

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292462 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.10.28

(22) Дата подачи заявки
2021.02.26

(51) Int. Cl. *A61K 48/00* (2006.01)
A61P 21/04 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/12 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)

(54) АНТИСМЫСЛОВАЯ НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, ИНДУЦИРУЮЩАЯ ВЫРЕЗАНИЕ ЭКЗОНА 51

(31) 2020-033483

(32) 2020.02.28

(33) JP

(86) PCT/JP2021/007286

(87) WO 2021/172498 2021.09.02

(71) Заявитель:

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

(72) Изобретатель:

Хонда Ю, Мутима Канаме, Фукуи
Такахиро, Хасегава Саки, Такеда
Син'ити, Аоки Йосицугу (JP)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к лекарственному средству, которое вызывает высокоэффективное вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека. Настоящее изобретение относится к антисмысловому олигомеру, обладающему активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека.

202292462

A1

A1

202292462

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574991EA/30

АНТИСМЫСЛОВАЯ НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, ИНДУЦИРУЮЩАЯ ВЫРЕЗАНИЕ ЭКЗОНА 51

Область техники

[0001]

Настоящее изобретение относится к антисмысловому олигомеру, который индуцирует вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека, и к фармацевтической композиции, содержащей антисмысловый олигомер.

Предпосылки создания изобретения

[0002]

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) представляет собой наиболее распространенную и тяжелую форму наследственной прогрессирующей мышечной атрофии, которая развивается приблизительно у одного из 3500 новорожденных мальчиков. Хотя двигательные функции у пациентов с МДД редко отличаются от функций здоровых людей в младенчестве и в детстве, однако, у детей приблизительно в возрасте от 4 до 5 лет наблюдается мышечная слабость. Затем, мышечная слабость у пациентов с МДД прогрессирует до потери способности передвигаться приблизительно к 12 годам и приводит к летальному исходу от сердечной или дыхательной недостаточности в 20 лет. В настоящее время не существует какой-либо приемлемой терапии МДД, а поэтому, крайне необходимо разработать эффективное терапевтическое средство.

[0003]

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 предшественники мРНК, а интроны удаляются посредством сплайсинга с образованием мРНК из 11058 оснований, соответствующих транслируемой области, в которой 79 экзонов соединены вместе. Эта мРНК транслируется в 3685 аминокислот с образованием белка дистрофина. Белок дистрофина 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 в организме у пациентов с МДД, что приводит к большому притоку ионов кальция в мышечные клетки. А поэтому, ответ, подобный воспалению, стимулирует развитие фиброза, в результате чего мышечные клетки все труднее поддаются регенерации.

[0004]

Мышечная дистрофия Беккера (МДБ) также вызывается мутацией в гене дистрофина. Симптомы такого заболевания включают мышечную слабость, сопровождающуюся мышечной атрофией, 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 или нет (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, все же вырабатывается, поскольку рамка считывания аминокислот сохраняется, а часть экзона удаляется в результате мутации.

[0005]

Предполагается, что вырезание 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 представляет собой мишень для вырезания 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 вырезание экзона будет приводить к МДД с симптомами, сходными с симптомами МДБ, которая протекает мягче. Способ с вырезанием экзона прошел испытания на животных, а именно, на мышах или собаках, и в настоящее время проходит клинические испытания с участием пациентов с МДД.

[0006]

Вырезание экзона может быть вызвано связыванием антисмысловых нуклеиновых кислот, нацеленных на 5'- или 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, вырезание экзона может быть вызвано нацеливанием антисмысловых нуклеиновых кислот на сайты сплайсинга. Кроме того, считается, что связывание белка SR с энхансером экзонного сплайсинга (ESE) необходимо для распознавания экзона по механизму сплайсинга. Соответственно, вырезание экзона также может быть вызвано нацеливанием на ESE.

[0007]

Поскольку мутации гена дистрофина могут варьироваться у различных пациентов с МДД, то необходимо разработать антисмысловые нуклеиновые кислоты на основе сайта или типа соответствующей генетической мутации. В прошлом, антисмысловые нуклеиновые кислоты, индуцирующие вырезание всех 79 экзонах, были получены Стивом Уилтоном и др., Университет Западной Австралии (Непатентный документ 3), а антисмысловые нуклеиновые кислоты, индуцирующие вырезание 39 экзонах, были

получены Annemieke Aartsma-Rus, et al., Нидерланды (Непатентный документ 4).

[0008]

Считается, что приблизительно 13% всех пациентов с МДЦ могут быть подвергнуты лечению посредством вырезания 51-го экзона (далее называемого «экзоном 51»). В последние годы было сделано множество отчетов об исследованиях, в которых экзон 51 в гене дистрофина был вырезан (патентные документы 1-10 и Непатентные документы 3-7).

[Список цитируемой литературы]

[Патентные документы]

[0009]

[Патентный документ 1] Международная публикация WO 2015/137409

[Патентный документ 2] Международная публикация WO 2019/241385

[Патентный документ 3] Международная публикация WO 2002/024906

[Патентный документ 4] Международная публикация WO 2004/048570

[Патентный документ 5] Международная публикация WO 2004/083432

[Патентный документ 6] Международная публикация WO 2006/000057

[Патентный документ 7] Международная публикация WO 2010/048586

[Патентный документ 8] Международная публикация WO 2009/054725

[Патентный документ 9] Международная публикация WO 2010/050801

[Патентный документ 10] Международная публикация WO 2010/050802

[0010]

[Непатентный документ 1] Monaco AP et al., Genomics 2:90-95 (1988)

[Непатентный документ 2] Matsuo M., Brain and Development 18:167-172 (1996)

[Непатентный документ 3] Wilton SD et al., Molecular Therapy 15:1288-1296 (2007)

[Непатентный документ 4] Annemieke Aartsma-Rus et al., Neuromuscular Disorders 12:S71-S77 (2002)

[Непатентный документ 5] Aoki Y. et al., Molecular Therapy 18: 1995-2005 (2010)

[Непатентный документ 6] Nakano S. et al., Pediatrics International 53: 524-529 (2011)

[Непатентный документ 7] Echigo Y et al., Molecular Therapy 25: 2561-2572 (2017)

[Описание сущности изобретения]

[Техническая проблема]

[0011]

С учетом всех вышеуказанных обстоятельств было бы желательно разработать новые антисмысловые олигомеры, которые индуцируют вырезание экзона 51 в гене дистрофина с высокой эффективностью. Кроме того, желательно разработать антисмысловые олигомеры, которые обладали бы превосходными свойствами (например, растворимостью и безопасностью) в качестве лекарственных средств, при сохранении активности индуцирования вырезания экзона 51 в гене дистрофина с высокой эффективностью.

[Решение проблемы]

[0012]

В результате детальных исследований технического содержания вышеупомянутых документов и структуры гена дистрофина, авторами настоящего изобретения было обнаружено, что вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека индуцируется с высокой эффективностью путем введения антисмыслового олигомера, имеющего последовательность оснований, представленную любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93. В результате исследований, авторами настоящего изобретения было также обнаружено, что антисмысловой олигомер, обладающий превосходной растворимостью и безопасностью, индуцирует вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека с высокой эффективностью. На основании этого открытия, авторами было создано настоящее изобретение.

[0013]

Таким образом, настоящее изобретение включает:

[1]

Антисмысловой олигомер, выбранный из группы, состоящей из нижеуказанных (a1)-(d1):

(a1) антисмыслового олигомера, содержащего последовательность оснований любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93;

(b1) антисмыслового олигомера, который содержит последовательность оснований с делецией, заменой, инсерцией и/или добавлением от 1 до 5 оснований в последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93, и обладает активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека;

(c1) антисмыслового олигомера, содержащего последовательность оснований, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93, и обладающего активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека; и

(d1) антисмыслового олигомера, который гибридизуется в жестких условиях с олигонуклеотидом, состоящим из последовательности оснований, комплементарной последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93, и обладает активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека (за исключением антисмыслового олигомера, который состоит из последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 90 и 97-126) или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата.

[2]

Антисмысловой олигомер, выбранный из группы, состоящей из нижеуказанных (e)-(h):

(e) антисмыслового олигомера, состоящего из последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93;

(f) антисмыслового олигомера, который состоит из последовательности оснований с делецией и/или заменой от 1 до 5 оснований в последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93 и обладает активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в

гене дистрофина человека;

(g) антисмыслового олигомера, состоящего из последовательности оснований, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93, и обладающего активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека; и

(h) антисмыслового олигомера, который гибридизуется в жестких условиях с олигонуклеотидом, состоящим из последовательности оснований, комплементарной последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93, и обладает активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека (за исключением антисмыслового олигомера, который состоит из последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 90 и 97-126) или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата.

[3]

Антисмысловый олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат согласно вышеуказанному [1] или [2], где антисмысловый олигомер представляет собой:

антисмысловый олигомер, имеющий нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93, и обладает активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека.

[4]

Антисмысловый олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат согласно вышеуказанному [1], где антисмысловый олигомер представляет собой антисмысловый олигомер, выбранный из группы, состоящей из:

(a2) антисмыслового олигомера, содержащего последовательность оснований любой из SEQ ID NO: 7, 8, 10, 16, 21, 24, 31, 42, 67 и 76;

(b2) антисмыслового олигомера, который содержит последовательность оснований с делецией, заменой, инсерцией и/или добавлением от 1 до 5 оснований в последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 7, 8, 10, 16, 21, 24, 31, 42, 67 и 76, и обладает активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека;

(c2) антисмыслового олигомера, содержащего последовательность оснований, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 7, 8, 10, 16, 21, 24, 31, 42, 67 и 76, и обладает активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека; и

(d2) антисмыслового олигомера, который гибридизуется в жестких условиях с олигонуклеотидом, состоящим из последовательности оснований, комплементарной последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 7, 8, 10, 16, 21, 24, 31, 42, 67 и 76, и обладает активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека.

[5]

Антисмысловый олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат согласно любому из вышеуказанных [1]-[4], где антисмысловый олигомер представляет

собой олигонуклеотид.

[6]

Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат согласно вышеуказанному [5], где сахарная часть и/или часть фосфатной связи по меньшей мере одного нуклеотида, составляющего олигонуклеотид, являются модифицированными.

[7]

Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат согласно вышеуказанному [5] или [6], где сахарная часть по меньшей мере одного нуклеотида, входящего в состав олигонуклеотида, представляет собой рибозу, в которой группа 2'-ОН заменена любой группой, выбранной из группы, состоящей из OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br и I (где R представляет собой алкил или арил, а R' представляет собой алкилен).

[8]

Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат согласно любому из вышеуказанных [5]-[7], где фрагмент фосфатной связи по меньшей мере одного нуклеотида, составляющего олигонуклеотид, представляет собой любой фрагмент, выбранный из группы, состоящей из фосфориоатной связи, фосфодитиоатной связи, алкилфосфонатной связи, фосфорамидатной связи и боранофосфатной связи.

[9]

Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат согласно любому из вышеуказанных [1]-[4], где антисмысловой олигомер представляет собой морфолино-олигомер.

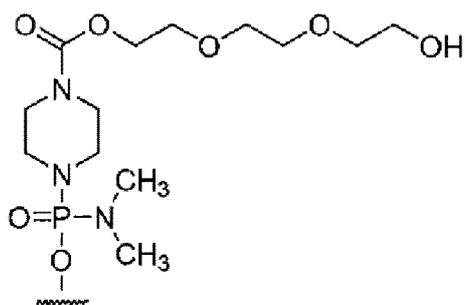
[10]

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

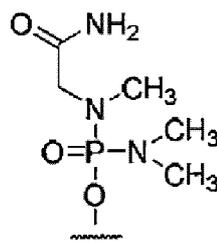
[11]

Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат согласно вышеуказанному [9] или [10], где 5'-конец представляет собой любую из химических формул (1)-(3), представленных ниже:

[Формула 1]



(1)



(2)



(3)

[12]

Фармацевтическую композицию для лечения мышечной дистрофии, содержащую антисмысловый олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат согласно любому из вышеуказанных [1]-[11].

[13]

Фармацевтическую композицию согласно вышеуказанному [12], дополнительно содержащую фармацевтически приемлемый носитель.

[14]

Фармацевтическую композицию согласно вышеуказанному [12] или [13] для введения пациенту с мышечной дистрофией, где указанным пациентом является пациент с мутацией, которая способствует вырезанию экзона 51 в гене дистрофина.

[15]

Фармацевтическую композицию согласно вышеуказанному [14], где у пациента присутствует ген дистрофина, который имеет по меньшей мере мутацию со сдвигом рамки считывания, вызванную делецией экзона вблизи экзона 51, и где рамка считывания аминокислот скорректирована путем вырезания экзона 51.

[16]

Фармацевтическую композицию согласно вышеуказанному [14] или [15], где у пациента имеется мутация со сдвигом рамки считывания, вызванная делециями экзонов 13-50, 29-50, 40-50, 43-50, 45-50, 47-50, 48-50, 49-50, 50, 52 или 52-63 в гене дистрофина.

[17]

Фармацевтическую композицию согласно вышеуказанному [14]-[16], где пациентом является человек.

[18]

Применение антисмыслового олигомера или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата согласно любому из вышеуказанных [1]-[11] в целях приготовления лекарственного средства для лечения мышечной дистрофии.

[19]

Способ лечения мышечной дистрофии, включающий введение пациенту с мышечной дистрофией эффективного количества антисмыслового олигомера или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата согласно любому из вышеуказанных [1]-[11], или фармацевтической композиции согласно любому из вышеуказанных [12]-[16].

[20]

Способ лечения согласно вышеуказанному [19], где пациентом является человек.

[21]

Антисмысловый олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат согласно любому из вышеуказанных [1]-[11], или фармацевтическую композицию согласно любому из вышеуказанных [12]-[16] для применения в целях лечения мышечной дистрофии.

[22]

Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат или фармацевтическую композицию согласно вышеуказанному [21], где подвергаемым лечению пациентом с мышечной дистрофией является человек.

[Эффект изобретения]

[0014]

Настоящее изобретение может относиться к антисмысловому олигомеру, который индуцирует вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека с высокой эффективностью. Настоящее изобретение может относиться к антисмысловому олигомеру, который обладает превосходной растворимостью, сохраняя при этом активность, индуцирующую вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека с высокой эффективностью. Настоящее изобретение может дополнительно относиться к антисмысловому олигомеру, обладающему превосходной растворимостью и безопасностью (например, не влияющему или почти не влияющему на функции почек и печени) и сохраняющему при этом активность, индуцирующую вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека с высокой эффективностью.

[Краткое описание чертежей]

[0015]

[Фигура 1] На фигуре 1 показана эффективность вырезания экзона 51 в гене дистрофина человека посредством антисмысловых олигомеров РМО № 43, 44, 45 и 46 в клетках рабдомиосаркомы человека (в клетках RD).

[Фигура 2] На фигуре 2 показана эффективность вырезания экзона 51 в гене дистрофина человека посредством антисмысловых олигомеров РМО № 42, 45, 47, 48, 49 и 50 в клетках RD.

[Фигура 3] На фигуре 3 показана эффективность вырезания экзона 51 в гене дистрофина человека посредством антисмысловых олигомеров РМО № 42, 62, 63 и 89 в клетках RD.

[Фигура 4] На фигуре 4 показана эффективность вырезания экзона 51 в гене дистрофина человека посредством антисмысловых олигомеров РМО № 83 и 85 в клетках RD.

[Фигура 5] На фигуре 5 показана эффективность вырезания экзона 51 в гене дистрофина человека посредством антисмысловых олигомеров РМО № 33, 34, 35, 36, 37 и 38 в клетках RD.

[Фигура 6] На фигуре 6 показана эффективность вырезания экзона 51 в гене дистрофина человека посредством антисмысловых олигомеров РМО № 83, 85 и 90 в клетках RD.

[Фигура 7] На фигуре 7 показана эффективность вырезания экзона 51 в гене дистрофина человека посредством антисмысловых олигомеров РМО № 82, 84, 86 и 87 в клетках RD.

[Фигура 8] На фигуре 8 показана эффективность вырезания экзона 51 в гене дистрофина человека посредством антисмысловых олигомеров РМО №№ 45, 51, 52, 56,

57, 58, 59, 60 и 61 в клетках RD.

[Фигура 9] На фигуре 9 показана эффективность вырезания экзона 51 в гене дистрофина человека посредством антисмысловых олигомеров РМО № 42, 64, 65, 66 и 85 в клетках RD.

[Фигура 10] На фигуре 10 показана эффективность вырезания экзона 51 в гене дистрофина человека посредством антисмысловых олигомеров РМО №№ 1, 2, 42, 66, 67, 85, 88, 92 и 93 в клетках RD.

[Фигура 11] На фигуре 11 показана эффективность вырезания экзона 51 в гене дистрофина человека посредством антисмысловых олигомеров РМО № 3, 4, 5, 6, 7, 8, 42, 68, 69, 70 и 85 в клетках RD.

[Фигура 12] На фигуре 12 показана эффективность вырезания экзона 51 в гене дистрофина человека посредством антисмысловых олигомеров РМО №№ 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 42, 71, 72, 73 и 91 в клетках RD.

[Фигура 13] На Фигуре 13 показана эффективность вырезания экзона 51 в гене дистрофина человека посредством антисмысловых олигомеров РМО № 8, 15, 16, 17, 42, 74, 75 и 76 в клетках RD.

[Фигура 14] На Фигуре 14 показана эффективность вырезания экзона 51 в гене дистрофина человека посредством антисмысловых олигомеров РМО № 8, 18, 19, 20, 42, 63, 75, 76 и 77 в клетках RD.

[Фигура 15] На фигуре 15 показана эффективность вырезания экзона 51 в гене дистрофина человека посредством антисмысловых олигомеров РМО № 8, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 42, 77 и 78 в клетках RD.

[Фигура 16] На фигуре 16 показана эффективность вырезания экзона 51 в гене дистрофина человека посредством антисмысловых олигомеров РМО № 8, 21, 27, 28, 29, 30, 42, 79, 80 и 81 в клетках RD.

[Фигура 17] На Фигуре 17 показана эффективность вырезания экзона 51 в гене дистрофина человека посредством антисмысловых олигомеров РМО № 8, 16, 21, 31, 32 и 67 в клетках RD.

[Фигура 18] На Фигуре 18 показана эффективность вырезания экзона 51 в гене дистрофина человека посредством антисмысловых олигомеров РМО №№ 16, 21 и 94 в клетках RD.

[Фигура 19] На Фигуре 19 показаны результаты теста на безопасность антисмыслового олигомера РМО № 42 у мышей. Значения для аспаратаминотрансферазы (AST), аланинаминотрансферазы (ALT), азота мочевины крови (BUN) и креатинина указаны в порядке слева от среднего±стандартного отклонения (уровень значимости исходя из t-критерия Стьюдента: $p < 0,05$).

[Фигура 20] На Фигуре 20 показаны результаты теста на безопасность антисмысловых олигомеров РМО №№ 16 и 90 у мышей. Значения для AST, ALT, BUN и креатинина указаны в порядке слева от среднего±стандартного отклонения, а значение, указывающее на значительное повышение, выражено как значение p (уровень значимости

на основе критерия Даннета: $p < 0,05$).

[Фигура 21] На Фигуре 21 показаны результаты теста на безопасность антисмыслового олигомера РМО № 21 у мышей. Значения для AST, ALT, BUN и креатинина указаны в порядке слева от среднего \pm стандартного отклонения (уровень значимости на основе t-критерия Стьюдента: $p < 0,05$).

[Описание вариантов осуществления изобретения]

[0016]

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

[0017]

1. Антисмысловой олигомер

Настоящее изобретение относится к антисмысловому олигомеру (далее называемому «антисмысловым олигомером согласно изобретению»), который с высокой эффективностью индуцирует вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека.

[0018]

[Экзон 51 в гене дистрофина человека]

В настоящем изобретении, термин «ген» включает геномный ген, а также кДНК, предшественник мРНК и мРНК. Предпочтительно, ген является предшественником мРНК, то есть, пре-мРНК.

В геноме человека, ген дистрофина человека расположен в локусе Xp21.2. Ген дистрофина человека имеет размер 2,2 миллиона пар оснований и является самым большим геном среди известных генов человека. Однако, кодирующие области гена дистрофина человека имеют размер всего 14 т.п.о., распределенных в виде 79 экзонов по всему гену дистрофина человека (Roberts, RG, et al., Genomics, 16: 536-538 (1993); и Koenig, M., et al., Cell 53: 219-228 (1988)). Пре-мРНК, которая является транскриптом гена дистрофина человека, подвергается сплайсингу с образованием зрелой мРНК размером 14 т.п.о. Последовательность оснований человеческого гена дистрофина дикого типа является известной (номер доступа в GenBank NM_004006).

Последовательность оснований экзона 51 в человеческом гене дистрофина дикого типа представлена SEQ ID NO: 127.

[0019]

[Антисмысловой олигомер]

Антисмысловой олигомер согласно изобретению был сконструирован для вырезания экзона 51 в гене дистрофина человека в целях модификации белка, кодируемого геном дистрофина типа DMD, в белок дистрофина типа BMD. Соответственно, экзон 51 в гене дистрофина, который является мишенью для вырезания экзона антисмысловым олигомером, включает как экзон дикого типа, так и экзон

мутантного типа.

[0020]

Антисмысловой олигомер согласно изобретению представляет собой, в частности, антисмысловой олигомер, выбранный из группы, состоящей из нижеследующих (a1)-(d1):

(a1) антисмыслового олигомера, содержащего последовательность оснований любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93;

(b1) антисмыслового олигомера, который содержит последовательность оснований с делецией, заменой, инсерцией и/или добавлением 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 или 1 основания в последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93, и обладает активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека;

(c1) антисмыслового олигомера, содержащего последовательность оснований, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 94% или по меньшей мере на 95% идентична последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93, и обладающего активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека; и

(d1) антисмыслового олигомера, который гибридизуется в жестких условиях с олигонуклеотидом, состоящим из последовательности оснований, комплементарной последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93, и обладает активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека.

[0021]

В другом варианте осуществления изобретения, антисмысловой олигомер согласно изобретению, в частности, представляет собой антисмысловой олигомер, выбранный из группы, состоящей из нижеуказанных (e)-(h):

(e) антисмыслового олигомера, который состоит из последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93;

(f) антисмыслового олигомера, который состоит из последовательности оснований с делецией и/или заменой от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3, от 1 до 2 или 1 основания в последовательности оснований любой из SEQ ID NOs: 1-89 и 91-93, и обладает активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека;

(g) антисмыслового олигомера, состоящего из последовательности оснований, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 94% или по меньшей мере на 95% идентична последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93, и обладающего активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека; и

(h) антисмыслового олигомера, который гибридизуется в очень жестких условиях с олигонуклеотидом, состоящим из последовательности оснований, комплементарной последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93, и обладает активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека.

[0022]

Антисмысловой олигомер согласно изобретению более предпочтительно представляет собой антисмысловой олигомер, выбранный из группы, состоящей из нижеследующих (a2)-(d2):

(a2) антисмыслового олигомера, содержащего последовательность оснований любой из SEQ ID NO: 7, 8, 10, 16, 21, 24, 31, 42, 67 и 76;

(b2) антисмыслового олигомера, который содержит последовательность оснований с делецией, заменой, инсерцией и/или добавлением 1-5 оснований в последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 7, 8, 10, 16, 21, 24, 31, 42, 67 и 76, и обладает активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека;

(c2) антисмыслового олигомера, содержащего последовательность оснований, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 7, 8, 10, 16, 21, 24, 31, 42, 67 и 76, и обладающего активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека; и

(d2) антисмыслового олигомера, который гибридизуется в жестких условиях с олигонуклеотидом, состоящим из последовательности оснований, комплементарной последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 7, 8, 10, 16, 21, 24, 31, 42, 67 и 76, и обладает активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека.

[0023]

Антисмысловые олигомеры (b1)-(d1), (f)-(h) и (b2)-(d2) представляют собой мутанты антисмысловых олигомеров (a1), (e) и (a2), соответственно, а в частности, сконструированы так, чтобы они соответствовали мутациям (например, полиморфизму) гена дистрофина пациентов.

[0024]

Однако, антисмысловой олигомер согласно изобретению исключает (не включает) антисмысловые олигомеры, состоящие из нижеследующих последовательностей оснований, описанных в Международной публикации WO 2015/137409.

[Таблица 1]

Последовательность	SEQ ID NO
CGGTAAGTTCTGTCTCAAGGAAGATGGCA	9 0
CTCATACCTTCTGCTTCAAGGAAGATGGCA	9 7
CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	9 8
AACATCAAGGAAGATGGCATT	9 9
TCCAACATCAAGGAAGATGGC	1 0 0
ACCTCCAACATCAAGGAAGAT	1 0 1
GAGU AACAGUCUGAGUAGGAG	1 0 2
UGUGUCACCAGAGU AACAGUC	1 0 3
AACCACAGGUUGUGUCACCAG	1 0 4
UUUCCUUAGUAACCACAGGUU	1 0 5
GAGAU GGCAGUUUCCUUAGUA	1 0 6
UUCUAGUUUGGAGAU GGCAGU	1 0 7
AAGAUGGCAUUUCUAGUUUGG	1 0 8
AACAUCAAGGAAGAUGGCAUU	1 0 9
AGGUACCUCCAACAUCAAGGA	1 1 0
CUGCCAGAGCAGGUACCUCCA	1 1 1
CGGUUGAAAUCUGCCAGAGCA	1 1 2
UGUCCAAGCCC GGUUGAAAUC	1 1 3
CGGUAAGUUCUGUCCAAGCCC	1 1 4
GAAAGCCAGUCGGUAAGUUCU	1 1 5
AUCAAGCAGAGAAAGCCAGUC	1 1 6
UUUAUAACUUGAUCAAGCAGAG	1 1 7
CUCUGUGAUUUUAUAACUUGA	1 1 8
CACCAUCACCCUCUGUGAUUU	1 1 9
CAAGGUCACCCACCAUCACCC	1 2 0
UUGAU AUCCUCAAGGUCACCC	1 2 1
GAUCAUCUCGUUGAU AUCCUC	1 2 2
UCUGCUUGAUGAUCAUCUCGU	1 2 3
GGCAUUUCUAGUUUGGAGAUG	1 2 4
CAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG	1 2 5
CCUCCAACAUCAAGGAAGAUG	1 2 6

[0025]

Используемый здесь термин «антисмысловой олигомер, который гибридизуется в жестких условиях», означает, например, антисмысловой олигомер, полученный посредством гибридизации колоний, гибридизации методом бляшек, Саузерн-гибридизации или т.п., с использованием в качестве зонда всего олигонуклеотида или его части, состоящих из последовательности оснований, комплементарной последовательности оснований, например, любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93. Способ 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.

[0026]

Используемый здесь термин «жесткие условия» может означать любые условия низкой жесткости, условия умеренной жесткости или условия высокой жесткости. Термин «условия низкой жесткости» означает, например, использование $5 \times \text{SSC}$, $5 \times$ раствора Денхардта, 0,5% ДСН, 50% формамида при 32°C . Термин «условия умеренной жесткости» означает, например, использование $5 \times \text{SSC}$, $5 \times$ раствора Денхардта, 0,5% ДСН, 50% формамида при 42°C или $5 \times \text{SSC}$, 1% ДСН, 50 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 50% формамида при 42°C . Термин «условия высокой жесткости» означает, например, использование (1) $5 \times \text{SSC}$, $5 \times$ раствора Денхардта, 0,5% ДСН, 50% формамида при 50°C , (2) $0,2 \times \text{SSC}$, 0,1% ДСН при 60°C , (3) $0,2 \times \text{SSC}$, 0,1% ДСН при 62°C , (4) $0,2 \times \text{SSC}$, 0,1% ДСН при 65°C или (5) $0,1 \times \text{SSC}$, 0,1% ДСН при 65°C , но не ограничивается ими. Предполагается, что в этих условиях, антисмысловые олигомеры с более высокой идентичностью последовательностей будут эффективно получены при более высоких температурах. На жесткость гибридизации влияет множество факторов, включая температуру, концентрацию зонда, длину зонда, ионную силу, время, концентрацию соли и т.п., и специалисты в данной области могут соответствующим образом выбрать эти факторы для достижения аналогичной жесткости. Используемый здесь термин «идентичность последовательностей» относится к идентичности по всей длине последовательностей оснований, подлежащих сравнению между парой двух определенных нуклеиновых кислот, и выражен соотношением (%) совпадающих оснований при оптимальном выравнивании полученных последовательностей оснований с использованием математического алгоритма, известного специалистам в области, к которой относится настоящее изобретение. Так, например, антисмысловой олигомер, состоящий из последовательности оснований, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности антисмыслового олигомера, состоящего из последовательности из 20 оснований, означает антисмысловой олигомер, содержащий 16 или более оснований, идентичных антисмысловому олигомеру из 20 оснований.

[0027]

Идентичность последовательностей может быть определена с использованием

FASTA (Science 227 (4693): 1435-1441, (1985)) или алгоритма BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), разработанного Карлином и Альтшулем (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 872264-2268, 1990, и Proc Natl Acad Sci USA 90: 5873, 1993). Были разработаны программы, называемые blastn, blastx, tblastn и tblastx и основанные на алгоритме 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 используются параметры по умолчанию для каждой программы.

[0028]

Если для гибридизации используются коммерчески доступные наборы, то, например, может быть использована система прямого мечения и детектирования Alkphos (GE Healthcare). В этом случае, в соответствии с протоколом, приложенным к набору, после инкубирования с меченым зондом в течение ночи, мембрану промывают первым промывочным буфером, содержащим 0,1% (масс./об.) ДСН при 55°C, что позволяет детектировать гибридизованный антисмысловый олигомер. Альтернативно, если зонд метят дигоксигенином (DIG) с использованием коммерчески доступного реагента (например, смеси для ПЦР-мечения (Roche Diagnostics) и т.п.), при получении зонда на основе всей или части последовательности, комплементарной последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93, то гибридизация может быть детектирована с помощью набора для детектирования нуклеиновых кислот DIG (Roche Diagnostics).

[0029]

Помимо антисмыслового олигомера, описанного выше, другими антисмысловыми олигомерами, которые могут гибридизоваться, являются антисмысловые олигомеры, имеющие последовательность, которая на 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более, 99,1% или более, 99,2% или более, 99,3% или более, 99,4% или более, 99,5% или более, 99,6% или более, 99,7% или более, 99,8% или более и 99,9% или более идентична последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93, как было вычислено с помощью программы для поиска гомологии, такой как FASTA и BLAST, с использованием параметров по умолчанию.

[0030]

Термин «индуцировать вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека» означает, что в результате связывания антисмыслового олигомера согласно изобретению с сайтом, соответствующим экзону 51 и/или соседнему с ним интрону транскрипта (например, пре-мРНК) гена дистрофина человека, происходит исключение экзона 51 и, например, последовательность оснований, соответствующая 5'-концу экзона 53, соединяется с последовательностью оснований, соответствующей 3'-концу экзона 50 у пациентов с МДД с делецией экзона 52, если транскрипт подвергается сплайсингу, что приводит к образованию зрелой мРНК, не содержащей сдвига рамки кодона.

[0031]

Таким образом, пациенты с МДД, имеющие мутацию, которая приводит к вырезанию экзона 51 в гене дистрофина, могут быть подвергнуты лечению путем вырезания экзона 51. Примерами таких пациентов с МДД являются пациенты с МДД, у которых ген дистрофина имеет по меньшей мере мутацию со сдвигом рамки считывания, вызванную делецией экзона вблизи экзона 51, и у которых рамка считывания аминокислот скорректирована за счет вырезания экзона 51, а, более конкретно, пациенты с МДД, имеющие мутацию со сдвигом рамки считывания, вызванную делециями экзонов 13-50, 29-50, 40-50, 43-50, 45-50, 47-50, 48-50, 49-50, 50, 52, 52-63 и т.п. в гене дистрофина.

[0032]

Используемый здесь термин «связывание», описанный выше, означает, что если антисмысловый олигомер согласно изобретению смешивают с транскриптом гена дистрофина человека, то оба они гибридизуются друг с другом в физиологических условиях с образованием двухцепочечной нуклеиновой кислоты. 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, предпочтительно 37°C, pH от 5 до 8, предпочтительно pH 7,4 и концентрация хлорида натрия 150 мМ.

[0033]

Подтверждение того, достигается ли вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека или нет, может быть осуществлено путем введения антисмыслового олигомера согласно изобретению в экспрессирующую дистрофин клетку (например, клетки рабдомиосаркомы человека), амплификации области, окружающей экзон 51 мРНК ген дистрофина человека из общей РНК клетки, экспрессирующей дистрофин, с помощью ОТ-ПЦР и проведения «гнездовой» ПЦР или анализа последовательности амплифицированного продукта ПЦР. Эффективность вырезания ES (%) может быть определена следующим образом. мРНК гена дистрофина человека собирают из тестируемых клеток; и в мРНК оценивают уровень полинуклеотида в полосе, показывающей, что экзон 51 был вырезан (уровень полинуклеотида «А»), и уровень полинуклеотида в полосе, показывающей, что экзон 51 не был вырезан (уровень полинуклеотида «В»). С использованием этих измеренных величин «А» и «В», эффективность вычисляют по нижеследующему уравнению (1). Для вычисления эффективности вырезания можно обратиться к Международной публикации WO 2012/029986.

[0034]

$$ES=100 \times A/(A+B)...(1)$$

[0035]

Предпочтительно, антисмысловый олигомер согласно изобретению индуцирует вырезание экзона 51 с эффективностью 10% или более, 20% или более, 30% или более, 40% или более, 50% или более, 60% или более, 70% или более, 80% или более и 90% или более.

[0036]

Антисмысловой олигомер согласно изобретению предпочтительно обладает высокой растворимостью в физиологическом растворе. В отличие от антисмыслового олигомера, имеющего низкую растворимость в физиологическом растворе, антисмысловой олигомер, обладающий высокой растворимостью в этом растворе, скорее всего не будет осаждаться в препарате во время его хранения и делать такой препарат непригодным для дальнейшего применения, а также очень маловероятно, что он будет осаждаться в солевой инфузионной жидкости и делать такую жидкость непригодной для дальнейшего применения. Кроме того, маловероятно, что антисмысловой олигомер, обладающий высокой растворимостью в физиологическом растворе, будет осаждаться и, следовательно, также маловероятно, что он будет обладать токсичностью при введении (Bulletin of Osaka University of Pharmaceutical Sciences 1, 91-99 (2007)). Таким образом, антисмысловой олигомер, обладающий высокой растворимостью в физиологическом растворе, является весьма подходящим в качестве активного ингредиента для лекарственных средств.

[0037]

Растворимость в физиологическом растворе предпочтительно равна или превышает 20 мг/мл, более предпочтительно, равна или превышает 30 мг/мл, гораздо более предпочтительно, равна или превышает 40 мг/мл, а особенно предпочтительно равна или превышает 50 мг/мл. Растворимость антисмыслового олигомера в физиологическом растворе может быть оценена путем растворения антисмыслового олигомера в предполагаемой концентрации в физиологическом растворе и визуального подтверждения наличия или отсутствия преципитации через определенный период времени.

[0038]

Антисмысловой олигомер предпочтительно имеет высокий уровень безопасности в качестве активного ингредиента для лекарственных средств. Безопасность может быть оценена, например, с использованием значения для аспаратаминотрансферазы (AST), аланинаминотрансферазы (ALT), азота мочевины крови (BUN) и креатинина в качестве показателей в крови после введения антисмыслового олигомера. Значение AST повышается при нарушении функции печени. Значение ALT повышается, когда существуют проблемы с печенью. Значение BUN повышается при снижении функции почек. Значение для креатинина имеет тенденцию к повышению при снижении функции клубочковой фильтрации почек. Поэтому, влияние антисмыслового олигомера на функции почек и печени может быть оценено с использованием этих значений в качестве показателей.

[0039]

В частности, антисмысловой олигомер вводят, например, здоровой мыши, а затем измеряют значение для AST, значение для ALT, значение для BUN и значение для креатинина в крови, и мышью подвергают тестированию на статистически значимые различия. Если наблюдается значительное повышение полученных значений по

сравнению со значениями оценок для контрольной группы (группы, получавшей носитель, или необработанной группы), то такие значения определяются как выбросы. Таким образом, можно подтвердить, что введенный антисмысловой олигомер оказывает влияние или может оказывать влияние на функции почек и печени. С другой стороны, если такое значительное повышение не наблюдается, то можно подтвердить, что введенный антисмысловой олигомер не оказывает влияния на функции почек и печени или маловероятно, что он будет оказывать такое влияние на функции почек и печени. Альтернативно, если полученные значения увеличиваются, в частности, например, на 30% или более по сравнению со значениями оценок для контрольной группы, то такие значения могут быть определены как выбросы.

[0040]

Антисмысловой олигомер согласно изобретению включает, например, олигонуклеотид, морфолино-олигомер или олигомер пептид-содержащей нуклеиновой кислоты (PNA), имеющий длину 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 оснований. Длина антисмыслового олигомера предпочтительно составляет от 20 до 30 оснований, от 20 до 29 оснований, от 22 до 30 оснований, от 22 до 29 оснований или от 25 до 29 оснований, а более предпочтительно, от 22 до 30 оснований, от 22 до 29 оснований или от 25 до 29 оснований, при этом, предпочтительными являются морфолино-олигомеры.

[0041]

Описанный выше олигонуклеотид (далее называемый «олигонуклеотидом согласно изобретению») представляет собой антисмысловой олигомер согласно изобретению, состоящий из нуклеотидов как составных звеньев. Такие нуклеотиды могут представлять собой любые из рибонуклеотидов, дезоксирибонуклеотидов и модифицированных нуклеотидов.

[0042]

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

[0043]

В настоящем изобретении, азотистое основание включает, например, аденин, гуанин, гипоксантин, цитозин, тимин, урацил и их модифицированные основания. Примеры таких модифицированных оснований включают, но не ограничиваются ими, псевдоурацил, 3-метилурацил, дигидроурацил, 5-алкилцитозины (например, 5-метилцитозин), 5-алкилурацилы (например, 5-этилурацил), 5-галогенурацилы (5-бромуррацил), 6-азапиримидин, 6-алкилпиримидины (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-метилюксиурацил, 5-метил-2-тиоурацил, 2-метилтио-N6-изопентениладенин, урацил-5-оксиуксусную кислоту, 2-тиоцитозин, пурин, 2,6-диаминопурин, 2-аминопурин, изогуанин, индол, имидазол, ксантин и т.п.

[0044]

Модификация сахарного фрагмента может включать, например, модификации во 2'-положении рибозы и модификации других положений сахара. Модификация во 2'-положении рибозы включает модификацию, заменяющую 2'-ОН рибозы на OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br или I, где R представляет собой алкил или арил, а R' представляет собой алкилен.

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

[0045]

Модификация фрагмента фосфатной связи включает, например, замену фосфодизфирной связи фосфортиоатной связью, фосфордитиоатной связью, алкилфосфонатной связью, фосфорамидатной связью или боранофосфатной связью (Eryu et al: *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2008, 18, 9154-9160) (см., например, Японские внутренние повторные публикации заявок РСТ №№ 2006/129594 и 2006/038608).

[0046]

В настоящем изобретении, алкил предпочтительно включает 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.

В настоящем изобретении, циклоалкил предпочтительно включает циклоалкил, содержащий от 5 до 12 атомов углерода. Конкретные примеры включают циклопентил, циклогексил, циклогептил, циклооктил, циклодецил и циклододецил.

В настоящем изобретении, галоген включает фтор, хлор, бром и йод.

Термин «алкокси» включает 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.

[0047]

В настоящем изобретении, арил предпочтительно включает арил, содержащий от 6 до 10 атомов углерода. Конкретные примеры включают фенил, α-нафтил и β-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.

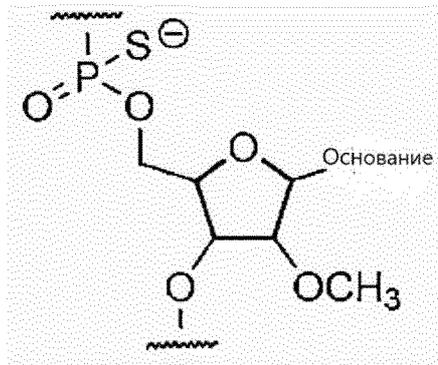
В настоящем изобретении, алкилен предпочтительно включает алкилен с прямой или разветвленной цепью, содержащий от 1 до 6 атомов углерода. Конкретные примеры включают метилен, этилен, триметилен, тетраметилен, пентаметилен, гексаметилен, 2-(этил)триметилен и 1-(метил)тетраметилен.

В настоящем изобретении, ацил включает алканоил или ароил с прямой или разветвленной цепью. Примеры алканоила включают формил, ацетил, 2-ацетилацетил, 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).

[0048]

Предпочтительно, олигонуклеотид согласно изобретению представляет собой антисмысловый олигомер согласно изобретению, содержащий составное звено, представленное приведенной ниже общей формулой, где группа -ОН в положении 2'-рибозы замещена метокси, а фрагмент фосфатной связи представляет собой фосфортиоатную связь:

[Формула 2]



где Основание представляет собой азотистое основание.

[0049]

Олигонуклеотид согласно изобретению может быть легко синтезирован с использованием различных автоматических синтезаторов (например, АКТА oligopilot plus 10/100 (GE Healthcare)). Альтернативно, синтез также может быть поручен другой организации (например, Promega Inc., Takara Co. или Japan Bio Service Co.) и т.п.

[0050]

Морфолино-олигомер согласно изобретению представляет собой антисмысловый олигомер согласно изобретению, содержащий составное звено, представленное приведенной ниже общей формулой:

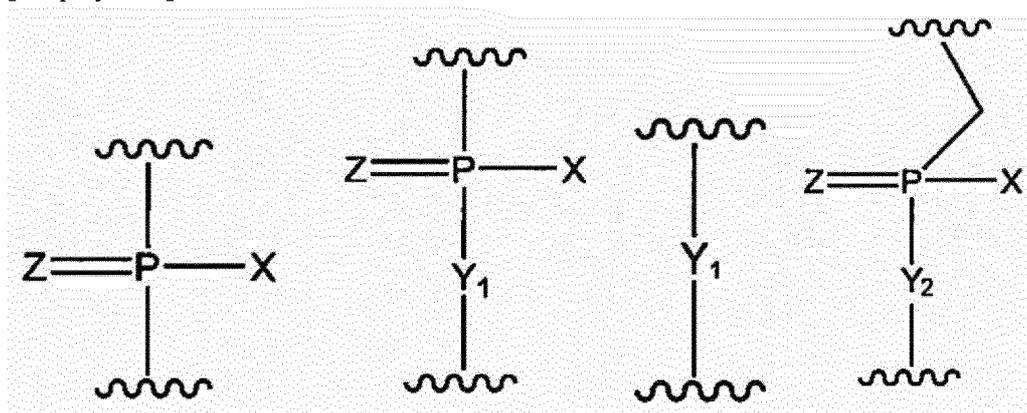
[Формула 3]



где Основание является таким, как оно определено выше, а W представляет собой группу, представленную любой из следующих групп:

[0051]

[Формула 4]



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;

R^1 представляет собой H или алкил;

R^2 и R^3 , которые могут быть одинаковыми или различными, представляют 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 ;

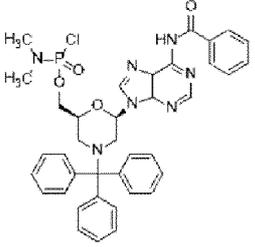
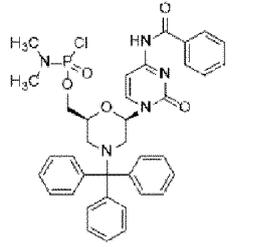
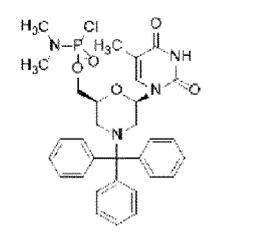
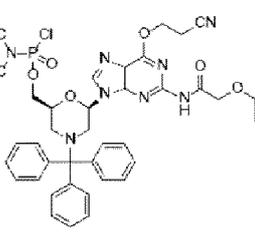
Z представляет собой O или S.

[0052]

Примеры морфолино-мономерных соединений, которые используются в синтезе морфолино-олигомера согласно изобретению, включают, но не ограничиваются ими, морфолино-мономерное соединение (A), морфолино-мономерное соединение (C), морфолино-мономерное соединение (T) и морфолино-мономерное соединение (G), описанные ниже в Таблице.

[0053]

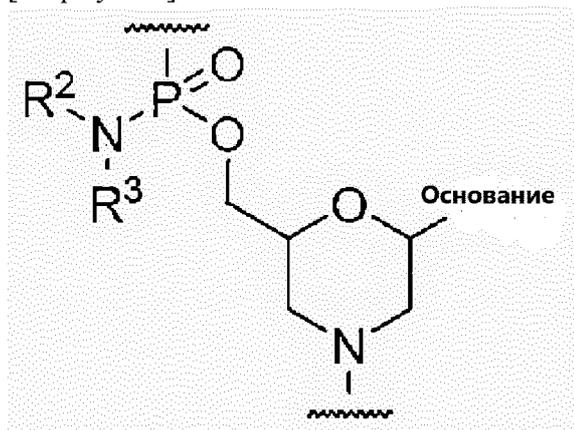
[Таблица 2]

Морфолино- мономерное соединение (А)	Морфолино- мономерное соединение (С)	Морфолино- мономерное соединение (Т)	Морфолино- мономерное соединение (G)
			

[0054]

Морфолино-олигомер предпочтительно представляет собой олигомер, содержащий составное звено, представленное приведенной ниже общей формулой (фосфордиамидатный морфолино-олигомер (далее называемый «РМО»)).

[Формула 5]



где основание, R^2 и R^3 являются такими, как они были определены выше.

Морфолино-олигомер согласно изобретению содержит морфолино-олигомер, в котором все или часть азотистых оснований, фрагменты морфолинового кольца, фрагменты фосфатной связи, 3'-конец и/или 5'-конец, которые составляют морфолино-олигомер, являются модифицированными.

[0055]

Модификация фрагмента фосфатной связи включает, например, модификацию путем замены фосфордиамидатной связью, фосфортиоатной связью, фосфордитиоатной связью, алкилфосфонатной связью, фосфорамидатной связью и боранофосфатной связью (Enya et al: *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2008, 18, 9154-9160) (см., например, Японские внутренние повторные публикации заявок РСТ №№ 2006/129594 и 2006/038608).

Морфолино-олигомер может быть получен, например, как описано в WO 1991/009033 или WO 2009/064471. В частности, РМО может быть получен в соответствии

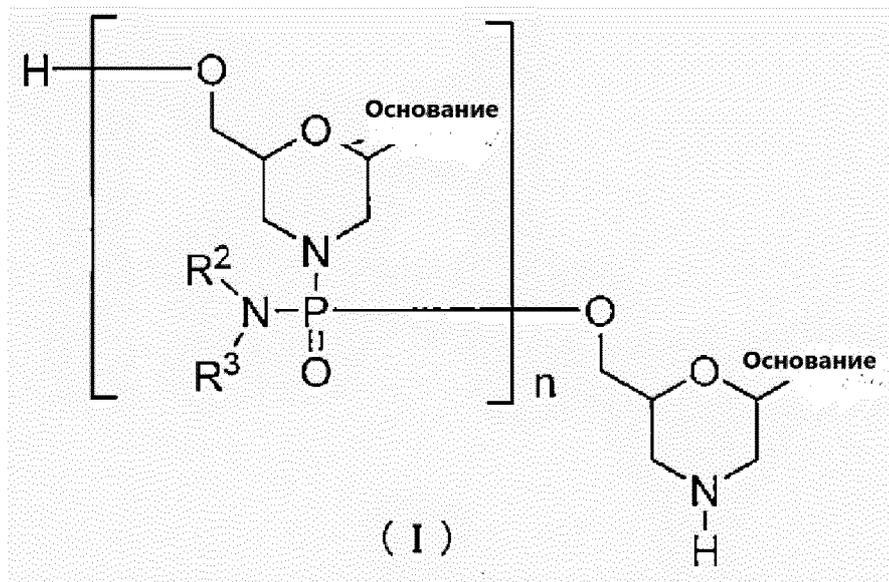
с процедурой, описанной в WO 2009/064471, или способом, описанным ниже.

[0056]

[Способ получения РМО]

Вариант РМО включает, например, соединение, представленное нижеприведенной общей формулой (I) (далее обозначаемое РМО (I)).

[Формула 6]



где каждое основание, R^2 и R^3 являются такими, как они были определены выше; и n представляет собой заданное целое число от 1 до 99, предпочтительно, заданное целое число от 19 до 29, от 19 до 28, от 21 до 29, от 21 до 28 или от 24 до 28, а более предпочтительно от 21 до 29, от 21 до 28 или от 24 до 28.

[0057]

РМО (I) может быть получен известным способом, например, он может быть получен путем осуществления процедур, описанных в нижеследующих стадиях.

Соединения и реагенты, используемые в приведенных ниже стадиях, не имеют конкретных ограничений, при условии, что они могут быть использованы для получения РМО.

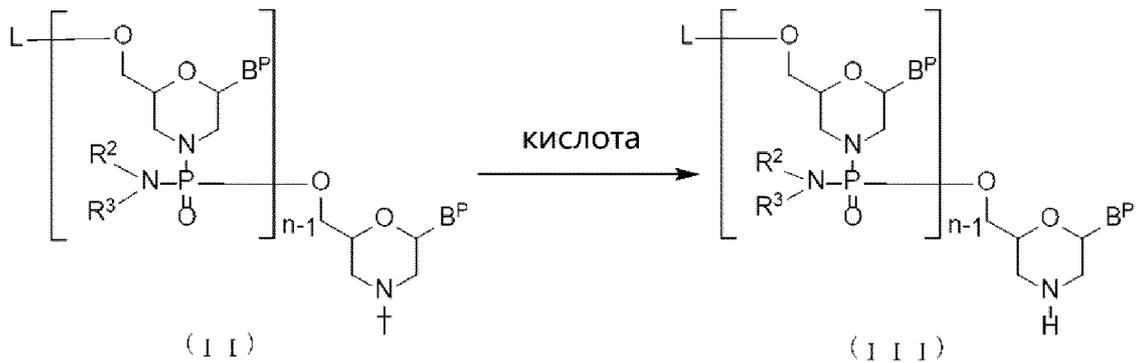
Кроме того, все нижеследующие стадии могут быть осуществлены жидкофазным методом или твердофазным методом (вручную или с использованием коммерчески доступных твердофазных автоматических синтезаторов). При получении РМО твердофазным методом предпочтительнее использовать автоматические синтезаторы из-за простоты операций и точности синтеза.

[0058]

(1) Стадия А:

Соединение, представленное приведенной ниже общей формулой (II) (далее называемое соединением (II)), подвергают реакции взаимодействия с кислотой с получением соединения, представленного приведенной ниже общей формулой (III) (далее называемого соединением (III)):

[Формула 7]



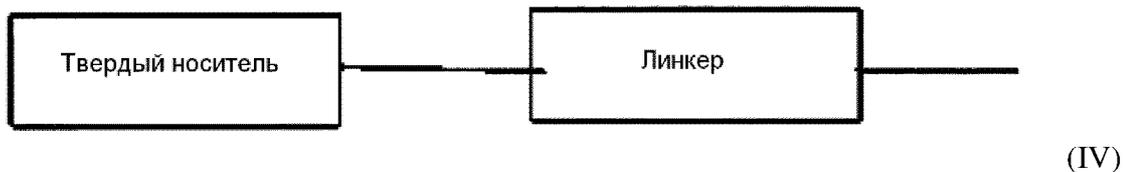
где n , R^2 и R^3 имеют значения, определенные выше;

каждый B^P независимо представляет собой азотистое основание, которое может быть, но необязательно, защищенным;

T представляет собой тритил, метокситритил или диметокситритил; и

L представляет собой водород, ацил или группу, представленную приведенной ниже общей формулой (IV) (далее обозначаемую как группа (IV)).

[Формула 8]



[0059]

«Азотистое основание» для B^P включает такое же «азотистое основание, как и для термина «Основание», при условии, что аминогруппа или гидроксигруппа в азотистом основании, представленном в B^P , может быть защищена.

Такая защитная группа для аминогруппы не имеет конкретных ограничений, при условии, что она может быть использована в качестве защитной группы для нуклеиновых кислот. Конкретные примеры включают бензоил, 4-метоксибензоил, ацетил, пропионил, бутирил, изобутирил, фенилацетил, феноксиацетил, 4-трет-бутилфеноксиацетил, 4-изопропилфеноксиацетил и (диметиламино)метилен. Конкретные примеры защитной группы для гидроксигруппы включают 2-цианоэтил, 4-нитрофенил, фенилсульфонилэтил, метилсульфонилэтил, триметилсилилэтил, фенил, который может быть замещен 1-5 электроноакцепторными группами в необязательных замещаемых положениях, дифенилкарбамоил, диметилкарбамоил, диэтилкарбамоил, метилфенилкарбамоил, 1-пирролидинилкарбамоил, морфолинокарбамоил, 4-(трет-бутилкарбоксит)бензил, 4-[(диметиламино)карбоксит]бензил и 4-(фенилкарбоксит)бензил (см., например, WO 2009/064471).

[0060]

«Твердый носитель» не имеет конкретных ограничений, при условии, что он

представляет собой носитель, подходящий для твердофазной реакции нуклеиновых кислот. Желательно, чтобы твердый носитель обладал следующими свойствами: например, (i) чтобы он был слаборастворимым в реагентах, которые могут быть использованы для синтеза производных морфолинонуклеиновой кислоты (например, в дихлорметане, ацетонитриле, тетразоле, N-метилимидазоле, пиридине, в ангидриде уксусной кислоте, лутидине, трифторуксусной кислоте); (ii) чтобы он был химически устойчивым к реагентам, которые могут быть использованы для синтеза производных морфолинонуклеиновой кислоты; (iii) чтобы он был химически модифицированным; (iv) чтобы он мог быть заряжен желаемыми производными морфолинонуклеиновой кислоты; (v) чтобы он имел достаточную прочность и выдерживал высокое давление при обработке; и (vi) чтобы он имел определенный диапазон диаметров и распределений частиц. В частности, примерами являются набухающий полистирол (например, аминометилполистироловая смола, 1% сшитый дивинилбензол (200-400 меш) (2,4-3,0 ммоль/г) (Tokyo Chemical Industry), аминометилированная полистироловая смола ·HCl [дивинилбензол, 1%, 100-200 меш] (Peptide Institute, Inc.)), ненабухающий полистирол (например, Primer Support (GE Healthcare)), полистирол с присоединенными цепями ПЭГ (например, смола NH₂-ПЭГ (Watanabe Chemical Co.), смола TentaGel), стекло с регулируемыми порами (CPG) (изготовленное, например, как CPG), стекло с оксалил-регулируемыми порами (см., например, Alul et al., *Nucleic Acids Research*, Vol. 19, 1527 (1991)), носитель TentaGel, дериватизированный аминополиэтиленгликолем (например, Wright et al., см., *Tetrahedron Letters*, Vol.34, 3373 (1993)), и сополимер пористого полистирола/дивинилбензола.

«Линкер», который может быть использован, представляет собой известный линкер, обычно используемый для связывания нуклеиновых кислот или производных морфолинонуклеиновой кислоты. Примеры включают 3-аминопропил, сукцинил, 2,2'-диэтанолсульфонил и алкиламино с длинной цепью (LCAA).

[0061]

Эта стадия может быть проведена путем взаимодействия соединения (II) с кислотой.

[0062]

«Кислота», которая может быть использована на этой стадии, включает, например, трифторуксусную кислоту, дихлоруксусную кислоту и трихлоруксусную кислоту. Количество используемой кислоты должно находиться в диапазоне, например, от 0,1 молярного эквивалента до 1000 молярных эквивалентов на 1 моль соединения (II), а предпочтительно, в диапазоне от 1 молярного эквивалента до 100 молярных эквивалентов на 1 моль соединения (II).

Органический амин может быть использован в комбинации с кислотой, описанной выше. Органический амин не имеет конкретных ограничений и включает, например, триэтиламин. Количество используемого органического амина находится в пределах, например, от 0,01 молярного эквивалента до 10 молярных эквивалентов, а

предпочтительно, в пределах, например, от 0,1 молярного эквивалента до 2 молярных эквивалентов на 1 моль кислоты.

Если на этой стадии используют соль или смесь кислоты и органического амина, то соль или смесь включают, например, соль или смесь трифторуксусной кислоты и триэтиламина, а более конкретно, смесь 1 эквивалента триэтиламина и 2 эквивалентов трифторуксусной кислоты.

Кислота, которая может быть использована на этой стадии, также может быть использована в форме, разбавленной подходящим растворителем в концентрации от 0,1% до 30%. Растворитель не имеет конкретных ограничений при условии, что он будет инертным в реакционной смеси, и включает, например, дихлорметан, ацетонитрил, спирт(ы) (этанол, изопропанол, трифторэтанол и т.п.), воду или их смесь.

[0063]

В описанной выше реакции, температура предпочтительно составляет в диапазоне, например, от 10°C до 10°C, более предпочтительно, в диапазоне от 10°C до 40°C, а наиболее предпочтительно, в диапазоне от 25°C до 35°C.

Время реакции может изменяться в зависимости от типа используемой кислоты и температуры реакции, и обычно оно составляет от 0,1 минуты до 24 часов, а предпочтительно от 1 минуты до 5 часов.

[0064]

После завершения этой стадии, при необходимости может быть добавлено основание для нейтрализации кислоты, оставшейся в системе. «Основание» не имеет конкретных ограничений и включает, например, диизопропилэтиламин. Основание может быть также использовано в форме, разбавленной подходящим растворителем в концентрации от 0,1% (об./об.) до 30% (об./об.).

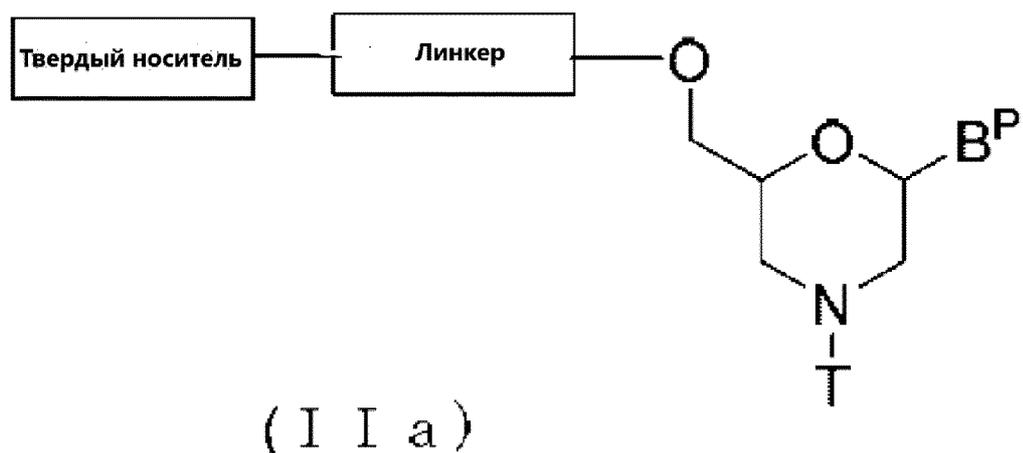
Растворитель, используемый на этой стадии, не имеет конкретных ограничений при условии, что он будет инертным в реакционной смеси, и включает дихлорметан, ацетонитрил, спирт(ы) (этанол, изопропанол, трифторэтанол и т.п.), воду и их смесь. Температура реакции предпочтительно составляет в диапазоне, например, от 10°C до 50°C, более предпочтительно, в диапазоне от 20°C до 40°C, а наиболее предпочтительно в диапазоне от 25°C до 35°C.

Время реакции может изменяться в зависимости от типа используемого основания и температуры реакции, и обычно оно составляет в диапазоне от 0,1 минуты до 24 часов, а предпочтительно в диапазоне от 1 минуты до 5 часов.

[0065]

В случае соединения (II), соединение приведенной ниже общей формулы (IIIa) (далее называемое соединением (IIIa)), где n равно 1, а L представляет собой группу (IV), может быть получено по следующей методике.

[Формула 9]



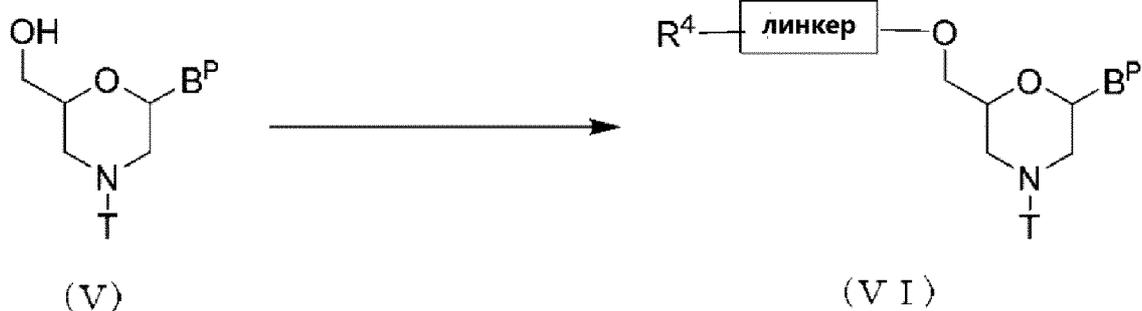
где B^P , T, линкер и твердый носитель являются такими, как они были определены выше.

[0066]

Стадия 1:

Соединение, представленное нижеследующей общей формулой (V), подвергают взаимодействию с ацилирующим агентом с получением соединения, представленного нижеследующей общей формулой (VI) (далее называемого соединением (VI)).

[Формула 10]



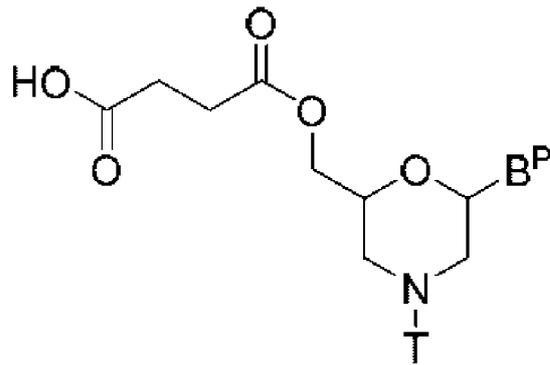
где B^P , T и линкер являются такими, как они были определены выше; и R^4 представляет собой гидроксильную, галогенную, карбоксильную группу или аминогруппу.

[0067]

Эта стадия может быть осуществлена известными способами введения линкеров с использованием соединения (V) в качестве исходного вещества.

В частности, соединение, представленное нижеследующей общей формулой (VIa), может быть получено с применением способа, известного как этерификация, с использованием соединения (V) и ангидрида янтарной кислоты.

[Формула 11]



(VI a)

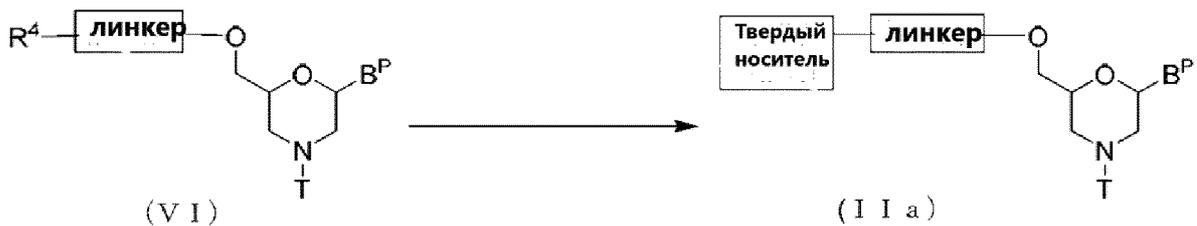
где B^P и T являются такими, как они были определены выше.

[0068]

Стадия 2:

Соединение (VI) подвергают взаимодействию с твердым носителем с использованием конденсирующего агента или подобного вещества для получения соединения (IIa).

[Формула 12]

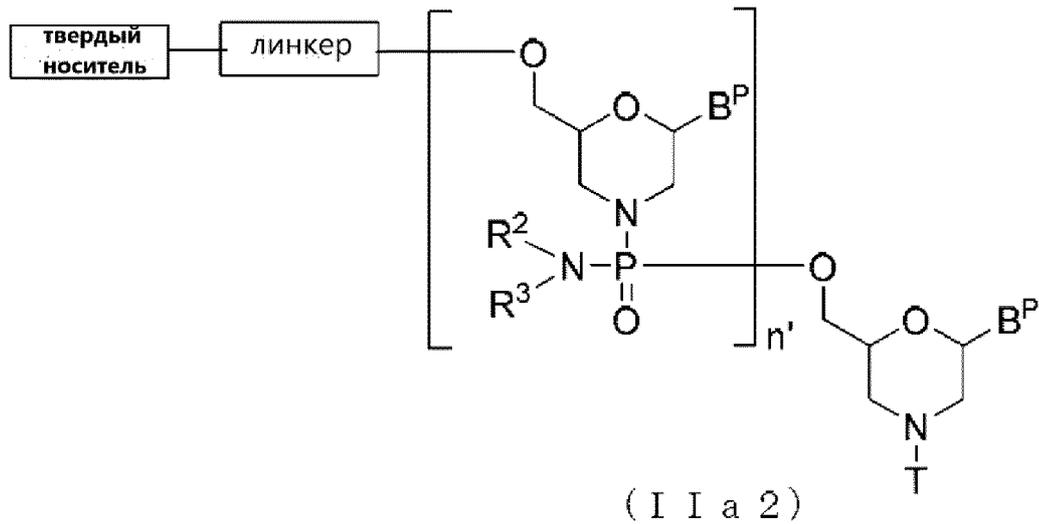


где B^P , R^4 , T, линкер и твердый носитель являются такими, как они были определены выше.

Эта стадия может быть осуществлена с использованием соединения (VI) и твердого носителя в соответствии с реакцией, известной как реакция конденсации.

В случае соединения (II), соединение, представленное нижеследующей общей формулой (IIa2), где n равно 1-99 (в конкретном варианте осуществления изобретения, n равно, например, 2-29, 2-28, 2-27, 2-26, 2-25, 2-24, 2-23, 2-22, 2-21 или 2-20, предпочтительно заданное целое число 19-29, 19-28, 21-29, 21-28 или 24-28, а более предпочтительно 21-29, 21-28 или 24-28), а L представляет собой группу, представленную общей формулой (IV), может быть получено с использованием соединения (IIa) в качестве исходного вещества и повторения стадии A и стадии B способа получения РМО, описанного в настоящей заявке, желаемое количество раз.

[Формула 13]



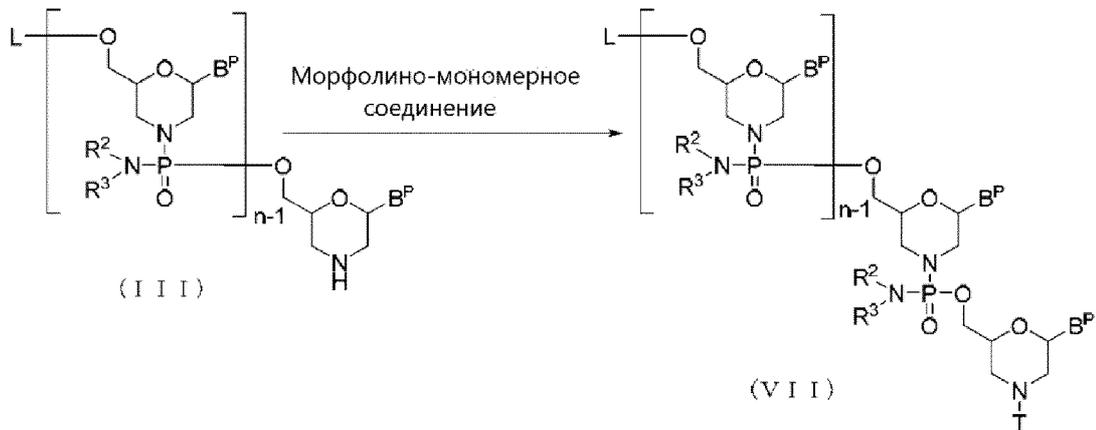
где B^P , n , R^2 , R^3 , T , линкер и твердый носитель являются такими, как они были определены выше.

[0069]

(2) Стадия В

Соединение (III) подвергают взаимодействию с морфолино-мономерным соединением в присутствии основания с получением соединения, представленного ниже следующей общей формулой (VII) (далее называемого соединением (VII)):

[Формула 14]



где каждый B^P , L , n , R^2 , R^3 и T являются такими, как они были определены выше.

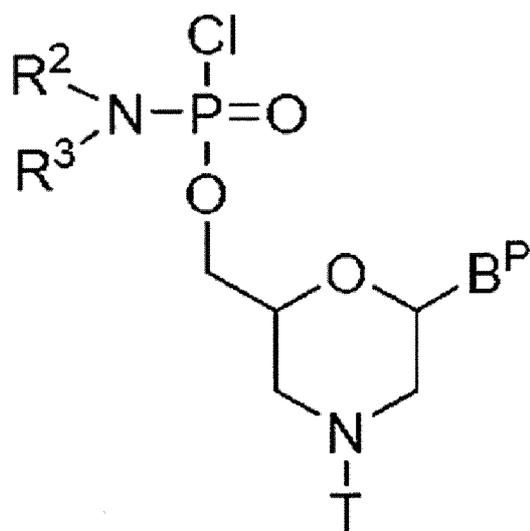
[0070]

Эта стадия может быть осуществлена путем взаимодействия соединения (III) с морфолино-мономерным соединением в присутствии основания.

[0071]

Морфолино-мономерное соединение включает, например, соединения, представленные ниже общей формулой (VIII):

[Формула 15]



(V I I I)

где B^P, R², R³ и T являются такими, как они были определены выше.

«Основание», которое может быть использовано на этой стадии, включает, например, диизопропилэтиламин, триэтиламин и N-этилморфолин. Количество используемого основания составляет в диапазоне, например, от 1 молярного эквивалента до 1000 молярных эквивалентов на 1 моль соединения (III), а предпочтительно, в диапазоне от 10 молярных эквивалентов до 100 молярных эквивалентов на 1 моль соединения (III).

Морфолино-мономерное соединение и основание, которые могут быть использованы на этой стадии, могут быть также использованы в форме, разведенной подходящим растворителем в концентрации от 0,1% до 30%. Растворитель не имеет конкретных ограничений при условии, что он будет инертным в реакции, и включает, например, N, N-диметилимидазолон, N-метилпиперидон, ДМФ, дихлорметан, ацетонитрил, тетрагидрофуран или их смесь.

[0072]

Температура реакции предпочтительно составляет в диапазоне, например, от 0°C до 100°C, а более предпочтительно в диапазоне от 10°C до 50°C.

Время реакции может изменяться в зависимости от типа используемого основания и температуры реакции, и обычно оно составляет в диапазоне от 1 минуты до 48 часов, а предпочтительно в диапазоне от 30 минут до 24 часов.

[0073]

Кроме того, после завершения этой стадии при необходимости может быть добавлен ацилирующий агент. «Ацилирующий агент» включает, например, ангидрид уксусной кислоты, ацетилхлорид и ангидрид феноксиуксусной кислоты. Ацилирующий агент может быть также использован, например, в форме, разведенной подходящим растворителем в концентрации от 0,1% до 30%. Растворитель не имеет конкретных

ограничений при условии, что он будет инертным в реакции, и включает, например, дихлорметан, ацетонитрил, тетрагидрофуран, спирт(ы) (этанол, изопропанол, трифторэтанол и т.п.), воду или их смесь.

При необходимости, основание, такое как пиридин, лутидин, коллидин, триэтиламин, диизопропилэтиламин, N-этилморфолин и т.п. может быть также использовано в комбинации с ацилирующим агентом. Количество используемого ацилирующего агента предпочтительно составляет в диапазоне от 0,1 молярного эквивалента до 10000 молярных эквивалентов, а более предпочтительно в диапазоне от 1 молярного эквивалента до 1000 молярных эквивалентов. Количество используемого основания составляет в диапазоне, например, от 0,1 молярного эквивалента до 100 молярных эквивалентов, а предпочтительно в диапазоне от 1 молярного эквивалента до 10 молярных эквивалентов на 1 моль ацилирующего агента.

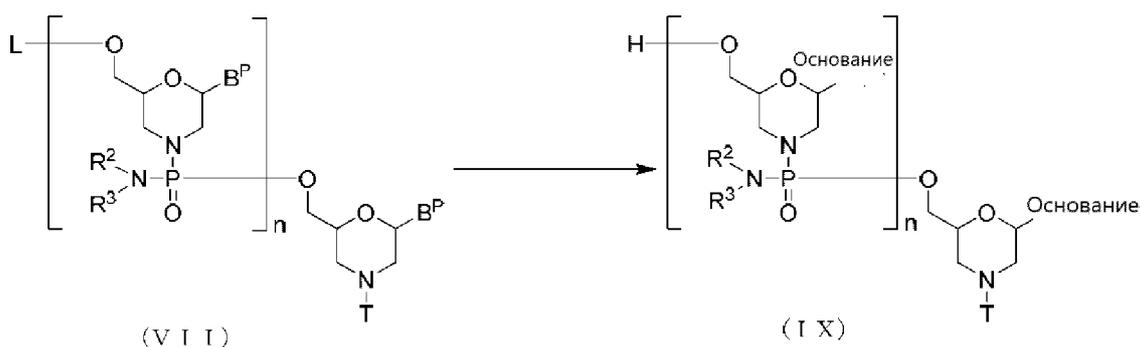
Температура этой реакции предпочтительно составляет в диапазоне от 10°C до 50°C, более предпочтительно, в диапазоне от 10°C до 50°C, гораздо более предпочтительно, в диапазоне от 20°C до 40°C, а наиболее предпочтительно, в диапазоне от 25°C до 35°C. Время реакции может варьироваться в зависимости от типа используемого ацилирующего агента и температуры реакции, и обычно составляет в диапазоне от 0,1 минуты до 24 часов, а предпочтительно в диапазоне от 1 минуты до 5 часов.

[0074]

(3) Стадия С:

В соединении (VII), полученном на стадии В, защитную группу удаляют с использованием агента для снятия защиты с получением соединения, представленного общей формулой (IX).

[Формула 16]



где основание, B^P , L , n , R^2 , R^3 и T являются такими, как они были определены выше.

[0075]

Эта стадия может быть осуществлена посредством взаимодействия соединения (VII) с агентом для снятия защиты.

[0076]

Термин «агент для снятия защиты» включает, например, концентрированную

аммиачную воду и метиламин. «Агент для снятия защиты», используемый на этой стадии, может быть также использован в форме, разведенной, например, водой, метанолом, этанолом, изопропиловым спиртом, ацетонитрилом, тетрагидрофураном, ДМФ, N, N-диметилимидазолидоном, N-метилпиперидоном или их смесью. Среди них, предпочтительным является этанол. Количество используемого агента для снятия защиты составляет, соответственно, например, в диапазоне от 1 молярного эквивалента до 100000 молярных эквивалентов, а более предпочтительно, в диапазоне от 10 молярных эквивалентов до 1000 молярных эквивалентов на 1 моль соединения (VII).

[0077]

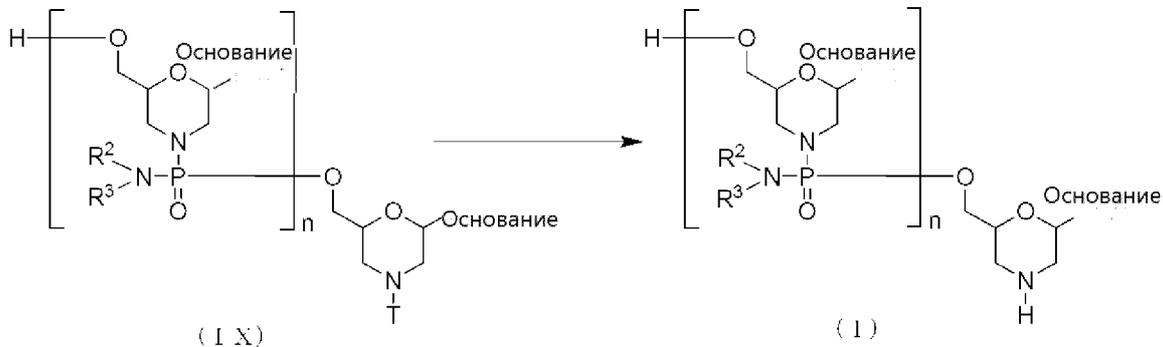
Подходящая температура реакции составляет, например, в диапазоне от 15°C до 75°C, предпочтительно, в диапазоне от 40°C до 70°C, а более предпочтительно в диапазоне от 50°C до 60°C. Время реакции снятия защиты может варьироваться в зависимости от типа соединения (VII), температуры реакции и т.п., и обычно составляет в диапазоне от 10 минут до 30 часов, предпочтительно от 30 минут до 24 часов, а более предпочтительно в диапазоне от 5 часов до 20 часов.

[0078]

(4) Стадия D:

РМО (I) получают посредством взаимодействия соединения (IX), полученного на стадии C, с кислотой:

[Формула 17]



где основание, n, R², R³ и T являются такими, как они были определены выше.

[0079]

Эта стадия может быть осуществлена путем добавления кислоты к соединению (IX).

[0080]

«Кислота», которая может быть использована на этой стадии, включает, например, трихлоруксусную кислоту, дихлоруксусную кислоту, уксусную кислоту, фосфорную кислоту, соляную кислоту и т.п. Количество используемой кислоты должно быть подходящим для того, чтобы раствор имел pH в диапазоне от 0,1 до 4,0, а более предпочтительно в диапазоне от 1,0 до 3,0. Растворитель не имеет конкретных ограничений, при условии, что он будет инертным в реакции, и включает, например, ацетонитрил, воду или смесь этих растворителей.

[0081]

Подходящая температура реакции составляет в диапазоне от 10°C до 50°C, более предпочтительно, от 20°C до 40°C, а более предпочтительно в диапазоне от 25°C до 35°C. Время реакции снятия защиты может варьироваться в зависимости от типа соединения (IX), температуры реакции и т.п., и обычно составляет в диапазоне от 0,1 минуты до 5 часов, предпочтительно от 1 минуты до 1 часа, а более предпочтительно в диапазоне от 1 минуты до 30 минут.

[0082]

РМО (I) может быть получен посредством обработки реакционной смеси, полученной на этой стадии, стандартными способами разделения и очистки, такими как экстракция, концентрирование, нейтрализация, фильтрация, центрифужное разделение, перекристаллизация, колоночная хроматография с обращенной фазой с использованием C₈-C₁₈, катионообменная колоночная хроматография, анионообменная колоночная хроматография, колоночная хроматография с гель-фильтрацией, высокоэффективная жидкостная хроматография, диализ, ультрафильтрация и т.п., проводимые отдельно или в комбинации. Таким образом, желаемый РМО (I) может быть выделен и очищен (см., например, WO 1991/09033).

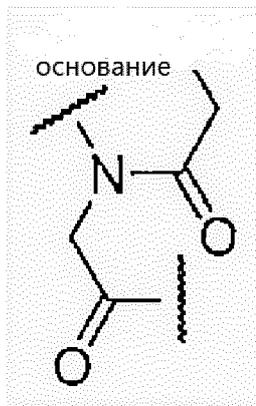
При очистке РМО (I) с использованием хроматографии с обращенной фазой, в качестве элюирующего растворителя можно использовать, например, смесь растворов 20 мМ триэтиламина/ацетатного буфера и ацетонитрила.

При очистке РМО (I) с использованием ионообменной хроматографии, в качестве элюирующего растворителя можно использовать, например, смесь 1 М физиологического раствора и 10 мМ водного раствора гидроксида натрия.

[0083]

Пептид-содержащая нуклеиновая кислота представляет собой антисмысловой олигомер согласно изобретению, имеющий в качестве составного звена группу, представленную следующей общей формулой:

[Формула 18]



где основание является таким, как оно было определено выше.

[0084]

Пептид-содержащие нуклеиновые кислоты могут быть получены, например, как

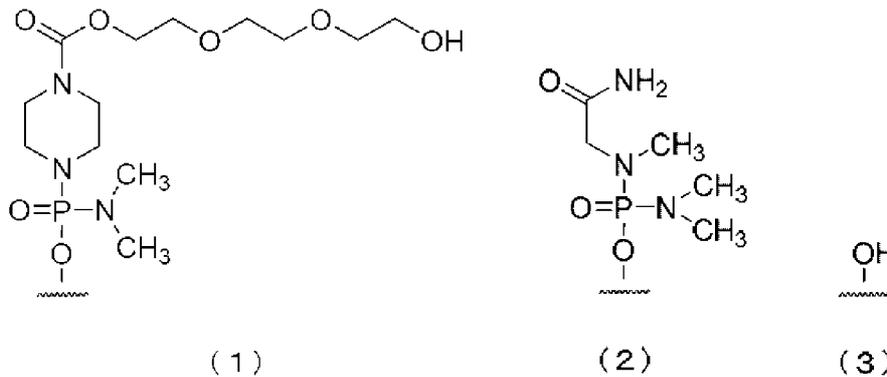
описано в представленной ниже литературе.

- 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)

[0085]

В антисмысловом олигомере согласно изобретению, 5'-конец может представлять собой любую из групп, представленных ниже химическими формулами (1)-(3), а предпочтительно он представляет собой (3)-ОН.

[Формула 19]



Далее, группы, показанные выше в (1), (2) и (3), упоминаются как «Группа (1)», «Группа (2)» и «Группа (3)», соответственно.

[0086]

Антисмысловый олигомер согласно изобретению может содержать соединение со стереохимически оптически чистым атомом фосфора, поскольку атом фосфора остатка фосфатной связи служит асимметрическим центром. Специалист в данной области может получить оптически чистые активные формы из изомерных смесей (WO 2017/024264). Антисмысловый олигомер согласно изобретению может быть синтезирован в виде оптически чистой активной формы. Специалист в данной области может получить оптически чистые активные формы путем мониторинга реакции синтеза (публикация выложенной заявки на патент Японии № 2018-537952).

[0087]

2. Антисмысловый олигомер, конъюгированный с пептидом.

Антисмысловый олигомер согласно изобретению может образовывать комплекс с функциональным пептидом, и может быть использован для повышения эффективности (например, мембранопроницаемым пептидом для повышения эффективности доставки в клетки-мишени) (WO2008/036127, WO2009/005793, WO2012/150960, WO2016/187425,

WO2018/118662, WO2018/118599, WO2018/118627, J. D. Ramsey, N. H. Flynn, *Pharmacology & Therapeutics* 154, 78-86 (2015), M. K. Tsoumpra et al., *EBioMedicine*, 45, 630-645(2019)). Сайт контактирования не имеет конкретных ограничений. Предпочтительно, 5'-конец или 3'-конец антисмыслового олигомера соединен (конъюгирован) с амино- или карбокси-концом функционального пептида.

В другом варианте осуществления изобретения, антисмысловый олигомер согласно изобретению и функциональный пептид могут образовывать комплекс (конъюгат) посредством линкера. Линкер не имеет конкретных ограничений. Предпочтительно, 5'-конец или 3'-конец антисмыслового олигомера соединен с одним концом линкера, тогда как амино- или карбоксильный конец функционального пептида соединен с другим концом линкера. Между функциональным пептидом и линкером может присутствовать дополнительная аминокислота.

[0088]

3. Фармацевтическая композиция

Антисмысловый олигомер согласно изобретению, даже если его длина короче, чем длина уже известных антисмысловых олигомеров, может индуцировать вырезание экзона 51 с высокой эффективностью. Антисмысловый олигомер согласно изобретению обладает превосходной растворимостью и при этом сохраняет активность, индуцирующую вырезание экзона 51 с высокой эффективностью. Кроме того, антисмысловый олигомер согласно изобретению обладает превосходной растворимостью и безопасностью, и при этом сохраняет активность, индуцирующую вырезание экзона 51 с высокой эффективностью. Таким образом, предполагается, что симптомы состояния мышечной дистрофии могут быть ослаблены с высокой эффективностью путем введения антисмыслового олигомера согласно изобретению пациентам с МДД, у которых присутствует мутация, инициирующая вырезание экзона 51 (например, мутация со сдвигом рамки считывания и миссенс-мутация/нонсенс-мутация в экзоне 51) в гене дистрофина. Таким образом, предполагается, что симптомы состояния мышечной дистрофии могут быть ослаблены с высокой эффективностью путем введения антисмыслового олигомера согласно изобретению, например, по меньшей мере пациентам с МДД, у которых присутствует уже определенный мутантный ген дистрофина с делецией экзона вблизи экзона 51. Предварительно определенный мутантный ген дистрофина означает ген дистрофина, который имеет по меньшей мере мутацию со сдвигом рамки считывания, вызванную делецией экзона вблизи экзона 51, и в котором, рамка считывания аминокислот скорректирована путем исключения (вырезания) экзона 51. Примерами пациентов с МДД являются пациенты с МДД, имеющие мутацию со сдвигом рамки считывания, вызванную делециями экзонов 13-50, 29-50, 40-50, 43-50, 45-50, 47-50, 48-50, 49-50, 50, 52, 52-63 и т.п.

В частности, предполагается, что симптомы состояния мышечной дистрофии могут быть ослаблены с высокой эффективностью путем введения фармацевтической композиции, содержащей антисмысловый олигомер согласно изобретению, пациентам с

МДД, у которых имеется мутация, превращающаяся в мутацию внутри рамки считывания путем вырезания экзона 51, например, пациентам с делецией экзонов 13-50, пациентам с делецией экзонов 29-50, пациентам с делецией экзонов 40-50, пациентам с делецией экзонов 43-50, пациентам с делецией экзонов 45-50, пациентам с делецией экзонов 47-50, пациентам с делецией экзонов 48-50, пациентам с делецией экзонов 49-50, пациентам с делецией экзона 50, пациентам с делецией экзона 52, пациентам с делецией экзонов 52-63 и т.п. Так, например, при использовании фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой олигомер согласно изобретению, аналогичные терапевтические эффекты могут быть достигнуты даже в меньшей дозе, чем в случае уже известных олигомеров. Соответственно, побочные эффекты могут быть ослаблены, что желательно с экономической точки зрения.

Антисмысловой олигомер согласно изобретению также может быть использован в целях приготовления фармацевтических композиций, поскольку антисмысловой олигомер обладает превосходной растворимостью и при этом сохраняет активность, индуцирующую вырезание экзона 51 с высокой эффективностью. Кроме того, антисмысловой олигомер согласно изобретению также может быть использован в качестве фармацевтической композиции, поскольку антисмысловой олигомер обладает превосходной растворимостью и безопасностью, и при этом сохраняет активность, индуцирующую вырезание экзона 51 с высокой эффективностью.

В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения мышечной дистрофии, содержащей в качестве активного ингредиента антисмысловой олигомер согласно изобретению, его фармацевтически приемлемую соль или гидрат (эта композиция далее будет называться «композицией согласно изобретению»).

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу лечения мышечной дистрофии, который включает введение пациенту с МДД антисмыслового олигомера согласно изобретению.

В указанном способе лечения, антисмысловой олигомер согласно изобретению может быть введен в составе фармацевтической композиции для лечения мышечной дистрофии.

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению антисмыслового олигомера согласно изобретению в целях приготовления фармацевтической композиции для лечения мышечной дистрофии, и к применению антисмыслового олигомера согласно изобретению для лечения мышечной дистрофии.

[0089]

Примерами фармацевтически приемлемой соли антисмыслового олигомера согласно изобретению, содержащейся в композиции согласно изобретению, являются соли щелочных металлов, такие как соль натрия, соль калия и соль лития; соли щелочноземельных металлов, такие как соль кальция и соль магния; соли металлов, такие как соль алюминия, соль железа, соль цинка, соль меди, соль никеля, соль кобальта и т.п.;

соли аммония; соли органических аминов, такие как соль трет-октиламина, соль дибензиламина, соль морфолина, соль глюкозамина, соль алкилового эфира фенилглицина, соль этилендиамина, соль N-метилглюкамина, соль гуанидина, соль диэтиламина, соль триэтиламина, соль дициклогексиламина, соль N, N'-дибензилэтилендиамина, соль хлорпрокаина, соль прокаина, соль диэтаноламина, соль N-бензилфенетиламина, соль пиперазина, соль тетраметиламмония, соль трис(гидроксиметил)аминометана; гидрогалогенидные соли, такие как соль фтористоводородной кислоты, соль хлористоводородной кислоты, соль бромистоводородной кислоты и соль иодистоводородной кислоты; соли неорганических кислот, такие как соль азотной кислоты, соль перхлорной кислоты, соль серной кислоты, соль фосфорной кислоты и т.п.; низшие алкансульфонаты, такие как метансульфонатная соль, трифторметансульфонатная соль и этансульфонатная соль; арилсульфонатная соль, такая как бензолсульфонатная соль и п-толуолсульфонатная соль; соли органических кислот, такие как соль уксусной кислоты, соль яблочной кислоты, соль фумаровой кислоты, соль янтарной кислоты, соль лимонной кислоты, соль винной кислоты, соль щавелевой кислоты, соль малеиновой кислоты и т.п.; и соли аминокислот, такие как соль глицина, соль лизина, соль аргинина, соль орнитина, соль глутаминовой кислоты и соль аспарагиновой кислоты. Эти соли могут быть получены известными способами. Альтернативно, антисмысловой олигомер согласно изобретению, содержащийся в композиции согласно изобретению, может присутствовать в форме гидрата.

[0090]

Способ введения композиции согласно изобретению не имеет конкретных ограничений, при условии, что он является фармацевтически приемлемым способом введения, и его можно выбрать в зависимости от метода лечения. С точки зрения легкости доставки в мышечные ткани, предпочтительными 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 композиции согласно изобретению, не имеют конкретных ограничений, и включают, например, различные инъекции, пероральные средства, капельные инъекции, ингаляции, мази, лосьоны и т.п.

[0091]

При введении антисмыслового олигомера согласно изобретению пациентам с мышечной дистрофией, композиция согласно изобретению может содержать носитель для облегчения доставки олигомера в мышечные ткани. Такой носитель не имеет конкретных ограничений при условии, что он является фармацевтически приемлемым, и его примеры включают катионные носители, такие как катионные липосомы, катионные полимеры и т.п., или носители, использующие вирусную оболочку. Примерами катионных липосом являются, например, липосомы, состоящие из 2-O-(2-диэтиламиноэтил)карабамоил-1,3-O-диолеоилглицерина и фосфолипидов в качестве основных компонентов (эта липосома будет далее называться «липосомой А»), олигофектамин (зарегистрированный торговый

знак) (Invitrogen Corp.), Липофектин (зарегистрированный торговый знак) (Invitrogen Corp.), Липофектамин (зарегистрированный торговый знак) (Invitrogen Corp.), Липофектамин 2000 (зарегистрированный торговый знак) (Invitrogen Corp.), DMRIE-C (зарегистрированный торговый знак) (Invitrogen Corp.), GeneSilencer (зарегистрированный торговый знак) (Gene Therapy Systems), TransMessenger (зарегистрированный торговый знак) (QIAGEN, Inc.), TransIT TKO (зарегистрированный торговый знак) (Mirus) и Nucleofector II (Lonza). Среди прочих, предпочтительной является липосома А. Примеры катионных полимеров включают JetSI (зарегистрированный торговый знак) (Qbiogene, Inc.) и Jet-PEI (зарегистрированный торговый знак) (полиэтиленимин, Qbiogene, Inc.). Пример носителей, использующих вирусную оболочку, включает GenomeOne (зарегистрированный торговый знак) (липосому HVJ-E, Ishihara Sangyo). Альтернативно, также могут быть использованы медицинские устройства, описанные в Японском патенте № 2924179, и катионные носители, описанные в Японских национальных повторных публикациях РСТ № 2006/129594 и 2008/096690.

Дополнительную информацию можно найти в патенте США № 4235871, в патенте США № 4737323, WO96/14057, «New RRC, Liposomes: A practical approach, IRL Press, Oxford (1990), pages 33-104» и т.п.

[0092]

Концентрация антисмыслового олигомера согласно изобретению, содержащегося в композиции согласно изобретению, может варьироваться в зависимости от типа носителя и т.п., и в одном варианте осуществления изобретения, она составляет в пределах от 0,1 нМ до 100 мкМ, а предпочтительно в пределах от 100 нМ до 10 мкМ. Массовое соотношение антисмыслового олигомера согласно изобретению, входящего в состав композиции согласно изобретению, и носителя (носитель/антисмысловый олигомер согласно изобретению) может варьироваться в зависимости от свойства олигомера, типа носителя и т.п., и соответственно, составляет в диапазоне от 0,1 до 100, а предпочтительно в диапазоне от 0,1 до 10.

[0093]

Композиция согласно изобретению может быть получена в форме водного раствора. В этом случае, композиция согласно изобретению может содержать антисмысловый 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, композиция согласно изобретению может содержать антисмысловый 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.

[0094]

Композиция согласно изобретению может быть получена в сухой форме. В этом

случае, для приготовления композиции согласно изобретению в форме водного раствора, композиция согласно изобретению в сухой форме, содержащая, например, 125 мг или 250 мг антисмыслового олигомера согласно изобретению, может быть смешана 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 1-50 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 5-10 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 ее использованием.

[0095]

В дополнение к антисмысловому олигомеру согласно изобретению и носителю, описанному выше, в композицию согласно изобретению могут быть, но необязательно, включены 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, сахароза, маннит, сорбит и ксилит), агенты, придающие изотоничность (например, хлорид натрия, глюкоза, мальтоза, лактоза, сахароза, трегалоза, маннит, сорбит и ксилит), 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 несколько из этих добавок. Содержание добавки в композиции согласно изобретению соответственно составляет 90 масс.% или менее, предпочтительно 70 масс.% или менее, а более предпочтительно 50 масс.% или менее.

[0096]

Композиция согласно изобретению может быть приготовлена путем добавления антисмыслового олигомера согласно изобретению к дисперсии носителя и адекватного перемешивания смеси. Добавки могут быть введены на соответствующей стадии либо до, либо после добавления антисмыслового олигомера согласно изобретению. Если композиция согласно изобретению приготовлена в форме водного раствора, то водный растворитель, который может быть использован при добавлении антисмыслового олигомера согласно изобретению, не имеет конкретных ограничений, при условии, что он будет фармацевтически приемлемым, и примерами водного растворителя являются вода для инъекций или дистиллированная вода для инъекций, электролитная жидкость, такая как физиологический раствор и т.п., и сахарная жидкость, такая как глюкозная жидкость, мальтозная жидкость и т.п. Специалист в данной области может соответствующим образом выбрать соответствующие pH и температуру для каждого конкретного случая.

[0097]

Композиция согласно изобретению может быть приготовлена, например, в жидкой форме и ее лиофилизированного препарата. В одном варианте композиции согласно

изобретению, приготовленной в сухой форме, лиофилизированный препарат может быть получен путем лиофилизации композиции согласно изобретению в жидкой форме обычным способом. Лиофилизация может быть осуществлена, например, путем соответствующей стерилизации композиции согласно изобретению в жидкой форме, дозированием аликвоты во флакон-контейнер, проведения предварительного замораживания в течение 2 часов при температуре приблизительно от -40 до -20°C , проведения первичной сушки при температуре приблизительно от 0 до 10°C при пониженном давлении, а затем проведения вторичной сушки при температуре приблизительно от 15 до 25°C при пониженном давлении. Обычно, лиофилизированный препарат композиции согласно изобретению может быть затем получен путем замены газа во флаконе газообразным азотом с последующим его герметичным закрытием.

[0098]

Лиофилизированный препарат композиции согласно изобретению может быть использован 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 целей применения и т.п., не имеет конкретных ограничений и обычно в 0,5-2 раза превышает объем до лиофилизации или не превышает 500 мл.

[0099]

При этом, желательно регулировать дозу вводимой композиции согласно изобретению, с учетом таких факторов, как: тип и лекарственная форма антисмыслового олигомера согласно изобретению, содержащегося в композиции; особенности пациентов, включая возраст, массу тела и т.п.; способ введения; а также характер и тяжесть заболевания. Суточная доза, вычисленная как количество антисмыслового олигомера согласно изобретению, обычно составляет в диапазоне от 0,1 мг до 10 г/человека, а предпочтительно, от 1 мг до 1 г/человека. Этот числовой диапазон может иногда изменяться в зависимости от типа заболевания, подвергаемого лечению; способа введения и молекулы-мишени. Таким образом, в некоторых случаях может быть достаточной доза ниже этого диапазона, и, наоборот, иногда может возникнуть потребность в дозе выше этого диапазона. Композиция может быть введена один или несколько раз в день или с интервалами от одного дня до нескольких дней.

[0100]

В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции согласно изобретению, содержащей вектор, способный экспрессировать олигонуклеотид согласно изобретению, и носитель, описанный выше. Такой экспрессионный вектор может представлять собой вектор, способный экспрессировать множество олигонуклеотидов согласно изобретению. Композиция может быть приготовлена вместе с фармацевтически приемлемыми добавками, как в случае с

композицией согласно изобретению, содержащей антисмысловой олигомер согласно изобретению. Концентрация экспрессионного вектора, содержащегося в композиции, может варьироваться в зависимости от типа носителя и т.п., и в одном варианте осуществления изобретения, она соответственно составляет в диапазоне от 0,1 нМ до 100 мкМ, а предпочтительно в диапазоне от 100 нМ до 10 мкМ. Массовое соотношение экспрессионного вектора и носителя, входящего в состав композиции (носитель/экспрессионный вектор), может варьироваться в зависимости от свойства экспрессионного вектора, типа носителя и т.п. и составляет соответственно в диапазоне от 0,1 до 100, а предпочтительно в диапазоне от 0,1 до 10. Содержание носителя в композиции является таким же, как и в случае композиции согласно изобретению, содержащей антисмысловой олигомер согласно изобретению, и способ ее получения также является таким же, как и способ получения композиции согласно изобретению.

[0101]

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

[Примеры]

[0102]

[Пример 1: Синтез антисмыслового олигомера]

В соответствии со способом, описанным в WO 2015/137409, были синтезированы антисмысловые олигомеры, представленные в Таблице 1 (РМО №№ 1-93 (SEQ ID NO: 1-93)), которые нацелены на неполную последовательность оснований экзона 51 и/или его 5'-смежный интрон (интрон 50) в гене дистрофина человека. Теоретическое значение молекулярной массы каждого антисмыслового олигомера и ее значение, определенное с помощью ESI-TOF-MS, также представлены в таблице.

В Таблице 1, например, «H51_67-81_131-142» означает, что если 5'-концевое основание экзона 51 в гене дистрофина человека считается 1-м основанием, а его нижерасположенные основания в направлении 3' нумеруются по порядку, то антисмысловой олигомер нацелен на последовательность оснований с 67 по 81 и на последовательность оснований со 131 по 142. Последовательность, начиная с -1-го основания и расположенных выше его оснований в последовательности оснований-мишеней представляет собой последовательность оснований в интроне 50. Последовательность оснований, включающая экзон 51 и последовательность вблизи 3'-конца интрона 50 в человечесом гене дистрофина дикого типа представлена SEQ ID NO: 128.

[Таблица 3-1]

Таблица 1. Синтезированные антисмысловые олигомеры (РМО No 1-93)

РМО	Последовательность оснований мишени	Полная РМО	Молекулярная масса		SEQ ID
			Теорети	Найденн	

				ч. значени е	ое значени е	No.
1	H51_67-81_131-142	27	TCGGTAAGTTCTAAGATGGCATTCTA	8977.10	8977.68	1
2	H51_68-81_131-142	26	TCGGTAAGTTCTAAGATGGCATTCT	8637.98	8637.42	2
3	H51_74-89_132-142	27	TCGGTAAGTTCCATCAAGGAAGATGGC	9021.13	9021.40	3
4	H51_73-89_132-141	27	CGGTAAGTTCCATCAAGGAAGATGGCA	9030.14	9030.55	4
5	H51_69-81_128-142	28	TCGGTAAGTTCTGTCAAGATGGCATTTC	9308.21	9308.75	5
6	H51_66-79_131-142	26	TCGGTAAGTTCTGATGGCATTCTAG	8653.98	8653.47	6
7	H51_67-79_134-146	26	CCAGTCGGTAAGTGATGGCATTCTA	8647.99	8647.86	7
8	H51_68-80_130-142	26	TCGGTAAGTTCTGAGATGGCATTCT	8653.98	8654.05	8
9	H51_70-81_129-142	26	TCGGTAAGTTCTGTAAGATGGCATT	8677.99	8677.82	9
10	H51_70-81_128-141	26	CGGTAAGTTCTGTCAAGATGGCATT	8662.99	8663.07	10
11	H51_68-80_131-142	25	TCGGTAAGTTCTAGATGGCATTCT	8298.86	8298.84	11
12	H51_67-78_129-142	26	TCGGTAAGTTCTGTATGGCATTCTA	8628.97	8628.97	12
13	H51_67-79_130-142	26	TCGGTAAGTTCTGGATGGCATTCTA	8653.98	8653.04	13
14	H51_68-79_129-142	26	TCGGTAAGTTCTGTGATGGCATTCT	8644.97	8644.45	14
15	H51_68-79_130-142	25	TCGGTAAGTTCTGGATGGCATTCT	8314.86	8315.29	15
16	H51_69-80_129-142	26	TCGGTAAGTTCTGTAGATGGCATTTC	8653.98	8653.51	16
17	H51_70-81_130-142	25	TCGGTAAGTTCTGAAGATGGCATT	8347.88	8348.16	17
18	H51_69-80_131-143	25	GTCGGTAAGTTCTAGATGGCATTTC	8323.87	8324.63	18
19	H51_69-79_131-142	23	TCGGTAAGTTCTGATGGCATTTC	7629.63	7629.47	19
20	H51_68-80_130-141	25	CGGTAAGTTCTGAGATGGCATTCT	8323.87	8323.29	20
21	H51_69-80_130-142	25	TCGGTAAGTTCTGAGATGGCATTTC	8323.87	8323.51	21
22	H51_72-82_130-142	24	TCGGTAAGTTCTGGAAGATGGCAT	8042.78	8042.42	22
23	H51_69-80_129-141	25	CGGTAAGTTCTGTAGATGGCATTTC	8323.87	8324.17	23
24	H51_70-80_130-141	23	CGGTAAGTTCTGAGATGGCATT	7678.65	7678.31	24
25	H51_69-79_130-141	23	CGGTAAGTTCTGGATGGCATTTC	7654.64	7654.67	25
26	H51_68-78_130-141	23	CGGTAAGTTCTGATGGCATTCT	7629.63	7629.34	26
27	H51_68-78_129-141	24	CGGTAAGTTCTGTATGGCATTCT	7959.74	7959.98	27
28	H51_69-79_131-141	22	CGGTAAGTTCTGATGGCATTTC	7299.52	7299.75	28
29	H51_68-78_132-145	25	CAGTCGGTAAGTTTCATGGCATTCT	8283.86	8283.22	29
30	H51_73-82_127-141	25	CGGTAAGTTCTGTCCGAAGATGGCA	8342.89	8342.97	30

[Таблица 3-2]

31	H51_68-79_129-141	25	CGGTAAGTTCTGTGATGGCATTCT	8314.86	8314.76	31
32	H51_68-78_128-141	25	CGGTAAGTTCTGTCATGGCATTCT	8274.85	8274.92	32
33	H51_77-89_132-145	27	CAGTCGGTAAGTTCATCAAGGAAGAT	9005.13	9005.19	33
34	H51_74-88_131-142	27	TCGGTAAGTTCTATCAAGGAAGATGGC	9036.13	9035.95	34
35	H51_69-82_133-145	27	CAGTCGGTAAGTTGAAGATGGCATTTC	9027.12	9026.95	35
36	H51_77-90_137-150	28	AAAGCCAGTCGGTAACATCAAGGAAGAT	9362.27	9362.13	36
37	H51_74-88_131-145	30	CAGTCGGTAAGTTCTATCAAGGAAGATGGC	10045.48	10045.48	37
38	H51_77-91_134-148	30	AGCCAGTCGGTAAGTAACATCAAGGAAGAT	10047.50	10047.18	38
39	H51_77-91_139-150	27	AAAGCCAGTCGGTAACATCAAGGAAGAT	9032.16	9032.47	39
40	H51_69-82_132-145	28	CAGTCGGTAAGTTCGAAGATGGCATTTC	9342.23	9342.41	40
41	H51_77-89_137-150	27	AAAGCCAGTCGGTACATCAAGGAAGAT	9023.15	9023.88	41
42	H51_70-81_128-142	27	TCGGTAAGTTCTGTCAAGATGGCATT	8993.10	8993.92	42
43	H51_68-81_134-146	27	CCAGTCGGTAAGTAAGATGGCATTCT	8987.11	8987.53	43
44	H51_77-88_128-142	27	TCGGTAAGTTCTGTCATCAAGGAAGAT	9011.12	9011.04	44
45	H51_72-86-131-142	27	TCGGTAAGTTCTCAAGGAAGATGGCAT	9036.13	9036.50	45
46	H51_73-87_131-143	28	GTCGGTAAGTTCTTCAAGGAAGATGGCA	9391.25	9391.64	46
47	H51_73-88_131-142	28	TCGGTAAGTTCTATCAAGGAAGATGGCA	9375.25	9375.16	47
48	H51_78-90_132-145	27	CAGTCGGTAAGTTCACATCAAGGAAGA	9014.14	9014.43	48
49	H51_77-92_131-141	27	CGGTAAGTTCTCAACATCAAGGAAGAT	8989.13	8988.67	49
50	H51_77-89_131-143	26	GTCGGTAAGTTCTCATCAAGGAAGAT	8681.01	8680.23	50
51	H51_77-91_135-146	27	CCAGTCGGTAAGAACATCAAGGAAGAT	9023.15	9022.73	51
52	H51_77-91_137-149	28	AAGCCAGTCGGTAACATCAAGGAAGAT	9362.27	9362.60	52
53	H51_76-89_130-142	27	TCGGTAAGTTCTGCATCAAGGAAGATG	9036.13	9036.49	53
54	H51_71-85_131-142	27	TCGGTAAGTTCTAAGGAAGATGGCATT	9051.13	9051.24	54
55	H51_71-87_131-142	29	TCGGTAAGTTCTTCAAGGAAGATGGCATT	9696.35	9696.96	55
56	H51_74-89_141-152	28	AGAAAGCCAGTCCATCAAGGAAGATGGC	9363.26	9363.78	56
57	H51_77-91_132-144	28	AGTCGGTAAGTTCAACATCAAGGAAGAT	9368.26	9368.63	57
58	H51_77-91_133-146	29	CCAGTCGGTAAGTTAACATCAAGGAAGAT	9683.37	9683.05	58
59	H51_77-91_131-144	29	AGTCGGTAAGTTCTAACATCAAGGAAGAT	9698.37	9698.22	59
60	H51_77-91_134-146	28	CCAGTCGGTAAGTAACATCAAGGAAGAT	9353.26	9353.46	60
61	H51_74-89_131-142	28	TCGGTAAGTTCTCATCAAGGAAGATGGC	9351.24	9351.27	61
62	H51_77-91_136-148	28	AGCCAGTCGGTAAACATCAAGGAAGAT	9362.27	9362.95	62
63	H51_-2-12_127-142	30	TCGGTAAGTTCTGTCTCTGAGTAGGAGCT	9994.43	9995.15	63
64	H51_128-141_6-18	27	TAACAGTCTGAGTCGGTAAGTTCTGTC	8978.10	8978.67	64
65	H51_8-20_128-141	27	CGGTAAGTTCTGTCAGTAACAGTCTGA	8987.11	8987.52	65

[Таблица 3-3]

66	H51_4-16_128-141	27	CGGTAAGTTCTGTCACAGTCTGAGTAG	9003.11	9003.22	66
67	H51_6-17_127-141	27	CGGTAAGTTCTGTCCAACAGTCTGAGT	8963.09	8963.28	67
68	H51_5-15_128-142	26	TCGGTAAGTTCTGTCCAGTCTGAGTA	8638.98	8638.76	68
69	H51_5-16_129-142	26	TCGGTAAGTTCTGTACAGTCTGAGTA	8663.99	8633.39	69
70	H51_6-16_128-142	26	TCGGTAAGTTCTGTCACAGTCTGAGT	8638.98	8638.34	70
71	H51_5-17_129-142	27	TCGGTAAGTTCTGTAAACAGTCTGAGTA	9002.11	9002.21	71
72	H51_6-17_128-142	27	TCGGTAAGTTCTGTCAACAGTCTGAGT	8978.10	8978.75	72
73	H51_6-18_129-142	27	TCGGTAAGTTCTGTAAACAGTCTGAGT	8993.10	8993.63	73
74	H51_2-12_128-142	26	TCGGTAAGTTCTGTCTCTGAGTAGGA	8678.99	8679.82	74
75	H51_2-11_128-142	25	TCGGTAAGTTCTGTCTGAGTAGGA	8348.74	8348.88	75
76	H51_-1-13_131-142	26	TCGGTAAGTTCTGTCTGAGTAGGAGC	8704.00	8703.95	76
77	H51_5-15_128-141	25	CGGTAAGTTCTGTCCAGTCTGAGTA	8308.87	8308.76	77
78	H51_4-13_131-142	22	TCGGTAAGTTCTGTCTGAGTAG	7339.53	7339.90	78
79	H51_-3-7_128-142	25	TCGGTAAGTTCTGTCTGAGTAGGAGCTA	8348.88	8348.60	79
80	H51_-2-9_129-142	25	TCGGTAAGTTCTGTGAGTAGGAGCT	8388.89	8388.22	80
81	H51_2-11_127-141	25	CGGTAAGTTCTGTCCCTGAGTAGGA	8333.88	8333.90	81
82	H51_-2-13_127-138	27	TAAGTTCTGTCCGTCTGAGTAGGAGCT	8994.10	8994.30	82
83	H51_-7-7_128-141	28	CGGTAAGTTCTGTCTGAGTAGGAGCTAAAAT	9366.24	9366.55	83
84	H51_-3-11_120-133	28	TCTGTCCAAGCCCGCTGAGTAGGAGCTA	9288.21	9288.36	84
85	H51_6-18_128-141	27	CGGTAAGTTCTGTCTAACAGTCTGAGT	8978.10	8978.58	85
86	H51_-1-15_125-136	28	AGTTCTGTCCAACAGTCTGAGTAGGAGC	9327.22	9326.72	86
87	H51_-1-12_125-138	27	TAAGTTCTGTCCAATCTGAGTAGGAGC	8987.11	8987.28	87
88	H51_6-17_128-141	26	CGGTAAGTTCTGTCAACAGTCTGAGT	8647.99	8648.53	88
89	H51_6-18_130-142	26	TCGGTAAGTTCTGTAAACAGTCTGAGT	8662.99	8663.19	89
90	H51_73-87_127-141	30	CGGTAAGTTCTGTCTCAAGGAAGATGGCA	10021.94	10021.47	90
91	H51_70-82_128-142	28	TCGGTAAGTTCTGTGCAAGATGGCATTT	9348.22	9348.21	91
92	H51_69-81_128-141	27	CGGTAAGTTCTGTCAAGATGGCATTT	8978.10	8978.55	92
93	H51_70-82_127-141	28	CGGTAAGTTCTGTCCGAAGATGGCATTT	9333.22	9333.36	93

[0103]

[Пример 2: Тест на активность вырезания экзонов антисмыслового олигомера]

Тест in vitro на вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека

(1) Метод тестирования

С использованием набора Nucleofector Kit L и Nucleofector II Amaha Cell Line (Lonza), от 0,3 до 120 мкМ каждого антисмыслового олигомера, представленного в Таблицах 1 и 2, трансфицировали в $3,5 \times 10^5$ клеток RD (линии клеток рабдомиосаркомы человека, CCL-136, приобретенной в АТСС). Импульсная программа, используемая для трансфекции, представляет собой T-030.

[0104]

После трансфекции, клетки RD культивировали в течение трех ночей в 2 мл минимальной поддерживающей среды Игла (EMEM) (Sigma, далее то же самое), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (Invitrogen) в условиях 37°C и 5% CO₂.

Культивируемые клетки RD один раз промывали PBS (Nissui, далее то же самое) и к этим клеткам добавляли 350 мкл буфера RA1 (Takara Bio Inc.), содержащего 1% 2-меркаптоэтанола (Nacalai Tesque, Inc.). После выдерживания клеток при комнатной температуре в течение нескольких минут для их лизиса, лизат собирали на фильтре NucleoSpin (зарегистрированный торговый знак) (Takara Bio Inc.). Гомогенат получали центрифугированием при $11000 \times g$ в течение 1 минуты. Общую РНК экстрагировали из этого гомогената в соответствии с протоколом, прилагаемым к набору для выделения РНК NucleoSpin (зарегистрированный торговый знак) (Takara Bio Inc.). Концентрацию общей выделенной РНК определяли с использованием NanoDrop ONE (Thermo Fisher Scientific Inc.).

[0105]

Одностадийную ОТ-ПЦР проводили с использованием 400 нг выделенной общей РНК с использованием набора для проведения одностадийной ОТ-ПЦР QIAGEN (Qiagen) и термоячейки. Реакционный раствор приготавливали в соответствии с протоколом, прилагаемым к набору. В качестве термоячейки использовали TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch (Takara Bio Inc.). ОТ-ПЦР проводили в соответствии со следующей программой.

50°C, 30 минут: реакция обратной транскрипции

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

[94°C, 30 секунд; 60°C, 30 секунд; 72°C, 1 минута] \times 35 циклов: ПЦР-амплификация

72°C, 10 минут: конечное удлинение.

[0106]

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

Прямой праймер: 5'-CTGAGTGGGAAGGCGGTAAAC-3' (SEQ ID NO: 95).

Обратный праймер: 5'-GAAGTTTCAGGGCCAAGTCA-3' (SEQ ID NO: 96).

[0107]

Продукт реакции, 1 мкл указанного выше ПЦР-продукта, анализировали с использованием биоанализатора (Agilent Technologies, Inc.) или MultiNA (Shimadzu Corp.).

Уровень полинуклеотидов в полосе, показывающий, что экзон 51 был вырезан (уровень полинуклеотидов «А»), и уровень полинуклеотидов в полосе, показывающий, что экзон 51 не был вырезан (уровень полинуклеотидов «В»), оценивали как интенсивность сигналов полос. На основании этих оценок значений «А» и «В», эффективность вырезания определяли по уравнению (1), представленному выше.

[0108]

(2) Результаты испытаний

На фиг. 1-18 показаны результаты эффективности вырезания экзона 51, полученные для каждого антисмыслового олигомера. Антисмысловый олигомер,

показанный в Таблице 2 (РМО № 94 (SEQ ID NO: 94)), который имел такую же последовательность оснований, как и лекарственное средство этеплирсен, вырезающее экзон 51 (WHO Drug Information 24, 2, 137-139 (2010), предлагаемый список INN 103), и который имел такую же 5'-концевую модификацию, где 5'-конец имел группу (1), описанную выше; и таким образом, по своей структуре в целом был таким же, был синтезирован в соответствии со способом, описанным в выложенной патентной заявке Японии № 2015-91229, и использовался в качестве прямого или косвенного сравнительного контроля.

Антисмысловые олигомеры согласно изобретению, представленные в Таблице 1, имели значительно более высокую эффективность вырезания, чем антисмысловой олигомер, представленный в Таблице 2, который по своей структуре в целом был таким же, как этеплирсен. Антисмысловые олигомеры согласно изобретению с очень высокой эффективностью вырезали экзон 51.

[Таблица 4]

Таблица 2: Синтезированный антисмысловой олигомер (РМО No. 94), имеющий такую же последовательность оснований и 5'-концевую модификацию, как и этеплирсен

РМО О №.	Последовательность оснований-мишеней	Полная длина	Последовательность оснований РМО	Молекулярная масса		SEQ ID NO
				Теоретическое значение	Найденное значение	
94	H51_66-95	30	CTCCAACATCAAGGA AGATGGCATTCTAG	10300,59	10300,43	94

[0109]

[Пример 3: Тест на растворимость антисмыслового олигомера]

Тест на растворимость антисмыслового олигомера в физиологическом растворе

Каждый антисмысловой олигомер РМО №№ 7, 8, 10, 16, 21, 24, 31, 42, 67, 76 и 90 с очень высокой эффективностью вырезания в примере 2 тестировали на его растворимость в физиологическом растворе для дополнительного подтверждения возможности его применения в медицинских целях.

[0110]

(1) Метод тестирования

57 мкл воды для инъекций добавляли в бутылку с образцом, содержащую 5,7 мг каждого указанного выше антисмыслового олигомера, который затем растворяли с помощью ультразвуковых волн и путем вихревого перемешивания. Затем добавляли 57 мкл 2 × физиологического раствора и подвергали вихревому перемешиванию для получения 50 мг/мл физиологического раствора. Раствор оставляли на 24 часа при комнатной температуре и визуально подтверждали присутствие или отсутствие осадка в растворе, которому давали отстояться. Антисмысловой олигомер, который не давал осадка, оценивали как обладающий высокой растворимостью.

[0111]

(2) Результаты испытаний

Среди всех протестированных антисмысловых олигомеров, каждый антисмысловый олигомер РМО №№ 7, 8, 10, 16, 21, 24, 31, 42, 67 и 76 обладал растворимостью, равной или превышающей 50 мг/мл в физиологическом растворе.

Исходя из этих результатов было обнаружено, что эти антисмысловые олигомеры являются антисмысловыми олигомерами, которые обладают высокой эффективностью в качестве лекарственных средств из-за их значительно высокой эффективности вырезания экзона 51, а также из-за их высокой растворимости в физиологическом растворе.

[0112]

[Пример 4: Оценка безопасности антисмыслового олигомера]

Среди антисмысловых олигомеров, протестированных в Примере 3 на их растворимость в физиологическом растворе, каждый антисмысловый олигомер РМО №№ 16, 21, 42 и 90 оценивали на его безопасность для подтверждения его безопасности для медицинского применения.

[0113]

(1) Метод оценки

Каждый антисмысловый олигомер растворяли в физиологическом растворе и вводили в хвостовую вену 6-недельного самца мыши C57BL/6N. На следующий день, у мыши брали сыворотку и определяли значения для аспаргатаминотрансферазы (AST), аланинаминотрансферазы (ALT), азота мочевины крови (BUN) и креатинина в крови. Значения измерений для контрольной группы мышей, которым в качестве среды вводили только физиологический раствор, или мышей, не подвергавшихся обработке, рассматривались как нормальные значения, а поэтому был проведен анализ на статистически значимые различия (t-критерий Стьюдента или критерий Даннета). Если наблюдалось значительное повышение значений с уровнем значимости $p < 0,05$ в группе введения каждого антисмыслового олигомера, то такие значения определяли как выбросы. В каждом тесте использовали систему статистического анализа SAS (зарегистрированный торговый знак, SAS Institute Inc.) версии 9.3. Если не наблюдалось никаких отклонений ни от одного из значений для AST, для ALT, для BUN и для креатинина в дозе 1000 мг/кг, то было установлено, что антисмысловый олигомер имеет высокую степень безопасности.

[0114]

(2) Результаты оценки

Каждый антисмысловый олигомер РМО №№ 16, 21 и 42 не обнаруживал никаких отклонений ни от одного из значений для AST, для ALT, для BUN и для креатинина в дозе 1000 мг/кг, и было подтверждено, что он имеет высокую степень безопасности (в частности, он не оказывает влияния или почти не оказывает влияния на функции почек и печени). Соответствующие результаты показаны на фигурах 19-21. Обнаруженные значения со значительным повышением уровня значимости $p < 0,05$ (выбросы) обозначены значением p.

[0115]

Эти результаты показали, что антисмысловой олигомер согласно изобретению обладает превосходными физическими свойствами и безопасностью в качестве лекарственного средства, и при этом, обладает активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в гене дистрофина с высокой эффективностью.

[Список последовательностей в свободном формате]

[0116]

SEQ ID NO: 1-126: синтетические нуклеиновые кислоты

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антисмысловой олигомер, выбранный из группы, состоящей из нижеуказанных (a1)-(d1):

(a1) антисмыслового олигомера, содержащего последовательность оснований любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93;

(b1) антисмыслового олигомера, который содержит последовательность оснований с делецией, заменой, инсерцией и/или добавлением от 1 до 5 оснований в последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93 и обладает активностью, индуцирующий вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека;

(c1) антисмыслового олигомера, содержащего последовательность оснований, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93, и обладающего активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека; и

(d1) антисмыслового олигомера, который гибридизуется в жестких условиях с олигонуклеотидом, состоящим из последовательности оснований, комплементарной последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93, и обладает активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека (за исключением антисмыслового олигомера, который состоит из последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 90 и 97-126) или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата.

2. Антисмысловой олигомер, выбранный из группы, состоящей из нижеуказанных (e)-(h):

(e) антисмыслового олигомера, состоящего из последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93;

(f) антисмыслового олигомера, который состоит из последовательности оснований с делецией и/или заменой от 1 до 5 оснований в последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93, и обладает активностью, индуцирующий вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека;

(g) антисмыслового олигомера, состоящего из последовательности оснований, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93, и обладающего активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека; и

(h) антисмыслового олигомера, который гибридизуется в жестких условиях с олигонуклеотидом, состоящим из последовательности оснований, комплементарной последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93, и обладает активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека (за исключением антисмыслового олигомера, который состоит из последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 90 и 97-126) или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата.

3. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат

по п. 1 или 2, где антисмысловой олигомер представляет собой:

антисмысловой олигомер, имеющий нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 1-89 и 91-93, и обладающий активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека.

4. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат по п. 1, где антисмысловой олигомер представляет собой антисмысловой олигомер, выбранный из группы, состоящей из:

(a2) антисмыслового олигомера, содержащего последовательность оснований любой из SEQ ID NO: 7, 8, 10, 16, 21, 24, 31, 42, 67 и 76;

(b2) антисмыслового олигомера, который содержит последовательность оснований с делецией, заменой, инсерцией и/или добавлением от 1 до 5 оснований в последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 7, 8, 10, 16, 21, 24, 31, 42, 67 и 76, и обладает активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека;

(c2) антисмыслового олигомера, содержащего последовательность оснований, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 7, 8, 10, 16, 21, 24, 31, 42, 67 и 76, и обладает активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека; и

(d2) антисмыслового олигомера, который гибридизуется в жестких условиях с олигонуклеотидом, состоящим из последовательности оснований, комплементарной последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 7, 8, 10, 16, 21, 24, 31, 42, 67 и 76, и обладает активностью, индуцирующей вырезание экзона 51 в гене дистрофина человека.

5. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат по любому из пп. 1-4, где антисмысловой олигомер представляет собой олигонуклеотид.

6. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат по п. 5, где сахарная часть и/или часть фосфатной связи по меньшей мере одного нуклеотида, составляющего олигонуклеотид, являются модифицированными.

7. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат по п. 5 или 6, где сахарная часть по меньшей мере одного нуклеотида, входящего в состав олигонуклеотида, представляет собой рибозу, в которой группа 2'-ОН заменена любой группой, выбранной из группы, состоящей из OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br и I (где R представляет собой алкил или арил, а R' представляет собой алкилен).

8. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат по любому из пп. 5-7, 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.

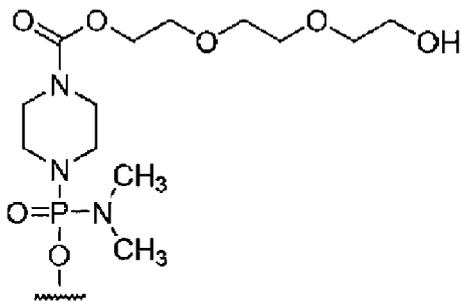
9. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат по любому из пп. 1-4, где антисмысловой олигомер представляет собой морфолино-

олигомер.

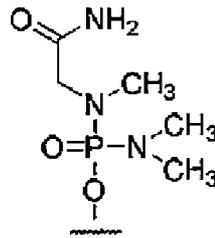
10. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат по п. 9, где антисмысловой олигомер представляет собой фосфородиамидатный морфолино-олигомер.

11. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат по п. 9 или 10, где 5'-конец представляет собой любую из химических формул (1)-(3), представленных ниже:

[Формула 1]



(1)



(2)



(3)

12. Фармацевтическая композиция для лечения мышечной дистрофии, содержащая антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат по любому из пп. 1-11.

13. Фармацевтическая композиция по п. 12, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

14. Фармацевтическая композиция по п. 12 или 13 для введения пациенту с мышечной дистрофией, где указанным пациентом является пациент с мутацией, которая способствует вырезанию экзона 51 в гене дистрофина.

15. Фармацевтическая композиция по п. 14, где у пациента присутствует ген дистрофина, который имеет по меньшей мере одну мутацию со сдвигом рамки считывания, вызванную делецией экзона вблизи экзона 51, и где рамка считывания аминокислот скорректирована путем вырезания экзона 51.

16. Фармацевтическая композиция по п. 14 или 15, где у пациента имеется мутация со сдвигом рамки считывания, вызванная делециями экзонов 13-50, 29-50, 40-50, 43-50, 45-50, 47-50, 48-50, 49-50, 50, 52 или 52-63 в гене дистрофина.

17. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 14-16, где пациентом является человек.

18. Применение антисмыслового олигомера или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата по любому из пп. 1-11 в целях приготовления лекарственного средства для лечения мышечной дистрофии.

19. Способ лечения мышечной дистрофии, включающий введение пациенту с мышечной дистрофией эффективного количества антисмыслового олигомера или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата по любому из пп. 1-11, или

фармацевтической композиции по любому из пп. 12-16.

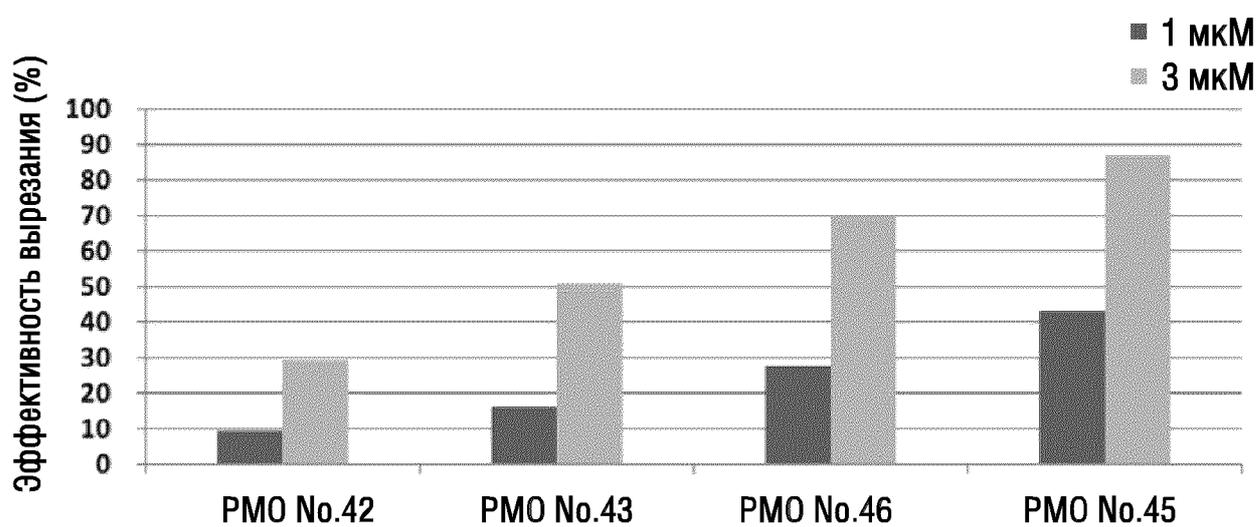
20. Способ лечения по п. 19, где пациентом является человек.

21. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат по любому из пп. 1-11, или фармацевтическая композиция по любому из пп. 12-16 для применения в целях лечения мышечной дистрофии.

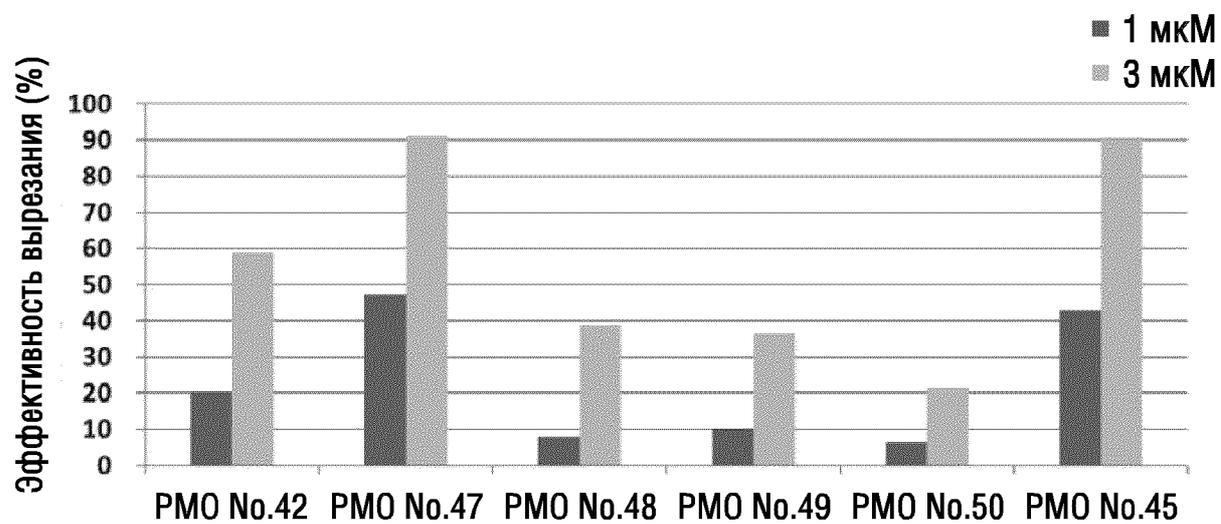
22. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат или фармацевтическая композиция по п. 21, где подвергаемым лечению пациентом с мышечной дистрофией является человек.

По доверенности

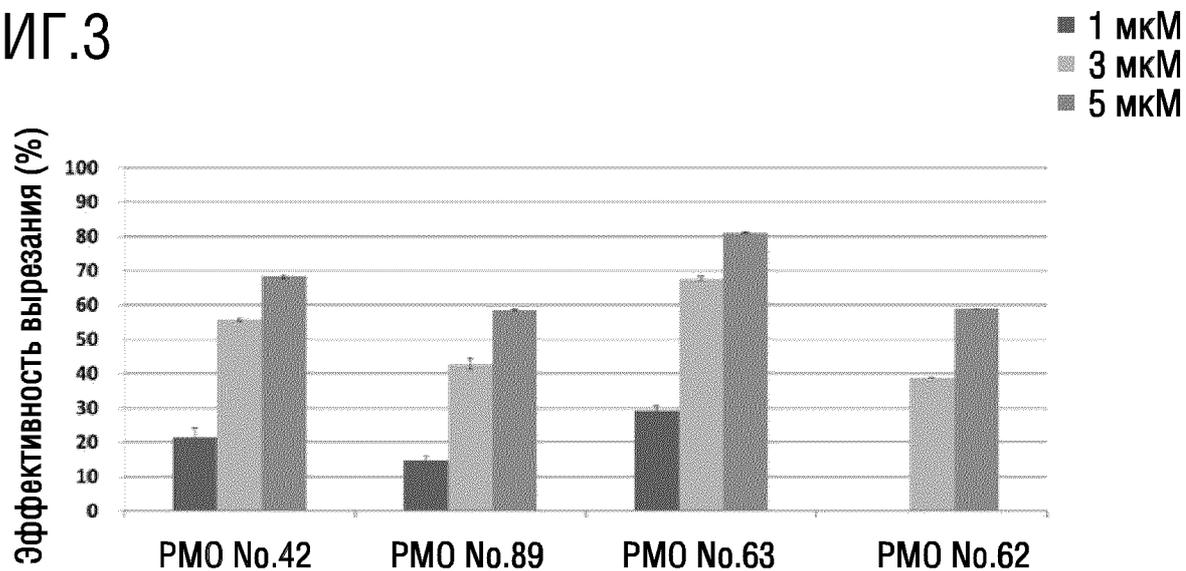
ФИГ.1



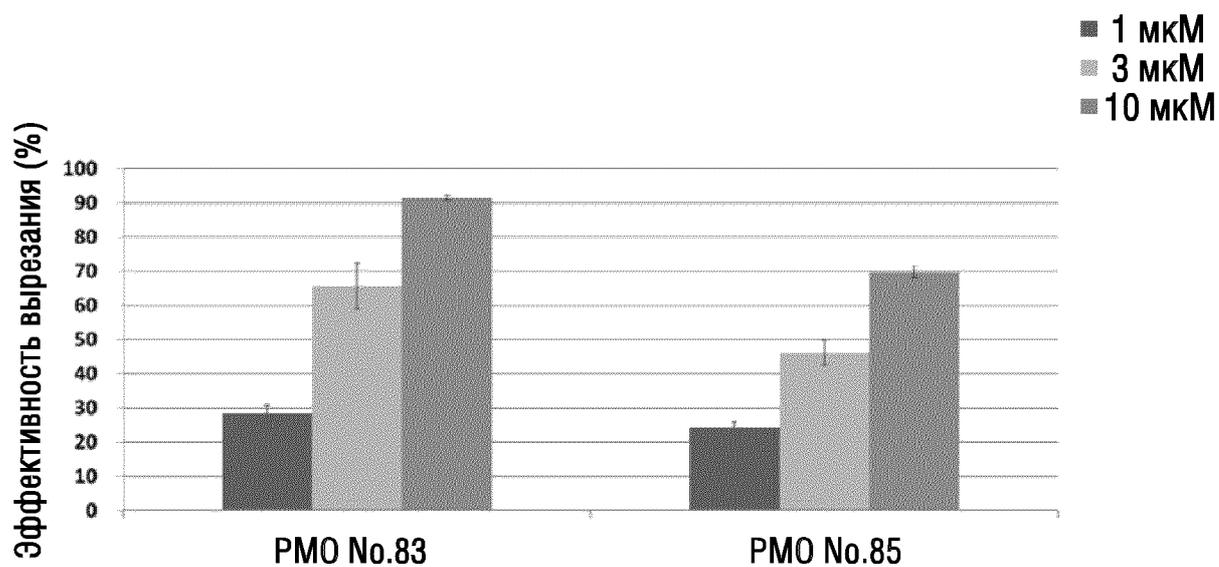
ФИГ.2



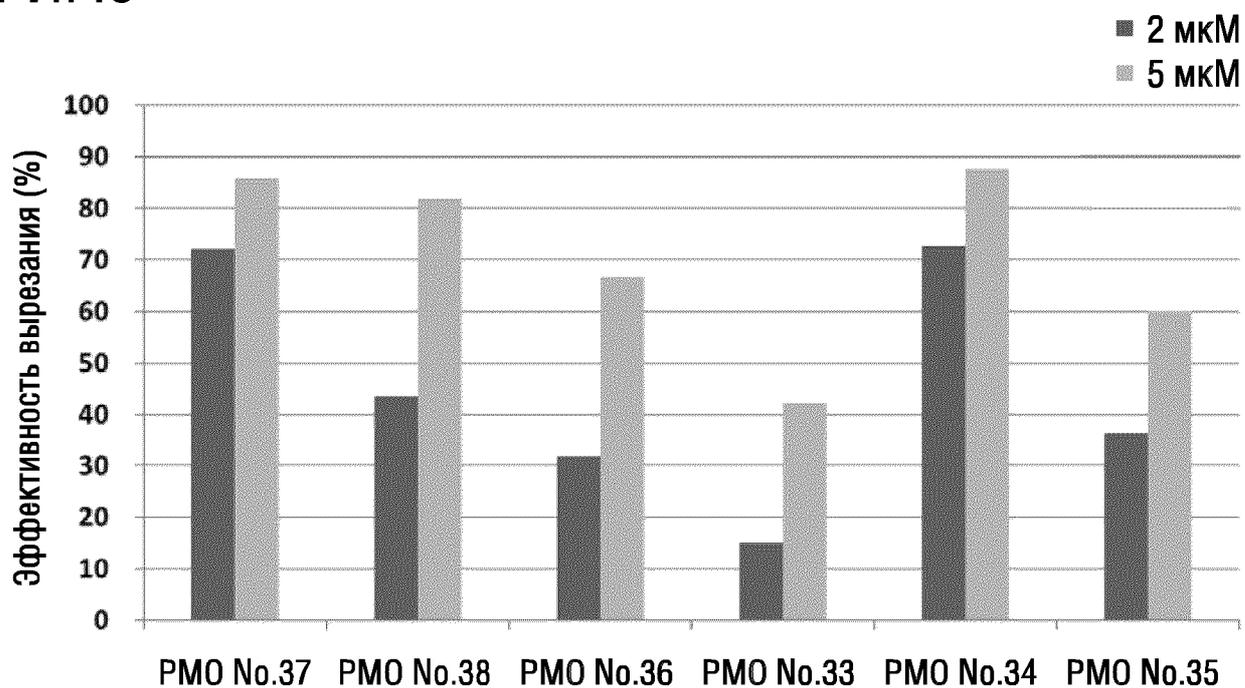
ФИГ.3



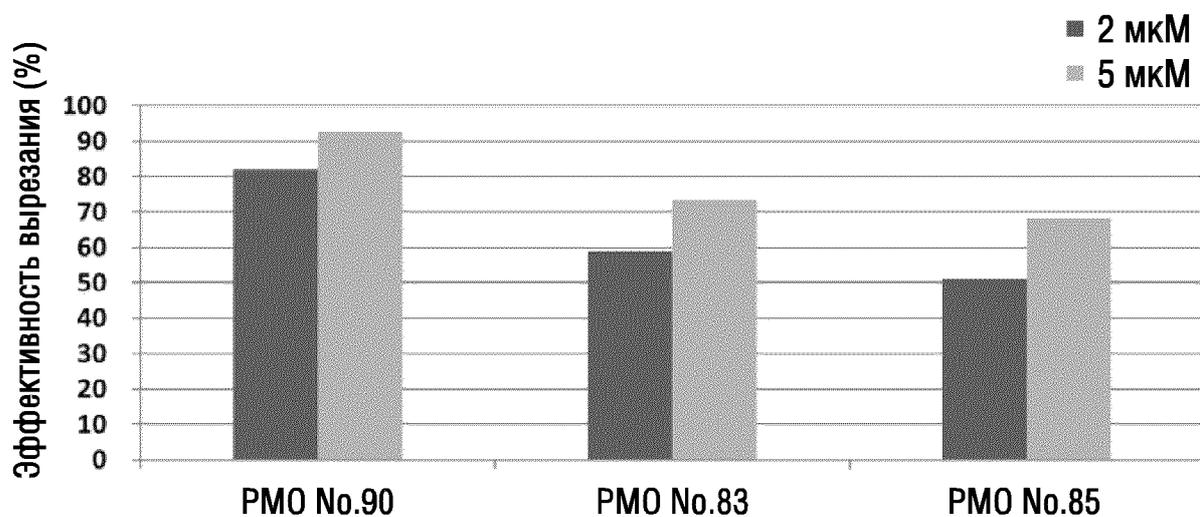
ФИГ.4



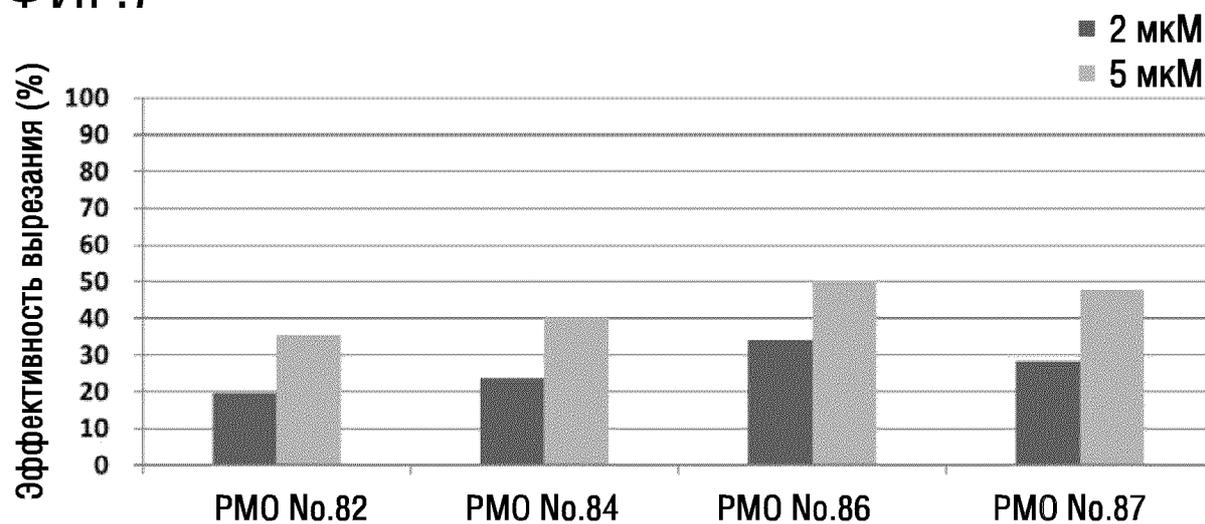
ФИГ.5



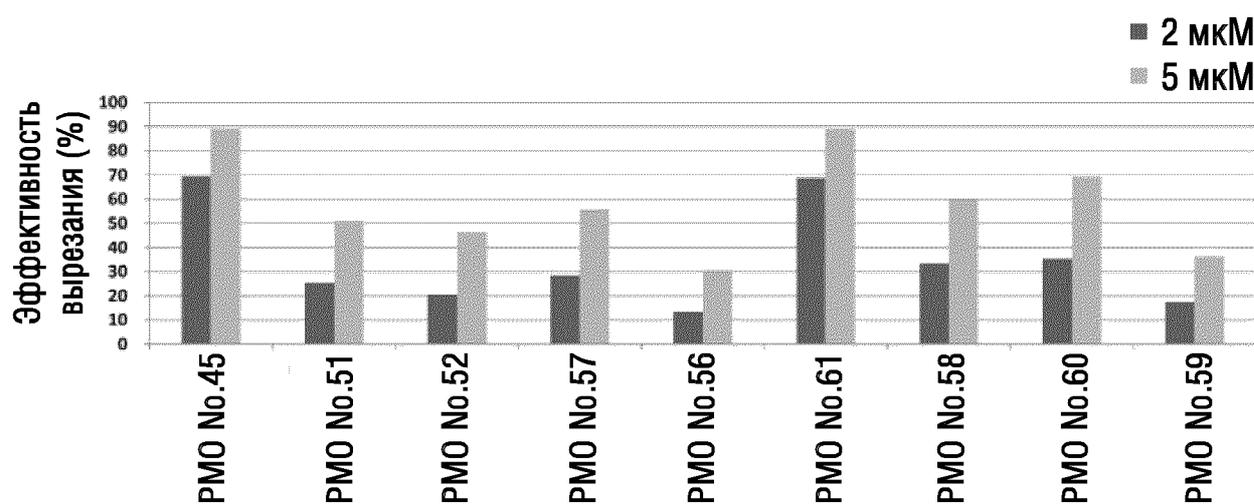
ФИГ.6



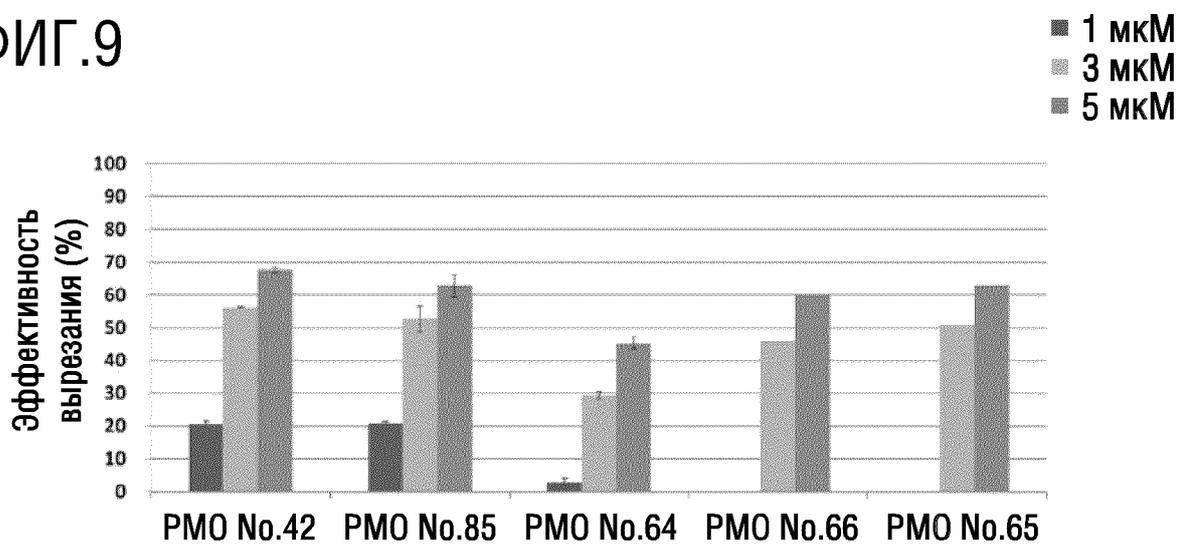
ФИГ.7



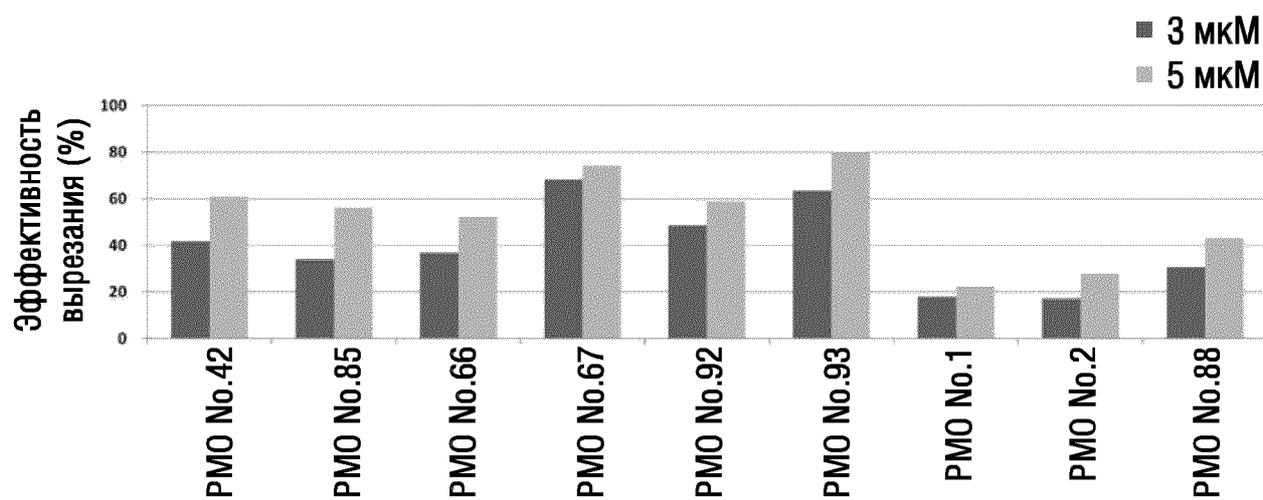
ФИГ.8



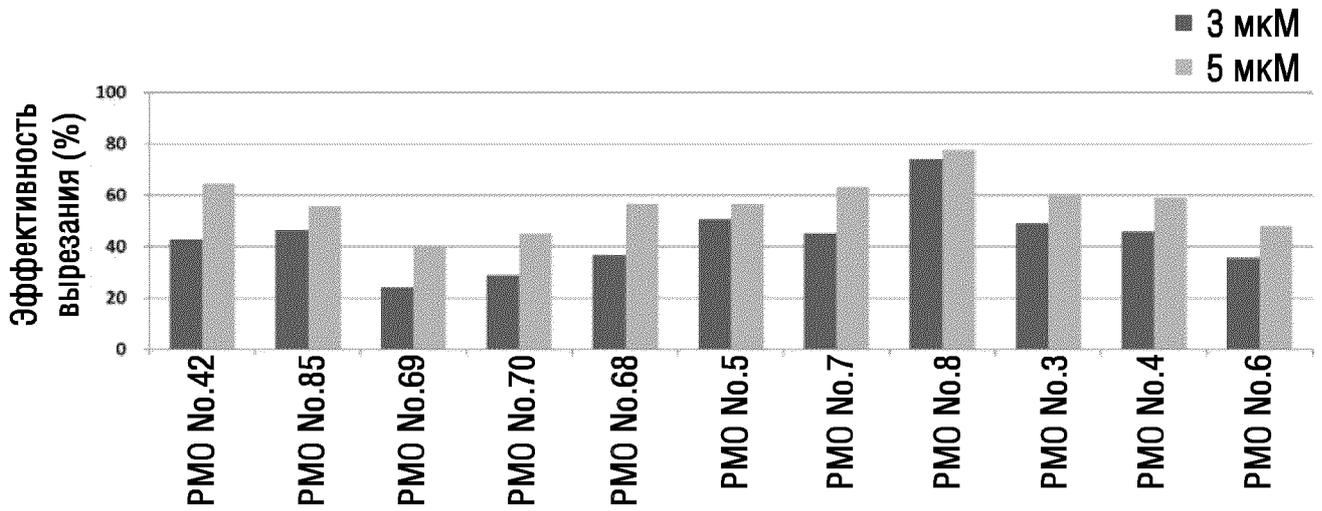
ФИГ.9



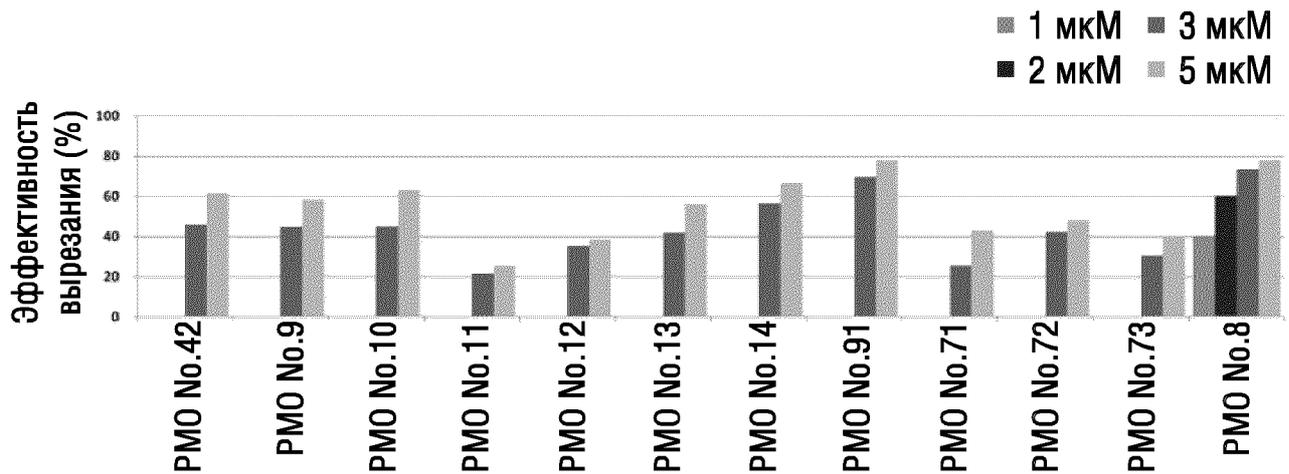
ФИГ.10



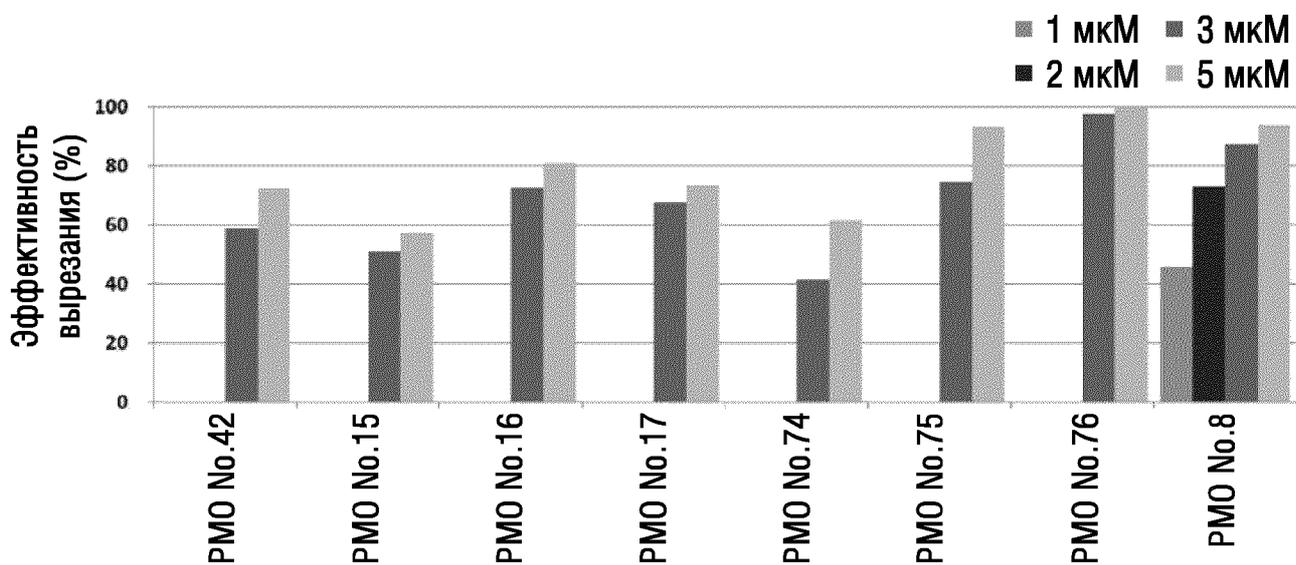
ФИГ.11



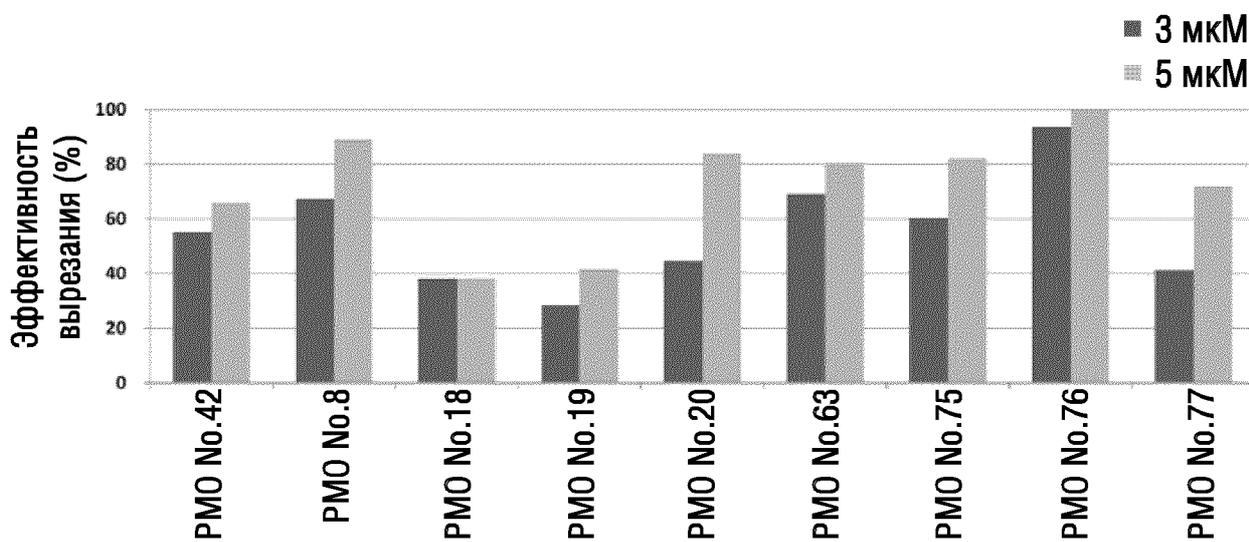
ФИГ.12



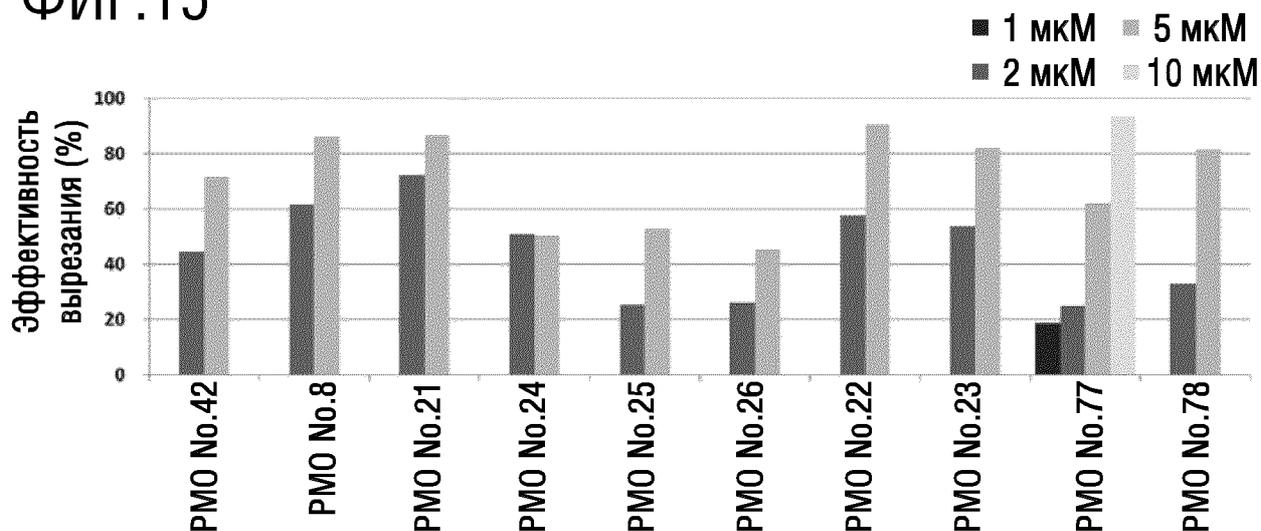
ФИГ.13



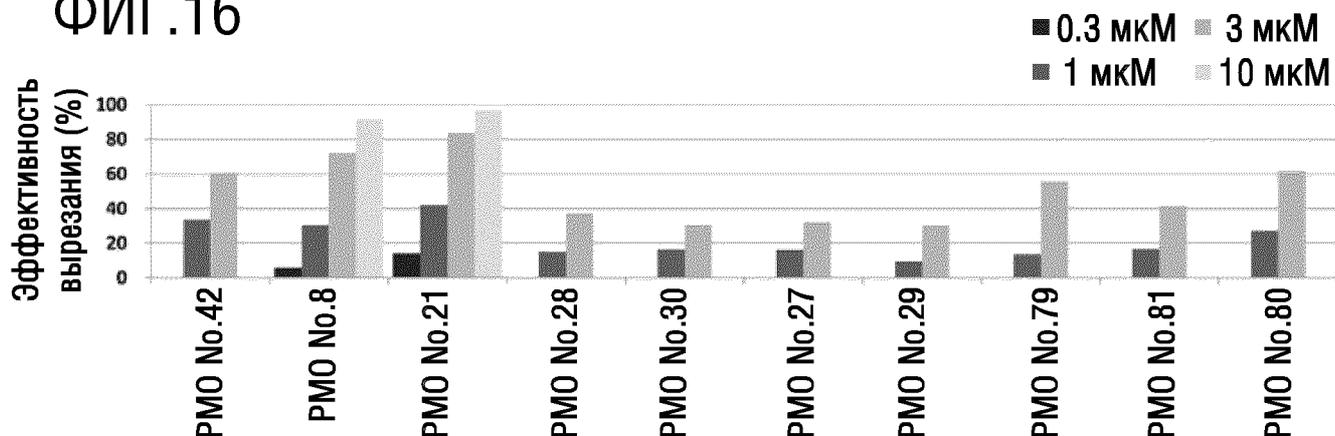
ФИГ.14



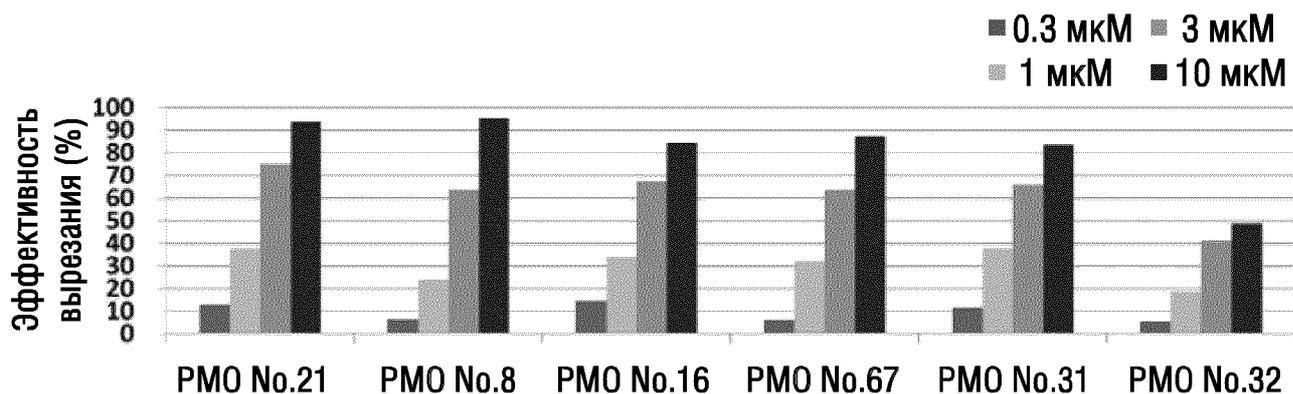
ФИГ.15



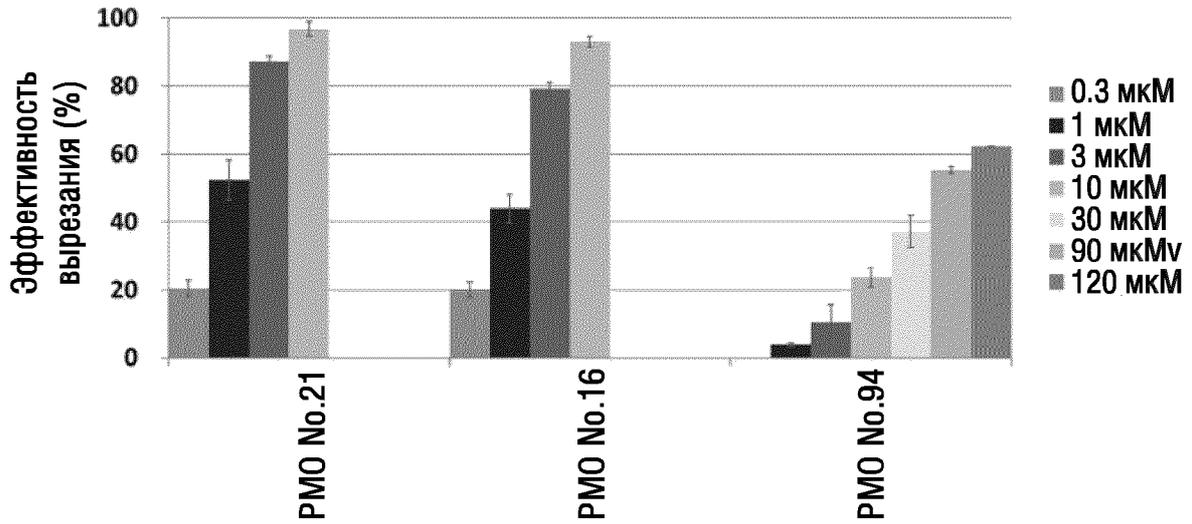
ФИГ.16



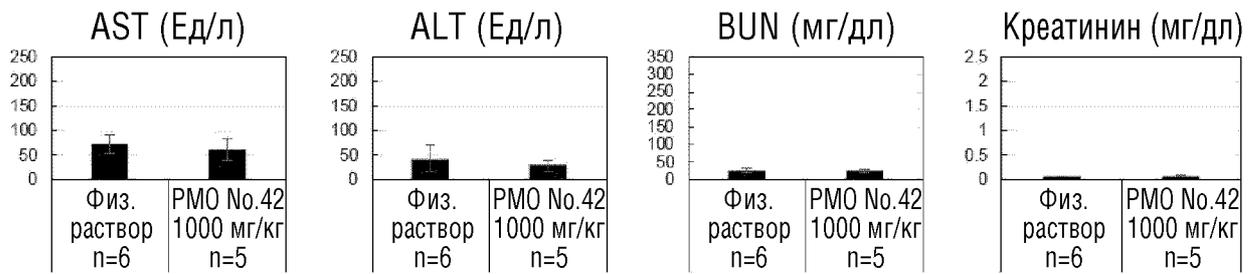
ФИГ.17



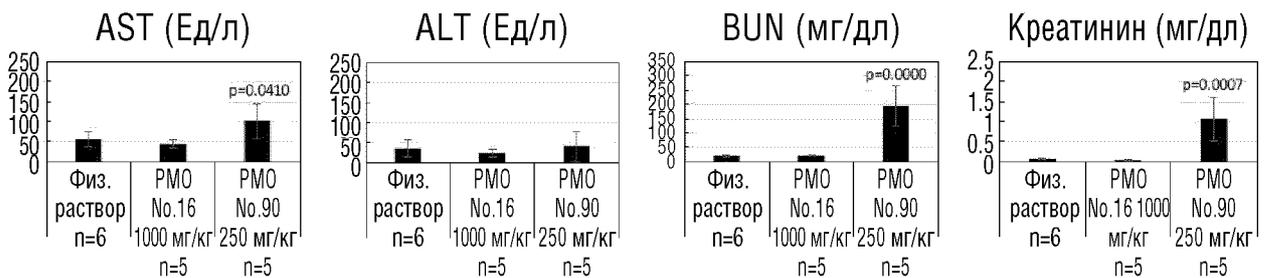
ФИГ.18



ФИГ.19



ФИГ.20



ФИГ.21

