограничений, при условии, что он будет фармацевтически приемлемым, и примерами таких носителей являются катионные носители, такие как катионные липосомы, катионные полимеры и т.п., или носители с вирусной оболочкой. Катионные липосомы представляют собой, например, липосомы, состоящие из 2-О-(2-диэтиламиноэтил)карбамоил-1,3-О-диолеоилглицерина и фосфолипидов в качестве основных компонентов (далее называемые «липосомой А»); Олигофектамин (зарегистрированный торговый знак) (производства Invitrogen Corp.), Липофектин (зарегистрированный торговый знак) (производства Invitrogen Corp.), Липофектамин (зарегистрированный торговый знак) (производства Invitrogen Corp.), Липофектамин 2000 (зарегистрированный торговый знак) (производство Invitrogen Corp.), DMRIE-C (зарегистрированный торговый знак) (производитель Invitrogen Corp.), GeneSilencer (зарегистрированный торговый знак) (производитель Gene Therapy Systems), TransMessenger (зарегистрированный торговый знак) (производитель QIAGEN, Inc.), TransIT ТКО (зарегистрированный торговый знак) (производитель Mirus) и Nucleofector II (Lonza). Из вышеперечисленных, предпочтительной является липосома А. Примерами катионных полимеров являются JetSI (зарегистрированный торговый знак) (производитель Qbiogene, Inc.) и Jet-PEI (зарегистрированный торговый знак) (полиэтиленмин, производимый Qbiogene, Inc.). Примерами носителей с вирусной оболочкой является GenomeOne (зарегистрированный торговый знак) (липосома HVJ-E, производства Ishihara Sangyo). В качестве альтернативы также могут быть использованы медицинские устройства, описанные в японских патентах № 2924179, и катионные носители, описанные в японских внутренних повторных публикациях РСТ № 2006/129594 и 2008/096690.

[0177]

Концентрация антисмыслового олигомера согласно изобретению, содержащегося в

фармацевтической композиции согласно изобретению и/или фармацевтической комбинации согласно изобретению, может варьироваться в зависимости от типа носителя и т.п. и обычно находится в диапазоне от 0,1 нМ до 100 мкМ, предпочтительно в диапазоне от 1 нМ до 10 мкМ, а более предпочтительно в диапазоне от 10 нМ до 1 мкМ. Массовое соотношение антисмыслового олигомера согласно изобретению, содержащегося в композиции согласно изобретению, и носителя (носитель/антисмысловой олигомер согласно изобретению) может варьироваться в зависимости от свойств олигомера, типа носителя и т.п. и обычно находится в диапазоне от 0,1 до 100, предпочтительно в диапазоне от 1 до 50, а более предпочтительно в диапазоне от 10 до 20.

Концентрация антисмыслового олигомера-супрессора согласно изобретению, содержащегося в фармацевтической композиции согласно изобретению и/или фармацевтической комбинации согласно изобретению, может варьироваться в зависимости от типа носителя и т.п. и обычно находится в диапазоне от 0,1 нМ до 100 мкМ, предпочтительно в диапазоне от 1 нМ до 10 мкМ, а более предпочтительно в диапазоне от 10 нМ до 1 мкМ. Массовое соотношение антисмыслового олигомера-супрессора согласно изобретению, содержащегося в композиции согласно изобретению, и носителя (носитель/антисмысловой олигомер-супрессор согласно изобретению) может варьироваться в зависимости от свойств олигомера, типа носителя и т.п. и обычно находится в диапазоне от 0,1 до 100, предпочтительно в диапазоне от 1 до 50, а более предпочтительно в диапазоне от 10 до 20.

[0178]

Фармацевтическая композиция согласно изобретению и/или фармацевтическая комбинация согласно изобретению могут быть приготовлены в форме водного раствора. В этом случае, фармацевтическая композиция согласно изобретению и/или фармацевтическая комбинация согласно изобретению может содержать антисмысловой олигомер согласно изобретению в концентрации от 2,5 до 500 мг/мл, от 5 до 450 мг/мл, от 10 до 400 мг/мл, от 15 до 350 мг/мл, от 20 до 300 мг/мл, от 20 до 250 мг/мл, от 20 до 200 мг/мл, от 20 до 150 мг/мл, от 20 до 100 мг/мл, от 20 до 50 мг/мл, от 20 до 40 мг/мл, от 20 до 30 мг/мл, от 23 до 27 мг/мл, от 24 до 26 мг/мл или 25 мг/мл. Альтернативно, фармацевтическая композиция согласно изобретению и/или фармацевтическая комбинация согласно изобретению могут содержать антисмысловой олигомер согласно изобретению в концентрации от 10 до 100 мг/мл, от 15 до 95 мг/мл, от 20 до 80 мг/мл, от 25 до 75 мг/мл, от 30 до 70 мг/мл, от 35 до 65 мг/мл, от 40 до 60 мг/мл, от 45 до 55 мг/мл, от 47 до 53 мг/мл, от 48 до 52 мг/мл, от 49 до 51 мг/мл или 50 мг/мл.

[0179]

Фармацевтическая композиция согласно изобретению и/или фармацевтическая комбинация согласно изобретению в форме водного раствора может содержать олигомер-супрессор согласно изобретению в концентрации от 2,5 до 500 мг/мл, от 5 до 450 мг/мл, от 10 до 400 мг/мл, от 15 до 350 мг/мл, от 20 до 300 мг/мл, от 20 до 250 мг/мл, от 20 до 200 мг/мл, от 20 до 150 мг/мл, от 20 до 100 мг/мл, от 20 до 50 мг/мл, от 20 до 40 мг/мл, от 20 до

30 мг/мл, от 23 до 27 мг/мл, от 24 до 26 мг/мл или 25 мг/мл. Альтернативно, фармацевтическая композиция согласно изобретению и/или фармацевтическая комбинация согласно изобретению могут содержать олигомер-супрессор согласно изобретению в концентрации от 10 до 100 мг/мл, от 15 до 95 мг/мл, от 20 до 80 мг/мл, от 25 до 75 мг/мл, от 30 до 70 мг/мл, от 35 до 65 мг/мл, от 40 до 60 мг/мл, от 45 до 55 мг/мл, от 47 до 53 мг/мл, от 48 до 52 мг/мл, от 49 до 51 мг/мл или 50 мг/мл.

[0180]

Фармацевтическая композиция согласно изобретению и/или фармацевтическая комбинация согласно изобретению могут быть приготовлены в сухой форме. В этом случае, для приготовления фармацевтической композиции согласно изобретению и/или фармацевтической комбинации согласно изобретению в форме водного раствора, например, 125 мг или 250 мг антисмыслового олигомера согласно изобретению в сухом виде могут быть смешаны с 0,5-100 мл воды (что соответствует антисмысловому олигомеру согласно изобретению в концентрации от 1,25 мг/мл до 250 мг/мл или от 2,5 мг/мл до 500 мг/мл), предпочтительно с 1 мл - 50 мл воды (что соответствует антисмысловому олигомеру согласно изобретению в концентрации от 2,5 мг/мл до 125 мг/мл или от 5 мг/мл до 250 мг/мл), а более предпочтительно с 5 мл - 10 мл воды (что соответствует антисмысловому олигомеру согласно изобретению в концентрации от 12,5 мг/мл до 25 мг/мл или от 25 мг/мл до 50 мг/мл), с последующим их использованием.

[0181]

Если фармацевтическая композиция согласно изобретению и/или фармацевтическая комбинация согласно изобретению находится в сухой форме, то для приготовления фармацевтической композиции согласно изобретению и/или фармацевтической комбинации согласно изобретению в форме водного раствора, например, 125 мг или 250 мг олигомера-супрессора согласно изобретению в сухом виде могут быть смешаны с 0,5-100 мл воды (что соответствует олигомеру-супрессору согласно изобретению в концентрации от 1,25 мг/мл до 250 мг/мл или от 2,5 мг/мл до 500 мг/мл), предпочтительно с 1 мл - 50 мл воды (что соответствует олигомеру-супрессору согласно изобретению в концентрации от 2,5 мг/мл до 125 мг/мл или от 5 мг/мл до 250 мг/мл), а более предпочтительно с 5 мл - 10 мл воды (что соответствует олигомеру-супрессору согласно изобретению в концентрации от 12,5 мг/мл до 25 мг/мл или от 25 мг/мл до 50 мг/мл), с последующим их использованием.

[0182]

Концентрации антисмыслового олигомера согласно изобретению и олигомера-супрессора согласно изобретению, содержащихся в фармацевтической композиции согласно изобретению и/или фармацевтической комбинации согласно изобретению, могут представлять собой соответствующие концентрации антисмыслового олигомера согласно изобретению и олигомера-супрессора согласно изобретению или они могут представлять собой общую концентрацию антисмыслового олигомера согласно изобретению и олигомера-супрессора согласно изобретению.

[0183]

Помимо антисмыслового олигомера согласно изобретению и/или антисмыслового олигомера-супрессора согласно изобретению и носителя, описанных выше, в фармацевтическую композицию согласно изобретению и/или в фармацевтическую комбинацию согласно изобретению могут быть также, но необязательно, введены фармацевтически приемлемые добавки. Примерами таких добавок являются эмульгаторы (например, жирные кислоты, содержащие от 6 до 22 атомов углерода, и их фармацевтически приемлемые соли, альбумин и декстран), стабилизаторы (например, холестерин, фосфатидная кислота, маннит и сорбит), агенты, придающие изотоничность (например, хлорид натрия, глюкоза, мальтоза, лактоза, сахароза и трегалоза) и агенты, регулирующие pH (например, соляная кислота, серная кислота, фосфорная кислота, уксусная кислота, гидроксид натрия, гидроксид калия и триэтаноламин). При этом, могут быть использованы одна или более из этих добавок. Содержание добавок в композиции согласно изобретению соответственно составляет 90 масс.% или менее, предпочтительно 70 масс.% или менее, а более предпочтительно 50 масс.% или менее.

[0184]

Фармацевтическая композиция согласно изобретению и/или фармацевтическая комбинация согласно изобретению могут быть приготовлены путем добавления антисмыслового олигомера согласно изобретению и/или антисмыслового олигомера-супрессора согласно изобретению к дисперсии носителя, с последующим адекватным перемешиванием смеси. Добавки могут быть добавлены на соответствующей стадии либо до, либо после добавления антисмыслового олигомера согласно изобретению и/или антисмыслового олигомера-супрессора согласно изобретению. Водный растворитель, который может быть использован при добавлении антисмыслового олигомера согласно изобретению и/или антисмыслового олигомера-супрессора согласно изобретению, не имеет конкретных ограничений, при условии, что он будет фармацевтически приемлемым, и примерами таких растворителей являются вода для инъекций или дистиллированная вода для инъекций, жидкий электролит, такой как физиологический раствор и т.п., и жидкий сахар, такой как глюкозная жидкость, мальтозная жидкость и т.п. Специалист в данной области может самостоятельно выбрать условия pH и температуры для такого вещества.

[0185]

Фармацевтическая композиция согласно изобретению и/или фармацевтическая комбинация согласно изобретению могут быть приготовлены, например, в жидкой форме и в виде лиофилизованного препарата. Лيوфилизованный препарат может быть приготовлен путем лиофилизации композиции согласно изобретению в жидкой форме обычным способом. Лيوфилизация может быть осуществлена, например, путем соответствующей стерилизации композиции согласно изобретению в жидкой форме, дозирования аликвоты во флакон-контейнер, проведения предварительного замораживания в течение 2 часов в условиях при температуре приблизительно от  $-40^{\circ}\text{C}$  до  $-20^{\circ}\text{C}$ , проведения первичной сушки при температуре приблизительно от  $0^{\circ}\text{C}$  до  $10^{\circ}\text{C}$  при пониженном давлении, а затем вторичной сушки при температуре приблизительно от  $15^{\circ}\text{C}$  до  $25^{\circ}\text{C}$  при пониженном

давлении. Обычно, лиофилизированный препарат композиции согласно изобретению может быть получен путем замены содержимого флакона газообразным азотом с последующей герметичной упаковкой.

[0186]

Лиофилизированный препарат фармацевтической композиции согласно изобретению и/или фармацевтической комбинации согласно изобретению может быть использован, в основном после восстановления, путем добавления, но необязательно, подходящего раствора (жидкости для восстановления) и повторного растворения препарата. Такая жидкость для восстановления включает воду для инъекций, физиологический раствор и другие инфузионные жидкости. Объем восстанавливающей жидкости может варьироваться в зависимости от предполагаемого применения и т.п., и не имеет конкретных ограничений, но обычно он в 0,5-2 раза превышает объем до лиофилизации или не превышает 500 мл.

[0187]

При этом, желательно регулировать дозу вводимой фармацевтической композиции согласно изобретению и/или фармацевтической комбинации согласно изобретению, принимая во внимание следующие факторы: тип и лекарственную форму антисмыслового олигомера согласно изобретению и/или антисмыслового олигомера-супрессора согласно изобретению; состояние пациентов, включая возраст, массу тела и т.п., способ введения, а также особенности и тяжесть заболевания. Разовая доза, рассчитанная как количество антисмыслового олигомера согласно изобретению и/или антисмыслового олигомера-супрессора согласно изобретению, может составлять от 0,1 мг до 1 г на кг массы тела, предпочтительно от 1 мг до 100 мг на кг массы тела, более предпочтительно от 1 мг до 90 мг на кг массы тела, а особенно предпочтительно от 1 мг до 80 мг на кг массы тела. Частота введения может составлять один раз в 1-3 дня, один раз в неделю или один раз в 2-3 недели. Этот числовой диапазон может иногда изменяться в зависимости от типа заболевания, подлежащего лечению, способа введения и молекулы-мишени. Следовательно, в некоторых случаях, может быть достаточно дозы или частоты введения ниже указанного диапазона, и, наоборот, иногда может потребоваться доза или частота введения выше указанного диапазона.

[0188]

В еще одном варианте, относящемся к фармацевтической композиции согласно изобретению и/или фармацевтической комбинации согласно изобретению, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей вектор, способный экспрессировать антисмысловый олигомер согласно изобретению, и/или антисмысловый олигомер-супрессор согласно изобретению, и носитель, описанный выше. Такой экспрессионный вектор может представлять собой вектор, способный экспрессировать множество антисмысловых олигомеров согласно изобретению и/или антисмысловых олигомеров-супрессоров согласно изобретению. Композиция может быть приготовлена вместе с фармацевтически приемлемыми добавками, как и в случае композиции согласно изобретению, содержащей антисмысловый олигомер согласно изобретению и/или

антисмысловой олигомер-супрессор согласно изобретению. Концентрация экспрессионного вектора, содержащегося в композиции, может варьироваться в зависимости от типа носителя и т.п. и обычно находится в диапазоне от 0,1 нМ до 100 мкМ, предпочтительно в диапазоне от 1 нМ до 10 мкМ, а более предпочтительно в диапазоне от 10 нМ до 1 мкМ. Массовое соотношение экспрессионного вектора, содержащегося в композиции, и носителя (носитель/экспрессионный вектор) может варьироваться в зависимости от свойства экспрессионного вектора, типа носителя и т.п. и соответственно составляет в диапазоне от 0,1 до 100, предпочтительно в диапазоне от 1 до 50, а более предпочтительно в диапазоне от 10 до 20. Содержание носителя, присутствующего в композиции, является таким же, как и в случае композиции согласно изобретению, содержащей антисмысловой олигомер согласно изобретению и/или антисмысловой олигомер-супрессор согласно изобретению, и способ их получения является таким же, как и способ получения композиции согласно изобретению.

[0189]

4. Представляющая интерес пре-мРНК, отличающаяся от пре-мРНК дистрофина человека

В настоящей заявке конкретно описан случай, в котором, представляющая интерес пре-мРНК представляет собой пре-мРНК дистрофина человека, но такая пре-мРНК не имеет конкретных ограничений. Что касается представляющей интерес пре-мРНК, отличающейся от пре-мРНК дистрофина человека, то способы конструирования, получения и применения антисмыслового олигомера и антисмыслового олигомера-супрессора могут быть осуществлены в соответствии с методиками и способами, раскрытыми в настоящей заявке или известными специалистам в данной области. Специалисты в данной области могут также разработать, получить и использовать антисмысловой олигомер или антисмысловой олигомер-супрессор для представляющей интерес пре-мРНК, отличающейся от пре-мРНК дистрофина человека, на основе технологий и способов, раскрытых в настоящей заявке или известных специалистам в данной области. Аналогичным образом, специалисты в данной области могут осуществить пропуск множества экзонов из представляющей интерес пре-мРНК с использованием антисмыслового олигомера, и повысить эффективность пропуска множества экзонов с использованием антисмыслового олигомера-супрессора на основе технологий и способов, раскрытых в настоящей заявке или известных специалистам в данной области.

[0190]

Используемыми здесь примерами представляющих интерес пре-мРНК являются пре-мРНК  $\gamma$ —саркогликана человека (SGCG), пре-мРНК Notch3 человека и пре-мРНК дистрофина человека. В определенном варианте осуществления настоящего изобретения, представляющей интерес пре-мРНК может быть пре-мРНК дистрофина человека. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, представляющей интерес пре-мРНК может быть пре-мРНК SGCG или Notch3 человека.

[0191]

Последовательности оснований областей-мишеней антисмыслового олигомера для использования при пропуске множества экзонов в представляющей интерес пре-мРНК SGCG или Notch3 человека приведены ниже.

[0192]

В настоящем изобретении, области-мишени в пре-мРНК SGCG человека показаны ниже как SEQ ID NO: 283 и 284.

[0193]

[Таблица 8]

Область-мишень	Последовательность оснований области-мишени	SEQ ID NO
Область рядом с акцептором интрона 3 (область в диапазоне от -400 оснований до +50 оснований с 3'-концом интрона 3, определенного как положение основания 0)	ATTACAAAAATATGGAATAGAGAGTAGCAGGAAAAAGTATATGGCATT TCTATTACCTAGAACCCCACTGTTGTAGGTGTCTTTCCCTTGACATAGCT GTGACCATATAGCTCTGTTAAATTGCATATTTGTCTAAATAATTCATAT TTTTTCTATCCCTATCTTGGGTTTGGAGCTCATTTTATGATTGTTATT CTTTTATCTTTCAATAAATACTCAAAAATGTTAAAAAATATGATTGATT AATTTTTAATTGCTTAGCCACAAAATTTATAGGATTTCCAGGATCTGTA ACAATGGATAAATAATTTTATAAAAATCCTAAATTTACACAGAATTATA AAGATATAATCATTTTAAACAGCACCTATTTTGCAAATTTTATAAATCT CTTTCTAGGACTCATCTCTGTTCTACAATCAACCCAGAATGTGACTGT AAATGCGCG	283
Область рядом с донором интрона 4 (область в диапазоне от -20 оснований до + 400 оснований с 5'-концом интрона 4, определенного как положение основания 0)	CACAGGCAGGTTAAAAAGTCGGTGAGTCCAGCTTCATCATGGTGCTTTGC ATGCATGTTGTCCATGAATAGTGCTAAATGAATGCATTGTTTTTCTTC TAAAGAAATCAAAGCTACTTATGAACAAAATATGAATTTTCTAAATATC ATGCTGTGTTGACCACAGACTAGCACCCACAGACTGGGGTGGGGGGTGAG GGGACAGCCTGAAAGTCTTTGATTAGAGTTATTTTGTCCAAGAAATA GAGGACAATTAAGCTAGTACAAGAAACAAAATGTTTATTGTGGGTTAC CAAAGACTCTTGCAGCAACCAAAGGGAAGGAACCCAAAGTAGCTGGCCTC AAAGAGCACAGAGACCAGTGGCTGAGAGCCACGAATACATTTCAGTTCCC TCCCCTTCTTTCTCTCTTTTCTCTCC	284

[0194]

В настоящем изобретении, области-мишени в пре-мРНК Notch3 человека представлены ниже.

[0195]

[Таблица 9]

Область-мишень	Последовательность оснований области-мишени	SEQ ID NO
Область рядом с акцептором интрона 3 (область в диапазоне от -400 оснований до +50 оснований с 3'-концом интрона 3, определенного как положение основания 0)	AAAGTGATCTGCCCGCCGAGCCCTCCCAAAGTTCTGGGATTACAGGCCGTG AGCCACTGCTCCCAGCAAATGTGTGTTTCTGCTCTGTTTCCCTGCCGTG TTTCTTGCCGTGTCTTGTGTGTATCTTTGTGTCTGGGGCCATCCTGCCCT GTGCTGCCAAACCAAGCCATCTCTGCCACAGGTGCCCGCCTGGCTGGG TGGGTGAGCGGTGTCACTGGAGGACCCCTGTCACTCAGGCCCTGTGC TGGCCGTGGTGTCTGCCAGAGTTCACTGGTGGCTGGCACCCGCCGATTC TCATGCCGGTGCCCCCGTGGCTTCCGAGGTGAGAGGGGAAGAGTCTGGA GGGGAGGTAGTCGGGGGTGTGGTCACTCCTAAACTCACCCTGTCTGGT CCCTCCAGGCCCTGACTGCTCCCTGCCAGATCCCTGCCCTCAGCAGCCCT TGTGCCAC	285
Область рядом с донором интрона 4 (область в диапазоне от -20 оснований до +400 оснований с 5'-концом интрона 4, определенного как положение основания 0)	CGACTGTGCCTGTCTTCTGGTGAGTGAGCCCTACTCAGGAGAGTCAGA GGGGTGGCCGTGGGGACAGCAGGCCAGCCCGCGGTGACCATCCTTGCC CCCTTCCCTGTAGGGTTTGAGGGTCAGAATTGTGAAGTGAACGTGGAC GACTGTCCAGGACACCGATGTCTCAATGGGGGACATGCGTGGATGGCG TCAACACCTATAACTGCCAGTGCCTCCTGAGTGGACAGGTGGGCACTG CGCCAGAGGGAGCGGGAGGCAGGCCCTCGGGTGGACATGCCCCAGGTG GCTGGACTGCTGCATCTGTGTGCCACAGGCCAGTTCTGCACGGAGGACG TGGATGAGTGTCACTGCAGCCCAACGCCCTGCCACAATGGGGGTACCTG CTTCAACACGCTGGGTGGCCACAGCTGC	286

[0196]

Антисмысловый олигомер для человеческого SGCG индуцирует пропуск нескольких экзонов из пре-мРНК человеческого SGCG, например, в диапазоне от -400 до +50 оснований с 3'-концом интрона 3, определенным как положение основания, и, как конкретный пример, представляет собой антисмысловый олигомер для человеческого SGCG, состоящий из

(L1) любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 287-308, или

(L2) последовательности оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой одной последовательностью оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 287-308, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины л ю б о й одной выбранной последовательности оснований, или

его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

[0197]

В данном случае, последовательность оснований (L2) представляет собой последовательность оснований мутантного типа (L1). Такой мутант также включает:

(L2-1) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 287-308, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины л ю б о й одной выбранной последовательности оснований,

(L2-2) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 86% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 287-308, и имеет длину в пределах  $\pm 14\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(L2-3) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 87% идентична



любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 287-308, и имеет длину в пределах  $\pm 3\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(L2-14) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 98% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 287-308, и имеет длину в пределах  $\pm 2\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(L2-15) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 99% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 287-308, и имеет длину в пределах  $\pm 1\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований, и

(L2-16) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 99,5% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 287-308, и имеет длину в пределах  $\pm 0,5\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований.

[0198]

Таким образом, еще одним вариантом антисмыслового олигомера для человеческого SGCG является антисмысловый олигомер для человеческого SGCG, состоящий из любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из (L1) и (L2-1)-(L2-16), или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат. Антисмысловый олигомер для человеческого SGCG входит в объем настоящего изобретения.

[0199]

Антисмысловый олигомер-супрессор, который подавляет одиночный пропуск из пр е-мРНК человеческого SGCG (антисмысловый олигомер-супрессор для человеческого SGCG), нацелен, например, на последовательность-сайленсер сплайсинга интрона 4 или на сайт сплайсинга одиночного пропуска, и, в качестве конкретного примера, представляет собой антисмысловый олигомер-супрессор для человеческого SGCG, состоящий из

(M1) любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 331-335, или

(M2) последовательности оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 331-335, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований, или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

[0200]

В данном случае, последовательность оснований (M 2) представляет собой последовательность оснований мутантного типа (M1). Такой мутант также включает:

(M2-1) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 331-335, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины л ю б о й одной выбранной последовательности оснований,



(M2-12) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 96% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 331-335, и имеет длину в пределах  $\pm 4\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(M2-13) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 97% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 331-335, и имеет длину в пределах  $\pm 3\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(M2-14) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 98% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 331-335, и имеет длину в пределах  $\pm 2\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(M2-15) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 99% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 331-335, и имеет длину в пределах  $\pm 1\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований, и

(M2-16) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 99,5% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 331-335, и имеет длину в пределах  $\pm 0,5\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований.

[0201]

Таким образом, еще одним вариантом антисмыслового олигомера-супрессора для человеческого SGCG является антисмысловый олигомер-супрессор для человеческого SGCG, состоящий из любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из (M1) и (M2-1)-(M2-16), или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат. Антисмысловый олигомер-супрессор для человеческого SGCG входит в объем настоящего изобретения. Антисмысловый олигомер-супрессор для человеческого SGCG входит в объем настоящего изобретения. Антисмысловый олигомер-супрессор для человеческого SGCG обладает способностью повышать эффективность множественного пропуска из пре-мРНК SGCG.

[0202]

Антисмысловый олигомер для человеческого Notch3, который индуцирует пропуск множества экзонов из пре-мРНК человеческого Notch3, нацелен, например, на область рядом с акцептором интрона 3, то есть, в диапазоне от -400 до +50 оснований с 3'-концом интрона 3, определенным как положение оснований, и представляет собой, например, антисмысловый олигомер для человеческого Notch3, состоящий из

(N1) любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 309-330, или

(N2) последовательности оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:

309-330, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований, или

его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

[0203]

В данном случае, последовательность оснований (N2) представляет собой последовательность оснований мутантного типа (N1). Такой мутант также включает:

(N2-1) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 309-330, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(N2-2) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 86% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 309-330, и имеет длину в пределах  $\pm 14\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(N2-3) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 87% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 309-330, и имеет длину в пределах  $\pm 13\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(N2-4) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 88% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 309-330, и имеет длину в пределах  $\pm 12\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(N2-5) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 89% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 309-330, и имеет длину в пределах  $\pm 11\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(N2-6) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 90% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 309-330, и имеет длину в пределах  $\pm 10\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(N2-7) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 91% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 309-330, и имеет длину в пределах  $\pm 9\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(N2-8) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 92% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 309-330, и имеет длину в пределах  $\pm 8\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(N2-9) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 93% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:

309-330, и имеет длину в пределах  $\pm 7\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(N2-10) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 94% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 309-330, и имеет длину в пределах  $\pm 6\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(N2-11) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 95% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 309-330, и имеет длину в пределах  $\pm 5\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(N2-12) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 96% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 309-330, и имеет длину в пределах  $\pm 4\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(N2-13) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 97% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 309-330, и имеет длину в пределах  $\pm 3\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(N2-14) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 98% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 309-330, и имеет длину в пределах  $\pm 2\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(N2-15) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 99% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 309-330, и имеет длину в пределах  $\pm 1\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований и

(N2-16) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 99,5% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 309-330, и имеет длину в пределах  $\pm 0,5\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований.

[0204]

Таким образом, еще одним вариантом бессмысленного олигомера для человеческого Notch3 является бессмысленный олигомер для человеческого Notch3, состоящий из любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из (N1) и (N2-1)-(N2-16), или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат. Бессмысленный олигомер для человеческого Notch3 входит в объем настоящего изобретения.

[0205]

Бессмысленный олигомер-супрессор, который подавляет одиночный пропуск из пр-е-мРНК человеческого Notch3 (бессмысленный олигомер-супрессор для человеческого Notch3), нацелен, например, на последовательность-сайленсер сплайсинга интрона 4 или с

айт сплайсинга одиночного пропуска, и, в качестве конкретного примера, представляет собой антисмысловой олигомер-супрессор для человеческого Notch3, состоящий из

(O1) любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 336-340, или

(O2) последовательности оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 336-340, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований, или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

[0206]

В данном случае, последовательность оснований (O2) представляет собой последовательность оснований мутантного типа (O1). Такой мутант также включает:

(O2-1) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 336-340, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(O2-2) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 86% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 336-340, и имеет длину в пределах  $\pm 14\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(O2-3) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 87% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 336-340, и имеет длину в пределах  $\pm 13\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(O2-4) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 88% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 336-340, и имеет длину в пределах  $\pm 12\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(O2-5) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 89% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 336-340, и имеет длину в пределах  $\pm 11\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(O2-6) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 90% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 336-340, и имеет длину в пределах  $\pm 10\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(O2-7) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 91% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 336-340, и имеет длину в пределах  $\pm 9\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(O2-8) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 92% идентична

любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 336-340, и имеет длину в пределах  $\pm 8\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(O2-9) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 93% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 336-340, и имеет длину в пределах  $\pm 7\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(O2-10) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 94% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 336-340, и имеет длину в пределах  $\pm 6\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(O2-11) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 95% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 336-340, и имеет длину в пределах  $\pm 5\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(O2-12) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 96% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 336-340, и имеет длину в пределах  $\pm 4\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(O2-13) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 97% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 336-340, и имеет длину в пределах  $\pm 3\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(O2-14) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 98% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 336-340, и имеет длину в пределах  $\pm 2\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований,

(O2-15) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 99% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 336-340, и имеет длину в пределах  $\pm 1\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований и

(O2-16) последовательность оснований, которая по меньшей мере на 99,5% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 336-340, и имеет длину в пределах  $\pm 0,5\%$  от длины любой одной выбранной последовательности оснований.

[0207]

Таким образом, еще одним вариантом бессмысленного олигомера-супрессора для человеческого Notch3 является бессмысленный олигомер-супрессор для человеческого Notch3, состоящий из любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из (O1) и (O2-1)-(O2-16), или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат.

Антисмысловой олигомер-супрессор для человеческого Notch3 входит в объем настоящего изобретения. Антисмысловой олигомер-супрессор для человеческого Notch3 способен повышать эффективность множественного пропуска из пре-мРНК Notch3.

[0208]

Последовательности оснований SEQ ID NO: 287-340 представлены ниже.

SEQ ID NO	Последовательность-мишень	Последовательность оснований
287	SCGCex4_(-400) - (-371)	TGCTACTCTCTATTTCCATATTTTGTAAAT
288	SCGCex4_(-380) - (-351)	AAATGCCATATACTTTTTCTGCTACTCTC
289	SCGCex4_(-360) - (-331)	AGTGGGGTTCTAGGTAATAGAAATGCCATA
290	SCGCex4_(-340) - (-311)	CAAGGAAAGACACCTACAACAGTGGGGTTC
291	SCGCex4_(-320) - (-291)	CTATATGGTCACAGCTATGTCAAGGAAAGA
292	SCGCex4_(-300) - (-271)	AAATATGCAATTAACAGAGCTATATGGTC
293	SCGCex4_(-280) - (-251)	AAAATATGAATTATTTAGACAAATATGCAA
294	SCGCex4_(-260) - (-231)	ACGCAAGATAGGGATAGAAAAAATATGAA
295	SCGCex4_(-240) - (-211)	AATCATAAAATGAGCTCCAACGCAAGATA
296	SCGCex4_(-220) - (-191)	TGAAAGATAAAA GAATAACAATCATAAAA
297	SCGCex4_(-200) - (-171)	TTAACATTTTGAGTATTTATTGAAAGATA
298	SCGCex4_(-180) - (-151)	AAATTCCTGAATCATATTTTTTTAACATTT
299	SCGCex4_(-160) - (-131)	TTTGTGGCTAAGACAATAAAAATTCCTGA
300	SCGCex4_(-140) - (-111)	GATCCTGGAATCCTATAAATTTGTGGCTA
301	SCGCex4_(-120) - (-91)	ATTATTTATCCATTGTTACAGATCCTGGAA
302	SCGCex4_(-100) - (-71)	AAATTTAGGATTTTATAAAAATTTATTC
303	SCGCex4_(-80) - (-51)	ATATCTTTATAATCTGTGTAATTTAGGA
304	SCGCex4_(-60) - (-31)	AGGTGCTGTTTAAAATGATTATATCTTTAT
305	SCGCex4_(-40) - (-11)	ATTTATAAAAATTTGCAAAATAGGTCTGTT
306	SCGCex4_(-20) - 10	GAGATGAGTCTTAGAAAGAGATTTATAAAA
307	SCGCex4_1-30	CTGGGTTGATTGTAGAAGCAGAGATGAGTC
308	SCGCex4_21-50	CGCGCATTTACAGTCACATTTCTGGGTTGAT
309	Notch3ex4_(-400) - (-371)	CTTTGGGAGGCTGCGCGGGCAGATCACTT
310	Notch3ex4_(-380) - (-351)	TCACGCCTGTAATCCAGAATTTGGGAGG
311	Notch3ex4_(-360) - (-331)	CATTTGCTGGGAGCAGTGGCTCACGCCTGT
312	Notch3ex4_(-340) - (-311)	GAAACAGAGCAGCAAAACACACATTTGCTGG
313	Notch3ex4_(-320) - (-291)	ACAGGCAAGAAACACGCAGGGAACAGAGC
314	Notch3ex4_(-300) - (-271)	GACACAAAGATACACACAAGACAGGCAAGA
315	Notch3ex4_(-280) - (-251)	CACAGGGCAGGATGGCCCCAGACACAAGA
316	Notch3ex4_(-260) - (-231)	GAGATGGCTTGGTTGGGCAGCACAGGGCAG
317	Notch3ex4_(-240) - (-211)	CAGCCGGGCACCTGTGGGCAGAGATGGCTT
318	Notch3ex4_(-220) - (-191)	ACACCGCTCACCCACCCAGCCAGGCGGGCA
319	Notch3ex4_(-200) - (-171)	TGACAGGGGTCCTCCAGCTGACACCGCTCA
320	Notch3ex4_(-180) - (-151)	GGCCAGCACAGGGGCTGAGTGACAGGGGT
321	Notch3ex4_(-160) - (-131)	TGAACTCTGGCAGACACCACGGCCAGCACA
322	Notch3ex4_(-140) - (-111)	CGGGCGGTGCCAGCCACCACTGAACTCTGG
323	Notch3ex4_(-120) - (-91)	GGGGCACCCGGCATGAGAATCGGGCGGTGC
324	Notch3ex4_(-100) - (-71)	CCTCTCACCTCGGAAGCCACGGGGGCACCG
325	Notch3ex4_(-80) - (-51)	CCTCCCCTCCAGACTCTTCCCCTCTCACCT
326	Notch3ex4_(-60) - (-31)	ACTGACCACACCCCGACTACCTCCCCTCC
327	Notch3ex4_(-40) - (-11)	CAGGACAGGGTGAGTTTAGGACTGACCACA
328	Notch3ex4_(-20) - 10	CAGTCAGGGCCTGGAGGGACCAGGACAGGG
329	Notch3ex4_1-30	GGCAGGGATCTGGCAGGAGCAGTCAGGCC
330	Notch3ex4_21-50	GTGGGCACAAGGGCTGCTGAGGCAGGGATC
331	SGCGex4_216-246	TGTGGTGCTAGTCTGTGGTCAACACAGCAT
332	SGCGex4_226-256	CACCCCACTCTGTGGTGCTAGTCTGTGGTC
333	SGCGex4_236-266	CCTCACCCCCACCCCACTCTGTGGTGCTA

334	SGCGex4_246-276	CAGGCTGTCCCCTCACCCCCACCCCACTC
335	SGCGex4_256-286	CAAAGCACTTCAGGCTGTCCCCTCACCCCC
336	Notch3ex4_397-426	AGGGAAGGGGCAAGGATGGTCACCGCCGG
337	Notch3ex4_407-436	CAAACCCCTAGCAGGGAAGGGGCAAGGATG
338	Notch3ex4_417-446	TCTGACCCCTCAAACCCCTAGCAGGGAAGGGG
339	Notch3ex4_427-456	ACTTCACAATTCTGACCCCTCAAACCCCTAGC
340	Notch3ex4_437-466	GTCCACGTTCACTTCACAATTCTGACCCCTC

[0209]

#### 5. Способ повышения эффективности пропуска множества экзонов

Настоящее изобретение относится к способу повышения эффективности пропуска двух или более следующих друг за другом экзонов, где указанный способ включает:

ингибирование последовательности-сайленсера сплайсинга, последовательности сайта сплайсинга или последовательности сайта ветвления представляющей интерес пре-мРНК, если два или более следующих друг за другом экзона пропускаются из представляющей интерес пре-мРНК (далее этот способ будет называться «способом повышения эффективности согласно изобретению»).

[0210]

В способе повышения эффективности согласно изобретению, пропуск двух или более следующих друг за другом экзонов в представляющей интерес пре-мРНК может быть осуществлено с использованием антисмыслового олигомера, который индуцирует пропуск множества экзонов, например, с использованием антисмыслового олигомера согласно изобретению или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата.

[0211]

Способ повышения эффективности согласно изобретению может повышать эффективность пропуска множества экзонов посредством ингибирования последовательности-сайленсера сплайсинга, последовательности сайта сплайсинга или последовательности сайта ветвления в представляющей интерес пре-мРНК и, таким образом, подавления одиночного пропуска. Способ повышения эффективности согласно изобретению включает ингибирование функции последовательности-сайленсера сплайсинга, последовательности сайта сплайсинга или последовательности сайта ветвления в представляющей интерес пре-мРНК, и, более конкретно, он включает подавление пропуска одного экзона посредством нацеливания на эти последовательности с использованием антисмыслового олигомера-супрессора.

[0212]

В способе повышения эффективности согласно изобретению, ингибирование последовательности-сайленсера сплайсинга, сайта сплайсинга или последовательности сайта ветвления может быть осуществлено с использованием антисмыслового олигомера-супрессора, такого как антисмысловый олигомер-супрессор согласно изобретению, или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат.

[0213]

В способе повышения эффективности согласно изобретению, олигомер,

содержащий последовательность оснований, комплементарную последовательности-сайленсера сплайсинга, последовательности сайта ветвления или последовательности сайта сплайсинга в представляющей интерес пре-мРНК, может быть использован в качестве антисмыслового олигомера-супрессора для ингибирования последовательности-сайленсера сплайсинга, последовательности сайта ветвления или последовательности сайта сплайсинга.

[0214]

Последовательность-сайленсер сплайсинга, последовательность сайта ветвления и последовательность сайта сплайсинга являются такими, как это указано выше. В определенном варианте способа повышения эффективности согласно изобретению, последовательность-сайленсер сплайсинга может представлять собой последовательность распознавания гетерогенного ядерного рибонуклеопротеина A1 (hnRNP A1). Примеры последовательности распознавания человеческого hnRNP A1 представлены в SEQ ID NO: 370-379.

[0215]

Термин «использование» или «используемый», если он относится к антисмысловому олигомеру и антисмысловому олигомеру-супрессору в способе повышения эффективности согласно изобретению, означает, что клетки, экспрессирующие представляющую интерес пре-мРНК, могут включать антисмысловой олигомер и антисмысловой олигомер-супрессор, так что это будет приводить к пропуску экзонов из представляющей интерес пре-мРНК. Примерами способов включения в клетки антисмыслового олигомера и антисмыслового олигомера-супрессора являются способы введения с использованием катионных носителей, таких как катионные липосомы, катионные полимеры и т.п., или носители с вирусной оболочкой. Катионные липосомы представляют собой, например, липосомы, состоящие из 2-О-(2-диэтиламиноэтил)карбамоил-1,3-О-диолеоилглицерина и фосфолипидов в качестве основных компонентов (далее называемые «липосомой А»); Олигофектамин (зарегистрированный торговый знак) (производства Invitrogen Corp.), Липофектин (зарегистрированный торговый знак) (производства Invitrogen Corp.), Липофектамин (зарегистрированный торговый знак) (производства Invitrogen Corp.), Липофектамин 2000 (зарегистрированный торговый знак) (производство Invitrogen Corp.), DMRIE-C (зарегистрированный торговый знак) (производитель Invitrogen Corp.), GeneSilencer (зарегистрированный торговый знак) (производитель Gene Therapy Systems), TransMessenger (зарегистрированный торговый знак) (производитель QIAGEN, Inc.), TransIT ТКО (зарегистрированный торговый знак) (производитель Mirus) и Nucleofector II (Lonza). Среди прочих, предпочтительной является липосома А. Примерами катионных полимеров являются JetSI (зарегистрированный торговый знак) (производитель Qbiogene, Inc.) и Jet-PEI (зарегистрированный торговый знак) (полиэтиленимин, производимый Qbiogene, Inc.). Примерами носителей с вирусной оболочкой является GenomeOne (зарегистрированный торговый знак) (липосома HVJ-E, производства Ishihara Sangyo). В

качестве альтернативы также могут быть использованы медицинские устройства, описанные в японском патенте № 2924179, и катионные носители, описанные в японских внутренних повторных публикациях РСТ № 2006/129594 и 2008/096690.

[0216]

К способу, позволяющему клеткам, экспрессирующим представляющие интерес пре-мРНК, в организме пациента, включать антисмысловой олигомер и антисмысловой олигомер-супрессор, можно отнести способ введения, описанный в разделе «3. Применение в медицине».

[0217]

В способе повышения эффективности согласно изобретению, ингибирование последовательности-сайленсера сплайсинга, последовательности сайта сплайсинга или последовательности сайта ветвления в представляющей интерес пре-мРНК повышает эффективность пропуска множества экзонов на 2% или выше, 4% или выше, 6% или выше, 8% или выше, 10% или выше, 12% или выше, 14% или выше, 16% или выше, 18% или выше, 20% или выше, 22% или выше, 24% или выше, 26% или выше, 28% или выше, 30% или выше, 32% или выше, 34% или выше, 36% или выше, 38% или выше, 40% или выше, 42% или выше, 44% или выше, 46% или выше, 48% или выше, 50% или выше, 52% или выше, 54% или выше, 56% или выше, 58% или выше, 60% или выше, 62% или выше, 64% или выше, 66% или выше, 68% или выше, 70% или выше, 72% или выше, 74% или выше, 76% или выше, 78% или выше, 80% или выше, 82% или выше, 84% или выше, 86% или выше, 88% или выше, 90% или выше, 92% или выше, 94% или выше, 96% или выше, 98% или выше или 100% или выше, если эффективность, достигнутая без ингибирования, принята за 100%.

[0218]

В способе повышения эффективности согласно изобретению, п р и м е р а м и представляющей интерес пре-мРНК являются пре-мРНК человеческого  $\gamma$ —саркогликана (SGCG), пре-мРНК человеческого Notch3 и пре-мРНК дистрофина человека. В определенном варианте осуществления изобретения, представляющей интерес пре-мРНК является пре-мРНК дистрофина человека. Если представляющей интерес пре-мРНК является пре-мРНК дистрофина человека, то два или более расположенных друг за другом экзонов представляют собой экзоны, выбранные из группы, состоящей из экзонов с 45-го по 55-й в пре-мРНК дистрофина человека.

### **Примеры**

[0219]

Далее, настоящее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на приведенные ниже примеры и примеры испытаний, которые не должны рассматриваться как ограничение объема изобретения.

[0220]

**[Пример 1: Получение антисмыслового олигомера]**

Получение 4-{[(2S,6R)-6-(4-бензамидо-2-оксопиримидин-1(2H)-ил)-4-

триморфолин-2-ил]метокси}-4-оксобутановой кислоты, нанесенной на аминополестириловую смолу (Соединения 1)

Стадия 1: Получение 4-{[(2S,6R)-6-(4-бензамидо-2-оксопиримидин-1(2H)-ил)-4-триморфолин-2-ил]метокси}-4-оксобутановой кислоты

В атмосфере аргона, 3,44 г N-{1-[(2R,6S)-6-(гидроксиметил)-4-триморфолин-2-ил]-2-оксо-1,2-дигидропиримидин-4-ил}бензамида и 1,1 г 4-диметиламинопиридина (4-DMAP) суспендировали в 50 мл дихлорметана и к суспензии добавляли 0,90 г ангидрида янтарной кислоты с последующим перемешиванием при комнатной температуре в течение 3 часов. К реакционной смеси добавляли 10 мл метанола и смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток экстрагировали этилацетатом и 0,5 М водным раствором дигидрофосфата калия. Полученный органический слой последовательно промывали 0,5 М водным раствором дигидрофосфата калия, водой и солевым раствором в указанном порядке. Полученный органический слой сушили над сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении с получением 4,0 г продукта.

Стадия 2: Получение 4-{[(2S,6R)-6-(4-бензамидо-2-оксопиримидин-1-ил)-4-триморфолин-2-ил]метокси}-4-оксобутановой кислоты, нанесенной на аминополестириловую смолу

После растворения 4,0 г 4-{[(2S,6R)-6-(4-бензамидо-2-оксопиримидин-1(2H)-ил)-4-триморфолин-2-ил]метокси}-4-оксобутановой кислоты в 200 мл пиридина (дегидратированного), к раствору добавляли 0,73 г 4-DMAP и 11,5 г гидрохлорида 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида. Затем, к смеси добавляли 25,0 г аминополестириловой смолы Primer support 200 производства GE Healthcare Japan Co., Ltd., 17-5214-97) и 8,5 мл триэтиламина с последующим встряхиванием при комнатной температуре в течение 4 дней. После завершения реакции, смолу удаляли фильтрованием. Полученную смолу последовательно промывали пиридином, метанолом и дихлорметаном в указанном порядке и сушили при пониженном давлении. К полученной смоле добавляли 200 мл тетрагидрофурана (дегидратированного), 15 мл ангидрида уксусной кислоты и 15 мл 2,6-лутидина, и смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Смолу отфильтровывали, последовательно промывали пиридином, метанолом и дихлорметаном в указанном порядке и сушили при пониженном давлении с получением 26,7 г представляющего интерес продукта.

Количество загружаемого продукта определяли исходя из молярного количества тритила на грамм смолы путем измерения УФ-поглощения на 409 нм с применением известного метода. Количество загружаемой смолы составляло 129,2 мкмоль/г.

[0221]

Условия измерения УФ

Устройство: U-2910 (Hitachi, Ltd.)

Растворитель: метансульфоновая кислота

Длина волны: 409 нм

Величина  $\epsilon$ : 45000

[0222]

Получение 4-{{(2S,6R)-6-(5-метил-2,4-диоксопиримидин-1-ил)-4-тритилморфолин-2-ил}метокси}-4-оксобутановой кислоты, нанесенной на аминополистироловую смолу (Соединения 2)

Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как и Соединение 1, за исключением того, что в этой стадии, вместо N-{1-[(2R,6S)-6-(гидроксиметил)-4-тритилморфолин-2-ил]-2-оксо-1,2-дигидропиримидин-4-ил}бензамида, используемого на стадии 1 при получении соединения 1, использовали 1-[(2R,6S)-6-(гидроксиметил)-4-тритилморфолин-2-ил]-5-метилпиримидин-2,4(1H,3H)-дион.

Количество загружаемого продукта определяли исходя из молярного количества тритила на грамм смолы путем измерения УФ-поглощения на 409 нм с применением известного метода. Количество загружаемой смолы составляло 164,0 мкмоль/г.

[0223]

Получение 4-{{(2S,6R)-6-(6-бензамидопурин-9-ил)-4-тритилморфолин-2-ил}метокси}-4-оксобутановой кислоты, нанесенной на аминополистироловую смолу (Соединения 3)

Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как и соединение 1, за исключением того, что вместо N-{1-[(2R,6S)-6-(гидроксиметил)-4-тритилморфолин-2-ил]-2-оксо-1,2-дигидропиримидин-4-ил}бензамида, используемого на стадии 1 при получении соединения 1, использовали N-{9-[(2R,6S)-6-(гидроксиметил)-4-тритилморфолин-2-ил]пурин-6-ил}бензамид.

Количество загружаемого продукта определяли исходя из молярного количества тритила на грамм смолы путем измерения УФ-поглощения на 409 нм с применением известного метода. Количество загружаемой смолы составляло 185,7 мкмоль/г.

[0224]

Получение 4-{{(2S,6R)-6-{6-(2-цианозтокси)-2-[(2-феноксиацетил)амино]пурин-9-ил}-4-тритилморфолин-2-ил}метокси}-4-оксобутановой кислоты, нанесенной на аминополистироловую смолу (Соединения 4)

Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как и соединение 1, за исключением того, что на этой Стадии, вместо N-{1-[(2R,6S)-6-(гидроксиметил)-4-тритилморфолин-2-ил]-2-оксо-1,2-дигидропиримидин-4-ил}бензамида, используемого на Стадии 1 при получении соединения 1, использовали N-{6-(2-цианозтокси)-9-[(2R,6S)-6-(гидроксиметил)-4-тритилморфолин-2-ил]пурин-2-ил}-2-феноксиацетамид.

Количество загружаемого продукта определяли исходя из молярного количества тритила на грамм смолы путем измерения УФ-поглощения на 409 нм с применением известного метода. Количество загружаемой смолы составляло 164,8 мкмоль/г.

[0225]

Получение антисмыслового РМО, нацеленного на область, расположенную рядом с донором или акцептором интрона в гене дистрофина человека

Согласно описанию, приведенному ниже, были синтезированы РМО, имеющие

последовательности оснований РМО №№ 1-232 (SEQ ID NO: 1-232), показанные в Таблице 11, и нацеленные на области вблизи доноров или акцепторов интронов 44-55 в пре-мРНК дистрофина человека, как показано в Таблице 10. 5'-конец каждого РМО представлен ниже как Группа (3). Синтезированный РМО растворяли в воде для инъекций (производства Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.).

[Формула 14]



[0226]

Последовательность-мишень оснований антисмыслового олигомера согласно изобретению или антисмыслового олигомера-супрессора согласно изобретению была описана как «На<sub>1</sub>\_b<sub>1</sub>-c<sub>1</sub>», «На<sub>2</sub>\_b<sub>2</sub>-c<sub>2</sub>\_На<sub>3</sub>\_b<sub>3</sub>-c<sub>3</sub>», или «На<sub>4</sub>\_b<sub>4</sub>-c<sub>4</sub>\_На<sub>5</sub>\_b<sub>5</sub>-c<sub>5</sub>\_На<sub>6</sub>\_b<sub>6</sub>-c<sub>6</sub>».

«На<sub>1</sub>\_b<sub>1</sub>-c<sub>1</sub>» представляет собой последовательность-мишень оснований антисмыслового олигомера первого варианта согласно изобретению. «На<sub>1</sub>» означает а-экзон гена дистрофина человека, «b<sub>1</sub>» означает 5'-концевое основание последовательности-мишени оснований, а «c<sub>1</sub>» представляет 3'-концевое основание последовательности-мишени оснований. «На<sub>1</sub>\_b<sub>1</sub>-c<sub>1</sub>» может иметь одно дополнительное основание на своем 3'-конце, и такая последовательность-мишень оснований представлена как «На<sub>1</sub>\_b<sub>1</sub>-c<sub>1</sub>\_N» («N» означает данное основание).

Если «b<sub>1</sub>» и «c<sub>1</sub>» представляют собой положительные целые числа, то каждый «b<sub>1</sub>» и «c<sub>1</sub>» представляет собой число оснований в направлении ниже, если 5'-концевое основание экзона *a* считается 1-м основанием. С другой стороны, если «b<sub>1</sub>» и «c<sub>1</sub>» являются отрицательными числами, то каждый «b<sub>1</sub>» и «c<sub>1</sub>» представляют собой число оснований в направлении выше, если 3'-концевое основание (a-1)-го интрона считается 1-м основанием.

Так, например, «Н45<sub>(-10)</sub>-15» означает последовательность оснований, в которой 5'-конец последовательности-мишени оснований представляет собой 10-е основание в направлении выше от 3'-конца 44-го интрона, и 3'-конец последовательности-мишени оснований представляет собой 15-е основание в направлении ниже от 5'-конца 45-го экзона.

«На<sub>2</sub>\_b<sub>2</sub>-c<sub>2</sub>\_На<sub>3</sub>\_b<sub>3</sub>-c<sub>3</sub>» представляет собой последовательность-мишень оснований антисмыслового олигомера второго варианта согласно изобретению. «На<sub>2</sub>\_b<sub>2</sub>-c<sub>2</sub>», который является первой частью «На<sub>2</sub>\_b<sub>2</sub>-c<sub>2</sub>\_На<sub>3</sub>\_b<sub>3</sub>-c<sub>3</sub>», означает последовательность-мишень оснований 3'-конца олигомерного звена, составляющего антисмысловый олигомер, а вторая часть «На<sub>3</sub>\_b<sub>3</sub>-c<sub>3</sub>» означает последовательность-мишень оснований 5'-конца олигомерного звена, составляющего антисмысловый олигомер. «На<sub>3</sub>\_b<sub>3</sub>-c<sub>3</sub>» может иметь одно дополнительное основание на своем 3'-конце, и такая последовательность-мишень оснований представлена как «На<sub>2</sub>\_b<sub>2</sub>-c<sub>2</sub>\_На<sub>3</sub>\_b<sub>3</sub>-c<sub>3</sub>\_N» («N» означает данное основание). Каждое из «На<sub>2</sub>\_b<sub>2</sub>-c<sub>2</sub>» и «На<sub>3</sub>\_b<sub>3</sub>-c<sub>3</sub>» имеет такое же обозначение, как и «На<sub>1</sub>\_b<sub>1</sub>-c<sub>1</sub>».

Если «На<sub>2</sub>» и «На<sub>3</sub>» совпадают, то часть «На<sub>3</sub>» может быть опущена.

Так, например, «Н45<sub>(-5)</sub>-5<sub>25-35</sub>» или «Н45<sub>(-5)</sub>-5<sub>Н45<sub>25-35</sub></sub>» означает последовательность оснований, в которой последовательность-мишень оснований 3'-конца олигомерного звена, составляющего антисмысловый олигомер, представляет собой «Н45<sub>(-5)</sub>-5», а последовательность-мишень оснований 5'-конца олигомерного звена, составляющего антисмысловый олигомер, представляет собой «Н45<sub>25-35</sub>».

«На<sub>4</sub><sub>b<sub>4</sub>-c<sub>4</sub></sub>На<sub>5</sub><sub>b<sub>5</sub>-c<sub>5</sub></sub>На<sub>6</sub><sub>b<sub>6</sub>-c<sub>6</sub></sub>» представляет собой последовательность-мишень оснований антисмыслового олигомера третьего варианта согласно изобретению. «На<sub>4</sub><sub>b<sub>4</sub>-c<sub>4</sub></sub>», который является первой частью «На<sub>4</sub><sub>b<sub>4</sub>-c<sub>4</sub></sub>На<sub>5</sub><sub>b<sub>5</sub>-c<sub>5</sub></sub>На<sub>6</sub><sub>b<sub>6</sub>-c<sub>6</sub></sub>», означает последовательность-мишень оснований 3'-конца олигомерного звена, составляющего антисмысловый олигомер, вторая часть «На<sub>5</sub><sub>b<sub>5</sub>-c<sub>5</sub></sub>» означает последовательность-мишень оснований промежуточного олигомерного звена, составляющего антисмысловый олигомер, а третья часть «На<sub>6</sub><sub>b<sub>6</sub>-c<sub>6</sub></sub>» означает последовательность-мишень оснований 5'-конца олигомерного звена, составляющего антисмысловый олигомер. «На<sub>6</sub><sub>b<sub>6</sub>-c<sub>6</sub></sub>» может иметь одно дополнительное основание на 3'-конце, и такая последовательность-мишень оснований представлена как «На<sub>4</sub><sub>b<sub>4</sub>-c<sub>4</sub></sub>На<sub>5</sub><sub>b<sub>5</sub>-c<sub>5</sub></sub>На<sub>6</sub><sub>b<sub>6</sub>-c<sub>6</sub></sub>Н» («Н» представляет данное основание). Каждый из «На<sub>4</sub><sub>b<sub>4</sub>-c<sub>4</sub></sub>», «На<sub>5</sub><sub>b<sub>5</sub>-c<sub>5</sub></sub>» и «На<sub>6</sub><sub>b<sub>6</sub>-c<sub>6</sub></sub>» имеет такое же обозначение, как и «На<sub>1</sub><sub>b<sub>1</sub>-c<sub>1</sub></sub>».

Если «На<sub>4</sub>» совпадает с «На<sub>5</sub>» и «На<sub>6</sub>», то части «На<sub>5</sub>» и «На<sub>6</sub>» могут быть опущены.

Так, например, «Н45<sub>(-5)</sub>-5<sub>25-35</sub><sub>60-70</sub>» или «Н45<sub>(-5)</sub>-5<sub>Н45<sub>25-35</sub></sub><sub>Н45<sub>60-70</sub></sub>» означает последовательность оснований, в которой последовательность-мишень оснований 3'-конца олигомерного звена, составляющего антисмысловый олигомер, представляет собой «Н45<sub>(-5)</sub>-5», последовательность-мишень оснований промежуточного олигомерного звена представляет собой «Н45<sub>25-35</sub>», а последовательность-мишень оснований 5'-конца олигомерного звена представляет собой «Н45<sub>60-70</sub>».

[0227]

[Таблица 10] Область-мишень в пре-мРНК дистрофина человека

Область-мишень	Диапазон области-мишени	SEQ ID NO
(R1) Область вблизи донора интрона 44	Область обозначена диапазоном от -20 оснований до +400 оснований с 5'-концом интрона 44, определенным как положение основания 0	233
(R2) Область вблизи акцептора интрона 44	Область обозначена диапазоном от -600 оснований до +50 оснований с 3'-концом интрона 44, определенным как положение основания 0	234

(R3) Область вблизи донора интрона 45	Область обозначена диапазоном от -20 оснований до +400 оснований с 5'-концом интрона 45, определенным как положение основания 0	235
(R4) Область вблизи акцептора интрона 45	Область обозначена диапазоном от -400 оснований до +50 оснований с 3'-концом интрона 45, определенным как положение основания 0	236
(R5) Область вблизи донора интрона 46	Область обозначена диапазоном от -20 оснований до +400 оснований с 5'-концом интрона 46, определенным как положение основания 0	237
(R6) Область вблизи акцептора интрона 46	Область обозначена диапазоном от -400 оснований до +50 оснований с 3'-концом интрона 46, определенным как положение основания 0	238
(R7) Область вблизи донора интрона 47	Область обозначена диапазоном от -20 оснований до +400 оснований с 5'-концом интрона 47, определенным как положение основания 0	239
(R8) Область вблизи акцептора интрона 47	Область обозначена диапазоном от -400 оснований до +50 оснований с 3'-концом интрона 47, определенным как положение основания 0	240
(R9) Область вблизи донора интрона 48	Область обозначена диапазоном от -20 оснований до +400 оснований с 5'-концом интрона 48, определенным как положение основания 0	241
(R10) Область вблизи акцептора интрона 48	Область обозначена диапазоном от -400 оснований до +50 оснований с 3'-концом интрона 48, определенным как положение основания 0	242

(R11) Область вблизи донора интрона 49	Область обозначена диапазоном от -20 оснований до +400 оснований с 5'-концом интрона 49, определенным как положение основания 0	243
(R12) Область вблизи акцептора интрона 49	Область обозначена диапазоном от -400 оснований до +50 оснований с 3'-концом интрона 49, определенным как положение основания 0	244
(R13) Область вблизи донора интрона 50	Область обозначена диапазоном от -20 оснований до +400 оснований с 5'-концом интрона 50, определенным как положение основания 0	245
(R14) Область вблизи акцептора интрона 50	Область обозначена диапазоном от -400 оснований до +50 оснований с 3'-концом интрона 50, определенным как положение основания 0	246
(R15) Область вблизи донора интрона 51	Область обозначена диапазоном от -20 оснований до +400 оснований с 5'-концом интрона 51, определенным как положение основания 0	247
(R16) Область вблизи акцептора интрона 51	Область обозначена диапазоном от -400 оснований до +50 оснований с 3'-концом интрона 51, определенным как положение основания 0	248
(R17) Область вблизи донора интрона 52	Область обозначена диапазоном от -20 оснований до +400 оснований с 5'-концом интрона 52, определенным как положение основания 0	249
(R18) Область вблизи акцептора интрона 52	Область обозначена диапазоном от -400 оснований до +50 оснований с 3'-концом интрона 52, определенным как положение основания 0	250

(R19) Область вблизи донора интрона 53	Область обозначена диапазоном от -20 оснований до +400 оснований с 5'-концом интрона 53, определенным как положение основания 0	251
(R20) Область вблизи акцептора интрона 53	Область обозначена диапазоном от -400 оснований до +50 оснований с 3'-концом интрона 53, определенным как положение основания 0	252
(R21) Область вблизи донора интрона 54	Область обозначена диапазоном от -20 оснований до +400 оснований с 5'-концом интрона 54, определенным как положение основания 0	253
(R22) Область вблизи акцептора интрона 54	Область обозначена диапазоном от -400 оснований до +50 оснований с 3'-концом интрона 54, определенным как положение основания 0	254
(R23) Область вблизи донора интрона 55	Область обозначена диапазоном от -20 оснований до +400 оснований с 5'-концом интрона 55, определенным как положение основания 0	255
(R24) Область вблизи акцептора интрона 55	Область обозначена диапазоном от -400 оснований до +50 оснований с 3'-концом интрона 55, определенным как положение основания 0	256

[0228]

[Таблица 11]

PMO No.	Область мишень	Последовательность- мишень оснований	Последовательность оснований PMO	SEQ ID NO
1	R1	H44_150-175	TTTCGAAAAACAATCAAAGACTTA	1
2		H44_157-196	ATGTGCTGAAGATAAATACAATTTGAAAA AACAAATCAA	2
3		H44_159-193	TGCTGAAGATAAATACAATTTGAAAAAAC AAATC	3
4		H44_170-199	CAGATGTGCTGAAGATAAATACAATTTCGA	4
5		H44_179-206	AAGAGTCCAGATGTGCTGAAGATAAATA	5
6		H44_209-236	ACCCITTCAGAACCTGATCTTTAAGAAGT	6
7		H44_239-266	TGACAACAACAGTCAAAAGTAATTTCCA	7
8		H44_269-296	ATGATAATTTTCTTTCTAGTAATATAAT	8
9		H44_299-326	TCCATAGCACCGTGCTCTAATATTATCA	9
10		H44_330-355	GGCAAACTCTCTCATCCTGCACACAAA	10
11		H44_354-381	TTTATCAGATAAACAGCTCCGTCCAGG	11
12		H44_389-416	CTTCCCTCTGTACAGATTCATTTATAT	12
13		H44_413-438	AAAAACCTTGTGTACGATGCTTC	13
14		H44_423-452	TGCCCCAAAGCCACAAAACACCTTGCTGTT	14
15		H44_455-480	GGTCCAACATAAAAGCCGAAATACAC	15
16		H44_479-506	TATGCCACAAGTCTCCTTTCTGGAAAGG	16
17		H44_509-536	GATATTTCTAGCAACTTCATTTTAGCTA	17
18		H44_150-164_179-193	TGCTGAAGATAAATACAATCAAAGACTTA	18
19		H44_150-164_192-206	AAGAGTCCAGATGTGCAAAATCAAAGACTTA	19
20		H44_161-175_179-193	TGCTGAAGATAAATATTTGAAAAACAAA	20
21		H44_161-175_192-206	AAGAGTCCAGATGTGTTTCGAAAAACAAA	21
22	R2	H45_(-598)-(-571)	TTAATTGCTTTCAGGAGCATCCATCAA	22
23		H45_(-568)-(-541)	TTTGCAATTAGAAGCCACAAAAACTGAG	23
24		H45_(-538)-(-511)	TCATTTCAAATCTGTCTGCGTCAATGT	24
25		H45_(-518)-(-491)	TTGCTATATTAGAAGAAAATTCATTTCA	25
26		H45_(-515)-(-488)	TAATTGCTATATTAGAAGAAAATTCATT	26
27		H45_(-508)-(-479)	AAATAAAATTAATTGCTATATTAGAAGAAA	27
28		H45_(-478)-(-449)	CAGTATTAATAAAAAACTCTAGAGATATTT	28
29		H45_(-470)-(-443)	TAGTCACAGTATTAATAAAAAACTCTAG	29
30		H45_(-448)-(-421)	GTGAAAAAGAACAACATAGGTTAGTCA	30
31		H45_(-439)-(-412)	ATACGAGAGGTGAAAAAGAACAACATA	31
32		H45_(-436)-(-409)	TGGATACGAGAGGTGAAAAAGAACAAC	32
33		H45_(-422)-(-395)	TTTCTTAGTGATCGTGGATACGAGAGGT	33
34		H45_(-418)-(-394)	GTTTCTTAGTGATCGTGCATACGAG	34
35		H45_(-418)-(-391)	TGGGTTTCTTAGTGATCGTGGATACGAG	35
36		H45_(-415)-(-391)	TGGGTTTCTTAGTGATCGTGGATAC	36
37		H45_(-413)-(-386)	GTATTTGGGTTTCTTAGTGATCGTGGAT	37
38		H45_(-405)-(-378)	TGAACAAAGTATTTGGGTTTCTTAGTGA	38
39		H45_(-389)-(-362)	TTGTAATAATTAACATGAACAAAGTAT	39
40		H45_(-349)-(-322)	TCCCCACAAGGATGTTCCATGTTAATA	40
41		H45_(-320)-(-293)	ACCTTTTCAAGAGCAAAATTCGATTTCTT	41
42		H45_(-305)-(-280)	CAATTAGTTGGAAACCTTTTCAAGAG	42
43		H45_(-290)-(-263)	TATAATGTCCTACAAATCAATTAGTTGG	43
44		H45_(-275)-(-250)	AGCTAGAGGATGTTATAATGTCCTAC	44

45	H45_(-260)-(-233)	ATTTTGTAAAGCTTGTCTAGCTAGAGGAT	45
46	H45_(-230)-(-203)	AAAGCACCCCTCTCGGTTAGCTCCAGTTT	46
47	H45_(-200)-(-173)	CAGAAAGACACCTTTTATGTGTCTAGGGA	47
48	H45_(-190)-(-163)	GGATAACAAGACAGAAAGACACCTTTTAT	48
49	H45_(-185)-(-160)	AAAGGATACAAGACAGAAAGACACCT	49
50	H45_(-171)-(-144)	TGACATGCCCATATCCAAAGGATACAAG	50
51	H45_(-168)-(-141)	AACTGACATGCCCATATCCAAAGGATAC	51
52	H45_(-142)-(-115)	AGCTCCATGTGAAAATTTCCCTATGAAA	52
53	H45_(-110)-(-83)	TGCAGTTGTACTGGCAAAGAAAGAAATA	53
54	H45_(-80)-(-53)	TGAGAAAAGATTAAACAGTGTGCTACCA	54
55	H45_(-78)-(-51)	TTTGAGAAAAGATTAAACAGTGTGCTAC	55
56	H45_(-70)-(-43)	TCTTTTATTTGAGAAAAGATTAAACAG	56
57	H45_(-60)-(-33)	AAGCCCATGTCTTTTATTTGAGAAAA	57
58	H45_(-50)-(-23)	AACAAAAATGAAGCCCATGTCTTTTA	58
59	H45_(-44)-(-17)	AGGCAAAACAAAAATGAAGCCCATGTCT	59
60	H45_(-25)-3	TTCTGTAAAGATACCAAAAAGGCAAAAC	60
61	H45_(-23)-5	AGTTCTGTAAAGATACCAAAAAGGCAAA	61
62	H45_(-22)-3	TTCTGTAAAGATACCAAAAAGGCAA	62
63	H45_(-21)-7	GGAGTTCTGTAAAGATACCAAAAAGGCA	63
64	H45_(-20)-5	AGTTCTGTAAAGATACCAAAAAGGC	64
65	H45_(-20)-8	TGGAGTTCTGTAAAGATACCAAAAAGGC	65
66	H45_(-18)-10	CCTGGAGTTCTGTAAAGATACCAAAAAG	66
67	H45_(-17)-8	TGGAGTTCTGTAAAGATACCAAAA	67
68	H45_(-16)-12	ATCTCGAGTTCTGTAAAGATACCAAAA	68
69	H45_(-15)-10	CCTGGAGTTCTGTAAAGATACCAAAA	69
70	H45_(-14)-14	CCATCCTGGAGTTCTGTAAAGATACCAA	70
71	H45_(-10)-16	TGCCATCCTGGAGTTCTGTAAAGATA	71
72	H45_(-5)-20	CCAATGCCATCCTGGAGTTCTGTAA	72
73	H45_1-25	GCTGCCCAATGCCATCCTGGAGTTC	73
74	H45_6-30	TTGCCCTGCCCAATGCCATCCTGG	74
75	H45_11-35	ACAGTTTGCCGCTGCCCAATGCCAT	75
76	H45_11-40	TGACAACAGTTTGCCGCTGCCCAATGCCAT	76
77	H45_16-35	ACAGTTTGCCGCTGCCCAAT	77
78	H45_16-40	TGACAACAGTTTGCCGCTGCCCAAT	78
79	H45_21-45	TGTTCTGACAACAGTTTGCCGCTGC	79
80	H45_(-423)-(-412)_16-33	AGTTTGCCGCTGCCCAATATACGAGAGGTG	80
81	H45_(-416)-(-402)_16-30	TTGCCGCTGCCCAATGTGATCGTGGATACG	81
82	H45_(-411)-(-400)_16-33	AGTTTGCCGCTGCCCAATTAGTGATCGTGG	82
83	H45_(-405)-(-391)_16-30	TTGCCGCTGCCCAATGGGTTTCTTAGTGA	83
84	H45_(-402)-(-391)_16-33	AGTTTGCCGCTGCCCAATTGGGTTTCTTAG	84
85	H45_(-156)-(-143)-(-141)-(-128)	AATTTCCCTATGAACTGACATGCCATA	85
86	H45_(-78)-(-65)_(-44)-(-31)	TGAAGCCCATGTCAAACAGTGTGCTAC	86
87	H45_(-78)-(-65)_(-34)-(-21)	AAAACAAAAATGAAGAACAGTGTGCTAC	87

88		H45_(-78)-(-65)_16-29	TGCCGCTGCCCAATAAACAGTGTGCTAC	88
89		H45_(-78)-(-65)_21-34	CAGTTTCCCGCTGCAAAACAGTGTGCTAC	89
90		H45_(-78)-(-65)_27-40	TGACAACAGTTTGCAAAACAGTGTGCTAC	90
91		H45_(-74)-(-62)_(-40)-(-28)	AAATGAAGCCCCAATTAACAGTGTG	91
92		H45_(-72)-(-58)_(-38)-(-26)	AAAAATGAAGCCCCAAAGATTAACAGTGTG	92
93		H45_(-71)-(-58)_(-38)-(-25)	CAAAAATGAAGCCCCAAAGATTAACAGTGTG	93
94		H45_(-71)-(-58)_16-29	TGCCGCTGCCCAATAAAGATTAACAGTGTG	94
95		H45_(-71)-(-58)_21-34	CAGTTTCCCGCTGCAAAGATTAACAGTGTG	95
96		H45_(-71)-(-58)_27-40	TGACAACAGTTTGCAAAGATTAACAGTGTG	96
97		H45_(-68)-(-60)_(-36)-(-28)_19-28	GCCGCTGCCCAATGAAGCAGATTAAC	97
98		H45_(-64)-(-51)_(-44)-(-31)	TGAAGCCCCATGTCTTTGAGAAAAGATT	98
99		H45_(-64)-(-51)_(-35)-(-22)	AAACAAAATGAAGTTTGAGAAAAGATT	99
100		H45_(-64)-(-51)_16-29	TGCCGCTGCCCAATTTTGAGAAAAGATT	100
101		H45_(-64)-(-51)_21-34	CAGTTTCCCGCTGCTTTGAGAAAAGATT	101
102		H45_(-64)-(-51)_27-40	TGACAACAGTTTGCTTTGAGAAAAGATT	102
103		H45_(-44)-(-31)_16-29	TGCCGCTGCCCAATGAAGCCCCATGTC	103
104		H45_(-44)-(-31)_27-40	TGACAACAGTTTGCTGAAGCCCCATGTC	104
105		H45_(-44)-(-31)_21-33_T	TAGTTTCCCGCTGTCTGAAGCCCCATGTC	105
106		H45_(-38)-(-25)_16-29	TGCCGCTGCCCAATCAAAAATGAAGCCC	106
107		H45_(-38)-(-25)_21-34	CAGTTTCCCGCTGCCAAAAATGAAGCCC	107
108		H45_(-38)-(-25)_27-40	TGACAACAGTTTGCCAAAAATGAAGCCC	108
109		H45_(-34)-(-21)_16-29	TGCCGCTGCCCAATAAAAACAAAAATGAA	109
110		H45_(-34)-(-21)_21-34	CAGTTTCCCGCTGCAAAAACAAAAATGAA	110
111		H45_(-34)-(-21)_27-40	TGACAACAGTTTGCAAAAACAAAAATGAA	111
112		H45_1-21	CCCAATGCCATCCTGGAGTTC	112
144	R3	H45_167-194	TTAGATCTGTGCCCCTACCTCTTTTTTC	144
145		H45_227-254	TCTCATGAAATATTTCTCTAAAGAAAGC	145
146		H45_257-284	ATGTTAGTGCCCTTCACCCCTGCTTATAA	146
147		H45_287-314	GCTGTGATTAATGGTTGATAGGTTCTT	147
148		H45_317-344	TGAAAAAAGAAATAAAAAATTTCTTTA	148
149		H45_347-374	TAACTAGCCACAAGTATATATTTAGTA	149
150			H46_(-200)-(-173)	TCAAGAATCTCTAAATGATAAGAGATTA
151		H46_(-171)-(-144)	TTCACTTTGAACAAAGTAATTTCAATAT	151
152		H46_(-146)-(-119)	ACCATACATAATTTAAGAAAATTCATTC	152
153		H46_(-141)-(-114)	TGTTAACCATACATAATTTAAGAAAATT	153
154		H46_(-136)-(-109)	AAAGATGTTAACCATACATAATTTAAGA	154
155		H46_(-126)-(-99)	AAGCAATTTAAAAGATGTTAACCATACA	155
156	R4	H46_(-116)-(-89)	ATTTAAAAATAAGCAATTTAAAAGATGT	156
157		H46_(-111)-(-84)	TGGCAATTTAAAAATAAGCAATTTAAAA	157
158		H46_(-106)-(-79)	AAACATGGCAATTTAAAAATAAGCAATT	158
159		H46_(-81)-(-54)	TATTTGTTAATGCAAACTGGGACACAAA	159
160		H46_(-51)-(-24)	TTATTTTTTTTTTCCAAATAGTTCTCAA	160
161		H46_(-18)-6	TCTAGCCTGGAGAAAGAAGATAA	161
162		H46_(-15)-9	TCTTCTAGCCTGGAGAAAGAAGAA	162

163		H46_(-9)-15	TTTTGTTCTTCTAGCCTGGAGAAA	163
164		H46_139-166	TTGAGAAAATAAAAATTACCTTGACTTGC	164
165		H46_169-196	ACTTCTTTATGCAAGCAGGCCCTGGGGG	165
166		H46_199-226	CAATGATTGAATTAAAAAATAGATTCAT	166
167	R5	H46_229-256	GAACTATGAATAACCTAATGGGCAGAAA	167
168		H46_259-286	ATAAAAATTGTGAGAAAAACACTTTAGCA	168
169		H46_289-316	ACTGGTTCAGAACTGCAGGGTTAAGAAG	169
170		H46_319-346	ACACACATATATACATATGTTCTTATGT	170
171		H47_(-200)-(-173)	CTCACCCCTCAGTAGATAAATCTCTGT	171
172		H47_(-171)-(-144)	TCTGAGCACAGAGCTGATTGACTGAAAC	172
173		H47_(-141)-(-114)	AGTGGTACCTCAAATACCAACAGTTTTT	173
174		H47_(-111)-(-84)	ATCAAATGAAGCGACTTGACCGAGGGC	174
175	R6	H47_(-81)-(-54)	TACCTTGTCTTTGCTTCTATTGATTAGT	175
176		H47_(-51)-(-24)	GTTAAAAATGAATTACAGCACAAATCCA	176
177		H47_(-18)-12	TTCACCAGTAACGAAACAGACAAATG	177
178		H47_1-29	TGGCCAGGGGCAACTCTTCCACCAGTAA	178
179	R7	H47_135-162	TTAATGTCTAACCTTTATCCACTGGAGA	179
180		H48_(-21)-7	TGGAACCTGAAAGGAAAAATACATTTTA	180
181	R8	H48_1-28	CTGTCTTCTCAGGTAAGCTCTGGAAC	181
182	R9	H48_177-204	AAGCAAAAAGTTCCTACCTGAACGTCA	182
183		H49_(-21)-7	CAGTTTCTGGGGAAAAGAACCATATA	183
184	R10	H49_22-47	ATCTCTCCACATCCGGTTGTTTAGC	184
185	R11	H49_93-120	TAGAGGTTGCTTCATTACCTTCACTGGC	185
186		H50_(-200)-(-173)	ACCCTACAAATATTTATCAATTGCTCCA	186
187		H50_(-171)-(-144)	TAAAGGAATTATAATTATTTTAGCCAAC	187
188		H50_(-141)-(-114)	TAAATTAACCTTAGTGGGTAGAATTTCT	188
189	R12	H50_(-111)-(-84)	TATTATTGGATTCTATTATATTTACT	189
190		H50_(-81)-(-54)	TCATGAACATCTTAATCCATTGGTGAA	190
191		H50_(-51)-(-24)	TACTATTTCGATTAACACTTTGAAGATA	191
192		H50_(-21)-7	ACTTCTCTTTAACAGAAAAGCATAAC	192
193	R13	H50_100-127	GGGATCCAGTATACTTACAGGCTCCAAT	193
194		H50_90-114	CTTACAGGCTCCAATAGTGGTCACT	194
195	R14	H51_(-18)-10	TGAGTAGGAGCTAAAAATTTTGGGTTT	195
196	R15	H51_224-251	TATCATTTTTTCTCATACCTTCTGCTTG	196
197		H52_(-47)-(-20)	TTAGTATCAGGGTCTTCAGCGTTGTGT	197
198	R16	H52_(-18)-10	GCATTGTTGCCTGTAAGAACAATATCC	198
199		H52_9-38	AACTGGGGACGCCCTCTGTTCCAAATCCTGC	199
200	R17	H52_109-136	GCTTGTTAAAAAECTTACTTCGATCCGT	200
201		H53_(-197)-(-170)	AATATTAGTTTCTGTAAATTATTTTCC	201
202		H53_(-167)-(-140)	ACAACAGGATTCTTTGCTTTTTTGGATGG	202
203		H53_(-137)-(-110)	TTATTCATTGTGTATGGCTAGGATGAT	203
204	R18	H53_(-107)-(-80)	ATCTCACATTTATGTTGCTTATTTAAAA	204
205		H53_(-77)-(-50)	GAGACATTTTAAATGTAACCTTCCAAACG	205
206		H53_(-47)-(-20)	AAATATATAGTAGTAAATGCTAGTCTGG	206
207		H53_(-18)-10	ATTCTTTCAACTAGAAATAAAGGAAAAA	207
208	R19	H53_203-230	GGTATCTTTGATACTAACCTTGGTTTCT	208
209	R20	H54_(-18)-10	TGGCCAACTGCTATAGATTTTTATGAGA	209
210		H54_146-173	AAATAATGTAATTCATACCTTTTATGAA	210
211	R21	H54_176-203	CCCATTATTACAGCCAACAGTAGTTTT	211
212		H54_206-233	CAAATCCTCATGGTCCATCCAGTTTCA	212
213		H54_236-263	CCAAGCTCCAGTTTAGCTGGATTGGAAA	213

214		H54_266-293	TTTAGTTGGTATTTATCGTCTTGAACCC	214	
215		H54_296-323	TAAATAGAACTCTGAGCCAAGTCCGTG	215	
216		H54_326-353	GGGCAAATGAGATCTTATGTTCCCTCGTT	216	
217	R22	H55_(-197) - (-170)	TTTACTTTTCATTTTTATTTAACTTAAAG	217	
218		H55_(-167) - (-140)	TAAGCAACAACATAATATTGTGCAGTC	218	
219		H55_(-137) - (-110)	TGGGGTGAGTTGTTGCTACAGCTCTTCC	219	
220		H55_(-107) - (-80)	TGGAGGAACTAAATTGTAATATACCAAC	220	
221		H55_(-77) - (-50)	CACCTAGTGAACCCATAAAAAGAGAAA	221	
222		H55_(-47) - (-20)	CAGATGCAATTATTAATATCAGAATGG	222	
223		H55_(-18) - 10	CTCACTCACCCCTGCAAAGGACCAAATGT	223	
224		H55_12-34	AGTTTTCTTCCAAAGCAGCCTCTC	224	
113	R23	H55_177-204	AATGCCTGACTTACTTGCCATTGTTTCA	113	
114		H55_191-218	AGTGCTAAAGCGGAAATGCCTGACTTAC	114	
115		H55_221-248	TGCTGAGAATTGTTCAATTGGATCCACA	115	
116		H55_251-278	TGTCCTGGCTGTCAGTTACAAGTACA	116	
117		H55_281-308	TCAGGCTGTATAAAAGCAACTATTTTGT	117	
118		H55_311-338	CTCTCCTCCTTGTCCAAATACCGAAATA	118	
119		H55_334-361	GATGTTTCCTTCTCCCTCTGCCTCTCTC	119	
120		H55_341-368	TATAAATGATGTTTCTTCTCCTCTGTC	120	
121		H55_371-398	TTTTCTAAGACGAGGGTGTAAAGTGGGA	121	
122		H55_401-428	TGCAAATGTTTTCTGCTCAGAGCATGT	122	
123		H55_431-458	TTTCTCCTTGACCGAAGCTCTGGTTTTA	123	
124		H55_461-488	CCAATCCCTAAGTTATTTCTCTGAGCAA	124	
125		H55_491-518	CAAAAATGTCAACTTTTAAATTTAATA	125	
126		H55_521-548	GCTTTCCTGTAAAATATTAATAAACA	126	
127		H55_548-575	TAAATAAACAGACAATTCATACAGATG	127	
128		R24	H56_(-400) - (-373)	AATAATTTCACTACTATATGGATCAAGT	128
129			H56_(-380) - (-355)	AAAGTGTACCCAGTGCCAATAATTT	129
130	H56_(-345) - (-318)		TATTTTATGGAAGTGATAGGCAATAAAA	130	
131	H56_(-315) - (-288)		TATATCTTCTAGTCTATGGACAAAATGT	131	
132	H56_(-285) - (-258)		TGTATTTATAACTTTATAAAGTTCACAA	132	
133	H56_(-255) - (-228)		TATTCCTTGCCATTATGAGTTGGAAGT	133	
134	H56_(-225) - (-198)		AAATGGGCATCTTATTAGTTGTAATAGA	134	
135	H56_(-195) - (-168)		ATTGCCTTCTCCTGTTATTATGTAGATT	135	
136	H56_(-165) - (-138)		AGATACATCTCAAATCCCTTTTCTTGGC	136	
137	H56_(-135) - (-108)		AGACATTTCAATCAGGCTAAACTAACAA	137	
138	H56_(-105) - (-78)		TTGCAAAAATATAAATAATTATTAGTTCA	138	
139	H56_(-76) - (-51)		ACAAGCGATGAATGTGAATTTGGAGA	139	
140	H56_(-59) - (-34)		ATTACCAACAAAAGAAAACAAGCGAT	140	
141	H56_(-39) - (-14)		GGAAAGAAGTATGTGCAGAAATTACC	141	
142	H56_(-31) - (-6)		GGACAGCAGGAAGAAGTATGTGCA	142	
143	H56_(-14) - 13		TCACCTTGGAGGTCTACAGGACAGCAG	143	
225	R1 + R24	H44_188-202_H56_(-156) - (-142)	ACATCTCAAATCCCTGTCCAGATGTGCTGA	225	
226		H44_188-202_H56_(-124) - (-110)	ACATTTCAATCAGGCGTCCAGATGTGCTGA	226	
227		H44_188-202_H56_(-85) - (-71)	TGGAGAATTGCAAAAAGTCCAGATGTGCTGA	227	
228		H56_(-156) - (-142)_H44_188-202	GTCCAGATGTGCTGAACATCTCAAATCCCT	228	

229		H56_(-124)-(-110)_H44_188-202	GTCCAGATGTGCTGAACATTTCAATCAGGC	229
230		H56_(-85)-(-71)_H44_188-202	GTCCAGATGTGCTGATGGAGAATTGCAAAA	230
231	R2	H45_16-35_H46_(-134)-(-115)	GTAAACCATACATAATTTAAACAGTTTGCC GCTGCCCAAT	231
232	R4	H45_16-35_H46_(-103)-(-84)	TGGCAATTTAAAAATAAGCAACAGTTTGCC GCTGCCCAAT	232

[0229]

В РМО Таблицы 11,

РМО для области-мишени R2 включает РМО №№ 22-71, 91-93, 98 и 99 в другом варианте осуществления изобретения, и РМО №№ 22-59, 91-93, 98 и 99 в еще одном варианте осуществления изобретения;

РМО для области-мишени R4 включает РМО №№ 150-163, в другом варианте осуществления изобретения, и РМО №№ 150-160 в еще одном варианте осуществления изобретения;

РМО для области-мишени R6 включает РМО №№ 171-177, в другом варианте осуществления изобретения, и РМО №№ 171-176 в еще одном варианте осуществления изобретения;

РМО для области-мишени R8 включает РМО № 180 в другом варианте осуществления изобретения; РМО области-мишени R10 включает РМО № 183 в другом варианте осуществления изобретения; РМО для области-мишени R12 включает РМО №№ 186-191 в другом варианте осуществления изобретения.

РМО для области-мишени R16 включает РМО №№ 197 и 198 в другом варианте осуществления изобретения, и РМО № 197 в еще одном варианте осуществления изобретения;

РМО для области-мишени R18 включает РМО №№ 201-206 в другом варианте осуществления изобретения;

РМО для области-мишени R22 включает РМО №№ 217-223 в другом варианте осуществления изобретения и РМО №№ 217-222 в еще одном варианте осуществления изобретения; и

РМО для области-мишени R24 включает РМО №№ 128-142 в другом варианте осуществления изобретения.

[0230]

0,2 г 4-{{[(2S,6R)-6-(4-бензамид-2-оксопиримидин-1-ил)-4-триморфолин-2-ил]метокси}-4-оксобутановой кислоты, нанесенной на аминополистироловую смолу (соединения 1), 4-{{[(2S,6R)-6-(5-метил-2,4-диоксопиримидин-1-ил)-4-триморфолин-2-ил]метокси}-4-оксобутановой кислоты, нанесенной на аминополистироловую смолу (Соединения 2), 4-{{[(2S,6R)-6-(6-бензамидопурин-9-ил)-4-триморфолин-2-ил]метокси}-4-оксобутановой кислоты, нанесенной на аминополистироловую смолу (Соединения 3), или 4-{{[(2S,6R)-6-{{6-(2-цианозтокси)-2-[(2-феноксиацетил)амино]пурин-

9-ил}-4-триморфолин-2-ил}метокси}-4-оксобутановой кислоты, нанесенной на аминополистироловую смолу (Соединения 4), соответствующие 5'-концевому основанию, загружали в колонку с фильтрующим наконечником. Затем запускали цикл синтеза, показанный в Таблице 12, с использованием устройства для синтеза нуклеиновых кислот (АКТА Oligopilot 10 plus). Нужное морфолино-мономерное соединение добавляли в каждом цикле реакции сочетания с получением последовательности оснований каждого РМО, описанной в Таблице 11 (см. Таблицу 12).

[0231]

[Таблица 12]

Стадия	Реагент	Объем (мл)	Время (мин.)
1	Деблокирующий раствор	18-32	1,8-3,2
2	Нейтрализующий и промывочный раствор	30	1,5
3	Раствор для реакции сочетания В	5	0,5
4	Раствор для реакции сочетания А	1,3	0,25
5	Реакция сочетания под действием реагентов, добавленных на стадиях 3 и 4		120-300
6	Ацетонитрил	20	1,0
7	Кэпирующий раствор	9	2,0
8	Ацетонитрил	30	2,0

Следует отметить, что только для 3'-концевого ацетилирования, стадии 1, 2, 7 и 8 были проведены повторно лишь после заключительного цикла.

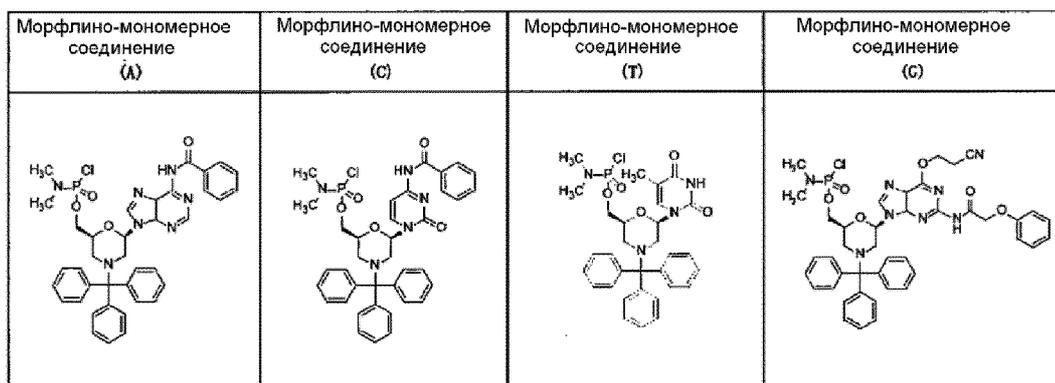
[0232]

Используемый деблокирующий раствор представлял собой раствор дихлорметана, содержащий 3% (масс./об.) трифторуксусной кислоты. В качестве нейтрализующего и промывочного раствора использовали раствор, полученный путем растворения N, N-диизопропилэтиламина до концентрации 10% (об./об.) и тетрагидрофурана до концентрации 5% (об./об.) в дихлорметане, содержащем 35% (об./об.) ацетонитрила. В качестве раствора для реакции сочетания А использовали раствор, полученный путем растворения морфолино-мономерного соединения в тетрагидрофуране до концентрации 0,10 М. В качестве раствора для реакции сочетания В использовали раствор, полученный путем растворения N, N-диизопропилэтиламина до концентрации 20% (об./об.) и тетрагидрофурана до концентрации 10% (об./об.) в ацетонитриле. Используемый кэпирующий раствор представлял собой раствор, полученный путем растворения 20% (об./об.) ангидрида уксусной кислоты и 30% (об./об.) 2,6-лутидина в ацетонитриле.

Морфолино-мономерное соединение (А), морфолино-мономерное соединение (С), морфолино-мономерное соединение (Т) и морфолино-мономерное соединение (G), описанные в Таблице 13, использовали в качестве морфолино-мономерного соединения.

[0233]

[Таблица 13]



[0234]

Аминопластироловую смолу, нагруженную синтезированным выше РМО, извлекали из реакционного сосуда и сушили при комнатной температуре в течение по меньшей мере 2 часов при пониженном давлении. Осушенный РМО, нанесенный на аминопластироловую смолу, загружали в реакционный сосуд и добавляли 5 мл 28% водного раствора аммиака и этанола (1/4). Смесь перемешивали при 55°C в течение 15 часов. Аминопластироловую смолу отделяли фильтрованием и промывали 1 мл смеси вода-этанол (1/4). Полученный фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток растворяли в 10 мл смеси растворителей, состоящей из 20 мМ буфера уксусной кислоты-триэтиламина (буфера ТЕАА) и ацетонитрила (4/1), и фильтровали через мембранный фильтр. Полученный фильтрат очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Используемые условия показаны в Таблице 14.

[0235]

[Таблица 14]

Колонка	XBridge 5 мкм C18 (Waters, φ19 ×50 мм, 1 CV=14 мл)
Скорость потока	10 мл/мин
Температура колонки	комнатная температура
Раствор А	20 мМ буфер ТЕАА
Раствор В	ацетонитрил (CH <sub>3</sub> CN)
Градиент	Раствор В: (10% →70%)/15 CV

CV: объем колонки

[0236]

Каждую фракцию анализировали, и представляющий интерес продукт извлекали и концентрировали при пониженном давлении. К концентрированному остатку добавляли 0,5 мл 2 М водного раствора фосфорной кислоты, и смесь перемешивали в течение 15 минут. Кроме того, добавляли 2 мл 2М водного раствора гидроксида натрия для подщелачивания смеси, а затем фильтровали через мембранный фильтр (0,45 мкм).

Полученный водный раствор, содержащий представляющий интерес продукт, очищали на колонке с анионообменной смолой. Используемые условия показаны в Таблице 15.

[0237] [Таблица 15]

Колонка	Source 15Q (GE Healthcare, $\phi 10 \times 108$ мм, 1 CV=8,5 мл)
Скорость потока	8,5 мл/мин
Температура колонки	комнатная температура
Раствор А	10 мМ водный раствор гидроксида натрия
Раствор В	10 мМ водный раствор гидроксида натрия, 1М водный раствор хлорида натрия
Градиент	Раствор В: (1% $\rightarrow$ 50%)/40 CV

[0238]

Каждую фракцию анализировали (с помощью ВЭЖХ) и получали представляющий интерес продукт в виде водного раствора. К полученному водному раствору добавляли 0,1 М фосфатный буфер (рН 6,0) для нейтрализации. Полученную смесь деминерализовали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ в условиях, описанных в Таблице 16.

[0239]

[Таблица 16]

Колонка	XBridge 5 мкм C18 (Waters, $\phi 10 \times 50$ мм, 1 CV=4 мл)
Скорость потока	4 мл/мин
Температура колонки	60 °С
Раствор А	вода
Раствор В	CH <sub>3</sub> CN
Градиент	Раствор В: (0% $\rightarrow$ 50%)/20 CV

[0240]

Представляющий интерес продукт извлекали и смесь концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток растворяли в воде. Полученный водный раствор лиофилизировали с образованием каждого РМО в качестве представляющего интерес соединения в виде белого хлопкообразного твердого вещества. Вычисленные и измеренные значения ESI-TOF-MS показаны ниже в Таблице 17.

[0241]

[Таблица 17]

PMO No.	Последовательность-мишень оснований	Вычислено	Измерено
1	H44_150-175	8610.02	8610.48
2	H44_157-196	13354.66	13354.45
3	H44_159-193	11652.07	11652.09
4	H44_170-199	10012.48	10013.39
5	H44_179-206	9392.27	9392.54
6	H44_209-236	9230.21	9230.92
7	H44_239-266	9256.24	9256.17
8	H44_269-296	9264.2	9263.99
9	H44_299-326	9181.19	9181.46
10	H44_330-355	8514.98	8514.36
11	H44_354-381	9231.21	9231.24
12	H44_389-416	9147.17	9147.4
13	H44_413-438	8551.97	8552.71
14	H44_423-452	9830.43	9830.2
15	H44_455-480	8588.01	8587.53
16	H44_479-506	9262.21	9262.15
17	H44_509-536	9226.19	9225.7
18	H44_150-164_179-193	9989.49	9989.23
19	H44_150-164_192-206	10006.49	10006.81
20	H44_161-175_179-193	10013.5	10013.95
21	H44_161-175_192-206	10030.5	10031.48
22	H45_(-598) - (-571)	9221.2	9221.27
23	H45_(-568) - (-541)	9312.25	9311.93
24	H45_(-538) - (-511)	9218.18	9218.33
25	H45_(-518) - (-491)	9283.22	9283.26
26	H45_(-515) - (-488)	9307.23	9307.34
27	H45_(-508) - (-479)	10027.5	10027.98
28	H45_(-478) - (-449)	9979.48	9980.37
29	H45_(-470) - (-443)	9295.25	9296.02
30	H45_(-448) - (-421)	9385.28	9385.45
31	H45_(-439) - (-412)	9403.3	9403.98
32	H45_(-436) - (-409)	9435.3	9435.78
33	H45_(-422) - (-395)	9388.23	9388.34
34	H45_(-418) - (-394)	8363.88	8363.44
35	H45_(-418) - (-391)	9404.23	9404.6
36	H45_(-415) - (-391)	8354.87	8354.48
37	H45_(-413) - (-386)	9385.21	9385.07
38	H45_(-405) - (-378)	9371.23	9371.33
39	H45_(-389) - (-362)	9325.25	9325.6
40	H45_(-349) - (-322)	9221.2	9221.14
41	H45_(-320) - (-293)	9211.19	9211.14
42	H45_(-305) - (-280)	8640	8640.11
43	H45_(-290) - (-263)	9284.22	9284.05
44	H45_(-275) - (-250)	8656	8656.36
45	H45_(-260) - (-233)	9347.22	9347
46	H45_(-230) - (-203)	9198.19	9198.43
47	H45_(-200) - (-173)	9335.24	9335.21

48	H45_(-190)-(-163)	9312.25	9312.03
49	H45_(-185)-(-160)	8670.05	8670.14
50	H45_(-171)-(-144)	9273.24	9273.53
51	H45_(-168)-(-141)	9233.23	9233.36
52	H45_(-142)-(-115)	9254.22	9254.39
53	H45_(-110)-(-83)	9392.27	9392.55
54	H45_(-80)-(-53)	9352.26	9352.54
55	H45_(-78)-(-51)	9358.25	9358.63
56	H45_(-70)-(-43)	9323.23	9323.51
57	H45_(-60)-(-33)	9260.21	9260.39
58	H45_(-50)-(-23)	9238.22	9238.79
59	H45_(-44)-(-17)	9291.26	9291.37
60	H45_(-25)-3	9281.25	9281.54
61	H45_(-23)-5	9321.26	9321.92
62	H45_(-22)-3	8287.9	8287.54
63	H45_(-21)-7	9353.26	9353.35
64	H45_(-20)-5	8303.9	8303.52
65	H45_(-20)-8	9344.25	9344.57
66	H45_(-18)-10	9304.24	9304.44
67	H45_(-17)-8	8318.9	8318.93
68	H45_(-16)-12	9279.23	9278.95
69	H45_(-15)-10	8270.88	8270.96
70	H45_(-14)-14	9231.21	9231.28
71	H45_(-10)-16	8607.98	8607.59
72	H45_(-5)-20	8213.85	8213.45
73	H45_1-25	8214.85	8214.52
74	H45_6-30	8190.84	8190.04
75	H45_11-35	8198.85	8198.45
76	H45_11-40	9877.43	9877.12
77	H45_16-35	6544.28	6544.07
78	H45_16-40	8222.86	8222.85
79	H45_21-45	8244.85	8245.01
80	H45_(-423)-(-412)_16-33	9997.46	9997.49
81	H45_(-416)-(-402)_16-30	9964.44	9964.38
82	H45_(-411)-(-400)_16-33	9979.44	9979.18
83	H45_(-405)-(-391)_16-30	9945.42	9945.04
84	H45_(-402)-(-391)_16-33	9945.42	9945.07
85	H45_(-156)-(-143)-(-141)-(-128)	9190.2	9189.84
86	H45_(-78)-(-65)_(-44)-(-31)	9256.22	9256.49
87	H45_(-78)-(-65)_(-34)-(-21)	9354.28	9354.26
88	H45_(-78)-(-65)_16-29	9232.21	9233.24
89	H45_(-78)-(-65)_21-34	9263.21	9263.82
90	H45_(-78)-(-65)_27-40	9295.23	9295.5
91	H45_(-74)-(-62)_(-40)-(-28)	8643.02	8643.41
92	H45_(-72)-(-58)_(-38)-(-26)	9354.28	9354.28

93	H45_(-71)-(-58)_(-38)-(-25)	9314.27	9314.5
94	H45_(-71)-(-58)_16-29	9264.23	9262.81
95	H45_(-71)-(-58)_21-34	9295.23	9295.83
96	H45_(-71)-(-58)_27-40	9327.25	9327.61
97	H45_(-68)-(-60)_(-36)-(-28)_19-28	9274.24	9274.8
98	H45_(-64)-(-51)_(-44)-(-31)	9310.23	9310.1
99	H45_(-64)-(-51)_(-35)-(-22)	9408.29	9408.3
100	H45_(-64)-(-51)_16-29	9286.22	9286.47
101	H45_(-64)-(-51)_21-34	9317.22	9317.12
102	H45_(-64)-(-51)_27-40	9349.24	9349.37
103	H45_(-44)-(-31)_16-29	9184.19	9183.98
104	H45_(-44)-(-31)_27-40	9247.21	9247.14
105	H45_(-44)-(-31)_21-33_T	9230.19	9230.7
106	H45_(-38)-(-25)_16-29	9210.22	9210.11
107	H45_(-38)-(-25)_21-34	9241.22	9241.87
108	H45_(-38)-(-25)_27-40	9273.24	9273.24
109	H45_(-34)-(-21)_16-29	9266.25	9266.72
110	H45_(-34)-(-21)_21-34	9297.25	9297.85
111	H45_(-34)-(-21)_27-40	9329.27	9329.78
112	H45_1-21	6859.387	6859.02
144	H45_167-194	9121.14	9121.27
145	H45_227-254	9253.22	9253.57
146	H45_257-284	9203.18	9203.09
147	H45_287-314	9369.21	9369.79
148	H45_317-344	9342.27	9342.18
149	H45_347-374	9268.22	9268.72
150	H46_(-200)-(-173)	9326.25	9325.78
151	H46_(-171)-(-144)	9243.21	9243.17
152	H46_(-146)-(-119)	9221.22	9221.07
153	H46_(-141)-(-114)	9276.23	9275.87
154	H46_(-136)-(-109)	9310.25	9310.07
155	H46_(-126)-(-99)	9295.25	9295.56
156	H46_(-116)-(-89)	9349.26	9349.16
157	H46_(-111)-(-84)	9334.26	9333.8
158	H46_(-106)-(-79)	9319.26	9319.07
159	H46_(-81)-(-54)	9318.24	9317.86
160	H46_(-51)-(-24)	9167.16	9167.63
161	H46_(-18)-6	8037.81	8037.34
162	H46_(-15)-9	8004.79	8004.24
163	H46_(-9)-15	7943.74	7944.19
164	H46_139-166	9293.23	9292.5
165	H46_169-196	9319.22	9319.52
166	H46_199-226	9325.25	9325.91
167	H46_229-256	9361.27	9361.58
168	H46_259-286	9351.26	9351.88
169	H46_289-316	9400.26	9400.38
170	H46_319-346	9219.2	9219.51

171	H47_(-200)-(-173)	9142.18	9142.19
172	H47_(-171)-(-144)	9320.24	9320.43
173	H47_(-141)-(-114)	9230.21	9230.7
174	H47_(-111)-(-84)	9354.26	9354.05
175	H47_(-81)-(-54)	9215.16	9215.57
176	H47_(-51)-(-24)	9262.23	9262.28
177	H47_(-16)-12	9257.24	9257.23
178	H47_1-29	9612.33	9613.79
179	H47_135-162	9236.2	9236.32
180	H48_(-21)-7	9351.26	9350.96
181	H48_1-28	9277.21	9277.18
182	H48_177-204	9233.23	9232.72
183	H49_(-21)-7	9304.24	9304.25
184	H49_22-47	8509.94	8509.66
185	H49_93-120	9244.19	9244.51
186	H50_(-200)-(-173)	9149.19	9148.87
187	H50_(-171)-(-144)	9292.23	9291.93
188	H50_(-141)-(-114)	9330.22	9330.33
189	H50_(-111)-(-84)	9237.17	9236.8
190	H50_(-81)-(-54)	9260.21	9259.85
191	H50_(-51)-(-24)	9259.21	9258.85
192	H50_(-21)-7	9183.21	9183.31
193	H50_100-127	9271.22	9271.25
194	H50_90-114	8277.87	8278.28
195	H51_(-18)-10	9411.24	9411.6
196	H51_224-251	9135.14	9135.51
197	H52_(-47)-(-20)	9330.2	9330.03
198	H52_(-18)-10	9270.22	9270.37
199	H52_9-38	9893.42	9893.2
200	H52_109-136	9236.2	9235.9
201	H53_(-197)-(-170)	9231.18	9231.18
202	H53_(-167)-(-140)	9298.2	9298.58
203	H53_(-137)-(-110)	9353.21	9353.6
204	H53_(-107)-(-80)	9225.19	9224.55
205	H53_(-77)-(-50)	9278.23	9278.35
206	H53_(-47)-(-20)	9373.25	9373.48
207	H53_(-18)-10	9319.26	9319
208	H53_203-230	9249.18	9249.06
209	H54_(-18)-10	9316.22	9316.33
210	H54_146-173	9267.22	9267.45
211	H54_176-203	9181.19	9181.18
212	H54_206-233	9142.18	9142.41
213	H54_236-263	9311.23	9311.57
214	H54_266-293	9249.18	9248.66
215	H54_296-323	9344.25	9344.57
216	H54_326-353	9308.21	9307.9
217	H55_(-197)-(-170)	9206.17	9206.95
218	H55_(-167)-(-140)	9278.23	9278.65
219	H55_(-137)-(-110)	9316.2	9316.05
220	H55_(-107)-(-80)	9327.25	9326.87
221	H55_(-77)-(-50)	9290.26	9290.43

222	H55_(-47) - (-20)	9342.25	9341.86
223	H55_(-18) -10	9185.21	9185.78
224	H55_12-34	6858.387	6858.97
113	H55_177-204	9203.18	9203.35
114	H55_191-218	9320.24	9320.46
115	H55_221-248	9301.22	9301.7
116	H55_251-278	9253.2	9253.12
117	H55_281-308	9300.22	9300.57
118	H55_311-338	9126.18	9126.01
119	H55_334-361	9058.12	9057.77
120	H55_341-368	9154.16	9154.22
121	H55_371-398	9412.24	9412.07
122	H55_401-428	9308.21	9308.06
123	H55_431-458	9210.17	9209.71
124	H55_461-488	9181.19	9181.31
125	H55_491-518	9260.23	9260.72
126	H55_521-548	9237.22	9236.93
127	H55_548-575	9304.26	9304.44
128	H56_(-400) - (-373)	9283.22	9282.84
129	H56_(-380) - (-355)	8584.99	8585.11
130	H56_(-345) - (-318)	9397.26	9397.16
131	H56_(-315) - (-288)	9275.21	9275.43
132	H56_(-285) - (-258)	9258.21	9257.72
133	H56_(-255) - (-228)	9307.21	9307.98
134	H56_(-225) - (-198)	9364.24	9364.79
135	H56_(-195) - (-168)	9224.17	9224.08
136	H56_(-165) - (-138)	9172.18	9172.28
137	H56_(-135) - (-108)	9256.24	9256.9
138	H56_(-105) - (-78)	9291.23	9291.37
139	H56_(-76) - (-51)	8754.04	8754.09
140	H56_(-59) - (-34)	8629.04	8629.59
141	H56_(-39) - (-14)	8723.04	8723.84
142	H56_(-31) - (-6)	8773.06	8773.68
143	H56_(-14) -13	9297.23	9296.6
225	H44_188-202_H56_(-156) - (-142)	9876.43	9876.87
226	H44_188-202_H56_(-124) - (-110)	9956.45	9956.24
227	H44_188-202_H56_(-85) - (-71)	10069.49	10070.12
228	H56_(-156) - (-142)_H44_188-202	9876.43	9876.63
229	H56_(-124) - (-110)_H44_188-202	9956.45	9956.72
230	H56_(-85) - (-71)_H44_188-202	10069.49	10069.93
231	H45_16-35_H46_(-134) - (-115)	13207.58	13207.56
232	H45_16-35_H46_(-103) - (-84)	13281.61	13281.25

[0242]

Получение антисмыслового РМО, нацеленного на последовательность- сайленсер сплайсинга в интроне гена дистрофина человека или сайт сплайсинга, участвующий в одиночном пропуске из гена дистрофина человека

(i) РМО, имеющий последовательность оснований РМО № 233 (SEQ ID NO: 257) и

нацеленный на последовательность-сайленсер сплайсинга интрона 44 или сайт сплайсинга, участвующий в одиночном пропуске, (ii) РМО, имеющие последовательности оснований РМО № 234-244 (SEQ ID NO: 258-268) и нацеленные на последовательность-сайленсер сплайсинга интрона 45 или сайт сплайсинга, участвующий в одиночном пропуске, (iii) РМО (связанные), имеющие последовательности оснований РМО №№ 245-249 (SEQ ID NO: 269-273) и нацеленные на область (R2) вблизи акцептора интрона 44, и последовательность-сайленсер сплайсинга интрона 45 или сайт сплайсинга, участвующий в одиночном пропуске, и (iv) РМО, имеющие последовательности оснований РМО No 250-251 (SEQ ID NO: 274-275) и нацеленные на последовательность-сайленсер сплайсинга экзона 45 в гене дистрофина человека, были синтезированы таким же способом, как и РМО, нацеленный на область вблизи донора или акцептора интрона. 5'-конец каждого РМО представляет собой группу (3), как и в случае РМО, нацеленного на область вблизи донора или акцептора интрона. Каждый РМО показан в Таблице 18, а расчетные (Clcd) и измеренные (найденные) значения ESI-TOF-MS показаны в Таблице 19.

[0243]

[Таблица 18]

РМО No.	Мишень	Последовательность-мишень оснований	Последовательность оснований РМО	SEQ ID NO	
233	(i)	H45_(-93) - (-70)	<u>GTGTGCTACCACATGCAGTTGTAC</u>	257	
234	(ii)	H45_166-189	<u>TCTGTGCGCCCTACCTCTTTTTTCT</u>	258	
235		H45_178-201	<u>ATTCCATTAGATCTGTGCGCCCTA</u>	259	
236		H45_183-206	<u>TTTTTCATTCCATTAGATCTGTGCG</u>	260	
237		H45_188-211	<u>AAATGTTTTTCATTCCATTAGATC</u>	261	
238		H45_191-214	<u>CTAAAATGTTTTTCATTCCATTAG</u>	262	
239		H45_197-220	<u>AGTCTGCTAAAATGTTTTTCATTCC</u>	263	
240		H46_(-35) - (-12)	<u>AGAATAAAAATTGTTATTTTTTTTT</u>	264	
241		H46_(-22)_2	<u>GCCTGGAGAAAAGAATAAAAATT</u>	265	
242		H46_(-12)_12	<u>TGTTCTTCTAGCCTGGAGAAAAGAA</u>	266	
243		H46_(-2)_22	<u>GATATTCTTTTGTTCTTCTAGCCT</u>	267	
244		H45_20236-20259	<u>ATCCATGCATTCTCCATGCACAG</u>	268	
245		(iii)	H45_16-30_191-205	<u>TTTCATTCCATTAGTTGCCGCTGCCCAAT</u>	269
246			H45_16-30_197-211	<u>AAATGTTTTTCATTCCATTGCCGCTGCCCAAT</u>	270
247			H45_16-33_197-208	<u>TGTTTTTCATTCCAGTTTGCCGCTGCCCAAT</u>	271
248	H45_16-35_183-192		<u>AGATCTGTGACAGTTTGCCGCTGCCCAAT</u>	272	
249	H45_18-35_191-202		<u>CATTCCATTAGACAGTTTGCCGCTGCCCA</u>	273	
250	(iv)	H45_31-54	<u>TGCATTCAATGTTCTGACAACAGT</u>	274	
251		H45_131-154	<u>GTTTGCAGACCTCCTGCCACCGCA</u>	275	

Подчеркнута последовательность оснований, которая, предположительно, соответствует последовательности-сайленсеру сплайсинга в интроне или сайту сплайсинга, участвующему в одиночном пропуске.

Последовательность оснований, предположительно, соответствующая последовательности-сайленсеру сплайсинга в интроне или сайту сплайсинга, участвующему в одиночном пропуске, подчеркнута.

[0244]

[Таблица 19]

PMO No.	Последовательность-мишень оснований	Вычислено	Измерено
233	H45_(-93) - (-70)	7938.75	7938.95
234	H45_166-189	7757.67	7757.89
235	H45_178-201	7848.72	7848.99
236	H45_183-206	7869.71	7869.94
237	H45_188-211	7886.73	7886.24
238	H45_191-214	7886.73	7886.37
239	H45_197-220	7887.73	7887.49
240	H46_(-35) - (-12)	7955.74	7955.61
241	H46_(-22)_2	8061.82	8062.19
242	H46_(-12)_12	7986.77	7986.42
243	H46_(-2)_22	7860.7	7860.83
244	H45_20236-20259	7842.73	7842.9
245	H45_16-30_191-205	9824.39	9824.66
246	H45_16-30_197-211	9833.4	9833.32
247	H45_16-33_197-208	9840.39	9840.1
248	H45_16-35_183-192	9908.43	9908.14
249	H45_18-35_191-202	9843.41	9843.08
250	H45_31-54	7848.72	7848.99
251	H45_131-154	7844.73	7844.85

[0245]

[Пример 2: Тест на активность пропуска множества экзонов под действием антисмыслового олигомера]

<Пример испытаний 1>

In vitro анализ на пропуск множества экзонов в гене дистрофина человека - (1): индуцирование пропуска множества экзонов

#### Методика

Каждый антисмысловый олигомер (PMO №№ 55, 59, 78, 65, 75, 77, 102, 35, 52, 47, 50, 46, 43, 40, 139, 119, 142, 113, 51, 11, 45, 54, 41, 74, 66, 64, 63, 68, 76, 28, 27, 225, 228, 1, 5, 132, 131, 128, 163, 162 и 161 (SEQ ID NO: 55, 59, 78, 65, 75, 77, 102, 35, 52, 47, 50, 46, 43, 40, 139, 119, 142, 113, 51, 11, 45, 54, 41, 74, 66, 64, 63, 68, 76, 28, 27, 225, 228, 1, 5, 132, 131, 128, 163, 162 и 161)), представленный в Таблице 11, трансфецировали в концентрации от 25 до 50 мкМ отдельно или в комбинации двух или трех олигомеров в  $3,5 \times 10^5$  клеток RD (клеточной линии рабдомиосаркомы человека, CCL-136, приобретенной у ATCC). Реагентом, используемым для трансфекции, является набор реагентов для нуклеофекции L Nucleofector Amaha Cell Line на Nucleofector II (Lonza). Была использована Программа T-030.

После трансфекции, клетки культивировали в течение трех ночей в 2 мл минимальной поддерживающей среды Игла (EMEM) (производства Sigma, далее используется та же среда), содержащей 10% фетальную бычью сыворотку (FBS) (производства Invitrogen) в условиях 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

Клетки RD один раз промывали PBS (производства Nissui, далее используется тот же буфер) и к клеткам добавляли 350 мкл буфера RLT (производства Qiagen), содержащего 1% 2-меркаптоэтанола (производства Nacalai Tesque, Inc.). После этого, клетки оставляли

при комнатной температуре на несколько минут для лизиса клеток, а затем лизат собирали в гомогенизатор QIAshredder (производства Qiagen). Гомогенат получали центрифугированием при 15000 об./мин. в течение 2 минут. Общую РНК экстрагировали в соответствии с протоколом, прилагаемым к набору RNeasy Mini Kit (производства Qiagen). Концентрацию экстрагированной общей РНК определяли с использованием NanoDrop ND-1000 (производства LMS Co., Ltd.).

[0246]

Одностадийную ОТ-ПЦР проводили с использованием 800 нг экстрагированной общей РНК с помощью набора для одностадийной ОТ-ПЦР QIAGEN (производства Qiagen). Реакционный раствор приготавливали в соответствии с протоколом, прилагаемым к набору. В качестве термоячейки использовали TaKaRa PCR Dice Touch (производства Takara Bio Inc.). Используемая программа ОТ-ПЦР представлена ниже.

50°C, 30 минут: реакция обратной транскрипции

95°C, 15 минут: активация полимеразы, инактивация обратной транскриптазы, термоденатурация кДНК

[94°C, 10 секунд; 57°C, 30 секунд; 72°C, 1 минута] ×33 циклов: ПЦР-амплификация

72°C, 10 минут: конечное удлинение.

[0247]

Последовательности оснований прямого праймера и обратного праймера, используемые для ОТ-ПЦР, приведены ниже.

Прямой праймер: 5'-ATTTGACAGATCTGTTGAGAAATGG-3' (SEQ ID NO: 276).

Обратный праймер 1: 5'-GGCTGTTTTTCATCCAGGTTGTG-3' (SEQ ID NO: 277).

Обратный праймер 2: 5'-AGTTGCTGCTCTTTTCCAGGT-3' (SEQ ID NO: 278).

[0248]

Транскрипты, в которых были пропущены экзоны 45-55, могут быть детектированы с использованием комбинации прямого праймера и обратного праймера 2. Транскрипты, в которых отсутствует пропуск, и транскрипты, в которых пропущен один экзон 45, могут быть обнаружены с использованием комбинации прямого праймера и обратного праймера 1.

Продукт описанной выше ПЦР-реакции анализировали с использованием биоанализатора (производства Agilent Technologies, Inc.) и MultiNA (производства Shimadzu Corp.).

[0249]

Были оценены уровни полинуклеотида «А» полосы с пропуском любых двух или более следующих друг за другом экзонов среди экзонов с 45 по 55, уровни полинуклеотида «В» полосы с пропуском любого одного экзона среди экзонов с 45 по 55 и уровни полинуклеотида «С» полосы без пропуска. Исходя из этих измеренных величин «А», «В» и «С», эффективность пропуска множества экзонов определяли по следующему уравнению.

Эффективность пропуска (%) =  $A/(A+B+C) \times 100$

[0250]

### Результаты

Результаты показаны на фигурах с 1 по 16. Введение РМО №№ 55, 59, 78, 65, 75, 77, 102, 35, 52, 47, 50, 46, 43, 40, 139, 119, 142, 113, 51, 11, 45, 54, 41, 74, 66, 64, 63, 68, 76, 28, 27, 225, 228, 1, 5, 132, 131, 128, 163, 162 и 161 (SEQ ID NO: 55, 59, 78, 65, 75, 77, 102, 35, 52, 47, 50, 46, 43, 40, 139, 119, 142, 113, 51, 11, 45, 54, 41, 74, 66, 64, 63, 68, 76, 28, 27, 225, 228, 1, 5, 132, 131, 128, 163, 162 и 161) по отдельности или в комбинации приводит к индуцированию пропуска множества экзонов 45-55.

Эти результаты показали, что антисмысловые олигомеры согласно изобретению, описанные в Таблице 11, эффективно индуцируют или будут эффективно индуцировать пропуск множества экзонов при использовании по отдельности или в комбинации.

Было также подтверждено, что введение РМО №№ 6, 7, 8, 10, 14, 26, 29, 38, 39, 53, 58, 67, 80, 82, 86, 92, 97, 98, 100, 121, 122, 124, 125, 126, 130, 144, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 231, 232 (SEQ ID NO: 6, 7, 8, 10, 14, 26, 29, 38, 39, 53, 58, 67, 80, 82, 86, 92, 97, 98, 100, 121, 122, 124, 125, 126, 130, 144, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 231, 232) также индуцирует пропуск нескольких экзонов с 45 по 55.

[0251]

<Пример испытаний 2>

*In vitro* анализ на пропуск множества экзонов в гене дистрофина человека - (2): индуцирование пропуска множества экзонов

#### Методика

Антисмысловой олигомер (РМО No 75), представленный в Таблице 11, добавляли в концентрации от 25 до 50 мкМ к  $3,5 \times 10^5$  клеток RD (клеточной линии рабдомиосаркомы человека, CCL-136, приобретенной у ATCC), и каждый антисмысловой олигомер (РМО № 236, 237 или 239) Таблицы 18 вводили в комбинации с этим олигомером в концентрации от 25 до 50 мкМ. Анализ проводили по методике, описанной в Примере испытаний 1.

[0252]

#### Результаты

Результаты показаны на фигурах 17 и 18. Введение РМО № 75 (SEQ ID NO: 75) в комбинации РМО № 236, 237 или 239 (SEQ ID NO: 260, 261 или 263) повышало эффективность пропуска нескольких экзонов с 45 по 55 по сравнению с РМО № 75, взятым отдельно. С другой стороны, этот подход снижал эффективность пропуска одного экзона 45.

Эти результаты показали, что антисмысловой олигомер согласно изобретению, описанный в Таблице 11, способствует или будет способствовать пропуску нескольких экзонов при использовании в комбинации с антисмысловым олигомером-супрессором согласно изобретению, описанным в Таблице 18.

[0253]

<Пример испытаний 3>

*In vitro* анализ на пропуск множества экзонов в гене дистрофина человека - (3):

индуцирование пропуска множества экзоновМетодика

Пример испытаний 3 проводили в соответствии с методикой, описанной в Примере испытания 2, за исключением того, что одностадийную ОТ-ПЦР проводили следующим образом.

Одностадийную ОТ-ПЦР проводили с использованием 800 нг экстрагированной общей РНК с помощью набора для одностадийной ОТ-ПЦР QIAGEN (производства Qiagen). Реакционный раствор приготавливали в соответствии с протоколом, прилагаемым к набору. В качестве термочейки использовали TaKaRa PCR Dice Touch (производства Takara Bio Inc.). Используемая программа ОТ-ПЦР представлена ниже.

50°C, 30 минут: реакция обратной транскрипции

95°C, 15 минут: активация полимеразы, инактивация обратной транскриптазы, термоденатурация кДНК

[94°C, 10 секунд; 60°C, 30 секунд; 72°C, 2 минуты] × 40 циклов: ПЦР-амплификация

72°C, 10 минут: конечное удлинение

[0254]

Последовательности оснований прямого праймера и обратного праймера, используемых для ОТ-ПЦР, представлены ниже.

Прямой праймер 2: 5'-ATTTGACAGATCTGTTGAGAAATGG-3' (SEQ ID NO: 279)

Обратный праймер 3: 5'-GGCTCCAATAGTGGTCAGTCC-3' (SEQ ID NO: 280).

Прямой праймер 3: 5'-CCTGAGAATTGGGAACATGC-3' (SEQ ID NO: 281)

Обратный праймер 4: 5'-CCTCCTTCCATGACTCAAGC-3' (SEQ ID NO: 282)

[0255]

Транскрипты, в которых были пропущены несколько экзонов, а именно, экзоны 45 и 46, экзоны с 45 по 47, экзоны с 45 по 48 или экзоны с 45 по 49 в гене дистрофина человека, могут быть детектированы с использованием комбинации прямого праймера 2 и обратного праймера 3. С другой стороны, транскрипты, в которых были пропущены несколько экзонов, а именно, экзоны 45 и 46, экзоны с 45 по 47, экзоны с 45 по 48, экзоны с 45 по 49, экзоны с 45 по 50, экзоны с 45 по 51 или экзоны с 45 по 52 детектируют с использованием комбинации прямого праймера 3 и обратного праймера 4.

Продукт вышеописанной ПЦР-реакции анализировали с использованием биоанализатора (производства Agilent Technologies, Inc.) и MultiNA (производства Shimadzu Corp.) для количественной оценки продукта ПЦР-транскрипта, в котором был пропущен каждый из этих экзонов.

[0256]

Результаты

Результаты представлены на фиг. 19-22. Введение РМО № 75 (SEQ ID NO: 75) в комбинации с РМО № 236 или 239 (SEQ ID NO: 260 или 263) повышало эффективность пропуска нескольких экзонов с 45 по 55 (Пример испытаний 2), а также пропуск экзонов 45 и 46, экзонов с 45 по 47, экзонов с 45 по 48, экзонов с 45 по 49, экзонов с 45 по 50, экзонов

с 45 по 51 и экзонов с 45 по 52 по сравнению с результатами пропуска одного РМО №75.

Эти результаты показали, что антисмысловой олигомер согласно изобретению, описанный в Таблице 11, способствует или будет способствовать пропуску множества экзонов при использовании в комбинации с антисмысловым олигомером-супрессором согласно изобретению, описанным в Таблице 18.

### **Промышленное применение**

[0257]

Настоящее изобретение относится к антисмысловому олигомеру и к антисмысловому олигомеру-супрессору, которые вызывают пропуск нескольких экзонов в дистрофии человека. Применение антисмыслового олигомера и антисмыслового олигомера-супрессора согласно изобретению позволяет разработать новое терапевтическое средство для лечения МДД и способ лечения МДД.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат, которые вызывают одновременный пропуск любых двух или более следующих друг за другом экзонов, выбранных из группы, состоящей из экзонов с 45-го по 55-й в пре-мРНК дистрофина человека;

антисмысловой олигомер, содержащий последовательность оснований, комплементарную последовательности оснований по меньшей мере одной области, выбранной из группы, состоящей из областей R1- R24, представленных

областью R<sub>n</sub> (где n означает нечетное число от 1 до 23), которая состоит из последовательности оснований NX в направлении выше от 3'-конца экзона NA и последовательности оснований NY в направлении ниже от 5'-конца интрона NB в пре-мРНК дистрофина человека, и

областью R<sub>n</sub> (где n означает четное число от 2 до 24), которая состоит из последовательности оснований NX в направлении выше от 3'-конца интрона NA и последовательности оснований NY в направлении ниже от 5'-конца экзона NB в пре-мРНК дистрофина человека,

или его неполная последовательность оснований, где  
 если n равно 1, то NA=44, NB=44, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 2, то NA=44, NB=45, NX=600 и NY=50,  
 если n равно 3, то NA=45, NB=45, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 4, то NA=45, NB=46, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 5, то NA=46, NB=46, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 6, то NA=46, NB=47, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 7, то NA=47, NB=47, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 8, то NA=47, NB=48, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 9, то NA=48, NB=48, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 10, то NA=48, NB=49, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 11, то NA=49, NB=49, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 12, то NA=49, NB=50, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 13, то NA=50, NB=50, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 14, то NA=50, NB=51, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 15, то NA=51, NB=51, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 16, то NA=51, NB=52, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 17, то NA=52, NB=52, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 18, то NA=52, NB=53, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 19, то NA=53, NB=53, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 20, то NA=53, NB=54, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 21, то NA=54, NB=54, NX=20 и NY=400,  
 если n равно 22, то NA=54, NB=55, NX=400 и NY=50,  
 если n равно 23, то NA=55, NB=55, NX=20 и NY=400, или





(a) любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389,

(b) последовательности оснований, которая гибридизуется в жестких условиях с последовательностью оснований, комплементарной любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389,

(c) последовательности оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований, или

(d) неполной последовательности оснований любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из последовательностей оснований (a), (b) и (c).

4. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль, или его гидрат по любому из пп. 1-3, где

антисмысловой олигомер представляет собой антисмысловой олигомер, содержащий два или более олигомерных звеньев, связанных друг с другом, где

каждый из олигомерных звеньев содержит последовательность оснований, комплементарную последовательности оснований любой области, выбранной из группы, состоящей из областей R1-R24, или ее неполной последовательности оснований, и соответствующие последовательности оснований олигомерных звеньев не являются последовательными и ни перекрываются друг с другом.

5. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль, или его гидрат по любому из пп. 1-3, где

антисмысловой олигомер представляет собой антисмысловой олигомер, содержащий два или более олигомерных звеньев, связанных друг с другом, где

каждый из олигомерных звеньев содержит последовательность оснований, комплементарную

(a) любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389,

(b) последовательности оснований, которая гибридизуется в жестких условиях с последовательностью оснований, комплементарной любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389,

(c) последовательности оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 233-256, 341-369 и 385-389, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований, или

(d) неполной последовательности оснований любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из последовательностей оснований (a), (b) и (c),

и где соответствующие последовательности оснований олигомерных звеньев не являются последовательными и не перекрываются друг с другом.

6. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или его гидрат по п. 4 или 5, где каждый из олигомерных звеньев содержит последовательность оснований, комплементарную непрерывной последовательности оснований длиной от 5 до 20 оснований в этой области.

7. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или его гидрат по любому из пп. 1-3, где антисмысловой олигомер состоит из:

(1) любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-111, 113-177, 179, 180, 182, 183, 185-193, 195-198, 200-223 и 225-232, или

(2) последовательности оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-111, 113-177, 179, 180, 182, 183, 185-193, 195-198, 200-223 и 225-232, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований.

8. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или его гидрат по любому из пп. 1-3 и 7, где антисмысловой олигомер состоит из любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 26, 27, 28, 29, 35, 38, 39, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 58, 59, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 80, 82, 86, 92, 97, 98, 100, 102, 113, 119, 121, 122, 124, 125, 126, 128, 130, 131, 132, 139, 142, 144, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 225, 228, 231 и 232.

9. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или его гидрат по любому из пп. 1-3, 7 и 8, где антисмысловой олигомер состоит из любой последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 11, 27, 28, 35, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 54, 55, 59, 63, 64, 65, 66, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 102, 113, 119, 128, 131, 132, 139, 142, 161, 162, 163, 225 и 228.

10. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или его гидрат по любому из пп. 1-9, где антисмысловой олигомер представляет собой олигонуклеотид.

11. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или его гидрат по п. 10, где сахарная часть и/или часть фосфатной связи по меньшей мере одного нуклеотида, составляющего олигонуклеотид, являются модифицированными.

12. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или его гидрат по п. 10 или 11, где сахарная часть по меньшей мере одного нуклеотида, составляющего олигонуклеотид, представляет собой рибозу, в которой 2'-ОН-группа заменена любой одной группой, выбранной из группы, состоящей из -OR, -R, -R'OR, -SH, -SR, -NH<sub>2</sub>, -NHR, -NR<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br и I,

(где R представляет собой алкил или арил, а R' представляет собой алкилен).

13. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или его гидрат по любому из пп. 10-12, где фрагмент фосфатной связи по меньшей мере одного нуклеотида, составляющего олигонуклеотид, представляет собой любой фрагмент, выбранный из группы, состоящей из фосфортиоатной связи, фосфодитиоатной связи,

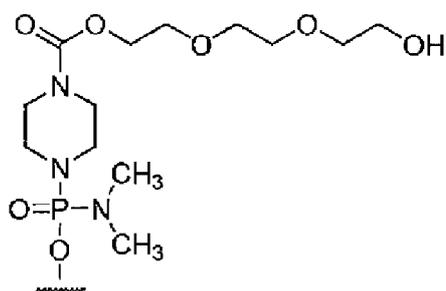
алкилфосфонатной связи, фосфорамидатной связи и боранофосфатной связи.

14. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль, или его гидрат по любому из пп. 1-9, где антисмысловой олигомер представляет собой морфолино-олигомер.

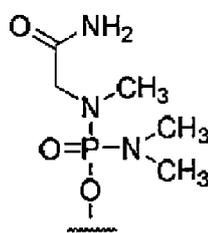
15. Антисмысловой олигомер, или его фармацевтически приемлемая соль, или его гидрат по п. 14, где антисмысловой олигомер представляет собой фосфордиамидатный морфолино-олигомер.

16. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль, или его гидрат по п. 14 или 15, где 5'-конец представляет собой любую из химических формул (1)-(3), представленных ниже:

(Формула 15)



(1)



(2)



(3)

17. Антисмысловой олигомер-супрессор или его фармацевтически приемлемая соль или его гидрат, которые подавляют одиночный пропуск любого одного экзона, выбранного из группы, состоящей из экзона с 45-го по 55-й в пре-мРНК дистрофина человека, где антисмысловой олигомер-супрессор содержит последовательность оснований, комплементарную

(a) любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 370-384,

(b) последовательности оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 370-384, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований, или

(c) неполной последовательности оснований (a) или (b).

18. Антисмысловой олигомер-супрессор или его фармацевтически приемлемая соль или его гидрат по п. 17, где антисмысловой олигомер-супрессор состоит из

(1) любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 257-275, или (2) последовательности оснований, которая по меньшей мере на 85% идентична любой одной последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 257-275, и имеет длину в пределах  $\pm 15\%$  от длины любой выбранной последовательности оснований.

19. Антисмысловой олигомер-супрессор или его фармацевтически приемлемая соль или его гидрат по п. 17 или 18, где антисмысловой олигомер-супрессор состоит из любой

последовательности оснований, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 260, 261 и 263.

20. Антисмысловой олигомер-супрессор или его фармацевтически приемлемая соль или его гидрат согласно по любому из пп. 17-19, где антисмысловой олигомер-супрессор представляет собой олигонуклеотид.

21. Антисмысловой олигомер-супрессор или его фармацевтически приемлемая соль или его гидрат по п. 20, где сахарная часть и/или часть фосфатной связи по меньшей мере одного нуклеотида, составляющего олигонуклеотид, являются модифицированными.

22. Антисмысловой олигомер-супрессор или его фармацевтически приемлемая соль или его гидрат по п. 20 или 21, где сахарная часть по меньшей мере одного нуклеотида, составляющего олигонуклеотид, представляет собой рибозу, в которой 2'-ОН-группа заменена любой одной группой, выбранной из группы, состоящей из -OR, -R, -R'OR, -SH, -SR, -NH<sub>2</sub>, -NHR, -NR<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br и -I,

(где R представляет собой алкил или арил, а R' представляет собой алкилен).

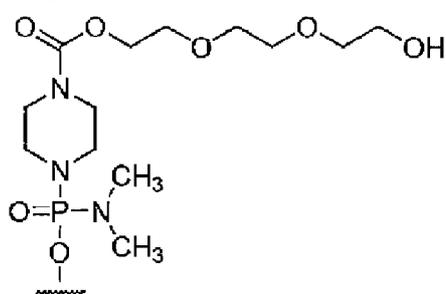
23. Антисмысловой олигомер-супрессор или его фармацевтически приемлемая соль или его гидрат по любому из пп. 20-22, где фрагмент фосфатной связи по меньшей мере одного нуклеотида, составляющего олигонуклеотид, представляет собой любой фрагмент, выбранный из группы, состоящей из фосфортиоатной связи, фосфордитиоатной связи, алкилфосфонатной связи, фосфорамидатной связи и боранофосфатной связи.

24. Антисмысловой олигомер-супрессор или его фармацевтически приемлемая соль или его гидрат по любому из пп. 17-19, где антисмысловой олигомер-супрессор представляет собой морфолино-олигомер.

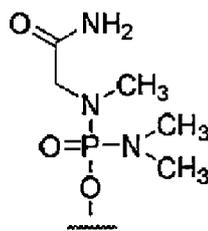
25. Антисмысловой олигомер-супрессор или его фармацевтически приемлемая соль или его гидрат по п. 24, где антисмысловой олигомер-супрессор представляет собой фосфордиамидатный морфолино-олигомер.

26. Антисмысловой олигомер-супрессор или его фармацевтически приемлемая соль или его гидрат по п. 24 или 25, где 5'-конец представляет собой любую из химических формул (1)-(3), представленных ниже:

(Формула 16)



(1)



(2)



(3)

27. Фармацевтическая композиция, содержащая антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или его гидрат по любому из пп. 1-16.

28. Фармацевтическая композиция по п. 27, дополнительно содержащая

антисмысловой олигомер-супрессор или его фармацевтически приемлемую соль или его гидрат по любому из пп. 17-26.

29. Фармацевтическая композиция, содержащая антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или его гидрат по любому из пп. 1-16, и антисмысловой олигомер-супрессор, или его фармацевтически приемлемую соль или его гидрат по любому из пп. 17-26.

30. Фармацевтическая композиция по п. 28 или 29, где:

(1) антисмысловой олигомер представляет собой олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 75, а антисмысловой олигомер-супрессор представляет собой олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 260,

(2) антисмысловой олигомер представляет собой олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 75, а антисмысловой олигомер-супрессор представляет собой олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 261, или

(3) антисмысловой олигомер представляет собой олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 75, а антисмысловой олигомер-супрессор представляет собой олигомер, состоящий из SEQ ID NO: 263.

31. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 27-30, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

32. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 27-31 для лечения мышечной дистрофии.

33. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 27-32 для введения пациенту-человеку.

34. Способ лечения мышечной дистрофии, включающий введение пациенту, страдающему мышечной дистрофией, антисмыслового олигомера или его фармацевтически приемлемой соли или его гидрата по любому из пп. 1-16, или фармацевтической композиции по любому из пп. 27-33.

35. Способ лечения по п. 34, где пациентом с мышечной дистрофией является пациент с мутацией, поддающейся пропуску экзонов с 45 по 55 в гене дистрофина.

36. Способ лечения по п. 34 или 35, где пациентом является человек.

37. Применение антисмыслового олигомера или его фармацевтически приемлемой соли или его гидрата по любому из пп. 1-16, или фармацевтической композиции по любому из пп. 27-33 в целях приготовления лекарственного средства для лечения мышечной дистрофии.

38. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль, или его гидрат по любому из пп. 1-16, или фармацевтическая композиция по любому из пп. 27-33 для применения в целях лечения мышечной дистрофии.

39. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или его гидрат или фармацевтическая композиция по п. 38, где лечение включает пропуск любых двух или более следующих друг за другом экзонов, выбранных из группы, состоящей из экзонов с 45-го по 55-й в пре-мРНК дистрофина человека.

40. Антисмысловой олигомер, или его фармацевтически приемлемая соль, или его гидрат, или фармацевтическая композиция по п. 38 или 39, где пациентом, проходящим лечение мышечной дистрофии, является человек.

41. Способ повышения эффективности пропуска двух или более следующих друг за другом экзонов, где указанный способ включает:

ингибирование последовательности-сайленсера сплайсинга, последовательности сайта сплайсинга или последовательности сайта ветвления представляющей интерес пре-мРНК, если два или более следующих друг за другом экзона пропущены из представляющей интерес пре-мРНК.

42. Способ по п. 41, где последовательность-сайленсер сплайсинга представляет собой последовательность распознавания гетерогенного ядерного рибонуклеопротеина A1 (hnRNPA1).

43. Способ по п. 41 или 42, где представляющей интерес пре-мРНК является пре-мРНК дистрофина человека.

44. Способ по любому из пп. 41-43, где два или более следующих друг за другом экзонов выбраны из группы, состоящей из экзонов с 45-го экзона по 55-й в пре-мРНК дистрофина человека.

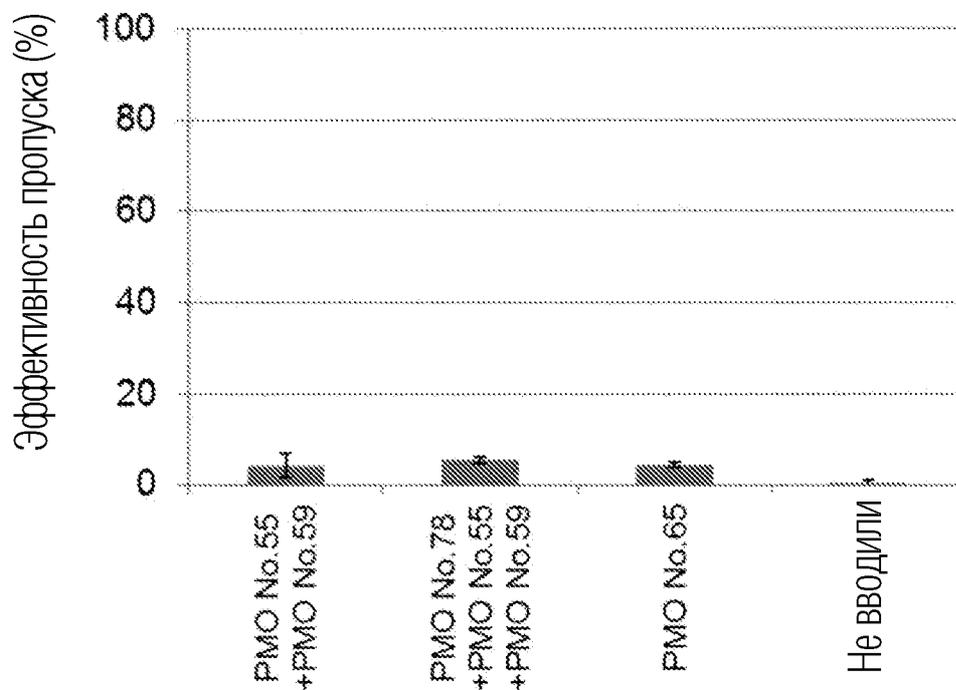
45. Способ по п. 44, где пропуск двух или более следующих друг за другом экзонов представляющей интерес пре-мРНК осуществляют с использованием антисмыслового олигомера или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата по любому из пп. 1-16.

46. Способ по п. 44 или 45, где специфическое ингибирование последовательности-сайленсера сплайсинга, последовательности сайта сплайсинга или последовательности сайта ветвления осуществляют с использованием антисмыслового олигомера-супрессора или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата по любому из пп. 17-26.

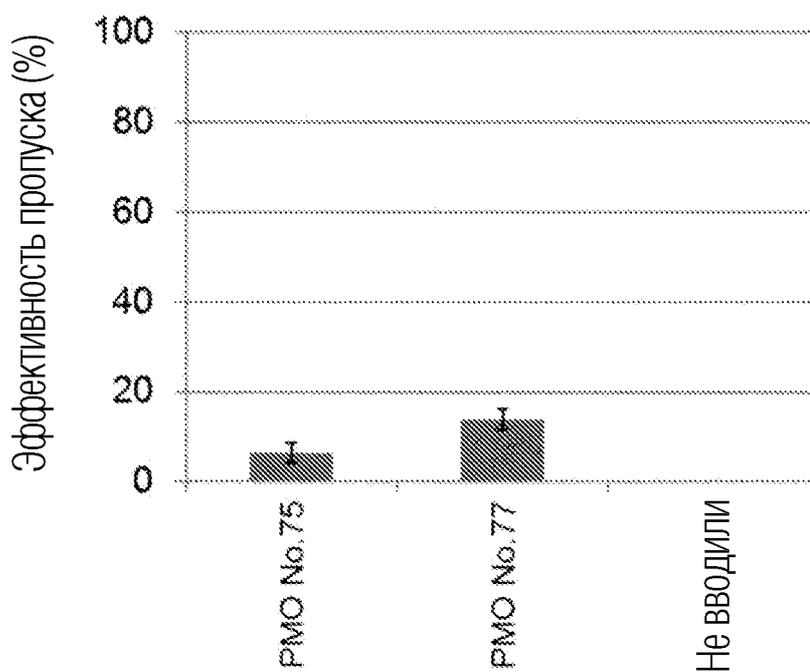
По доверенности

ФИГ. 1

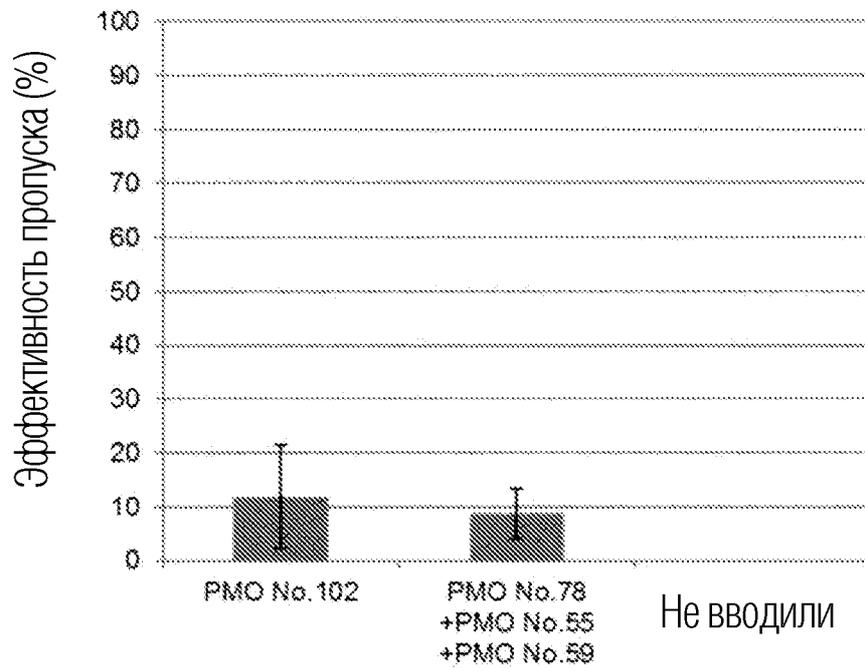
А



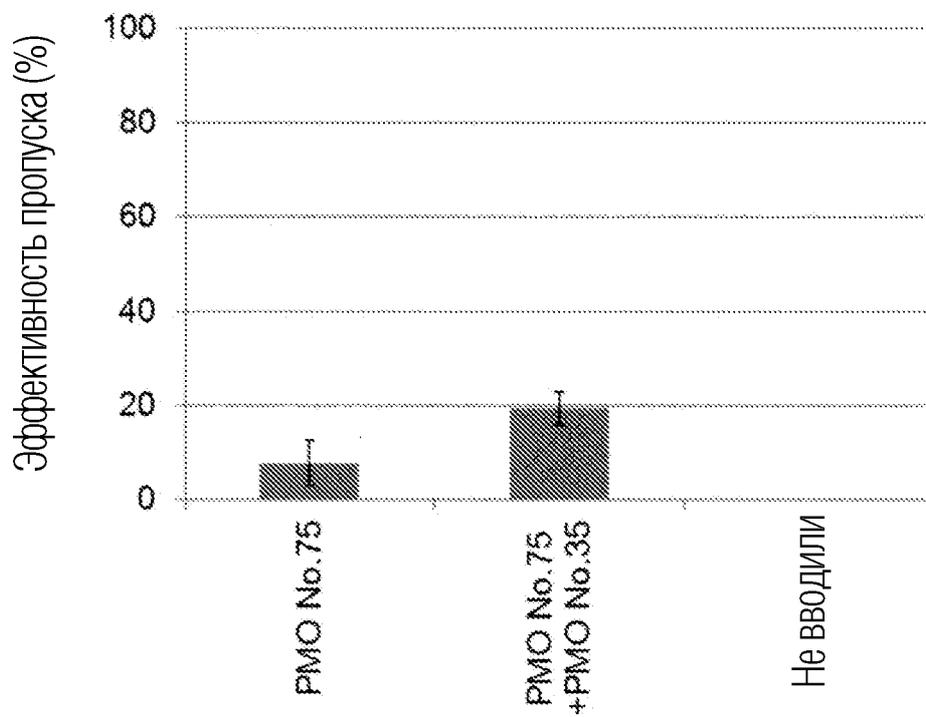
В



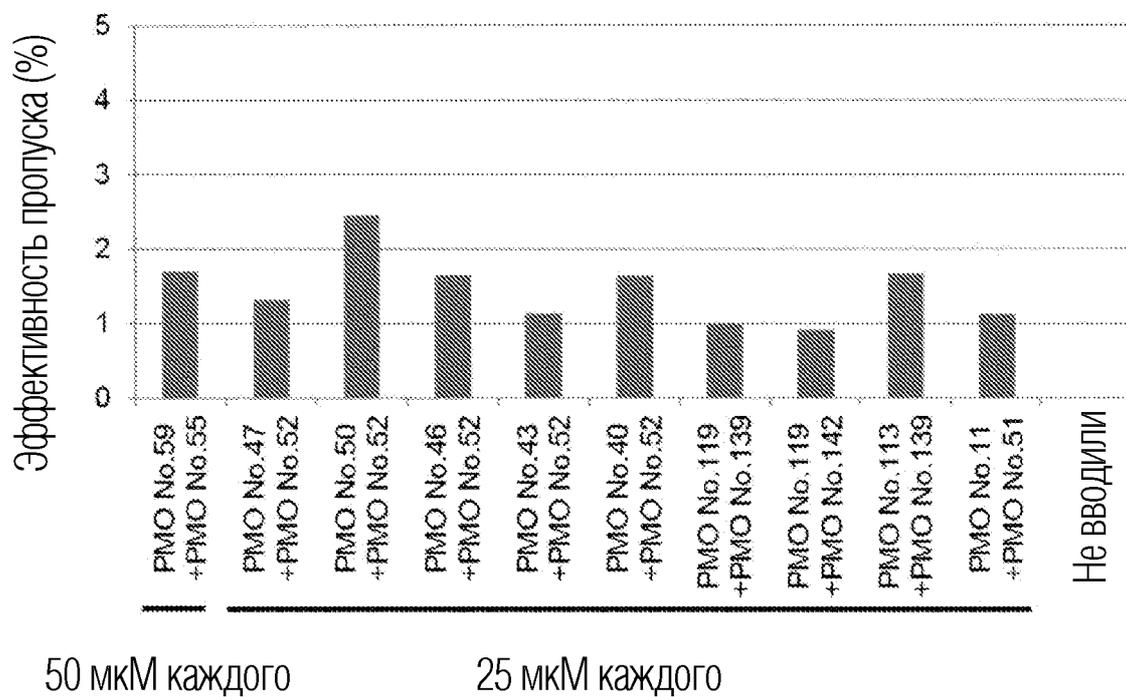
ФИГ. 2



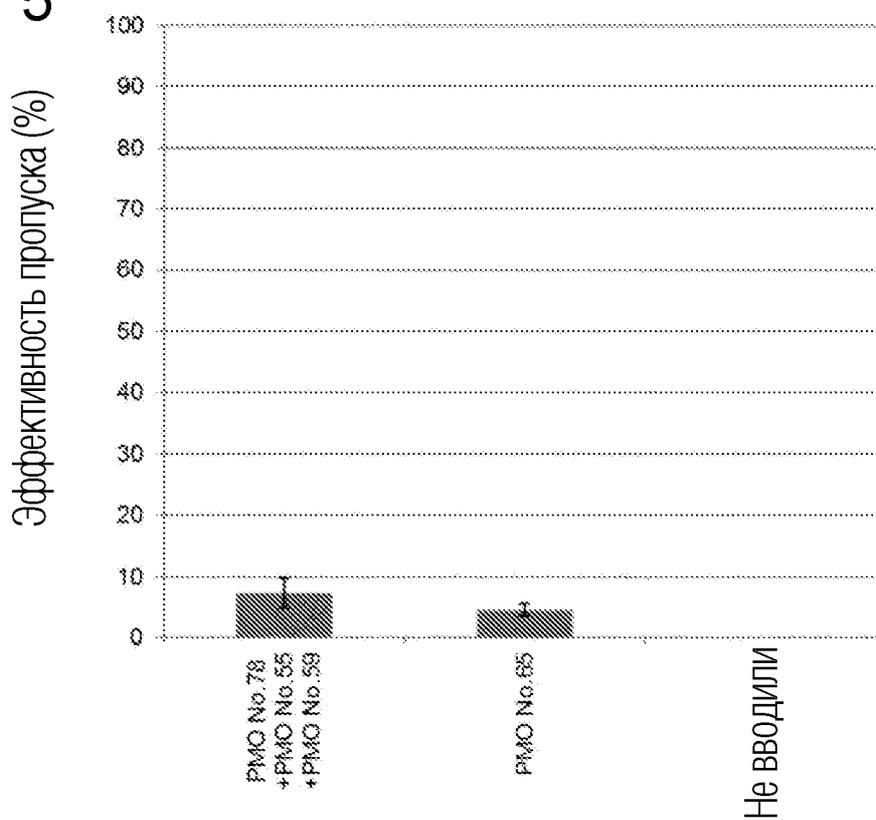
ФИГ. 3



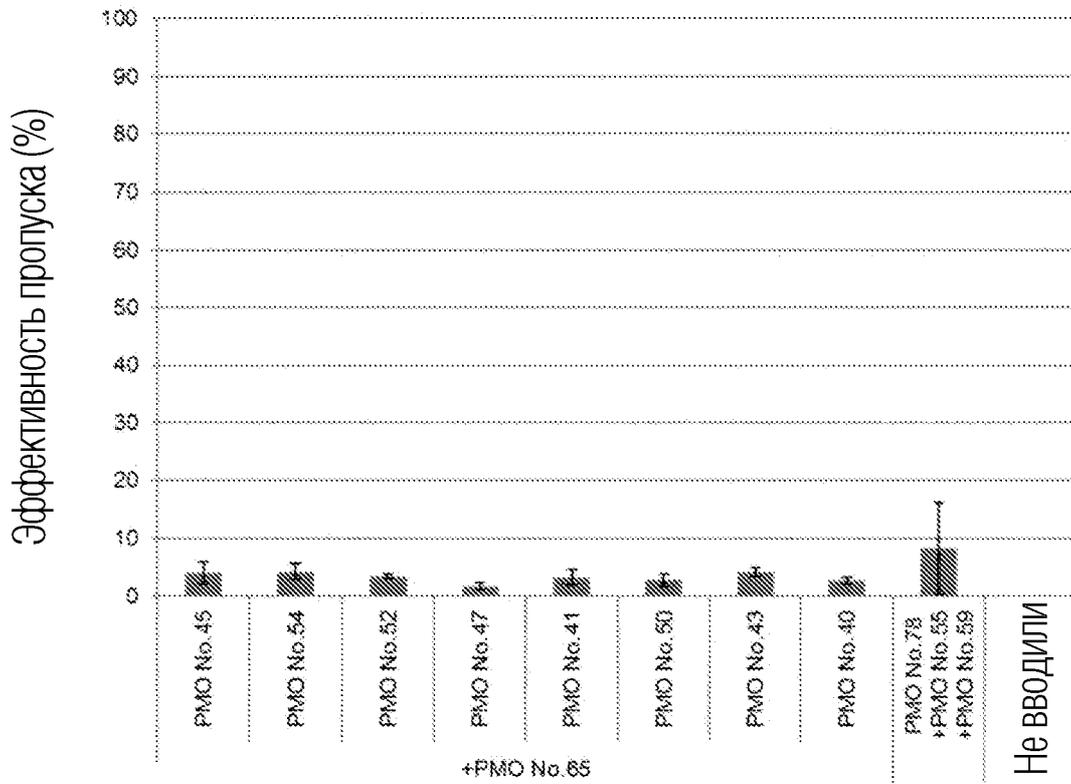
ФИГ. 4



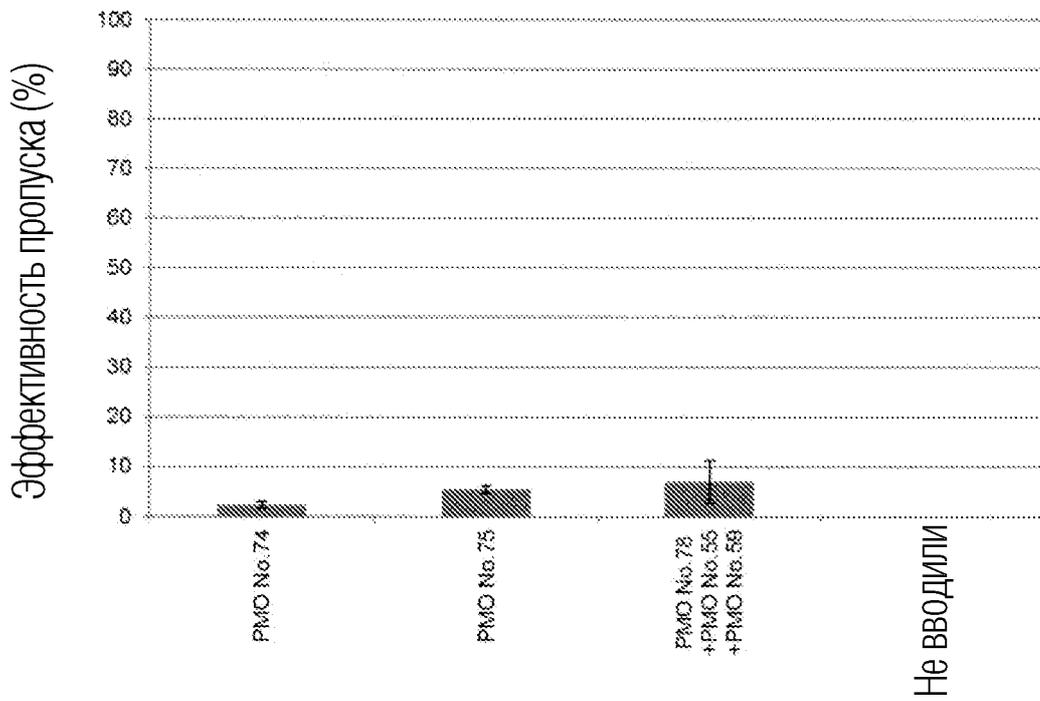
ФИГ. 5



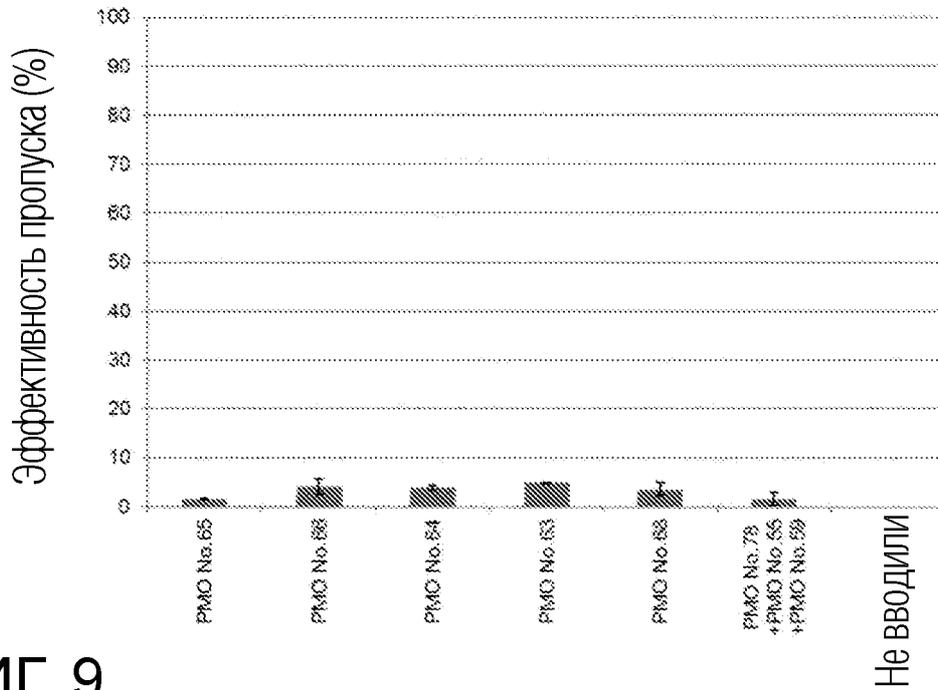
ФИГ. 6



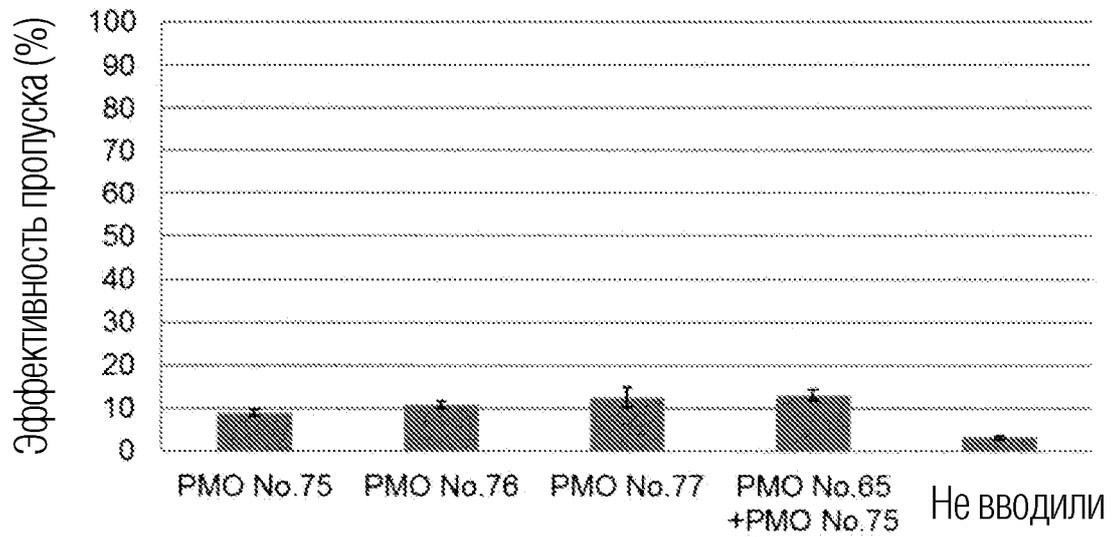
ФИГ. 7



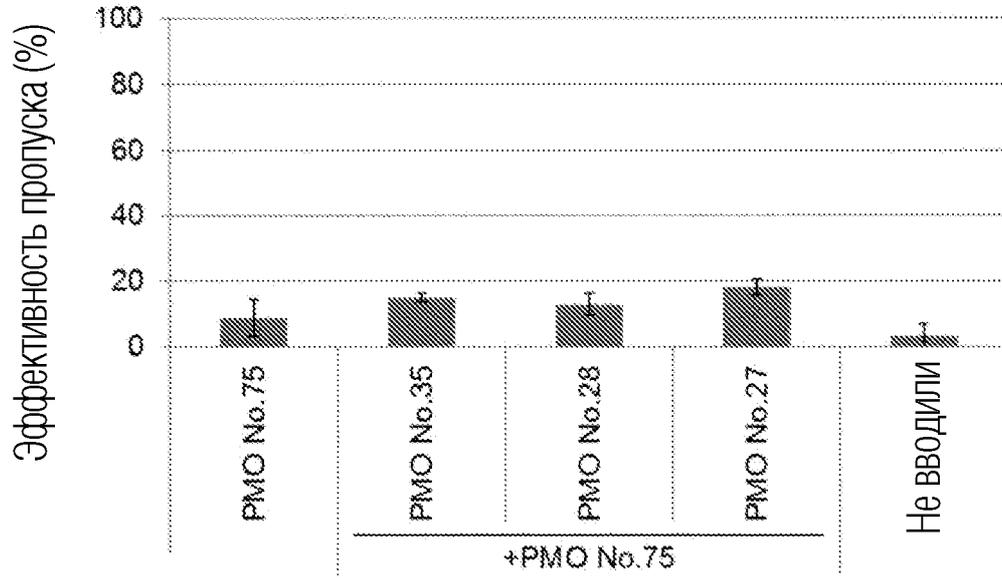
ФИГ. 8



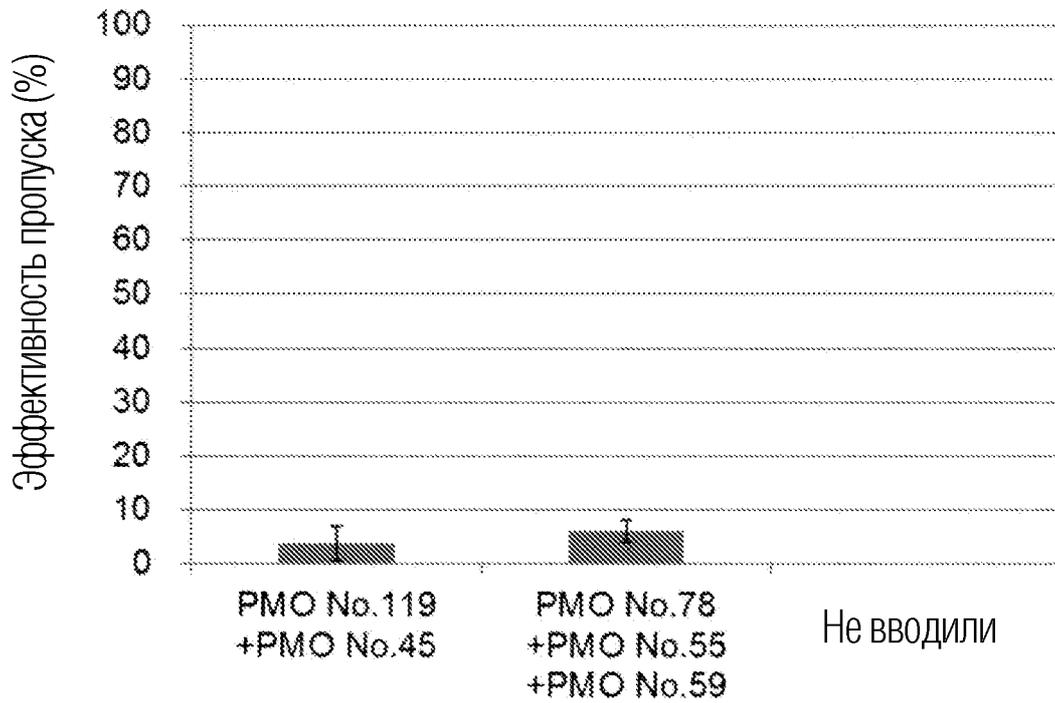
ФИГ. 9



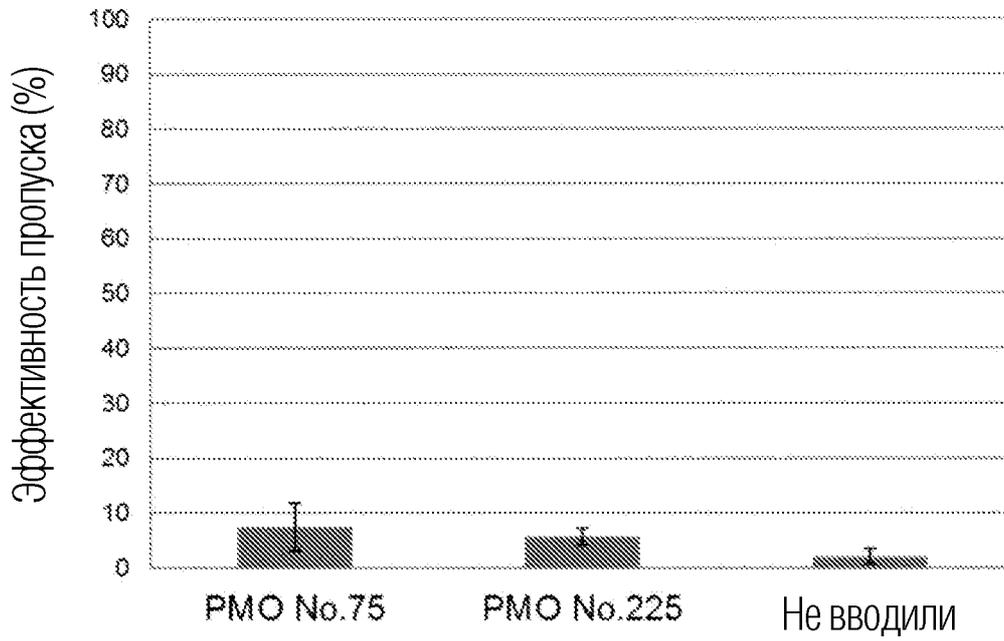
ФИГ. 10



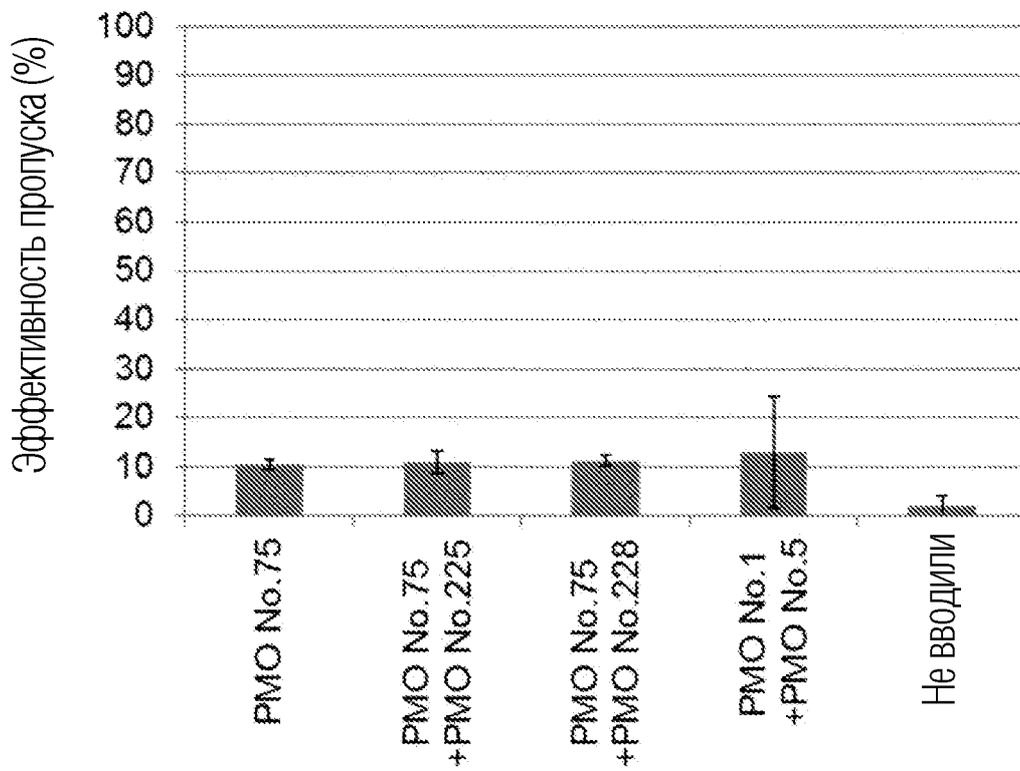
ФИГ. 11



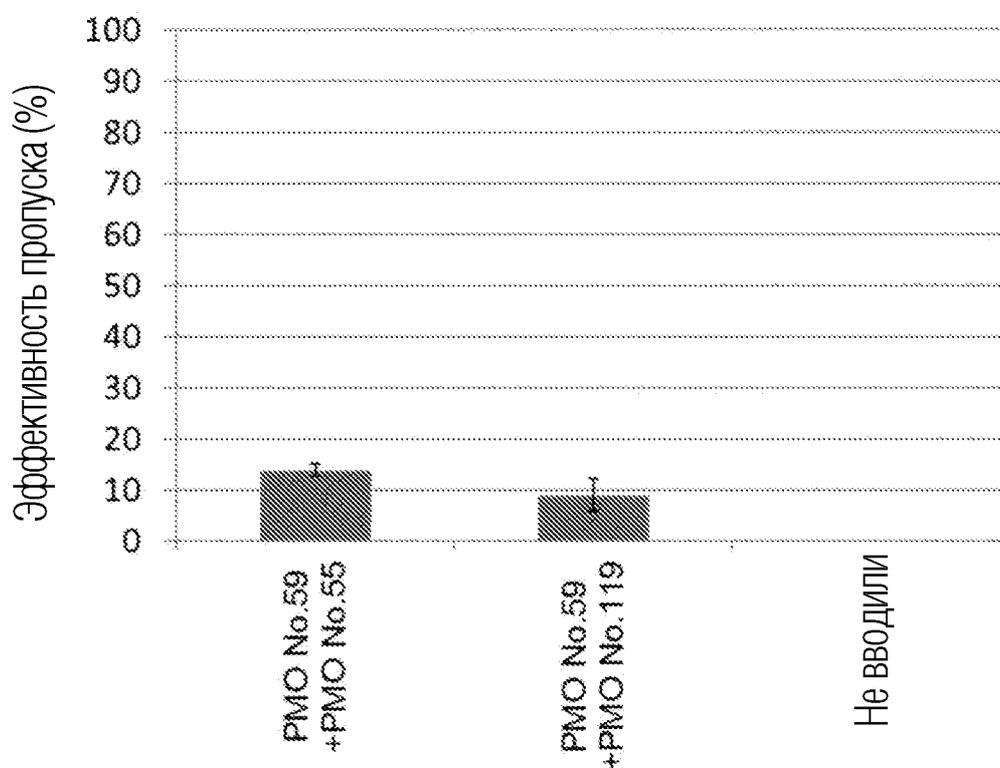
ФИГ. 12



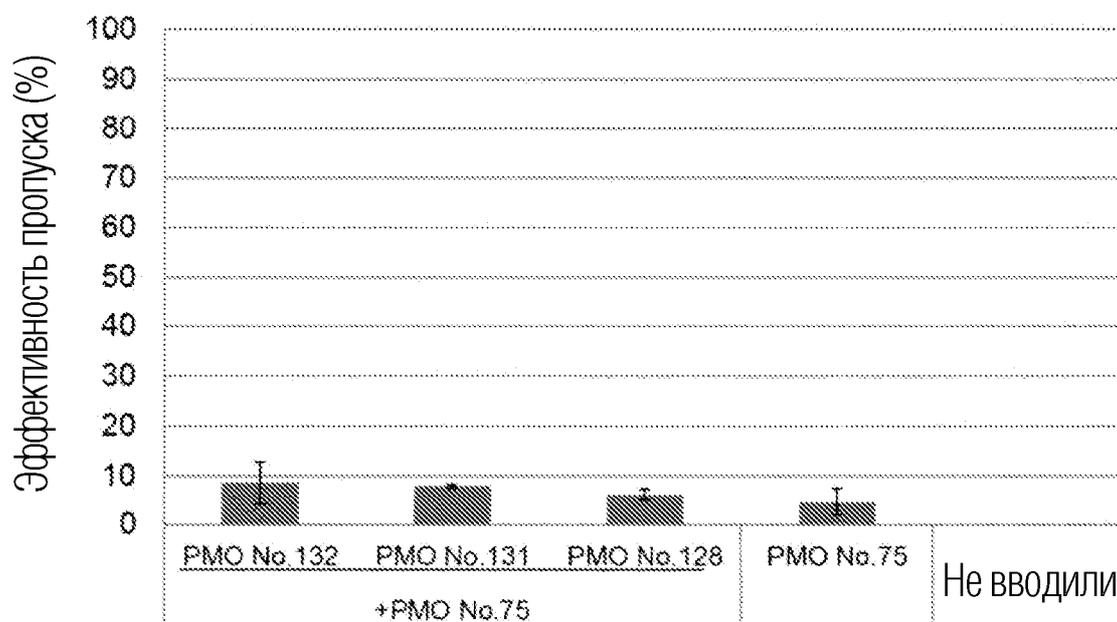
ФИГ. 13



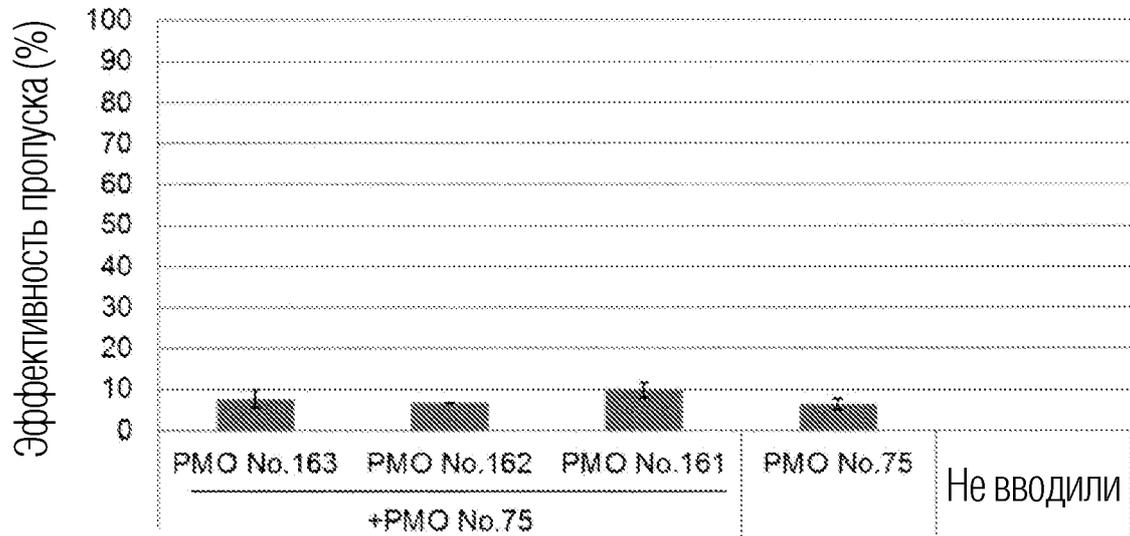
ФИГ. 14



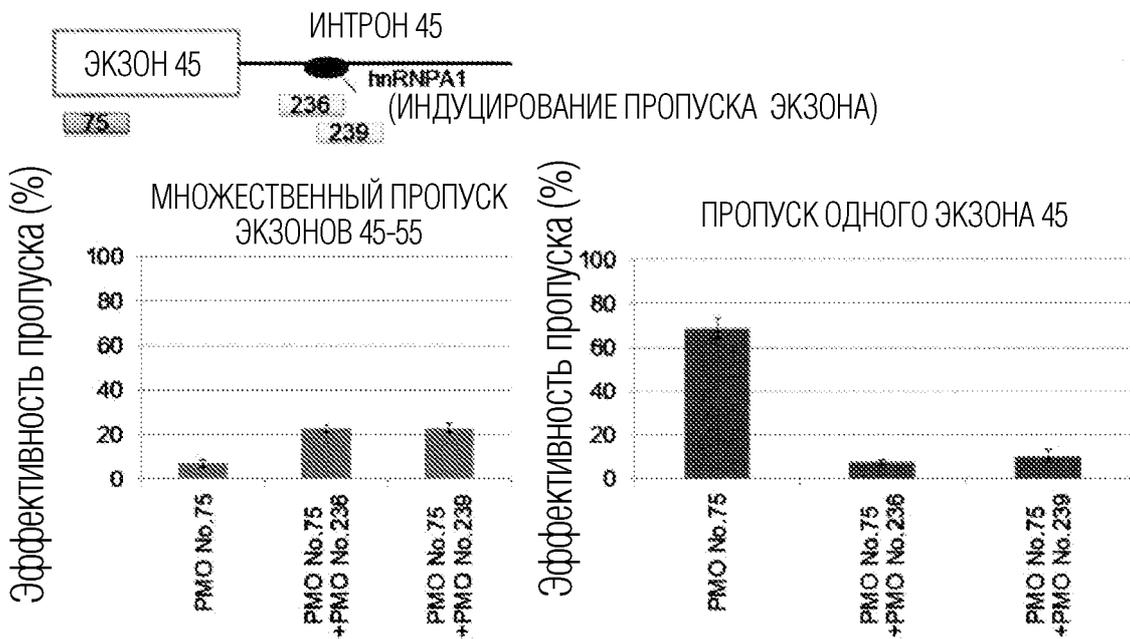
ФИГ. 15



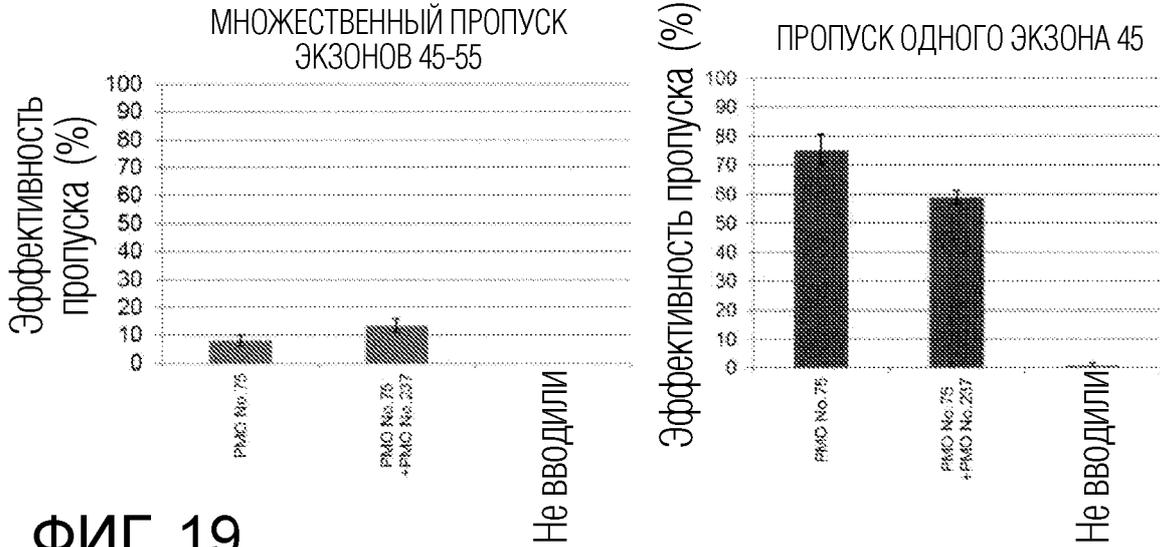
ФИГ. 16



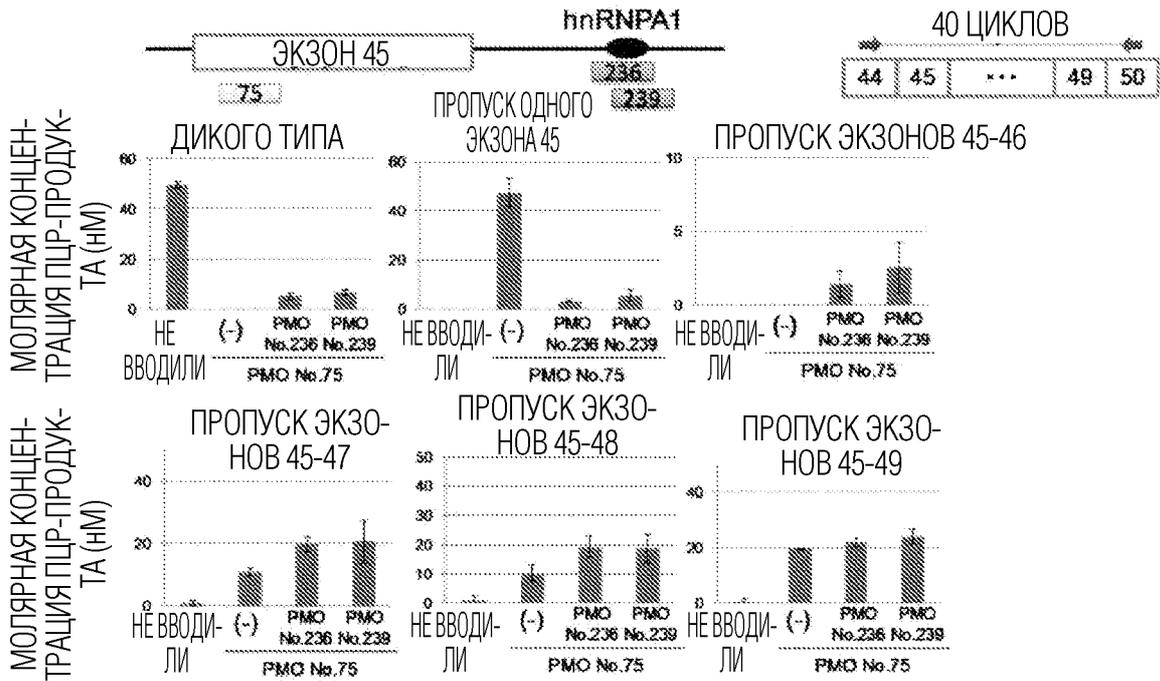
ФИГ. 17



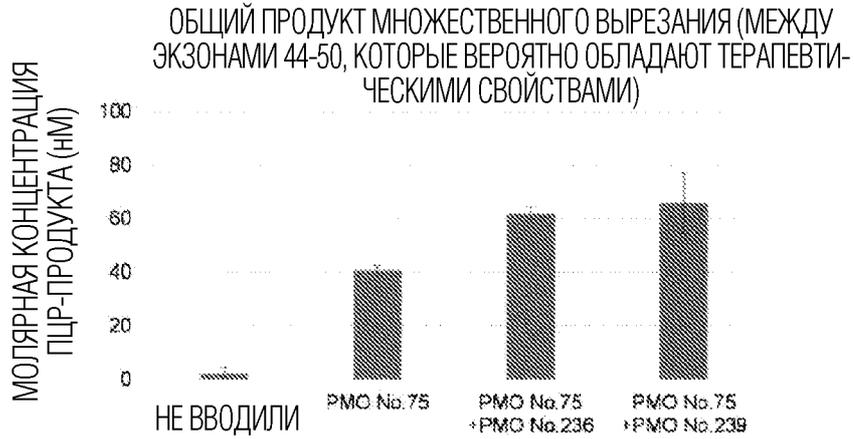
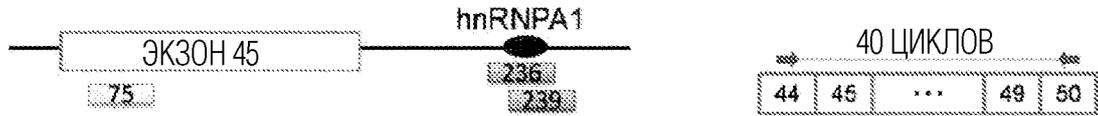
ФИГ. 18



ФИГ. 19

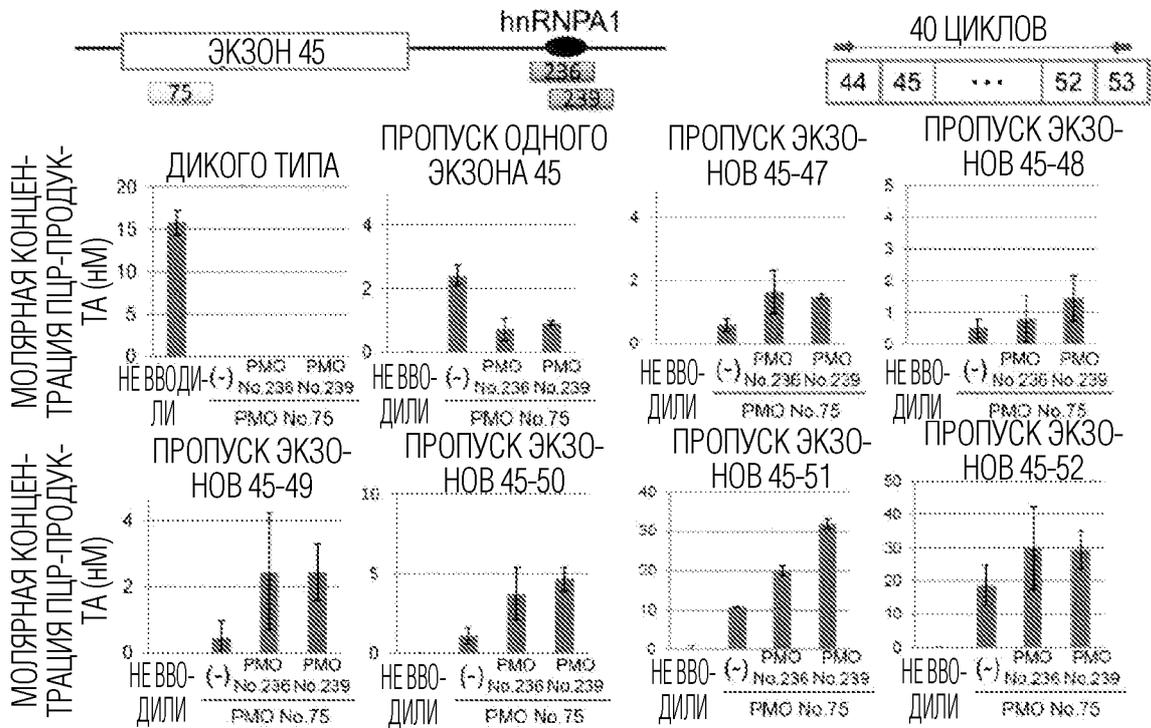


ФИГ. 20

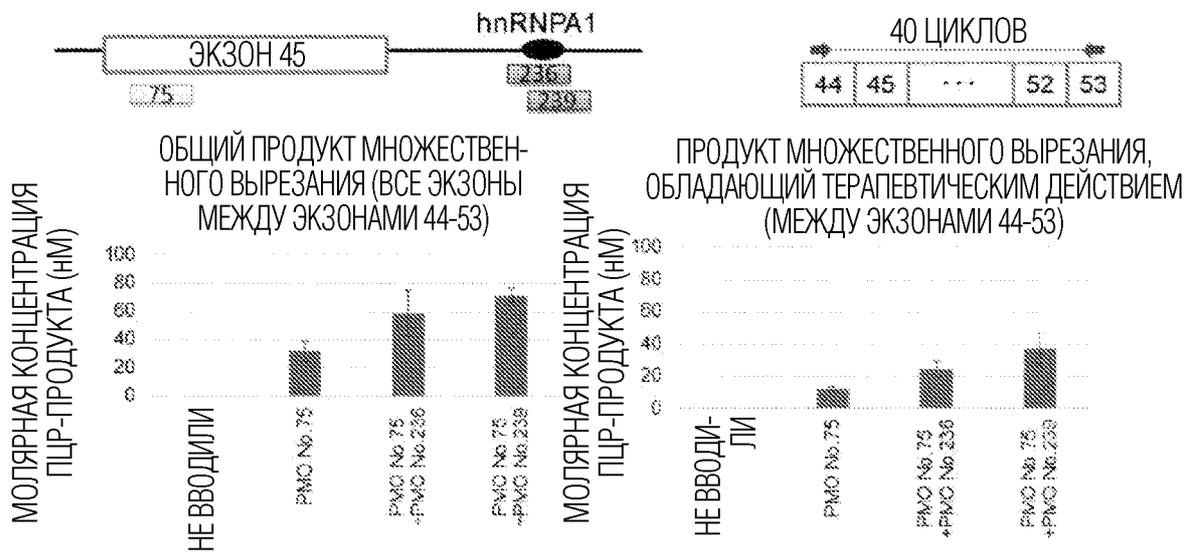


\*ОБЩИЙ ПРОПУСК ЭКЗОНОВ 45-46, ЭКЗОНОВ 45-47, ЭКЗОНОВ 45-48 И ЭКЗОНОВ 45-49

ФИГ. 21



ФИГ. 22



\* ОБЩИЙ ПРОПУСК ЭКЗОНОВ 45-47, ЭКЗОНОВ 45-48, ЭКЗОНОВ 45-49, ЭКЗОНОВ 45-50, ЭКЗОНОВ 45-51 И ЭКЗОНОВ 45-52

\* ОБЩИЙ ПРОПУСК ЭКЗОНОВ 45-47, ЭКЗОНОВ 45-48, ЭКЗОНОВ 45-49 И ЭКЗОНОВ 45-51