

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042313**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.02.02

(51) Int. Cl. *A61K 48/00* (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)

(21) Номер заявки
201892366

(22) Дата подачи заявки
2017.04.17

(54) **АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОМЕРЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ
ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ С ГЕНОМ КИСЛОЙ АЛЬФА-
ГЛЮКОЗИДАЗЫ**

(31) **62/324,185**

(56) WO-A2-2016138534

(32) **2016.04.18**

WO-A1-2015190922

(33) **US**

WO-A1-2015179741

(43) **2019.03.29**

US-A1-20140017212

(86) **PCT/US2017/028002**

US-A1-20150197534

(87) **WO 2017/184529 2017.10.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**САРЕПТА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)**

(72) Изобретатель:
Шнелль Фредерик Джозеф (US)

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

(57) Изобретение относится к модифицированным антисмысловым олигонуклеотидам. Нуклеотиды, описанные в настоящем изобретении, состоят из 10-40 нуклеиновых оснований и содержат нацеливающую последовательность, комплементарную области-мишени в интроне 1 пре-мРНК гена человеческой альфа-гликозидазы (GAA). Область-мишень содержит по меньшей мере одно дополнительное нуклеиновое основание по сравнению с нацеливающей последовательностью, где по меньшей мере одно дополнительное нуклеиновое основание не имеет комплементарного нуклеинового основания в нацеливающей последовательности и где по меньшей мере одно дополнительное нуклеиновое основание является внутренним к области-мишени.

B1

042313

042313
B1

Область техники

Изобретение относится к антисмысловым олигомерам и родственным композициям и способам стимулирования включения экзона в качестве терапии болезни накопления гликогена II типа (GSD-II) (также известной как болезнь Помпе, гликогеноз II, дефицит кислой мальтазы (AMD), дефицит кислой альфа-гликозидазы и дефицит лизосомальной альфа-гликозидазы), и более конкретно относится к стимулированию включения экзона 2 и посредством этого восстановлению уровня ферментативно активного белка, кислой альфа-глюкозидазы (GAA), кодируемого геном GAA.

Описание родственного уровня техники

Альтернативный сплайсинг увеличивает кодирующий потенциал генома человека синтезом с одного гена множества белков. Нарушенный альтернативный сплайсинг также связан с возрастающим количеством заболеваний человека.

GSD-II представляет собой врожденное аутосомно-рецессивную лизосомальную болезнь накопления, вызванную дефицитом фермента, называемого кислой альфа-глюкозидазой (GAA). Роль GAA в теле заключается в расщеплении гликогена. Пониженные или отсутствующие уровни активности GAA приводят к накоплению гликогена в поврежденных тканях, включая сердце, скелетные мышцы (включая мышцы, вовлеченные в дыхание), печень и нервную систему. Считают, что данное накопление гликогена вызывает прогрессирующую мышечную слабость и дыхательную недостаточность у индивидов с GSD-II. GSD-II может возникать у младенцев, детей или взрослых, и прогнозы варьируются в зависимости от времени возникновения и тяжести симптомов. Клинически, GSD-II может проявляться с широким и непрерывным спектром тяжести в диапазоне от тяжелой (детской) до более мягкой формы при позднем возникновении у взрослых. Пациенты, в конце концов, умирают от дыхательной недостаточности. Имеется хорошая корреляция между тяжестью заболевания и остаточной активностью кислой альфа-глюкозидазы, причем активность составляет 10-20% от нормы при позднем возникновении и менее чем 2% при ранних формах возникновения заболевания. Оценено, что от GSD-II страдает приблизительно 5000-10000 человек по всему миру.

Самой распространенной мутацией, связанной с формой возникновения заболевания у взрослых, является IVS1-13T>G. Обнаруживаемая у двух третьих пациентов с GSD-II, возникшей во взрослом возрасте, данная мутация может придавать преимущество при отборе гетерозиготным индивидам или представляет собой очень старую мутацию. Широкие этнические вариации индивидов с GSD-II, возникшей во взрослом возрасте, с данной мутацией опровергают общего родоначальника.

Ген GAA состоит из 20 экзонов, охватывающих примерно 20 т.о. 3,4 т.о. мРНК кодирует белок с молекулярным весом приблизительно 105 кДа. Мутация IVS1-13T>G ведет к потере экзона 2 (577 оснований), который содержит AUG кодон инициации.

Лечение GSD-II включает стратегии лечения лекарственными средствами, подбор диеты и пересадку костного мозга без заметного успеха. В последние годы ферментозаместительная терапия (ERT) дает новую надежду пациентам с GSD-II. Например, Myozyme®, лекарственное средство, представляющее собой рекомбинантный GAA белок, получило одобрение для применения на пациентах с GSD-II заболеванием в 2006 и в США и в Европе. Myozyme® зависит от манноза-6-фосфатаз (M6P) на поверхности белка GAA для доставки в лизосомы.

Антисмысловую технологию, применяемую в основном для подавления РНК, недавно приспособили для изменения процесса сплайсинга. Процессинг первичных генных транскриптов (пре-мРНК) многих генов включает удаление интронов и точный сплайсинг экзонов, где донорный сайт сплайсинга соединен с акцепторным сайтом сплайсинга. Сплайсинг представляет собой точный процесс, включающий координированное узнавание донорного и акцепторного сайтов сплайсинга, и точки разветвления (в направлении к 5'-концу от акцепторного сайта сплайсинга) с балансом положительных усилителей сплайсинга экзонов (преимущественно локализованных в экзоне) и негативных мотивов сплайсинга (сайленсеры сплайсинга локализованы преимущественно в интронах).

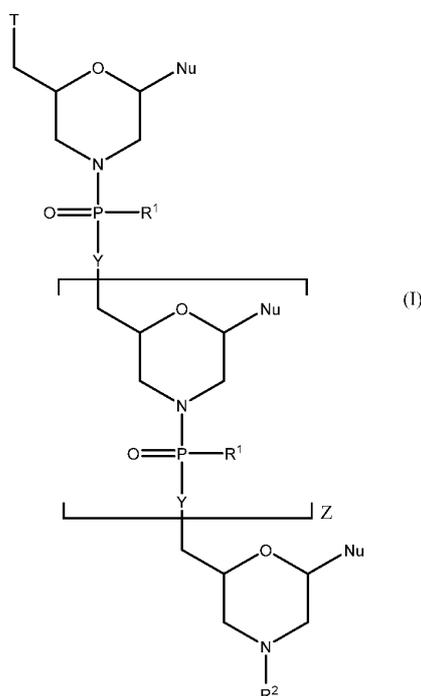
Эффективные агенты, которые могут изменять сплайсинг GAA пре-мРНК, вероятно, будут пригодными терапевтически для улучшенного лечения GSD-II.

Сущность изобретения

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к модифицированному антисмысловому олигонуклеотиду из 10-40 нуклеиновых оснований. Модифицированный антисмысловый олигонуклеотид содержит нацеливающую последовательность, комплементарную области-мишени в пре-мРНК гена альфа-гликозидазы (GAA) человека (например, в интроне 1 GAA, таком как область-мишень в SEQ ID NO: 1), где область-мишень содержит по меньшей мере одно дополнительное нуклеиновое основание по сравнению с нацеливающей последовательностью, где по меньшей мере одно дополнительное нуклеиновое основание не имеет комплементарного нуклеинового основания в нацеливающей последовательности, и где по меньшей мере одно дополнительное нуклеиновое основание является внутренним к области-мишени. Взаимодействие между областью-мишенью и нацеливающей последовательностью может быть в общем 10 0% комплементарным, но может также включать меньшие степени комплементарности (например, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%). Область-мишень может

содержать по меньшей мере одну из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3. Необязательно, область-мишень может содержать SEQ ID NO: 4. Необязательно, область-мишень может содержать SEQ ID NO: 5. Модифицированный антисмысловой олигонуклеотид может способствовать сохранению экзона 2 в мРНК GAA после связывания нацеливающей последовательности с областью-мишенью. Область-мишень может содержать от одного до трех дополнительных нуклеиновых оснований, по сравнению с нацеливающей последовательностью. Однако более трех дополнительных нуклеиновых оснований может присутствовать в области-мишени. Кроме того, дополнительные нуклеиновые основания можно разделять друг от друга вдоль области-мишени. Модифицированный антисмысловой олигонуклеотид может вызывать, по меньшей мере, двукратную GAA ферментативную активность согласно тесту на определение ферментативной активности по сравнению со вторым антисмысловым олигонуклеотидом, который является полностью комплементарным области-мишени в SEQ ID NO: 1. Модифицированный антисмысловой олигонуклеотид может вызывать, по меньшей мере, трехкратную или, по меньшей мере, четырехкратную GAA ферментативную активность, согласно тесту на определение ферментативной активности, по сравнению со вторым антисмысловым олигонуклеотидом, который является полностью комплементарным области-мишени в SEQ ID NO: 1.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к антисмысловому олигомерному соединению формулы (I)



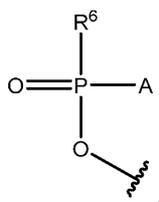
или его фармацевтически приемлемой соли,

где каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность;

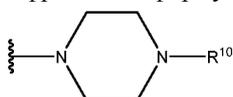
Z представляет собой целое от 8-38;

каждый Y независимо выбран из O и $-NR^4$, где каждый R^4 независимо выбран из H, C_1 - C_6 -алкила, аралкила, $-C(=NH)NH_2$, $C(O)(CH_2)_nNR^5C(=NH)NH_2$, $C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^5C(=NH)NH_2$ и G, где R^5 выбран из H и C_1 - C_6 -алкила и n представляет собой целое от 1 до 5;

T выбран из OH и фрагмента формулы

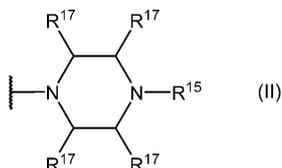


где A выбран из $-OH$, $-N(R^7)_2$ и R^1 , где каждый R^7 независимо выбран из H и C_1 - C_6 -алкила, и R^6 выбран из OH , $-N(R^9)CH_2C(O)NH_2$ и фрагмента формулы

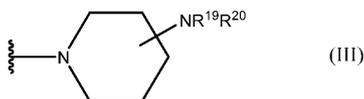


где R^9 выбран из H и C_1 - C_6 -алкила; и

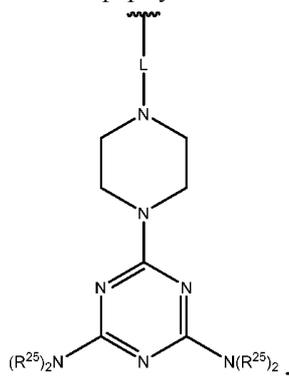
R^{10} выбран из G, $C(O)R^{11}OH$, ацила, тритила, 4 метокситритила, $C(=NH)NH_2$, $C(O)(CH_2)_mNR^{12}C(=NH)NH_2$ и $C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{12}C(=NH)NH_2$, где m представляет собой целое от 1 до 5, R^{11} имеет формулу $-(O-алкил)_y-$, где y представляет собой целое от 3 до 10 и каждая из алкильных групп независимо выбрана из C_2-C_6 алкила; и R^{12} выбран из H и C_1-C_6 -алкила; каждый случай R^1 независимо выбран из $-N(R^{13})_2$, где каждый R^{13} независимо выбран из H и C_1-C_6 -алкила; фрагмента формулы (II)



где R^{15} выбран из H, G, C_1-C_6 -алкила, $C(=NH)NH_2$, $C(O)(CH_2)_qNR^{18}C(=NH)NH_2$, и $C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{18}C(=NH)NH_2$, где R^{18} выбран из H и C_1-C_6 -алкила; и q представляет собой целое от 1 до 5, и каждый R^{17} независимо выбран из H и метила; и фрагмента формулы (III)



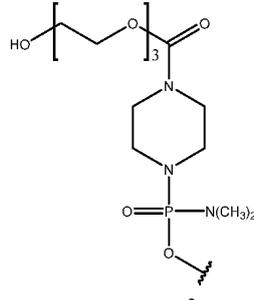
где R^{19} выбран из H, C_1-C_6 -алкила, $C(=NH)NH_2$, $C(O)(CH_2)_rNR^{22}C(=NH)NH_2$, $C(O)CH(NH_2)(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$, $C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{22}C(=NH)NH_2$, $C(O)CH(NH_2)(CH_2)_4NH_2$ и G, где R^{22} выбран из H и C_1-C_6 -алкила; и r представляет собой целое от 1-5, и R^{20} выбран из H и C_1-C_6 -алкила; или R^{19} и R^{20} , вместе с атомом азота, с которым они соединены, образуют гетероциклическое или гетероарильное кольцо, содержащее 5-7 кольцевых атомов и необязательно содержащее дополнительный гетероатом, выбранный из кислорода, азота и серы; и R^2 выбран из H, G, ацила, тритила, 4 метокситритила, бензоила, стеароила, C_1-C_6 -алкила, $C(=NH)NH_2$, $C(O)-R^{23}$, $C(O)(CH_2)_sNR^{24}C(=NH)NH_2$, $C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{24}C(=NH)NH_2$, $C(O)CH(NH_2)(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ и фрагмента формулы



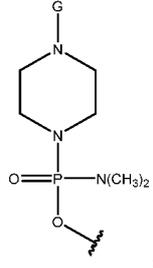
где, R^{23} имеет формулу $-(O-алкил)_v-OH$, где v представляет собой целое от 3-10, и каждая из v алкильных групп независимо выбрана из C_2-C_6 -алкила; и R^{24} выбран из H и C_1-C_6 -алкила; s представляет собой целое от 1 до 5; L выбран из $-C(O)(CH_2)_6C(O)-$ и $C(O)(CH_2)_2S_2(CH_2)_2C(O)-$; и каждый R^{25} имеет формулу $-(CH_2)_2OC(O)N(R^{26})_2$, где каждый R^{26} имеет формулу $-(CH_2)_6NHC(=NH)NH_2$, где G представляет собой проникающий пептид ("CPP") и линкерный фрагмент, выбранный из $C(O)(CH_2)_5NH$ CPP, $C(O)(CH_2)_2NH$ CPP, $C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH$ CPP, $C(O)CH_2NH$ CPP, и

Y представляет собой O при каждом появлении. В некоторых вариантах осуществления, R² выбран из H, G, ацила, тритила, 4 метокситритила, бензоила и стеароила.

В некоторых вариантах осуществления, T имеет формулу

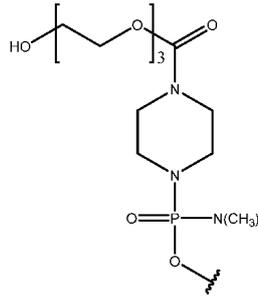


Y представляет собой O при каждом появлении, и R² представляет собой G. В некоторых вариантах осуществления, T имеет формулу



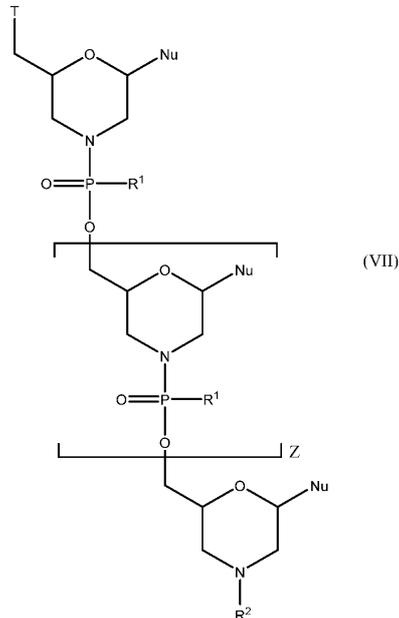
и Y представляет собой O при каждом появлении.

В некоторых вариантах осуществления, T имеет формулу



Y представляет собой O при каждом появлении, каждый R¹ представляет собой -N(CH₃)₂, и R² представляет собой H.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к антисмысловому олигомерному соединению формулы (VII)

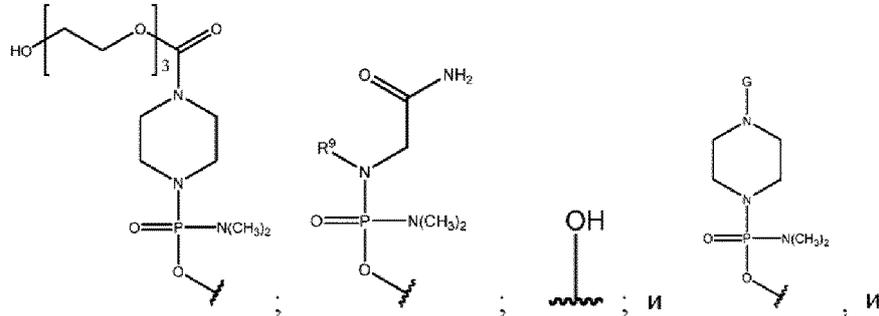


или его фармацевтически приемлемой соли,

где каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность;

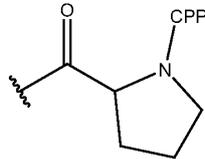
Z представляет собой целое от 8 до 38;

T выбран из

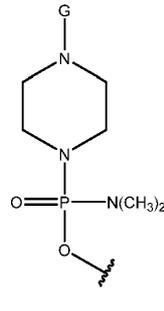


каждый R^1 представляет собой $-N(R^4)_2$, где каждый R^4 независимо представляет собой C_1 - C_6 -алкил; и R^2 выбран из H, G, ацила, тритила, 4 метокситрители, бензоила и стеароила,

где G представляет собой проникающий пептид ("CPP") и линкерный фрагмент, выбранный из $C(O)(CH_2)_5NH$ CPP, $C(O)(CH_2)_2NH$ CPP, $C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH$ CPP, $C(O)CH_2NH$ CPP и



где CPP соединен с линкерным фрагментом через амидную связь по карбокси концу CPP, и где T представляет собой



или R^2 представляет собой G.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность антисмыслового олигомера настоящего изобретения, включая, например, некоторые варианты осуществления антисмысловых олигомеров формулы (I) и (IV), выбрана из последовательностей, перечисленных в табл. 2A-2C, как описано в настоящем изобретении, и следующих:

- I.
- SEQ ID NO: 13 (GGC CAG AAG GAA GGC GAG AAA AGC), где Z равно 22;
 - SEQ ID NO: 14 (GCC AGA AGG AAG GC GAG AAA AGC X), где Z равно 22;
 - SEQ ID NO: 15 (CCA GAA GGA AGG CGA GAA AAG CXC), где Z равно 22;
 - SEQ ID NO: 16 (CAG AAG GAA GGC GAG AAA AGC XCC), где Z равно 22;
 - SEQ ID NO: 17 (AGA AGG AAG GCG AGA AAA GCX CCA), где Z равно 22;
 - SEQ ID NO: 18 (GAA GGA AGG CGA GAA AAG CXC CAG), где Z равно 22;
 - SEQ ID NO: 19 (AAG GAA GGC GAG AAA AGC XCC AGC), где Z равно 22;
 - SEQ ID NO: 20 (AGG AAG GCG AGA AAA GCX CCA GCA), где Z

- равно 22;
- i) SEQ ID NO: 21 (CGG CXC XCA AAG CAG CXC XGA GA), где Z равно 21;
- j) SEQ ID NO: 22 (ACG GCX CXC AAA GCA GCX CXG AG), где Z равно 21;
- k) SEQ ID NO: 23 (CAC GGC XCX CAA AGC AGC XCX GA), где Z равно 21;
- l) SEQ ID NO: 24 (XCA CGG CXC XCA AAG CAG CXC XG), где Z равно 21;
- m) SEQ ID NO: 25 (CXC ACG GCX CXC AAA GCA GCX CX), где Z равно 21;
- n) SEQ ID NO: 26 (ACX CAC GGC XCX CAA AGC AGC XC), где Z равно 21;
- o) SEQ ID NO: 27 (GCG GCA CXC ACG GCX CXC AAA GC), где Z равно 21;
- p) SEQ ID NO: 28 (GGC GGC ACX CAC GGC XCX CAA AG), где Z равно 21;
- q) SEQ ID NO: 29 (CGG CAC XCA CGG CXC XCA AAG CA), где Z равно 21;
- r) SEQ ID NO: 30 (GCA CXC ACG GCX CXC AAA GCA GC), где Z равно 21;
- s) SEQ ID NO: 31 (GGC ACX CAC GGC XCX CAA AGC AG), где Z равно 21;
- t) SEQ ID NO: 32 (CAC XCA CGG CXC XCA AAG CAG CX), где Z равно 21;
- u) SEQ ID NO: 33 (GCC AGA AGG AAG GCG AGA AAA GC), где Z равно 21;
- v) SEQ ID NO: 34 (CCA GAA GGA AGG CGA GAA AAG C), где Z равно 19;
- w) SEQ ID NO: 35 (CAG AAG GAA GGC GAG AAA AGC), где Z равно 19;
- x) SEQ ID NO: 36 (GGC CAG AAG GAA GGC GAG AAA AG), где Z равно 21;
- y) SEQ ID NO: 37 (GGC CAG AAG GAA GGC GAG AAA A), где Z равно 19;
- z) SEQ ID NO: 38 (GGC CAG AAG GAA GGC GAG AAA), где Z равно

19;

aa) SEQ ID NO: 39 (CGG CAC XCA CGGC XCX CAA AGC A), где Z
равно 21;

bb) SEQ ID NO: 40 (GCG GCA CXС АСGG CXС XCA AAG C), где Z
равно 21;

cc) SEQ ID NO: 41 (GGC GGC ACX CAC G GCX CXС AAA G), где Z
равно 21;

dd) SEQ ID NO: 42 (XGG GGA GAG GGC CAG AAG GAA GGC), где Z
равно 22;

ee) SEQ ID NO: 43 (XGG GGA GAG GGC CAG AAG GAA GC), где Z
равно 21;

ff) SEQ ID NO: 44 (XGG GGA GAG GGC CAG AAG GAA C), где Z
равно 20;

gg) SEQ ID NO: 45 (GGC CAG AAG GAA GCG AGA AAA GC), где Z
равно 21;

hh) SEQ ID NO: 46 (GGC CAG AAG GAA CGA GAA AAG C), где Z
равно 20;

ii) SEQ ID NO: 47 (AGG AAG CGA GAA AAG CXС CAG CA), где Z
равно 21;

jj) SEQ ID NO: 48 (AGG AAC GAG AAA AGC XCC AGC A), где Z
равно 20;

kk) SEQ ID NO: 49 (CGG GCX CXС AAA GCA GCX CXG AGA), где Z
равно 22;

ll) SEQ ID NO: 50 (CGC XСX CAA AGC AGC XСX GAG A), где Z
равно 20;

mm) SEQ ID NO: 51 (CCX CXС AAA GCA GCX CXG AGA), где Z
равно 19;

nn) SEQ ID NO: 52 (GGC GGC ACX CAC GGG CXС XCA AAG), где Z
равно 22;

oo) SEQ ID NO: 53 (GGC GGC ACX CAC GCX CXС AAA G), где Z
равно 20;

pp) SEQ ID NO: 54 (GGC GGC ACX CAC CXС XCA AAG), где Z
равно 19;

qq) SEQ ID NO: 55 (GCG GGA GGG GCG GCA CXС АСG GGC), где Z
равно 22;

rr) SEQ ID NO: 56 (GCG GGA GGG GCG GCA CXС АСG GC), где Z

равно 21;

ss) SEQ ID NO: 57 (GCG GGA GGG GCG GCA CXC ACG C), где Z
равно 20; и

tt) SEQ ID NO: 58 (GCG GGA GGG GCG GCA CXC ACC), где Z
равно 19,

Где X выбран из урацила (U) или тимина (T);

II.

a) SEQ ID NO: 59 (GGC CAG AAG GAA GGG CGA GAA AAG C), где Z
равно 23;

b) SEQ ID NO: 60 (CCA GAA GGA AGG GCG AGA AAA GCX C), где Z
равно 23;

c) SEQ ID NO: 61 (AAG GAA GGG CGA GAA AAG CXC CAG C), где Z
равно 23;

d) SEQ ID NO: 62 (GCG GGA GGG GCG GCA CXC ACG GGG C), где Z
равно 23;

e) SEQ ID NO: 63 (XGG GGA GAG GGC CAG AAG GAA GGG C), где Z
равно 23;

f) SEQ ID NO: 64 (AGA AGG AAG GGC GAG AAA AGC XCC A), где Z
равно 23;

g) SEQ ID NO: 65 (GCX CXC AAA GCA GCX CXG AGA CAX C), где Z
равно 23;

h) SEQ ID NO: 66 (CXC XCA AAG CAG CXC XGA GAC AXC A), где Z
равно 23;

i) SEQ ID NO: 67 (XCX CAA AGC AGC XCX GAG ACA XCA A), где Z
равно 23;

j) SEQ ID NO: 68 (CXC AAA GCA GCX CXG AGA CAX CAA C), где Z
равно 23;

k) SEQ ID NO: 69 (XCA AAG CAG CXC XGA GAC AXC AAC C), где Z
равно 23;

l) SEQ ID NO: 70 (CAA AGC AGC XCX GAG ACA XCA ACC G), где Z
равно 23;

m) SEQ ID NO: 71 (AAA GCA GCX CXG AGA CAX CAA CCG C), где Z
равно 23;

n) SEQ ID NO: 72 (AAG CAG CXC XGA GAC AXC AAC CGC G), где Z
равно 23;

o) SEQ ID NO: 73 (AGC AGC XCX GAG ACA XCA ACC GCG G), где Z

равно 23;

p) SEQ ID NO: 74 (GCA GCX CXG AGA CAX CAA CCG CGG C), где Z равно 23; и

q) SEQ ID NO: 75 (CAG CXC XGA GAC AXC AAC CGC GGC X), где Z равно 23,

где X выбран из урацила (U) или тимина (T); и

III.

a) SEQ ID NO: 76 (GCC AGA AGG AAG GGC GAG AAA AGC X), где Z равно 23;

b) SEQ ID NO: 77 (CAG AAG GAA GGG CGA GAA AAG CXC C), где Z равно 23;

c) SEQ ID NO: 78 (GAA GGA AGG GCG AGA AAA GCX CCA G), где Z равно 23;

d) SEQ ID NO: 79 (AGG AAG GGC GAG AAA AGC XCC AGC A), где Z равно 23;

e) SEQ ID NO: 80 (ACX CAC GGG GCX CXC AAA GCA GCX C), где Z равно 23;

f) SEQ ID NO: 81 (GGCXCXCAAAGCAGCXCXGAGACAX), где Z равно 23;

g) SEQ ID NO: 82 (GGC XCX CAA AGC AGC XCX GA), где Z равно 18;

h) SEQ ID NO: 83 (GAG AGG GCC AGA AGG AAG GG), где Z равно 18;

i) SEQ ID NO: 84 (XXX GCC AXG XXA CCC AGG CX), где Z равно 18;

j) SEQ ID NO: 85 (GCG CAC CCX CXG CCC XGG CC), где Z равно 18; и

k) SEQ ID NO: 86 (GGC CCX GGX CXG CXG GCX CCC XGC X), где Z равно 23,

где X выбран из урацила (U) или тимина (T).

В некоторых вариантах осуществления, нацеливающая последовательность выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 27-29, 34-36, 59 и 82. В некоторых вариантах осуществления, нацеливающая последовательность выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 27-29, 34-36, и 59. В некоторых вариантах осуществления, нацеливающая последовательность выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 27-29 и 34-36. В некоторых вариантах осуществления, каждый случай X в любой одной из SEQ ID NO: 13, 27-29, 34-36, 59 и 82, представляет собой T.

В некоторых вариантах осуществления, включая, например, некоторые варианты осуществления антисмысловых олигомеров формулы (I) и (IV), нацеливающая последовательность является комплементарной области-мишени в интроне 1 (SEQ ID NO: 1) пре-мРНК гена человеческой альфа гликозидазы (GAA). В некоторых вариантах осуществления, нацеливающая последовательность является комплементарной области-мишени в экзоне 2 или интроне 2 гена человеческой GAA. В различных вариантах осуществления, включая, например, варианты осуществления антисмысловых олигомеров формулы (I) и (IV), нацеливающая последовательность является комплементарной области-мишени в интроне 1 (SEQ ID NO: 1) пре-мРНК гена человеческой альфа гликозидазы (GAA), где область-мишень содержит по меньшей мере одно дополнительное нуклеиновое основание по сравнению с нацеливающей последовательностью, где по меньшей мере одно дополнительное нуклеиновое основание не имеет комплементарного нуклеинового основания в нацеливающей последовательности, и где по меньшей мере одно дополнительное нуклеиновое основание является внутренним к области-мишени. В некоторых вариантах осуществления, нацеливающая последовательность включает последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 13-86, как показано в табл. 2A-2C в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления, нацеливающая последовательность включает последовательность, выбранную из табл. 2A и 2B. В некоторых вариантах осуществления, нацеливающая последовательность выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 27-29, 34-36, 59 и 82. Кроме того и относительно последовательностей, перечисленных в табл. 2A-2C (или табл. 2B и 2C) в настоящем изобретении, в определенных вариантах осуществления, выбрана последовательность с 100% комплементарностью, и одно или более нуклеиновых основания удалены (или альтернативно получены с одним или более отсутствующими нуклеиновыми основаниями) так, что полученная в результате последовательность содержит одно или более отсутствующих нуклеиновых оснований относительно ее природного комплемента в области-мишени. За исключением части, где удалены одно или более нуклеиновых оснований, предполагается, что оставшиеся части являются на

100% комплементарными. Однако в пределы настоящего изобретения включены варианты, что могут присутствовать сниженные степени комплементарности.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один X SEQ ID NO: 13-86 представляет собой T. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один X SEQ ID NO: 13-86 представляет собой U. В некоторых вариантах осуществления каждый X SEQ ID NO: 13-86 представляет собой T. В некоторых вариантах осуществления каждый X SEQ ID NO: 13-86 представляет собой U. В различных вариантах осуществления по меньшей мере один X нацеливающей последовательности представляет собой T. В различных вариантах осуществления, каждый X нацеливающей последовательности представляет собой T. В различных вариантах осуществления по меньшей мере один X нацеливающей последовательности представляет собой U. В различных вариантах осуществления, каждый X нацеливающей последовательности представляет собой U.

Данные и другие аспекты настоящего изобретения будут очевидны со ссылкой на следующее подробное описание и прилагаемые чертежи. Все ссылки, описанные в настоящем изобретении, включены в настоящее изобретение с помощью ссылки во всей своей полноте, как если каждая была бы включена отдельно.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 и 2 представляют собой гистограммы, показывающие GAA ферментативную активность (ферментный анализ), найденную для различных РМО соединений в процессе скрининга. Y ось представляет собой кратное увеличение GAA ферментативной активности относительно необработанного контроля. "N" относится к количеству параллельных опытов, проводимых в каждом испытании. Горизонтальная пунктирная линия показывает степень GAA активности в необработанных клетках. Отдельные соединения дозируют при 5 мкМ и 0,2 мкМ. Горизонтальная пунктирная линия показывает степень GAA активности в необработанных клетках.

Фиг. 3 и 4 представляют собой гистограммы, показывающие дозозависимый эффект ферментного анализа, найденный для различных РМО соединений. Y ось представляет собой кратное увеличение GAA ферментативной активности относительно необработанного контроля. Отдельные соединения дозировали при 5 мкМ, 1 мкМ, 0,2 мкМ и 0,4 мкМ. Горизонтальная пунктирная линия показывает степень GAA активности в необработанных клетках.

Фиг. 5-8 представляют собой гистограммы, показывающие дозозависимый эффект ферментного анализа, найденный для различных РМО соединений. Y ось представляет собой кратное увеличение GAA ферментативной активности относительно необработанного контроля. Отдельные соединения дозировали при 5 мкМ, 1 мкМ, 0,2 мкМ и 0,04 мкМ. Горизонтальная пунктирная линия показывает степень GAA активности в необработанных клетках.

Фиг. 9-14 представляют собой гистограммы, показывающие дозозависимый эффект ферментного анализа, найденный для различных РМО соединений. Y ось представляет собой кратное увеличение GAA ферментативной активности относительно необработанного контроля. Отдельные соединения дозировали при 5 мкМ, 1,6 мкМ, 0,5 мкМ и 0,16 мкМ. Горизонтальная пунктирная линия показывает степень GAA активности в необработанных клетках.

Фиг. 15a и 15b представляют собой гистограммы, показывающие дозозависимый эффект ферментного анализа, найденный для различных РРМО соединений. Y ось представляет собой кратное увеличение GAA ферментативной активности относительно необработанного контроля. Отдельные соединения дозировали при 5 мкМ, 1,6 мкМ и 0,5 мкМ. Горизонтальная пунктирная линия показывает степень GAA активности в необработанных клетках.

Фиг. 16 представляет собой гистограмму, показывающую дозозависимый эффект ферментного анализа, найденный для различных РМО соединений. Y ось представляет собой кратное увеличение GAA ферментативной активности относительно необработанного контроля. Отдельные соединения дозировали при 5 мкМ. Горизонтальная пунктирная линия показывает степень GAA активности в необработанных клетках.

Фиг. 17 и 18 представляют собой гистограммы, показывающие GAA ферментативную активность (ферментный анализ), найденную для различных РРМО соединений. Y ось представляет собой кратное увеличение GAA ферментативной активности относительно необработанного контроля. Отдельные соединения дозировали при 5 мкМ, 1,6 мкМ, и 0,5 мкМ. Горизонтальная пунктирная линия показывает степень GAA активности в необработанных клетках. "N=9" относится к количеству параллельных опытов, оцененных в каждом исследовании. Таблицы со сводными данными показывает EC_{50} в мкМ.

Фиг. 19 представляет собой таблицу со сводными данными, показывающую EC_{50} (в мкМ) для различных РРМО соединений.

Фиг. 20-22 представляют собой гистограммы, показывающие GAA ферментативную активность (ферментный анализ), найденную для различных РРМО соединений. Y ось представляет собой кратное увеличение GAA ферментативной активности относительно необработанного контроля. Отдельные соединения дозировали при 5 мкМ, 1,6 мкМ и 0,5 мкМ. Горизонтальная пунктирная линия показывает степень GAA активности в необработанных клетках. Таблицы со сводными данными EC_{50} в мкМ.

Фиг. 23 представляет собой таблицу со сводными данными, показывающую EC_{50} (в мкМ) для раз-

личных РРМО соединений.

Фиг. 24-26 представляют собой гистограммы, показывающие ГАА ферментативную активность (ферментный анализ), найденную для различных РРМО соединений. Y ось представляет собой кратное увеличение ГАА ферментативной активности относительно необработанного контроля. Отдельные соединения дозировали при 5 мкМ, 1,6 мкМ и 0,5 мкМ. Горизонтальная пунктирная линия показывает степень ГАА активности в необработанных клетках. Таблицы со сводными данными ЕС₅₀ в мкМ.

Подробное описание

I. Определения.

Если не определено иначе, все технические и научные термины, применяемые в настоящем изобретении, имеют те же значения, как обычно известно специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные способам и материалам, описанным в настоящем изобретении, можно применять на практике или тестировании предмета настоящего изобретения, описаны предпочтительные способы и материалы. Для целей настоящего изобретения, следующие термины определяют ниже.

Форма единственного числа может применяться в настоящем изобретении для указания на один или более чем один (т.е. по меньшей мере один) объект. В качестве примера, "элемент" обозначает один элемент или более чем один элемент.

Под "приблизительно" подразумевают количество, степень, величину, число, частоту, процент, протяжение, размер, количество, вес или длину, которая изменяется до 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% относительно исходного количества, степени, величины, числа, частоты, процента, протяжения, размера, количества, веса или длины.

Под "кодирующей последовательностью" подразумевают любую последовательность нуклеиновой кислоты, которая вносит вклад в кодирование полипептидного продукта гена. Наоборот, термин "некодирующая последовательность" относится к любой последовательности нуклеиновой кислоты, которая не вносит непосредственный вклад в кодирование полипептидной цепи гена.

Повсюду в данном описании, если контекст не требует иначе, ясно, что слова "включает" и "включая" подразумевают включение заявленной стадии или элемента или группа стадий или элементов, но не исключение любой другой стадии или элемента или группы стадий или элементов.

Под "состоит из" подразумевают включение и ограничение, что бы не следовало за фразой "состоит из": таким образом, фраза "состоит из" показывает, что требуются или являются обязательными перечисленные элементы, и что не могут присутствовать другие элементы. Под "по существу состоит из" подразумевают включение любых элементов, перечисленных после фразы, и ограничение для других элементов, которые не влияют на или не делают вклад в активность или действие, указанные в описании для перечисленных элементов. Таким образом, фраза "по существу состоит из" указывает, что требуются или являются обязательными перечисленные элементы, но что другие элементы являются необязательными и могут присутствовать или отсутствовать, в зависимости от того, влияют ли они существенно на активность или действие перечисленных элементов.

Как применяют в настоящем изобретении, термины "контакт с клеткой", "введение" или "доставка" включают доставку олигомеров настоящего изобретения в клетку способами, стандартными в данной области техники, например, трансфекцией (например, липосомы, фосфат кальция, полиэтиленмин), электропорацией (например, нуклеофекция), микроинъекцией.

Как применяют в настоящем изобретении, предполагается, что термин "алкил" включает линейную (т.е. неразветвленную или ациклическую), разветвленную, циклическую или полициклическую неароматическую углеводородную группу, которая необязательно замещена одной или более функциональными группами. Если не указано иначе, "алкильные" группы содержат один-восемь и предпочтительно один-шесть атомов углерода. Предполагается, что C₁-C₆-алкил включает C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ и C₆ алкильные группы. Низший алкил относится к алкильным группам, содержащим 1-6 атомов углерода. Примеры алкила включают, но не ограничиваются, метил, этил, n-пропил, изопропил, циклопропил, бутил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил, циклобутил, пентил, изопентил, трет-пентил, циклопентил, гексил, изогексил, циклогексил и т.д. Алкил может быть замещенным или незамещенным. Примерные замещенные алкильные группы включают, но не ограничиваются, фторметил, дифторметил, трифторметил, 2-фторэтил, 3-фторпропил, гидроксиметил, 2-гидроксиэтил, 3-гидроксипропил, бензил, замещенный бензил, фенэтил, замещенный фенэтил и т.д.

Как применяют в настоящем изобретении, термин "алкокси" обозначает подгруппу алкила, в котором алкильная группа, как определено выше с указанным количеством углеродов, присоединена через кислородный мостик. Например, "алкокси" относится к группам -O-алкил, где алкильная группа содержит 1-8 атомов углерода линейной, разветвленной, циклической конфигурации. Примеры "алкокси" включают, но не ограничиваются, метокси, этокси, n-пропокси, изопропокси, трет-бутокси, n-бутокси, втор-пентокси и подобные.

Как применяют в настоящем изобретении, термин "арил", применяемый отдельно или как часть большей группы, как в "аралкил", "аралкокси" или "арилоксиалкил", относится к ароматическим кольцевым группам, содержащим шесть-четырнадцать кольцевых атомов, таким как фенил, 1-нафтил, 2-

нафтил, 1-антрацил и 2-антрацил. "Арильное" кольцо может содержать один или более заместителей. Термин "арил" можно применять взаимозаменяемо с термином "арильное кольцо". "Арил" также включает конденсированные полициклические ароматические кольцевые системы, в которых ароматическое кольцо конденсировано с одним или более кольцами. Неограничивающие примеры пригодных арильных кольцевых групп включают фенил, гидроксифенил, галогенфенил, алкоксифенил, диалкоксифенил, триалкоксифенил, алкилендиоксифенил, нафтил, фенантрил, антрил, фенантро и подобные, а также 1-нафтил, 2-нафтил, 1-антрацил и 2-антрацил. Также включенной в объем термина "арил", как его применяют в настоящем изобретении, является группа, в которой ароматическое кольцо конденсировано с одним или более неароматическими кольцами, такими как инданил, фенантридинил или тетрагидронафтил, где радикал или место присоединения находится в ароматическом кольце.

Термин "ацил" обозначает C(O)R группу (в которой R показывает H, алкил или арил, как определено выше). Примеры ацильных групп включают формил, ацетил, бензоил, фенилацетил и аналогичные группы.

Термин "гомолог", как применяют в настоящем изобретении, обозначает соединения, отличающиеся систематически последовательным добавлением одинаковой химической группы. Например, гомолог соединения может отличаться добавлением одной или более -CH₂- групп, аминокислотных остатков, нуклеотидов или нуклеотидных аналогов.

Термины "проникающий пептид" (CPP) или "пептидный фрагмент, который улучшает поглощение клетками" применяют взаимозаменяемо, и они относятся к катионным проникающим пептидам, так называемым "транспортным пептидам", "пептидам-носителям" или "доменам пептидной трансдукции". Пептиды, как показано в настоящем изобретении, обладают способностью стимулировать клеточное проникновение в приблизительно или, по меньшей мере, приблизительно 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% клеток указанной популяции культуры клеток и обеспечивают макромолекулярную транслокацию во множестве тканей *in vivo* при системном введении. В некоторых вариантах осуществления CPP имеют формулу [(C(O)CHR'NH)_m]R^a, где R' представляет собой боковую цепь природной аминокислоты или ее одно- или двухуглеродного гомолога, R^a выбран из водорода или ацила, и m представляет собой целое вплоть до 50. CPP могут также иметь формулу [(C(O)CHR'NH)_m]R^a, где R' представляет собой боковую цепь природной аминокислоты или ее одно- или двухуглеродного гомолога, и где R^a выбран из водорода, ацила, бензоила или стеарила. CPP любой структуры может быть присоединен по 3' или 5' концу антисмыслового олигомера через "линкер", такой как, например, C(O)(CH₂)₅NH-, C(O)(CH₂)₂NH-, C(O)(CH₂)₂NH-C(O)(CH₂)₅NH или C(O)CH₂NH-. Дополнительные CPP являются хорошо известными в данной области техники и описаны, например, в заявке США № 2010/0016215, которая включена с помощью ссылки во всей своей полноте. В других вариантах осуществления m представляет собой целое, выбранное из 1-50, где, когда m равно 1, фрагмент представляет собой одну аминокислоту или ее производное.

Как применяют в настоящем изобретении, "аминокислота" относится к соединению, состоящему из атома углерода, с которым соединена первичная аминогруппа, карбоксильная группа, боковая цепь и атом водорода. Например, термин "аминокислота" включает, но не ограничивается, глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, аспарагин, глутамин, лизин и аргинин. Кроме того, как применяют в настоящем изобретении, "аминокислота" также включает производные аминокислот, такие как эфиры и амиды, и соли, а также другие производные, включая производные, проявляющие фармакосвойства при метаболизме до активной формы.

Соответственно, ясно, что термин "аминокислота" включает природные и неприродные аминокислоты.

Как применяют в настоящем изобретении, "пара электронов" относится к валентной паре электронов, которые не связаны или разделены с другими атомами.

Как применяют в настоящем изобретении, "гомология" относится к количеству в процентах аминокислот, которые являются одинаковыми или представляют консервативные замещения. Гомологию можно определить, применяя программы для сравнения последовательностей, такие как GAP (Deveraux et al., 1984, *Nucleic Acids Research* 12, 387-395). Таким образом, последовательности той же или по существу отличной длины по отношению к последовательностям, приведенным в настоящем изобретении, можно сравнивать включением пропусков в выровненные последовательности, причем пропуски можно определить, например, алгоритмом сравнения, применяемым GAP.

Под "выделенным" предполагается материал, который по существу или в основном не содержит компонентов, которые обычно сопровождают его в его нативном состоянии. Например, "выделенный полинуклеотид", "выделенный олигонуклеотид" или "выделенный олигомер", как применяют в настоящем изобретении, может относиться к полинуклеотиду, который или удален из последовательностей, которые фланкируют его в природном состоянии, например, фрагмент ДНК, который удален из последовательностей, которые являются соседними данному фрагменту в геноме. Термин "выделение", поскольку он относится к клеткам, относится к очистке клеток (например, фибробластов, лимфоцитов) из источника (например, субъекта с заболеванием экспансии полинуклеотидных повторов). В контексте мРНК или белка, "выделение" относится к извлечению мРНК или белка из источника, например, клеток.

Термины "модулирует" включает "увеличение" или "снижение" одного или более измеримых параметров, необязательно, на определенную и/или статистически значимую величину. "Повышает" или "повышение", "увеличивает" или "увеличение" или "стимулирует" или "стимулирование" относятся, в общем, к способности одного или более антисмысловых соединений или композиций продуцировать или вызывать больший физиологический ответ (т.е. последующие эффекты) в клетке или у субъекта, относительно ответа, вызванного без антисмыслового соединения или контрольным соединением. Подходящие физиологические или клеточные реакции (*in vivo* или *in vitro*) будут очевидны специалисту в данной области техники и могут включать увеличение включения экзона 2 в пре-мРНК, кодирующую GAA, или увеличение экспрессии функционального GAA фермента в клетке, ткани или у нуждающегося в этом субъекта. "Повышенное" или "увеличенное" количество обычно представляет собой "статистически значимую" величину и может включать увеличение, которое является в 1,1, 1,2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 или более раз больше (например, 500, 1000 раз), включая все целые и десятичные в пределах и выше 1 (например, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8), количества, продуцированного без антисмыслового соединения (отсутствия агента) или контрольным соединением. Термин "снижать" или "ингибировать" может, в общем, относиться к способности одного или более антисмысловых соединений или композиций "снижать" подходящий физиологический или клеточный ответ, такой как симптом заболевания или состояния, описанного в настоящем изобретении, как измерено согласно стандартным способам в диагностической области техники. Подходящие физиологические или клеточные ответы (*in vivo* или *in vitro*) будут очевидными специалисту в данной области техники и могут включать ослабление симптомов или патологии болезни накопления гликогена, такой как болезнь Помпе, например, снижение накопления гликогена в одной или более тканях. "Снижение" ответа может быть "статистически значимым" по сравнению с ответом, вызываемым без антисмыслового соединения или контрольной композицией и может включать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% снижение, включая все промежуточные целые.

Как применяют в настоящем изобретении, "антисмысловой олигонуклеотид", "антисмысловой олигомер" или "олигонуклеотид" относится к линейной последовательности нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, которая обеспечивает гибридизацию нуклеинового основания с целевой последовательностью в РНК спариванием оснований по Уотсону-Крику, образуя гетеродуплекс олигомер:РНК в целевой последовательности. Термины "антисмысловой олигонуклеотид", "модифицированный антисмысловой олигонуклеотид", "антисмысловой олигомер", "олигомер" и "соединение" можно применять взаимозаменяемо для ссылки на олигомер. Циклические субъединицы могут иметь в своей основе рибозу или другой пентозный сахар или, в некоторых вариантах осуществления, морфолиновую группу (смотри описание морфолиновых олигомеров ниже). Также предполагаются пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК), конформационно заперты нуклеиновые кислоты (LNA), трицикло-ДНК олигомеры, трициклофосфориоатные олигомеры и 2'-О-метильные олигомеры, среди других антисмысловых агентов, известных в данной области техники.

Включенными являются неприродные олигомеры или "олигонуклеотидные аналоги", включая олигомеры, содержащие (i) структуру с модифицированным остовом, например, остовом, отличным от стандартной фосфодиэфирной связи, обнаруживаемой в природных олиго- и полинуклеотидах, и/или (ii) модифицированные сахарные остатки, например, морфолиновые остатки, а не рибозные или дезоксирибозные остатки. Олигомерные аналоги несут основания, способные образовывать водородные связи спариванием оснований по Уотсону-Крику со стандартными полинуклеотидными основаниями, где остов аналога презентует основания способом, позволяющим данное водородное связывание специфическим к последовательности способом между молекулой олигомерного аналога и основаниями в стандартном полинуклеотиде (например, одноцепочечной РНК или одноцепочечной ДНК). Предпочтительные аналоги представляют собой аналоги, содержащие по существу неизменный остов, содержащий фосфор.

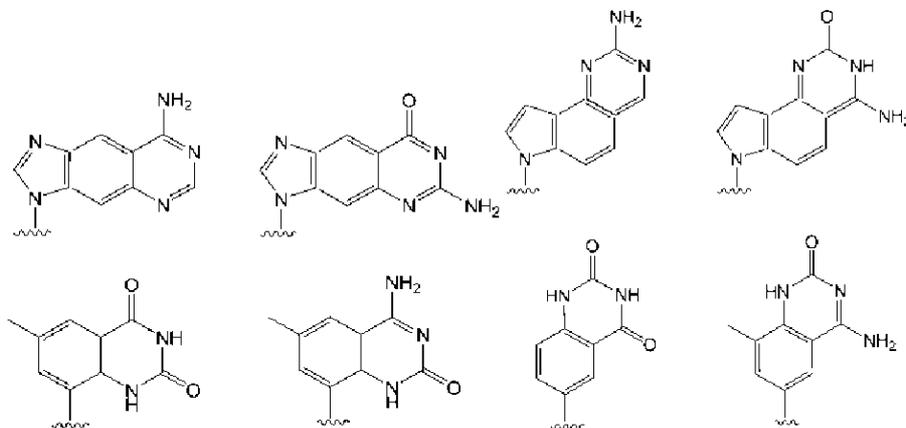
"Устойчивый к нуклеазам" олигомер относится к олигомеру, чей остов является по существу устойчивым к расщеплению нуклеазами, в негибридизованной или гибридизованной форме; обычными внеклеточными и внутриклеточными нуклеазами в теле (например, экзонуклеазами, такими как 3'-экзонуклеазы, эндонуклеазы, РНКазы Н); т.е. олигомер подвергается незначительному расщеплению или не подвергается расщеплению нуклеазами в нормальных нуклеазных условиях в теле, в котором олигомер подвергается воздействию. "Устойчивый к нуклеазам гетеродуплекс" относится к гетеродуплексу, образованному связыванием антисмыслового олигомера с его комплементарной мишенью так, что гетеродуплекс является по существу устойчивым к разрушению *in vivo* внутриклеточными и внеклеточными нуклеазами, которые способны разрезать двухцепочечные РНК/РНК или РНК/ДНК комплексы. "Гетеродуплекс" относится к дуплексу между антисмысловым олигомером и комплементарной частью целевой РНК.

Как применяют в настоящем изобретении, "нуклеиновое основание" (Nu), "фрагмент, спаривающийся с основанием" или "основание" применяют взаимозаменяемо для ссылки на пуриновое или пиримидиновое основание, обнаруживаемое в нативных ДНК или РНК (урацил, тимин, аденин, цитозин и гуанин), а также аналоги природных пуринов и пиримидинов, которые придают улучшенные свойства, такие как связывающая способность, олигомеру. Примеры аналогов включают гипоксантин (компонент,

являющийся основанием нуклеозида, инозина); 2,6-диаминопурин; 5-метилцитозин; C5-пропинил-модифицированные пиримидины; 9-(аминоэтокси)феноксазин (G-clamp) и подобные.

Дополнительные примеры фрагментов, спаривающихся с основаниями, включают, но не ограничиваются, урацил, тимин, аденин, цитозин, гуанин и гипоксантин, содержащие соответствующие их аминогруппы, защищенные ацильными защитными группами, 2-фторурацил, 2-фторцитозин, 5-бром урацил, 5-йод урацил, 2,6-диаминопурин, азацитозин, пиримидиновые аналоги, такие как псевдоизоцитозин и псевдоурацил и другие модифицированные нуклеиновые основания, такие как 8-замещенные пурины, ксантин или гипоксантин (последние два являются продуктами естественной деградации). Также предполагаются модифицированные нуклеиновые основания, описанные в Chiu and Rana, RNA, 2003, 9, 1034-1048, Limbach et al. Nucleic Acids Research, 1994, 22, 2183-2196 и Revankar and Rao, Comprehensive Natural Products Chemistry, т. 7, 313.

Дополнительные примеры фрагментов, спаривающихся с основаниями, включают, но не ограничиваются, нуклеиновые основания с расширенной ароматической системой, в которых добавлено одно или более бензольных колец. Замены нуклеиновых оснований, описанные в каталоге Glen Research catalog (www.glenresearch.com); Krueger A.T. et al., Acc. Chem. Res., 2007, 40, 141-150; Kool E.T., Acc. Chem. Res., 2002, 35, 936-943; Benner S.A. et al., Nat. Rev. Genet., 2005, 6, 553-543; Romesberg F.E. et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 2003, 7, 723-733; Hirao I., Curr. Opin. Chem. Biol., 2006, 10, 622-627, предполагаются в качестве пригодных для получения олигомеров, описанных в настоящем изобретении. Примеры нуклеиновых оснований с расширенной ароматической системой, показаны ниже



Нуклеиновое основание, ковалентно соединенное с рибозой, сахарным аналогом или остатком морфолина, образует нуклеозид. "Нуклеотиды" состоят из нуклеозида вместе с фосфатной группой. Фосфатные группы, ковалентно соединяют нуклеозиды друг с другом, образуя олигомер.

Олигомер "специфически гибридизуется" с целевым полинуклеотидом, если олигомер гибридизуется с мишенью в физиологических условиях с T_{пл} по существу большей чем 40 или 45°C, предпочтительно по меньшей мере 50°C и обычно 60-80°C или более. Данная гибридизация предпочтительно соответствует жестким условиям гибридизации. При указанных ионной силе и pH, T_m представляет собой температуру, при которой 50% целевой последовательности гибридизуется с комплементарным полинуклеотидом. Данная гибридизация может возникать с "приблизительно полной" или "существенной" комплементарностью антисмыслового олигомера к целевой последовательности, а также с точной комплементарностью.

Как применяют в настоящем изобретении, "достаточная длина" относится к антисмысловому олигомеру или его нацеливающей последовательности, которая является комплементарной, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26, по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29, или, по меньшей мере 30 или более, таким как 8-40, и таким как 15-40 непрерывным нуклеиновым основаниям в области интрона 1, экзона 2 или интрона 2 GAA, или области, охватывающей любую из приведенных выше. Антисмысловый олигомер достаточной длины содержит, по меньшей мере, минимальное количество нуклеотидов для того, чтобы быть способным специфически гибридизоваться с областью повтора пре-мРНК GAA в мутантной РНК. Предпочтительно, олигомер достаточной длины имеет длину 8-30 нуклеотидов. Более предпочтительно, олигомер достаточной длины имеет длину 9-27 нуклеотидов. Еще более предпочтительно, олигомер достаточной длины имеет длину 15-40 нуклеотидов.

Термины "идентичность последовательностей" или, например, содержащий "последовательность, на 50% идентичная", как применяют в настоящем изобретении, относится к степени, в которой последо-

вательности являются идентичными нуклеотид за нуклеотидом или аминокислота за аминокислотой в сравниваемом промежутке. Таким образом, "идентичность последовательностей в процентах" можно рассчитать сравнением двух оптимально выровненных последовательностей в сравниваемом промежутке, определением количества положений, в которых присутствуют одинаковые нуклеиновые основания (например, A, T, C, G, I) или одинаковые аминокислотные остатки (например, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys и Met) в обеих последовательностях, получением количества совпадающих положений, делением количества совпадающих положений на суммарное количество положений в сравниваемом промежутке (т.е. размер окна), и умножением результата на 100, получая идентичность последовательностей в процентах. Оптимальное выравнивание последовательностей для выравнивания окна для сравнения можно осуществлять автоматизированной реализацией алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA, и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, Wis., USA) или осмотром и наилучшим выравниванием (т.е. приводящим к гомологии с наибольшим процентом в окне сравнения), полученным любым из различных выбранных способов. Можно также сослаться на семейство программ BLAST, как, например, описано Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25:3389, 1997.

"Субъект" или "субъект, нуждающийся в" включает субъекта, являющегося млекопитающим, такого как субъект, являющийся человеком. Примеры субъектов, являющихся млекопитающими, имеют или подвергаются риску наличия GSD-II (или болезни Помпе). Как применяют в настоящем изобретении, термин "GSD-II" относится к болезни накопления гликогена II типа (GSD-II или болезнь Помпе), человеческому аутосомно-рецессивному заболеванию, которое часто характеризуется недостаточной экспрессией GAA белка у пораженных индивидов. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет пониженную экспрессию и/или активность GAA белка в одной или более тканей, например, сердце, скелетных мышцах, печени и тканях нервной системы. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет повышенное накопление гликогена в одной или более тканях, например, сердце, скелетных мышцах, печени и тканях нервной системы. В конкретных вариантах осуществления, субъект имеет IVS1-13T>G мутацию или другую мутацию, которая приводит к пониженной экспрессии функционального белка GAA (см., например, Zampieri et al., European J. Human Genetics. 19:422-431, 2011).

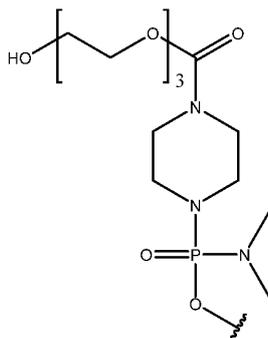
Как применяют в настоящем изобретении, термин "мишень" относится к области РНК, и конкретно, к области, идентифицируемой GAA геном. В конкретном варианте осуществления мишень представляет собой область в интроне 1 кодирующей GAA пре-мРНК (например, SEQ ID NO: 1), которая является ответственной за подавление сигнала, который стимулирует включение экзона 2. В другом варианте осуществления область-мишень представляет собой область мРНК экзона 2 GAA. В следующем варианте осуществления, мишень содержит один или более дискретных подобластей интрона 1 пре-мРНК, кодирующей GAA. Данные подобласти включают, но не ограничиваются, последовательности, определяемые SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3.

Термин "целевая последовательность" относится к части целевой РНК, на которую направлен олигомерный аналог, т.е. последовательности, с которой олигомерный аналог будет гибридизоваться спариванием оснований по Уотсону-Крику с комплементарной последовательностью.

Термин "нацеливающая последовательность" представляет собой последовательность в олигомере или олигомерном аналоге, которая является комплементарной (кроме того, имеется ввиду по существу комплементарной) к "целевой последовательности" в РНК геноме. Вся последовательность или только часть бессмысленного олигомера может быть комплементарной целевой последовательности. Например, в олигомере, содержащем 20-30 оснований, приблизительно 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или 29 могут представлять собой нацеливающие последовательности, которые являются комплементарными области-мишени. Обычно, нацеливающая последовательность образована непрерывными основаниями в олигомере, но может альтернативно образовываться не непрерывными последовательностями, которые, помещаемые вместе, например, из противоположных концов олигомера, образуют последовательность, которая перекрывает целевую последовательность.

"Нацеливающая последовательность" может обладать "почти полной" или "существенной" комплементарностью к целевой последовательности и все еще функционировать для целей настоящего изобретения, т.е. быть все еще "комплементарной". Предпочтительно, соединения, являющиеся олигомерными аналогами, применяемые в настоящем изобретении, содержат самое большое одно некомплементарное основание с целевой последовательностью из 10 нуклеотидов, и предпочтительно самое большое одно некомплементарное основание из 20. Альтернативно, применяемые бессмысленные олигомеры имеют, по меньшей мере, 90% гомологию по последовательности, и предпочтительно, по меньшей мере, 95% гомологию по последовательности, с примерными нацеливающими последовательностями, как указано в настоящем изобретении.

Как применяют в настоящем изобретении, термины "ТЕГ" или "триэтиленгликольный хвост" относятся к триэтиленгликольным фрагментам, конъюгированным с олигонуклеотидом, например, на его 3'-или 5'-конце. Например, в некоторых вариантах осуществления, "ТЕГ" включает случай, где, например, Т соединения формулы (I), (VI) или (VII) имеет формулу



Как применяют в настоящем изобретении, термин "определение количества", "количественная оценка" или другие родственные слова относятся к определению количества, массы или концентрации в единичном объеме нуклеиновой кислоты, полинуклеотида, олигомера, пептида, полипептида или белка.

Как применяют в настоящем изобретении, "лечение" субъекта (например, млекопитающего, такого как человек) или обработка клетки представляет собой любой тип вмешательства, применяемый в попытке изменить естественное развитие индивида или клетки. Лечение включает, но не ограничивается, введение фармацевтической композиции, и его можно осуществлять или профилактически или после возникновения патогенного события или контакта с этиологическим фактором. Также включенным является "профилактическое" лечение, которое может быть направлено на снижение скорости прогрессирования заболевания или состояния, которое лечат, задержку возникновения заболевания или состояния или снижение тяжести его возникновения. "Лечение" или "профилактика" не обязательно указывает на полную ликвидацию, вылечивание или предотвращение заболевания или состояния или связанных с ним симптомов.

II. Последовательности для модуляции сплайсинга GAA.

Определенные варианты осуществления относятся к способам увеличения уровня содержащей экзон 2 мРНК, кодирующей GAA, относительно GAA мРНК с удаленным экзоном 2 в клетке, включающим контакт клетки с антисмысловым олигомером достаточной длины и комплементарности для специфической гибридизации с областью в GAA гене, так что увеличивается количество содержащей экзон 2 GAA мРНК относительно GAA мРНК с удаленным экзоном-2 в клетке. В некоторых вариантах осуществления клетка находится в субъекте, и способ включает введение антисмыслового олигомера субъекту.

Антисмысловый олигомер можно сконструировать для блокировки или ингибирования или модулирования трансляции мРНК или для ингибирования или модулирования процесса сплайсинга пре-мРНК, или для стимулирования разрушения целевых мРНК, и можно сказать, что он "направлен на" или "нацелен на" целевую последовательность, с которой он гибридизуется. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность содержит область, содержащую 3' или 5' сайт сплайсинга пре-мРНК, точку ветвления или другую последовательность, вовлеченную в регуляцию сплайсинга. Целевая последовательность может быть в экзоне или в интроне или охватывать экзон-интронный стык.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловый олигомер обладает достаточной комплементарностью по последовательности с целевой мРНК (т.е. РНК для которой модулируют выбор сайта сплайсинга) для блокирования области целевой РНК (например, пре-мРНК) эффективным способом. В примерных вариантах осуществления, данная блокировка GAA пре-мРНК служит для модулирования сплайсинга, или маскировкой сайта связывания для нативного белка, который мог бы иначе модулировать сплайсинг, и/или изменением структуры целевой мРНК. В некоторых вариантах осуществления целевая мРНК представляет собой целевую пре-мРНК (например, пре-мРНК GAA гена).

Антисмысловый олигомер, обладающий достаточной комплементарностью по последовательности к последовательности целевой РНК для модулирования сплайсинга целевой РНК, обозначает то, что антисмысловый агент содержит последовательность, достаточную для запуска маскировки сайта связывания для нативного белка, который мог бы иначе модулировать сплайсинг и/или изменять трехмерную структуру целевой РНК. Аналогично, олигомерный реагент, содержащий достаточную последовательность, комплементарную к последовательности целевой РНК для модулирования сплайсинга целевой РНК обозначает то, что олигомерный реагент содержит последовательность, достаточную для запуска маскировки сайта связывания для нативного белка, который мог бы иначе модулировать сплайсинг и/или изменять трехмерную структуру целевой РНК.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловый олигомер имеет достаточную длину и комплементарность к последовательности в интроне 1 человеческой GAA пре-мРНК, экзоне 2 человеческой GAA пре-мРНК или интроне 2 человеческой GAA пре-мРНК. Также включенными являются антисмысловые олигомеры, которые являются комплементарными области, которая охватывает интрон 1/экзон 2 человеческой GAA пре-мРНК, или области, которая охватывает экзон 2/интрон 2 человеческой GAA пре-мРНК. Последовательности интрона 1 (SEQ ID NO: 1), экзона 2 (SEQ ID NO: 4) и интрона 2 (SEQ ID NO: 5) для человеческого GAA гена показаны в табл. 1 ниже (выделенный T/G вблизи 3' конца SEQ ID NO: 1 представляет собой IVS1-13T>G мутацию, описанную выше; нуклеотид в данном положении представ-

ляет собой или Т или G).

Таблица 1. Целевые последовательности для нацеленных на GAA олигомеров (из NG_009822)

| название | Последовательность (5'-3') | SEQ ID NO |
|----------|--|-----------|
| GAA-IVS1 | GTGAGACACCTGACGTCTGCCCCGCGCTGCCGGCGGTAACAT CCCAGAAGCGGGTTTGAACGTGCCTAGCCGTGCCCCAGCCT CTTCCCCTGAGCGGAGCTTGAGCCCCAGACCTCTAGTCCTCC CGGTCTTTATCTGAGTTCAGCTTAGAGATGAACGGGGAGCCG CCCTCCTGTGCTGGGCTTGGGGCTGGAGGCTGCATCTTCCCG TTTCTAGGGTTTCCTTTCCCCTTTTGATCGACGCAGTGCTCA GTCTTGGCCGGGACCCGAGCCACCTCTCCTGCTCCTGCAGGA CGCACATGGCTGGGTCTGAATCCCTGGGGTGAGGAGCACCGT GGCCTGAGAGGGGGCCCCGGGCCAGCTCTGAAATCTGAATG TCTCAATCACAAGACCCCTTAGGCCAGGCCAGGGGTGACT GTCTCTGGTCTTTGTCCCTGGTTGCTGGCACATAGCACCCGA AACCCCTTGAAACCGAGTGATGAGAGAGCCTTTTGCTCATGA GGTGACTGATGACCGGGACACCAGGTGGCTTCAGGATGGAA GCAGATGGCCAGAAAGACCAAGGCCGTGATGACGGGTGGGAT GGAAAAGGGGTGAGGGGCTGGAGATTGAGTGAATCACCAGTG GCTTAGTCAACCATGCCTGCACAATGGAACCCGTAAGAAC CACAGGGATCAGAGGGCTTCCC GCCGGTTGTGGAACACACC AAGGCACTGGAGGGTGGTGCAGCAGAGAGCACAGCATCACT GCCCCACCTCACACCAGGCCCTACGCATCTTCCATACGG CTGTCTGAGTTTTATCCTTTGTAATAAACAGCAACTGTAAG AAACGCACTTTCCTGAGTCTGTGACCCCTGAAGAGGGAGTCC TGGGAACCTCTGAATTTATAACTAGTTGATCGAAAGTACAAG | 1 |

| | | |
|--|---|--|
| | <p>TGACAACCTGGGATTTGCCATTGGCCTCTGAAGTGAAGGCAG TGTGTGGGACTGAGCCCTTAACCTGTGGAGTCTGTGCTGAC TCCAGGTAGTGTCAAGATTGAATTGAATTGTAGGACACCCAG CCGTGTCCAGAAAGTTGCAGAATTGATGGGTGTGAGAAAAAC CCTACACATTTAATGTCAGAAGTGTGGGTAAAAATGTTTCACC CTCCAGCCCAGAGAGCCCTAATTTACCAGTGGCCACGGTGG AACACCACGTCCGGCCGGGGCAGAGCGTTCCAGCCAAGCC TTCTGTAACATGACATGACAGGTCAGACTCCCTCGGGCCCTG AGTTCACTTCTTCTGGTATGTGACCAGCTCCCAGTACCAGA GAAGGTTGCACAGTCTCTGCTCCAAGGAGCTTCACTGGCCA GGGGCTGCTTTCTGAAATCCTTGCTGCCTCTGCTCCAAGGC CCGTTCCTCAGAGACGCAGACCCCTCTGATGGCTGACTTTGG TTTGAGGACCTCTCTGCATCCCTCCCCATGGCCTTGCTCCT AGGACACCTTCTTCTCCTTTCCCTGGGGTCAGACTTGCCTA GGTGCGGTGGCTCTCCAGCCTTCCCCACGCCCTCCCCATGG TGTATTACACACACCAAAGGGACTCCCCTATTGAAATCCATG CATATTGAATCGCATGTGGGTCCGGCTGCTCCTGGGAGGAG CCAGGCTAATAGAATGTTTGCCATAAAATATTAATGTACAGA GAAGCGAAACAAAGGTCGTTGGTACTTGTAACTTACCAGC AGAATAATGAAAGCGAACCCCATATCTCATCTGCACGCGAC ATCCTTGTGTGTCTGTACCCGAGGCTCCAGGTGCAGCCACT GTTACAGAGACTGTGTTTCTTCCCATGTACCTCGGGGCGG GGAGGGTTCTGATCTGCAAAGTCGCCAGAGTTAAGTCCTT TCTCTTGTGGCTTTGCCACCCCTGGAGTGTACCCCTCAGC TGCGGTGCCAGGATTCCCCTGTGGTATGTCGTGCACCA GTCAATAGGAAAGGGAGCAAGGAAAGGTACTGGGTCCCCTA AGGACATACGAGTTGCCAGAATCACTTCGCTGACACCCAGT GGACCAAGCCGCACCTTTATGCAGAAGTGGGGCTCCAGCCA GGCGTGGTCACTCCTGAAATCCCAGCACTTCGGAAGGCCAAG GGGGTGGATCACTTGAGCTCAGGAGTTCGAGACCAGCCTGG GTAACATGGCAAAATCCCGTCTCTACAAAAATACAGAAAATT AGCTGGGTGCGGTGGTGTGCTTACAGTCCCAGCTACTCAG GAGGCTGAAGTGGGAGGATTGCTTGAGTCTGGGAGGTGGAGG TTGCAGTGAGCCAGGATCTCACCACAGCACTCTGGCCAGGC GACAGCTGTTTGCCCTGTTCAAGTGTCTACCTGCCTTGCTG</p> | |
|--|---|--|

| | | |
|------------------------|--|---|
| | GTCTTCTGGGGACATTCTAAGCGTGTGTTGATTTGTAACATT TTAGCAGACTGTGCAAGTGTCTGCACTCCCCTGCTGGAGCT TTTCTCGCCCTTCCTTCTGGCCCTCTCCCCAGTCTAGACAGC AGGGCAACACCCACCCTGGCCACCTTACCCACCTGCCTGGG TGCTGCAGTGCCAGCCGCGGTTGATGTCTCAGAGCTGCTTTG AGAGCCCCGTGAGTGGCCGCCCTCCCGCCTCCCTGCTGAGCC CGCTTT/GCTTCTCCCGCAG | |
| GAA-IVS1 (-76-38) | TCTCAGAGCTGCTTTGAGAGCCCCGTGAGTGGCCGCC | 2 |
| GAA-IVS1 (-192-160) | GGAGCTTTTCTCGCCCTTCCTTCTGGCCCTCTC | 3 |
| GAA-exon2 | GCCTGTAGGAGCTGTCCAGGCCATCTCCAACCATGGGAGTGA GGCACCCGCCCTGCTCCACCGGCTCCTGGCCGTCTGGCC TCGTGTCTTGGCAACCGCTGCACTCCTGGGGCACATCCTAC TCCATGATTTCTGCTGGTTCCCGAGAGCTGAGTGGCTCCT CCCCAGTCTGGAGGAGACTCACCCAGCTCACCAGCAGGGAG CCAGCAGACCAGGGCCCGGATGCCAGGCACACCCCGGCC GTCCCAGAGCAGTGCCACACAGTGCAGCGTCCCCCAACA GCCGCTTCGATTGGCCCTGACAAGGCATCACCCAGGAAC AGTGCAGGCCCGCGGCTGTTGCTACATCCCTGCAAAGCAGG GGCTGCAGGGAGCCAGATGGGGCAGCCCTGGTGTCTTCTCC CACCCAGTACCCAGCTACAAGCTGGAGAACCTGAGCTCCT CTGAAATGGGCTACACGGCCACCCTGACCCGTACCACCCCA CCTTCTCCCAAGGACATCCTGACCTGCGGCTGGACGTGA TGATGGAGACTGAGAACCGCCTCCACTTCACG | 4 |
| GAA-IVS2 | GTGGGCAGGGCAGGGCGGGGGCGCGCCAGGGCAGAGGGT GCGCGTGGACATCGACACCCACGCACCTCACAGGGTGGGGT GCATGTTGCACCACTGTGTGCTGGGCCCTTGCTGGGAGCGGA GGTGTGAGCAGACAATGGCAGCGCCCTCGGGGAGCAGTGGG GACACCACGGTGACAGGTACTCCAGAAGGCAGGGCTCGGGC TCATTCATCTTTATGAAAAGGTGGGTGAGGTAGAGTAGGGCT GCCAGAGGTTGCGAATGAAAACAGGATGCCAGTAAACCCGA ATTGCAGATACCCAGGCATGACTTTGTTTTTTGTGTAAGG ATGCAAAATTTGGGATGATTTATACTAGAAAAGCTGCTTGT TGTTTATCTGAAATTCAGAGTTATCAGGTGTTCTGTATTTA | 5 |
| | CCTCCATCCTGGGGAGGCGTCTCCTCCTGGCTCTGCAGAT GAGGGAGCCGAGGCTCAGAGAGGCTGAATGTGCTGCCATGG TCCCACATCCATGTGTGGCTGCACCAGGACCTGACCTGTCT TGGCGTGCGGGTTGTTCTCTGGAGAGTAAGGTGGCTGTGGG AACATCAATAACCCCATCTCTTAG | |

В некоторых вариантах осуществления антисмысловые нацеливающие последовательности сконструированы для гибридизации с областью одной или более целевых последовательностей, перечисленных в табл. 1. Отобранные антисмысловые нацеливающие последовательности можно сделать короче, например приблизительно 12 оснований, или длинее, например приблизительно 40 оснований, и они включают небольшое количество некомплементарных оснований, при условии, что последовательность является достаточно комплементарной для осуществления модулирования сплайсинга при гибридизации с целевой последовательностью, и необязательно образуют с РНК геотродуплекс, имеющий $T_{пл}$ 45°C или выше.

В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности между целевой последовательностью и антисмысловой нацеливающей последовательностью является достаточной для образования стабильного дуплекса. Область комплементарности антисмысловых олигомеров с целевой РНК последовательностью может составлять всего лишь 8-11 оснований, но может составлять 12-15 оснований или более, например, 10-40 оснований, 12-30 оснований, 12-25 оснований, 15-25 оснований, 12-20 оснований или 15-20 оснований, включая все целые между данными диапазонами. Антисмысловый олигомер из

приблизительно 14-15 оснований обычно является достаточно длинным для обладания уникальной комплементарной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления минимальная длина комплементарных оснований может требоваться для достижения необходимой связывающей Тпл, как обсуждается в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления могут быть пригодными олигомеры вплоть до 40 оснований, где, по меньшей мере, минимальное количество оснований, например, 10-12 оснований, являются комплементарными к целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления облегченное или активное поглощение клетками является оптимальным при длинах олигомером, меньше чем приблизительно 30 оснований. Для РМО олигомеров, описанных дополнительно в настоящем изобретении, оптимальный баланс связывающей стабильности и поглощения обычно возникает при длинах 18-25 оснований. Включенными в описание являются антисмысловые олигомеры (например, РМО, РМО-Х, ПНК, LNA, 2'-ОМе), которые состоят из приблизительно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 оснований, в которых, по меньшей мере, приблизительно 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 непрерывных или прерывистых оснований являются комплементарными к целевым последовательностям табл. 1 (например, SEQ ID NO: 1-5, последовательность, которая охватывает SEQ ID NO: 1/4 или SEQ ID NO: 4/5).

Антисмысловые олигомеры обычно содержат последовательность оснований, которая является достаточно комплементарной к последовательности или области в или смежной с интроном 1, экзоном 2 или интроном 2 последовательности пре-мРНК человеческого GAA гена. В определенных вариантах осуществления, олигомеры являются комплементарными к SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3. В идеале, антисмысловой олигомер способен эффективно модулировать нарушенный сплайсинг пре-мРНК GAA, и посредством этого увеличивать экспрессию активного белка GAA. Данное требование необязательно удовлетворяется, когда олигомерное соединение обладает способностью активно поглощаться клетками млекопитающих и, после поглощения, образовывать стабильный дуплекс (или гетеродуплекс) с целевой мРНК, необязательно с Тпл, большей чем приблизительно 40°C или 45°C.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигомеры могут быть на 100% комплементарными целевой последовательности, или могут содержать некомплементарные основания, например, обеспечивая варианты, при условии, что гетеродуплекс, образованный олигомером и целевой последовательностью, является достаточно стабильным для выдерживания действия клеточных нуклеаз и других способов деградаци, которые могут возникать *in vivo*. Следовательно, определенные олигомеры могут обладать существенной комплементарностью, то есть приблизительно или, по меньшей мере, приблизительно 70% комплементарностью по последовательности, например, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% комплементарностью по последовательности, между олигомером и целевой последовательностью. Олигомерные остовы, которые являются менее подверженными расщеплению нуклеазами, обсуждаются в настоящем изобретении. Некомплементарные основания, если они присутствуют, являются обычно менее дестабилизирующими в направлении концевых областей гибридного дуплекса, чем в середине. Допустимое количество некомплементарных оснований будет зависеть от длины олигомера, процента G:C пар оснований в дуплексе и положения некомплементарного основания (оснований) в дуплексе, согласно хорошо известным принципам стабильности дуплексов. Хотя данный антисмысловой олигомер не обязательно является на 100% комплементарным к *v* целевой последовательности, он является эффективным для того, чтобы стабильно и специфически связываться с целевой последовательностью, так что модулируется сплайсинг целевой пре-РНК.

Стабильность дуплекса, образованного между олигомером и целевой последовательностью, представляет собой функцию Тпл связывания и подверженности дуплекса к расщеплению клеточными ферментами. Тпл олигомера относительно комплементарной последовательности РНК можно измерить общепринятыми способами, такими как способы, описанные Hames et al., *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, 1985, стр. 107-108, или как описано в Miyada C.G. and Wallace R.B., 1987, *Oligomer Hybridization Techniques*, *Methods Enzymol.* т. 154 стр. 94-107. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигомеры могут иметь Тпл связывания относительно комплементарной последовательности РНК, большую чем температура тела и предпочтительно большую чем приблизительно 45 или 50°C. Тпл в диапазоне 60-80°C или более также являются включенными. Согласно хорошо известным принципам, Тпл олигомера относительно РНК гибрида на основе комплементарности можно повысить повышением доли C:G спаренных оснований в дуплексе, и/или увеличением длины (в парах оснований) гетеродуплекса. В то же время, с целью оптимизации поглощения клетками, может быть предпочтительным ограничение размера олигомера. В связи с этим, соединения, которые показывают Тпл (45-50°C или более) при длине 25 оснований или меньше обычно являются предпочтительными относительно соединений, требующих больше чем 25 оснований для больших величин.

Табл. 2А, 2В и 2С показывают примерные нацеливающие последовательности (в направлении от 5' к 3' концу), комплементарные последовательностям пре-мРНК человеческого GAA гена.

Таблица 2А Примерные нацеливающие последовательности (последовательности с делецией)

| Координаты | Нацеливающая последовательность (TS) * (5'-3') | TS SEQ ID NO |
|-----------------------------|--|--------------|
| GAA-IVS1.SA. (-189, -165)-G | GGC CAG AAG GAA GGC GAG AAA AGC | 13 |
| GAA-IVS1.SA. (-190, -166)-G | GCC AGA AGG AAG GC GAG AAA AGC X | 14 |
| GAA-IVS1.SA. (-191, -167)-G | CCA GAA GGA AGG CGA GAA AAG CXC | 15 |
| GAA-IVS1.SA. (-192, -168)-G | CAG AAG GAA GGC GAG AAA AGC XCC | 16 |
| GAA-IVS1.SA. (-193, -169)-G | AGA AGG AAG GCG AGA AAA GCX CCA | 17 |
| GAA-IVS1.SA. (-194, -170)-G | GAA GGA AGG CGA GAA AAG CXC CAG | 18 |
| GAA-IVS1.SA. (-195, -171)-G | AAG GAA GGC GAG AAA AGC XCC AGC | 19 |
| GAA-IVS1.SA. (-196, -172)-G | AGG AAG GCG AGA AAA GCX CCA GCA | 20 |
| GAA-IVS1 (-76-52) -2G | CGG CXC XCA AAG CAG CXC XGA GA | 21 |
| GAA-IVS1 (-75-51) -2G | ACG GCX CXC AAA GCA GCX CXG AG | 22 |
| GAA-IVS1 (-74-50) -2G | CAC GGC XCX CAA AGC AGC XCX GA | 23 |
| GAA-IVS1 (-73-49) -2G | XCA CGG CXC XCA AAG CAG CXC XG | 24 |
| GAA-IVS1 (-72-48) -2G | CXC ACG GCX CXC AAA GCA GCX CX | 25 |
| GAA-IVS1 (-71-47) -2G | ACX CAC GGC XCX CAA AGC AGC XC | 26 |
| GAA-IVS1 (-66-42) -2G | GCG GCA CXC ACG GCX CXC AAA GC | 27 |
| GAA-IVS1 (-65-41) -2G | GGC GGC ACX CAC GGC XCX CAA AG | 28 |
| GAA-IVS1 (-67-43) -2G | CGG CAC XCA CGG CXC XCA ΛΛG CΛ | 29 |
| GAA-IVS1 (-69-45) -2G | GCA CXC ACG GCX CXC AAA GCA GC | 30 |
| GAA-IVS1 (-68-44) -2G | GGC ACX CAC GGC XCX CAA AGC AG | 31 |
| GAA-IVS1 (-70-46) -2G | CAC XCA CGG CXC XCA AAG CAG CX | 32 |
| GAA-IVS1.SA. (-189, -166)-G | GCC AGA AGG AAG GCG AGA AAA GC | 33 |
| GAA-IVS1.SA. (-189, -167)-G | CCA GAA GGA AGG CGA GAA AAG C | 34 |
| GAA-IVS1.SA. (-189, - | CAG AAG GAA GGC GAG AAA | 35 |

| | | |
|------------------------------|------------------------------------|----|
| 168)-G | AGC | |
| GAA-IVS1.SA. (-188, -165)-G | GGC CAG AAG GAA GGC GAG AAA AG | 36 |
| GAA-IVS1.SA. (-187, -165)-G | GGC CAG AAG GAA GGC GAG AAA A | 37 |
| GAA-IVS1.SA. (-186, -165)-G | GGC CAG AAG GAA GGC GAG AAA | 38 |
| GAA-IVS1 (-67-43)-2G | CGG CAC XCA CGGC XCX CAA AGC A | 39 |
| GAA-IVS1 (-66-42)-2G | GCG GCA CXC ACGG CXC XCA AAG C | 40 |
| GAA-IVS1 (-65-41)-2G | GGC GGC ACX CAC G GCX CXC AAA G | 41 |
| GAA-IVS1.SA. (-180, -156)-G | XGG GGA GAG GGC CAG AAG GAA GGC | 42 |
| GAA-IVS1.SA. (-180, -156)-2G | XGG GGA GAG GGC CAG AAG GAA GC | 43 |
| GAA-IVS1.SA. (-180, -156)-3G | XGG GGA GAG GGC CAG AAG GAA C | 44 |
| GAA-IVS1.SA. (-189, -165)-2G | GGC CAG AAG GAA GCG AGA AAA GC | 45 |
| GAA-IVS1.SA. (-189, -165)-3G | GGC CAG AAG GAA CGA GAA AAG C | 46 |
| GAA-IVS1.SA. (-196, -172)-2G | ACG AAC CCA CAA AAG CXC CAG CA | 47 |
| GAA-IVS1.SA. (-196, -172)-3G | AGG AAC GAG AAA AGC XCC AGC A | 48 |
| GAA-IVS1 (-76-52)-G | CGG GCX CXC AAA GCA GCX CXG AGA | 49 |
| GAA-IVS1 (-76-52)-3G | CGC XCX CAA AGC AGC XCX GAG A | 50 |
| GAA-IVS1 (-76-52)-4G | CCX CXC AAA GCA GCX CXG AGA | 51 |
| GAA-IVS1 (-65-41)-G | GGC GGC ACX CAC GGG CXC XCA AAG | 52 |
| GAA-IVS1 (-65-41)-3G | GGC GGC ACX CAC GCX CXC AAA G | 53 |
| GAA-IVS1 (-65-41)-4G | GGC GGC ACX CAC CXC XCA AAG | 54 |
| GAA-IVS1 (-57-33)-G | GCG GGA GGG GCG GCA CXC ACG GGC | 55 |
| GAA-IVS1 (-57-33)-2G | GCG GGA GGG GCG GCA CXC ACG GC | 56 |
| GAA-IVS1 (-57-33)-3G | GCG GGA GGG GCG GCA CXC ACG C | 57 |
| GAA-IVS1 (-57-33)-4G | GCG GGA GGG GCG GCA CXC ACC | 58 |

Для любой из последовательностей в табл. 2А, каждый X независимо выбран из тимина (Т) или урацила (U). "-G", "-2G", "-3G" или "-4G" обозначают нацеливающие последовательности, которые являются комплементарными области-мишени в интроне 1 (SEQ ID NO: 137) пре-мРНК гена человеческой альфа гликозидазы (GAA), где область-мишень содержит один, два, три или четыре дополнительных нуклеиновых оснований по сравнению с нацеливающей последовательностью, где данные дополнитель-

ные нуклеиновые основания представляют собой цитозины, и где одно, два, три или четыре дополнительных нуклеиновых основания не содержат соответствующие комплементарные дополнительные нуклеиновые основания в нацеливающей последовательности (следовательно, -G (гуанин), -2G, -3G, или -4G). Дополнительные нуклеиновые основания являются внутренними к области-мишени.

Таблица 2В. Примерные нацеливающие последовательности

| Координаты | Нацеливающая последовательность (TS) * (5'-3') | TS SEQ ID NO |
|---------------------------|--|-----------------|
| GAA-IVS1.SA. (-189, -165) | GGC CAG AAG GAA GGG CGA GAA AAG C | 59 |
| GAA-IVS1.SA. (-191, -167) | CCA GAA GGA AGG GCG AGA AAA GCX C | 60 |
| GAA-IVS1.SA. (-195, -171) | AAG GAA GGG CGA GAA AAG CXC CAG C | 61 |
| GAA-IVS1(-57-33) | GCG GGA GGG GCG GCA CXC ACG GGG C | 62 |
| GAA-IVS1.SA. (-180, -156) | XGG GGA GAG GGC CAG AAG GAA GGG C | 63 |
| GAA-IVS1.SA. (-193, -169) | ACA AGC AAG GGC CAG AAA AGC XCC A | 64 |
| GAA-IVS1(-80-56) | GCX CXC AAA GCA GCX CXG AGA CAX C | 65 |
| GAA-IVS1(-81-57) | CXC XCA AAG CAG CXC XGA GAC AXC A | 66 |
| GAA-IVS1(-82-58) | XCX CAA AGC AGC XCX GAG ACA XCA A | 67 |
| GAA-IVS1(-83-59) | CXC AAA GCA GCX CXG AGA CAX CAA C | 68 |
| GAA-IVS1(-84-60) | XCA AAG CAG CXC XGA GAC AXC AAC C | 69 |
| GAA-IVS1(-85-61) | CAA AGC AGC XCX GAG ACA XCA ACC G | 70 |
| GAA-IVS1(-86-62) | AAA GCA GCX CXG AGA CAX CAA CCG C | 71 |
| GAA-IVS1(-87-63) | AAG CAG CXC XGA GAC AXC AAC CGC G | 72 |
| GAA-IVS1(-88-64) | AGC AGC XCX GAG ACA XCA ACC GCG G | 73 |
| GAA-IVS1(-89-65) | GCA GCX CXG AGA CAX CAA CCG CGG C | 74 |
| GAA-IVS1(-90-66) | CAG CXC XGA GAC AXC AAC CGC GGC X | 75 |

Для любой из последовательностей в табл. 2В каждый X независимо выбран из тимина (Т) или урацила (U).

Таблица 2С. Примерные нацеливающие последовательности

| Координаты | Нацеливающая последовательность (TS) * (5'-3') | TS SEQ ID NO |
|---------------------------|--|-----------------|
| GAA-IVS1.SA. (-190, -166) | GCC AGA AGG AAG GGC GAG AAA AGC X | 76 |
| GAA-IVS1.SA. (-192, -168) | CAG AAG GAA GGG CGA GAA AAG CXC C | 77 |

| | | |
|---------------------------|-----------------------------------|----|
| GAA-IVS1.SA. (-194, -170) | GAA GGA AGG GCG AGA AAA GCX CCA G | 78 |
| GAA-IVS1.SA. (-196, -172) | AGG AAG GGC GAG AAA AGC XCC AGC A | 79 |
| GAA-IVS1 (-71-47) | ACX CAC GGG GCX CXG AAA GCA GCX C | 80 |
| GAA-IVS1 (-79-55) | GGCXCCAAAGCAGCCXGAGACAX | 81 |
| GAA-IVS1 (-74-55) | GGC XCC CAA AGC AGC XCC GA | 82 |
| GAA-IVS1 (-179-160) | GAG AGG GCC AGA AGG AAG GG | 83 |
| GAA-IVS1, 2178, 20 | XXX GCC AXG XCA CCC AGG CX | 84 |
| GAA-IVS2, 27, 20 | GCG CAC CCX CXG CCC XGG CC | 85 |
| GAAEx2A(+202+226) | GGC CCX GGX CXG CXG GCX CCC XGC X | 86 |

Для любой из последовательностей в табл. 2С, каждый X независимо выбран из тимина (Т) или урацила (U).

Таким образом, некоторые антисмысловые олигомеры содержат, состоят или состоят по существу из последовательности в табл. 2А-2С или ее варианта или непрерывной или прерывистой части (частей). Например, некоторые антисмысловые олигомеры содержат приблизительно или, по меньшей мере, приблизительно 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27 непрерывных или прерывистых нуклеотидов любой из SEQ ID NO, показанных в табл. 2А-2С. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 27-29, 34-36, 59 и 82. Для прерывистых частей, промежуточные нуклеотиды можно удалять. Дополнительные примеры вариантов включают олигомеры, имеющие приблизительно или, по меньшей мере, приблизительно 70% идентичность по последовательности или гомологию, например 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность по последовательности или гомологию, на протяжении всей длины любой из SEQ ID NO, показанных в табл. 2А-С. В некоторых вариантах осуществления любые антисмысловые олигомеры или соединения, содержащие, состоящие из или состоящие по существу из данных вариантных последовательностей, подавляют ISS и/или ESS элемент в GAA пре-мРНК. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер или соединение с нацеливающей последовательностью, которая содержит, состоит или состоит по существу из данной вариантной последовательности, подавляют ISS и/или ESS элемент в GAA пре-мРНК. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер или соединение с нацеливающей последовательностью, которая содержит, состоит или состоит по существу из данной вариантной последовательности, увеличивает, усиливает или стимулирует сохранение экзона 2 в зрелой GAA мРНК, необязательно, по меньшей мере, на приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, или 65% или более относительно контроля, согласно по меньшей мере одному из примеров или способов, описанных в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер или соединение с нацеливающей последовательностью, которое содержит, состоит или состоит по существу из данной вариантной последовательности, увеличивает, усиливает или стимулирует экспрессию белка GAA в клетке, необязательно, по меньшей мере, на приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 или 65% или более относительно контроля, согласно по меньшей мере одному из примеров или способов, описанных в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер или соединение, содержащее, состоящее из или состоящее по существу из данной вариантной последовательности, увеличивает, усиливает или стимулирует GAA ферментную активность в клетке, необязательно, по меньшей мере, на приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 или 65% или более относительно контроля, согласно по меньшей мере одному из примеров или способов, описанных в настоящем изобретении. В качестве примера в настоящем изобретении, клетку (например, фибробласт) можно получить у пациента, имеющего IVS1-13T>G мутацию.

В некоторых вариантах осуществления некоторые антисмысловые олигомеры содержат, состоят из или состоят по существу из последовательности, как показано в табл. 2В (или табл. 2С), или варианта или его непрерывной или прерывистой части (частей). Например, определенные антисмысловые олигомеры содержат приблизительно или, по меньшей мере, приблизительно 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27 непрерывных или прерывистых нуклеотидов любой SEQ ID NO, показанной в табл. 2В или 2С. Для прерывистых частей, промежуточные нуклеотиды можно удалять. Дополнительные примеры вариантов включают олигомеры, имеющие приблизительно или, по меньшей мере, приблизительно 70% идентичность или гомологию по последовательности, например, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность или гомологию по последовательности, по всей длине любой SEQ ID NO, показанной в табл. 2В или 2С. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер или соединение

с нацеливающей последовательностью, которое содержит, состоит или состоит по существу из данной вариантной последовательности, подавляет ISS и/или ESS элемент в GAA пре-мРНК. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер или соединение с нацеливающей последовательностью, которое содержит, состоит или состоит по существу из данной вариантной последовательности, увеличивает, усиливает или стимулирует сохранение экзона 2 в зрелой GAA мРНК, необязательно, по меньшей мере, на приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 или 65% или более относительно контроля, согласно по меньшей мере одному из примеров или способов, описанных в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер или соединение с нацеливающей последовательностью, которое содержит, состоит или состоит по существу из данной вариантной последовательности, увеличивает, усиливает или стимулирует экспрессию белка GAA в клетке, необязательно, по меньшей мере, на приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, или 65% или более относительно контроля, согласно по меньшей мере одному из примеров или способов, описанных в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер или соединение, состоящее из или состоящее по существу из данной вариантной последовательности, увеличивает, усиливает или стимулирует GAA ферментную активность в клетке, необязательно, по меньшей мере, на приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 или 65% или более относительно контроля, согласно по меньшей мере одному из примеров или способов, описанных в настоящем изобретении. В качестве примера в настоящем изобретении, клетку (например, фибробласт) можно получить у пациента, имеющего IVS1-13T>G мутацию.

В различных аспектах обеспечивают антисмысловой олигомер или соединение, содержащие нацеливающую последовательность, которая является комплементарной (например, по меньшей мере, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, или 100% комплементарность) области-мишени человеческой GAA пре-мРНК, где необязательно нацеливающие последовательности показаны в любой из табл. 2A-2C. В другом аспекте, обеспечивают антисмысловой олигомер или соединение, содержащие вариантную нацеливающую последовательность, такую как любая из последовательностей, описанных в настоящем изобретении, где вариантная нацеливающая последовательность связывается с областью-мишенью человеческой пре-мРНК, которая является комплементарной (например, 80-100% комплементарность) одной или более из нацеливающих последовательностей, указанных в любой из табл. 2A-2C. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер или соединение связывается с целевой последовательностью, содержащей, по меньшей мере, 10 (например, по меньшей мере, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40) последовательных оснований человеческой GAA пре-мРНК (например, любая из SEQ ID NO: 1, 2 или 3, или последовательность, которая охватывает точку сплайсинга GAA пре-мРНК, определенную SEQ ID NO: 1/4 или SEQ ID NO: 4/5). В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность является комплементарной (например, по меньшей мере, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% комплементарность) одной или более из нацеливающих последовательностей, указанных в любой из табл. 2A-2C. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность является комплементарной (например, по меньшей мере 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% комплементарность), по меньшей мере 10 (например, по меньшей мере 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, или 28) непрерывным основаниям одной или более из нацеливающих последовательностей, указанных в любой из табл. 2A-2C. В некоторых вариантах осуществления целевую последовательность определяют сайтом выравнивания (например, GAA-IVS1.SA.(-189,-165)), как показано в одной или более из таблиц в настоящем изобретении.

Активность антисмысловых олигомеров и их вариантов можно анализировать согласно стандартным способам в данной области техники. Например, формы сплайсинга и уровни экспрессии исследуемых РНК и белков можно оценить любым из широкого диапазона хорошо известных способов определения форм сплайсинга и/или экспрессии транскрибированной нуклеиновой кислоты или белка. Неограничивающие примеры данных способов включают ПЦР в реальном времени сплайсинговых форм РНК, с последующим разделением по размеру продуктов ПЦР, способы гибридизации нуклеиновых кислот, например, нозерн-блот и/или применение НК-чипов; способы амплификации нуклеиновых кислот; иммунологические способы детекции белков; способы очистки белков; и анализы на функционирование активность белков.

Степени экспрессии РНК можно получить приготовлением мРНК/кДНК (т.е. транскрибированный полинуклеотид) из клетки, ткани или организма, и гибридизацией мРНК/кДНК с эталонным полинуклеотидом, который представляет собой комплемент исследуемой нуклеиновой кислоты или его фрагмент. кДНК можно необязательно амплифицировать, применяя любой из ряда полимеразных цепных реакций или способами транскрипции *in vitro* перед гибридизацией с комплементарным полинуклеотидом; предпочтительно, не амплифицировать ее. Экспрессия одного или более транскриптов можно также детектировать, применяя количественную ПЦР, оценивая степень экспрессии транскрипта (транскриптов).

III. Химии антисмысловых олигомеров А.

Общие характеристики.

Определенные антисмысловые олигомеры настоящего изобретения специфически гибридизуются с

элементом, являющимся сайленсером интронного сплайсинга, или элементом, являющийся сайленсером экзонного сплайсинга. Некоторые антисмысловые олигомеры содержат нацеливающую последовательность, указанную в табл. 2А-2С, фрагмент по меньшей мере 10 непрерывных нуклеотидов нацеливающей последовательности в табл. 2А-2С или вариант, имеющий по меньшей мере 80% идентичность по последовательности с нацеливающей последовательностью в табл. 2А-2С. Конкретные антисмысловые олигомеры состоят или состоят по существу из нацеливающей последовательности, указанной в табл. 2А-2С. В некоторых вариантах осуществления олигомер является устойчивым к действию нуклеаз.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер содержит неприродный химический остов, выбранный из фосфорамидатного или фосфородиамидатного морфолинового олигомера (РМО), пептидо-нуклеиновой кислоты (ПНК), конформационно запертой нуклеиновой кислоты (LNA), фосфоротиоатного олигомера, трицикло-ДНК олигомера, трициклофосфоротиоатного олигомера, 2'-О-Ме-модифицированного олигомера или любой комбинации перечисленных выше, и нацеливающую последовательность, комплементарную области в интроне 1 (SEQ ID. NO: 1) [включая части, показанные SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3], интроне 2 (SEQ ID. NO: 5) или экзоне 2 (SEQ ID. NO: 4) пре-мРНК гена кислой альфа-глюкозидазы (GAA) человека. Например, в некоторых вариантах осуществления, нацеливающая последовательность выбрана из последовательностей, перечисленных в табл. 2А-2С, где X выбран из урацила (U) или тимина (T). Кроме того и например, нацеливающая последовательность выбрана из последовательностей, перечисленных в табл. 2А-2С. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, описанный в настоящем изобретении, содержит нацеливающую последовательность, указанную в табл. 4А-4С.

Антисмысловые олигомеры настоящего изобретения обычно содержат множество нуклеотидных звеньев, причем каждое содержит нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует или содержит нацеливающую последовательность, например, как обсуждается выше. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, антисмысловые олигомеры изменяются по длине от приблизительно 10 до приблизительно 40 звеньев, более предпочтительно приблизительно 10-30 звеньев, и обычно 15-25 звеньев. Например, антисмысловые соединения настоящего изобретения могут быть 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 звеньев в длину, или изменяться в диапазоне от 10 звеньев до 40 звеньев, от 10 звеньев до 30 звеньев, от 14 звеньев до 25 звеньев, от 15 звеньев до 30 звеньев, от 17 звеньев до 30 звеньев, от 17 звеньев до 27 звеньев, от 10 звеньев до 27 звеньев, от 10 звеньев до 25 звеньев и от 10 звеньев до 20 звеньев. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер имеет длину от 10 до приблизительно 40 или от приблизительно 5 до приблизительно 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер имеет длину от приблизительно 14 до приблизительно 25 или от приблизительно 17 до приблизительно 27 нуклеотидов.

В различных вариантах осуществления антисмысловой олигомер может содержать полностью модифицированный остов, например, 100% остова является модифицированным (например, 25-мерный антисмысловой олигомер содержит свой остов, полностью модифицированный любой комбинацией модификаций остова, как описано в настоящем изобретении). В различных вариантах осуществления, антисмысловой олигомер может содержать приблизительно 100-2,5% своего остова модифицированным. В различных вариантах осуществления, антисмысловой олигомер может содержать приблизительно 99, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 или 2,5% своего остова модифицированными и варианты между ними. В других вариантах осуществления, антисмысловой олигомер может содержать любую комбинацию модификаций остова, как описано в настоящем изобретении.

В различных вариантах осуществления антисмысловой олигомер может содержать, состоять из или состоять по существу из фосфорамидатных морфолиновых олигомеров и фосфородиамидатных морфолиновых олигомеров (РМО), олигомеров, модифицированных фосфоротиоатами, 2' О-метил модифицированных олигомеров, пептидо-нуклеиновой кислоты (ПНК), конформационно запертой нуклеиновой кислоты (LNA), фосфоротиоатных олигомеров, 2' О-МОЕ модифицированных олигомеров, 2'-фтормодифицированных олигомеров, нуклеиновых кислот с 2'О,4'С-этиленовой мостиковой связью (ЕНА), трицикло-ДНК, трицикло-ДНК фосфоротиоатных нуклеотидов, 2'-О-[2-(N-метилкарбамоил)этил]модифицированных олигомеров, морфолиновых олигомеров, фосфорамидатных морфолиновых олигомеров, конъюгированных с пептидами (РРМО), фосфородиамидатных морфолиновых олигомеров, содержащих атом фосфора с (i) ковалентной связью с атомом азота морфолинового кольца и (ii) второй ковалентной связью с (1,4-пиперазин)-1-ильным заместителем или замещенным (1,4-пиперазин)-1-илом (РМОplus), и фосфородиамидатные морфолиновые олигомеры, содержащие атом фосфора с (i) ковалентной связью с атомом азота морфолинового кольца и (ii) второй водородной связью с кольцевым азотом 4-аминопиперидин-1-ила (т.е. APN) или производным 4-аминопиперидин-1-ила (РМО-X), включая комбинации любого из приведенных выше.

В некоторых вариантах осуществления остов антисмыслового олигомера по существу является незаряженным и необязательно узнается как субстрат для активного или облегченного транспорта через клеточную мембрану. В некоторых вариантах осуществления все межнуклеотидные связи являются незаряженными. Способность олигомера образовывать стабильный дуплекс с целевой РНК может также

относиться к другим свойствам остова, включая длину и степень комплементарности антисмыслового олигомера относительно мишени, соотношение некомплементарных пар G:C к A:T, и положений любым некомплементарных оснований. Способность антисмыслового олигомера быть устойчивым к клеточным нуклеазам может способствовать сохранению и конечной доставки агента в клеточную цитоплазму. Примеры антисмысловых олигомерных нацеливающих последовательностей перечислены в табл. 2А, 2В и 2С.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер содержит по меньшей мере одну межнуклеотидную связь, которая является положительно заряженной или катионной при физиологическом рН. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер содержит по меньшей мере одну межнуклеотидную связь, которая имеет рКа между приблизительно 5,5 и приблизительно 12. В следующих вариантах осуществления, антисмысловой олигомер содержит приблизительно, по меньшей мере, или не более чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 межнуклеотидных связей, которые имеют рКа между приблизительно 4,5 и приблизительно 12. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер содержит приблизительно или, по меньшей мере, приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% межнуклеотидных связей, которые имеют рКа между приблизительно 4,5 и приблизительно 12. Необязательно, антисмысловой олигомер содержит по меньшей мере одну межнуклеотидную связь с основным азотом и алкильной, арильной или аралкильной группой. В конкретных вариантах осуществления, катионная межнуклеотидная связь или связи содержат 4-аминопиперидин-1-ильную (APN) группу или ее производное. Не будучи связанными любой теорией, считают, что присутствие катионной связи или связей (например, APN группы или APN производного) в олигомере облегчает связывание с отрицательно заряженными фосфатами в целевом нуклеотиде. Таким образом, гетеродуплекс между мутантой РНК и олигомером, содержащим катионную связь, может удерживаться и ионными силами притяжения, и спариванием оснований по Уотсону-Крику.

В некоторых вариантах осуществления количество катионных связей составляет по меньшей мере 2 и не более чем приблизительно половина всех межнуклеотидных связей, например, приблизительно или не более чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 катионных связей. Однако в некоторых вариантах осуществления, вплоть до всех межнуклеотидных связей представляют собой катионные связи, например, приблизительно или, по меньшей мере, приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 всех межнуклеотидных связей представляют собой катионные связи. В конкретных вариантах осуществления, олигомер из приблизительно 19-20 звеньев может содержать 2-10, например 4-8, катионные связи, и оставшиеся связи являются незаряженными. В других конкретных вариантах осуществления, олигомер из 14-15 звеньев может содержать 2-7, например 2, 3, 4, 5, 6 или 7 катионных связей, и оставшиеся связи являются незаряженными. Суммарное количество катионных связей в олигомере может, таким образом, изменяться от приблизительно 1 до 10 до 20 до 30 или более (включая все целые между ними), и могут быть распределены по всему олигомеру.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер может содержать приблизительно или вплоть до приблизительно 1 катионной связи на каждые 2-5 или 2, 3, 4 или 5 незаряженных связей, такие как приблизительно 4-5 или 4 или 5 на каждые 10 незаряженных связей.

Определенные варианты осуществления включают антисмысловые олигомеры, которые содержат приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% катионных связей. В некоторых вариантах осуществления оптимальное улучшение антисмысловой активности можно наблюдать, если приблизительно 25% связей остова являются катионными. В некоторых вариантах осуществления улучшение можно наблюдать с меньшим количеством, например, 10-20% катионных связей, или когда количество катионных связей находится в диапазоне 50-80%, такое как приблизительно 60%.

В некоторых вариантах осуществления катионные связи распределены вдоль остова. Данные олигомеры необязательно содержат, по меньшей мере, две последовательные незаряженные связи; т.е. олигомер необязательно не содержит строго чередующийся порядок вдоль всей своей длины. В конкретных случаях, каждая одна или две катионные связи разделены вдоль остова, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4 или 5 незаряженными связями.

Также включенными являются олигомеры, содержащие блоки катионных связей и блоки незаряженных связей. Например, центральный блок незаряженных связей может быть фланкирован блоками катионных связей или наоборот. В некоторых вариантах осуществления олигомер имеет приблизительно равные по длине 5', 3' и центральную области, и процент катионных связей в центральной области является большим чем приблизительно 50, 60, 70 или 80% суммарного количества катионных связей.

В определенных антисмысловых олигомерах, большое количество катионных связей (например, 70, 75, 80, 90% катионных связей) распределено близко к "центральной области" связей остова, например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 самые центральные связи. Например, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24-мерный олигомер может содержать, по меньшей мере, 50, 60, 70 или 80% всех катионных связей, расположенных в 8, 9, 10, 11 или 12 самых центральных связей.

В. Характеристики химии остова.

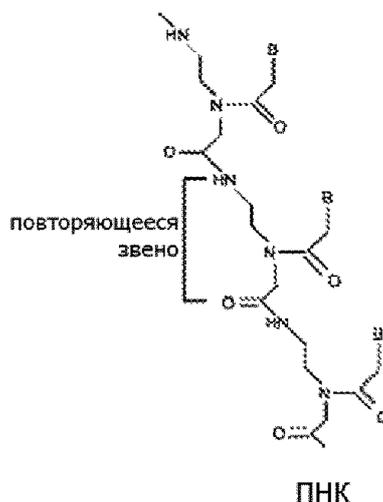
Для антисмысловых олигомеров можно применять ряд антисмысловых химий. Примеры олигомер-

ных химий включают, без ограничения, фосфорамидатные морфолиновые олигомеры и фосфородиамидатные морфолиновые олигомеры (РМО), модифицированные фосфоротиоатами олигомеры, 2'-О-метилмодифицированные олигомеры, пептидо-нуклеиновую кислоту (ПНК), конформационно запертую нуклеиновую кислоту (LNA), фосфоротиоатные олигомеры, 2'-О-МОЕ модифицированные олигомеры, 2'-фтор-модифицированный олигомер, нуклеиновые кислоты с 2'О,4'С-этиленовой мостиковой связью (ЕНА), трицикло-ДНК, трицикло-ДНК фосфоротиоатные нуклеотиды, 2'-О-[2-(N-метилкарбамоил)этил]модифицированные олигомеры, морфолиновые олигомеры, фосфорамидатные морфолиновые олигомеры, конъюгированные с пептидами (РРМО), фосфородиамидатные морфолиновые олигомеры, содержащие атом фосфора с (i) ковалентными связями с атомом азота морфолинового кольца, и (ii) второй ковалентной связью с (1,4-пиперазин)-1-ильным заместителем или с замещенным (1,4-пиперазин)-1-илом (РМОplus), и фосфородиамидатные морфолиновые олигомеры, содержащие атом фосфора с (i) с ковалентной связью с атомом азота морфолинового кольца и (ii) второй ковалентной связью с кольцевым азотом 4-аминопиперидин-1-ила (т.е. APN) или производного 4-аминопиперидин-1-ила (РМО-X), включая комбинации любого из приведенных выше. В общем, в ПНК и LNA химиях можно применять более короткие нацеливающие последовательности из-за их относительно высокой силы связывания с мишенью по сравнению с РМО и 2'-О-Ме модифицированными олигомерами. Фосфоротиоатные и 2'-О-Ме-модифицированные химии можно комбинировать для получения 2'-О-Ме-фосфоротиоатного остова. См., например, РСТ публикации № WO 2013/112053 и WO 2009/008725, которые включены в настоящее изобретение с помощью ссылки во всей своей полноте.

В некоторых случаях, бессмысловые олигомеры, такие как РМО, можно конъюгировать с проникающими пептидами (СРР), облегчая внутриклеточную доставку. Конъюгированные с пептидами РМО называют РРМО, и определенные варианты осуществления включает варианты, описанные в РСТ публикации № WO 2012/150960, включенной в настоящее изобретение с помощью ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления можно применять богатую аргинином пептидную последовательность, конъюгированную или соединенную, например, с 3' концом бессмыслового олигомера, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления можно применять богатую аргинином пептидную последовательность, конъюгированную или соединенную, например, с 5' концом бессмыслового олигомера, как описано в настоящем изобретении.

1. Пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК).

Пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК) представляют собой аналоги ДНК, в которых остов является структурно гомоморфным с дезоксирибозным остовом, состоящий из N-(2-аминоэтил)глициновых звеньев, с которыми соединены пиримидиновые или пуриновые основания. ПНК, содержащие природные пиримидиновые и пуриновые основания, гибридизуются с комплементарными олигомерами, следуя правилам спаривания оснований по Уотсону-Крику, и имитируют ДНК с точки зрения узнавания пар оснований (Egholm, Vuchardt et al. 1993). Остов ПНК образован пептидными связями, а не фосфодиэфирными связями, делая их подходящими для бессмысловых применений (смотри структуру ниже). Остов является незаряженным, приводя в результате к ПНК/ДНК или ПНК/РНК дуплексам, которые показывают большую чем обычно термическую стабильность. ПНК не узнаются нуклеазами или протеазами. Неограничивающий пример ПНК показан ниже:



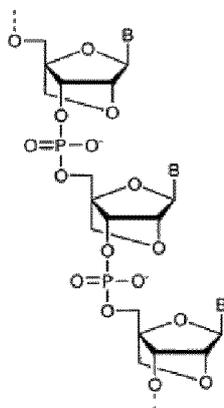
Несмотря на радикальное структурное изменение в природной структуре, ПНК способны специфически связываться в спиральной форме с ДНК или РНК. Характеристики ПНК включают высокое связывающее сродство с комплементарной ДНК или РНК, дестабилизирующий эффект, вызванный единичным некомплементарным основанием, устойчивость к нуклеазам и протеазам, гибридизацию с ДНК или РНК, независимо от концентрации солей, и образование триплексов с гомопуриновыми ДНК. PANAGENE™ разработала свои запатентованные Bts ПНК мономеры (Bts; бензотиазол-2-

сульфонильная группа) и запатентованный способ олигомеризации. ПНК олигомеризация, применяя Bts ПНК мономеры, состоит из повторяющихся циклов деблокирования, конденсации и кэппинга. ПНК можно получить синтетически, применяя любой способ, известный в данной области техники. См., например, патенты США № 6969766, 7211668, 7022851, 7125994, 7145006 и 7179896. См. также патенты США № 5539082; 5714331; и 5719262 для получения ПНК. Дополнительные рекомендации для ПНК соединений можно найти в Nielsen et al., Science, 254:1497-1500, 1991. Каждый из приведенных выше документов включен с помощью ссылки во всей своей полноте.

2. Конформационно запертые нуклеиновые кислоты (LNA).

Антисмысловые олигомерные соединения могут также содержать звенья "конформационно запертой нуклеиновой кислоты" (LNA). "LNA" являются членом класса модификаций, называемых мостиковыми нуклеиновыми кислотами (BNA). BNA характеризуются ковалентной связью, которая запирает конформацию рибозного кольца в C3'-эндо (нозерн) изломе плоскости углеводного кольца. Для LNA, мостик состоит из метилена между 2'-O и the 4'-C положениями. LNA улучшает предорганизацию остова и стэкинг оснований, улучшая гибридизацию и термическую стабильность.

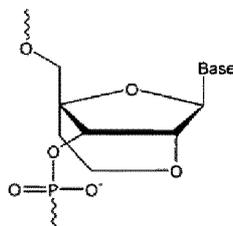
Структуры LNA можно найти, например, в Wengel, et al., Chemical Communications (1998) 455; Tetrahedron (1998) 54:3607, и Accounts of Chem. Research (1999) 32:301; Obika et al., Tetrahedron Letters (1997) 38:8735; (1998) 39:5401, и Bioorganic Medicinal Chemistry (2008) 16:9230, которые включены в настоящее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



LNA

Соединения настоящего изобретения могут вводить одну или более LNA; в некоторых случаях, соединения могут полностью состоять из LNA. Способы получения отдельных LNA нуклеозидных звеньев и их включение в олигомеры описано, например, в патентах США № 7572582, 7569575, 7084125, 7060809, 7053207, 7034133, 6794499 и 6670461, каждый из которых включен с помощью ссылки во всей своей полноте. Стандартные межзвенные линкеры включают фосфодиэфирные и фосфоротиоатные фрагменты; альтернативно, можно применять линкеры, не содержащие фосфор. Дополнительные варианты осуществления включают соединение, содержащее LNA, где каждое LNA звено отделено ДНК звеном. Определенные соединения состоят из чередующихся LNA и ДНК звеньев, где межзвенный линкер представляет собой фосфоротиоат.

Нуклеиновые кислоты с 2'O,4'C-этиленовым мостиком (ENA) представляют собой другой член класса BNA. Неограничивающий пример показан ниже:

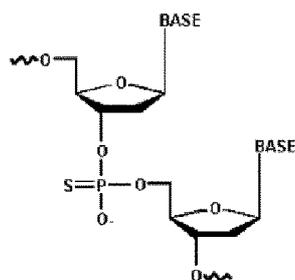


ENA

ENA олигомеры и их получение описано в Obika et al., Tetrahedron Lett 38 (50): 8735, которая включена с помощью ссылки во всей своей полноте. Соединения настоящего изобретения могут вводить одно или более ENA звеньев.

3. Фосфоротиоаты.

"Фосфоротиоаты" (или S-олиги) представляют собой вариант ДНК, в котором один из соседних кислородов заменен на серу. Неограничивающий пример фосфоротиоата показан ниже:

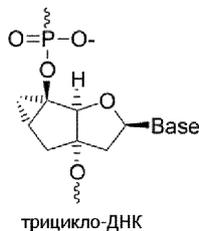


Введение серы в межнуклеотидную связь ослабляет действие эндо- и экзонуклеаз, включая 5'-3' и 3'-5' ДНК POL I экзонуклеазу, нуклеазы S1 и P1, РНКазу, сывороточные нуклеазы и фосфодиэстеразу змеиного яда. Фосфоротиоаты получают двумя принципиальными способами: действием раствора элементарной серы в дисульфиде углерода на гидрофосфат, или способом введения серы через триэфир фосфита или с дисульфидом тетраэтилтиурама (TETD) или 3Н-1,2-бензодитиол-3-он 1,1-диоксида (BDTD) (смотри, например, Iyeg et al., J. Org. Chem. 55, 4693-4699, 1990, которые включены в настоящее изобретение с помощью ссылки во всей своей полноте). Последний способ избегает проблемы с нерастворимостью элементарной серы в большинстве неорганических растворителей и токсичностью дисульфида углерода. TETD и BDTD способы также дают фосфоротиоаты с высокой чистотой.

4. Трицикло-ДНК и трицикло-фосфоротиоатные нуклеотиды.

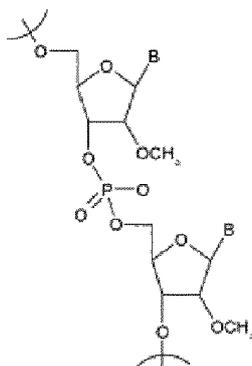
Трицикло-ДНК (tc-ДНК) представляют собой класс затрудненных ДНК аналогов, в которых каждый нуклеотид модифицирован введением циклопропанового кольца, ограничивающего конформационную гибкость остова и оптимизирующего геометрию остова торсионного угла γ . Гомоосновные содержащие аденин- и тимин трицикло-ДНК образуют необычайно стабильные пары А-Т оснований с комплементарными РНК. Трицикло-ДНК и их получение описано в международной патентной заявке № WO 2010/115993, которая включена в настоящее изобретение с помощью ссылки во всей своей полноте. Соединения настоящего изобретения могут вводить один или более трицикло-ДНК нуклеотидов; в некоторых случаях, соединения могут полностью состоять из трицикло-ДНК нуклеотидов.

Трицикло-фосфоротиоатные нуклеотиды представляют собой трицикло-ДНК нуклеотиды с фосфоротиоатными межнуклеотидными связями. Трицикло-фосфоротиоатные нуклеотиды и их получение описано в международной патентной заявке № WO 2013/053928, которая включена в настоящее изобретение с помощью ссылки во всей своей полноте. Соединения настоящего изобретения могут вводить один или более трицикло-ДНК нуклеотидов; в некоторых случаях, соединения могут полностью состоять из трицикло-ДНК нуклеотидов. Неограничивающий пример трицикло-ДНК/трицикло-фосфоротиоатного нуклеотида показан ниже:

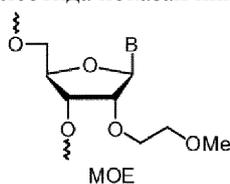


5. 2'-О-Метил, 2'-О-МОЕ и 2'-F олигомеры.

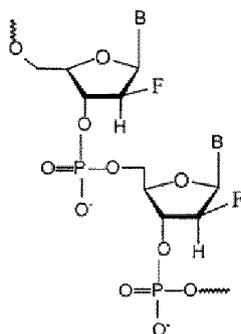
Молекулы "2'-О-Ме олигомера" несут метильную группу при 2'-ОН остатке молекулы рибозы. 2'-О-Ме-РНК показывает такое же (или аналогичное) поведение как ДНК, но защищена от разрушения нуклеазами. 2'-О-Ме-РНК можно также комбинировать с фосфоротиоатными олигомерами (РТО) для дополнительной стабилизации. 2'-О-Ме олигомеры (фосфодиэфир или фосфоротиоат) можно получить согласно способам, стандартным в данной области техники (смотри, например, Yoo et al., Nucleic Acids Res. 32:2008-16, 2004, которая включена с помощью ссылки во всей своей полноте). Неограничивающий пример 2'-О-Ме олигомера показан ниже:



2'-О-Ме олигомеры могут также содержать фосфоротиоатную связь (2'-О-Ме фосфоротиоатные олигомеры). 2'-О-Метоксиэтильные олигомеры (2'-О-МОЕ), подобно 2'-О-Ме олигомерам, несут метоксиэтильную группу при 2'-ОН остатке молекулы рибозы и обсуждаются в Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 78, 486-504, 1995, которая включена в настоящее изобретение с помощью ссылки во всей своей полноте. Неограничивающий пример 2'-О-МОЕ нуклеотида показан ниже:



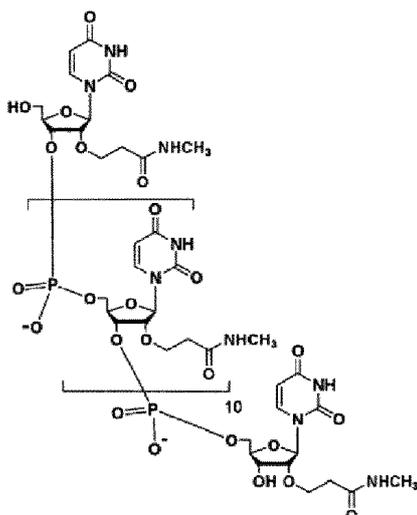
В отличие от предшествующих производных с алкилированным 2'-ОН рибозы, 2'-фторные олигомеры содержат остаток фтора в 2' положении вместо 2'-ОН. Неограничивающий пример 2'-F олигомера показан ниже:



2'-Фторные олигомеры дополнительно обсуждаются в WO 2004/043977, которая включена с помощью ссылки во всей своей полноте. Соединения настоящего изобретения могут вводить один или более 2'-О-метильных, 2'-О-МОЕ и 2'-F звеньев и можно применять в них любые межнуклеотидные связи. В некоторых случаях, соединение настоящего изобретения может состоять полностью из 2'-О-метильных, 2'-О-МОЕ или 2'-F звеньев. Один вариант осуществления соединения настоящего изобретения состоит полностью из 2'-О-метильных звеньев.

6. 2'-О-[2-(N-метилкарбамоил)этильные] олигонуклеотиды (МСЕ).

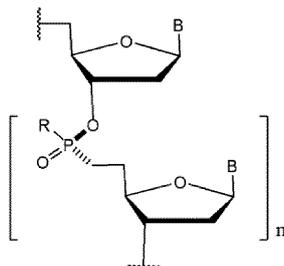
МСЕ представляет собой другой пример 2'-О модифицированных рибонуклеотидов, пригодный в соединениях настоящего изобретения. В настоящем изобретении, 2'-ОН дериватизируют до 2-(N-метилкарбамоил)этильного фрагмента, увеличивая устойчивость к нуклеазам. Неограничивающий пример МСЕ олигомера показан ниже:



МСЕ и его получение описано в Yamada et al., *J. Org. Chem.*, 76(9):3042-53, которая включена с помощью ссылки во всей своей полноте. Соединения настоящего изобретения могут вводить один или более МСЕ звеньев.

7. Стереоспецифические олигомеры.

Стереоспецифические олигомеры представляют собой олигомеры, в которых стереохимия каждой содержащей фосфор связи фиксирована способом получения так, что получают по существу один чистый олигомер. Неограничивающий пример стереоспецифического олигомера показан ниже:



В примере выше каждый фосфор олигомера имеет одинаковую стереохимию. Дополнительные примеры включают олигомеры, описанные выше. Например, LNA, ENA, трицикло-ДНК, МСЕ, 2' O-метил, 2' O-МОЕ, 2'-F олигомеры и олигомеры на основе морфолина можно получить со стереоспецифическими содержащими фосфор межнуклеотидными связями, такими как, например, фосфоротиоат, фосфодизфир, фосфорамидат, фосфородиамидат или другие содержащие фосфор межнуклеотидные связи. Стереоспецифические олигомеры, способы получения, получение с контролем хиральности, хиральный дизайн и хиральные вспомогательные вещества для применения в получении данных олигомеров описаны, например, в WO 2015107425, WO 2015108048, WO 2015108046, WO 2015108047, WO 2012039448, WO 2010064146, WO 2011034072, WO 2014010250, WO 2014012081, WO 20130127858 и WO 2011005761, каждый из которых включен с помощью ссылки во всей своей полноте.

8. Олигомеры на основе морфолина.

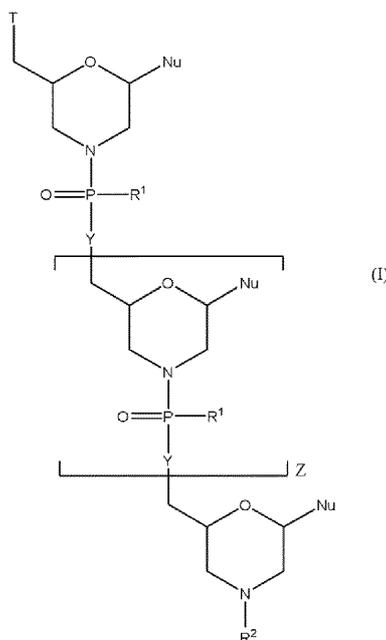
Олигомеры на основе морфолина относятся к олигомеру, содержащему морфолиновые звенья, несущие нуклеиновое основание и, вместо рибозы, содержащие морфолиновое кольцо. Примеры межнуклеотидных связей включают, например, фосфорамидатные или фосфородиамидатные межнуклеотидные связи, соединяющие азот морфолинового кольца одного морфолинового звена с 4' экзоциклическим углеродом соседнего морфолинового звена. Каждое морфолиновое звено содержит пуриновое или пиримидиновое нуклеиновое основание, эффективно связывающееся, специфическими для оснований водородными связями, с основанием в олигонуклеотиде.

Олигомеры на основе морфолина (включая антисмысловые олигомеры) подробно описаны, например, в патентах США № 5698685; 5217866; 5142047; 5034506; 5166315; 5185444; 5521063; 5506337 и рассматриваемых патентных заявках США № 12/271,036; 12/271,040; и РСТ публикации No. WO 2009/064471 и WO 2012/043730 и Summerton et al. 1997, *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*, 7, 187-195, которые включены в настоящее изобретение с помощью ссылки во всей своей полноте. В структуре олигомера, фосфатные группы обычно называют образующими "межнуклеотидные связи" олигомера. Природная межнуклеотидная связь РНК и ДНК представляет собой 3'-5' фосфодизфирную связь. "Фосфорамидатная" группа содержит фосфор, имеющий три присоединенных атома кислорода и один присоединенный атом азота, тогда как "фосфородиамидатная" группа содержит фосфор, имеющий два присоединенных атома кислорода и два присоединенных атома азота. В незаряженных или катионных

межвенных связях олигомеров на основе морфолина, описанных в настоящем изобретении, один азот всегда висит на цепи остова. Второй азот в фосфородиамидатной связи обычно представляет собой кольцевой азот в структуре с морфолиновым кольцом.

"РМО-Х" относится к фосфородиамидатным олигомерам на основе морфолина, содержащим атом фосфора с (i) ковалентной связью с атомом азота морфолинового кольца и (ii) второй ковалентной связью с кольцевым азотом 4-аминопиперидин-1-ила (т.е. APN) или производного 4-аминопиперидин-1-ила. Примеры РМО-Х олигомеров описаны в РСТ заявке № РСТ/US2011/38459 и РСТ заявке № WO 2013/074834, которые включены в настоящее изобретение с помощью ссылки во всей своей полноте. РМО-Х включают "РМО-арп" или "APN," который относится к РМО-Х олигомеру, который содержит по меньшей мере одну межнуклеотидную связь, где атом фосфора соединен с морфолиновой группой и кольцевым азотом 4-аминопиперидин-1-ила (т.е. APN). В конкретных вариантах осуществления, антисмысловый олигомер, содержащий нацеливающую последовательность, как указано в табл. 2А, 2В или 2С, содержит по меньшей мере одну содержащую APN связь или связь, содержащую производное APN. Различные варианты осуществления включают олигомеры на основе морфолина, которые содержат приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% связей, содержащих APN/APN производное, где оставшиеся связи (если их меньше чем 100%) представляют собой неизменные связи, например, приблизительно или, по меньшей мере, приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 суммарных межнуклеотидных связей представляют собой связи, содержащие APN/APN производное.

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

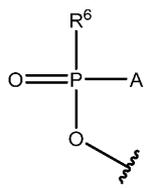


или его фармацевтически приемлемую соль, где каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность;

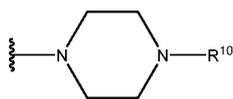
Z представляет собой целое от 8 до 38;

каждый Y независимо выбран из O и -NR⁴, где каждый R⁴ независимо выбран из H, C₁-C₆-алкила, аралкила, C(=NH)NH₂, C(O)(CH₂)_nNR⁵C(=NH)NH₂, C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NR⁵C(=NH)NH₂ и G, где R⁵ выбран из H и C₁-C₆-алкила, и p представляет собой целое от 1 до 5;

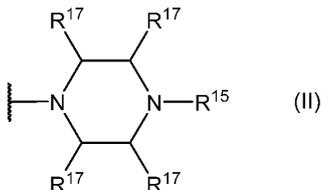
T выбран из OH и фрагмента формулы



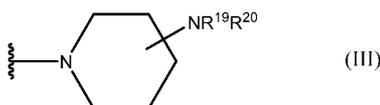
где A выбран из -OH, -N(R⁷)₂ и R¹, где каждый R⁷ независимо выбран из H и C₁-C₆-алкила, и R⁶ выбран из OH, -N(R⁹)CH₂C(O)NH₂ и фрагмента формулы:



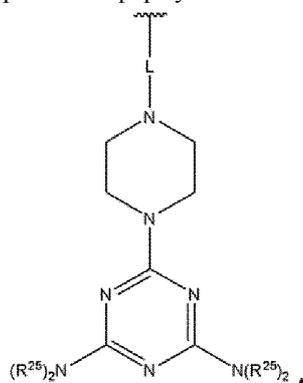
где R^9 выбран из H и C_1 - C_6 -алкила; и R^{10} выбран из G, $C(O)-R^{11}OH$, ацила, тритила, 4 метокситритила, $C(=NH)NH_2$, $C(O)(CH_2)_mNR^{12}C(=NH)NH_2$, и $C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{12}C(=NH)NH_2$, где m представляет собой целое от 1 до 5, R^{11} имеет формулу $-(O-алкил)_y-$, где y представляет собой целое от 3 до 10, и каждая из алкильных групп независимо выбрана из C_2 - C_6 -алкила; и R^{12} выбран из H и C_1 - C_6 -алкила; каждый случай R^1 независимо выбран из $-N(R^{13})_2$, где каждый R^{13} независимо выбран из H и C_1 - C_6 -алкила; фрагмента формулы (II)



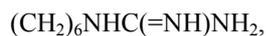
где R^{15} выбран из H, G, C_1 - C_6 -алкила, $C(=NH)NH_2$, $C(O)(CH_2)_qNR^{18}C(=NH)NH_2$ и $C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{18}C(=NH)NH_2$, где R^{18} выбран из H и C_1 - C_6 -алкила; и q представляет собой целое от 1 до 5, и каждый R^{17} независимо выбран из H и метила; и фрагмента формулы (III)



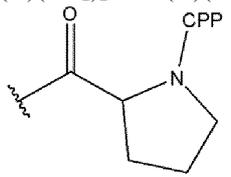
где R^{19} выбран из H, C_1 - C_6 -алкила, $C(=NH)NH_2$, $C(O)(CH_2)_rNR^{22}C(=NH)NH_2$, $C(O)CH(NH_2)(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$, $C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{22}C(=NH)NH_2$, $C(O)CH(NH_2)(CH_2)_4NH_2$ и G, где R^{22} выбран из H и C_1 - C_6 -алкила; и r представляет собой целое от 1 до 5, и R^{20} выбран из H и C_1 - C_6 -алкила; или R^{19} и R^{20} вместе с атомом азота, с которым они соединены, образуют гетероциклическое или гетероарильное кольцо, содержащее 5-7 кольцевых атомов и необязательно содержащее дополнительный гетероатом, выбранный из кислорода, азота и серы; и R^2 выбран из H, G, ацила, тритила, 4 метокситритила, бензоила, стеароила, C_1 - C_6 -алкила, $C(=NH)NH_2$, $C(O)R^{23}$, $C(O)(CH_2)_5NR^{24}C(=NH)NH_2$, $C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{24}C(=NH)NH_2$, $C(O)CH(NH_2)(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ и фрагмента формулы



где R^{23} имеет формулу $-(O-алкил)_v-OH$, где v представляет собой целое от 3 до 10 и каждая из v алкильных групп независимо выбрана из C_2 - C_6 -алкила; и R^{24} выбран из H и C_1 - C_6 -алкила; s представляет собой целое от 1 до 5; L выбран из $-C(O)(CH_2)_6C(O)-$ и $C(O)(CH_2)_2S_2(CH_2)_2C(O)-$; и каждый R^{25} имеет формулу $-(CH_2)_2OC(O)N(R^{26})_2$, где каждый R^{26} имеет формулу

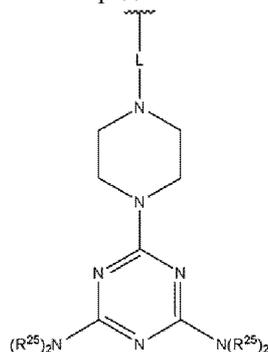


где G представляет собой проникающий пептид ("CPP") и линкерный фрагмент, выбранный из $\text{C(O)(CH}_2)_5\text{NH CPP}$, $\text{C(O)(CH}_2)_2\text{NH CPP}$, $\text{C(O)(CH}_2)_2\text{NHC(O)(CH}_2)_5\text{NH CPP}$, $\text{C(O)CH}_2\text{NH CPP}$ и



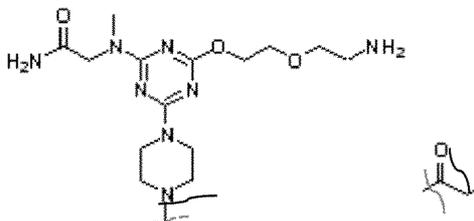
где CPP соединен с линкерным фрагментом через амидную связь по карбокси концу CPP, и где G может присутствовать при одном появлении или отсутствовать.

В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой фрагмент формулы



где L выбран из $\text{C(O)(CH}_2)_6\text{C(O)}$ - или $-\text{C(O)(CH}_2)_2\text{S}_2(\text{CH}_2)_2\text{C(O)}$ -, и каждый R^{25} имеет формулу $-(\text{CH}_2)_2\text{OC(O)N(R}^{26})_2$, где каждый R^{26} имеет формулу $(\text{CH}_2)_6\text{NHC(=NH)NH}_2$. Данные фрагменты дополнительно описаны в патенте США № 7935816, включенном в настоящее изобретение с помощью ссылки во всей своей полноте.

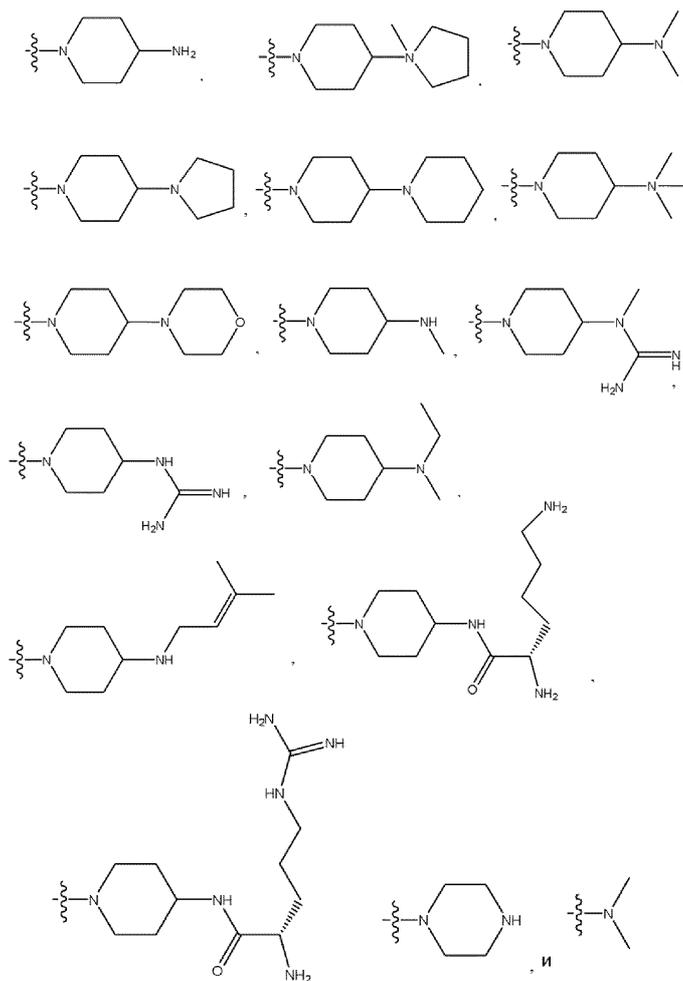
В некоторых вариантах осуществления R^2 может содержать любой из фрагментов, показанных ниже:



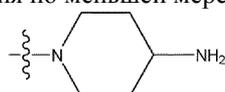
В некоторых вариантах осуществления каждый R^1 представляет собой $\text{N(CH}_3)_2$. В некоторых вариантах осуществления приблизительно 50-90% R_1 групп представляют собой диметиламино (т.е. $\text{N(CH}_3)_2$). В некоторых вариантах осуществления приблизительно 66% R_1 групп представляют собой диметиламино.

В некоторых неограничивающих вариантах осуществления нацеливающая последовательность выбрана из последовательностей табл. 2A-2C, где X выбран из урацила (U) или тимина (T). В некоторых неограничивающих вариантах осуществления каждый R^1 представляет собой $\text{N(CH}_3)_2$, и нацеливающая последовательность выбрана из последовательностей табл. 2A-2C, где X выбран из урацила (U) или тимина (T).

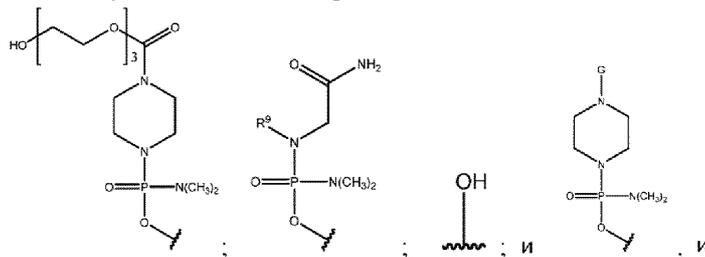
В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения R_1 можно выбрать из



В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R^1 представляет собой

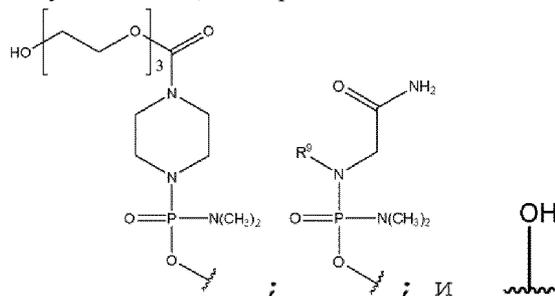


В некоторых вариантах осуществления T выбран из

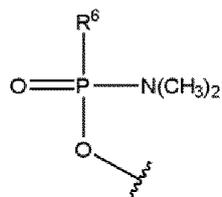


Y представляет собой O при каждом появлении. В некоторых вариантах осуществления R^2 выбран из H , G , ацила, тритила, 4 метокситритила, бензоила и стеароила.

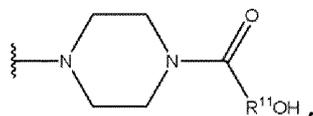
В различных вариантах осуществления, T выбран из



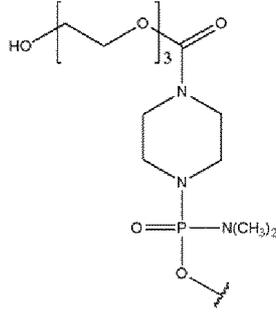
Y представляет собой O при каждом появлении и R^2 представляет собой G .
В некоторых вариантах осуществления T имеет формулу



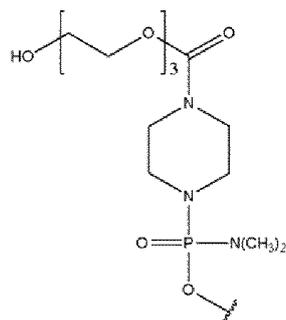
R^6 имеет формулу



Y представляет собой O при каждом появлении, и R^2 представляет собой G .
В некоторых вариантах осуществления T имеет формулу

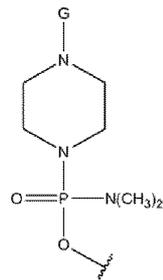


Y представляет собой O при каждом появлении, и R^2 представляет собой G . В некоторых вариантах осуществления T имеет формулу

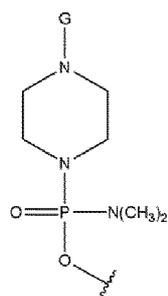


Y представляет собой O при каждом появлении, каждый R^1 представляет собой $-N(CH_3)_2$, и R^2 представляет собой G .

В некоторых вариантах осуществления T имеет формулу

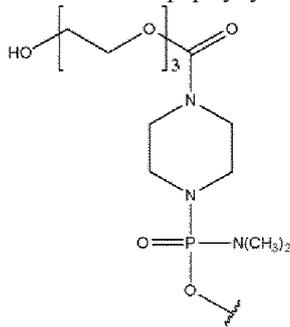


и Y представляет собой O при каждом появлении. В некоторых вариантах осуществления T имеет формулу



Y представляет собой O при каждом появлении, каждый R^1 представляет собой $-N(CH_3)_2$, и R^2 представляет собой ацетил.

В некоторых вариантах осуществления T имеет формулу

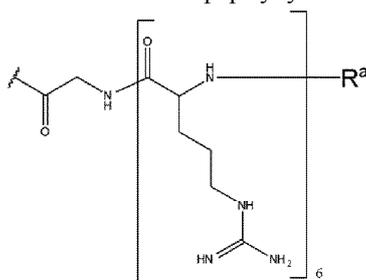


Y представляет собой O при каждом появлении, каждый R^1 представляет собой $-N(CH_3)_2$, и R^2 представляет собой H.

В некоторых вариантах осуществления R^2 выбран из H, ацила, тритила, 4 метокситритила, бензоила и стеарила.

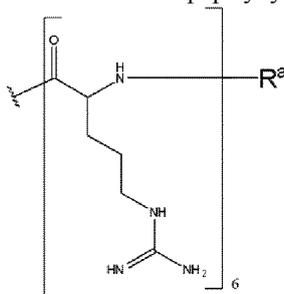
В различных вариантах осуществления R^2 выбран из H или G. В конкретном варианте осуществления, R^2 представляет собой G. В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой H или ацил. В некоторых вариантах осуществления каждый R^1 представляет собой $N(CH_3)_2$. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один случай R^1 представляет собой $N(CH_3)_2$. В некоторых вариантах осуществления каждый случай R^1 представляет собой $N(CH_3)_2$.

В некоторых вариантах осуществления G имеет формулу



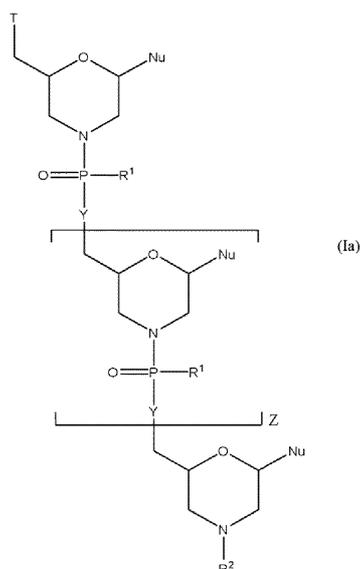
где R^a выбран из H, ацила, бензоила и стеарила. В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

В некоторых вариантах осуществления CPP имеет формулу



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

В другом аспекте, антисмысловый олигомер представляет собой соединение формулы (Ia)

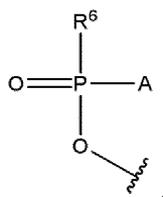


или его фармацевтически приемлемую соль, где каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность;

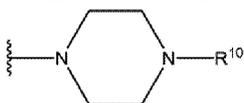
Z представляет собой целое от приблизительно 13 до приблизительно 38;

каждый Y независимо выбран из O и $-NR^4$, где каждый R^4 независимо выбран из H, C_1 - C_6 -алкила, аралкила, $C(=NH)NH_2$, $C(O)(CH_2)_nNR^5C(=NH)NH_2$, $C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^5C(=NH)NH_2$ и G, где R^5 выбран из H и C_1 - C_6 -алкила, и n представляет собой целое от 1 до 5;

T выбран из OH и фрагмента формулы



где A выбран из $-OH$, $-N(R^7)_2$ и R^1 , где каждый R^7 независимо выбран из H и C_1 - C_6 -алкила, и R^6 выбран из OH , $-N(R^9)CH_2C(O)NH_2$ и фрагмента формулы



где R^9 выбран из H и C_1 - C_6 -алкила; и

R^{10} выбран из G, $C(O)-R^{11}OH$, ацила, тритила, 4 метокситритила, $C(=NH)NH_2$, $C(O)(CH_2)_mNR^{12}C(=NH)NH_2$, и $C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{12}C(=NH)NH_2$, где

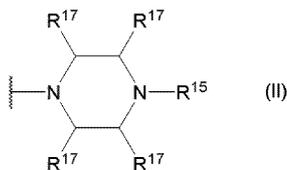
m представляет собой целое от 1 до 5,

R^{11} имеет формулу $-(O-алкил)_y-$, где y представляет собой целое от 3 до 10, и

каждая из алкильных групп независимо выбрана из C_2 - C_6 -алкила; и

R^{12} выбран из H и C_1 - C_6 -алкила; каждый случай R^1 независимо выбран из

$-N(R^{13})_2$, где каждый R^{13} независимо выбран из H и C_1 - C_6 -алкила; фрагмента формулы (II)



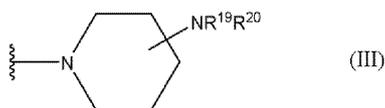
где R^{15} выбран из H, G, C_1 - C_6 -алкила, $C(=NH)NH_2$, $C(O)(CH_2)_qNR^{18}C(=NH)NH_2$ и $C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{18}C(=NH)NH_2$, где

R^{18} выбран из H и C_1 - C_6 -алкила; и

q представляет собой целое от 1 до 5; и

каждый R^{17} независимо выбран из H и метила; и

фрагмента формулы (III)



где R^{19} выбран из H, C_1 - C_6 -алкила, $C(=NH)NH_2$, $C(O)(CH_2)_5NR^{22}C(=NH)NH_2$, $C(O)CH(NH_2)(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$, $C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{22}C(=NH)NH_2$, $C(O)CH(NH_2)(CH_2)_4NH_2$ и G, где

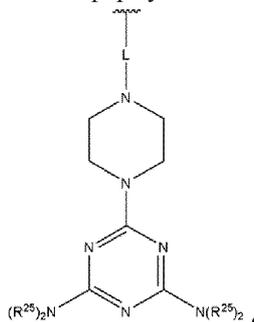
R^{22} выбран из H и C_1 - C_6 -алкила; и

г представляет собой целое от 1 до 5, и

R^{20} выбран из H и C_1 - C_6 -алкила; или

R^{19} и R^{20} вместе с атомом азота, с которым они соединены, образуют гетероциклическое или гетероарильное кольцо, содержащее 5-7 кольцевых атомов и необязательно содержащее дополнительный гетероатом, выбранный из кислорода, азота и серы; и

R^2 выбран из H, G, ацила, тритила, 4 метокситритила, бензоила, стеароила, C_1 - C_6 -алкила, $C(=NH)NH_2$, $C(O)R^{23}$, $C(O)(CH_2)_5NR^{24}C(=NH)NH_2$, $C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{24}C(=NH)NH_2$, $C(O)CH(NH_2)(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ и фрагмента формулы



где R^{23} имеет формулу $-(O\text{-алкил})_v\text{-OH}$, где v представляет собой целое от 3 до 10, и каждая v алкильных групп независимо выбрана из C_2 - C_6 -алкила; и

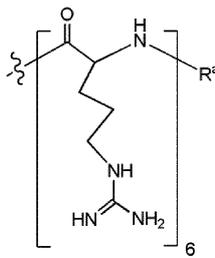
R^{24} выбран из H и C_1 - C_6 -алкила;

s представляет собой целое от 1 до 5;

L выбран из $-C(O)(CH_2)_6C(O)-$ и $C(O)(CH_2)_2S_2(CH_2)_2C(O)-$; и

каждый R^{25} имеет формулу $-(CH_2)_2OC(O)N(R^{26})_2$, где каждый R^{26} имеет формулу $-(CH_2)_6NHC(=NH)NH_2$,

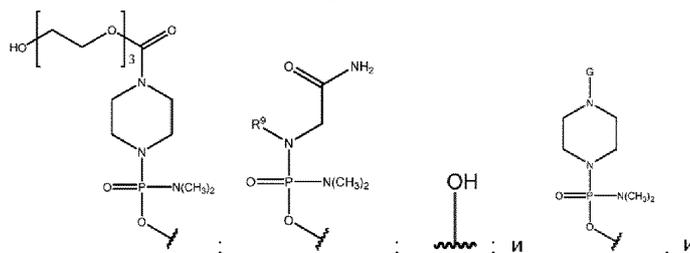
где G представляет собой проникающий пептид ("CPP") и линкерный фрагмент, имеющий формулу $C(O)CH_2NH\text{ CPP}$, где CPP имеет формулу



где R^a представляет собой H или ацил, и

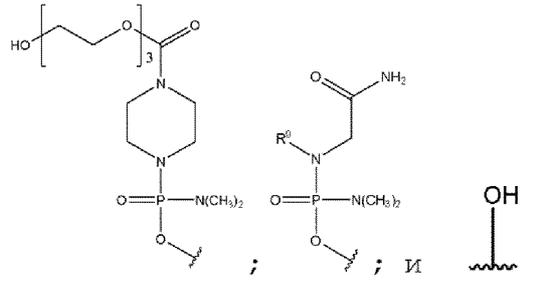
где G может присутствовать при одном появлении или отсутствовать.

В некоторых вариантах осуществления T выбран из

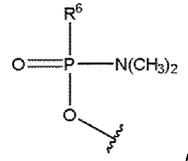


Y представляет собой O при каждом появлении. В некоторых вариантах осуществления R^2 выбран из H, G, ацила, тритила, 4 метокситритила, бензоила и стеароила.

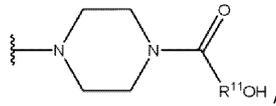
В различных вариантах осуществления, T выбран из



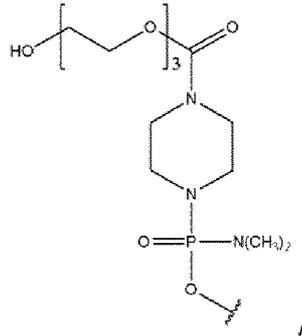
Y представляет собой O при каждом появлении, и R² представляет собой G.
В некоторых вариантах осуществления T имеет формулу



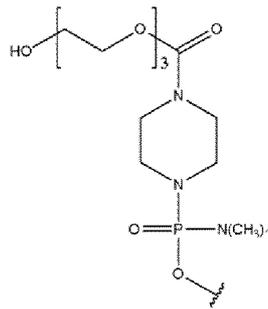
R⁶ имеет формулу



Y представляет собой O при каждом появлении, и R² представляет собой G.
В некоторых вариантах осуществления T имеет формулу

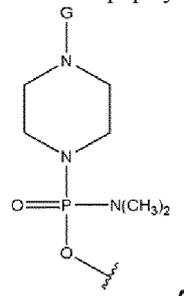


Y представляет собой O при каждом появлении, и R² представляет собой G. В некоторых вариантах осуществления T имеет формулу

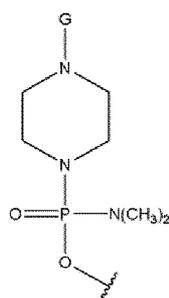


Y представляет собой O при каждом появлении, каждый R¹ представляет собой -N(CH₃)₂, и R² представляет собой G.

В некоторых вариантах осуществления T имеет формулу

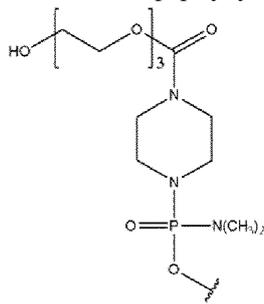


и Y представляет собой O при каждом появлении. В некоторых вариантах осуществления T имеет формулу



Y представляет собой O при каждом появлении, каждый R¹ представляет собой -N(CH₃)₂, и R² представляет собой ацетил.

В некоторых вариантах осуществления T имеет формулу



Y представляет собой O при каждом появлении, каждый R¹ представляет собой -N(CH₃)₂, и R² представляет собой H.

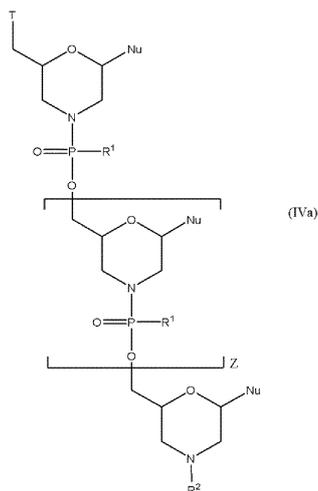
В некоторых вариантах осуществления R² выбран из H, ацила, тритила, 4 метокситритила, бензоила и стеароила.

В различных вариантах осуществления R² выбран из H или G. В конкретном варианте осуществления, R² представляет собой G. В некоторых вариантах осуществления R² представляет собой H или ацил. В некоторых вариантах осуществления каждый R¹ представляет собой N(CH₃)₂. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один случай R¹ представляет собой N(CH₃)₂. В некоторых вариантах осуществления каждый случай R¹ представляет собой N(CH₃)₂.

В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

В некоторых вариантах осуществления включая, например, варианты осуществления антисмысловых олигомеров формулы (I) и (Ia), нацеливающая последовательность является комплементарной области-мишени в интроне 1 (SEQ ID NO: 1) пре-мРНК гена человеческой альфа гликозидазы (GAA). В различных вариантах осуществления, включая, например, варианты осуществления антисмысловых олигомеров формулы (I) и (Ia), нацеливающая последовательность является комплементарной области-мишени в интроне 1 (SEQ ID NO: 1) пре-мРНК гена человеческой альфа гликозидазы (GAA), где область-мишень содержит по меньшей мере одно дополнительное нуклеиновое основание по сравнению с нацеливающей последовательностью, где по меньшей мере одно дополнительное нуклеиновое основание не имеет комплементарного нуклеинового основания в нацеливающей последовательности и где по меньшей мере одно дополнительное нуклеиновое основание является внутренним к области-мишени. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность включает последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 13-86, как показано в таблицах 2A-2C в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность включает последовательность, выбранную из табл. 2A и 2B. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 27-29, 34-36, 59 и 82. Кроме того и относительно последовательностей, перечисленных в табл. 2A-2C (или табл. 2B и 2C) в настоящем изобретении, в определенных вариантах осуществления, выбрана последовательность с 100% комплементарностью, и удалено одно или более нуклеиновых оснований (или альтернативно получены с одним или более отсутствующими нуклеиновыми основаниями) так, что полученная в результате последовательность имеет один или более отсутствующих нуклеиновых оснований, по сравнению с его природным комплементом в области-мишени. За исключением части, где удалено одно или более нуклеиновых оснований, предполагается, чтобы оставшиеся части были на 100% комплементарными. Однако включено в объем настоящего изобретения то, что могут быть представлены сниженные степени комплементарности.

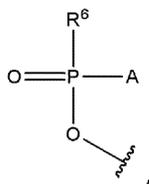
В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер настоящего изобретения представляет собой соединение формулы (IVa)



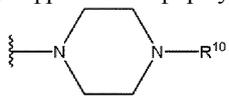
или его фармацевтически приемлемую соль, где каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность;

Z представляет собой целое от 8 до 38;

T выбран из OH и фрагмента формулы

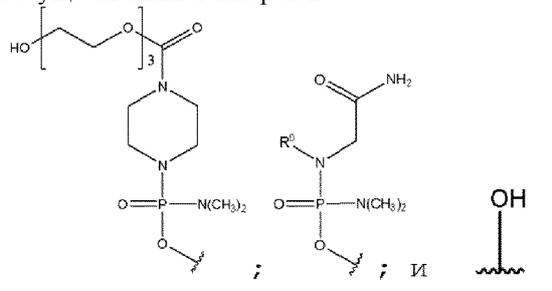


где A выбран из -OH, $-N(R^7)_2R^8$, и R^1 где каждый R^7 независимо выбран из H и C_1-C_6 -алкила, и R^8 выбран из пары электронов и H, и R^6 выбран из OH, $-N(R^9)CH_2C(O)NH_2$ и фрагмента формулы



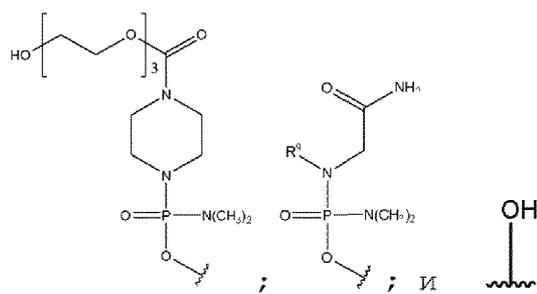
где R^9 выбран из H и C_1-C_6 -алкила; и R^{10} выбран из $C(O)-R^{11}OH$, ацила, тритила, 4 метокситритила, $C(=NH)NH_2$, $C(O)(CH_2)_mNR^{12}C(=NH)NH_2$ и $C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{12}C(=NH)NH_2$, где m представляет собой целое от 1 до 5, R^{11} имеет формулу $-(O-алкил)_y-$, где y представляет собой целое от 3 до 10 и каждая из алкильных групп независимо выбрана из C_2-C_6 -алкила; и R^{12} выбран из H и C_1-C_6 -алкила; каждый случай R^1 независимо представляет собой $-N(R^{13})_2R^{14}$, где каждый R^{13} независимо выбран из H и C_1-C_6 -алкила, и R^{14} выбран из пары электронов и H; и R^2 выбран из H, ацила, тритила, 4 метокситритила, бензоила, стеароила и C_1-C_6 -алкила.

В некоторых вариантах осуществления T выбран из

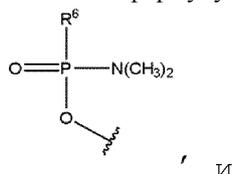


Y представляет собой O при каждом появлении. В некоторых вариантах осуществления R^2 выбран из H, ацила, тритила, 4 метокситритила, бензоила и стеароила.

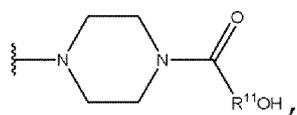
В различных вариантах осуществления, T выбран из



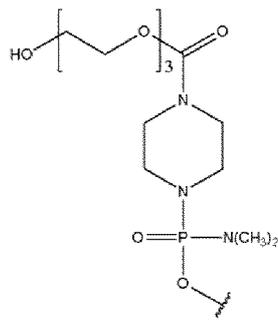
В некоторых вариантах осуществления T имеет формулу



R⁶ имеет формулу

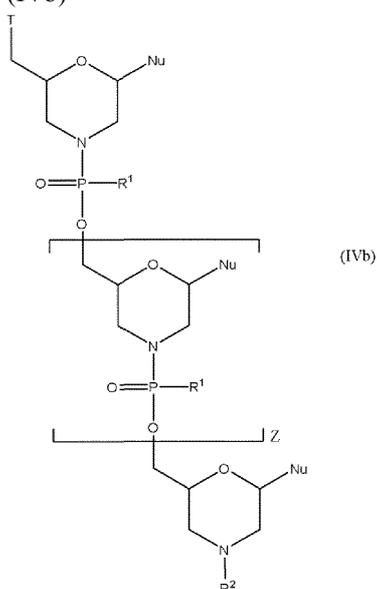


В некоторых вариантах осуществления T имеет формулу:



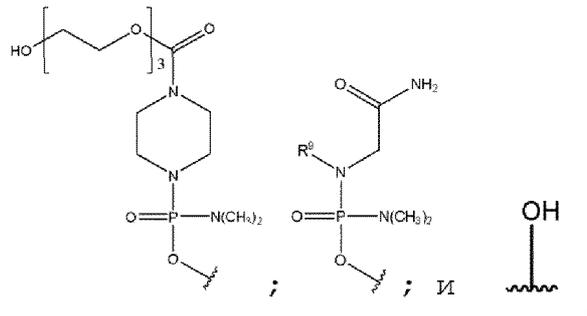
В некоторых вариантах осуществления R² представляет собой H, тритил или ацил. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один случай R¹ представляет собой N(CH₃)₂. В некоторых вариантах осуществления каждый R¹ представляет собой N(CH₃)₂.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловый олигомер настоящего изобретения представляет собой соединение формулы (IVb)



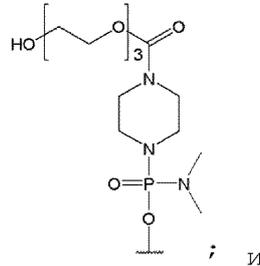
или его фармацевтически приемлемую соль, где каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность;

Z представляет собой целое от 8 до 38;
 T выбран из фрагмента формулы



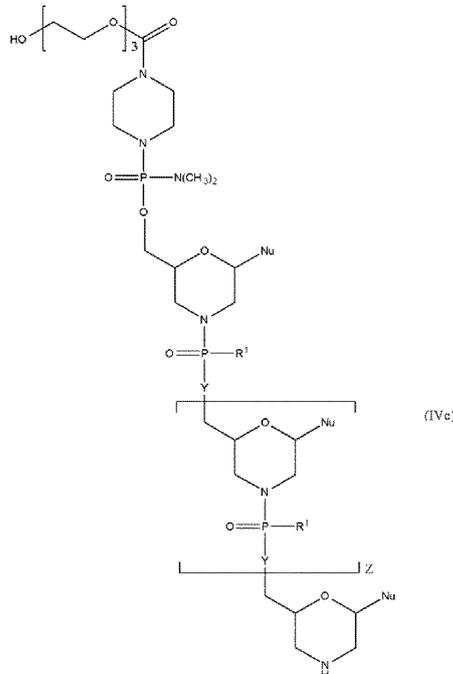
где R^3 выбран из H и C_1-C_6 -алкила;
 каждый случай R^1 независимо представляет собой $-N(R^4)_2$, где каждый R^4 независимо выбран из H и C_1-C_6 -алкила; и
 R^2 выбран из H, ацила, тритила, 4 метокситритила, бензоила, стеароила и C_1-C_6 -алкила.
 В различных вариантах осуществления, R^2 выбран из H или ацила. В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой H.

В некоторых вариантах осуществления T имеет формулу



R^2 представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер настоящего изобретения представляет собой соединение формулы (IVc)

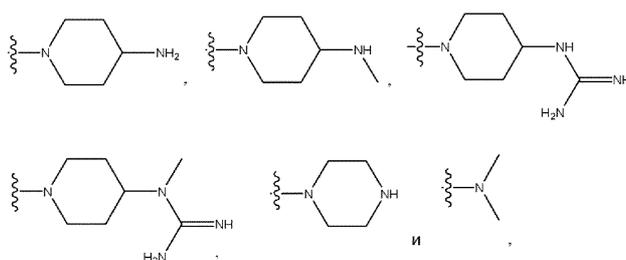


или его фармацевтически приемлемую соль, где
 каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность;

Z представляет собой целое от 8 до 38;

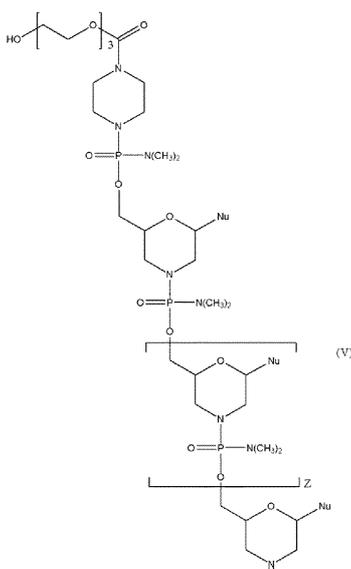
каждый Y представляет собой O;

каждый R^1 независимо выбран из группы, состоящей из



где по меньшей мере один R^1 представляет собой $-N(CH_3)_2$. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность выбрана из SEQ ID NO: 4-30, 133-255 или 296-342, где X выбран из урацила (U) или тимина (T). В некоторых вариантах осуществления каждый R^1 представляет собой $-N(CH_3)_2$.

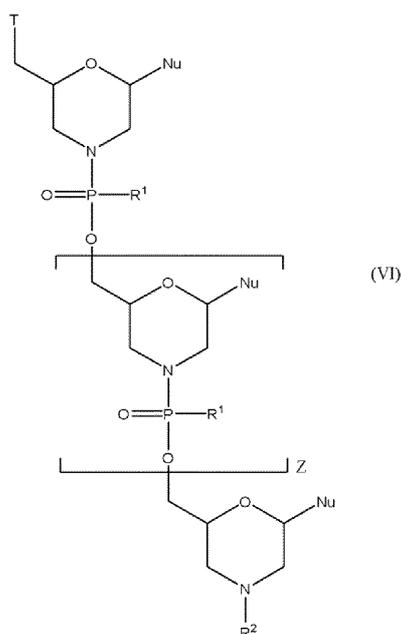
В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер представляет собой соединение формулы (V)



или его фармацевтически приемлемую соль, где каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность; и Z представляет собой целое от 8 до 38.

В некоторых вариантах осуществления включающих, например, варианты осуществления антисмысловых олигомеров формулы (IVa), (IVb), (IVc) и (V), нацеливающая последовательность является комплементарной области-мишени в интроне 1 (SEQ ID NO: 1) пре-мРНК гена человеческой альфа гликозидазы (GAA). В различных вариантах осуществления, включая, например, варианты осуществления антисмысловых олигомеров формулы (IVa), (IVb), (IVc) и (V), нацеливающая последовательность является комплементарной области-мишени в интроне 1 (SEQ ID NO: 1) пре-мРНК гена человеческой альфа гликозидазы (GAA), где область-мишень содержит по меньшей мере одно дополнительное нуклеиновое основание по сравнению с нацеливающей последовательностью, где по меньшей мере одно дополнительное нуклеиновое основание не имеет комплементарного нуклеинового основания в нацеливающей последовательности, и где по меньшей мере одно дополнительное нуклеиновое основание является внутренним к области-мишени. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность включает последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 13-SEQ ID NO: 86, как показано в табл. 2A-2C в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 27-29, 34-36, 59 и 82. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность включает последовательность, выбранную из табл. 2A-2C. Кроме того и относительно последовательностей, перечисленных в табл. 2A-2C (или табл. 2B и 2C) в настоящем изобретении, в определенных вариантах осуществления, выбрана последовательность с 100% комплементарностью и удалено одно или более нуклеиновых оснований (или альтернативно получены с одним или более отсутствующими нуклеиновыми основаниями) так, что полученная в результате последовательность содержала одно или более отсутствующих нуклеиновых оснований относительно ее природного комплемента в области-мишени. За исключением части, где удалено одно или более нуклеиновых оснований, предполагается, чтобы оставшиеся части были на 100% комплементарными. Однако включено в объем настоящего изобретения то, что могут быть представлены сниженные степени комплементарности.

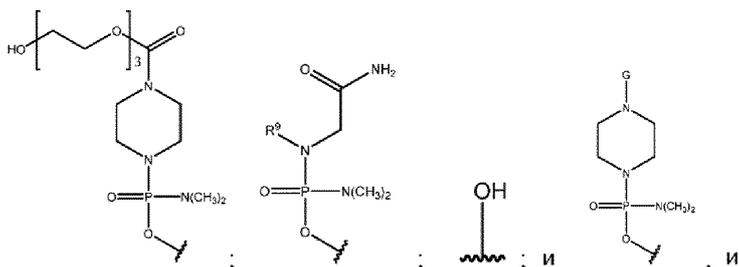
В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер представляет собой соединение формулы (VI)



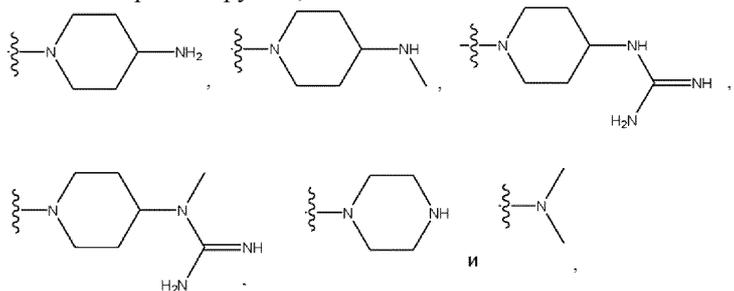
или его фармацевтически приемлемую соль, где каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность;

Z представляет собой целое от 8 до 38;

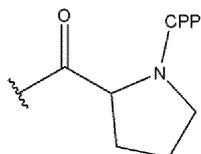
T выбран из



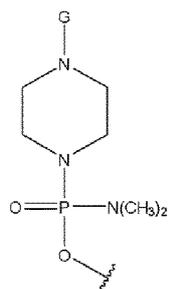
каждый R¹ независимо выбран из группы, состоящей из



R² выбран из H, G, ацила, тритила, 4 метокситритила, бензоила и стеароила, где G представляет собой проникающий пептид ("CPP") и линкерный фрагмент, выбранный из C(O)(CH₂)₅NH CPP, C(O)(CH₂)₂NH CPP, C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH CPP, C(O)CH₂NH CPP, и:

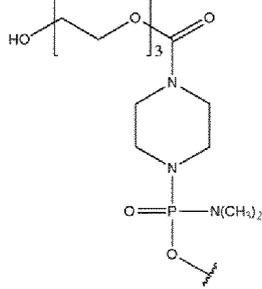


где CPP соединен с линкерным фрагментом через амидную связь по карбокси концу CPP, и где T представляет собой

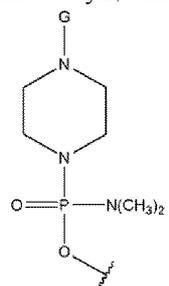


или R^2 представляет собой G.

В некоторых вариантах осуществления T имеет формулу

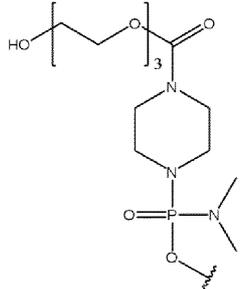


и R^2 представляет собой G. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно появление R^1 представляет собой $-N(CH_3)_2$. В некоторых вариантах осуществления каждое появление R^1 представляет собой $-N(CH_3)_2$. В некоторых вариантах осуществления T имеет формулу



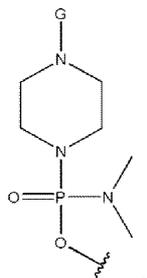
В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно появление R^1 представляет собой $-N(CH_3)_2$. В некоторых вариантах осуществления каждое появление R^1 представляет собой $-N(CH_3)_2$.

В некоторых вариантах осуществления T имеет формулу



R^2 представляет собой G, и каждое появление R^1 представляет собой $-N(CH_3)_2$.

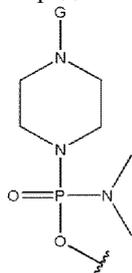
В некоторых вариантах осуществления R^2 выбран из H, ацетила, тритила, 4 метокситритила, бензоила и стеароила, и T имеет формулу



В различных вариантах осуществления R^2 представляет собой ацетил. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно появление R^1 представляет собой $-N(CH_3)_2$. В некоторых вариантах осуществления каждое появление R^1 представляет собой $-N(CH_3)_2$.

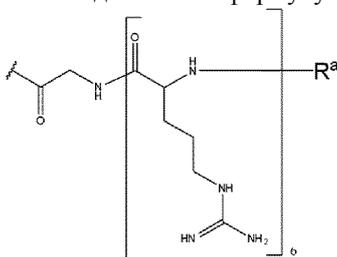
В различных вариантах осуществления, R^2 выбран из H, ацила, тритила, 4 метокситритила, бензоила и стеарила.

В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой ацетил, T имеет формулу



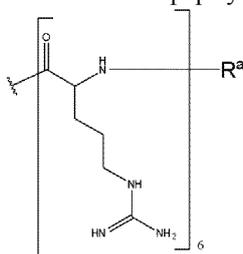
и каждое появление R^1 представляет собой $N(CH_3)_2$.

В некоторых вариантах осуществления где G имеет формулу



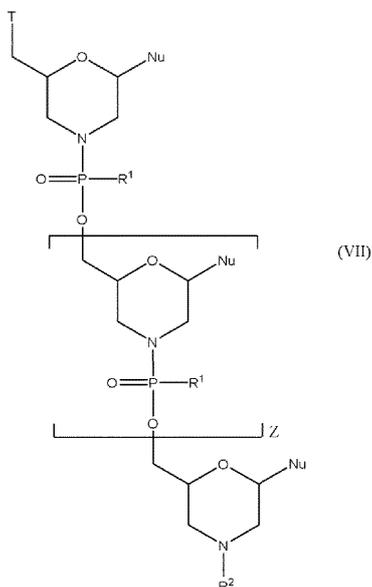
где R^a выбран из H, ацила, бензоила и стеарила. В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

В некоторых вариантах осуществления CPP имеет формулу



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

В некоторых вариантах осуществления антисмысловый олигомер представляет собой соединение формулы (VII)

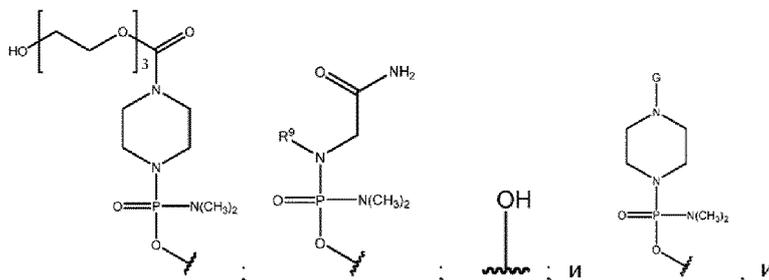


или его фармацевтически приемлемую соль,

где каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность;

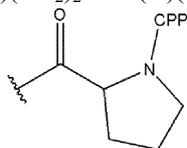
Z представляет собой целое от 8 до 38;

T выбран из

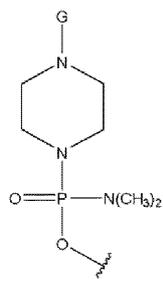


каждый R^1 представляет собой $-N(R^4)_2$, где каждый R^4 независимо представляет собой C_1 - C_6 -алкил; и R^2 выбран из H, G, ацила, тритила, 4 метокситрители, бензоила и стеарила,

где G представляет собой проникающий пептид ("CPP") и линкерный фрагмент, выбранный из $C(O)(CH_2)_5NH$ CPP, $C(O)(CH_2)_2NH$ CPP, $C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH$ CPP, $C(O)CH_2NH$ CPP, и:



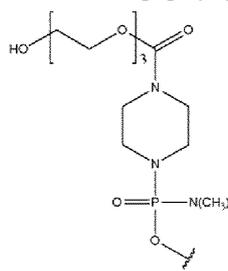
где CPP соединен с линкерным фрагментом через амидную связь по карбокси концу CPP, и где T представляет собой



или R^2 представляет собой G.

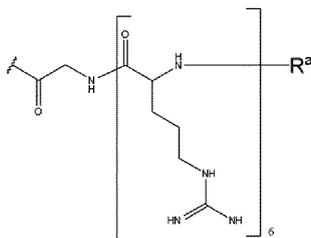
В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один случай R^1 представляет собой $N(CH_3)_2$. В некоторых вариантах осуществления каждый случай R^1 представляет собой $N(CH_3)_2$.

В некоторых вариантах осуществления T имеет формулу



и R^2 представляет собой G. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один случай R^1 представляет собой $N(CH_3)_2$. В некоторых вариантах осуществления каждый случай R^1 представляет собой $N(CH_3)_2$.

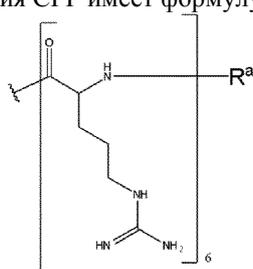
В различных вариантах осуществления, G имеет формулу



где R^a выбран из H, ацила, бензоила и стеарила. В некоторых вариантах осуществления R^a пред-

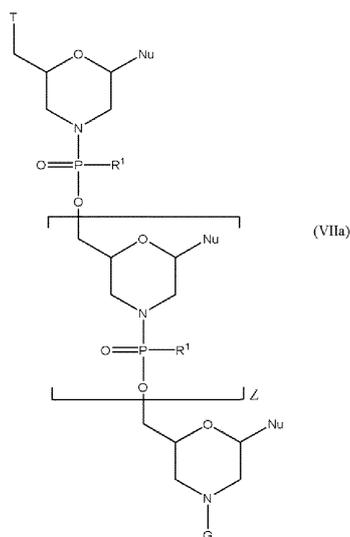
ставляет собой ацетил.

В некоторых вариантах осуществления CPP имеет формулу



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

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

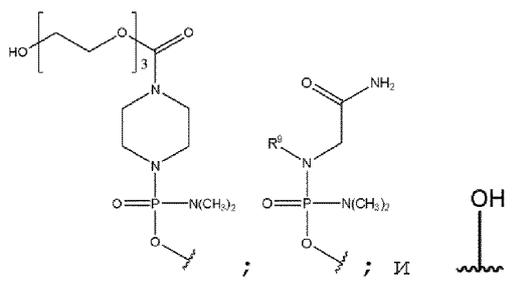


или его фармацевтически приемлемую соль,

где каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность;

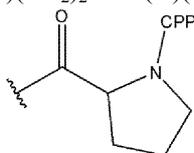
Z представляет собой целое от 8 до 38;

T выбран из



каждый случай R¹ представляет собой -N(R⁴)₂, где каждый R⁴ независимо представляет собой C₁-C₆-алкил; и

G представляет собой проникающий пептид ("CPP") и линкерный фрагмент, выбранный из C(O)(CH₂)₅NH CPP, C(O)(CH₂)₂NH CPP, C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH CPP, C(O)CH₂NH CPP, и:

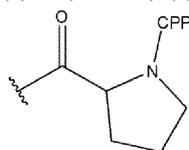


где CPP соединен с линкерным фрагментом через амидную связь по карбокси концу CPP.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один случай R¹ представляет собой N(CH₃)₂. В некоторых вариантах осуществления каждый случай R¹ представляет собой N(CH₃)₂.

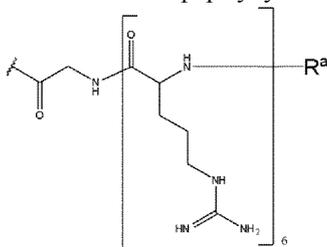
В некоторых вариантах осуществления G имеет формулу

G представляет собой проникающий пептид ("CPP") и линкерный фрагмент, выбранный из $C(O)(CH_2)_5NH$ CPP, $C(O)(CH_2)_2NH$ CPP, $C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH$ CPP, $C(O)CH_2NH$ CPP и



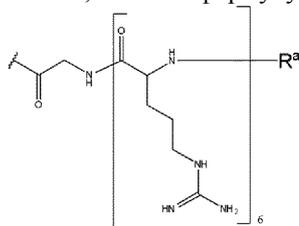
где CPP соединен с линкерным фрагментом через амидную связь по карбокси концу CPP.

В некоторых вариантах осуществления G имеет формулу



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

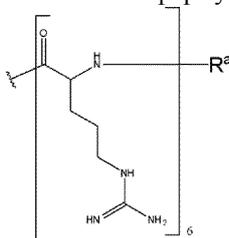
В различных вариантах осуществления, G имеет формулу



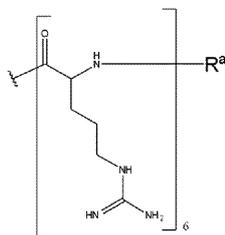
, и

R^a представляет собой ацетил.

В некоторых вариантах осуществления CPP имеет формулу



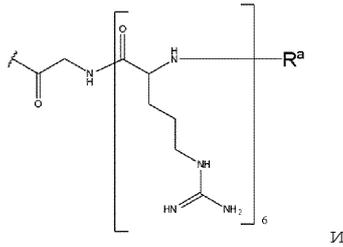
где R^a выбран из H, ацила, бензоила и стеароила. В некоторых вариантах осуществления, R^a представляет собой ацетил. В различных вариантах осуществления, CPP имеет формулу



, и

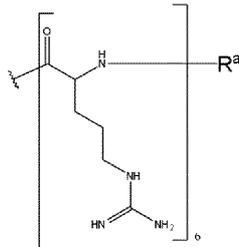
R^a представляет собой ацетил.

В различных аспектах, антисмысловой олигомер настоящего изобретения представляет собой соединение формулы (VIId)

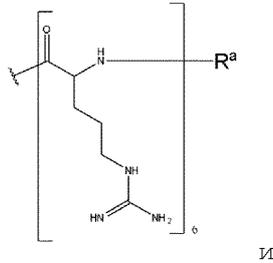


R^a представляет собой ацетил.

В некоторых вариантах осуществления COP имеет формулу

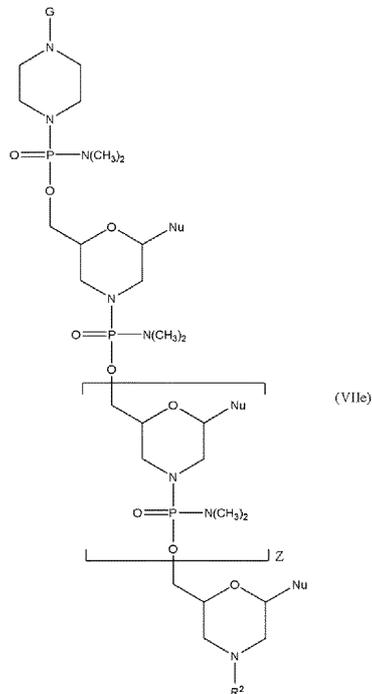


где R^a выбран из H, ацила, бензоила и стеарила. В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил. В различных вариантах осуществления, каждый случай R^1 представляет собой $N(CH_3)_2$, COP имеет формулу



R^a представляет собой ацетил.

В различных аспектах, антисмысловый олигонуклеотид настоящего изобретения включает соединения формулы (VIIe)

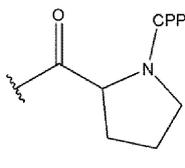


или его фармацевтически приемлемую соль, где каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность;

Z представляет собой целое от 8 до 38;

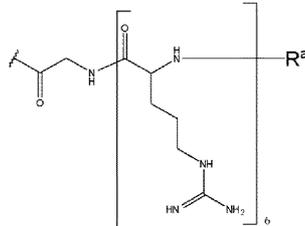
R^2 выбран из H, тритила, 4-метокситритила, ацетила, бензоила и стеарила; и

G представляет собой проникающий пептид ("CPP") и линкерный фрагмент, выбранный из C(O)(CH₂)₅NH CPP, C(O)(CH₂)₂NH CPP, C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH CPP, C(O)CH₂NH CPP, и:



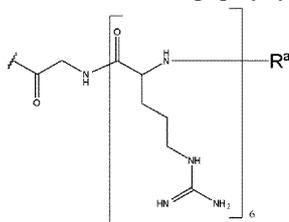
где CPP соединен с линкерным фрагментом через амидную связь по карбокси концу CPP.

В некоторых вариантах осуществления G имеет формулу



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

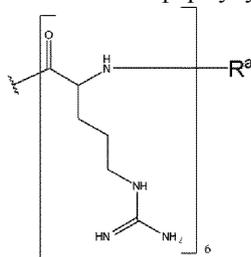
В различных вариантах осуществления, G имеет формулу



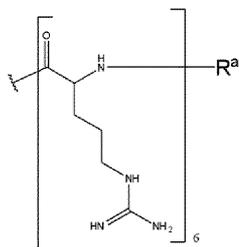
, и

R^a представляет собой ацетил.

В некоторых вариантах осуществления CPP имеет формулу



где R^a выбран из H, ацила, бензоила и стеариола. В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил. В различных вариантах осуществления, CPP имеет формулу



, и

R^a представляет собой ацетил.

В некоторых вариантах осуществления включая, например, варианты осуществления антисмысловых олигомеров формулы (VI), (VII), (VIIa), (VIIb), (VIIc), (VIId), (VIIe) и (VIII), нацеливающая последовательность является комплементарной области-мишени в интроне 1 (SEQ ID NO: 1) пре-мРНК гена человеческой альфа гликозидазы (GAA). В различных вариантах осуществления, включая, например, варианты осуществления антисмысловых олигомеров формулы (VI), (VII), (VIIa), (VIIb), (VIIc), (VIId), (VIIe) и (VIII), нацеливающая последовательность является комплементарной области-мишени в интроне 1 (SEQ ID NO: 1) пре-мРНК гена человеческой альфа гликозидазы (GAA), где область-мишень содержит по меньшей мере одно дополнительное нуклеиновое основание по сравнению с нацеливающей последовательностью, где по меньшей мере одно дополнительное нуклеиновое основание не имеет комплементарности.

тарного нуклеинового основания в нацеливающей последовательности, и где по меньшей мере одно дополнительное нуклеиновое основание является внутренним к области-мишени. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность включает последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 13-SEQ ID NO: 86 (например, SEQ ID NO: 13-58 или 59-75). В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 27-29, 34-36, 59 и 82. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность включает последовательность, выбранную из табл. 2А-2С. Кроме того и относительно последовательностей, перечисленных в табл. 2А-2С в настоящем изобретении, в определенных вариантах осуществления, выбрана последовательность со 100% комплементарностью, и удалено одно или более нуклеиновых оснований (или альтернативно получены с одним или более отсутствующими дополнительными нуклеиновыми основаниями) так, чтобы полученная в результате последовательность содержала одно или более отсутствующих нуклеиновых оснований относительно ее природного комплемента в области-мишени. За исключением части, где удалено одно или более нуклеиновых оснований, предполагается, что оставшиеся части были на 100% комплементарными. Однако включено в объем настоящего изобретения то, что могут быть представлены сниженные степени комплементарности.

В некоторых вариантах осуществления любого из антисмысловых олигомеров, способов или композиций, описанных в настоящем изобретении, Z представляет собой целое от 8 до 28, от 15 до 38, 15-28, 8-25, от 15 до 25, от 10 до 38, от 10 до 25, от 12 до 38, от 12 до 25, от 14 до 38 или от 14 до 25. В некоторых вариантах осуществления любого из антисмысловых олигомеров, способов или композиций, описанных в настоящем изобретении, Z равно 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 или 38. В некоторых вариантах осуществления любого из антисмысловых олигомеров, способов или композиций, описанных в настоящем изобретении, Z равно 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28. В некоторых вариантах осуществления любого из антисмысловых олигомеров, способов или композиций, описанных в настоящем изобретении, Z равно 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25.

В некоторых вариантах осуществления каждый Z модифицированных антисмысловых олигомеров настоящего изобретения, включая соединения формул (I), (Ia), (IVa), (IVb), (IVc), (V), (VI), (VII), (VIIa), (VIIb), (VIIc), (VIId), (VIIe) и (VIII), представляет собой целое от 8 до 28.

В некоторых вариантах осуществления каждый Z модифицированных антисмысловых олигомеров настоящего изобретения, включая соединения формул (I), (Ia), (IVa), (IVb), (IVc), (V), (VI), (VII), (VIIa), (VIIb), (VIIc), (VIId), (VIIe) и (VIII), представляет собой целое от 15 до 38.

В некоторых вариантах осуществления каждый Z модифицированных антисмысловых олигомеров настоящего изобретения, включая соединения формул (I), (Ia), (IVa), (IVb), (IVc), (V), (VI), (VII), (VIIa), (VIIb), (VIIc), (VIId), (VIIe) и (VIII), представляет собой целое от 15 до 28.

В некоторых вариантах осуществления каждый Z модифицированных антисмысловых олигомеров настоящего изобретения, включая соединения формул (I), (Ia), (IVa), (IVb), (IVc), (V), (VI), (VII), (VIIa), (VIIb), (VIIc), (VIId), (VIIe) и (VIII), представляет собой целое от 8 до 25.

В некоторых вариантах осуществления каждый Z модифицированных антисмысловых олигомеров настоящего изобретения, включая соединения формул (I), (Ia), (IVa), (IVb), (IVc), (V), (VI), (VII), (VIIa), (VIIb), (VIIc), (VIId), (VIIe) и (VIII), представляет собой целое от 15 до 25.

В некоторых вариантах осуществления каждый Z модифицированных антисмысловых олигомеров настоящего изобретения, включая соединения формул (I), (Ia), (IVa), (IVb), (IVc), (V), (VI), (VII), (VIIa), (VIIb), (VIIc), (VIId), (VIIe) и (VIII), представляет собой целое от 10 до 38.

В некоторых вариантах осуществления каждый Z модифицированных антисмысловых олигомеров настоящего изобретения, включая соединения формул (I), (Ia), (IVa), (IVb), (IVc), (V), (VI), (VII), (VIIa), (VIIb), (VIIc), (VIId), (VIIe) и (VIII), представляет собой целое от 10 до 25.

В некоторых вариантах осуществления каждый Z модифицированных антисмысловых олигомеров настоящего изобретения, включая соединения формул (I), (Ia), (IVa), (IVb), (IVc), (V), (VI), (VII), (VIIa), (VIIb), (VIIc), (VIId), (VIIe) и (VIII), представляет собой целое от 12 до 38.

В некоторых вариантах осуществления каждый Z модифицированных антисмысловых олигомеров настоящего изобретения, включая соединения формул (I), (Ia), (IVa), (IVb), (IVc), (V), (VI), (VII), (VIIa), (VIIb), (VIIc), (VIId), (VIIe) и (VIII), представляет собой целое от 12 до 25.

В некоторых вариантах осуществления каждый Z модифицированных антисмысловых олигомеров настоящего изобретения, включая соединения формул (I), (Ia), (IVa), (IVb), (IVc), (V), (VI), (VII), (VIIa), (VIIb), (VIIc), (VIId), (VIIe) и (VIII), представляет собой целое от 14 до 38.

В некоторых вариантах осуществления каждый Z модифицированных антисмысловых олигомеров настоящего изобретения, включая соединения формул (I), (Ia), (IVa), (IVb), (IVc), (V), (VI), (VII), (VIIa), (VIIb), (VIIc), (VIId), (VIIe) и (VIII), представляет собой целое от 14 до 25.

В некоторых вариантах осуществления каждый Z модифицированных антисмысловых олигомеров настоящего изобретения, включая соединения формул (I), (Ia), (IVa), (IVb), (IVc), (V), (VI), (VII), (VIIa), (VIIb), (VIIc), (VIId), (VIIe) и (VIII), равен 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 или 38.

В некоторых вариантах осуществления каждый Z модифицированных антисмысловых олигомеров настоящего изобретения, включая соединения формул (I), (Ia), (IVa), (IVb), (IVc), (V), (VI), (VII), (VIIa), (VIIb), (VIIc), (VIId), (VIIe) и (VIII), равен 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28.

В некоторых вариантах осуществления каждый Z модифицированных антисмысловых олигомеров настоящего изобретения, включая соединения формул (I), (Ia), (IVa), (IVb), (IVc), (V), (VI), (VII), (VIIa), (VIIb), (VIIc), (VIId), (VIIe) и (VIII), равен 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25.

В некоторых вариантах осуществления каждый Nu антисмысловых олигомеров настоящего изобретения, включая соединения формулы (I), (Ia), (IVa), (IVb), (IVc), (V), (VI), (VII), (VIIa), (VIIb), (VIIc), (VIId), (VIIe) и (VIII), независимо выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, тимина, урацила, цитозина, гипоксантина, 2,6-диаминопурина, 5-метилцитозина, C5-пропил-модифицированных пиримидинов и 9-(аминоэтокси)феноксазина.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность антисмысловых олигомеров настоящего изобретения, включая соединения формулы (I), (Ia), (IVa), (IVb), (IVc), (V), (VI), (VII), (VIIa), (VIIb), (VIIc), (VIId), (VIIe) и (VIII), является комплементарной 10 или более непрерывным нуклеотидам в области-мишени в интроне 1 (SEQ ID NO. 1), интроне 2 (SEQ ID NO. 60) или экзоне 2 (SEQ ID NO. 61) пре-мРНК гена человеческой кислой альфа-глюкозидазы (GAA). В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность антисмысловых олигомеров настоящего изобретения, включая соединения формулы (I), (Ia), (IVa), (IVb), (IVc), (V), (VI), (VII), (VIIa), (VIIb), (VIIc), (VIId), (VIIe) и (VIII), включает последовательность, выбранную из последовательностей табл. 2A-2C, как описано в настоящем изобретении, представляет собой фрагмент, по меньшей мере, 12 непрерывных нуклеотидов последовательности, выбранной из табл. 2A-2C, как описано в настоящем изобретении, или представляет собой вариант, имеющий, по меньшей мере, 90% идентичность по последовательности с последовательностью, выбранной из табл. 2A-2C, как описано в настоящем изобретении (где X выбран из урацила (U) или тимина (T), в соответствующих случаях в зависимости от таблицы, на которую ссылаются). В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 27-29, 34-36, 59 и 82.

Дополнительные антисмысловые олигомеры/химии, которые можно применять согласно настоящему изобретению, включают антисмысловые олигомеры/химии, описанные в следующих патентах и патентных публикациях, содержание которых включено в настоящее изобретение с помощью ссылки: РСТ публикации № WO 2007/002390; WO 2010/120820; и WO 2010/148249; патент США № 7838657; и заявка США № 2011/0269820.

Антисмысловые олигонуклеотиды можно получить ступенчатым твердофазным синтезом, применяя способы, известные в данной области техники и описанные в цитируемых в настоящем изобретении ссылках.

C. CPP и богатые аргинином пептидные конъюгаты РМО (PPMO).

В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид конъюгирован с проникающим пептидом (называемым в настоящем изобретении "CPP"). В некоторых вариантах осуществления CPP представляет собой пептид, богатый аргинином. Термин "богатый аргинином" относится к CPP, содержащему по меньшей мере 2 и предпочтительно 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 остатков аргинина, каждый обязательно разделен одной или более незаряженными, гидрофобными остатками, и необязательно содержащему приблизительно 6-14 аминокислотных остатков. Как объясняется ниже, CPP предпочтительно соединен по его карбокси концу с 3' и/или 5' концом антисмыслового олигонуклеотида через линкер, который может также составлять одну или более аминокислот, и предпочтительно также кэспируют по его amino концу заместителем R^a, причем R^a выбран из H, ацила, бензоила или стеароила. В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

Как видно в таблице ниже, неограничивающие примеры CPP для применения в настоящем изобретении включают - (RXR)₄-R^a, R-(FFR)₃-R^a, -B-X-(RXR)₄-R^a, -B-X-R-(FFR)₃-R^a, -GLY-R-(FFR)₃-R^a, GLY R₆-R^a и -R₆-R^a, где R^a выбран из H, ацила, бензоила и стеароила, и где R представляет собой аргинин, X представляет собой 6-аминогексановую кислоту, B представляет собой β-аланин, F представляет собой фенилаланин, и GLY (или G) представляет собой глицин. CPP "R₆" предназначен для указания на пептид из (6) остатков аргинина, соединенных вместе амидными связями (и не один заместитель, например, R⁶). В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

Примеры CPP приведены в табл. 2D (SEQ ID NO: 6-12).

Таблица 2D. Примеры проникающих пептидов

| название | Последовательность | SEQ ID NO: |
|------------------------|--------------------|------------|
| (RXR) ₄ | RXRRXRRXRRXR | 6 |
| (RFF) ₃ R | RFFRFFRFFR | 7 |
| (RXR) ₄ XB | RXRRXRRXRRXRB | 8 |
| (RFF) ₃ RXB | RFFRFFRFFRXB | 9 |
| (RFF) ₃ RG | RFFRFFRFFR | 1 |

| | | |
|------------------|---------|---|
| | | 0 |
| R ₆ G | RRRRRRG | 1 |
| | | 1 |
| R ₆ | RRRRRR | 1 |
| | | 2 |

X представляет собой 6-аминогексановую кислоту; В представляет собой β-аланин; F представляет собой фенилаланин; G представляет собой глицин CPP, их получение и способы конъюгирования с олигомером дополнительно описаны в публикации заявки США № 2012/0289457 и международных публикациях патентных заявок № WO 2004/097017, WO 2009/005793 и WO 2012/150960, описание которых включено в настоящее изобретение с помощью ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид содержит заместитель "G," определенный как комбинация CPP и линкера. Линкер соединяет CPP по его карбокси концу с 3'-концом и/или 5'-концом олигонуклеотида. В различных вариантах осуществления, антисмысловой олигонуклеотид может содержать только один CPP, присоединенный к 3'-концу олигомера. В других вариантах осуществления, антисмысловой олигонуклеотид может содержать только один CPP, присоединенный по 5'-концу олигомера.

Линкер в G может содержать, например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислоты.

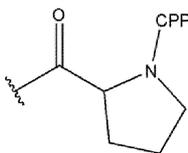
В конкретных вариантах осуществления, G выбран из

C(O)(CH₂)₅NH CPP;

C(O)(CH₂)₂NH CPP;

C(O)(CH₂)₂NHC(O) (CH₂)₅NH CPP;

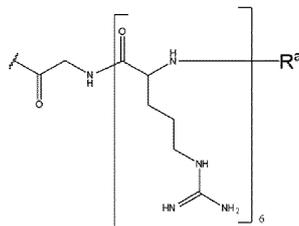
C(O)CH₂NH CPP и формулы



где CPP соединен с линкерным фрагментом через амидную связь по карбокси концу CPP.

В различных вариантах осуществления CPP представляет собой пептид, богатый аргинином, как определено выше и показано в табл. 2D. В некоторых вариантах осуществления богатый аргинином CPP представляет собой -R₆-R^a, (т.е. шесть остатков аргинина; SEQ ID NO: 12), где R^a выбран из H, ацила, бензоила и стеароида. R^a представляет собой ацетил. В различных вариантах осуществления, CPP выбран из SEQ ID NO: 6, 7 или 12, и линкер выбран из группы, описанной выше. В некоторых вариантах осуществления CPP представляет собой SEQ ID NO: 12, и линкер представляет собой Gly.

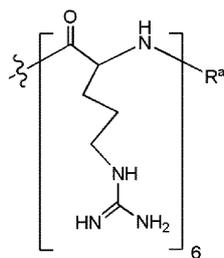
В некоторых вариантах осуществления G представляет собой C(O)CH₂NH R₆-R^a, ковалентно соединенный с антисмысловым олигомером настоящего изобретения по 5' и/или 3'-концу олигомера, где R^a представляет собой H, ацил, бензоил или стеароил, кэппируя amino конец R₆. R^a представляет собой ацетил. В данных неограничивающих примерах, CPP представляет собой -R₆-R^a, и линкер представляет собой C(O)CH₂NH, (т.е. GLY). Данный конкретный пример G=C(O)CH₂NH R₆-R^a также показан следующей структурой



где R^a выбран из H, ацила, бензоила и стеароида. В некоторых вариантах осуществления G выбран из SEQ ID NO: 3-6. В некоторых вариантах осуществления G представляет собой SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

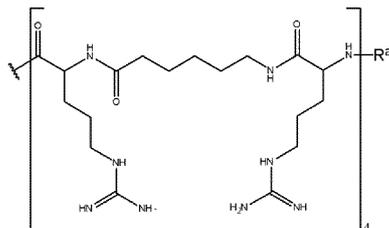
В различных вариантах осуществления, CPP представляет собой -R₆-R^a, также показанный следующей формулой:

042313

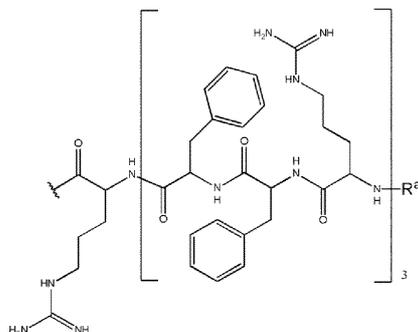


где R^a выбран из H, ацила, бензоила и стеарила. В некоторых вариантах осуществления CPP представляет собой SEQ ID NO: XX. В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

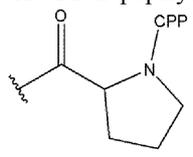
В некоторых вариантах осуществления CPP представляет собой $-(R^a)_4-R^a$, также показанный следующей формулой:



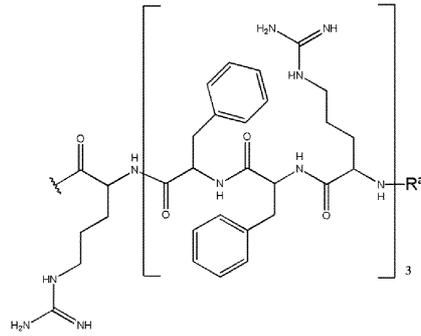
В различных вариантах осуществления, CPP представляет собой $-R-(FFR)_3-R^a$, также показанный следующей формулой:



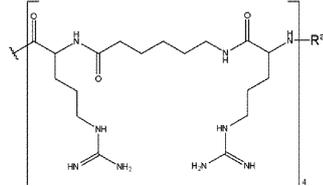
В различных вариантах осуществления, G выбран из: $C(O)(CH_2)_5NH$ CPP; $C(O)(CH_2)_2NH$ CPP; $C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_3NH$ CPP; $C(O)CH_2NH$ CPP и формулы



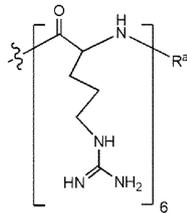
где CPP соединен с линкерным фрагментом через амидную связь по карбокси концу CPP, и где CPP выбран из



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



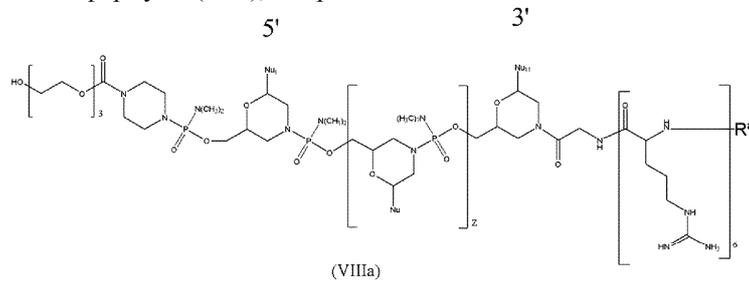
, $(-R(XR)_4-R^a)$ или



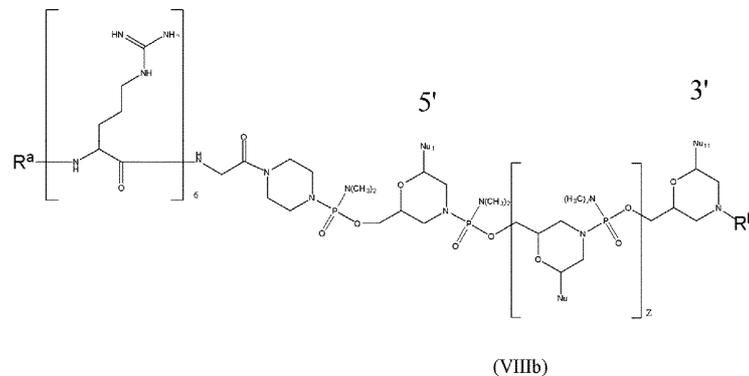
, $(-R_6-R^a)$.

В некоторых вариантах осуществления R^a представляет собой ацетил.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер настоящего изобретения представляет собой соединение формулы (VIII), выбранное из



и



фармацевтически приемлемую соль любого из приведенных выше, где каждый Nu представляет собой фрагмент, спаривающийся с пуриновым или пиримидиновым основанием, которые, взятые вместе, образуют нацеливающую последовательность;

Z представляет собой целое от 8 до 38;

R^a выбран из H, ацетила, бензоила и стеароила; и

R^b выбран из H, ацетила, бензоила, стеароила, тритила и 4 метокситритила.

В некоторых вариантах осуществления включая, например, варианты осуществления антисмысло-

вых олигомеров формулы (VIII), нацеливающая последовательность является комплементарной области-мишени в интроне 1 (SEQ ID NO: 1) пре-мРНК гена человеческой альфа-гликозидазы (GAA).

В различных вариантах осуществления, включая, например, варианты осуществления антисмысловых олигомеров формулы (VIII), нацеливающая последовательность является комплементарной области-мишени в интроне 1 (SEQ ID NO: 1) пре-мРНК гена человеческой альфа гликозидазы (GAA), где область-мишень содержит по меньшей мере одно дополнительное нуклеиновое основание по сравнению с нацеливающей последовательностью, где по меньшей мере одно дополнительное нуклеиновое основание не имеет комплементарного нуклеинового основания в нацеливающей последовательности, и где по меньшей мере одно дополнительное нуклеиновое основание является внутренним к области-мишени. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность включает последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 13-SEQ ID NO: 86 (например, любую из SEQ ID NO: 13-58 или 59-75). В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность включает последовательность, выбранную из табл. 2А-2С. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность включает последовательность, выбранную из табл. 2А и 2В. Кроме того и относительно последовательностей, перечисленных в табл. 2А-2С в настоящем изобретении, в определенных вариантах осуществления, выбрана последовательность с 100% комплементарностью, и удалено одно или более нуклеиновых оснований (или альтернативно получены с одним или более отсутствующими нуклеиновыми основаниями) так, чтобы полученная в результате последовательность содержала одно или более отсутствующих нуклеиновых оснований относительно ее природного комплемента в области-мишени. За исключением части, где удалено одно или более нуклеиновых оснований, предполагается, чтобы оставшиеся части были на 100% комплементарными. Однако включено в объем настоящего изобретения то, что могут быть представлены сниженные степени комплементарности.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность антисмысловых олигомеров настоящего изобретения, включая, например, некоторые варианты осуществления антисмысловых олигомеров формулы (I), (Ia), (IVa), (IVb), (IVc), (V), (VI), (VII), (VIIa), (VIIb), (VIIc), (VIId), (VIIe) и (VIII), выбрана из последовательностей, перечисленных в таблицах 2А-2С, как описано в настоящем изобретении, и следующих:

I.

uu) SEQ ID NO: 13 (GGC CAG AAG GAA GGC GAG AAA AGC), где Z
равно 22;

vv) SEQ ID NO: 14 (GCC AGA AGG AAG GC GAG AAA AGC X), где Z
равно 22;

ww) SEQ ID NO: 15 (CCA GAA GGA AGG CGA GAA AAG CXC), где Z
равно 22;

xx) SEQ ID NO: 16 (CAG AAG GAA GGC GAG AAA AGC XCC), где Z
равно 22;

yy) SEQ ID NO: 17 (AGA AGG AAG GCG AGA AAA GCX CCA), где Z
равно 22;

zz) SEQ ID NO: 18 (GAA GGA AGG CGA GAA AAG CXC CAG), где Z
равно 22;

aaa) SEQ ID NO: 19 (AAG GAA GGC GAG AAA AGC XCC AGC), где Z
равно 22;

bbb) SEQ ID NO: 20 (AGG AAG GCG AGA AAA GCX CCA GCA), где Z
равно 22;

ccc) SEQ ID NO: 21 (CGG CXC XCA AAG CAG CXC XGA GA), где Z
равно 21;

ddd) SEQ ID NO: 22 (ACG GCX CXC AAA GCA GCX CXG AG), где Z
равно 21;

eee) SEQ ID NO: 23 (CAC GGC XCX CAA AGC AGC XCX GA), где Z
равно 21;

fff) SEQ ID NO: 24 (XCA CGG CXC XCA AAG CAG CXC XG), где Z
равно 21;

ggg) SEQ ID NO: 25 (CXC ACG GCX CXC AAA GCA GCX CX), где Z
равно 21;

hhh) SEQ ID NO: 26 (ACX CAC GGC XCX CAA AGC AGC XC), где Z
равно 21;

iii) SEQ ID NO: 27 (GCG GCA CXC ACG GCX CXC AAA GC), где Z
равно 21;

jjj) SEQ ID NO: 28 (GGC GGC ACX CAC GGC XCX CAA AG), где Z
равно 21;

042313

kkk) SEQ ID NO: 29 (CGG CAC XCA CGG CXC XCA AAG CA), где Z
равно 21;

lll) SEQ ID NO: 30 (GCA CXC ACG GCX CXC AAA GCA GC), где Z
равно 21;

mmm) SEQ ID NO: 31 (GGC ACX CAC GGC XCX CAA AGC AG), где Z
равно 21;

nnn) SEQ ID NO: 32 (CAC XCA CGG CXC XCA AAG CAG CX), где Z
равно 21;

ooo) SEQ ID NO: 33 (GCC AGA AGG AAG GCG AGA AAA GC), где Z
равно 21;

ppp) SEQ ID NO: 34 (CCA GAA GGA AGG CGA GAA AAG C), где Z
равно 19;

qqq) SEQ ID NO: 35 (CAG AAG GAA GGC GAG AAA AGC), где Z
равно 19;

rrr) SEQ ID NO: 36 (GGC CAG AAG GAA GGC GAG AAA AG), где Z
равно 21;

sss) SEQ ID NO: 37 (GGC CAG AAG GAA GGC GAG AAA A), где Z
равно 19;

ttt) SEQ ID NO: 38 (GGC CAG AAG GAA GGC GAG AAA), где Z
равно 19;

uuu) SEQ ID NO: 39 (CGG CAC XCA CGGC XCX CAA AGC A), где Z
равно 21;

vvv) SEQ ID NO: 40 (GCG GCA CXC ACGG CXC XCA AAG C), где Z
равно 21;

www) SEQ ID NO: 41 (GGC GGC ACX CAC G GCX CXC AAA G), где Z
равно 21;

xxx) SEQ ID NO: 42 (XGG GGA GAG GGC CAG AAG GAA GGC), где Z
равно 22;

yyy) SEQ ID NO: 43 (XGG GGA GAG GGC CAG AAG GAA GC), где Z
равно 21;

zzz) SEQ ID NO: 44 (XGG GGA GAG GGC CAG AAG GAA C), где Z
равно 20;

aaaa) SEQ ID NO: 45 (GGC CAG AAG GAA GCG AGA AAA GC), где Z
равно 21;

bbbb) SEQ ID NO: 46 (GGC CAG AAG GAA CGA GAA AAG C), где Z
равно 20;

cccc) SEQ ID NO: 47 (AGG AAG CGA GAA AAG CXC CAG CA), где Z равно 21;

dddd) SEQ ID NO: 48 (AGG AAC GAG AAA AGC XCC AGC A), где Z равно 20;

eeee) SEQ ID NO: 49 (CGG GCX CXC AAA GCA GCX CXG AGA), где Z равно 22;

ffff) SEQ ID NO: 50 (CGC XCX CAA AGC AGC XCX GAG A), где Z равно 20;

gggg) SEQ ID NO: 51 (CCX CXC AAA GCA GCX CXG AGA), где Z равно 19;

hhhh) SEQ ID NO: 52 (GGC GGC ACX CAC GGG CXC XCA AAG), где Z равно 22;

iiii) SEQ ID NO: 53 (GGC GGC ACX CAC GCX CXC AAA G), где Z равно 20;

jjjj) SEQ ID NO: 54 (GGC GGC ACX CAC CXC XCA AAG), где Z равно 19;

kkkk) SEQ ID NO: 55 (GCG GGA GGG GCG GCA CXC ACG GGC), где Z равно 22;

llll) SEQ ID NO: 56 (GCG GGA GGG GCG GCA CXC ACG GC), где Z равно 21;

mmmm) SEQ ID NO: 57 (GCG GGA GGG GCG GCA CXC ACG C), где Z равно 20; и

nnnn) SEQ ID NO: 58 (GCG GGA GGG GCG GCA CXC ACC), где Z равно 19,

где X выбран из урацила (U) или тимина (T);

II.

r) SEQ ID NO: 59 (GGC CAG AAG GAA GGG CGA GAA AAG C), где Z равно 23;

s) SEQ ID NO: 60 (CCA GAA GGA AGG GCG AGA AAA GCX C), где Z равно 23;

t) SEQ ID NO: 61 (AAG GAA GGG CGA GAA AAG CXC CAG C), где Z равно 23;

u) SEQ ID NO: 62 (GCG GGA GGG GCG GCA CXC ACG GGG C), где Z равно 23;

v) SEQ ID NO: 63 (XGG GGA GAG GGC CAG AAG GAA GGG C), где Z равно 23;

w) SEQ ID NO: 64 (AGA AGG AAG GGC GAG AAA AGC XCC A), где Z равно 23;

x) SEQ ID NO: 65 (GCX CXC AAA GCA GCX CXG AGA CAX C), где Z равно 23;

y) SEQ ID NO: 66 (CXC XCA AAG CAG CXC XGA GAC AXC A), где Z равно 23;

z) SEQ ID NO: 67 (XCX CAA AGC AGC XCX GAG ACA XCA A), где Z равно 23;

aa) SEQ ID NO: 68 (CXC AAA GCA GCX CXG AGA CAX CAA C), где Z равно 23;

bb) SEQ ID NO: 69 (XCA AAG CAG CXC XGA GAC AXC AAC C), где Z равно 23;

cc) SEQ ID NO: 70 (CAA AGC AGC XCX GAG ACA XCA ACC G), где Z равно 23;

dd) SEQ ID NO: 71 (AAA GCA GCX CXG AGA CAX CAA CCG C), где Z равно 23;

ee) SEQ ID NO: 72 (AAG CAG CXC XGA GAC AXC AAC CGC G), где Z равно 23;

ff) SEQ ID NO: 73 (AGC AGC XCX GAG ACA XCA ACC GCG G), где Z равно 23;

gg) SEQ ID NO: 74 (GCA GCX CXG AGA CAX CAA CCG CGG C), где Z равно 23; и

hh) SEQ ID NO: 75 (CAG CXC XGA GAC AXC AAC CGC GGC X), где Z равно 23,

где X выбран из урацила (U) или тимина (T); и

III.

l) SEQ ID NO: 76 (GCC AGA AGG AAG GGC GAG AAA AGC X), где Z равно 23;

m) SEQ ID NO: 77 (CAG AAG GAA GGG CGA GAA AAG CXC C), где Z равно 23;

n) SEQ ID NO: 78 (GAA GGA AGG GCG AGA AAA GCX CCA G), где Z равно 23;

o) SEQ ID NO: 79 (AGG AAG GGC GAG AAA AGC XCC AGC A), где Z равно 23;

p) SEQ ID NO: 80 (ACX CAC GGG GCX CXC AAA GCA GCX C), где Z равно 23;

q) SEQ ID NO: 81 (GGCXCAAAGCAGCXGAGACAX), где Z равно 23;

r) SEQ ID NO: 82 (GGC XCX CAA AGC AGC XCX GA), где Z равно 18;

s) SEQ ID NO: 83 (GAG AGG GCC AGA AGG AAG GG), где Z равно 18;

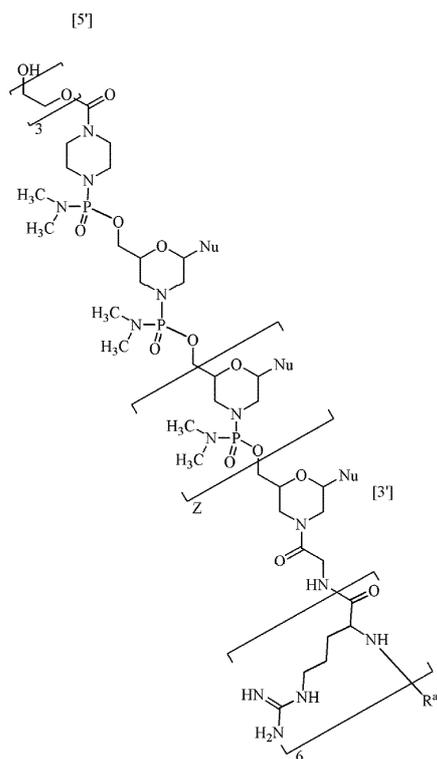
t) SEQ ID NO: 84 (XXX GCC AXG XXA CCC AGG CX), где Z равно 18;

u) SEQ ID NO: 85 (GCG CAC CCX CXG CCC XGG CC), где Z равно 18; и

v) SEQ ID NO: 86 (GGC CCX GGX CXG CXG GCX CCC XGC X), где Z равно 23,

где X выбран из урацила (U) или тимина (T).

В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 27-29, 34-36, 59 и 82. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 27-29, 34-36 и 59. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 27-29 и 34-36. В некоторых вариантах осуществления каждый случай X в любой одной SEQ ID



(XX)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

I.

a) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 13 (GGC CAG AAG GAA GGC GAG AAA AGC), где Z равно 22;

b) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 14 (GCC AGA AGG AAG GC GAG AAA AGC X), где Z равно 22;

c) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 15 (CCA GAA GGA AGG CGA GAA AAG CXC), где Z равно 22;

d) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 16 (CAG AAG GAA GGC GAG AAA AGC XCC), где Z равно 22;

e) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 17 (AGA AGG AAG GCG AGA AAA GCX CCA), где Z равно 22;

f) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 18 (GAA GGA AGG CGA GAA AAG CXC CAG), где Z равно 22;

g) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 19 (AAG GAA GGC GAG AAA AGC XCC AGC), где Z равно 22;

h) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 20 (AGG AAG GCG AGA AAA GCX CCA GCA), где Z равно 22;

i) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 21 (CGG CXC XCA AAG CAG CXC XGA GA), где Z равно 21;

j) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 22 (ACG GCX CXC AAA GCA GCX CXG AG), где Z равно 21;

k) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 23 (CAC GGC XCX CAA AGC AGC XCX GA), где Z

ливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 44 (XGG GGA GAG GGC CAG AAG GAA C), где Z равно 20;

gg) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 45 (GGC CAG AAG GAA GCG AGA AAA GC), где Z равно 21;

hh) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 46 (GGC CAG AAG GAA CGA GAA AAG C), где Z равно 20;

ii) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 47 (AGG AAG CGA GAA AAG CXC CAG CA), где Z равно 21;

jj) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 48 (AGG AAC GAG AAA AGC XCC AGC A), где Z равно 20;

kk) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 49 (CGG GCX CXC AAA GCA GCX CXG AGA), где Z равно 22;

ll) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 50 (CGC XCX CAA AGC AGC XCX GAG A), где Z равно 20;

mm) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 51 (CCX CXC AAA GCA GCX CXG AGA), где Z равно 19;

nn) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3') : SEQ ID NO: 52 (GGC GGC ACX CAC GGG CXC XCA AAG), где Z равно 22;

oo) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3') : SEQ ID NO: 53 (GGC GGC ACX CAC GCX CXC AAA G), где Z равно 20;

pp) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 54 (GGC GGC ACX CAC CXC XCA AAG), где Z равно 19;

qq) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3') : SEQ ID NO: 55 (GCG GGA GGG GCG GCA CXC ACG GGC), где Z равно 22;

гг) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 56 (GCG GGA GGG GCG GCA CXC ACG GC), где Z равно 21;

ss) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 57 (GCG GGA GGG GCG GCA CXC ACG C), где Z равно 20; и

tt) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 58 (GCG GGA GGG GCG GCA CXC ACC), где Z равно 19,

где X выбран из урацила (U) или тимина (T);

II.

a) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 59 (GGC CAG AAG GAA GGG CGA GAA AAG C), где Z равно 23;

b) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 60 (CCA GAA GGA AGG GCG AGA AAA GCX C), где Z равно 23;

c) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 61 (AAG GAA GGG CGA GAA AAG CXC CAG C), где Z равно 23;

d) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 62 (GCG GGA GGG GCG GCA CXC ACG GGG C), где Z равно 23;

e) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 63 (XGG GGA GAG GGC CAG AAG GAA GGG C), где Z равно 23;

f) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацели-

вающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 64 (AGA AGG AAG GGC GAG AAA AGC XCC A), где Z равно 23;

g) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 65 (GCX CXС ААА GCA GCX CXG AGA CAX C), где Z равно 23;

h) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 66 (CXC XCA AAG CAG CXC XGA GAC AXC A), где Z равно 23;

i) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 67 (XCX CAA AGC AGC XCX GAG ACA XCA A), где Z равно 23;

j) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 68 (CXC ААА GCA GCX CXG AGA CAX CAA C), где Z равно 23;

k) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 69 (XCA AAG CAG CXC XGA GAC AXC AAC C), где Z равно 23;

l) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 70 (CAA AGC AGC XCX GAG ACA XCA ACC G), где Z равно 23;

m) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 71 (AAA GCA GCX CXG AGA CAX CAA CCG C), где Z равно 23;

n) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 72 (AAG CAG CXC XGA GAC AXC AAC CGG G), где Z равно 23;

o) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 73 (AGC AGC XCX GAG ACA XCA ACC GCG G), где Z равно 23;

p) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 74 (GCA GCX CXG AGA CAX CAA CCG CGG C), где Z равно 23; и

q) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 75 (CAG CXC XGA GAC AXC AAC CGG GGC X), где Z равно 23,

где X выбран из урацила (U) или тимина (T); и

III.

a) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 76 (GCC AGA AGG AAG GGC GAG AAA AGC X), где Z равно 23;

b) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 77 (CAG AAG GAA GGG CGA GAA AAG CXC C), где Z равно 23;

c) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 78 (GAA GGA AGG GCG AGA AAA GCX CCA G), где Z равно 23;

d) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 79 (AGG AAG GGC GAG AAA AGC XCC AGC A), где Z равно 23;

e) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 80 (ACX CAC GGG GCX CXC ААА GCA GCX C), где Z равно 23;

f) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 81 (GGCXCXCAAAGCAGCXCXGAGACAX), где Z равно 23;

g) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 82 (GGC XCX CAA AGC AGC XCX GA), где Z равно 18;

h) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 83 (GAG AGG GCC AGA AGG AAG GG), где Z равно 18;

i) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацели-

вающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 84 (XXX GCC AXG XXA CCC AGG CX), где Z равно 18;

ж) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 85 (GCG CAC CCX CXG CCC XGG CC), где Z равно 18; и

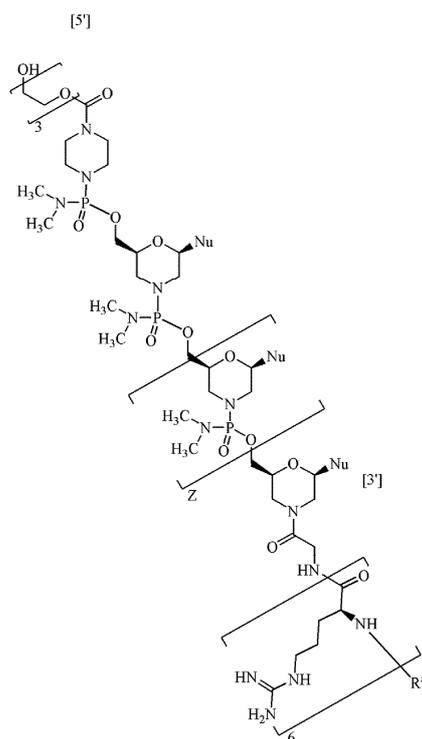
к) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 86 (GGC CCX GGX CXG CXG GCX CCC XGC X), где Z равно 23,

где X выбран из урацила (U) или тимина (T); и где R^a представляет собой H или ацетил.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один X SEQ ID NO: 13-86 представляет собой T. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один X SEQ ID NO: 13-86 представляет собой U. В некоторых вариантах осуществления каждый X SEQ ID NO: 13-86 представляет собой T. В некоторых вариантах осуществления каждый X SEQ ID NO: 13-86 представляет собой U. В различных вариантах осуществления по меньшей мере один X нацеливающей последовательности представляет собой T. В различных вариантах осуществления, каждый X нацеливающей последовательности представляет собой T. В различных вариантах осуществления по меньшей мере один X нацеливающей последовательности представляет собой U. В различных вариантах осуществления, каждый X нацеливающей последовательности представляет собой U.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 27-29, 34-36, 59 и 82. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один X SEQ ID NO: 13, 27-29, 34-36, 59 и 82 представляет собой T. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один X SEQ ID NO: 13, 27-29, 34-36, 59 и 82 представляет собой U. В некоторых вариантах осуществления каждый X SEQ ID NO: 13, 27-29, 34-36, 59 и 82 представляет собой T. В некоторых вариантах осуществления каждый X SEQ ID NO: 13, 27-29, 34-36, 59 и 82 представляет собой U.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловых олигомеров настоящего изобретения, включая, например, антисмысловые олигомеры формулы (XX), антисмысловый олигомер может иметь формулу (XXI)



(XXI)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

I.

а) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 13 (GGC CAG AAG GAA GGC GAG AAA AGC), где Z равно 22;

б) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 14 (GCC AGA AGG AAG GC GAG AAA AGC X), где Z равно 22;

ливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 56 (GCG GGA GGG GCG GCA CXC ACG GC), где Z равно 21;

ss) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 57 (GCG GGA GGG GCG GCA CXC ACG C), где Z равно 20; и

tt) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 58 (GCG GGA GGG GCG GCA CXC ACC), где Z равно 19,

где X выбран из урацила (U) или тимина (T);

II.

a) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 59 (GGC CAG AAG GAA GGG CGA GAA AAG C), где Z равно 23;

b) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 60 (CCA GAA GGA AGG GCG AGA AAA GCX C), где Z равно 23;

c) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 61 (AAG GAA GGG CGA GAA AAG CXC CAG C), где Z равно 23;

d) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 62 (GCG GGA GGG GCG GCA CXC ACG GGG C), где Z равно 23;

e) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 63 (XGG GGA GAG GGC CAG AAG GAA GGG C), где Z равно 23;

f) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 64 (AGA AGG AAG GGC GAG AAA AGC XCC A), где Z равно 23;

g) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 65 (GCX CXC AAA GCA GCX CXG AGA CAX C), где Z равно 23;

h) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 66 (CXC XCA AAG CAG CXC XGA GAC AXC A), где Z равно 23;

i) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 67 (XCX CAA AGC AGC XCX GAG ACA XCA A), где Z равно 23;

j) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 68 (CXC AAA GCA GCX CXG AGA CAX CAA C), где Z равно 23;

k) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 69 (XCA AAG CAG CXC XGA GAC AXC AAC C), где Z равно 23;

l) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 70 (CAA AGC AGC XCX GAG ACA XCA ACC G), где Z равно 23;

m) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 71 (AAA GCA GCX CXG AGA CAX CAA CCG C), где Z равно 23;

n) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 72 (AAG CAG CXC XGA GAC AXC AAC CGC G), где Z равно 23;

o) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 73 (AGC AGC XCX GAG ACA XCA ACC GCG G), где Z равно 23;

p) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 74 (GCA GCX CXG AGA CAX CAA CCG CGG C), где Z равно 23; и

q) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 75 (CAG CXC XGA GAC AXC AAC CGC GGC X), где Z равно 23,

где X выбран из урацила (U) или тимина (T); и III.

l) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 76 (GCC AGA AGG AAG GGC GAG AAA AGC X), где Z равно 23;

m) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 77 (CAG AAG GAA GGG CGA GAA AAG CXC C), где Z равно 23;

n) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 78 (GAA GGA AGG GCG AGA AAA GCX CCA G), где Z равно 23;

o) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 79 (AGG AAG GGC GAG AAA AGC XCC AGC A), где Z равно 23;

p) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 80 (ACX CAC GGG GCX CXC AAA GCA GCX C), где Z равно 23;

q) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 81 (GGCXCXCAAAGCAGCXCXGAGACAX), где Z равно 23;

r) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 82 (GGC XCX CAA AGC AGC XCX GA), где Z равно 18;

s) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 83 (GAG AGG GCC AGA AGG AAG GG), где Z равно 18;

t) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 84 (XXX GCC AXG XXA CCC AGG CX), где Z равно 18;

u) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 85 (GCG CAC CCX CXG CCC XGG CC), где Z равно 18;

и

v) каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность (5'-3'): SEQ ID NO: 86 (GGC CCX GGX CXG CXG GCX CCC XGC X), где Z равно 23,

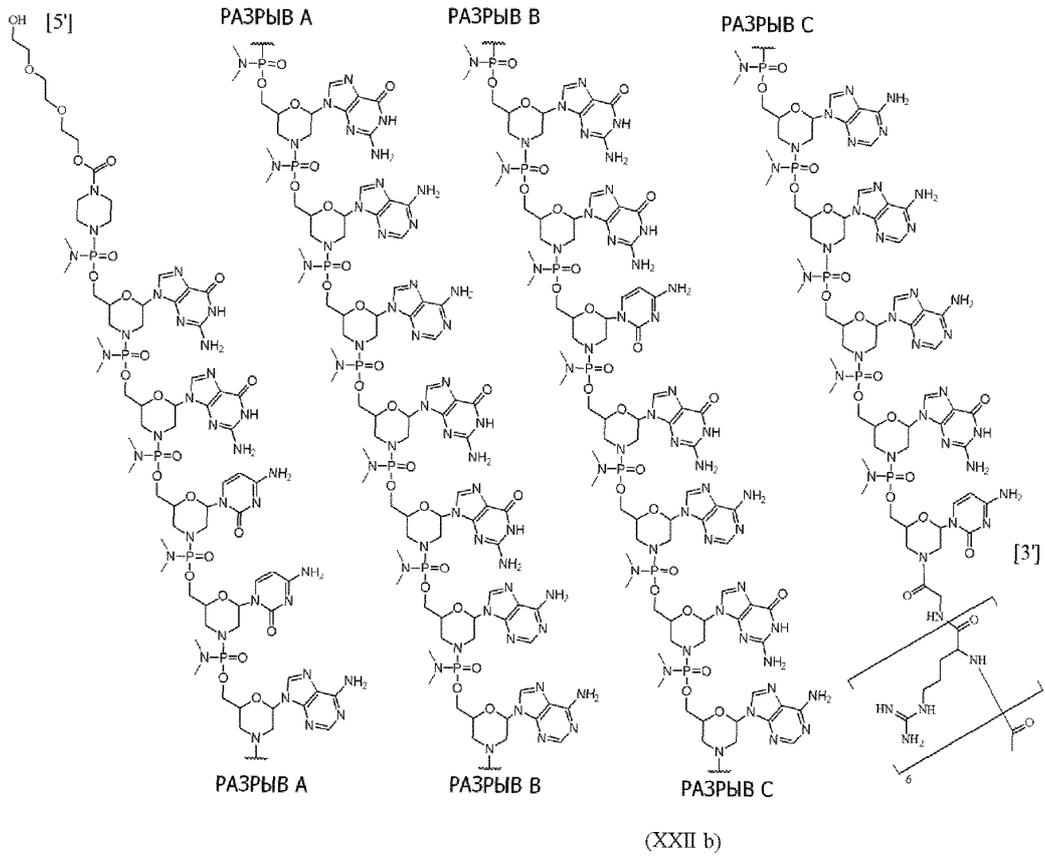
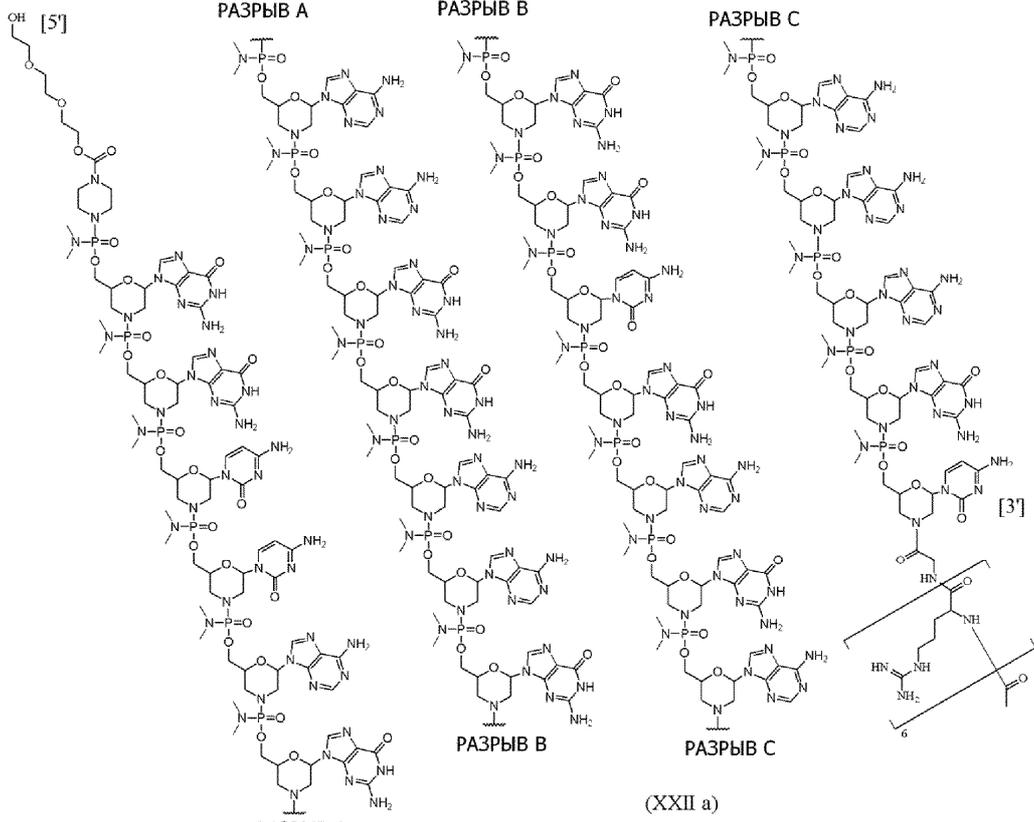
где X выбран из урацила (U) или тимина (T);

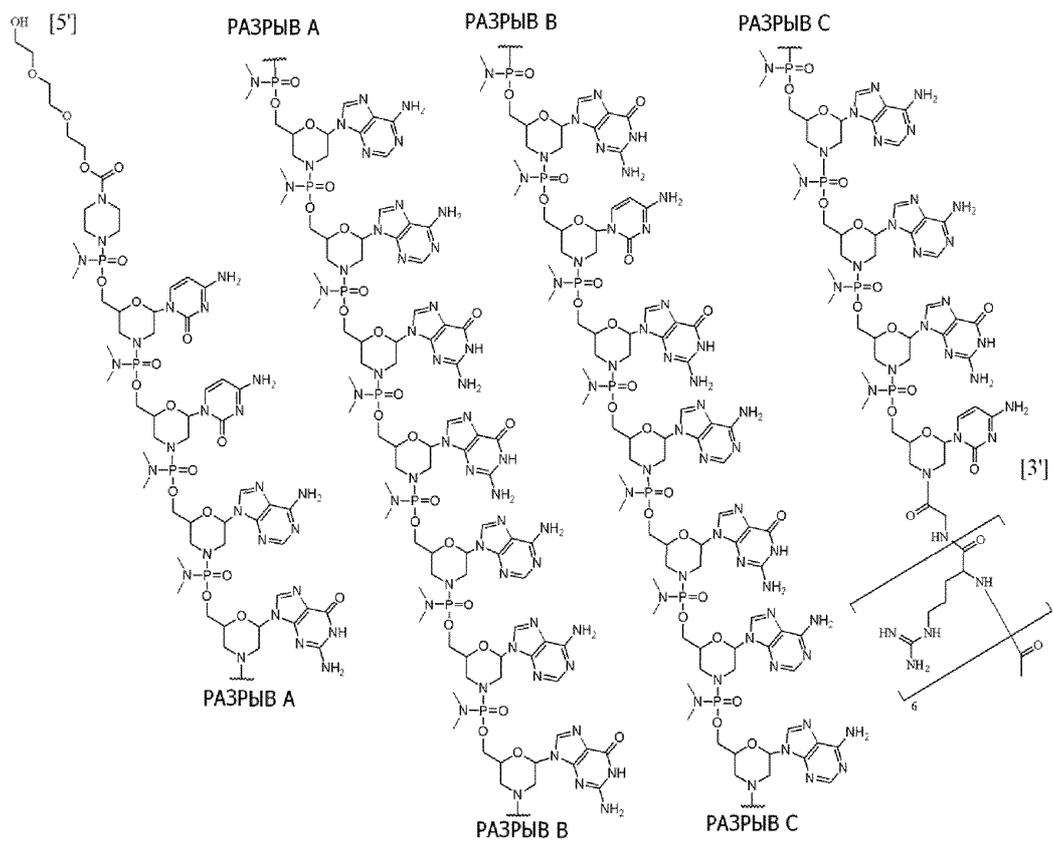
и где R^a представляет собой H или ацетил.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один X SEQ ID NO: 13-86 представляет собой T. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один X SEQ ID NO: 13-86 представляет собой U. В некоторых вариантах осуществления каждый X SEQ ID NO: 13-86 представляет собой T. В некоторых вариантах осуществления каждый X SEQ ID NO: 13-86 представляет собой U. В различных вариантах осуществления по меньшей мере один X нацеливающей последовательности представляет собой T. В различных вариантах осуществления, каждый X нацеливающей последовательности представляет собой T. В различных вариантах осуществления по меньшей мере один X нацеливающей последовательности представляет собой U. В различных вариантах осуществления, каждый X нацеливающей последовательности представляет собой U.

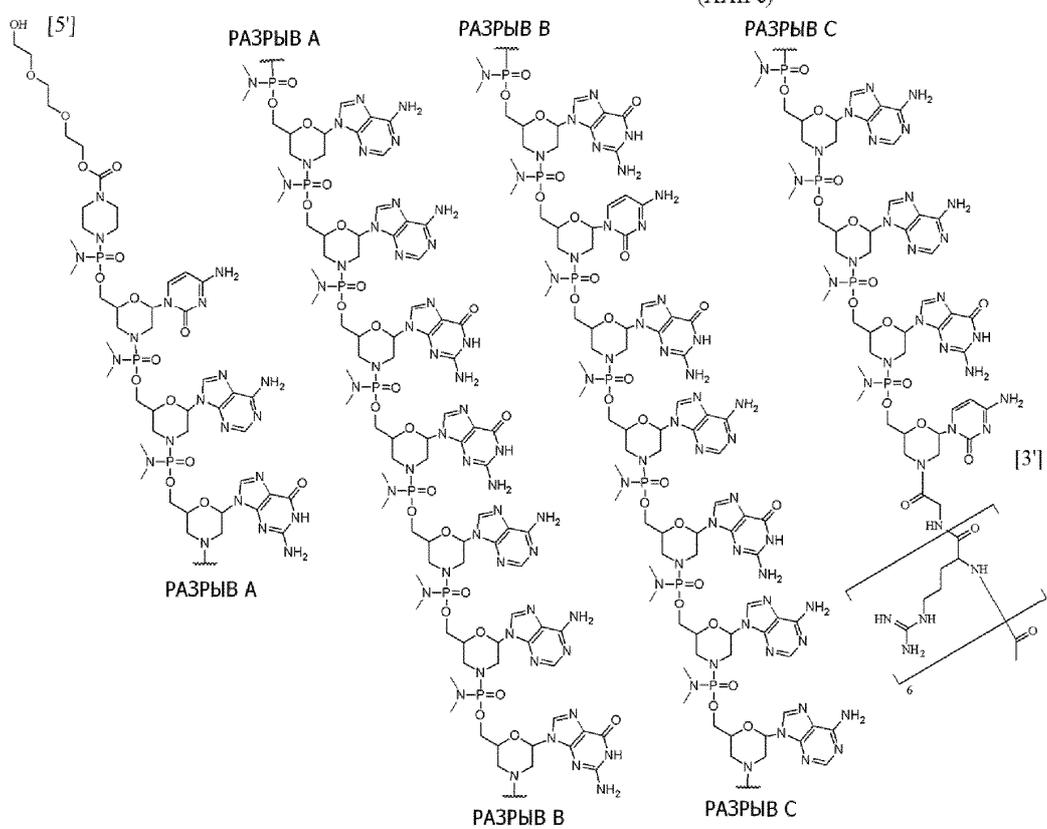
В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 27-29, 34-36, 59 и 82. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один X SEQ ID NO: 13, 27-29, 34-36, 59 и 82 представляет собой T. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один X SEQ ID NO: 13, 27-29, 34-36, 59 и 82 представляет собой U. В некоторых вариантах осуществления каждый X SEQ ID NO: 13-86 представляет собой T. В некоторых вариантах осуществления каждый X SEQ ID NO: 13, 27-29, 34-36, 59 и 82 представляет собой U.

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

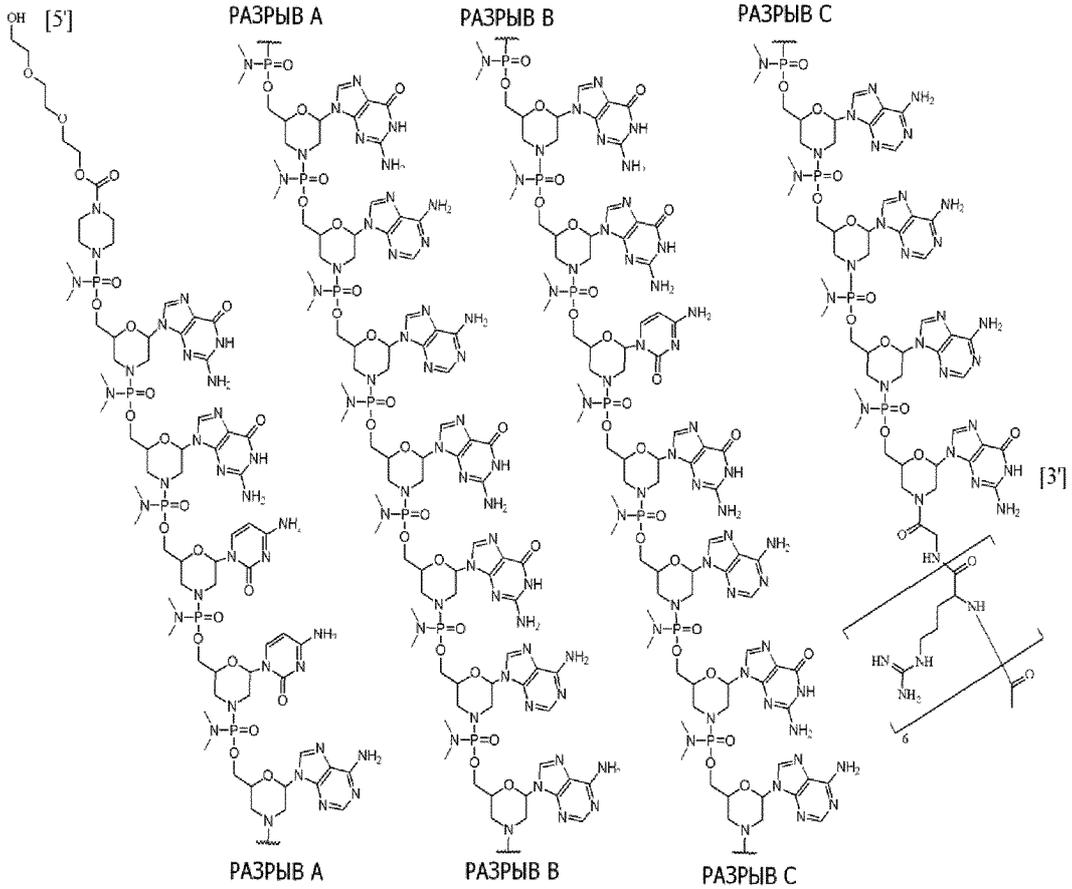




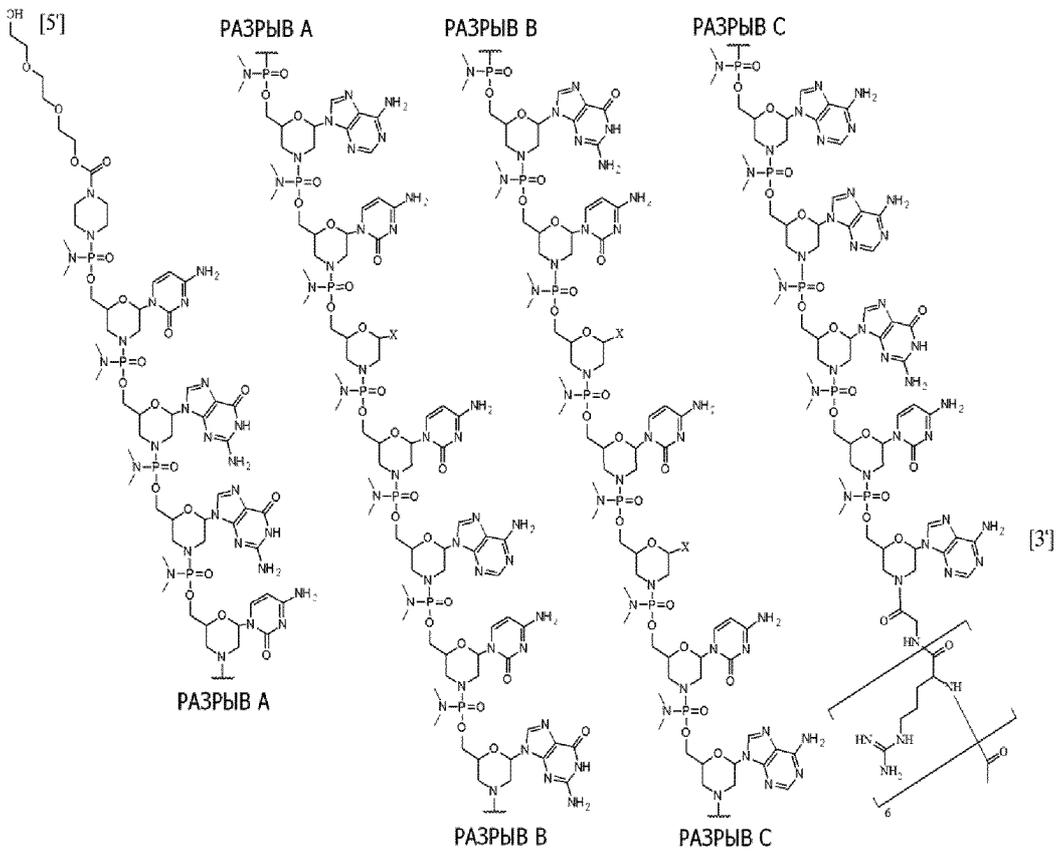
(XXII c)



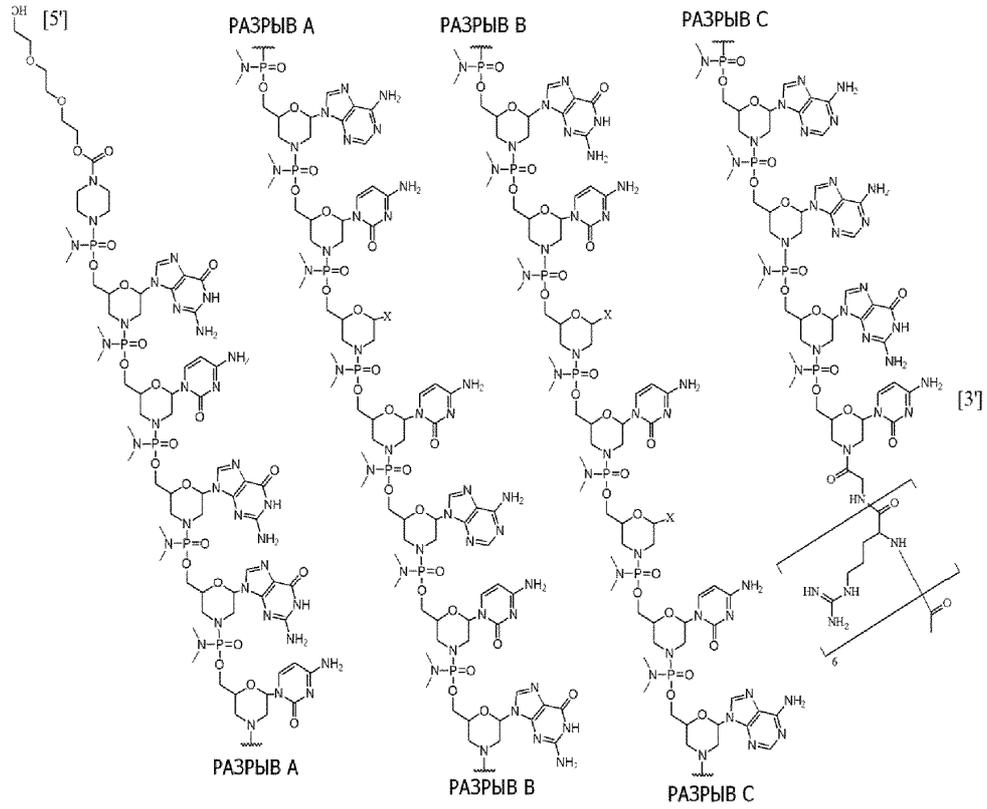
(XXII d)



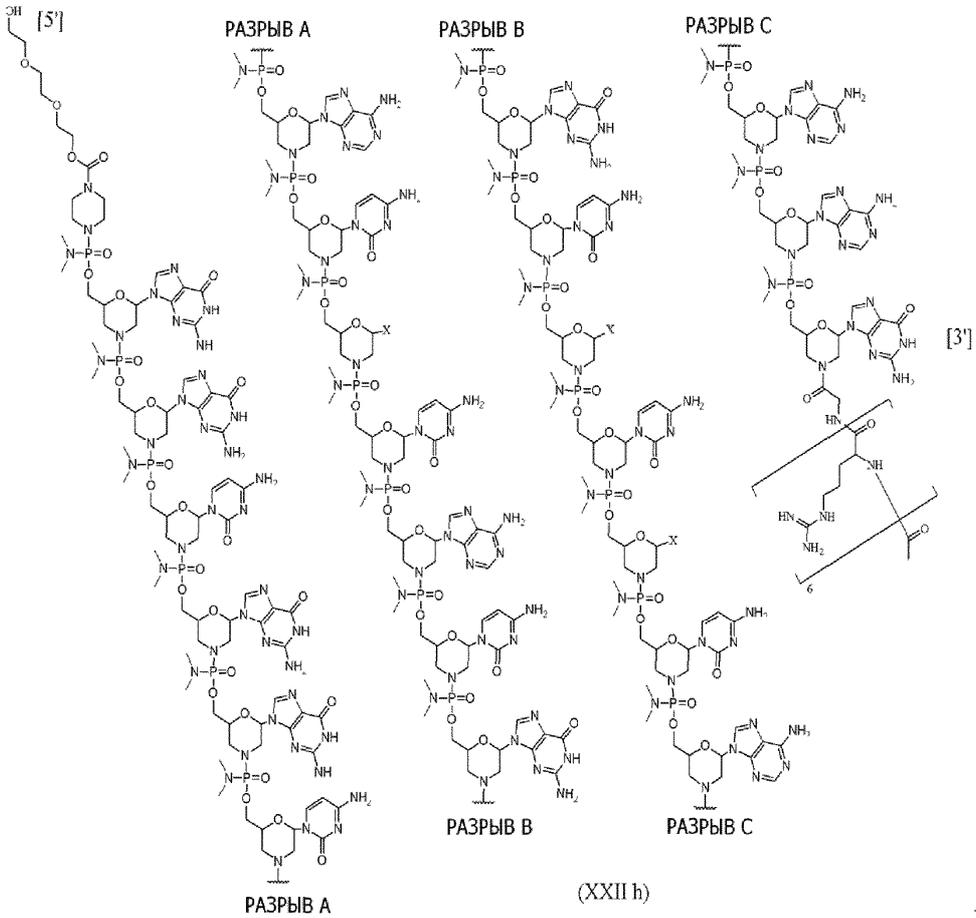
(XXII e)



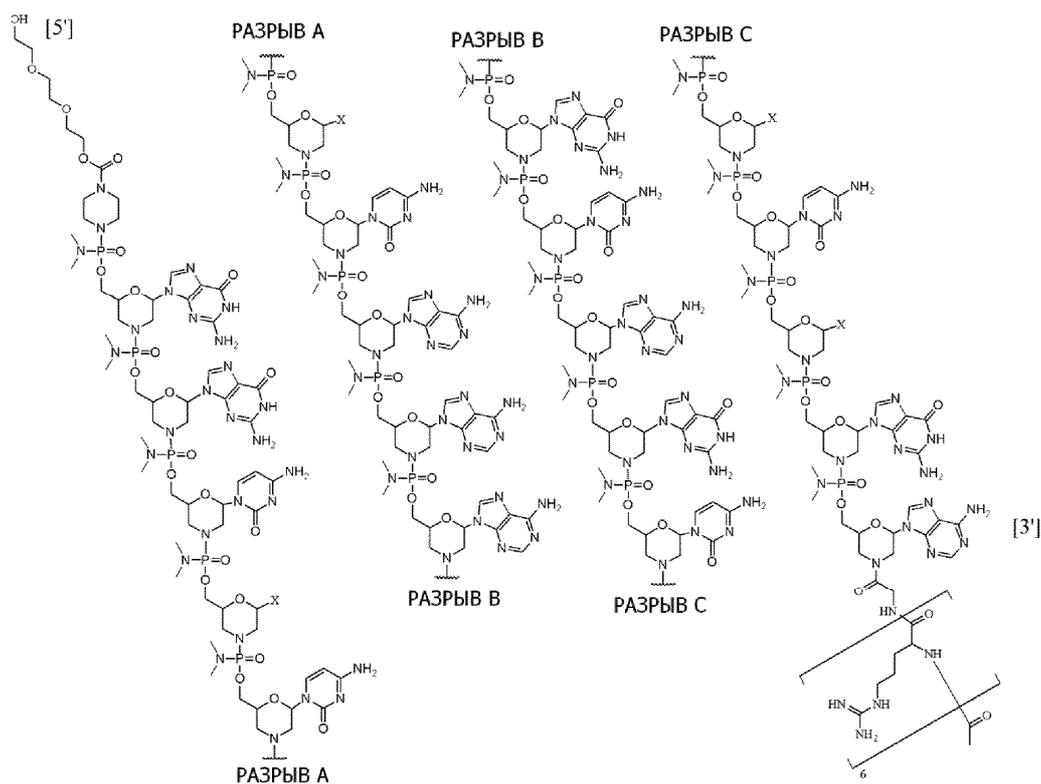
(XXII f)



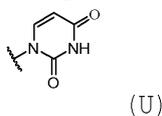
(XXII g)



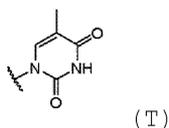
(XXII h)



где X при каждом появлении независимо выбран из



или



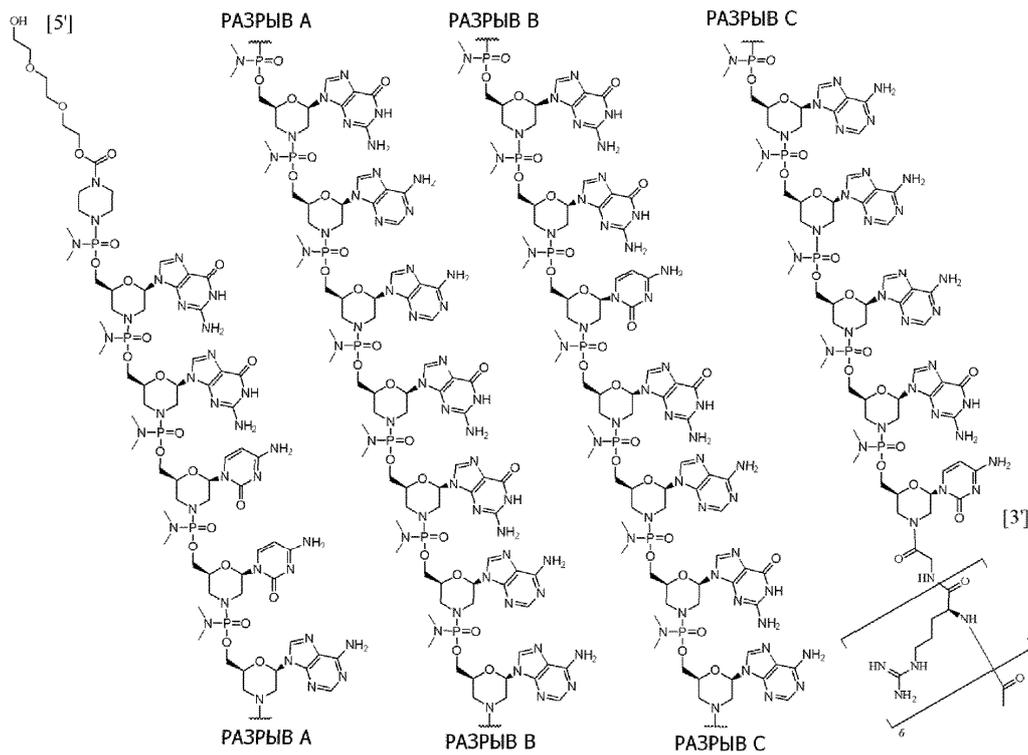
В некоторых вариантах осуществления каждый X представляет собой T. В других вариантах осуществления, каждый X представляет собой U.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (XXII) имеет формулу (XXII a), где по меньшей мере один X представляет собой U. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (XXII) имеет формулу (XXII a), где по меньшей мере один X представляет собой T. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (XXII) имеет формулу (XXII a), где каждый X представляет собой U. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (XXII) имеет формулу (XXII a), где каждый X представляет собой T.

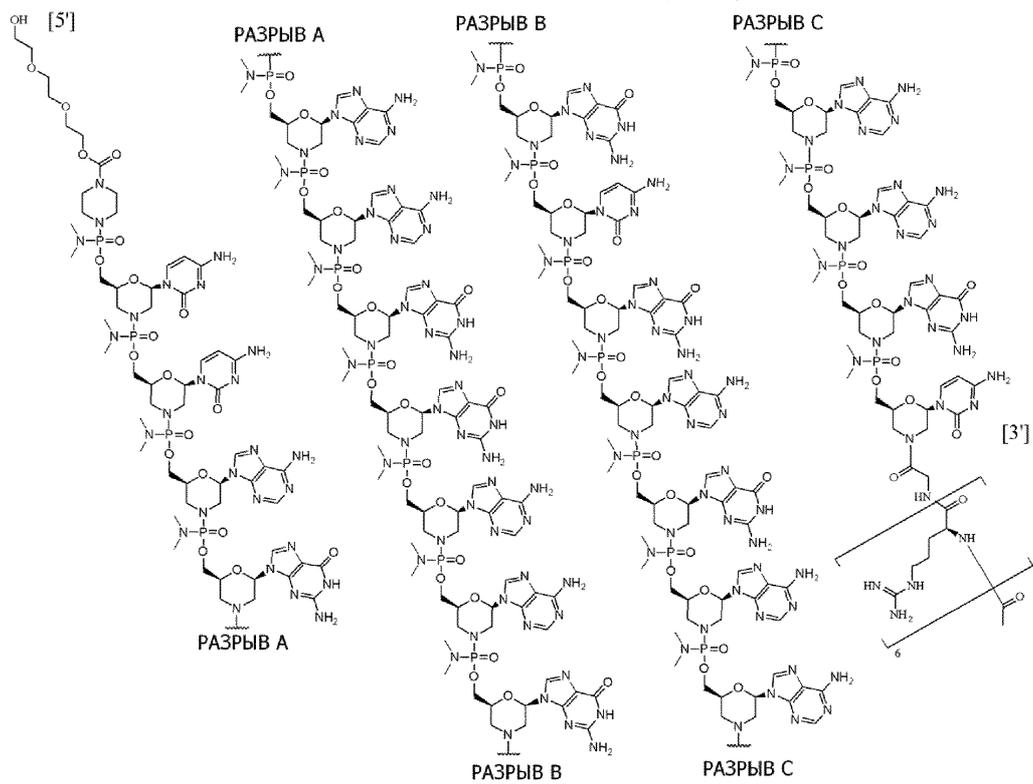
В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (XXII) имеет формулу (XXII b), где по меньшей мере один X представляет собой U. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (XXII) имеет формулу (XXII b), где по меньшей мере один X представляет собой T. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (XXII) имеет формулу (XXII b), где каждый X представляет собой U. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (XXII) имеет формулу (XXII b), где каждый X представляет собой T.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (XXII) имеет формулу (XXII c), где по меньшей мере один X представляет собой U. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (XXII) имеет формулу (XXII c), где по меньшей мере один X представляет собой T. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (XXII) имеет формулу (XXII c), где каждый X представляет собой U. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (XXII) имеет формулу (XXII c), где каждый X представляет собой T.

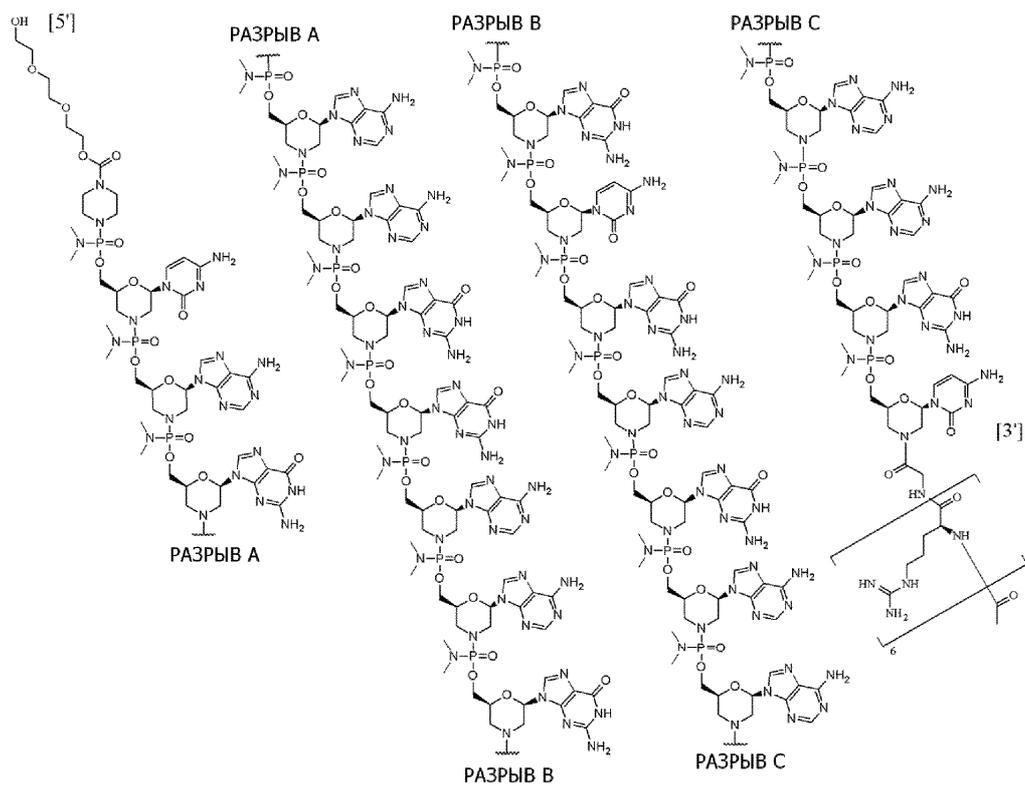
В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (XXII) имеет формулу (XXII d), где по меньшей мере один X представляет собой U. В некоторых вариантах осуществления со-



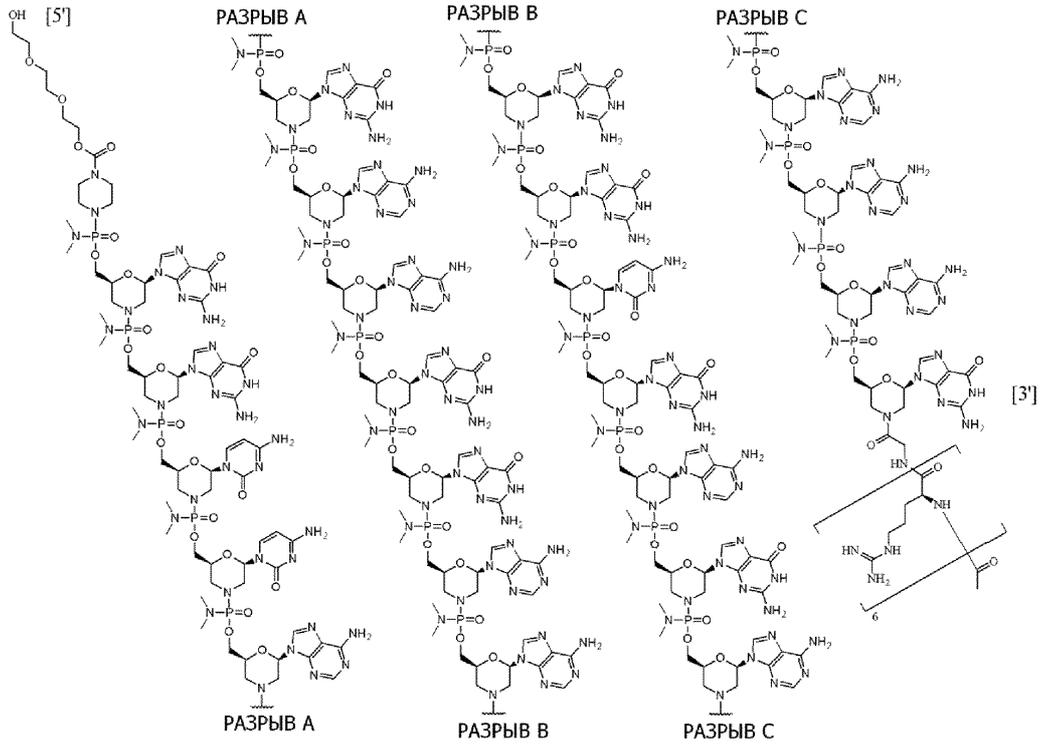
(XXIII b)



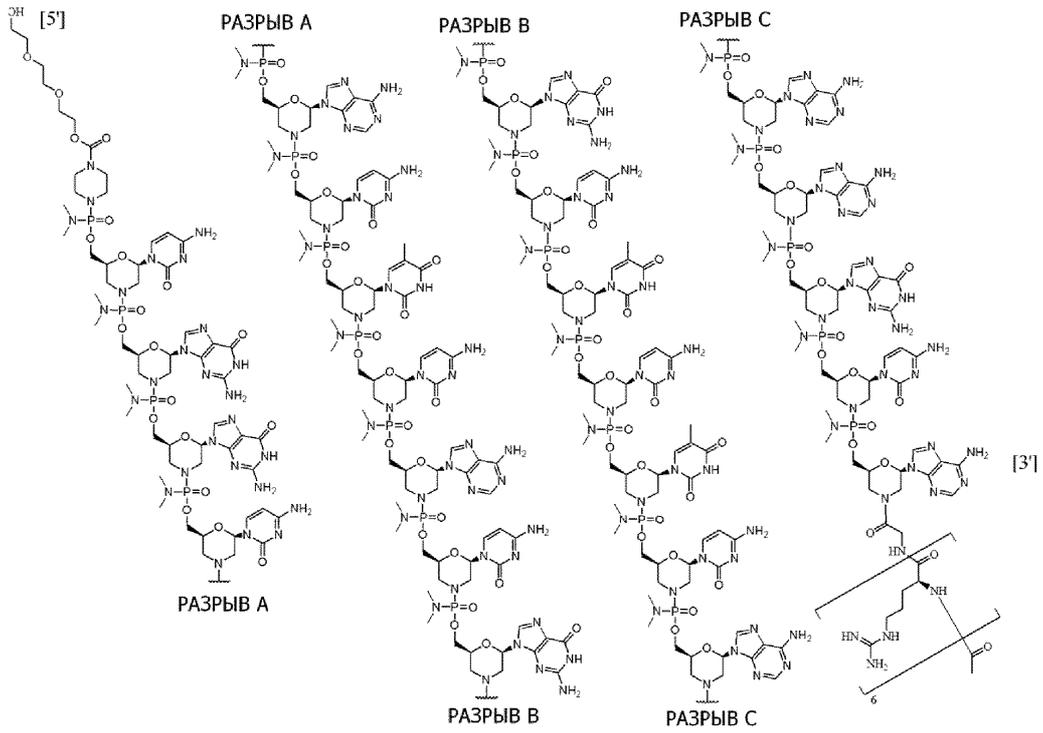
(XXIII c)



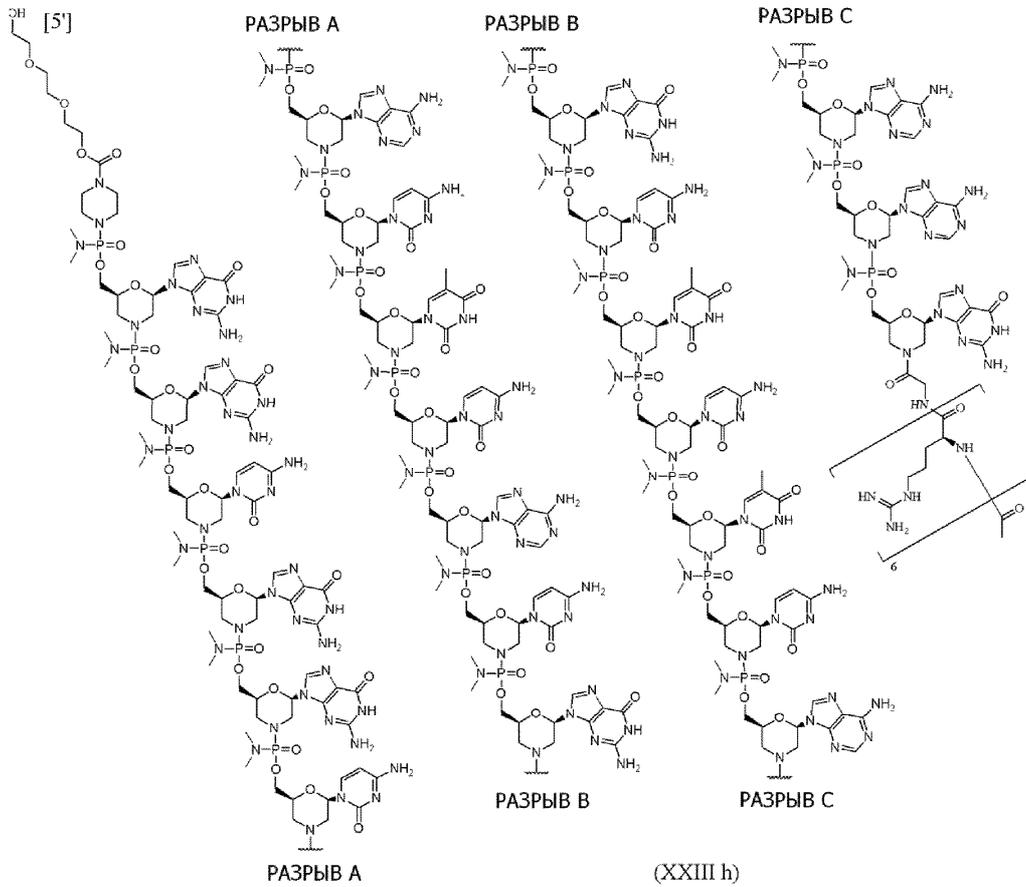
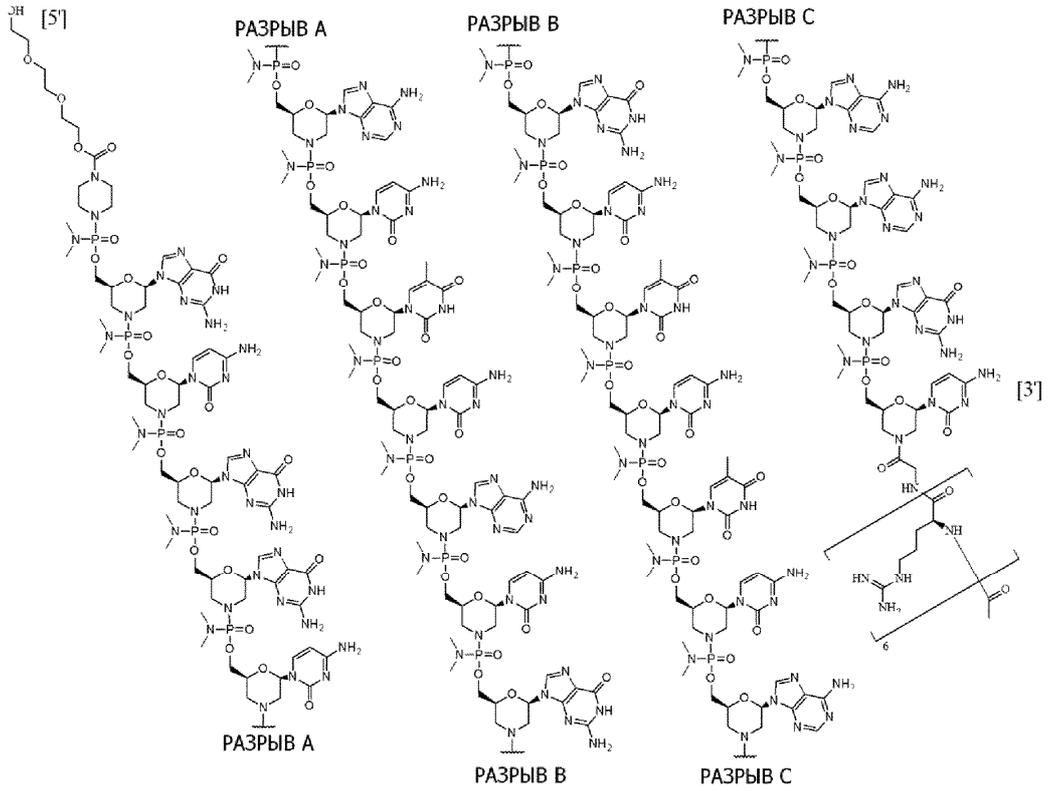
(XXIII d)

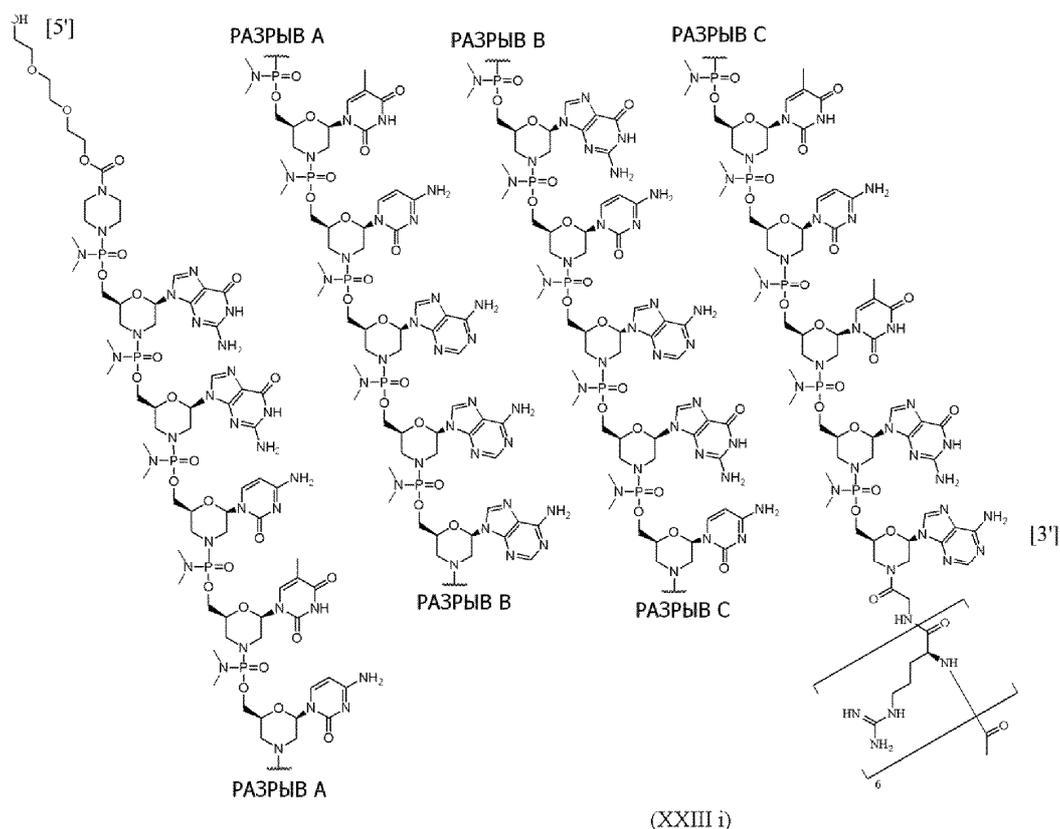


(XXIII e)



(XXIII f)

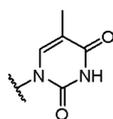
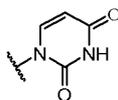




В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (XXIII) имеет формулу (XXIII a). В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (XXIII) имеет формулу (XXIII b). В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (XXIII) имеет формулу (XXIII c). В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (XXIII) имеет формулу (XXIII d). В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (XXIII) имеет формулу (XXIII e). В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (XXIII) имеет формулу (XXIII f). В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (XXIII) имеет формулу (XXIII g). В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (XXIII) имеет формулу (XXIII h). В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (XXIII) имеет формулу (XXIII i).

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к антисмысловому олигомерному соединению любой из формул (XXII a)-(XXII i) или его фармацевтически приемлемой соли где X при каждом появлении независимо выбран из

(U) или



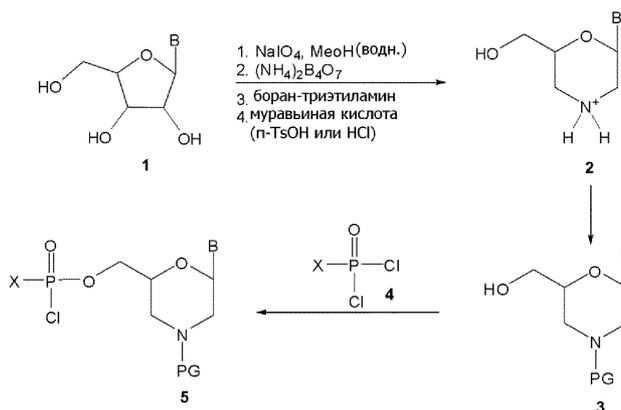
(T). В некоторых вариантах осуществления каждый X представляет собой T.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к антисмысловому олигомерному соединению любой из формул (XXIII a)-(XXIII i) или его фармацевтически приемлемой соли.

D. Получение РМО-X с межнуклеотидными линкерами с основным азотом.

Морфолиновые звенья, модифицированные межзвенные связи и содержащие их олигомеры можно получить, как описано, например, в патентах США № 5185444 и 7943762, которые включены с помощью ссылки во всей своей полноте. Морфолиновые звенья можно получить согласно следующей общей реакционной схеме I.

Реакционная схема 1. Получение морфолиновых звеньев



Ссылаясь на реакционную схему 1, где В представляет собой фрагмент, спаривающийся с основанием, и PG представляет собой защитную группу, морфолиновые звенья можно получить из соответствующих рибонуклеозидов (1), как показано. Морфолиновое звено (2) может быть необязательно защищено реакцией с подходящим предшественником защитной группы, например, тритилхлоридом. 3' защитную группу обычно удаляют в процессе твердофазного синтеза олигомеров, как описано более подробно ниже. Фрагмент, осуществляющий спаривание с основанием, можно подходящим образом защищать для твердофазного синтеза олигомеров. Подходящие защитные группы включают бензоил для аденина и цитозина, фенилацетил для гуанина и пивалоилоксиметил для гипоксантина (I). Пивалоилоксиметильную группу можно вводить по N1 положению гипоксантинового гетероциклического основания. Хотя незащищенное гипоксантиновое звено можно применять, выходы в реакции активации намного выше, когда основание защищено. Другие подходящие защитные группы включают группы, описанные в одновременно рассматриваемой заявке США № 12/271040, которая включена с помощью ссылки во всей своей полноте.

Реакция 3 с активированным фосфорным соединением 4 дает в результате морфолиновые звенья, содержащие требуемый соединительный фрагмент 5. Соединения структуры 4 можно получить, применяя любой набор способов, известных специалисту в данной области техники. Например, данные соединения можно получить реакцией соответствующего амина и оксихлорида фосфора. В связи с этим, аминное исходное соединение можно получить, применяя любой способ, известный в данной области техники, например, способы, описанные в примерах и в патенте США № 7943762.

Соединения структуры 5 можно применять в автоматическом твердофазном синтезе олигомеров для получения олигомеров, содержащих межзвенные связи. Данные способы являются хорошо известными в данной области техники. Вкратце, соединение структуры 5 можно модифицировать по 5' концу для того, чтобы оно содержало линкер с твердой подложкой. Например, соединение 5 можно соединять с твердой подложкой линкером, содержащим L^{11} и L^{15} .

Получение модифицированных морфолиновых звеньев и морфолиновых олигомеров описано более подробно в примерах. Морфолиновые олигомеры, содержащие любой набор модифицированных связей, можно получить, применяя способы, описанные в настоящем изобретении, способы, известные в данной области техники и/или описанные в ссылках в настоящем изобретении. Также описанными в примерах являются общие модификации морфолиновых олигомеров, полученные, как описано ранее (смотри, например, РСТ публикацию WO 2008036127).

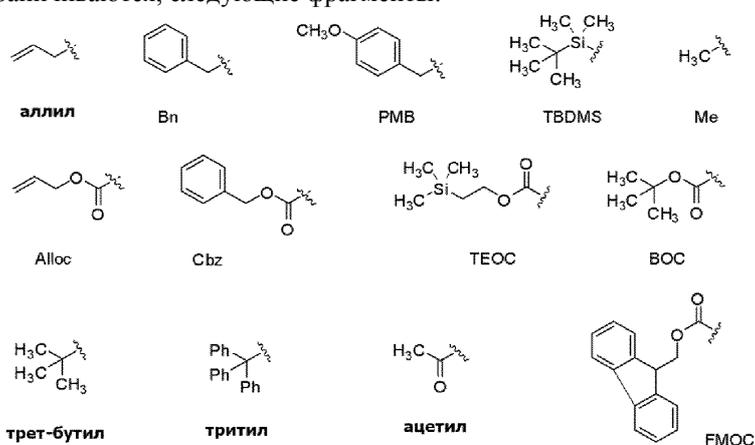
Термин "защитная группа" относится к химическим фрагментам, которые блокируют некоторые или все реакционноспособные фрагменты соединения и препятствуют участию данных фрагментов в химических реакциях до удаления защитной группы, например, фрагменты, перечисленные и описанные в T.W. Greene, P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3-е издание, John Wiley & Sons (1999). Может быть полезно применять различные защитные группы, чтобы каждую (отличную) защитную группу можно было удалять различными способами. Защитные группы, которые удаляются в совершенно разных реакционных условиях, обеспечивают дифференциальное удаление данных защитных групп. Например, защитные группы можно удалять кислотой, основанием и гидрогенолизом. Группы, такие как тритил, диметокситригил, ацеталь и трет-бутилдиметилсилил, являются кислотолабильными, и их можно применять для защиты карбоксов и гидроксидных фрагментов в присутствии аминных групп, защищенных Cbz группами, которые удаляются гидрогенолизом, и Fmoc группами, которые являются основнолабильными. Карбоксильные фрагменты можно блокировать основнолабильными группами, такими как метил или этил, и гидроксидные фрагменты можно блокировать основнолабильными группами, такими как ацетил, в присутствии аминов, блокированных кислотолабильными группами, такими как трет-бутил карбамат или карбаматами, которые являются стабильными и к действию кислот, и к действию оснований, но удаляются гидролитически.

Карбоксильные и гидроксильные реакционные фрагменты можно также блокировать защитными

группами, удаляемыми гидролитически, такими как бензильная группа, тогда как аминогруппы можно блокировать основнотлабильными группами, такими как Fmoc. Особенно пригодной защитной группой аминогруппы для синтеза соединений формулы (I) является трифторацетамид. Карбоксильные реакционные фрагменты можно блокировать окислительно удаляемыми защитными группами, такими как 2,4-диметоксibenзил, тогда как совместно присутствующие аминогруппы можно блокировать фторлабильными сильными карбаматами.

Аллильные блокирующие группы являются пригодными в присутствии кислото- и основнотлабильных защитных групп, поскольку они являются стабильными, и их можно впоследствии удалять металлическими или пи-кислотными катализаторами. Например, блокированную аллилом карбоновую кислоту можно деблокировать реакцией, катализируемой палладием (0), в присутствии кислототлабильной трет-бутилкарбаматной или основнотлабильной ацетатной аминной защитных групп. Еще другая форма защитной группы представляет собой смолу, к которой присоединено соединение или промежуточное соединение. До тех пор, пока остаток присоединен к смоле, данная функциональная группа блокирована и не может реагировать. После высвобождения со смолы, функциональная группа становится доступной для реакции.

Стандартные блокирующие/защитные группы являются известными в данной области техники и включают, но не ограничиваются, следующие фрагменты:



Если не указано иное, все химические вещества получали у Sigma-Aldrich-Fluka. Бензоиладенозин, бензоилцитидин и фенилацетилгуанозин получали у Carbosynth Limited, UK.

Получение PMO, PMO+, PPMO и PMO-X, содержащих дополнительные модификации связей, как описано в настоящем изобретении, получали, применяя способы, известные в данной области техники и описанные в находящихся на рассмотрении заявках США 12/271036 и 12/271040 и PCT публикации номер WO 2009/064471, которые включены в настоящее изобретение с помощью ссылки во всей своей полноте.

PMO с 3' тритильной модификацией получены по существу, как описано в PCT публикации номер WO/2009/064471, за исключением того, что стадию детритилирования пропускали.

IV. Составы.

Соединения настоящего изобретения можно также смешивать, инкапсулировать, конъюгировать или иначе ассоциировать с другими молекулами, молекулярными структурами или смесями соединений, например, липосомами, молекулами, мишенями которых являются рецепторы, пероральными, ректальными, местными или другими составами для того, чтобы способствовать поглощению, распределению и/или абсорбции. Примеры патентов США, которые учат получению данных составов, способствующих поглощению, распределению и/или абсорбции, включают, но не ограничиваются, патенты США № 5108921; 5354844; 5416016; 5459127; 5521291; 5543158; 5547932; 5583020; 5591721; 4426330; 4534899; 5013556; 5108921; 5213804; 5227170; 5264221; 5356633; 5395619; 5416016; 5417978; 5462854; 5469854; 5512295; 5527528; 5534259; 5543152; 5556948; 5580575; и 5595756, каждый из которых включен в настоящее изобретение с помощью ссылки.

Антисмысловые соединения настоящего изобретения включают любые фармацевтически приемлемые соли, эфиры или соли данных эфиров, или любое другое соединение, которое, после введения животному, включая человека, способно обеспечивать (прямо или косвенно) биологически активный метаболит или его остаток. Соответственно, например, также дано описание пролекарств и фармацевтически приемлемым солям соединений настоящего изобретения, фармацевтически приемлемым солям данных пролекарств и другим биоэквивалентам.

Термин "пролекарство" указывает на терапевтический агент, который получают в неактивной форме, которая превращается в активную (т.е. лекарственное средство) в теле или его клетках под действием эндогенных ферментов или других химических веществ и/или условиях. В частности, версии пролекарств олигомеров настоящего изобретения получают в виде SATE [(S-ацетил-2-тиоэтил)фосфатных]

производных согласно способам, описанным в WO 93/24510 Gosselin et al., опубликованном 9 декабря 1993 или в WO 94/26764 и патенте США № 5770713 Imbach et al.

Термин "фармацевтически приемлемые соли" относится к физиологически и фармацевтически приемлемым солям соединений настоящего изобретения: т.е. солям, которые сохраняют требуемую биологическую активность исходного соединения, но не придают ему нежелательных токсикологических эффектов. Для олигомеров, примеры фармацевтически приемлемых солей и их применение дополнительно описано в патенте США № 6287860, который включен в настоящее изобретение во всей своей полноте.

Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции и составы, которые содержат антисмысловые соединения настоящего изобретения. Фармацевтические композиции настоящего изобретения можно вводить рядом путей в зависимости от того, требуется ли местное или системное лечение, и от области, которую обрабатывают. Введение может быть местным (включая офтальмическое и на слизистые мембраны, включая вагинальную и ректальную доставку), легочным, например, ингаляцией или инсуффляцией порошков или аэрозолей, включая ингалятором; интратекальным, интраназальным, эпидермальным и трансдермальным), пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенную, внутриартериальную, подкожную, интраперитонеальную или внутримышечную инъекцию или вливание; или интракраниальное, например интратекальное или интравентрикулярное введение. Считают, что олигомеры по меньшей мере с одной 2'-О-метоксиэтильной модификацией являются особенно пригодными для перорального введения. Фармацевтические композиции и составы для местного введения включают трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, крема, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Общепринятые фармацевтические носители, водные, порошковые или масляные основы, загустители и подобные могут быть необходимы или желательны. Презервативы и перчатки с покрытием и подобные могут быть также пригодными.

Фармацевтические составы настоящего изобретения, которые можно удобно предоставлять в виде единичной лекарственной формы, можно получить согласно общепринятым способам, хорошо известным в области фармацевтической промышленности. Данные способы включают стадию смешения активных ингредиентов с фармацевтическим носителем (носителями) или вспомогательным веществом (веществами). В общем, составы получают равномерным и тщательным смешением активных ингредиентов с жидкими носителями или мелкодисперсными твердыми носителями или обоими, и затем, при необходимости, приданием продукту формы.

Композиции настоящего изобретения можно формулировать в виде многих возможных форм дозирования, таких как, но не ограничиваясь, таблетки, капсулы, желатиновые капсулы, жидкие сиропы, мягкие гели, суппозитории и клизмы. Композиции настоящего изобретения можно также формулировать в виде суспензий в водной, неводной или смешанной среде. Водные суспензии могут дополнительно содержать вещества, которые увеличивают вязкость суспензии, включая, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, сорбитол и/или декстран. Суспензии могут также содержать стабилизаторы.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения включают, но не ограничиваются, растворы, эмульсии, пены и составы, содержащие липосомы. Фармацевтические композиции и составы настоящего изобретения могут содержать один или более агентов, улучшающих проникновение, носителей, вспомогательных веществ или других активных или неактивных ингредиентов.

Эмульсии обычно представляют собой гетерогенные системы одной жидкости, диспергированной в другой в виде капель, обычно превышающих 0,1 мкм в диаметре. Эмульсии могут содержать дополнительные компоненты, в добавление к диспергированным фазам, и активное лекарственное средство, которое может присутствовать в виде растворов или в водной фазе, или в масляной фазе или само представлять собой отдельную фазу. Микроэмульсии включены в качестве варианта осуществления настоящего изобретения. Эмульсии и их применение является хорошо известным в данной области техники и дополнительно описано в патенте США № 6287860, который включен в настоящее изобретение во всей своей полноте.

Составы настоящего изобретения включают липосомные составы. Как применяют в настоящем изобретении, термин "липосома" обозначает везикулу, состоящую из амфифильных липидов, организованных в виде сферического бислоя или бислоев. Липосомы представляют собой однослойные или многослойные везикулы, которые содержат мембрану, образованную из липофильного материала, и водное содержимое, которое содержит композицию, которую доставляют. Катионные липосомы представляют собой положительно заряженные липосомы, которые, как считают, взаимодействуют с отрицательно заряженными молекулами ДНК, образуя стабильный комплекс. Липосомы, которые являются чувствительными к pH или отрицательно заряженными, как считают, захватывают ДНК, а не образуют с ним комплекс. И катионные и некатионные липосомы применяют для доставки НК в клетки.

Липосомы также включают "стерически стабилизированные" липосомы, термин, который, как применяют в настоящем изобретении, относится к липосомам, содержащим один или более специализированных липидов, которые, при введении в липосомы, приводят в результате к увеличению периоду существования в кровяном русле относительно липосом, не содержащих данных специализированных липидов. Примеры стерически стабилизированных липосом представляют собой примеры, в которых часть образующей везикулу липидной части липосомы содержит один или более гликолипидов или де-

риватизирована одним или более гидрофильными полимерами, такими как фрагмент полиэтиленгликоля (PEG). Липосомы и их применение дополнительно описано в патенте США № 6287860, который включен в настоящее изобретение во всей своей полноте.

Фармацевтические составы и композиции настоящего изобретения могут также содержать поверхностно-активные вещества. Применение поверхностно-активных веществ в лекарственных продуктах, составах и в эмульсиях является хорошо известным в данной области техники. Поверхностно-активные вещества и их применение дополнительно описаны в патенте США № 6287860, который включен в настоящее изобретение во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении применяют различные агенты, улучшающие проникновение, обеспечивая эффективную доставку нуклеиновых кислот, в частности олигомеров. В добавление к облегчению диффузии нелипофильных лекарственных средств через клеточные мембраны, агенты, улучшающие проникновение, также улучшают проницаемость липофильных лекарственных средств. Агенты, улучшающие проникновение, можно классифицировать как принадлежащие к одной из пяти категорий, т.е. поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие агенты и нехелатирующие агенты, отличные от поверхностно-активных веществ. Агенты, улучшающие проникновение, и их применение дополнительно описаны в патенте США № 6287860, который включен в настоящее изобретение во всей своей полноте.

Специалисту в данной области техники ясно, что составы стандартно разрабатывают в зависимости от их предполагаемого применения, т.е. пути введения.

Составы для местного введения включают составы, в которых олигомеры настоящего изобретения смешаны с агентами для местной доставки, такими как липиды, липосомы, жирные кислоты, эфиры жирных кислот, стероиды, хелатирующие агенты и поверхностно-активные вещества. Липиды и липосомы включают нейтральные (например, диолеилфосфатидил DOPE этаноламин, димиристоилфосфатидилхолин DMPC, дистеароилфосфатидилхолин), отрицательные (например, димиристоилфосфатидилглицерин DMPG) и катионные (например, диолеилтетраметиламинопропил DOTAP и диолеилфосфатидилэтанолламин DOTMA).

Для местного или другого введения, олигомеры настоящего изобретения можно инкапсулировать в липосомы, или они могут образовывать комплексы с ними, в частности в катионные липосомы. Альтернативно, олигомеры можно комплексовать с липидами, в частности с катионными липидами. Жирные кислоты и эфиры, их фармацевтически приемлемые соли и их применение дополнительно описаны в патенте США № 6287860, который включен в настоящее изобретение во всей своей полноте. Местные составы описаны подробно в заявке США серии № 09/315298, поданной 20 мая 1999, которая включена в настоящее изобретение с помощью ссылки во всей своей полноте.

Композиции и составы для перорального введения включают порошки или гранулы, микрочастицы, наночастицы, суспензии или растворы в водной или неводной среде, капсулы, желатиновые капсулы, сашэ, таблетки или минитаблетки. Загустители, ароматизаторы, разбавители, эмульгаторы, агенты, способствующие диспергированию, или связующие могут также быть желательными. Пероральные составы представляют собой составы, в которых олигомеры настоящего изобретения вводят в сочетании с одним или более агентами, улучшающими проникновение, поверхностно-активными веществами и хелаторами. Поверхностно-активные вещества включают жирные кислоты и/или эфиры или их соли, желчные кислоты и/или их соли. Желчные кислоты/соли и жирные кислоты и их применение дополнительно описаны в патенте США № 6287860, который включен в настоящее изобретение во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает комбинации агентов, улучшающих проникновение, например, жирные кислоты/соли в комбинации с желчными кислотами/солями. Пример комбинации представляет собой натриевую соль лауриновой кислоты, каприновой кислоты и UDCA. Дополнительные агенты, улучшающие проникновение, включают полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир, полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир. Олигомеры настоящего изобретения можно доставлять перорально, в виде гранул, содержащих высушенные распылением частицы, или комплексовать, получая микро или наночастицы. Агенты, образующие комплексы с олигомерами, и их применение дополнительно описаны в патенте США № 6287860, который включен в настоящее изобретение во всей своей полноте. Пероральные составы для олигомеров и их применение описаны подробно в заявках США серийные № 09/108673 (поданной 1 июля 1998), 09/315298 (поданной 20 мая 1999) и 10/071822, поданной 8 февраля 2002, каждый из которых включена в настоящее изобретение с помощью ссылки во всей своей полноте.

Композиции и составы для парентерального, интратекального или интравентрикулярного введения могут включать стерильные водные растворы, которые могут также содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки, такие как, но не ограничиваясь, агенты, улучшающие проникновение, носители и другие фармацевтически приемлемые носители или вспомогательные вещества.

Определенные варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают фармацевтические композиции, содержащие один или более олигомерных соединений и один или более других химиотерапевтических агентов, которые функционируют неантисмысловым механизмом. Примеры данных химиотерапевтических агентов включают, но не ограничиваются, противораковые химиотерапевтические лекарственные средства, такие как даунорубин, дауномицин, дактиномицин, доксорубин, эпирубин,

идарубицин, эзорубицин, блеомицин, мафосфамид, ифосфамид, цитозинарабинозид, бис-хлорэтилнитрозомочевина, бусульфид, митомицин С, актиномицин D, митрамицин, преднизон, гидроксипрогестерон, тестостерон, тамоксифен, дакарбазин, прокарбазин, гексаметилмеламин, пентаметилмеламин, митоксантрон, амсакрин, хлорамбуцил, метилциклогексилнитрозомочевина, азотистые иприты, мелфалан, циклофосфамид, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-азацитидином, гидроксимочевина, дезоксиформин, 4-гидроксипероксициклофосфамид, 5-фторурацил (5-FU), 5-фтордезоксифуридин (5-FUdR), метотрексат (MTX), колхицин, таксол, винкристин, винбластин, этопозид (VP-16), триметрексат, иринотекан, топотекан, гемцитабин, тенипозид, цисплатин и диэтилстилбестрол (DES). При применении с соединениями настоящего изобретения, данные химиотерапевтические агенты можно применять отдельно (например, 5-FU и олигомер), последовательно (например, 5-FU и олигомер в течение некоторого периода времени после MTX и олигомера), или в комбинации с одним или более другими данными химиотерапевтическими агентами (например, 5-FU, MTX и олигомер, или 5-FU, радиотерапия и олигомер). Противовоспалительные лекарственные средства, включая, но не ограничиваясь, нестероидные противовоспалительные лекарственные средства и кортикостероиды, и противовирусные лекарственные средства, включая, но не ограничиваясь, рибавирин, видарабин, ацикловир, можно также комбинировать в композициях настоящего изобретения. Комбинации антисмысловых соединений и других неантисмысловых лекарственных средств также включены в объем настоящего изобретения. Два или более комбинированных соединений можно применять вместе или последовательно.

В другом родственном варианте осуществления, композиции настоящего изобретения могут содержать один или более антисмысловых соединений, в частности олигомеров, мишенью которых является первая нуклеиновая кислота, и один или более дополнительных антисмысловых соединений, мишенью которых является вторая нуклеиновая кислота. Альтернативно, композиции настоящего изобретения могут содержать два или более антисмысловых соединения, нацеленных на различные области одной нуклеиновой кислоты, являющейся мишенью. Многочисленные примеры антисмысловых соединений являются известными в данной области техники. Два или более комбинированных соединений можно применять вместе или последовательно.

V. Способы применения.

Определенные варианты осуществления относятся к способам увеличения экспрессии содержащей экзон 2 GAA мРНК и/или белка, применяя антисмысловые олигомеры настоящего изобретения для терапевтических целей (например, лечения субъектов с GSD-II). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение обеспечивает способы лечения индивида, пораженного или находящегося в группе риска развития GSD-II, включающие введение эффективного количества антисмыслового олигомера настоящего изобретения субъекту. В некоторых вариантах осуществления антисмысловый олигомер, содержащий нуклеотидную последовательность достаточной длины и комплементарности для специфической гибридизации с областью в пре-мРНК гена кислой альфа-глюкозидазы (GAA), где связывание антисмыслового олигомера с областью увеличивает уровень содержащей экзон 2 GAA мРНК в клетке и/или ткани субъекта. Примеры антисмысловых нацеливающих последовательностей показаны в табл. 2A-2C в настоящем изобретении.

Также включенными являются антисмысловые олигомеры для применения в получении лекарственного препарата для лечения болезни накопления гликогена II типа (GSD-II; болезнь Помпе), содержащие нуклеотидную последовательность достаточной длины и комплементарности для специфической гибридизации с областью в пре-мРНК гена кислой альфа-глюкозидазы (GAA), где связывание антисмыслового олигомера с данной областью увеличивает уровень содержащей экзон 2 GAA мРНК.

В некоторых вариантах осуществления способов лечения GSD-II или лекарственного препарата для лечения GSD-II, антисмысловое олигомерное соединение содержит:

Неприродный химический остов, выбранный из фосфорамидатного или фосфородиамидатного морфолинового олигомера (PMO), пептидо-нуклеиновой кислоты (ПНК), конформационно запертой нуклеиновой кислоты (LNA), фосфоротиоатного олигомера, трицикло-ДНК олигомера, трицикло-фосфоротиоатного олигомера, 2'-O-Me-модифицированного олигомера или любой комбинации перечисленных выше; и нацеливающую последовательность, комплементарную области в интроне 1 (SEQ ID. NO: 1), интроне 2 (SEQ ID. NO: 60) или экзоне 2 (SEQ ID. NO: 61) пре-мРНК гена человеческой кислой альфа-глюкозидазы (GAA).

Как отмечалось выше, "GSD-II" относится к болезни накопления гликогена II типа (GSD-II или болезни Помпе), человеческому аутосомно-рецессивному заболеванию, которое часто характеризуется низкой экспрессией GAA белка у пораженных индивидов. Включенными являются субъекты, страдающие от инфантильной GSD-II, и субъекты, страдающие от форм позднего возникновения заболевания.

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет пониженную экспрессию и/или активность GAA белка в одной или более тканях (например, относительно здорового субъекта или в более ранний момент времени), включая сердце, скелетные мышцы, печень и ткани нервной системы. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет повышенное накопление гликогена в одной или более тканях (например, относительно здорового субъекта или в более ранний момент времени), включая сердце, скелетные мышцы, печень и ткани нервной системы. В конкретных вариантах осуществления субъект имеет

по меньшей мере одну IVS1-13T>G мутацию (также называемую с,336-13T>G), возможно в комбинации с другой мутацией (мутациями), которая приводит к пониженной экспрессии функционального GAA белка. Сводка молекулярно-генетических испытаний, применяемых при GSD-II, показаны в табл. 3 ниже.

Таблица 3

| Символ гена | Способ испытания | Обнаруженные мутации | Частота детекции мутации способом испытания | Доступность испытания |
|-------------|---|--|---|-----------------------|
| GAA | Анализ последовательности | p.Arg854* | ~50%-60% | клиническая |
| | | p.Asp645Glu | ~40%-80% | |
| | | IVS1-13T>G | ~50%-85% | |
| | | Другие варианты последовательностей в гене | 83%-93% | |
| | Анализ последовательности выбранных экзонов | Варианты последовательностей в выбранных экзонах | 83%-93% | |
| | анализ на интересующие мутации | Варианты последовательностей в целевых областях | 100% для вариантов среди интересующих мутаций | |
| | Анализ делеции/дублирования | делеции/дубликации экзона и всего гена | 5%-13% | |

Определенные варианты осуществления относятся к способам увеличения экспрессии содержащей экзон 2 GAA мРНК или белка в клетке, ткани и/или у субъекта, как описано в настоящем изобретении. В некоторых случаях, содержащая экзон-2 GAA мРНК или белок увеличиваются приблизительно на или по меньшей мере приблизительно на 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% относительно контроля, например контрольной клетки/субъекта, контрольной композиции без антисмыслового олигомера, отсутствия лечения и/или более раннего момента времени. Также включенными являются способы поддержания экспрессии содержащей GAA мРНК или белка по сравнению с уровнями здорового контроля.

Некоторые варианты осуществления относятся к способам увеличения экспрессии функционального/активного GAA белка в клетке, ткани и/или у субъекта, как описано в настоящем изобретении. В определенных случаях уровень функционального/активного GAA белка увеличивают на приблизительно или, по меньшей мере, приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% относительно контроля, например контрольной клетки/субъекта, контрольной композиции без антисмыслового олигомера, отсутствия лечения и/или более раннего момента времени. Также включенными являются способы поддержания экспрессии функционального/активного GAA белка относительно уровней здорового контроля.

Конкретные варианты осуществления относятся к способам снижения накопления гликогена в одной или более клетках, тканях и/или у субъектов, как описано в настоящем изобретении. В определенных случаях, накопление гликогена снижается на приблизительно или по меньшей мере приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% относительно контроля, например, контрольной клетки/субъекта, контрольной композиции без антисмыслового олигомера, отсутствия лечения и/или более раннего момента времени. Также включенными являются способы поддержания нормальных или иначе здоровых уровней гликогена в клетке, ткани и/или у субъекта (например, бессимптомные уровни или уровни, связанные с ослабленными симптомами GSD-II).

Также включенными являются способы ослабления одного или более симптомов GSD-II у нуждающегося в лечении субъекта. Конкретные примеры включают симптомы инфантильной GSD-II, такие как ардиомегалия, гипотония, кардиомиопатия, обструкция оттока левого желудочка, респираторный дистресс, задержка развития моторики/мышечная слабость, и трудности с приемом пищи/задержка в раз-

витии. Дополнительные примеры включают симптомы GSD-II при позднем возникновении, такие как мышечная слабость (например, слабость скелетных мышц, включая прогрессирующую мышечную слабость), ослабленный кашлевой рефлекс, рецидивирующие инфекции грудной клетки, задержка развития моторики, затрудненное глотание или жевание, и сниженная жизнестойкость или дыхательная недостаточность.

Антисмысловые олигомеры настоящего изобретения можно вводить субъектам для лечения (профилактически или терапевтически) GSD-II. В сочетании с данным лечением, можно рассмотреть фармакогеномику (т.е. изучение взаимосвязи между генотипом индивида и реакцией индивида на чужеродное соединение или лекарственное средство). Различия в метаболизме терапевтических средств может приводить к тяжелой токсичности или терапевтической неудачи изменением соотношения между дозой и концентрацией в крови фармакологически активного лекарственного средства.

Таким образом, лечащий врач или клиницист может рассмотреть возможность применения знаний, полученных в релевантных фармакогеномных исследованиях, определяя, вводить ли терапевтический агент, а также приспосабливать ли дозирование и/или терапевтический режим лечения для терапевтического агента.

Эффективная доставка антисмыслового олигомера к целевой нуклеиновой кислоте представляет собой один аспект лечения. Пути доставки антисмысловых олигомеров включают, но не ограничиваются, различные системные пути, включая пероральный и парентеральный пути, например внутривенную, подкожную, интраперитонеальную и внутримышечную, а также ингаляцию, трансдермальную и местную доставку. Подходящий путь может определить специалист в данной области техники, в зависимости от состояния субъекта на лечении. Сосудистая или внесосудистая циркуляция, кровяная или лимфатическая система и цереброспинальная жидкость представляют собой некоторые неограничивающие места, в которые можно вводить РНК. Можно применять прямую доставку в ЦНС, например, интрацеребральное, вентрикулярное или интратекальное введение можно применять в качестве путей введения.

В конкретных вариантах осуществления, антисмысловой олигомер (олигомеры) вводят субъекту внутримышечной инъекцией (IM), т.е. их вводят или доставляют внутримышечно. Неограничивающие примеры мест внутримышечной инъекции включают дельтовидную мышцу плеча, латеральную широкую мышцу бедра и вентрорядочные мышцы бедер, и мышцы верхнего наружного квадранта ягодиц. В конкретных вариантах осуществления, РМО, РМО-Х или РРМО вводят IM.

В некоторых вариантах осуществления субъект нуждается в лечении, поскольку гликоген накапливается в тканях центральной нервной системы. Примеры включают случаи, когда патология центральной нервной системы способствует нехватке дыхания при GSD-II (см., например, DeRuisseau et al., PNAS USA. 106:9419-24, 2009). Соответственно, антисмысловые олигомеры, описанные в настоящем изобретении, можно доставлять в нервную систему субъекта любым способом, известным в данной области, например, когда субъект имеет GSD-II с вовлечением ЦНС. Например, периферическую инъекцию в кровь антисмысловых олигомеров настоящего изобретения можно применять для доставки указанных реагентов в периферические нейроны диффузным и/или активным способом. Альтернативно, антисмысловые олигомеры можно модифицировать, способствуя прохождению через гематоэнцефалитический барьер (BBB), осуществляя доставку указанных реагентов в нейронные клетки центральной нервной системы (ЦНС). Особый недавний прогресс в технологии антисмысловых олигомеров и стратегий доставки расширил объем применимости антисмысловых олигомеров для заболеваний нейронов (см., например, Forte A. et al. 2005. *Curr. Drug Targets* 6:21-29; Jaeger L.B. и W.A. Banks. 2005. *Methods Mol. Med.* 106:237-251; Vinogradov S.V. et al. 2004. *Bioconjug. Chem.* 5:50-60; вышеперечисленные статьи включены в настоящее изобретение с помощью ссылки во всей своей полноте). Например, антисмысловые олигомеры настоящего изобретения можно получать в виде соединений на основе пептидо-нуклеиновой кислоты (ПНК). Было обнаружено, что каждый из ПНК реагентов проникает через ГЭБ (Jaeger L.B. и W.A. Banks. 2005. *Methods Mol. Med.* 106:237-251). Лечение субъекта, например, вазоактивным агентом, также описано как способствующее транспорту через ГЭБ (Id). Конъюгирование антисмысловых олигомеров настоящего изобретения с агентами, которые активно транспортируются через ГЭБ, можно также применять в качестве механизма доставки. Введение антисмысловых агентов вместе с контрастными агентами, такими как йогексол (например, отдельно, одновременно, в одном составе) может также облегчать доставку через ГЭБ, как описано в РСТ публикации № WO 2013/086207, включенной с помощью ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигомеры настоящего изобретения можно доставлять трансдермальными способами (например, включением антисмысловых олигомеров, например, в эмульсии, причем данные антисмысловые олигомеры необязательно упаковывают в липосомы). Данные трансдермальные и опосредованные эмульсиями/липосомами способы доставки описаны для доставки антисмысловых олигомеров в данной области техники, например в патенте США № 6965025, содержание которого включено в настоящее изобретение с помощью ссылки во всей своей полноте.

Антисмысловые олигомеры, описанные в настоящем изобретении, можно также доставлять имплантируемым устройством. Дизайн данного устройства представляет собой способ, известный в данной области техники, например, дизайн синтетического импланта, описанный, например, в патенте США №

6969400, содержание которого включено в изобретение с помощью ссылки во всей своей полноте.

Антисмысловые олигомеры можно вводить в клетки, применяя способы, известные в данной области техники (например, трансфекцию, электропорацию, вливание, липосомы, коллоидные полимерные частицы и вирусные и невирусные векторы, а также другие способы, известные в данной области техники). Выбранный способ доставки будет зависеть, по меньшей мере, от химии олигомера, клеток, которые обрабатывают, и места клеток и будет очевиден специалисту в данной области техники. Например, локализацию можно осуществлять липосомами со специфическими маркерами на поверхности, обеспечивающими адресную доставку липосом, прямым введением в ткань, содержащую целевые клетки, специфическим поглощением, опосредованным рецепторами, или подобными.

Как известно в данной области техники, антисмысловые олигомеры можно доставлять, применяя, например, способы, включающие опосредованное липосомами поглощение, липидные конъюгаты, опосредованное полилизинном поглощение, опосредованное наночастицами поглощение и опосредованный рецепторами эндоцитоз, а также дополнительные неэндоцитозные режимы доставки, такие как микроинъекция, пермеабиллизация (например, пермеабиллизация стрептолизином-О, пермеабиллизация анионными пептидами), электропорация и различные неинвазивные неэндоцитозные способы доставки, которые являются известными в данной области техники (ссылка на Dokka and Rojanasakul, *Advanced Drug Delivery Reviews* 44, 35-49, включенная с помощью ссылки во всей своей полноте).

Антисмысловые олигомеры можно вводить в любой общепринятой среде или носителе, который является физиологически и/или фармацевтически приемлемым. Данная композиция может содержать любой из множества стандартных фармацевтически приемлемых носителей, применяемых специалистами в данной области техники. Примеры включают, но не ограничиваются, соляной раствор, фосфатно-буферный солевой раствор (PBS), воду, водный этанол, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода или триглицеридные эмульсии, таблетки и капсулы. Выбор подходящего физиологически приемлемого носителя будет изменяться в зависимости от выбранного способа введения. Предполагается, что "фармацевтически приемлемый носитель" включает любой и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие поглощение агенты и подобные, совместимые с фармацевтическим введением. Применение данной среды и агентов для фармацевтически активных веществ является хорошо известным в данной области техники. За исключением случаев, когда любая общепринятая среда или агент является несовместимой с активным соединением, предполагается их применение в композициях. Вспомогательные активные соединения можно также вводить в композиции.

Соединения (например, антисмысловые олигомеры) настоящего изобретения можно обычно применять в виде свободной кислоты или свободного основания. Альтернативно, соединения настоящего изобретения можно применять в виде солей присоединения кислоты или основания. Соли присоединения кислоты соединений со свободной аминогруппой настоящего изобретения можно получить способами, хорошо известными в данной области техники, и можно получить из органических и неорганических кислот. Подходящие органические кислоты включают малеиновую, фумаровую, бензойную, аскорбиновую, янтарную, метансульфо-, уксусную, трифторуксусную, щавелевую, пропионовую, винную, салициловую, лимонную, глюконовую, молочную, миндальную, коричную, аспарагиновую, стеариновую, пальмитиновую, гликолевую, глутаминовую и бензолсульфокислоту.

Подходящие неорганические кислоты включают хлористоводородную, бромистоводородную, серную, фосфорную и азотную кислоты. Соли присоединения основания включают соли, образованные с карбоксилатным ионом и включают соли, образованные с органическими и неорганическими катионами, такими как катионы, выбранные из щелочных и щелочноземельных металлов (например, лития, натрия, калия, магния, бария и кальция), а также иона аммония и его замещенных производных (например, дибензиламмония, бензиламмония, 2-гидроксиэтиламмония и подобных). Таким образом, предполагается, что термин "фармацевтически приемлемая соль" включает любую и все приемлемые солевые формы.

Кроме того, пролекарства также включены в контекст настоящего изобретения. Пролекарства представляют собой любой ковалентно присоединенный носитель, который высвобождает соединение *in vivo*, когда данное пролекарство вводят пациенту. Пролекарства обычно получают модификацией функциональных групп таким способом, что модификация расщепляется, или стандартными манипуляциями или *in vivo*, давая исходное соединение. Пролекарства включают, например, соединения настоящего изобретения, где гидроксильная, амино или сульфгидрильная группа соединена с любой группой, которая, при введении пациенту, расщепляется, давая гидроксильную, амино или сульфгидрильные группы. Таким образом, репрезентативные примеры пролекарств включают (но не ограничиваются) ацетатные, формиатные и бензоатные производные спиртовой и аминовой функциональных групп антисмысловых олигомеров настоящего изобретения. Кроме того, в случае карбоновой кислоты (-COOH), можно применять эфиры, такие как метиловые эфиры, этиловые эфиры и подобные.

В некоторых случаях, липосомы можно применять для того, чтобы способствовать захвату антисмыслового олигомера клетками (см., например, Williams S.A., *Leukemia* 10(12):1980-1989, 1996; Lapalainen et al., *Antiviral Res.* 23:119, 1994; Uhlmann et al., antisense oligomers: a new therapeutic principle,

Chemical Reviews, т. 90, № 4, 25 стр. 544-584, 1990; Gregoriadis G., Chapter 14, Liposomes, Drug Carriers in Biology and Medicine, стр. 287-341, Academic Press, 1979). Гидрогели можно также применять в качестве сред для введения антисмысловых олигомеров, например, как описано в WO 93/01286. Альтернативно, олигомеры можно вводить в микросферах или микрочастицах (см., например, Wu G.Y. and Wu C.H., J. Biol. Chem. 262:4429-4432, 30 1987). Альтернативно, применение наполненных газом микропузырьков в комплексе с антисмысловыми олигомерами может улучшать доставку в целевые ткани, как описано в патенте США № 6245747. Можно также применять композиции с замедленным высвобождением. Они могут включать полупроницаемые полимерные матрицы в виде формованных изделий, таких как пленки или микрокапсулы.

В одном варианте осуществления, антисмысловый олигомер вводят субъекту, являющемуся млекопитающим, например, человеку или домашнему животному, проявляющему симптомы лизосомальной болезни накопления, в подходящем фармацевтическом носителе. В одном аспекте способа, субъект представляет собой человека, например, пациента, которому поставлен диагноз GSD-II (болезни Помпе). В одном предпочтительном варианте осуществления, антисмысловый олигомер содержится в фармацевтически приемлемом носителе и доставляется перорально. В другом предпочтительном варианте осуществления, олигомер содержится в фармацевтически приемлемом носителе и доставляется внутривенно (i.v.).

В одном варианте осуществления антисмысловое соединение вводят в количестве и способом, эффективным для получения в результате пиковой концентрации в крови, по меньшей мере, 200-400 нМ антисмыслового олигомера. Обычно вводят одну или более доз антисмыслового олигомера, обычно через регулярные интервалы, в течение периода приблизительно одной-двух недель. Предпочтительные дозы для перорального введения составляют приблизительно 1-1000 мг олигомера на 70 кг. В некоторых случаях, могут быть необходимы дозы, большие чем 1000 мг олигомер/пациент. Для внутривенного введения, предпочтительные дозы составляют от приблизительно 0,5 мг до 1000 мг олигомера на 70 кг. Антисмысловый олигомер можно вводить через регулярные интервалы в течение короткого периода времени, например, каждый день в течение двух недель или менее. Однако в некоторых случаях олигомер вводят периодически в течение более длительного периода времени. За введением может следовать или осуществляться одновременно введение антибиотика или другого терапевтического средства. Режим лечения можно регулировать (дозу, частоту, путь и т.д.), как показано, исходя из результатов иммуноанализа, других биохимических анализов и физиологического исследования субъекта на лечении.

Эффективный *in vivo* режим лечения, применяя антисмысловые олигомеры изобретения, может изменяться в зависимости от продолжительности, дозы, частоты и пути введения, а также состояния субъекта на лечении (т.е. профилактическое введение в сравнении с введением в ответ на локализованную или системную инфекцию). Соответственно, данная *in vivo* терапия будет часто требовать контроля испытаниями, пригодными для конкретного типа заболевания, которое лечат, и соответствующих корректировок доз или режима лечения, для достижения оптимального терапевтического результата.

Лечение можно контролировать, например, стандартными индикаторами заболевания, известными в данной области техники. Эффективность введенного *in vivo* антисмыслового олигомера настоящего изобретения можно определить из биологических образцов (ткани, крови, мочи и т.д.), отобранных у субъекта перед, в процессе и после введения антисмыслового олигомера. Анализы данных образцов включают (1) отслеживание присутствия или отсутствия образования гетеродуплекса с целевыми и нецелевыми последовательностями, применяя способы, известные специалисту в данной области техники, например, анализ на подвижность в электрофорезном геле; (2) контролирование количества мутантной мРНК относительно эталонной нормальной мРНК или белка, как определено стандартными способами, такими как ПЦР в реальном времени, нозерн-блоттинг, ELISA или вестерн-блоттинг.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловый олигомер активно поглощается клетками млекопитающих. В следующих вариантах осуществления, антисмысловый олигомер можно конъюгировать с транспортным фрагментом (например, транспортным пептидом или CPP), как описано в настоящем изобретении, облегчая поглощение.

VI. Дозирование.

Считают, что составы терапевтических композиций и их последующее введение (дозирование) находится в пределах знаний специалиста в данной области техники. Дозирование зависит от тяжести и восприимчивости к лечению болезненного состояния, которое лечат, причем курс лечения длится от нескольких дней до нескольких месяцев, или до осуществления вылечивания или достижения ослабления болезненного состояния. Оптимальный график дозирования можно рассчитать из измерений накопления лекарственного средства в теле пациента. Специалист в данной области техники может легко определить оптимальные дозы, способы дозирования и частоту повторения. Оптимальные дозы могут изменяться, в зависимости от относительной эффективности отдельных олигомеров, и их можно обычно оценить, исходя из EC50, которые, как были найдено, являются эффективными в *in vitro* и *in vivo* моделях животных. В общем, доза составляет от 0,01 мкг до 100 г на кг веса тела, и ее можно вводить один или более раз в день, неделю, месяц или год, или даже один раз каждые 2-20 лет. Специалист в данной области техники может легко оценить частоту повторов для дозирования, исходя из измеренных времен пребы-

вания и концентраций лекарственного средства в биологических жидкостях или тканях. После успешного лечения, может быть желательно подвергать пациента поддерживающей терапии, предотвращая рецидив болезненного состояния, где олигомер вводят в поддерживающих дозах в диапазоне от 0,01 мкг до 100 г на кг веса тела, один или более раз в день, один раз каждые 20 лет.

Тогда как настоящее изобретение описано со спецификой согласно некоторым из его вариантов осуществления, следующие примеры служат только для иллюстрации описания и не предполагаются ограничивающими его. Каждая из ссылок, патентов, патентных заявок, GenBank номеров доступа и подобных, приводимых в настоящей заявке, включена в настоящее изобретение с помощью ссылки во всей своей полноте.

VII. Примеры.

Пример 1. Дизайн антисмысловых нацеливающих последовательностей.

Антисмысловые олигомерные нацеливающие последовательности конструировали для терапевтических применений с переключением сплайсинга, относящихся к IVS1-13T>G мутации в GAA гене человека. В настоящем изобретении полагают, что олигомеры, переключающие сплайсинг, будут подавлять интронный и экзонный элемент, являющиеся сайленсерами сплайсинга (ISS и ESS элементы, соответственно) и, посредством этого, способствовать сохранению экзона 2 в зрелой мРНК GAA. Затем, восстановление нормальной или близкой к нормальной экспрессии GAA могло бы обеспечивать синтез функционального белка, посредством этого, обеспечивая клиническую пользу пациентам с GSD-II.

Таким образом, определенные антисмысловые нацеливающие последовательности разрабатываются для маскировки элементов, являющихся сайленсером сплайсинга, или в экзоне 2 GAA гена или в фланкирующих его интронах. Неограничивающие примеры потенциальных мишеней для элементов, являющихся сайленсерами, включают hnRNPA1 мотивы (TAGGGA), Tra2-β мотивы и 9G8 мотивы. In silico анализ вторичной структуры (mFold) мРНК интронов 1 и 2 (IVS1 и IVS2, соответственно) также применяли для обнаружения взаимодействий на большом расстоянии, которые могут обеспечить подходящие антисмысловые целевые последовательности.

Антисмысловые нацеливающие последовательности, являющиеся результатом данного анализа, показаны в табл. 2A-2C в настоящем изобретении.

Примеры олигомеров, содержащих нацеливающую последовательность, как указано в табл. 2A-2C, получали в виде РМО и/или РРМО (олигомеры, конъюгированные с CPP, таким как богатый аргинином CPP). Как описано ниже, данные антисмысловые олигомеры вводили в фибробласты пациентов с GSD-II, применяя протоколы нуклеофекции, как также описано в примере 2 ниже.

Пример 2.

Материалы и способы.

GSD-II клетки. Фибробласты или лимфоциты индивидов с GSD-II (Coriell клеточные линии GM00443 и GM11661) выращивали согласно стандартным протоколам в минимальной поддерживающей среде Игла с 10% FBS. Клетки пересеивали приблизительно за 3-5 дней до экспериментов и до приблизительно 80% конfluence при трансфекции или нуклеофекции.

GM00443 фибробласты были от мужчин 30-летнего возраста, взрослая форма; возникновение в третьей декаде; нормальный размер и количество мРНК GAA, GAA белка, обнаруженного антителом, но только 9-26% активности нормальной кислой альфа-1,4 гликозидазы; пассаж 3 при CCR; субъект, являющийся донором, является гетерозиготным с одним аллелем, несущим T>G трансверсию по положению

-13 акцепторной области интрона 1 GAA гена, приводящую в результате к транскриптам с альтернативным сплайсингом с делецией первого кодирующего экзона [экзон 2 (IVS1-13T>G)].

GM11661 фибробласты были от мужчин 38-летнего возраста. Тесты на нарушенное функционирование печени; эпизодические судороги в ногах при физической активности; утренняя головная боль; непереносимость жирной пищи; брюшная киста; недостаточная активность фибробластов и WBC кислой альфа-1,4 гликозидазы; субъект, являющийся донором, представляет собой сложную гетерозиготу: аллель один несет T>G трансверсию по положению -13 акцепторной области интрона 1 GAA гена (IVS1-13T>G); полученный в результате транскрипт с альтернативным сплайсингом имеет делецию в рамке считывания экзона 2, которая содержит инициаторный кодон; аллель два несет делецию экзона 18.

Протокол нуклеофекции. Антисмысловые РМО/РРМО (РМО, конъюгированные с пептидом, богатым аргинином) получали в виде 1-2 мМ исходных растворов в воде, обедненной нуклеазами (не обработанной DEPC), из которых получали подходящие разбавленные растворы для нуклеофекции. GSD-II клетки трипсинизировали, считали, центрифугировали при 90g в течение 10 мин, и $1-5 \times 10^5$ клеток на лунку повторно суспендировали в растворе для нуклеофекции P2 (Lonza). Затем, раствор антисмыслового РМО и клетки добавляли в каждую лунку Nucleocuvette 16-луночной полосы, и генерировали импульсы программой EN-100. Клетки выдерживали при комнатной температуре в течение 10 мин и переносили в 12-луночный планшет в двух экземплярах. Суммарную РНК выделяли из обработанных клеток через 48 часов, применяя GE Illustra 96 Spin набор, следуя протоколу, рекомендованному изготовителем. Выделенную РНК хранили при -80°C до анализа.

ПЦР в реальном времени GAA. Для детекции с помощью ПЦР мРНК, содержащих экзон 2, последовательности праймеров выбирали из экзона 1 (прямой) к экзону 3 (обратный). ПЦР в реальном времени для экзонов 1-3 будет генерировать ампликон полной длины приблизительно 1177 оснований. Разница в размере между интактным ампликоном (~1177 оснований) и транскриптом из ~600 оснований, который не содержал экзон 2 (экзон 2 имеет длину ~578 оснований), указывает на существенную предпочтительную амплификацию более короткого продукта. Это позволит установить высокие стандарты в анализе эффективности антисмысловых олигомеров по стимулированию сплайсинга транскрипта полной длины или транскрипта, содержащего экзон-2.

ПЦР с обратной транскрипцией проводили для амплификации GAA аллеля, применяя Superscript III систему одностадийного ПЦР реальном времени (Invitrogen). 400 нг суммарной РНК, выделенной из клеток, подвергнутых нуклеофекции, подвергали обратной транскрипции и амплифицировали с генспецифическими праймерами.

Раствор для амплификации, обеспечиваемый в одностадийном наборе, дополняли Су5-меченным dCTP (GE), обеспечивая визуализацию полос с помощью флуоресценции. Обработанные образцы прогоняли на готовом 10% акриламидном/TBE геле (Invitrogen) и визуализировали на Typhoon Trio (GE), применяя 633 нм возбуждающий лазер и 670 нм BP 30 эмиссионный фильтр с плоскостью фокуса на поверхности пластины. Гели анализировали ImageQuant (GE), определяя интенсивности полос. Интенсивности для всех полос, содержащих экзон 2, собирали вместе для репрезентации уровней транскрипта полного экзона 2 в анализе включения.

Альтернативно, продукты амплификации с помощью ПЦР (без добавления Су5-меченного dCTP) анализировали на Caliper LabChip GX биоанализаторе или Agilent 2200 Tape Station для определения % включения экзона.

Ферментный анализ и Protein Simple вестерн-блоттинг GAA. Нетрансформированные фибробласты пациентов (GM00443) подвергали нуклеофекции с РМО при различных концентрациях в растворе для нуклеофекции Lonza's P3 и выдерживали при 37°C с 5% CO₂ в течение шести дней. Клетки промывали дважды сбалансированным солевым раствором Хенкса (HBSS), лизировали небуферизованной H₂O, замораживали/размораживали три раза и затем встряхивали при 1000 об/мин в течение 1 мин. The Bio-Rad DC™ набор для анализа применяли для количественного определения концентрации всего белка. Что касается ферментного анализа, клеточный лизат смешивали с 1,4 мМ 4-метилумбеллиферил α-D-гликопиранозидом в 0,2 М ацетатном буфере (рН 3,9 или 6,5), выдерживали при 37°C в течение 3 ч и затем флуоресценцию регистрировали при возбуждении при 360 нм и излучении при 460 нм. Стандартную кривую генерировали, применяя 4-метилумбеллиферон.

Вестерн-блоттинг GAA белка проводили, применяя ProteinSimple® Wes™ систему (12-230 кДа набор шаблонов). Кроличье анти-GAA антитело [клон EPR4716(2)] от Abcam разбавляли 1:100 и сдваивали с мышинным анти-GAPDH [клон 6c5] от Santa Cruz Biotechnology, разбавленным 1:5. Мышине и кроличьи вторичные антитела от ProteinSimple® смешивали 1:1 для сдваивания. GAA определяли количественно, применяя ProteinSimple® Compass программное обеспечение, в виде площади под кривой для всех форм GAA и нормализовали к GAPDH.

Пример 3.

Получение антисмысловых РМО и РРМО.

Антисмысловые РМО разрабатывали для воздействия на пре-мРНК человеческой GAA (например, интрон 1 пре-мРНК человеческой GAA), получали, как описано в настоящем изобретении и применяли для обработки фибробластов пациентов с GSD-II.

Таблица 4А. РМО или РРМО соединения после нуклеофекции
(последовательности с внутренней делецией)

| Название | Нацеливающая последовательность (TS) * (5'-3') | TS SEQ ID NO | 5' Привяз ка ** | 3' Привяз ка *** | СРР SEQ ID NO |
|------------------------------------|--|-----------------|--------------------------|---------------------------|---------------------|
| GAA- IVS1.SA. (- 189,-165)-G | GGC CAG AAG GAA GGC GAG AAA AGC | 13 | TEG | H | |
| GAA- IVS1.SA. (- 190,-166)-G | GCC AGA AGG AAG GC GAG AAA AGC T | 87 | TEG | H | |
| GAA- IVS1.SA. (- 191,-167)-G | CCA GAA GGA AGG CGA GAA AAG CTC | 88 | TEG | H | |
| GAA- IVS1.SA. (- 192,-168)-G | CAG AAG GAA GGC GAG AAA AGC TCC | 89 | TEG | H | |
| GAA- IVS1.SA. (- 193,-169)-G | AGA AGG AAG GCG AGA AAA GCT CCA | 90 | TEG | H | |
| GAA- IVS1.SA. (- 194,-170)-G | GAA GGA AGG CGA GAA AAG CTC CAG | 91 | TEG | H | |
| GAA- IVS1.SA. (- 195,-171)-G | AAG GAA GGC GAG AAA AGC TCC AGC | 92 | TEG | H | |
| GAA- IVS1.SA. (- 196,-172)-G | AGG AAG GCG AGA AAA GCT CCA GCA | 93 | TEG | H | |
| GAA-IVS1 (-76- 52)-2G | CGG CTC TCA AAG CAG CTC TGA GA | 94 | TEG | H | |
| GAA-IVS1 (-75- | ACG GCT CTC | 95 | TEG | H | |

042313

| | | | | | |
|----------------------------|--------------------------------------|-----|-----|---|--|
| 51)-2G | AAA GCA GCT CTG AG | | | | |
| GAA-IVS1 (-74-50)-2G | CAC GGC TCT CAA AGC AGC TCT GA | 96 | TEG | H | |
| GAA-IVS1 (-73-49)-2G | TCA CGG CTC TCA AAG CAG CTC TG | 97 | TEG | H | |
| GAA-IVS1 (-72-48)-2G | CTC ACG GCT CTC AAA GCA GCT CT | 98 | TEG | H | |
| GAA-IVS1 (-71-47)-2G | ACT CAC GGC TCT CAA AGC AGC TC | 99 | TEG | H | |
| GAA-IVS1 (-66-42)-2G | GCG GCA CTC ACG GCT CTC AAA GC | 100 | TEG | H | |
| GAA-IVS1 (-65-41)-2G | GGC GGC ACT CAC GGC TCT CAA AG | 101 | TEG | H | |
| GAA-IVS1 (-67-43)-2G | CGG CAC TCA CGG CTC TCA AAG CA | 102 | TEG | H | |
| GAA-IVS1 (-69-45)-2G | GCA CTC ACG GCT CTC AAA GCA GC | 103 | TEG | H | |
| GAA-IVS1 (-68-44)-2G | GGC ACT CAC GGC TCT CAA AGC AG | 104 | TEG | H | |
| GAA-IVS1 (-70-46)-2G | CAC TCA CGG CTC TCA AAG CAG CT | 105 | TEG | H | |
| GAA-IVS1.SA. (-189,-166)-G | GCC AGA AGG AAG GCG AGA AAA GC | 33 | TEG | H | |

042313

| | | | | | |
|---|---------------------------------------|------------|-----|-----|----|
| GAA- IVS1.SA. (- 189,-167)-G | CCA GAA GGA AGG CGA GAA AAG C | 34 | TEG | H | |
| GAA- IVS1.SA. (- 189,-168)-G | CAG AAG GAA GGC GAG AAA AGC | 35 | TEG | H | |
| GAA- IVS1.SA. (- 188,-165)-G | GGC CAG AAG GAA GGC GAG AAA AG | 36 | TEG | H | |
| GAA- IVS1.SA. (- 187,-165)-G | GGC CAG AAG GAA GGC GAG AAA A | 37 | TEG | H | |
| GAA- IVS1.SA. (- 186,-165)-G | GGC CAG AAG GAA GGC GAG AAA | 38 | TEG | H | |
| GAA-IVS1 (-67- 43)-2G/R6 | CGG CAC TCA CGGC TCT CAA AGC A | 106 | TEG | R6G | 11 |
| GAA-IVS1 (-66- 42)-2G/R6 | GCG GCA CTC ACGG CTC TCA AAG C | 107 | TEG | R6G | 11 |
| GAA-IVS1 (-65- 41)-2G/R6 | GGC GGC ACT CAC G GCT CTC AAA G | 108 | TEG | R6G | 11 |
| GAA- IVS1.SA. (- 189,-167)- G/R6 | CCA GAA GGA AGG CGA GAA AAG C | 34 | TEG | R6G | 11 |
| GAA- IVS1.SA. (- 189,-168)- G/R6 | CAG AAG GAA GGC GAG AAA AGC | 35 | TEG | R6G | 11 |
| GAA- IVS1.SA. (- 188,-165)- | GGC CAG AAG GAA GGC GAG AAA AG | 36 | TEG | R6G | 11 |

042313

| | | | | | | |
|---|---------------------------------------|------------|-----|-----|----|--|
| G/R6 | | | | | | |
| GAA- IVS1.SA. (- 189,-165)- G/R6 | GGC CAG AAG GAA GGC GAG AAA AGC | 13 | TEG | R6G | 11 | |
| GAA- IVS1.SA. (- 180,-156)-G | TGG GGA GAG GGC CAG AAG GAA GGC | 109 | TEG | H | | |
| GAA- IVS1.SA. (- 180,-156)-2G | TGG GGA GAG GGC CAG AAG GAA GC | 110 | TEG | H | | |
| GAA- IVS1.SA. (- 180,-156)-3G | TGG GGA GAG GGC CAG AAG GAA C | 111 | TEG | H | | |
| GAA- IVS1.SA. (- 189,-165)-2G | GGC CAG AAG GAA GCG AGA AAA GC | 45 | TEG | H | | |
| GAA- IVS1.SA. (- 189,-165)-3G | GGC CAG AAG GAA CGA GAA AAG C | 46 | TEG | H | | |
| GAA- IVS1.SA. (- 196,-172)-2G | AGG AAG CGA GAA AAG CTC CAG CA | 112 | TEG | H | | |
| CAA- IVS1.SA. (- 196,-172)-3G | ACG AAC CAC AAA AGC TCC AGC A | 113 | TEG | H | | |
| GAA-IVS1 (-76- 52)-G | CGG GCT CTC AAA GCA GCT CTG AGA | 114 | TEG | H | | |
| GAA-IVS1 (-76- 52)-3G | CGC TCT CAA AGC AGC TCT GAG A | 115 | TEG | H | | |
| GAA-IVS1 (-76- 52)-4G | CCT CTC AAA GCA GCT CTG AGA | 116 | TEG | H | | |

| | | | | | |
|-----------------------|---------------------------------------|-----|-----|---|--|
| GAA-IVS1 (-65-41) -G | GGC GGC ACT CAC GGG CTC TCA AAG | 117 | TEG | H | |
| GAA-IVS1 (-65-41) -3G | GGC GGC ACT CAC GCT CTC AAA G | 118 | TEG | H | |
| GAA-IVS1 (-65-41) -4G | GGC GGC ACT CAC CTC TCA AAG | 119 | TEG | H | |
| GAA-IVS1 (-57-33) -G | GCG GGA GGG GCG GCA CTC ACG GGC | 120 | TEG | H | |
| GAA-IVS1 (-57-33) -2G | GCG GGA GGG GCG GCA CTC ACG GC | 121 | TEG | H | |
| GAA-IVS1 (-57-33) -3G | GCG GGA GGG GCG GCA CTC ACG C | 122 | TEG | H | |
| GAA-IVS1 (-57-33) -4G | GCG GGA GGG GCG GCA CTC ACC | 123 | TEG | H | |

*Тимины (Т) необязательно представляют собой урацилы (U). **ТЕГ определяют выше.

Таблица 4В. РМО или РРМО соединения после нуклеофекции

| Название | Нацеливающая последовательность (TS) * (5'-3') | TS SEQ ID NO | 5' привязка а ** | 3' привязка а *** | CPP SEQ ID NO |
|--------------------------|--|--------------|------------------|-------------------|---------------|
| GAA-IVS1.SA. (-189,-165) | GGC CAG AAG GAA GGG CGA GAA AAG C | 59 | TEG | H | |
| GAA-IVS1.SA. (-191,-167) | CCA GAA GGA AGG GCG AGA AAA GCT C | 124 | TEG | H | |
| GAA-IVS1.SA. (- | AAG GAA GGG CGA | 125 | TEG | H | |

| | | | | | |
|----------------------------|---|-----|-----|-----|----|
| 195,-171) | GAA AAG CTC CAG C | | | | |
| GAA-IVS1(-57-33) | GCG GGA GGG GCG GCA CTC ACG GGG C | 126 | TEG | H | |
| GAA-IVS1.SA.(-180,-156) | TGG GGA GAG GGC CAG AAG GAA GGG C | 127 | TEG | H | |
| GAA-IVS1.SA.(-189,-165)-R6 | GGC CAG AAG GAA GGG CGA GAA AAG C | 59 | TEG | R6G | 11 |
| GAA-IVS1(-74-55)-R6 | GGC TCT CAA AGC AGC TCT GA | 128 | TEG | R6G | 11 |
| GAA-IVS1.SA.(-193,-169) | AGA AGG AAG GGC GAG AAA AGC TCC A | 129 | TEG | H | |
| GAA-IVS1(-80-56) | GCT CTC AAA GCA GCT CTG AGA CAT C | 130 | TEG | H | |
| GAA-IVS1(-81-57) | CTC TCA AAG CAG CTC TGA GAC ATC A | 131 | TEG | H | |
| GAA-IVS1(-82-58) | TCT CAA AGC AGC TCT GAG ACA TCA A | 132 | TEG | H | |
| GAA-IVS1(-83-59) | CTC AAA GCA GCT CTG AGA CAT CAA C | 133 | TEG | H | |
| GAA-IVS1(-84-60) | TCA AAG CAG CTC TGA GAC ATC AAC C | 134 | TEG | H | |
| GAA-IVS1(-85-61) | CAA AGC AGC TCT GAG ACA TCA ACC G | 135 | TEG | H | |
| GAA-IVS1(-86-62) | AAA GCA GCT CTG AGA CAT CAA CCG C | 136 | TEG | H | |
| GAA-IVS1(-87-63) | AAG CAG CTC TGA GAC ATC AAC CGC G | 137 | TEG | H | |
| GAA-IVS1(-88-64) | AGC AGC TCT GAG ACA TCA ACC GCG G | 138 | TEG | H | |
| GAA-IVS1(-89-65) | GCA GCT CTG AGA CAT CAA CCG CGG C | 139 | TEG | H | |
| GAA-IVS1(-90-66) | CAG CTC TGA GAC ATC AAC CGC GGC T | 140 | TEG | H | |

*Тимины (Т) необязательно представляют собой урацилы (U).

**ТЕГ определяют выше.

Таблица 4С. РМО или РРМО соединения после нуклеофекции

| Название | Нацеливающая последовательность (TS) * (5'-3') | TS SEQ ID NO | 5' | 3' |
|---------------------------|--|--------------|---------------|-------------|
| | | | привязка а ** | привязка ** |
| GAA-IVS1.SA. (-190, -166) | GCC AGA AGG AAG GGC GAG AAA AGC T | 141 | TEG | H |
| GAA-IVS1.SA. (-192, -168) | CAG AAG GAA GGG CGA GAA AAG CTC C | 142 | TEG | H |
| GAA-IVS1.SA. (-194, -170) | GAA GGA AGG GCG AGA AAA GCT CCA G | 143 | TEG | H |
| GAA-IVS1.SA. (-196, -172) | AGG AAG GGC GAG AAA AGC TCC AGC A | 144 | TEG | H |
| GAA-IVS1 (-71-47) | ACT CAC GGG GCT CTC AAA GCA GCT C | 145 | TEG | H |
| GAA-IVS1 (-79-55) | GGCTCTCAAAGCAGCTCTG AGACAT | 146 | TEG | H |
| GAA-IVS1 (-74-55) | GGC TCT CAA AGC AGC TCT GA | 128 | TEG | H |
| GAA-IVS1 (-179-160) | GAG AGG GCC AGA AGG AAG GG | 83 | TEG | H |
| GAA-IVS1, 2178, 20 | TTT GCC ATG TTA CCC AGG CT | 146 | TEG | H |
| GAA-IVS2, 27, 20 | GCG CAC CCT CTG CCC TGG CC | 147 | TEG | H |
| GAAEx2A (+202+226) | GGC CCT GGT CTG CTG GCT CCC TGC T | 148 | TEG | H |

*Тимины (Т) представляют собой необязательно урацилы (U).

**ТЕГ определяют выше.

Пример 4.

Антисмысловые олигомеры вызывают повышенные уровни экспрессии кислой альфа-глюкозидазы в фибробластах GSD-II пациентов.

Описанные выше антисмысловые РМО и РРМО доставляли в GM00443 или GM11661 клетки нуклеофекцией (см. выше, например, материалы и способы). После шести дней выдерживания при 37°C с 5% CO₂, клетки лизировали, и GAA активность в лизатах или экспрессию GAA белка измеряли иммуноанализом, как описано выше. В общем, экспрессия белкового GAA фермента в клетках, обработанных антисмысловыми олигонуклеотидами настоящего изобретения, была выше, чем уровень экспрессии GAA в необработанных клетках (см. конкретные экспериментальные результаты ниже). Данные результаты показывают, что олигонуклеотиды настоящего изобретения стимулируют повышенные уровни экспрессии белкового GAA фермента в фибробластах GSD-II пациентов. Не желая быть связанными теорией или механизмом действия, принимая во внимание экспериментальные результаты, описанные в настоящем изобретении, изобретатели считают, что олигомеры настоящего изобретения подавляют ISS и/или ESS элементы и, посредством этого, способствуют сохранению экзона 2 в зрелой GAA мРНК.

Как подробно показано в следующих примерах, серию вариантных РРМО и РМО олигонуклеотидов оценивали на их способность повышать экспрессию и/или активность GAA фермента в клетках пациентов с болезнью Помпе. Нацеливающая последовательность вариантных олигонуклеотидов является комплементарной области-мишени в интроне 1 (SEQ ID NO: 1) пре-мРНК гена человеческой альфа-глюкозидазы (GAA), где область-мишень содержит одно, два, три или четыре дополнительных нуклеиновых основания по сравнению с нацеливающей последовательностью, где данные дополнительные нуклеиновые основания представляют собой цитозины, и где одно, два, три или четыре дополнительных нуклеиновых основания не имеют соответствующих комплементарных нуклеиновых оснований в нацеливающей последовательности (следовательно, "-G" (гуанин), "-2G", "-3G" или "-4G" обозначения). Дополнительные нуклеиновые основания являются внутренними области-мишени. Неожиданно было обнаружено, что многие из вариантных олигонуклеотидов обладают одинаковой или аналогичной активностью с олигонуклеотидами, имеющими соответствующую невариантную нацеливающую последовательность (см., например, фиг. 10b и 16). В некоторых случаях олигонуклеотиды, имеющие вариантные нацеливающие

последовательности, были более активными по повышению GAA ферментативной активности в клетках пациентов, по сравнению с олигонуклеотидами, имеющими соответствующую инвариантную нацеливающую последовательность (см., например, фиг. 16). Например, как показано на фиг. 16, два различных олигонуклеотида, имеющие варианты нацеливающие последовательности без одного остатка G, по сравнению с олигонуклеотидами с нацеливающими последовательностями, которые являются на 100% комплементарными GAA (инвариантный), были более активными по повышению GAA в фибробластах пациентов с болезнью Помпе (фиг. 16).

Эксперимент 1.

Отобранные олигонуклеотиды оценивали в GM00443 клетках при ряде доз (5 мкМ и 0,2 мкМ). После выдерживания клеток, подверженных нуклеофекции, в течение шести дней, лизаты получали как выше, и GAA ферментативную активность измеряли в лизатах. Как показано на фиг. 1 и 2, лизаты клеток, обработанных каждым из данных соединений при всех испытываемых концентрациях, показали повышенную GAA ферментативную активность по сравнению с уровнем GAA ферментативной активности в лизатах из необработанных клеток.

Эксперимент 2.

В другом примере отобранные олигонуклеотиды оценивали в GM00443 клетках при ряде доз (5 мкМ, 1 мкМ, 0,2 мкМ и 0,4 мкМ). Как показано на фиг. 3 и 4, лизаты клеток, обработанных каждым из данных соединений при всех испытываемых концентрациях, показали повышенную GAA ферментативную активность по сравнению с уровнем GAA ферментативной активности в лизатах из необработанных клеток.

Эксперимент 3.

В другом примере отобранные олигонуклеотиды оценивали в GM00443 клетках при ряде доз (5 мкМ, 1 мкМ, 0,2 мкМ и 0,04 мкМ). Как показано на фиг. 5-8, лизаты клеток, обработанных каждым из данных соединений при всех испытываемых концентрациях, показали повышенную GAA ферментативную активность по сравнению с уровнем GAA ферментативной активности в лизатах из необработанных клеток.

Эксперимент 4.

В другом примере отобранные олигонуклеотиды оценивали в GM00443 клетках при ряде доз (5 мкМ, 1,6 мкМ, 0,5 мкМ и 0,16 мкМ). Как показано на фиг. 9, лизаты клеток, обработанных каждым из данных соединений при всех испытываемых концентрациях, показали повышенную GAA ферментативную активность по сравнению с уровнем GAA ферментативной активности в лизатах из необработанных клеток.

Эксперимент 5.

В другом примере отобранные олигонуклеотиды оценивали в GM00443 клетках при ряде доз (5 мкМ, 1,6 мкМ, 0,5 мкМ и 0,16 мкМ). Как показано на фиг. 10a, лизаты клеток, обработанных каждым из данных соединений при всех испытываемых концентрациях, показали повышенную GAA ферментативную активность по сравнению с уровнем GAA ферментативной активности в лизатах из необработанных клеток.

Эксперимент 6.

В другом примере отобранные олигонуклеотиды оценивали в GM11661 клетках при ряде доз (5 мкМ, 1,6 мкМ, 0,5 мкМ и 0,16 мкМ). Как показано на фиг. 10b, лизаты клеток, обработанных каждым из данных соединений при всех испытываемых концентрациях, показали повышенную GAA ферментативную активность по сравнению с уровнем GAA ферментативной активности в лизатах из необработанных клеток.

Эксперимент 7.

В другом примере отобранные олигонуклеотиды оценивали в GM00443 клетках при ряде доз (5 мкМ, 1,6 мкМ, 0,5 мкМ и 0,16 мкМ). Как показано на фиг. 11 и 12, лизаты клеток, обработанных каждым из данных соединений при всех испытываемых концентрациях, показали повышенную GAA ферментативную активность по сравнению с уровнем GAA ферментативной активности в лизатах из необработанных клеток.

Эксперимент 8.

В другом примере отобранные олигонуклеотиды оценивали в GM00443 клетках при ряде доз (5 мкМ, 1,6 мкМ, 0,5 мкМ и 0,16 мкМ). Как показано на фиг. 13a, лизаты клеток, обработанных каждым из данных соединений при всех испытываемых концентрациях, показали повышенную GAA ферментативную активность по сравнению с уровнем GAA ферментативной активности в лизатах из необработанных клеток.

Эксперимент 9.

В другом примере отобранные олигонуклеотиды оценивали в GM11661 клетках при ряде доз (5 мкМ, 1,6 мкМ, 0,5 мкМ и 0,16 мкМ). Как показано на фиг. 13b, лизаты клеток, обработанных каждым из данных соединений при всех испытываемых концентрациях, показали повышенную GAA ферментативную активность по сравнению с уровнем GAA ферментативной активности в лизатах из необработанных клеток.

Эксперимент 10.

В другом примере отобранные олигонуклеотиды оценивали в GM00443 клетках при ряде доз (5 мкМ, 1,6 мкМ, 0,5 мкМ и 0,16 мкМ). Как показано на фиг. 14, лизаты клеток, обработанных каждым из данных соединений при всех испытываемых концентрациях, показали повышенную GAA ферментативную активность по сравнению с уровнем GAA ферментативной активности в лизатах из необработанных клеток.

Эксперимент 11.

В другом примере отобранные РРМО олигонуклеотиды оценивали в GM00443 клетках при ряде доз

Кроме того, EC_{50} (мкМ) была в диапазоне от 0,128 до 0,763.

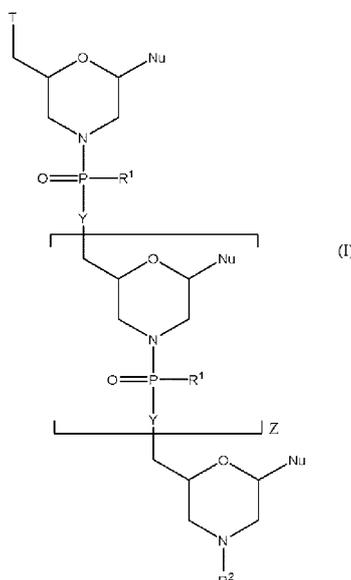
Эксперимент 23.

В другом примере отобранные РРМО олигонуклеотиды оценивали в GM11661 клетках при ряде доз (5 мкМ, 1,6 мкМ и 0,5 мкМ). Как показано на фиг. 26, лизаты клеток, обработанных каждым из данных соединений при всех испытываемых концентрациях, показали повышенную GAA ферментативную активность по сравнению с уровнем GAA ферментативной активности в лизатах из необработанных клеток. Кроме того, EC_{50} (мкМ) была в диапазоне от 0,002 до 0,218.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Модифицированный антисмысловый олигонуклеотид из 10-40 нуклеиновых оснований для лечения болезни накопления гликогена II типа, содержащий нацеливающую последовательность, комплементарную области-мишени в интроне 1 (SEQ ID NO: 1) пре-мРНК гена человеческой альфа-гликозидазы (GAA), где область-мишень содержит по меньшей мере одно дополнительное нуклеиновое основание по сравнению с нацеливающей последовательностью, где по меньшей мере одно дополнительное нуклеиновое основание не имеет комплементарного нуклеинового основания в нацеливающей последовательности и где по меньшей мере одно дополнительное нуклеиновое основание является внутренним к области-мишени,

где модифицированный антисмысловый олигонуклеотид представляет собой антисмысловое олигомерное соединение формулы (I)

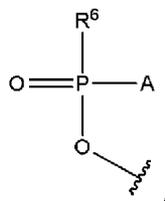


или его фармацевтически приемлемая соль, где каждый Nu представляет собой нуклеиновое основание, которое, взятое вместе, образует нацеливающую последовательность;

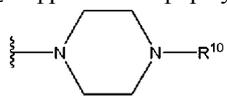
Z представляет собой целое от 8 до 38;

каждый Y независимо выбран из O и $-NR^4$, где каждый R^4 независимо выбран из H, C_1 - C_6 -алкила, аралкила, $-C(=NH)NH_2$, $-C(O)(CH_2)_nNR^5C(=NH)NH_2$, $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^5C(=NH)NH_2$ и G, где R^5 выбран из H и C_1 - C_6 -алкила и n представляет собой целое от 1 до 5;

T выбран из OH и фрагмента формулы



где A выбран из $-OH$, $-N(R^7)_2$ и R^1 , где каждый R^7 независимо выбран из H и C_1 - C_6 -алкила, и R^6 выбран из OH, $-N(R^9)CH_2C(O)NH_2$ и фрагмента формулы:



где R^9 выбран из H и C_1 - C_6 -алкила; и R^{10} выбран из G, $-C(O)-R^{11}OH$, ацила, $-C(=NH)NH_2$, $-C(O)(CH_2)_mNR^{12}C(=NH)NH_2$ и $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{12}C(=NH)NH_2$, где

m представляет собой целое от 1 до 5,

R^{11} имеет формулу $-(O\text{-алкил})_y-$, где y представляет собой целое от 3 до 10, и

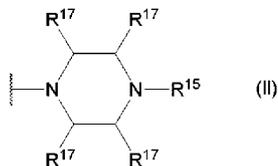
каждая из алкильных групп независимо выбрана из C_2 - C_6 -алкила; и

R^{12} выбран из H и C_1 - C_6 -алкила;

каждый случай R^1 независимо выбран из

$-N(R^{13})_2$, где каждый R^{13} независимо выбран из H и C_1 - C_6 -алкила;

фрагмента формулы (II)



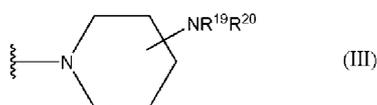
где R^{15} выбран из H, G, C_1 - C_6 -алкила, $-C(=NH)NH_2$, $-C(O)(CH_2)_qNR^{18}C(=NH)NH_2$ и $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{18}C(=NH)NH_2$, где

R^{18} выбран из H и C_1 - C_6 -алкила; и

q представляет собой целое от 1 до 5, и

каждый R^{17} независимо выбран из H и метила; и

фрагмента формулы (III)



где R^{19} выбран из H, C_1 - C_6 -алкила, $-C(=NH)NH_2$, $C(O)(CH_2)_gNR^{22}C(=NH)NH_2$, $-C(O)CH(NH_2)(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$, $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{22}C(=NH)NH_2$, $-C(O)CH(NH_2)(CH_2)_4NH_2$ и G, где

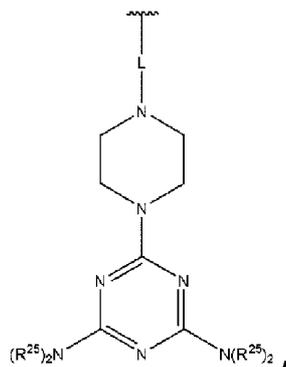
R^{22} выбран из H и C_1 - C_6 -алкила; и

g представляет собой целое от 1 до 5, и

R^{20} выбран из H и C_1 - C_6 -алкила; или

R^{19} и R^{20} вместе с атомом азота, с которым они соединены, образуют гетероциклическое или гетероарильное кольцо, содержащее 5-7 кольцевых атомов и необязательно содержащее дополнительный гетероатом, выбранный из кислорода, азота и серы; и

R^2 выбран из H, G, ацила, бензоила, стеароила, C_1 - C_6 -алкила, $-C(=NH)NH_2$, $-C(O)-R^{23}$, $-C(O)(CH_2)_5NR^{24}C(=NH)NH_2$, $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{24}C(=NH)NH_2$, $-C(O)CH(NH_2)(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ и фрагмента формулы



где R^{23} имеет формулу $-(O\text{-алкил})_v-OH$, где v представляет собой целое от 3 до 10 и каждая v алкильных групп независимо выбрана из C_2 - C_6 -алкила; и

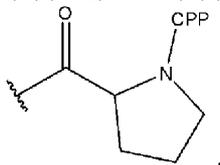
R^{24} выбран из H и C_1 - C_6 -алкила;

s представляет собой целое от 1 до 5;

L выбран из $-C(O)(CH_2)_6C(O)-$ и $-C(O)(CH_2)_2S_2(CH_2)_2C(O)-$; и

каждый R^{25} имеет формулу $-(CH_2)_2OC(O)N(R^{26})_2$, где каждый R^{26} имеет формулу $-(CH_2)_6NHC(=NH)NH_2$,

где G представляет собой проникающий пептид ("CPP") и линкерный фрагмент, выбранный из $-C(O)(CH_2)_5NH-CPP$, $C(O)(CH_2)_2NH-CPP$, $C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-CPP$, $-C(O)CH_2NH-CPP$ и



где CPP соединен с линкерным фрагментом через амидную связь по карбоксиконцу CPP, где G может быть представлен при одном появлении или отсутствовать; и

где нацеливающая последовательность выбрана из группы, состоящей из:

I.

- a) SEQ ID NO: 13 (GGC CAG AAG GAA GGC GAG AAA AGC), где Z равно 22;
- b) SEQ ID NO: 14 (GCC AGA AGG AAG GCG AGA AAA GCX), где Z равно 22;
- c) SEQ ID NO: 15 (CCA GAA GGA AGG CGA GAA AAG CXC), где Z равно 22;
- d) SEQ ID NO: 16 (CAG AAG GAA GGC GAG AAA AGC XCC), где Z равно 22;
- e) SEQ ID NO: 17 (AGA AGG AAG GCG AGA AAA GCX CCA), где Z равно 22;
- f) SEQ ID NO: 18 (GAA GGA AGG CGA GAA AAG CXC CAG), где Z равно 22;
- g) SEQ ID NO: 19 (AAG GAA GGC GAG AAA AGC XCC AGC), где Z равно 22;
- h) SEQ ID NO: 20 (AAG AAG GCG AGA AAA GCX CCA GCA), где Z равно 22;
- i) SEQ ID NO: 21 (CGG CXC XCA AAG CAG CXC XGA GA), где Z равно 21;
- j) SEQ ID NO: 22 (ACG GCX CXC AAA GCA GCX CXG AG), где Z равно 21;
- k) SEQ ID NO: 23 (CAC GGC XCX CAA AGC AGC XCX GA), где Z равно 21;
- l) SEQ ID NO: 24 (XCA CGG CXC XCA AAG CAG CXC XG), где Z равно 21;
- m) SEQ ID NO: 25 (CXC ACG GCX CXC AAA GCA GCX CX), где Z равно 21;
- n) SEQ ID NO: 26 (ACX CAC GGC XCX CAA AGC AGC XC), где Z равно 21;
- o) SEQ ID NO: 27 (GCG GCA CXC ACG GCX CXC AAA GC), где Z равно 21;
- p) SEQ ID NO: 28 (GGC GGC ACX CAC GGC XCX CAA AG), где Z равно 21;
- q) SEQ ID NO: 29 (CGG CAC XCA CGG CXC XCA AAG CA), где Z равно 21;
- r) SEQ ID NO: 30 (GCA CXC ACG GCX CXC AAA GCA GC), где Z равно 21;
- s) SEQ ID NO: 31 (GGC ACX CAC GGC XCX CAA AGC AG), где Z равно 21;
- t) SEQ ID NO: 32 (CAC XCA CGG CXC XCA AAG CAG CX), где Z равно 21;
- u) SEQ ID NO: 33 (GCC AGA AGG AAG GCG AGA AAA GC), где Z равно 21;
- v) SEQ ID NO: 34 (CCA GAA GGA AGG CGA GAA AAG C), где Z равно 20;
- w) SEQ ID NO: 35 (CAG AAG GAA GGC GAG AAA AGC), где Z равно 19;
- x) SEQ ID NO: 36 (GGC CAG AAG GAA GGC GAG AAA AG), где Z равно 21;
- y) SEQ ID NO: 37 (GGC CAG AAG GAA GGC GAG AAA A), где Z равно 20;
- z) SEQ ID NO: 38 (GGC CAG AAG GAA GGC GAG AAA), где Z равно 19;
- aa) SEQ ID NO: 39 (CGG CAC XCA CGG CXC XCA AAG CA), где Z равно 21;
- bb) SEQ ID NO: 40 (GCG GCA CXC ACG GCX CXC AAA GC), где Z равно 21;
- cc) SEQ ID NO: 41 (GGC GGC ACX CAC GGC XCX CAA AG), где Z равно 21;
- dd) SEQ ID NO: 42 (XGG GGA GAG GGC CAG AAG GAA GGC), где Z равно 22;
- ee) SEQ ID NO: 43 (XGG GGA GAG GGC CAG AAG GAA GC), где Z равно 21;
- ff) SEQ ID NO: 44 (XGG GGA GAG GGC CAG AAG GAA C), где Z равно 20;
- gg) SEQ ID NO: 45 (GGC CAG AAG GAA GCG AGA AAA GC), где Z равно 21;
- hh) SEQ ID NO: 46 (GGC CAG AAG GAA CGA GAA AAG C), где Z равно 20;
- ii) SEQ ID NO: 47 (AGG AAG CGA GAA AAG CXC CAG CA), где Z равно 21;
- jj) SEQ ID NO: 48 (AGG AAC GAG AAA AGC XCC AGC A), где Z равно 20;
- kk) SEQ ID NO: 49 (CGG GCX CXC AAA GCA GCX CXG AGA), где Z равно 22;
- ll) SEQ ID NO: 50 (CGC XCX CAA AGC AGC XCX GAG A), где Z равно 20;
- mm) SEQ ID NO: 51 (CCX CXC AAA GCA GCX CXG AGA), где Z равно 19;
- nn) SEQ ID NO: 52 (GGC GGC ACX CAC GGC CXC XCA AAG), где Z равно 22;
- oo) SEQ ID NO: 53 (GGC GGC ACX CAC GCX CXC AAA G), где Z равно 20;
- pp) SEQ ID NO: 54 (GGC GGC ACX CAC CXC XCA AAG), где Z равно 19;
- qq) SEQ ID NO: 55 (GCG GGA GGG GCG GCA CXC ACG GGC), где Z равно 22;
- rr) SEQ ID NO: 56 (GCG GGA GGG GCG GCA CXC ACG GC), где Z равно 21;
- ss) SEQ ID NO: 57 (GCG GGA GGG GCG GCA CXC ACG C), где Z равно 20; и
- tt) SEQ ID NO: 58 (GCG GGA GGG GCG GCA CXC ACC), где Z равно 19,

где X выбран из урацила (U) или тимина (T);

II.

- a) SEQ ID NO: 59 (GGC CAG AAG GAA GGG CGA GAA AAG C), где Z равно 23;
- b) SEQ ID NO: 60 (CCA GAA GGA AGG GCG AGA AAA GCX C), где Z равно 23;
- c) SEQ ID NO: 61 (AAG GAA GGG CGA GAA AAG CXC CAG C), где Z равно 23;
- d) SEQ ID NO: 62 (GCG GGA GGG GCG GCA CXC ACG GGG C), где Z равно 23;
- e) SEQ ID NO: 63 (XGG GGA GAG GGC CAG AAG GAA GGG C), где Z равно 23;
- f) SEQ ID NO: 64 (AGA AGG AAG GGC GAG AAA AGC XCC A), где Z равно 23;
- g) SEQ ID NO: 65 (GCX CXC AAA GCA GCX CXG AGA CAX C), где Z равно 23;
- h) SEQ ID NO: 66 (CXC XCA AAG CAG CXC XGA GAC AXC A), где Z равно 23;
- i) SEQ ID NO: 67 (XCX CAA AGC AGC XCX GAG ACA XCA A), где Z равно 23;
- j) SEQ ID NO: 68 (CXC AAA GCA GCX CXG AGA CAX CAA C), где Z равно 23;

- k) SEQ ID NO: 69 (XCA AAG CAG CXG XGA GAC AXC AAC C), где Z равно 23;
 l) SEQ ID NO: 70 (CAA AGC AGC XCX GAG ACA XCA ACC G), где Z равно 23;
 m) SEQ ID NO: 71 (AAA GCA GCX CXG AGA CAX CAA CCG C), где Z равно 23;
 n) SEQ ID NO: 72 (AAG CAG CXG XGA GAC AXC AAC CGC G), где Z равно 23;
 o) SEQ ID NO: 73 (AGC AGC XCX GAG ACA XCA ACC GCG G), где Z равно 23;
 p) SEQ ID NO: 74 (GCA GCX CXG AGA CAX CAA CCG CGG C), где Z равно 23; и
 q) SEQ ID NO: 75 (CAG CXG XGA GAC AXC AAC CGC GGC X), где Z равно 23,
 где X выбран из урацила (U) или тимина (T).

2. Модифицированный антисмысловый олигонуклеотид по п.1, где нацеливающая последовательность выбрана из любой SEQ ID NO: 13-58.

3. Модифицированный антисмысловый олигонуклеотид по п.1, где нацеливающая последовательность выбрана из любой SEQ ID NO: 13, 33-38, 45 и 46.

4. Модифицированный антисмысловый олигонуклеотид по п.1, где нацеливающая последовательность выбрана из любой SEQ ID NO: 13, 27-29 или 34-36.

5. Применение модифицированного антисмыслового олигонуклеотида по любому из пп.1-4 в получении лекарственного средства для лечения болезни накопления гликогена II типа.

6. Применение по п.5, где нацеливающая последовательность выбрана из любой из SEQ ID NO: 13-58.

7. Применение по п.5, где нацеливающая последовательность выбрана из любой из SEQ ID NO: 13, 33-38, 45 и 46.

8. Применение по п.5, где нацеливающая последовательность выбрана из любой из SEQ ID NO: 13, 27-29 или 34-36.

9. Модифицированный антисмысловый олигонуклеотид по п.1, нацеливающая последовательность выбрана из любой из SEQ ID NO: 33-38.

10. Модифицированный антисмысловый олигонуклеотид по п.1, нацеливающая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 33.

11. Модифицированный антисмысловый олигонуклеотид по п.1, нацеливающая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 34.

12. Модифицированный антисмысловый олигонуклеотид по п.1, нацеливающая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 35.

13. Модифицированный антисмысловый олигонуклеотид по п.1, нацеливающая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 36.

14. Модифицированный антисмысловый олигонуклеотид по п.1, нацеливающая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 37.

15. Модифицированный антисмысловый олигонуклеотид по п.1, нацеливающая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 38.

16. Применение по п.5, где нацеливающая последовательность выбрана из любой из SEQ ID NO: 33-38.

17. Применение по п.5, где нацеливающая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 33.

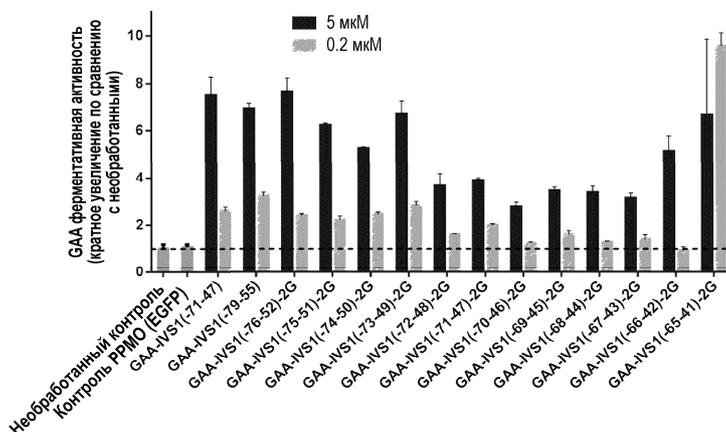
18. Применение по п.5, где нацеливающая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 34.

19. Применение по п.5, где нацеливающая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 35.

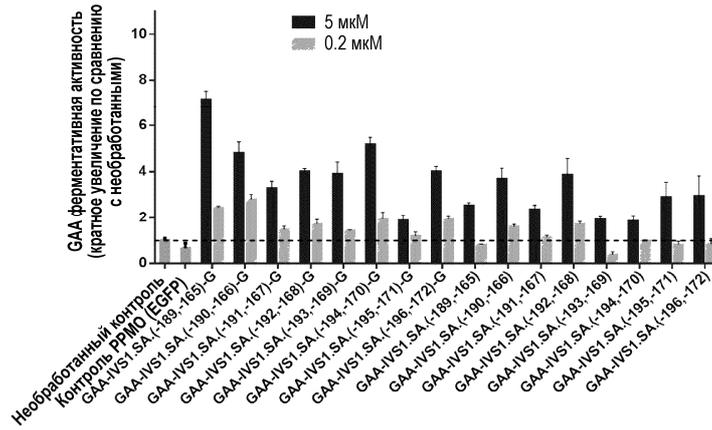
20. Применение по п.5, где нацеливающая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 36.

21. Применение по п.5, где нацеливающая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 37.

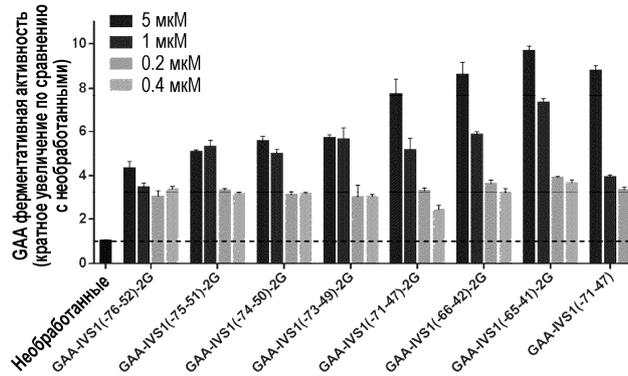
22. Применение по п.5, где нацеливающая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 38.



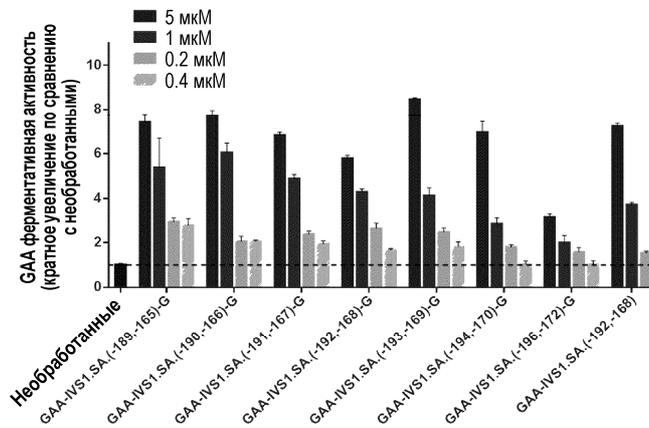
Фиг. 1



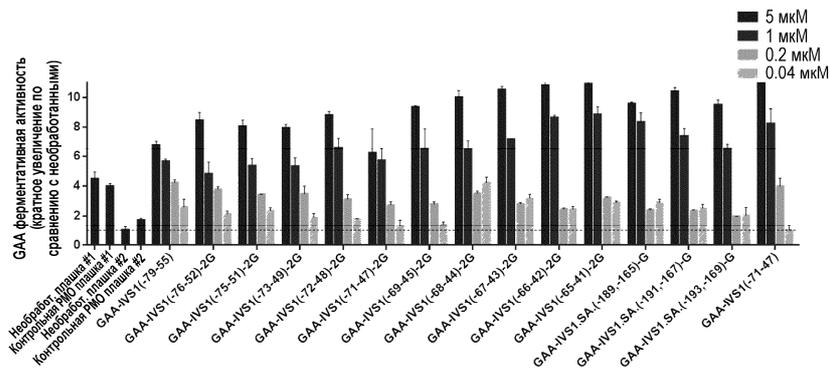
Фиг. 2



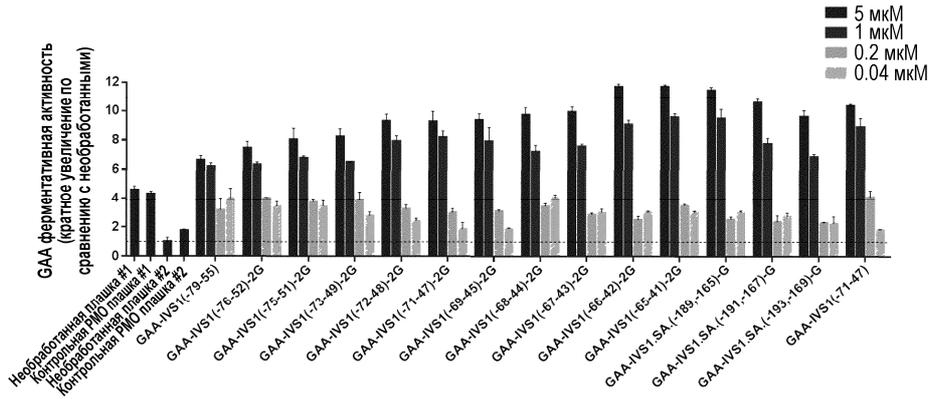
Фиг. 3



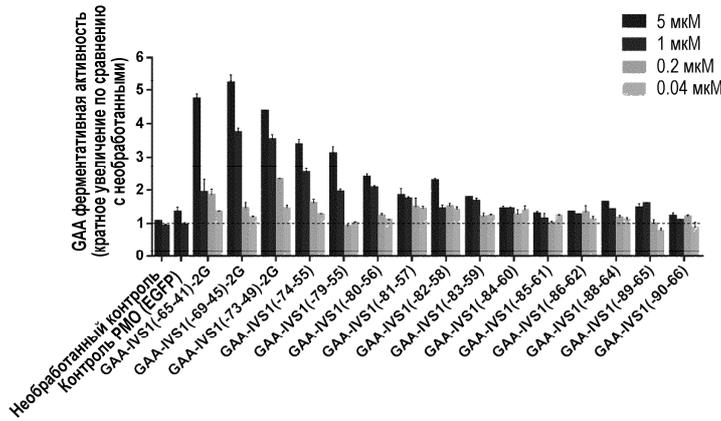
Фиг. 4



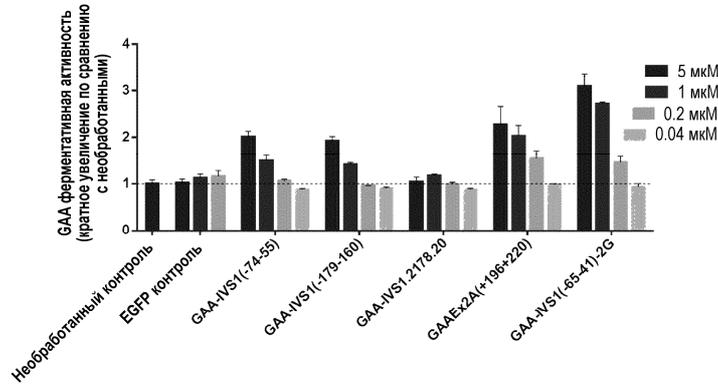
Фиг. 5



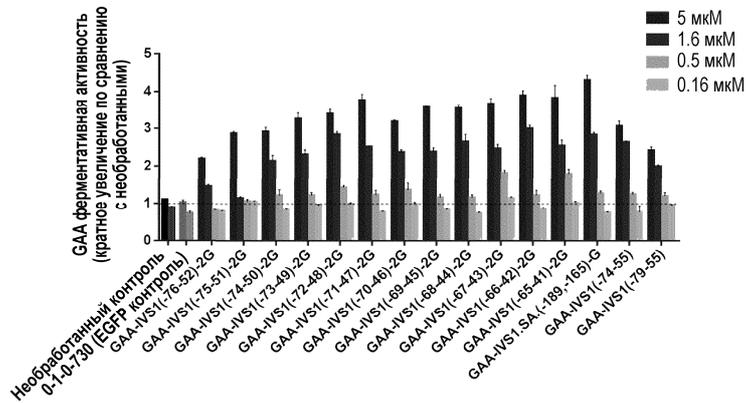
Фиг. 6



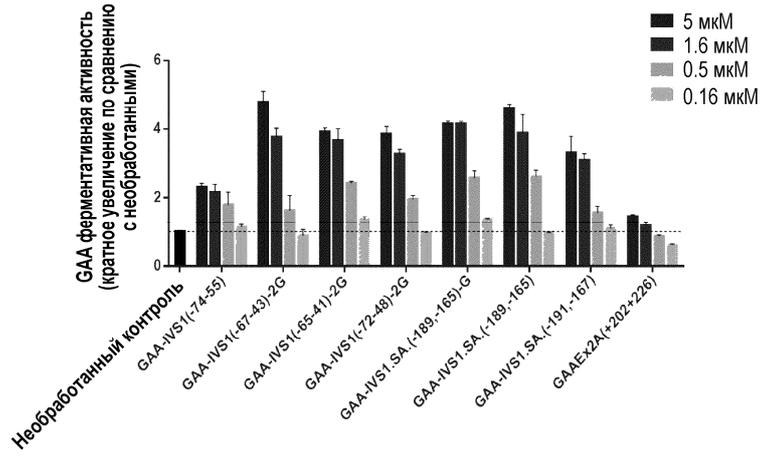
Фиг. 7



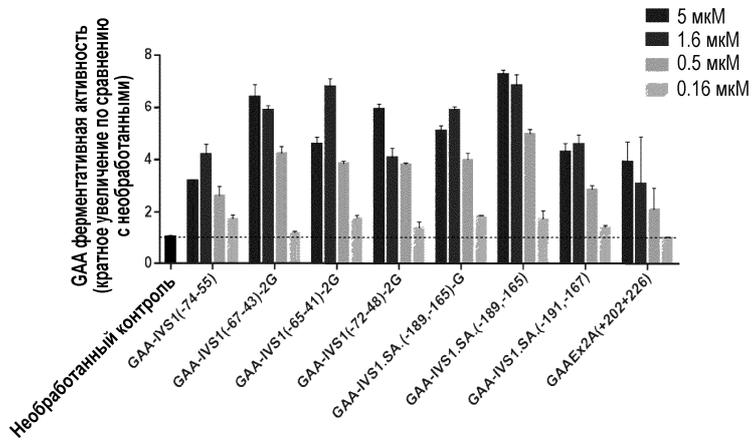
Фиг. 8



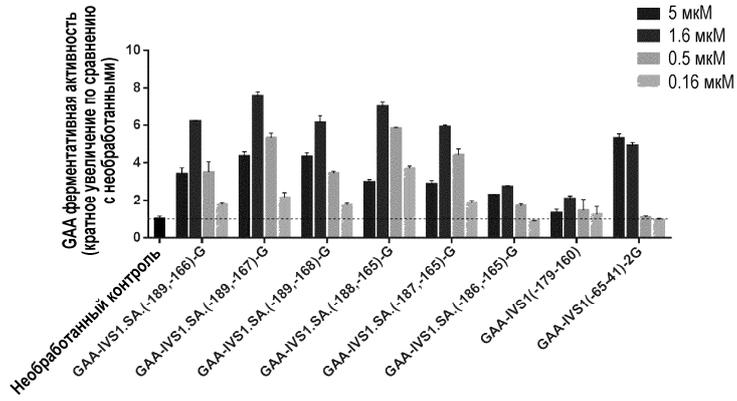
Фиг. 9



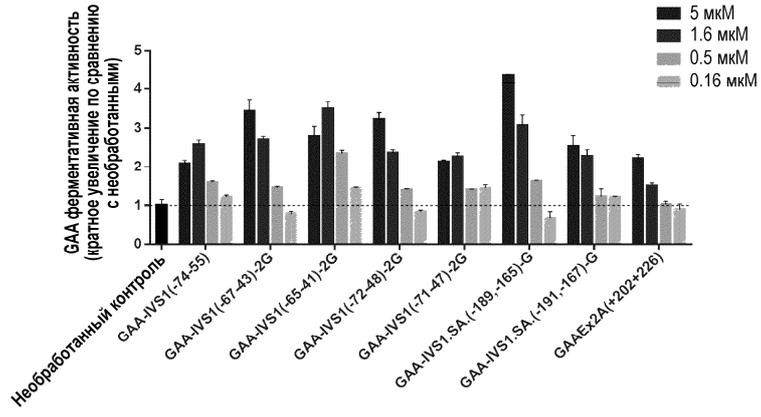
Фиг. 10а



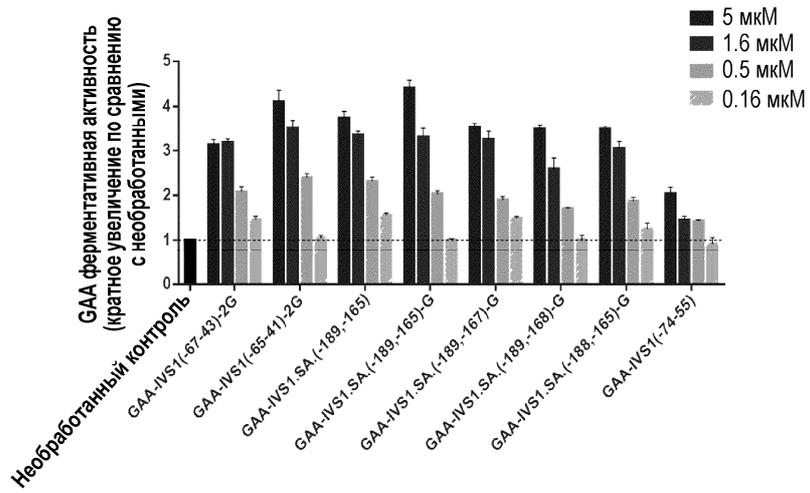
Фиг. 10б



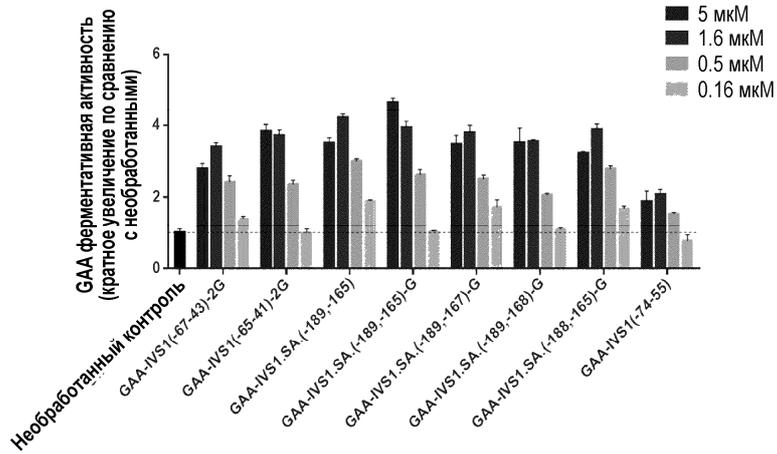
Фиг. 11



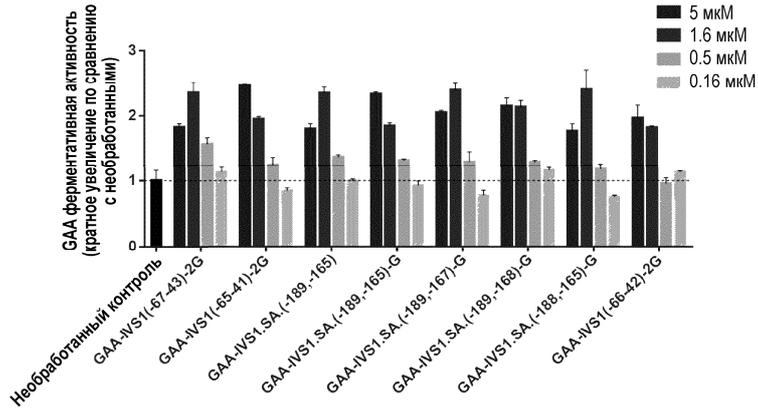
Фиг. 12



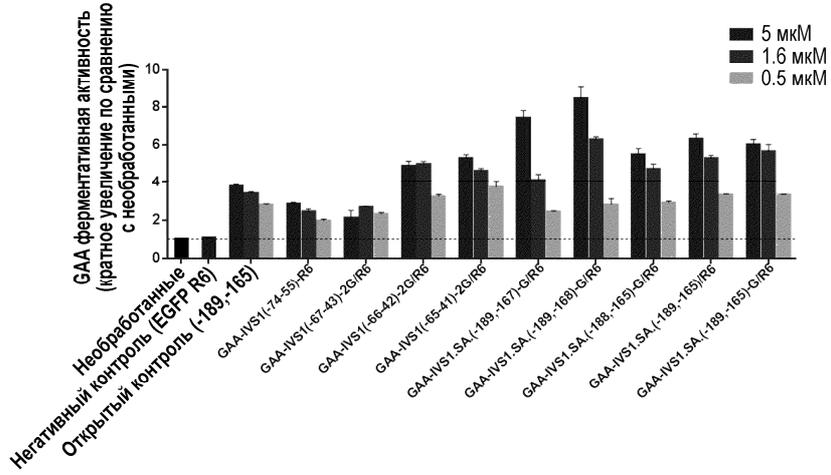
Фиг. 13а



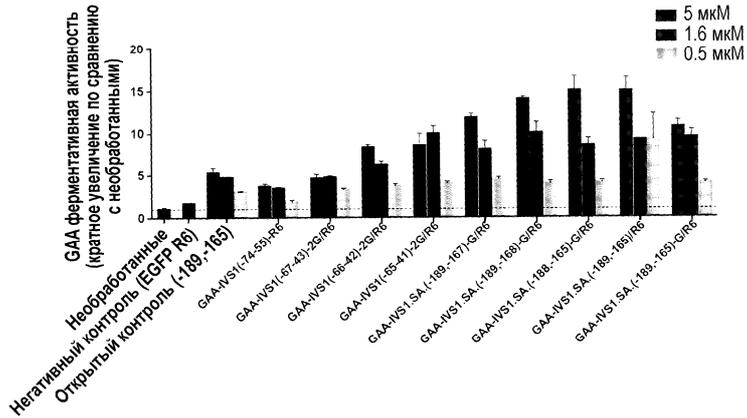
Фиг. 13б



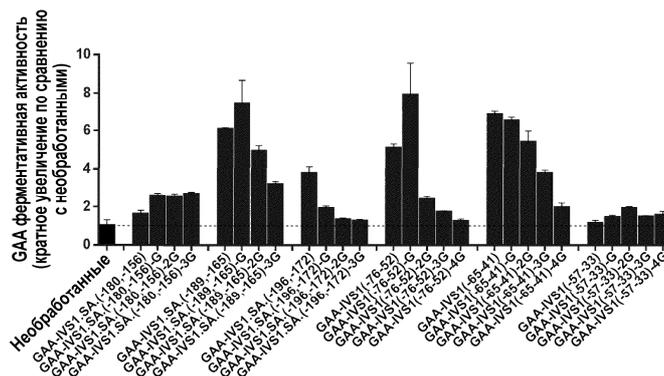
Фиг. 14



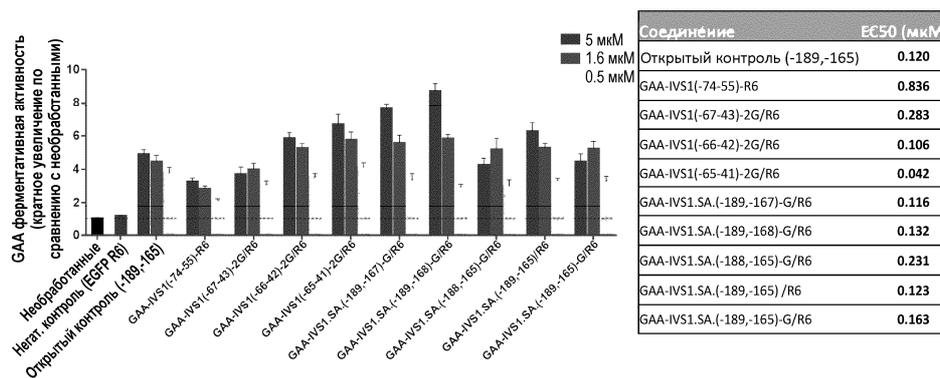
Фиг. 15а



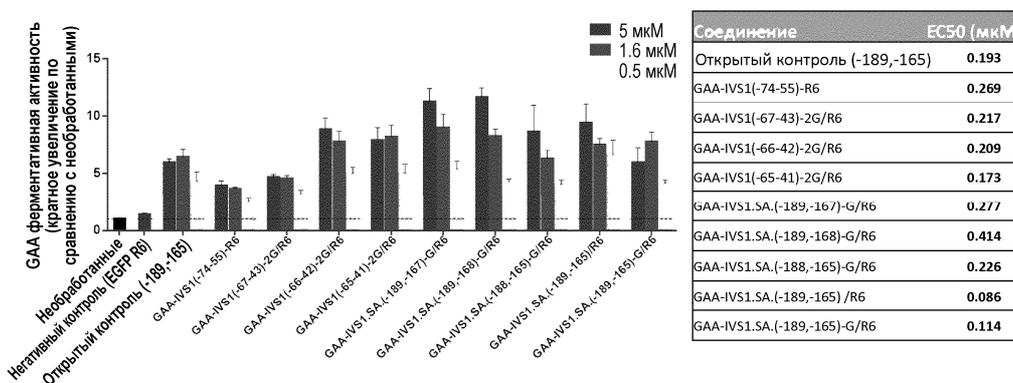
Фиг. 15б



Фиг. 16



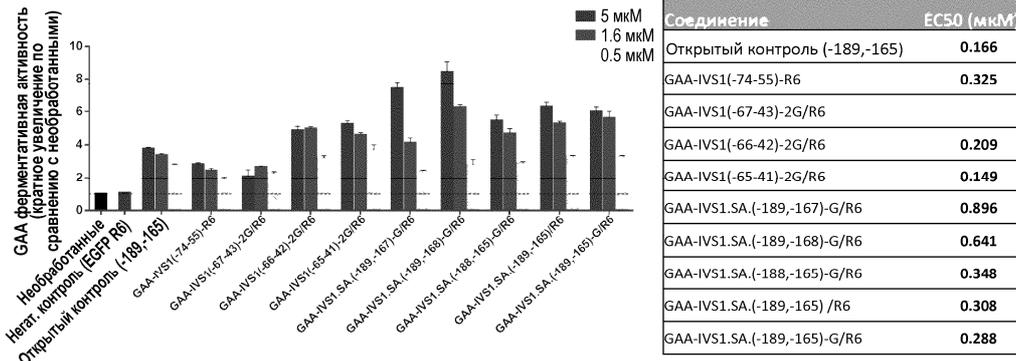
Фиг. 17



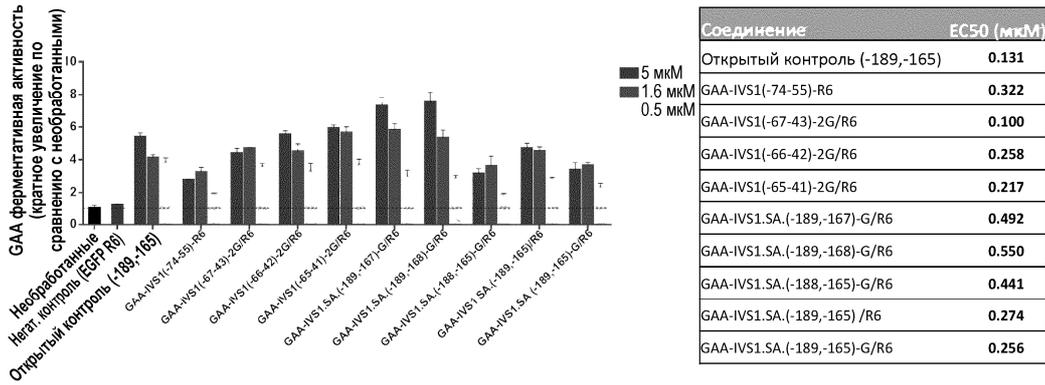
Фиг. 18

| Соединение | EC50 (мкМ) | |
|-------------------------------|------------|---------|
| | GM00443 | GM11661 |
| Открытый контроль (-189,-165) | 0.120 | 0.193 |
| GAA-IVS1(-74-55)-R6 | 0.836 | 0.269 |
| GAA-IVS1(-67-43)-2G/R6 | 0.283 | 0.217 |
| GAA-IVS1(-66-42)-2G/R6 | 0.106 | 0.209 |
| GAA-IVS1(-65-41)-2G/R6 | 0.042 | 0.173 |
| GAA-IVS1.SA.(-189,-167)-G/R6 | 0.116 | 0.277 |
| GAA-IVS1.SA.(-189,-168)-G/R6 | 0.132 | 0.414 |
| GAA-IVS1.SA.(-188,-165)-G/R6 | 0.231 | 0.226 |
| GAA-IVS1.SA.(-189,-165)/R6 | 0.123 | 0.086 |
| GAA-IVS1.SA.(-189,-165)-G/R6 | 0.163 | 0.114 |

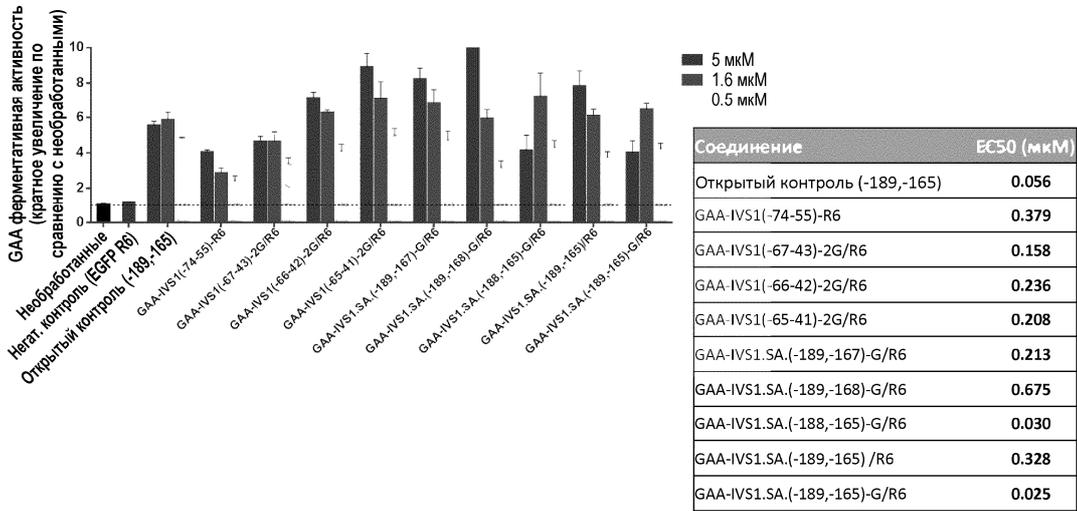
Фиг. 19



Фиг. 20



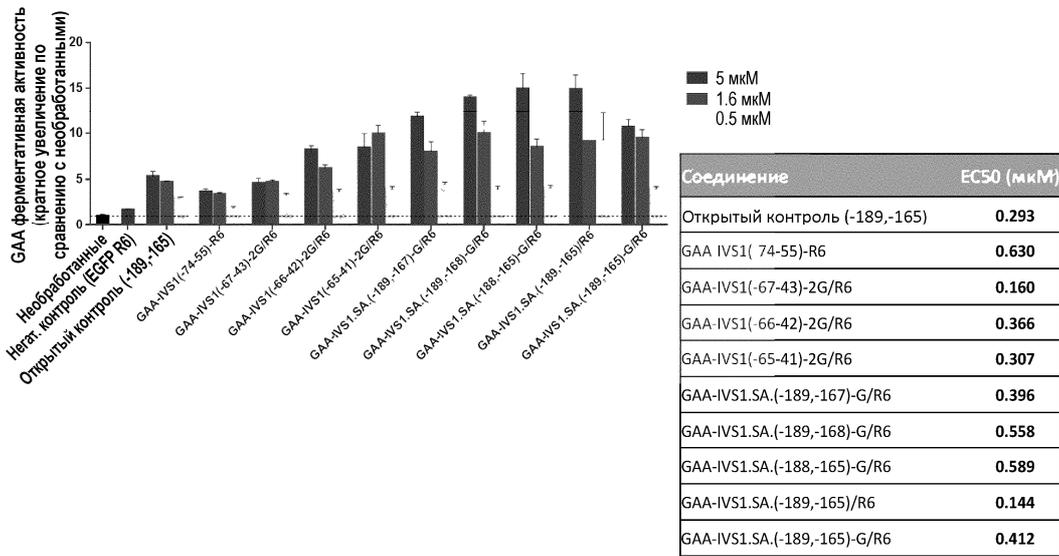
Фиг. 21



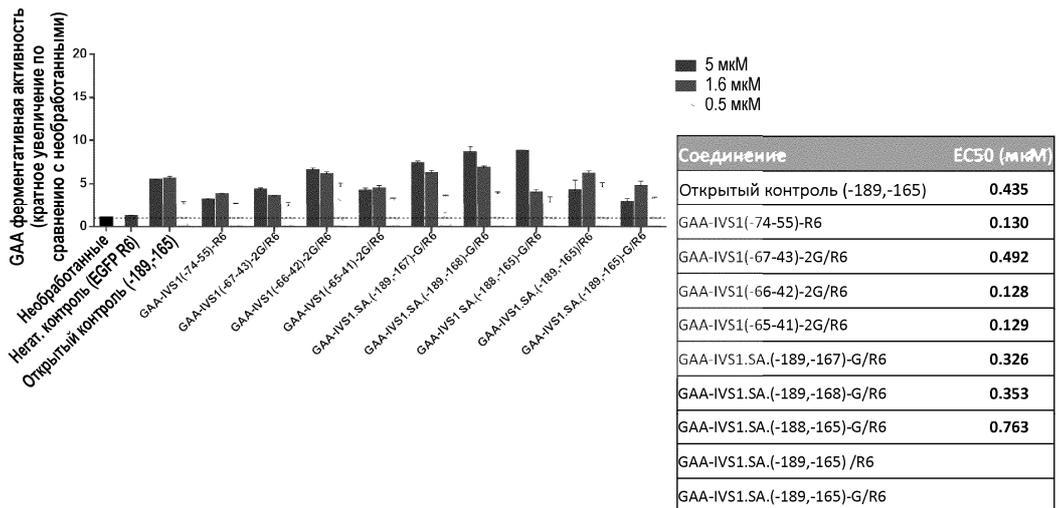
Фиг. 22

| Соединение | Клетки GM00443 | | | | Клетки GM11661 | | | |
|-------------------------------|----------------|-----------|-----------|----------------------|----------------|-----------|-----------|----------------------|
| | Анализ #1 | Анализ #2 | Анализ #3 | Среднее | Анализ #1 | Анализ #2 | Анализ #3 | Среднее |
| Открытый контроль (-189,-165) | 0.166 | 0.131 | 0.056 | 0.117 ± 0.056 | 0.293 | 0.435 | 0.018 | 0.249 ± 0.212 |
| GAA-IVS1(-74-55)-R6 | 0.325 | 0.322 | 0.379 | 0.342 ± 0.032 | 0.630 | 0.130 | 0.181 | 0.314 ± 0.275 |
| GAA-IVS1(-67-43)-2G | | 0.100 | 0.158 | 0.129 ± 0.041 | 0.160 | 0.492 | 0.120 | 0.258 ± 0.204 |
| GAA-IVS1(-66-42)-2G | 0.209 | 0.258 | 0.236 | 0.234 ± 0.025 | 0.366 | 0.128 | 0.218 | 0.237 ± 0.120 |
| GAA-IVS1(-65-41)-2G | 0.149 | 0.217 | 0.208 | 0.191 ± 0.037 | 0.307 | 0.129 | 0.096 | 0.177 ± 0.114 |
| GAA-IVS1.SA.(-189,-167)-G | 0.896 | 0.492 | 0.213 | 0.534 ± 0.343 | 0.396 | 0.326 | 0.171 | 0.297 ± 0.115 |
| GAA-IVS1.SA.(-189,-168)-G | 0.641 | 0.550 | 0.675 | 0.622 ± 0.065 | 0.558 | 0.353 | 0.330 | 0.414 ± 0.126 |
| GAA-IVS1.SA.(-188,-165)-G | 0.348 | 0.441 | 0.030 | 0.273 ± 0.215 | 0.589 | 0.763 | | 0.676 ± 0.123 |
| GAA-IVS1.SA.(-189,-165) | 0.308 | 0.274 | 0.328 | 0.303 ± 0.028 | 0.144 | | 0.158 | 0.151 ± 0.010 |
| GAA-IVS1.SA.(-189,-165)-G | 0.288 | 0.256 | 0.025 | 0.190 ± 0.143 | 0.412 | | 0.002 | 0.207 ± 0.290 |

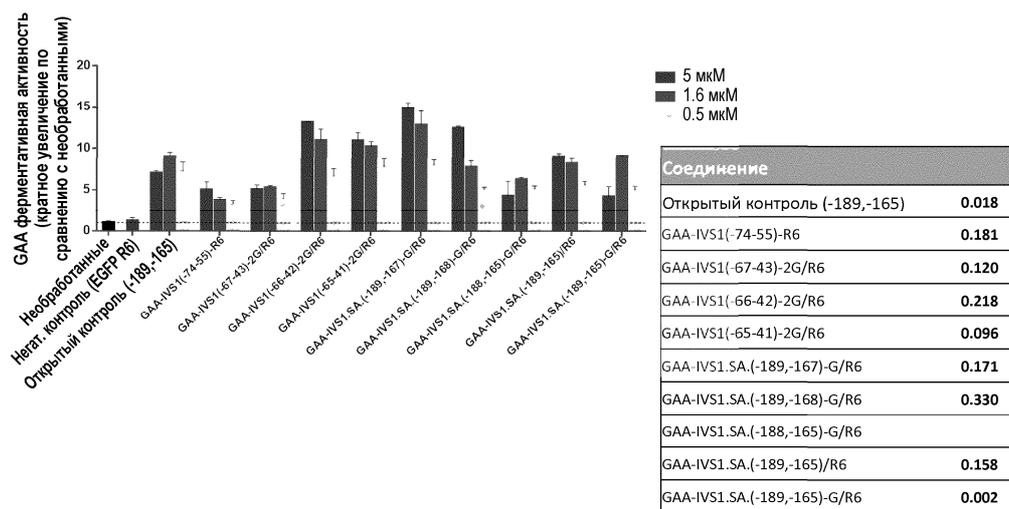
Фиг. 23



Фиг. 24



Фиг. 25



Фиг. 26



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2