الهيئة السعودية للملكية الفكرية
Saudi Authority for Intellectual Property

المملكة العربية السعودية
Kingdom of Saudi Arabia

براءة اختراع

إن الرئيس التنفيذي للهيئة السعودية للملكية الفكرية وبموجب أحكام نظام براءات الاختراع والتصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة والأصناف النباتية والنماذج الصناعية الصادر بالمرسوم الملكي الكريم رقم م/27 وتاريخ 1425/05/29هـ والمعدل بقرار مجلس الوزراء رقم 536 وتاريخ 1439/10/19هـ، ولائحته التنفيذية.
يقرر منح:

ساريبتا ثيرابيوتكس، انك
SAREPTA THERAPEUTICS, INC.

براءة اختراع رقم: SA 7062

بتـــاريخ: 1442/01/15 هـ
الموافق: 2020/09/03 م

عن الاختراع المسمى:

تركيبـات تخطي للأكسون خاصة بمعالجة الحثل العضلي
Exon Skipping Compositions for Treating Muscular Dystrophy

وفق ما هو موضح في وصف الاختراع المرفق، ولمالك البراءة الحق في الانتفاع بكامل الحقوق النظامية في المملكة العربية السعودية خلال فترة سريان الحماية.

الرئيس التنفيذي

د. عبدالعزيز بن محمد السويلم

الهيئة السعودية للملكية الفكرية
Saudi Authority for Intellectual Property

[19] **الهيئة السعودية للملكية الفكرية**
[11] **رقم البراءة:** SA 7062 B

[12] **براءة اختراع**

[45] **تاريخ المنح:** 1442/01/15 هـ
الموافق: 2020/09/03 م

[21] رقم الطلب: 515361125
[22] تاريخ دخول المرحلة الوطنية: 1436/12/01 هـ
الموافق: 2015/09/14 م
[30] بيانات الأسبقية:
US 61/784.547 2013/03/14 م
[72] اسم المخترع: ريتشارد كيه. بيستويك، دياني الزابيث فرانك، فريد جوزيف شنيل
[73] مالك البراءة: ساريبتا ثيرابيوتكس، انك
عنوانه: 3450 مونتي فيلا باركواي، سويت 101 بوثيل دبليو آيه 98021 ، الولايات المتحدة الأمريكية
جنسيته: امريكية
[74] الوكيل: مكتب المحامي سليمان ابراهيم العمار

[86] رقم الطلب الدولي: PCT/US2014/029689
تاريخ إيداع الطلب الدولي: 2014/03/14 م
[87] رقم النشر الدولي: WO 2014 153220 A2
تاريخ النشر الدولي: 2014/09/25 م
[51] التصنيف الدولي(IPC[8]):
A61K 031/712, A61K 031/708
C12N 015/011
[56] المراجع:
WO 2010048586, WO 2011057350
WO 2012150960, US 2010168212

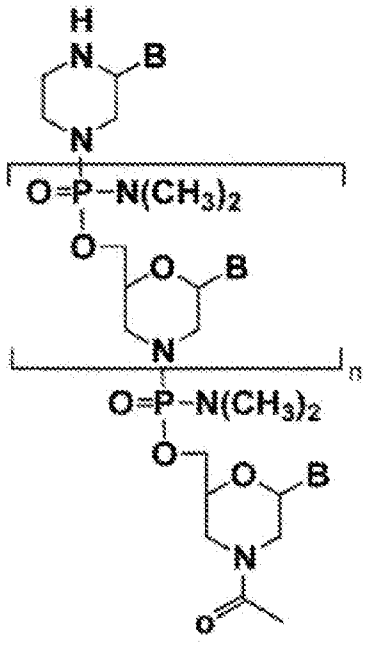
الفاحص: ندى بنت هذال القحطاني

[54] اسم الاختراع: تركيبات تخطي للأكسون خاصة بمعالجة الحثل العضلي

Exon Skipping Compositions for Treating Muscular Dystrophy

[57] الملخص: يتعلق الاختراع الحالي بمركبات جديدة مضادة للحسAntisense وتركيبات مناسبة لتسهيل تخطي الأكسون exon في جين ديستروفين بشري human dystrophin gene ، حيث يكون الأوليجومر مضاد للحس antisense oligomer بطول 20-50 نيوكليوتيد nucleotides قادر على ربط مستهدف يمكن اختياره لحث تخطي الأكسون في جين ديستروفين بشري، حيث أن الأوليجومر المضاد للحس المذكور يشتمل على متوالية من القواعد التي يتم تهجينها بشكل خصا بالنسبة لمنطقة أكسون 44 مستهدف من المجموعة المكونة من H44A(-07+15)، H44A(-08+15)، H44A(-06+15)، H44A(-08+17)، H44A(-07+17)، H44A(17+06-) وحيث أن القواعد الخاصة بالأوليجومر المذكور يتم ربطها مع بنيات حلقية ring structures من المورفولينو morpholino وحيث أن بنيات حلقة المورفولينو المذكورة يتم ربطها من خلال روابط وحدة داخلية تشتمل على فسفور phosphorous يتم ربطها من نيتروجين مورفولينو morpholino nitrogen من بنية حلقة ring structure مع 5 ' كربون حلقي خارجي exocyclic carbon من بنية حلقة مجاورة. الشكل (1أ)

عدد عناصر الحماية (5) ، عدد الاشكال (6)



تركيبات تخطي للأكسون خاصة بمعالجة الحثل العضلي

Exon Skipping Compositions for Treating Muscular Dystrophy

الوصف الكامل

خلفية الاختراع

يتعلق الاختراع الحالي بمركبات جديدة مضادة للحس Antisense وتركيبات مناسبة لتسهيل تخطي الأكسون exon في جين ديستروفين بشري human dystrophin gene. تم أيضاً توفير طرق لحث تخطي الأكسون باستخدام التركيبات الجديدة المضادة للحس والمهيأة للاستخدام في طرق هذا الاختراع.

تم تطوير تقنيات تضاد الحس باستخدام مدى من التقنيات الكيميائية للتأثير على التعبير الجيني عند مستويات متعددة مختلفة (الانتساخ transcription ، التضفير splicing ، الثبات stability ، الترجمة translation). تم تطوير العديد من البحوث لكي تركز على استخدام مركبات مضادة للحس لتصحيح والتعويض عن جينات مرتبطة بالمرض أو غير طبيعية في مدى واسع من المؤشرات. تكون جزيئات مضادة لعكس اتجاه النسخ قادرة على تثبيط التعبير الجيني باستخدام خاصية وبسبب أن هذال والعديد من جود الحث التي تتعلق بالأوليجيونيوكليوتيدات oligonucleotides في شكل معدلات من التعبير الجيني قد تركز على تثبيط التعبير عن الجينات المستهدفة الخاصة بالوظيفة من عناصر مؤثر على سيس. تكون الأوليجيونيوكليوتيدات المضادة للحس قد تم توجيهها في مضادة الحمض النووي الريبوزي Ribonucleic acid ويُسمى اختصارًا (RNA)، إما في نفس الجديلة sense strand (على سبيل المثال، mRNA) أو جديلة ناقصة minus-strand في حالة بعض مستهدفات RNA . لكي يتم تحقيق التأثير المطلوب الخاص بنقص متحكم فيه، وأوليجيونيوكليوتيد يكون بصفة عامة عن أي من التحسين الخاص بالتحلل الخاص بـ mRNA مستهدف، وإعاقة انتقال mRNA أو إعاقة وظيفة عناصر RNA خاصة بالتأثير على سيس وبالتالي التأثير على المنع بشكل فعال لأي من التخليق الجديد الخاص ببروتين مستهدف أو انتساخ RNA فيروسي. وعلى الرغم من ذلك فإن تلك لالتقنيات لا تكون مفيدة حيث أن الخاضع يكون عبارة عن إنتاج بزيادة متحكم فيها من بروتين أساسي أو يتم

التعويض عنه فميا يتعلق بتطفيرات والتي تحث الإنهاء الناضج القبلي الخاص بالترجمة مثل التطفيرات الخاصة بإزاحة الإطار أو غير المهمة. في تلك الحالات، فإن ناتج الانتساخ الجيني الفعال يجب أن يتم تعريضه غلى تحلل مستهدف أو تثبيط ستيريك بحيث يكون هناك خصائص كيميائية خاصة بالأوليجيونيوكليوتيد تحسن من تحلل mRNA مستهدف أو إعاقة الترجمة. في العديد من الأمراض الجينية، فإن التأثيرات الخاصة بالتطفيرات على التعبير النهائي من الجين يمكن أن يتم تعديلها من خلال عملية تخطي أكسون مستهدفة أثناء عملية الجدل. تم توجيه عملية الربط بشكل مباشر من خلال تعقيد آلية متعددة المكونات التي تكون عبارة عن روابط إكسون – إنترون exon–intron في mRNA أولي وفي ارتباط على نحو قريب وبإنشاء الانشطار الخاص بروابط فوسفو داي إستر عند أطراف الإنترونات مع إعادة التشكيل التالي بين الأكسونات والتي يتم ربطها معاً. يتم التسبب في العملية المعقدة وعالية الدقة بواسطة وحدات متكررة متوالية في mRNA أول والذي يكون قصيراً بشكل نسبي ، وأجزاء RNA شبه محافظة والتي ترتبط بها العديد من عوامل الربط النووي المتعددة والتي تم تضمينها في تفاعلات الربط. وعن طريق تغيير آلية طريقة الربط التي تقرأ أو تتعرف على محددات تم تضمينها في معالجة لـ mRNA أمامية، ويمكن أن تكون ممكنة لإنشاء جزيئات mRNA مرتبطة على نحو تمايزي. تم الآن التعرف على العديد من الجينات البشرية والتي تكون مرتبطة على نحو بديل أثناء التعبير عن الجيني الطبيعي، وعلى الرغم من ذلك فإن تلك الآليات التي تم تضمينها لم يتم تحدديها. وصف Bennett et al. (البراءة الأمريكية رقم 6.210.892) تعديل مضاد مضاد للحس الخاص بمعالجة mRNA خلوي من النوع غير المعالج باستخدام نظائر أوليجيونيوكليوتيد في عكس تجاه النسخ والي لا تحث الانشطار الذي يتوسطه RNAse H من RNA مستهدف. يمكن الوصول لاستخدام والذي يكون قابلاً لإنشاء mRNAs مرتبط على نحو بديل والذي يفتر لأكسونات (على سبيل المثال، كما تم وصفه بواسطة (Sazani, Kole, et al. 2007) فميا يتعلق بإنشاء مستقبلات عائلة عليا من عامل نخر الورم ألفا Tumor necrosis factor alpha (TNF) قابلة للذوبان) التي تفتقر لنطاقات تمديد غشاء مشفرة للأكسونات. في الحالات التي يكون فيها البروتين الوظيفي الطبيعي قد تم إنهاؤه بشكل ثابت بسبب التطفيرات المذكورة هنا، فإن هناك وسائل خاصة باستعادة بعض إنتاج البروتين الوظيفي خلال تقنية مضاد للحس والتي تم توضيحها بحيث تكون ممكنة خلال التدخل أثناء عمليات الربط وبالتالي إذا ارتبطت الأكسونات مع التطفيرات المسبب للمرض فيمكن أن يتم

حذفها على نحو خاص من بعض الجينات ومنتج بروتين قصير يمكن في بعض الوقت إنتاجه الذي له خصائص بيولوجية مشابهة من البروتين الأصلي أو له نشاط بيولوجي فعال لتخفيف مرض يتم التسبب فيه عن طريق الأكسون (انظر، على سبيل المثال، ,. Sierakowska, Sambade et al. 1996; Wilton, Lloyd et al. 1999; van Deutekom, Bremmer-Bout et al. 2001; Lu, Mann et al. 2003; Aartsma-Rus, Janson et al. 2004. Kole et al. و البراءات الامريكية ارقام : 5627274; 5916808; 5976879; و 5665593 ، التي تكشف عن طرق خاصة بمكافحة الربط غير الطبيعي باستخدام نظائر أوليجيونيوكليوتيد معدلة ونظائر التي لا تحسن من التحلل الخاص بـ mRNA أولي . وصف Bennett et al (البراءة الأمريكية رقم 6.210.892) تعديل مضاد للحس من معالجة mRNA من النوع الخلوي غير المعالج والذي يستخدم أيضاً نظائر أوليجيونيوكليوتيد مضاد للحس والذي لا يحث الانشطار الذي يتوسطه RNAse H من RNA مستهدف.

تستهدف العملية تخطي الأكسون exon والذي يكون مفيداً بشكل خاص في الجينات الطويلة حيث أن هناك العديد من الأكسونات exons والإنترونات introns حيث يكون هناك تكراراً كثيراً في التكوين الجيني الخاص بالأكسونات أو حيث يكون البروتين قادراً على التأثير بدون واحد أو أكثر من الأكسونات. تكون التأثيرات الخاصة بإعادة توجيه المعالجة لاجينية الخاصة بمعالجة أمراض جينية genetic diseases مرتبطة مع الانقطاعات التي تسببها تطفيرات في العديد من الجينات التي تركز على استخدام الاوليجيو نيوكليوتيدات والتي تكون إما: (1) تتراكب بشكل كلي أو جزئي مع عناصر تم تضمينها في عملية الربط؛ أو (2) ترتبط مع mRNA أولي عند موضع قريب على نحو كافي لعنصر خاص بإتلاف ارتباط ووظيفة العوامل الخاصة بالربط والتي يمكن أن تتسبب بشكل طبيعي في تفاعل ربط معين والذي يحدث عند ذلك العنصر. يتسبب الحثل العضلي لدوشين Duchenne muscular dystrophy (DMD) في التأثير في التعبير الخاص بديستروفين بروتين protein dystrophin. يشتمل الجين طبقاً للبروتين على 79 أكسون تم انتشارها من أكثر من 2 مليون نيوكليوتيد nucleotides من DNA . وأي تطفيرات mutations التي تعمل تغييرات في قراءة إطار الأكسون reading frame of the exon ، وإدخال كودون إيقاف stop codon أو تتميز بإزالة إكسون إطاري frame exon أو إكسونات exons أو إزدواج واحد

او أكثر من الأكسونات التي لها احتمالية إتلاف الإنتاج من خلال الدسيتورفين dystrophin والتي ينتج عنها DMD. تكون هناك صورة أقل شدة من الحثل العضلي muscular dystrophy ، والحثل العضلي لبيكر Becker muscular dystrophy (BMD) موجودة في طور النشأة، والتي تحذف بشكل نمطي واحدة أو أكثر من الأكسونات والتي نتج عنها قراءة صحيحة للإطار بطول ناتج انتساخ ديستورفين، مثل الترجمة الخاصة بـ mRNA في البروتين والذي لا ينتهي بشكل أولي. وإذا تم ربطهما فميا يتعلق بالأكسونات السفلية في معالجة ديستورفين متطفر من mRNA أولي والذي يحافظ على الإطار الصحيح الخاص بالقراءة من الجين، تكون النتيجة عبارة عن تشفير mRNA خاصة بالبروتين مع حذف داخلي قصير والتي تحتفظ ببعض النشاط والتي ينتج عنها النمط الظاهري من بيكر. للعديد من السنوات، تمت معرفة أن أنواع الحذف الخاصة بالأكسون أو الأكسونات التي لا تغير إطار القراءة من الديستروفين سوف تزيد من النوع الظاهري BMD ، حيث أن حذف الأكسون الذي يسبب إزاحة خاصة بالإطار والذي يزيد من :

DMD (Monaco, Bertelson et al. 1988). بصفة عامة فإن تطفيرات ديستروفين تشتمل على تطفيرات نقطية وحذف أكسونات والذي يغير الإطار الخاص بالقراءة وبالتالي يتقاطع مع ترجمة بروتين مناسب متقاطع ينتج عنه DMD. يجب أيضاً ملاحظة أن هناك بعض مرضى BMD و DMD لهم حذوفان أكسون يغطي الإكسونات المتعددة. تم تقرير تعديل ديستوفين متطفر خاص بربط mRNA أولي مع أوليجوربيو نيوكليوتيد الذي تم تقريره في كل من المعمل والكائن الحي (انظر، على سبيل المثال، Matsuo, Masumura et al. 1991; Takeshima, Nishio et al. 1995; Pramono, Takeshima et al. 1996; Dunckley, Eperon et al. 1997; Dunckley, Manoharan et al. 1998; Errington, Mann et al. 2003)

يكون المثال الأول الخاص بتخطي الأكسون القابل لإعادة الإنتاج في نموذج فئران mdx تم تقريره بواسطة Wilton et al. (Wilton, Lloyd et al. 1999). وعن طريق توجيه جزيء عكس اتجاه النسخ موضع ارتباط مانح، فإن ذلك يتم تكونيه بشكل فعال فيما يتعلق بتخطي الأكسون 23 والذي يتم حثفه في دستروفين mRNA في مدى 6 ساعات من المعالجة الخاصة بالخلايا المزروعة. يصف Wilton et al. أيضاً استهداف منطقة مستقبل من mRNA أولي من ديستروفين فاري مع الأوليجيونيوكليوتيدات المضادة مضاد للحس. وعلى الرغم من أن

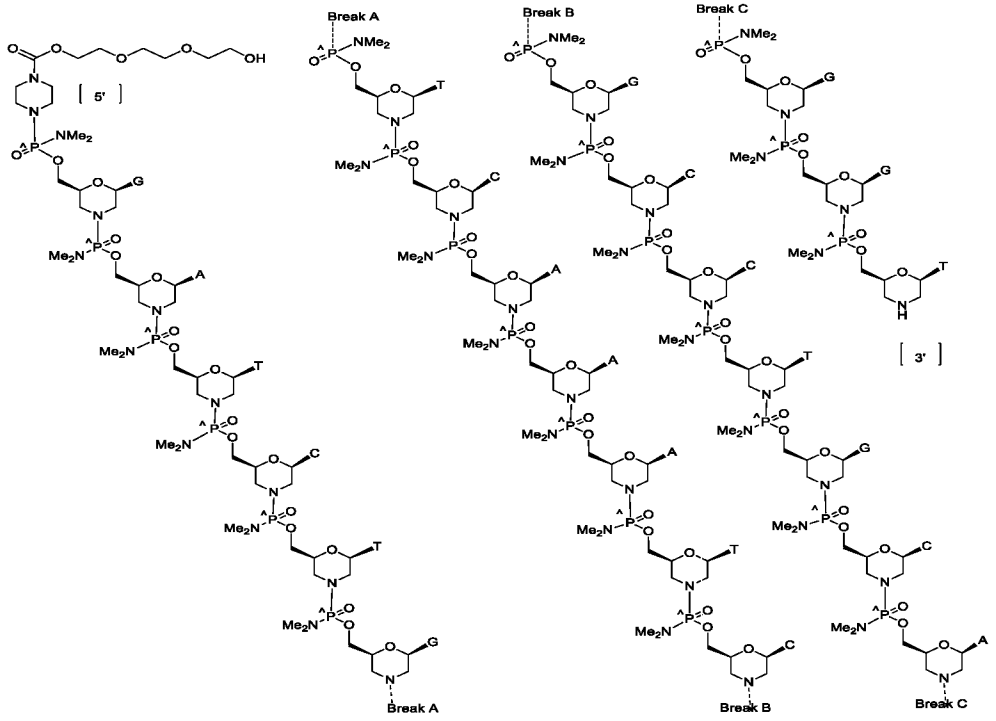
الأوليجيونيوكليوتيد المضاد للحس يتم توجيهه عند موضع ربط مانح الإنترون 23 الذي يتكون من التخطي في أورمات عضلية، تم الوصول للمركب المذكور بحيث يكون أقل فعالية في مزراعة خلية مثبتة تم التعبير عنها في مستويات أعلى من ديستروفين. وعلى الرغم من ذلك، ومع الاستهداف الذي تم تحسينه وتصميم الأوليجيونيوكليوتيد المضاد للحس، فإن الفعالي الخاصة بإزالة الأكسون تتزايد على نحو كبير ومع الترتيب الخاص بالزيادة (Mann, Honeyman et al. 2002). بدأت الدراسات الحالية في تناول التحدي الخاص تحقيق تعبير ديستروفين تم الحفاظ عليه يتم تحقيقه من خلال التأثيرات العكسية عند الحد الأدنى لها في الأنسجة التي تم التأثير عليها بواسطة غياب الديستروفين. ينتج عن الحقن بداخل العضلات من أوليجيونيوكليوتيد مستهدف خاص بالأكسون 51 (PRO051) في العضلة الداخلية من العصب الظنبوبي في العضلة في أربعة من المرضى مصابين بـ DMD ينتج عنه تخطي الأكسون 51 بدون أي تأثيرات عكسية جانبية إكلينيكية واضحة (Mann, Honeyman et al. 2002; van Deutekom, Janson et al. 2007). إن الدراسات التي تبحث عند التوصيل المتزامن الخاص بمضاد الانتساخ من فوسفورو داي أميدات مورفولوينة من أوليجيومر مترافق مع ببتيد اختراق خلية cell-penetrating peptide (PPMO) مستهدف لأكسون 23 في فئران mdx يعمل على إنتاج بروتيني ديستورفين dystrophin protein عال ويتم الحفاظ عليه في العضلات الهيكلية و القلبية skeletal and cardiac muscles بدون السمية القابلة للاكتشاف detectable toxicity (Jearawiriyapaisarn, Moulton et al. 2008; Wu, Moulton et al. 2008; Yin, Moulton et al. 2008). تكون التجارب الإكلينيكية الحديثة الخاصة بالأمان والفعالية الخاصة بأوليجيو نيوكليوتيدات splice switching oligonucleotides (SSOs) الخاصة بمعالجة DMD التي تكون معتمدة على تقنية SSO لحث الارتباط البديل الخاص بـ mRNAs من خلال إعاقة فراغية من سبلايسوم (Cirak et al., 2011; Goemans et al., 2011; Kinali et al., 2009; van Deutekom et al., 2007). وعلى الرغم من تلك النجاحات، ظلت الحاجة موجودة لتحسين أوليجيومرات مضاد للحس antisense oligomers والتي تم استهدافها فيما يتعلق بأكسونات ديستروفين dystrophin exons متعددة وتركيبات توصيل عضلة محسنة وطرق خاصة بتطبيقات علاجية لـ DMD .

الوصف العام للاختراع

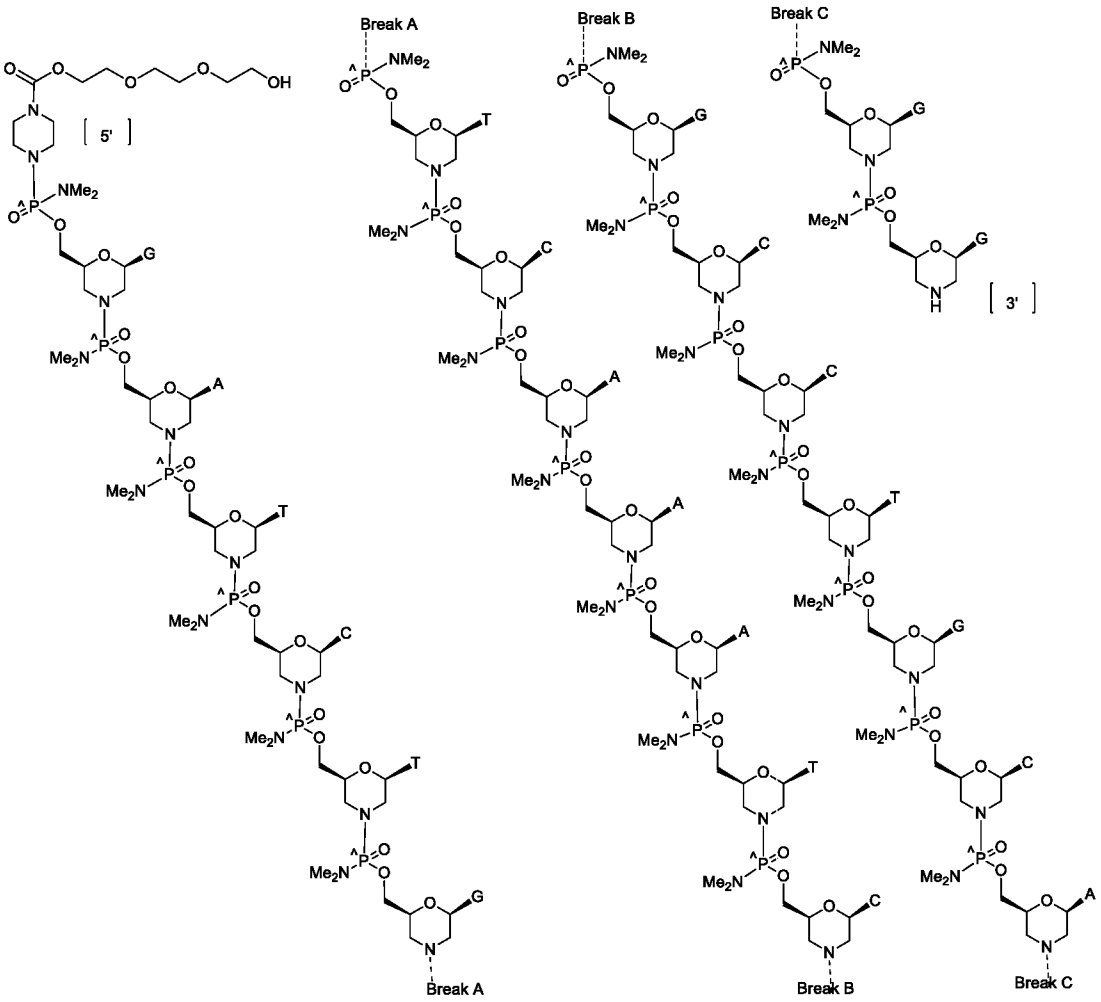
في واحدة من السمات، يوفر الاختراع أوليجيومر مضاد للحس من 20-50 نيوكليوتيد nucleotides في الطول قادر على ربط مستهدف مختار لحث تخطي الأكسون في جين ديستروفين بشري، حيث يشتمل الأوليجيومر المضاد للحس على متوالية من قواعد التي تهجن بشكل خاص منطقة مستهدفة لأكسون 44 مختارة من المجموعة المكونة من H44A(-07+15)، H44A (-08+15)، H44A(-06+15)، H44A(-08+17)، H44A(-07+17)، و H44A (-06+17)، حيث يتم ربط القواعد الخاصة بالأوليجيومر مع بنيات حلقية من مورفولينو morpholino ring structures ، وحيث يتم ربط البنيات الحلقية من مورفولينو بواسطة روابط وحدة فرعية تشتمل على فسفور phosphorous تربط نيتروجين مورفولينو morpholino nitrogen من من بنية حلقية مع 5 ' كربون إكسو سيكليك exocyclic carbon من بنية حلقية مجاورة. في أحد النماذج ، يشتمل الأوليجيومر المضاد للحس على متوالية من قواعد مختارة من المجموعة المكونة من المتوالية رقم: 1 و 4-8. في نموذج آخر ، يكون الأوليجيومر المضاد للحس من حوالي 20 إلى 30 نيوكليوتيد في الطول أو حوالي 22 إلى 28 نيوكليوتيد في الطول. في نموذج آخر أيضاً ، تتكون المتوالية من متوالية تم اختيارها من المتوالية رقم: 1 و 4-8. في أحد النماذج ، يوفر الاختراع أوليجيومر مضاد للحس الذي لا ينشط RNase H. في سمة أخرى، يوفر الاختراع أوليجيومر مضاد للحس المرتبط بشكل كيميائي مع مع واحد أو أكثر من الأجزاء أو المترافقات التي تحسن نشاط ، التوزيع الخلوي ، أو الامتصاص الخلوي لأوليجيومر مضاد للحس ، مثل ، على سبيل المثال، جزيء بولي إيثيلين جليكول polyethylene glycol molecule . في نماذج أخرى ، يكون الأوليجيومر المضاد للحس مترافقاً مع ببتيد غني بأرجينين arginine-rich peptide مثل متوالية تم اختيارها من المتوالية رقم: 24-39. في سمة أخرى ، يوفر الاختراع أوليجيومر مضاد للحس من 20-50 نيوكليوتيد في الطول قادر على ربط مستهدف مختار لحث تخطي الأكسون في جين ديستروفين بشري human dystrophin gene ، حيث يشتمل الأوليجيومر المضاد للحس على متوالية من قواعد التي تم تهجينها بشكل خاص منطقة مستهدفة لأكسون 44 مختارة من المجموعة المكونة من H44A (-07+15)، H44A(-08+15)، H44A(-06+15)، H44A(-08+17)، H44A (-07+17)، و H44A(-06+17)، حيث

يتم ربط القواعد الخاصة بالأوليجيومر مع بنيات حلقية من مورفولينو، و حيث يتم ربط البنيات الحلقية من مورفولينو بواسطة روابط بداخل الوحدة مشتملة على فسفور غير مشحون إلى حد كبير تربط نيتروجين مورفولينو morpholino nitrogen من بنية حلقية مع 5 ' كربون إكسو سيكليك exocyclic carbon 5' من بنية حلقية مجاورة. في أحد النماذج ، بشكل موجب شحن 5٪-35٪ من الروابط من الأوليجيومر المضاد للحس يتم. في نموذج آخر ، تكون الروابط بداخل الوحدة من الأوليجيومر المضاد للحس غير مشحونة و ويتم تقاطعها مع روابط التي يتم بشكل موجب شحنها عند رقم هيدروجيني فسيولوجي physiological pH ، حيث يكون العدد الكلي من الروابط المشحونة بشكل موجب بين 2 و ولا يكون العدد الكلي أكثر من نصف الروابط. في بعض النماذج، يشتمل الأوليجيومر المضاد للحس على بنيات حلقية من مورفولينو و روابط حلقية بداخل الوحدات من فوسفورو داي أميدات phosphorodiamidate . في بعض النماذج، يكون الأوليجيومر المضاد للحس قد تم تعديله باستخدام مجموعة كاتيونية معلقة pendant cationic.

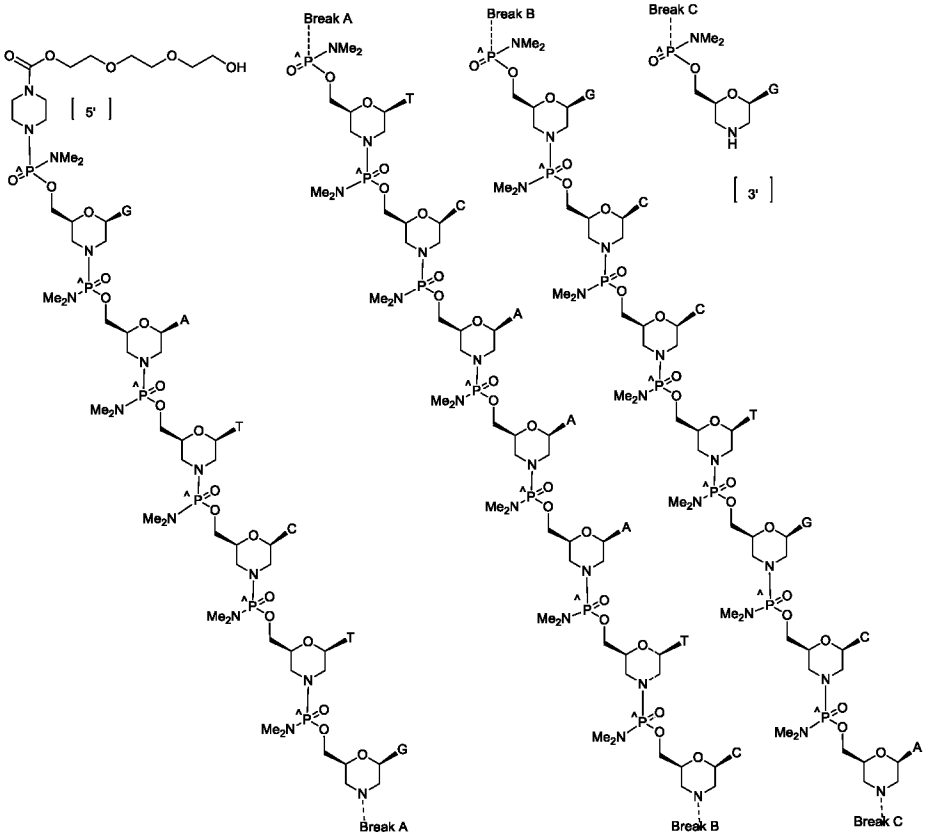
في سمة أخرى، يوفر الاختراع أوليجيومر مضاد للحس مختار من المجموعة المكونة من:



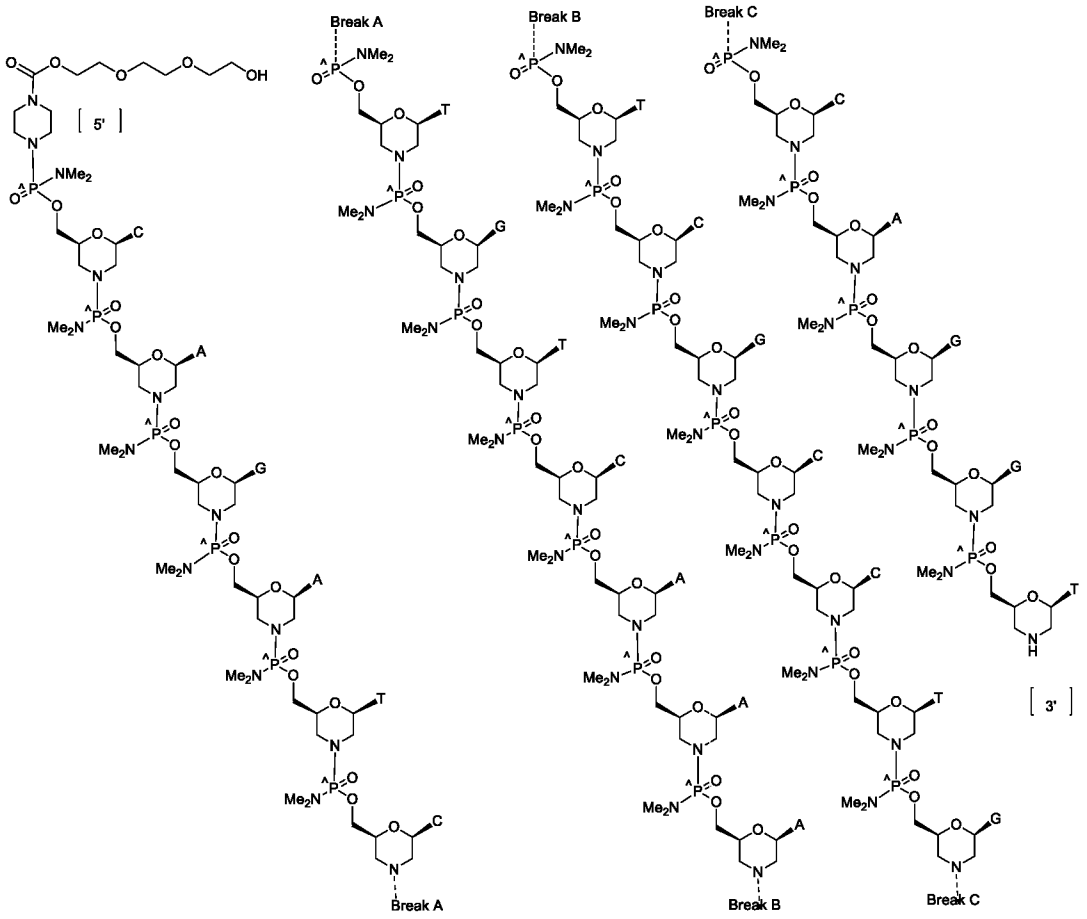
A44H(-8+15)؛


Break A
Break B
Break C
5'
3'
NMe2
Me2N
OH
Break A
Break B
Break C

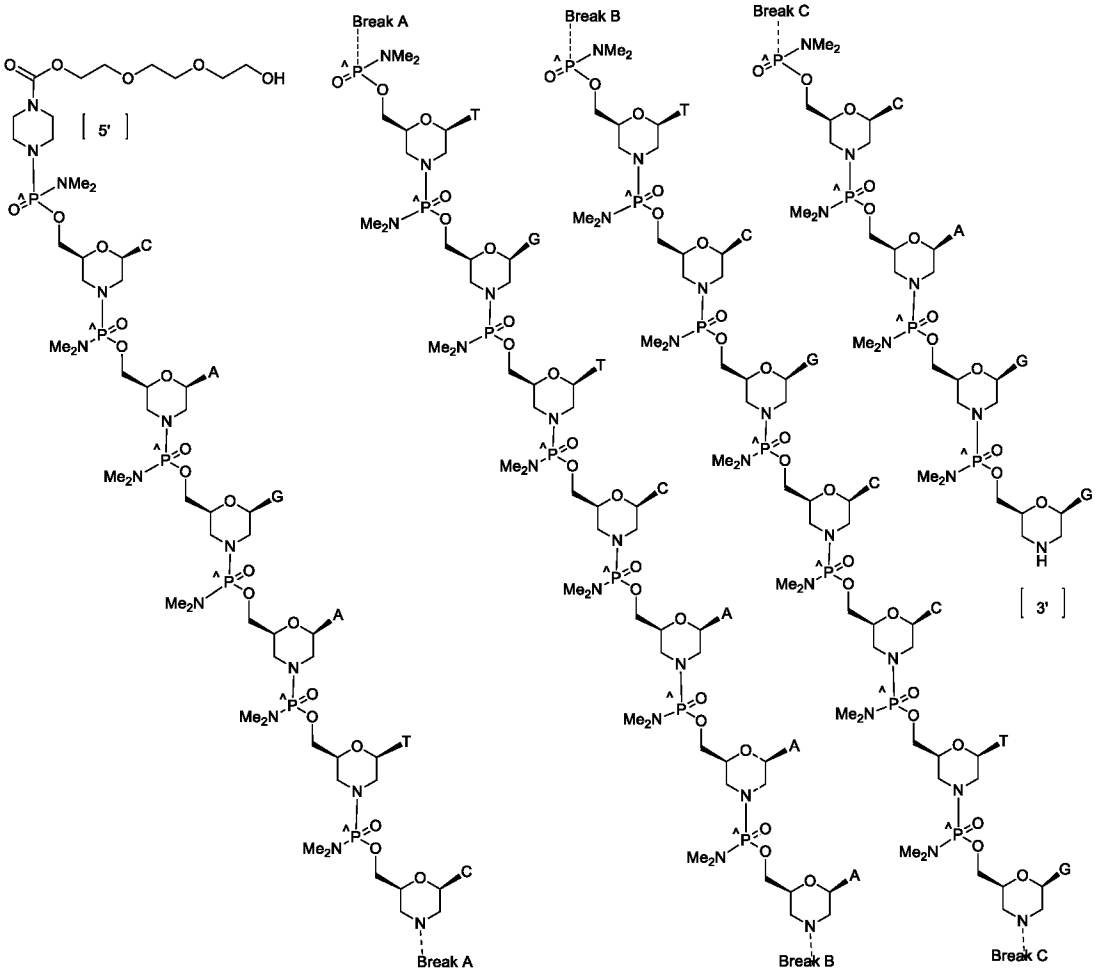
;(15+7-)H44A



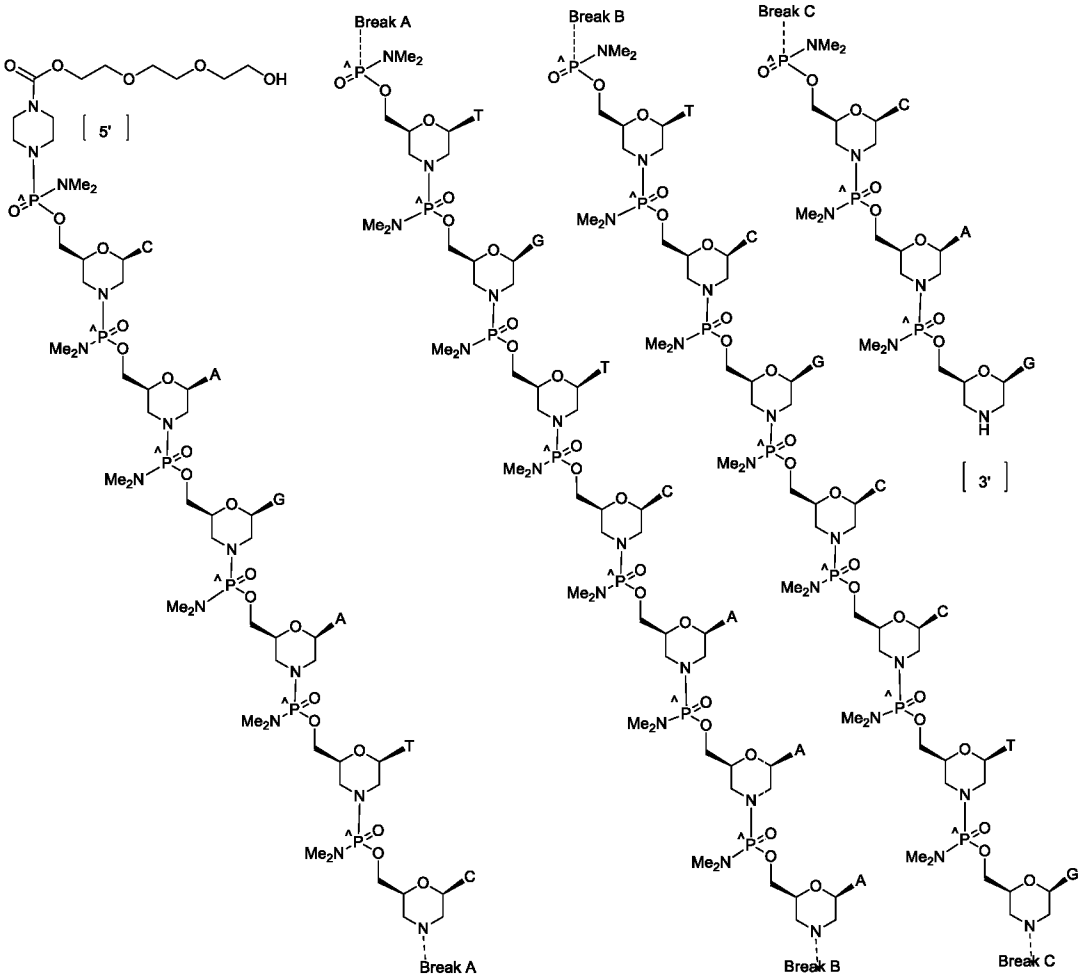
;(15+6-)H44A



;(17+8-)H44A

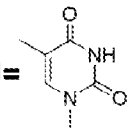
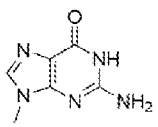
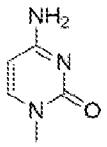
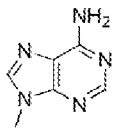

Break A
Break B
Break C
NMe2
OH
5'
3'
Me2N
A
C
G
T
Break A
Break B
Break C

و ؛(17+7-)H44A



, (17+6−)H44A

حيث

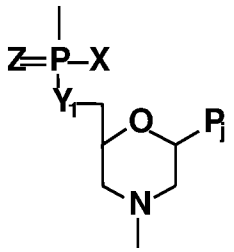
T=m^{5}U=  G=  C=  A= 

و ، و ، ،

حيث ^ = الخصائص الكيميائية الفراغية stereochemistry الخاصة للمركز الفوسفوري phosphorus center لم يتم تحديده.

في بعض النماذج، يمكن أن يتم استبدال اليوراسيلuracil فيما يتعلق بثيميدين thymine في البنيات السابقة.

في بعض السمات، فإن المركب مضاد للحس يتم تكوينه من روابط وحدة فرعية من داخلية تشتمل على فسفور يتم ربطها مع نيتروجين مورفولينو من وحدة فرعية خاصة بـ 5' كربون حلقي '5 exocyclic carbon خارجي من وحدة فرعية مجاورة، حيث أن الروابط تكون عبارة عن روابط فسفورو داي اميدات phosphorodiamidate طبقاً للبنية التالية:



حيث تكون Y1=O ، Z=O ، Pj عبارة عن بيورين purine أو جزيء مزدوج معتمد على البيريميدين pyrimidine فعال في الارتباط من خلال رابط هيدروجين hydrogen bonding خاص بقاعدة مع قاعدة في بولي نيوكليوتيد polynucleotide ويكون X عبارة عن ألكيل alkyl ، ألكوكسي alkoxy ، ثيو ألكوكسي thioalkoxy أو ألكيل أمينو alkyl amino ، حيث X=NR2، حيث تكون كل R بشكل مستقل عبارة عن هيدروجين أو ميثيل methyl. تكون الروابط الداخلية العليا والتي تكون غير مشحونة قد تم تقاطعها مع روابطة التي تم شحنها بشكل موجب عند رقم فسيولوجي، حيث أن العدد الكلي من الروباط المشونة بشكل موجب يكون بين 1 وعند كل العدد الكلي من الروابط بداخل الوحدات. في نموذج توضيح آخر، يشتمل المركب على رابطة بداخل

الوحدات وتعديلات طرفية كما تم وصفه في الطلب الأمريكي المؤقت رقم 118298/13 الذي تم تضمينه هنا كمرجع.

وطبقاً لواحدة م السمات، يوفر الاختراع جزيئات مضاد للحس قادرة على الرابتاط مع مستهدف تم اختياره في ديستروفين بشري من mRNA أولي لحث تخطي الأكسون. في سمة أخرى، يوفر الاختراع اثنين أو أكثر من الأوليجيونيوكليوتيدات مضاد للحس والتي يتم استخدامها معاً لحث تخطي منفرد أو مزدوج. على سبيل المثال، تخطي الأكسون من أكسونات منفردة أو متعددة والذي يمكن تحقيقه من خلال الارتباط مع اثنين أو أكثر من جزيئات أوليجونيوكليوتيد مضاد للحس.

في سمة أخرى، يتعلق الاختراع بأوليجيونيوكليوتيد مضاد للحس معزول من 20 إلى 50 نيوكليوتيد في الطول، بما في ذلك على الأقل 10، 12، 15، 17، 20 أو أكثر من النيوكليوتيدات المتممة المتعاقبة إلى منطقة مستهدفة لأكسون 44 من تم تحديد جين ديستروفين في شلك موضع تلدين مختار من المجموعة المكونة من: H44A(-07+17)، H44A(-07+20)، H44A(-22+07)، H44A(-8+15)، H44A(-7+15)، H44A(-6+15)، H44A(-8+17)، H44A(-6+17)، H44A(+77+101)، H44A(+64+91)، H44A(+62+89)، H44A(+62+85)، H44A(-13+14)، H44A(-14+15)، حيث يتم هجين الأوليجيو نيوكليوتيدات بشكل خاص مع موضع التلدين الذي يحث تخطي أكسون 44 . في أحد النماذج ، يكون الأوليجيونيوكليوتيد المضاد للحس من 25 إلى 28 نيوكليوتيد في الطول.

في سمة أخرى، يتعلق الاختراع أوليجيونيوكليوتيد مضاد للحس معزول من 20 إلى 50 نيوكليوتيد في الطول، بما في ذلك على الأقل 10، 12، 15، 17، 20 أو أكثر النيوكليوتيدات من متوالية نيوكليوتيد مختارة من المجموعة المكونة من: المتوالية رقم: 1-12، 46 و 47، حيث يتم تهجين الأوليجيونيوكليوتيد بشكل خاص بمنطقة مستهدفة لأكسون 44 من جين ديستروفين Dystrophin gene و حث تخطي أكسون 44 . في أحد النماذج ، تكون قواعد ثيمين في المتوالية رقم: 1-12، 46، و 47 بشكل خاص عبارة عن يوراسيل uracil.

تكون أمثلة متواليات مضادة للحس التوضيحة من أكسون 44 مشتمل على ما تم تحديده فيما يلي

H44A(-07+17): 5'-CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG-3' (متوالية رقم : 1)

H44A(-07+20): 5'-CAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG-3' (متوالية رقم: 2)

H44A(-07+22): 5'-CTCAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG-3' (متوالية رقم : 3)

H44A(-8+15): 5'-GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGT-3' (متوالية رقم : 4)

H44A(-7+15): 5'-GATCTGTCAAATCGCCTGCAGG-3' (متوالية رقم : 5)

H44A(-6+15): 5'-GATCTGTCAAATCGCCTGCAG-3' (متوالية رقم : 6)

H44A(-8+17): 5'-CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGGT-3' (متوالية رقم : 7)

H44A(-6+17): 5'-CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAG-3' (متوالية رقم : 8)

H44A(+77+101): 5'-GTGTCTTTCTGAGAAACTGTTCAGC-3' (متوالية رقم : 9)

H44A(+64+91): 5'-GAGAAACTGTTCAGCTTCTGTTAGCCAC-3' (متوالية رقم : 10)

H44A(+62+89): 5'-GAAACTGTTCAGCTTCTGTTAGCCACTG-3' (متوالية رقم : 11)

H44A(+62+85): 5'-CTGTTCAGCTTCTGTTAGCCACTG-3' (متوالية رقم : 12)

H44A(-13+14): 5'-ATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAAAAG-3' (متوالية رقم : 46)

H44A(-14+15): 5'-GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAAAAGC-3' (متوالية رقم : 47).

في أحد النماذج، يهجن hybridizes الأوليجيومر المضاد للحس بشكل خاص موضع تلدين annealing H44A(-07+17)، مثل متوالية رقم :1. في نموذج آخر، يهجن الأوليجيومر المضاد للحس بشكل خاص موضع تلدين H44A(-07+20)، مثل متوالية رقم : 2. في نموذج آخر، يهجن الأوليجيومر المضاد للحس بشكل خاص موضع تلدين H44A(-07+22)، مثل متوالية رقم : 3. في نموذج آخر، يهجن الأوليجيومر المضاد للحس بشكل خاص موضع تلدين H44A(-8+15)، مثل متوالية رقم : 4. في نموذج آخر، يهجن الأوليجيومر المضاد للحس بشكل خاص موضع تلدين H44A(-7+15)، مثل متوالية رقم : 5. في نموذج آخر، يهجن الأوليجيومر المضاد للحس بشكل خاص موضع تلدين H44A(-6+15)، مثل متوالية رقم : 6. في نموذج آخر، يهجن الأوليجيومر المضاد للحس بشكل خاص موضع تلدين H44A(-8+17)، مثل متوالية رقم : 7. في نموذج آخر، يهجن الأوليجيومر المضاد للحس بشكل خاص موضع تلدين H44A(-6+17)، مثل متوالية رقم : 8. في نموذج آخر، يهجن الأوليجيومر المضاد للحس بشكل خاص موضع تلدين H44A(+77+101)، مثل متوالية رقم : 9. في نموذج آخر، يهجن الأوليجيومر المضاد للحس بشكل خاص موضع تلدين H44A(+64+91)، مثل متوالية رقم : 10. في نموذج آخر، يهجن الأوليجيومر المضاد للحس بشكل خاص موضع تلدين H44A(+62+89)، مثل متوالية رقم : 11. في نموذج آخر، يهجن الأوليجيومر المضاد للحس بشكل خاص موضع تلدين H44A(+62+85)، مثل متوالية رقم : 12. في نموذج آخر، يهجن الأوليجيومر المضاد للحس بشكل خاص موضع تلدين H44A(-13+14)، مثل متوالية رقم : 46. في نموذج آخر، يهجن الأوليجيومر المضاد للحس بشكل خاص موضع تلدين H44A(-14+15)، مثل متوالية رقم : 47.

في بعض النماذج، يحتوي أوليجيونيوكليوتيد عكس اتجاه النسخ من الاختراع واحد أو أكثر من التعديلات لتقليل أو منع الانشطار بواسطة RNase H. في بعض النماذج، لا ينشط أوليجيونيوكليوتيد عكس اتجاه النسخ من الاختراع RNase H. في بعض النماذج، يشتمل أوليجيونيوكليوتيد عكس اتجاه النسخ على أصل غير طبيعي. في بعض النماذج، فإن أجزاء السكر من الجزء الأصلي من الأوليجيونيوكليوتيد يتم استبدالها باستخدام أجزاء غير طبيعية مثل مركبات مروفولينو. في بعض النماذج ، فإن أوليجيونيوكليوتيدات مضاد للحس بها روابط أوليجيونيوكليوتيد

داخلية من الصورة الأصلية من أوليجيونيوكليوتيد يتم استبدالهاب استخدام روابط نيوكليوتيد داخلية غير طبيعية مثل فوسفاتاز phosphates معدل . تشتمل مركبات فوسفاتاز المعدلة التوضيحية على مركبات ميثيل فوسفونات methyl phosphonates ، مويثيل فسفورو ثيوات methyl phosphorothioates ، وفسفورو مروفوليدات phosphoromorpholidates وفوسفوفر بيبرازيدات phosophropiperazidates وفوسفسورو أميدات phosphoroamidates. في بعض النماذج، فإن الأوليجيونيوكليوتيد المضاد للحس تكون عبارة عن 2'- O – ميثيل –أوليجيو ريبونيولكيوتيد 2'-O-methyl-oligoribonucleotide أو حمض ببتيد نووي peptide nucleic acid.

في بعض النماذج، يحتوي أوليجيونيوكليوتيد عكس اتجاه النسخ تعديلات قاعدية أو استبدالات. على سبيل المثال، فإن قواعد نيوكليوتيد معينة يمن اختيارها لزيادة ألفة الارتباط الخاصة بأوليجيونيوكليوتيدات مضاد للحس متم وصفها هنا. تشتمل تلك على مركبات بيريميدين بها استبدال عند 5- substituted pyrimidines 5- ، مركبات 6- آزابيريميدين 6- azapyrimidines ، N-2 ، N-6 و O-6 تم استبداله باستخدام مركبات بيروين purines بها استبدال والتي تشتمل على 2- أمينو بروبيل أدينين 2-aminopropyladenine ، 5- بروبينيل يوراسيل 5-propynyluracil ، 5 – بروبينيل سيتوسين 5-propynylcytosine و 2، 6- داي أمينو بيورين 2, 6-diaminopurine. تم توضيح أن استبدالت 5- ميثيل سيتوسين 5-methylcytosine توضح أن هناك زيادة في ثبات معقد duplex stability من حمض نووي nucleic acid بمقدار 0.6-1.2 م، ويمكن أن يتم تضمينها في داخل الأوليجيو نيوكليوتيدات مضاد للحس هنا. في واحدة من النماذج، فإن قاعدة البيريميدية من الأوليجيونيولكيوتيد تشتمل على قاعدة بيريميدين pyrimidine -5 بها استبدال حيث يتم اختيار قاعدة بيميدين من مجموعة تتكون من سيتوسين cytosine وثيميدين thymine ويوراسيل uracil.

في واحدة من النماذج فإن قاعدة البيريميدين pyrimidine base التي بها استبدال 5- ميثيل سيتوسين 5-methylcytosine. في نموذج آخر، يكون هناك قاعدة بيورين purine base واحدة على الأقل من أوليجيونيوكليوتيد تشتمل على N-2 و N-6 من قاعدة بيورين نبها استبدال.

في احد النماذج يكون بـ N-2 و N-6 استبدال من قاعدة بيورين وتكون عبارة عن 2، 6- داي أمينو بيورين 2, 6-diaminopurine.

في أحد النماذج، يشتلم الأوليجيونيوكليوتيد المضاد للحس على واحدة أو أكثر من استبدالات 5- ميثيل سيتوسين 5-methylcytosine بمفردها أو في توليفة مع تعديل آخر، مثل تعديلات سكر 2- -ميثيوكسي إيثيل 2'-O-methoxyethyl sugar. في نموذج آخر، فإن الأوليجيونيوكليوتيد المضاد للحس يشتمل على واحد أو أكثر من استبدالات 2، 6- أمينو بيورين 2, 6-diaminopurine لمفردها أو في توليفة مع تعديل آخر.

في بعض النماذج، فإن الأوليجيونيوكليوتيد في مضاد اتجاه النسخ يتم ربطه مع واحدة أو أكثر من الأجزاء مثل جزيء بولي إيثيلين جليكول أو مترافقات مثل ببتيد مخترق لخلية غنية بأرجينين (على سبيل المثال، 24-39)، والتي تحسن من النشاط والتوزيع الخلوي أو الامتصاص الخلوي من أوليجيونيوكليوتيد مضاد للحس. في أحد النماذج التوضيحية، فإن بولي ببتيد غني بأرجينين يتم ربطه على نحو تساهمي عند الوحدة البنائية من الطرف N أو الطرف C بالنسبة للطرف 3 ' أو 5 ' من المركب مضاد للحس. بالإضافة إلى ذلك وفي نموذج توضيح فإن المركب مضاد للحس يتكون من وحدات فرعية من مورفولينو وروابط وحدة فرعية تشتمل على فسفور يتم ربطه مع نيتروجين مورفولينو من الوحدة الفرعية الخاصة بكربون 5' إكسو سيكليلك من الوحدة الفرعية المجاورة.

في سمة أخرى، يوفر الاختراع نواقل تعبير التي تتضمن أوليجيونيوكليوتيد عكس اتجاه النسخ تم وصفه أعلاه ، على سبيل المثال، ، أوليجيونيوكليوتيد عكس اتجاه النسخ من المتوالية رقم: 1-12، 46 و 47. في بعض النماذج، تم تعديل ناقل التعبير expression vector من خلال فيروس تقهقري retrovirus أو ناقل فيروس غير تقهقري non-retroviral vector مثل ناقل فيروسي يرتبط بالغدة adeno-associated viral vector.

في سمة أخرى، فإن الاختراع يوفر تركيبات صيدلانية التي تشتمل على أوليجيونيوكليوتيدات عكس اتجاه النسخ تم وصفها أعلاه ومحلول ملحي والذي يشتلم على محلول منظم من الفوسفات phosphate buffer.

في سمة أخرى، يوفر الاختراع جزيئات مضادة لعكس اتجاه النسخ تم اختيارها وتمت تهئتها للمساعدة في معالجة وقائية أو علاجية من اضطراب جينيgenetic disorder يشتمل على جزيء مضاد antisense molecule لعكس اتجاه النسخ في صورة مناسبة خاصة بالتوصيل إلى البروتين.

في سمة أخرى، فإن الاختراع يوفر طريقة لمعالجة مريض من مرض جيني حيث أن هـ هنا تطفير في التشفير الجيني لبروتين معين وتؤثر في التطفير الذي يتم نشره من خلال تخطي الأكسون ويشتمل على الخطوات التالية: (أ) اختيار جزيء مضاد للحس طبقاً لطرق تم وصفها هنا؛ (ب) إعطاء جزيء لمريض في حاجة للمعالجة. يتناول الاختراع أيضاً استخدام أوليجيو نيكليوتيدات مضاد للحس معزولة من الاختراع الخاصة بتصنيع دواء خاص بالمعالجة من مرض جيني.

في سمة أخرى، فإن الاختراع يوفر طريقة لمعالجة حالة تتميز بضمور عصبي دوشين والذي يشتمل على إعطاء المريض كمية فعالة من أوليجيونيوكليوتيد تم تصميمه بشكل مناسب من الاختراع المرتبط مع آفة جينية معينة في المريض المذكور. بالإضافة على ذلك، فإن الاختراع يوفر طريقة للمعالجة الوقائية لمريض لمنع أو تقليل ضمور عضلي لدوشين من خلال إعطاء المريض كمية فعالة من أوليجيو نيوكليوتيدات مضاد للحس أو تركيبة صيدلانية تشتمل على واحدة أو أكثر من جزيئات بيولوجية biological molecules.

في سمة أخرى، يوفر الاختراع أطقماً لمعالجة المرض الجيني ، تشتمل تلك الأطقم على الأقل على أوليجيونيوكليوتيد مضاد للحس من الاختراع الحالي، يتم التغليف في حاوية مناسبة وتعليمات خاصة بالاستخدام.

سوف تكون تلك الأهداف وسمات أخرى مفهومة بشكل كامل عند قراءة الوصف التفصيلي التالي من الاختراع في ارتباط مع الأشكال.

شرح مختصر للرسومات

الشكل رقم 1أ: يوضح بنية أوليجيومر مروفولينو مع رابطة فوسفورو داي أميدات phosphorodiamidate linkage.

الشكل رقم 1ب: يوضح الترافق الخاص ببتيد غني بأرجينين arginine-rich peptide وأوليجيو مضاد عكس antisense oligomer اتجاه النسخ، طبقاً لنموذج من الاختراع.

الشكل رقم 1ج: يوضح الترافق في الشكل رقم 1ب حيث أن الروابط الأساسية تشتمل على واحدة أو أكثر من المجموعات المشحونة بشكل موجب.

الأشكال 1د-ز: توضح جزء وحدة فرعية متكررة من أوليجيو نيوكليوتيدات مورفولينو morpholino oligonucleotides توضيحية تم عليها إطلاق د حتى ز.

الشكلان 2أ-2ب يوضحان مخطط التفاعل الخاص بتحضير رابطة من تخليق طور صلب solid phase ومادة حاملة صلبة solid support خاصة بتصنيع أوليجيومر oligomer.

الشكلان 3 و 4 يوضحان مخططات مناظرة لتجارب توضح الأنشطة النسبة الخاصة بأوليجيومرات مضاد للحس توضيحية خاصة بحث تخطي الأكسون 44 في خلايا عضلية مخططة بشرية مزروعة. تم تعريض RNA من خلايا عضلية مخططة تمت معالجتها بأوليجيومرات موضحة إلى أكسون 44- خاص بتضخيم RT-PCR تمت معرفته، ويلي ذلك الاستشراد الكهربي للجلد وحساب كثافة النطاق. تم تخطيط البيانات في شكل تخطي الأكسون ٪ كما تم قياسه من خلال PCR ، أي، شدة النطاق الخاصة بمنتج تخطي الأكسون المرتبطع مع منتج PCR من الطول الكامل . في الشكل رقم 3، H44A(-06+14) و H44A(-06+20) و H44A(-09+17) (المتوالية رقم 13، 19 و20 ، على الترتيب) والتي تكون عبارة عن أوليجيومرات منشورة.

في الشكل رقم 4، H44A(+85+104) و H44A(+59+85) و H44A(+65+90) (المتوالية رقم 14، 21 و23 على الترتيب) والتي تكون عبارة عن أوليجيومرات تم نشرها.

تم توضيح الشكل رقم 5 ورقم 6 في شكل مخططات منظارة للتجارب التي تم توضيحها بالنسبة لأنسطة من أولجيومرات في عكس اتجاه النشط الخاصة بتخطي الأكسون 44 في أرومة عضلية جنينية.

الوصف التفصيلي:

تتعلق نماذج الاختراع الحالي بتحسين مركبات في عكس اتجاه النسط وطرق لاستخدامها والتي تم تحديدها بصفة خاصة لحث تخطي الأكسون في جين ديستروفين بشري. يلعب الديستروفين دوراً مهماً في وظيفة لاعضلة والعديد من الأمراض المرتبطة بالعضلة المتعددة والتي تم تميزها بواسطة صور متطفرة من الجين المذكور. وبالتالي وفي نماذج معينة فإن المركبات مضادة للحس المحسنة التي تم وصفها هنا تحث تخطي الأكسون من الصور المتطفرة من جين ديستروفين بشري مثل جينات ديستروفين الموجودة في الضمور العضلي لدوشين Duchenne muscular dystrophy (DMD) والضمور العضلي لبيكر Becker muscular dystrophy.

نتيجة حالات انشطار mRNA ظاهرة تم التسبب فيها بواسطة تطفيرات في جينات ديستروفين إما تم التعبير عنها من بروتين ديستروفين معيب أو تم التعبير عنها في ديستروفين غير قابل للقياس إطلاقاً أو حالة التي تؤدي إلى صور متغيرة من الضمور العضلي. لكي يتم معالجة تلك الحالة، فإن المركبات مضادة للحس من الاختراع الحالي يتم تهجينها لكي يتم اختيار مناطق من RNA معالجة بشكل أولي من جين ديستروفين بشري متطفر والذي يحث تخطي الأكسون والربط التمايزي في mRNA من ديستروفين مرتبط وبالتالي السماح لخلايا العضلة أن تنمو في ناتج انتساخ mRNA الذي يشفر بروتين ديستروفين وظيفي. في نماذج معينة، فإن بروتين ديستروفين لاناتج لا يكون بالضرورة من الصورة "غير المعالجة" من ديستروفين، ولكين يمكن أن يتم قطعه أو يكون من صورة وظيفية أو شبه وظيفية من ديستروفين.

وعن طريق زيادة مستويات بروتين ديستروفين وظيفي في الخلايا العضلية، فإن تلك النماذج ونماذج مرتبطة بها يمكن أن تكو مفيدة في الوقاية من ومعالجة الضمور العضلي وعلى نحو خاص تلك التي من صور خاصة بالضمور العضلي مثل DMD و BMD والتي يتم تمييزها بواسطة التعبير عن بروتينات ديستروفين فعالة نتيجة ارتباط mRNA غير مرتبط. توفر

أوليجيومرات خاصة هنا لتوفير استهداف محسن أو استهداف خاص بالديستروفين بالمقارنة بأوليجيومرات في الاستخدام وبالتالي تعرض مزايا هامة ومزايا مفيدة بالمقارنة بطرق بديلة من صور معالجة ذات صلة بالضمور العضليmuscular dystrophy .

في واحدة من السمات، يوفر الاختراع أوليجيومر مضاد للحس من 20-50 نيوكليوتيد في الطول قادر على ربط مستهدف مختار لحث تخطي الأكسون في جين ديستروفين بشري، حيث يشتمل الأوليجيومر المضاد للحس على متوالية من قواعد التي تم تهجينها بشكل خاص منطقة مستهدفة لأكسون 44 مختارة من المجموعة المكونة من H44A(-15+07)، H44A(-15+08)، H44A(-15+06)، H44A(-17+08)، H44A(-17+07)، و H44A(-17+06)، حيث يتم ربط القواعد الخاصة بالأوليجيومر مع بنيات حلقية من مورفولينو، و حيث يتم ربط البنيات الحلقية من مورفولينو بواسطة روابط وحدة فرعية تشتمل على فسفور تربط نيتروجين مورفولينو من بنية حلقية مع 5 ' كربون إكسو سيكليك من بنية حلقية مجاورة. في أحد النماذج ، يشتمل الأوليجيومر المضاد للحس على متوالية من قواعد مختارة من المجموعة المكونة من المتوالية رقم: 1 و 4-8. في نموذج آخر ، يكون الأوليجيومر مضاد النسخ عبارة عن حوالي 20 إلى 30 نيوكليوتيد في الطول أو حوالي 22 إلى 28 نيوكليوتيد في الطول. في نموذج آخر أيضاً ، تتكون المتوالية من متوالية تم اختيارها من المتوالية رقم: 1 و 4-8. في أحد النماذج ، يوفر الاختراع أوليجيومر مضاد للحس الذي لا ينشط RNase H.

في سمة أخرى، يوفر الاختراع أوليجيومر مضاد للحس المرتبط بشكل كيميائي بواحد أو أكثر من الأجزاء أو المترافقات التي تحسن نشاط ، التوزيع الخلوي ، أو أو الامتصاص الخلوي لأوليجيومر مضاد للحس ، مثل ، على سبيل المثال، جزيء بولي إيثيلين جليكول . في نماذج أخرى ، يكون الأوليجيومر المضاد للحس مترافقاً مع ببتيد غني بأرجينين مثل متوالية تم اختيارها من المتوالية رقم: 24-39.

في سمة أخرى، يوفر الاختراع أوليجيومر مضاد للحس من 20-50 نيوكليوتيد في الطول قادر على ربط مستهدف مختار لحث تخطي الأكسون في جين ديستروفين بشري، حيث يشتمل الأوليجيومر المضاد للحس على متوالية من قواعد التي تم تهجينها بشكل خاص لمنطقة مستهدفة لأكسون 44 مختارة من المجموعة المكونة من H44A(-15+07)، H44A(-15+08)،

H44A(-15+06)، H44A(-17+08)، H44A(-17+07)، و H44A(-17+06)، حيث يتم ربط القواعد الخاصة بالأوليجيومر مع بنيات حلقية من مورفولينو، وحيث يتم ربط البنيات الحلقية من مورفولينو بواسطة روابط بداخل الوحدة مشتملة على فسفور غير مشحون إلى حد كبير تربط نيتروجين مورفولينو من بنية حلقية مع 5 ' كربون إكسو سيكليك من بنية حلقية مجاورة. في أحد النماذج، يتم بشكل موجب شحن 5٪-35٪ من الروابط من الأوليجيومر المضاد للحس . في نموذج آخر، تكون الروابط بداخل الوحدة من الأوليجيومر المضاد للحس غير مشحونة ويتم تقاطعها مع روابط التي يتم بشكل موجب شحنها عند رقم هيدروجيني فسيولوجي، حيث يكون العدد الكلي من الروابط المشحونة بشكل موجب بين 2 وليس أكثر من النصف وهو العدد الكلي من الروابط. في بعض النماذج، يشتمل الأوليجيومر المضاد للحس على بنيات حلقية من مورفولينو و روابط حلقية بداخل الوحدات من فوسفورو داي أميدات . في بعض النماذج، يكون الأوليجيومر المضاد للحس قد تم تعديله باستخدام مجموعة كاتيونية معلقة.

في سمة أخرى، يوفر الاختراع أوليجيومرات مضاد للحس تم وصفها في الأمثلة ممن 2-7. في بعض النماذج يمكن أن يتم استبدال اليوراسيل بثيميدين في أوليجومرات عكس اتجاه النسخ تم وصفها في الأمثلة من 2-7.

في واحدة من السمات، يتعلق الاختراع بـ أوليجيونيوكليوتيد معزول مضاد للحس من 20 إلى 50 نيوكليوتيد في الطول، بما في ذلك على الأقل 10، 12، 15، 17، 20 أو أكثر، نيوكليوتيد متمم لمنطقة مستهدفة لأكسون 44 من تم تحديد جين ديستروفين في شلك an موضع تلدين مختارة من المجموعة المكونة من: H44A(-17+07)، H44A(-20+07)، H44A(-22+07)، H44A(-15+8)، H44A(-15+7)، H44A(-15+6)، H44A(-17+8)، H44A(-17+6)، H44A(+101+77)، H44A(+91+64)، H44A(+89+62)، H44A(+85+62)، H44A(-14+13)، H44A(-15+14). أوليجيونيوكليوتيد مضاد للحس يتم تهجينها بشكل خاص إلى موضع التلدين ، لحث تخطي أكسون 44 .

تشتمل أوليجيو نيوكليوتيدات مضاد للحس أخرى مضاد للحس من الاختراع من 20 إلى 50 نيوكليوتيد في الطول و على الأقل 10، 12، 15، 17، 20، 22، 25 أو أكثر من النيوكليوتيدات من المتوالية رقم: 1-12، 46، و 47. في بعض النماذج، تكون قواعد ثيمين في المتوالية رقم:

1-12، 46، و 47 بشكل خاص عبارة عن يوراسيل. تم توضيح أوليجيوميرات مضاد للحس التوضيحة من الاختراع هنا فيما يلي.

H44A(-07+17): 5'-CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG-3'

(المتوالية رقم 1)

H44A(-07+20): 5'-CAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG-3' (المتوالية رقم 2) H44A(-07+22): 5'-CTCAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG-3' (المتوالية رقم 3)

H44A(-8+15): 5'-GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGT-3' (المتوالية رقم 4)

H44A(-7+15): 5'-GATCTGTCAAATCGCCTGCAGG-3' (المتوالية رقم 5)

H44A(-6+15): 5'-GATCTGTCAAATCGCCTGCAG-3' (المتوالية رقم 6)

H44A(-8+17): 5'-CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGGT-3' (المتوالية رقم 7)

H44A(-6+17): 5'-CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAG-3' (المتوالية رقم 8)

H44A(+77+101): 5'-GTGTCTTTCTGAGAAACTGTTCAGC-3' (المتوالية رقم 9)

H44A(+64+91): 5'-GAGAAACTGTTCAGCTTCTGTTAGCCAC-3' (المتوالية رقم 10)

H44A(+62+89): 5'-GAAACTGTTCAGCTTCTGTTAGCCACTG-3' (المتوالية رقم 11)

H44A(+62+85): 5'-CTGTTCAGCTTCTGTTAGCCACTG-3' (المتوالية رقم 12)

H44A(-13+14): 5'-ATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAAAAG-3' (المتوالية رقم 46)

H44A(−14+15): 5'−GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAAAAGC−3' (المتوالية رقم 47).

في أحد النماذج، يهجن الأوليجيومر المضاد للحس بشكل خاص موضع تلدين H44A(−17+07)، مثل متوالية رقم :1. في نموذج آخر، يهجن الأوليجيومر المضاد للحس بشكل خاص موضع تلدين H44A(−20+07)، مثل متوالية رقم : 2. في نموذج آخر، يهجن الأوليجيومر المضاد للحس بشكل خاص موضع تلدين H44A(−22+07)، مثل متوالية رقم : 3. في نموذج آخر، يهجن الأوليجيومر المضاد للحس بشكل خاص موضع تلدين H44A(−15+8)، مثل متوالية رقم : 4. في نموذج آخر، يهجن الأوليجيومر المضاد للحس بشكل خاص موضع تلدين H44A(−15+7)، مثل متوالية رقم : 5. في نموذج آخر، يهجن الأوليجيومر المضاد للحس بشكل خاص موضع تلدين H44A(−15+6)، مثل متوالية رقم : 6. في نموذج آخر، يهجن الأوليجيومر المضاد للحس بشكل خاص موضع تلدين H44A(−17+8)، مثل متوالية رقم : 7. في نموذج آخر، يهجن الأوليجيومر المضاد للحس بشكل خاص موضع تلدين H44A(−17+6)، مثل متوالية رقم : 8. في نموذج آخر، يهجن الأوليجيومر المضاد للحس بشكل خاص موضع تلدين H44A(+77+101)، مثل متوالية رقم : 9. في نموذج آخر، يهجن الأوليجيومر المضاد للحس بشكل خاص موضع تلدين H44A(+64+91)، مثل متوالية رقم : 10. في نموذج آخر، يهجن الأوليجيومر المضاد للحس بشكل خاص موضع تلدين H44A(+62+89)، مثل متوالية رقم : 11. في نموذج آخر، يهجن الأوليجيومر المضاد للحس بشكل خاص موضع تلدين H44A(+62+85)، مثل متوالية رقم : 12. في نموذج آخر، يهجن الأوليجيومر المضاد للحس بشكل خاص موضع تلدين H44A(−13+14)، مثل متوالية رقم : 46. في نموذج آخر، يهجن الأوليجيومر المضاد للحس بشكل خاص موضع تلدين H44A(−14+15)، مثل متوالية رقم : 47.

وما لم يتم تحديد خلاف ذلك، فإن كل التقنيات والمصطلحات التقنية التي تم استخدامها هنا يكون لها نفس المعاني المفهومة لذوي المهارة العادية في المجال الذي يتعلق به الاختراع الحالي. على الرغم أن أي من الطرق والمواد المشابهة أو المكافئة لتكل التي ت وصها هنا يمكن استخدامها في

الممارسة أو الاختبار للاختراع الحالي، فإن الطرق المفضلة والمواد قد تم وصفها هنا. لأغراض الاختراع الحالي، فإن المصطلحات التالية تم تعريفها كما يلي.

I –التعريفات

يشير مصطلح "حوالي" إلى كمية ، مستوي، قيمة أو عدد تكرار ونسبة مئوية أو بُعد، حجم، مقدار ، وزن أو طول الذي يتنوع والذي يكون من 30، 25، 20، 15، 10، 9، 8، 7، 6، 5، 4، 3، 2 أو 1٪ إلى الكمية، المستوي، القيمة، العدد ، التكرار، النسبة لامئوية، البعد الجم، والكمية والوزن أو الطول المرجعي.

تشير المصطلحات "مكتمل" و "على نحو مكتمل" إلى بولي نيوكليوتيدات (أي، متوالية من النيوكليوتيد) التي ترتبط من خلال إزدواج القاعدة. على سبيل المثال، فإن المتوالية " T-G-A (5'-3')" تكون متممة للمتوالية " T-C-A (5'-3')". يمكن أن يكون المتمم "جزئي" فيه بعض الأحماض النووية والقواعد التي تم تطابقها طبقاً لقواعد متزاوجة أساسية. أو يمكن أن تكون "كاملة" أو "إجمالية" متممة بين الأحماض النووية. تكون درجة التتميم بين جدائل الحمض النووي لها تأثيرات كبيرة على الفعالية والمقاومة الخاصة بالتجنين بين جدائل الحمض النووي. بينما يكون هناك تتميم في الغالب مطلوباً ويكن أن تشتمل بعض النماذج على واحدة أو اكثر ويفضل 6، 5، 4، 3، 2، أو 1 من عدم التطابق بالنسبة لبعض النماذج التي يمكن أن يتم تضمينها مع واحدة أو أكثر ولكن يفضل 6، 5، 4، 3، 2، أو 1 من صور عدم التطابق بالنسبة لـ مستهدف RNA. تكون الصور المتنوعة عند أي موضع في مدى الأوليجيومر قد تم تضمينها. في نماذج معينة تكون الصور المتنوعة من المتوالية قريبة من الأطراف الخاصةب الأوليجيومر والذي يفضل بصفة عامة أن تكون تغييرات في الجزء السفلي، وإذا كان ذلك موجوداً فتكون بشكل نمطي في حوالي 6، 5، 4، 3، 2، أو 1 نيوكليوتيد من الطرف 5' و/أو 3'.

يتم استخدام "ببتيد اختراق الخلية" و " CPP " والتي يتم استخدامها على نحو تبادلي وتشير على ببتيدات اختراق خلية كاتيونية وايضاً يطلق عليها ببتيدات نقالة أو ببتيدات حاملة أو نطاقات إرسال ببتيد. يكون للببتيدات التي تم توضيحها هنا قدرة خاصة بحث اختراق الخلية بنسبة 100٪ من الخلايا الخاصة بمجموعة مزرعة خلية معين وتسمح بالنقل الموضعي بجزيء كبير بداخل

نسيج متعدد في الكائن الحي عند الإعطاء المجموعي. يكون نموذج CPP المفضل عبارة عن ببتيد غني بالأرجينين كما تم وصفه على نحو إضافي فيما يلي.

يتم استخدام المصطلحات "أوليجيوم مضاد للحس" و "مركب مضاد للحس" و "أوليجيو ببتيد "مضاد للحس" على نحو تبادلي هنا لكي تشير إلى متوالية من وحدات فرعية حلقية ، تحمل كل منها جزيء مزدوج مع قاعدة مرتبطة من خلال روابط وحدة فرعية والتي تسمح بأجزاء زوج قاعدة لكي يتم التهجين إلى متوالية مستهدفة في حمض نووي (على نحو نمطي RNA) بواسطة زوج قاعدة من Watson–Crick ، لكي يتم تشكيل معقد : حمض نووي :أوليجيومر غير متجانس بداخل متوالية مستهدفة. تكون الوحدات الفرعية الحلقية معتمدة على ريبوز أو سكر بنتوز آخر أو في نموذج مفضل، مجموعة مورفولينيو (انظر، الوصف الخاص بأوليجيومرات مورفولينو فيما يلي). يمكن أن يكون للأوليجيومر تتتميم متوالية دقيقة أو متوالية قريبة لمتوالية مستهدفة؛ والتغييرات في المتوالية لاقريبة عند الطرف الخاص بالأوليجيومر والتي تكون بصفة عامة مفضلة للتغييرات في الجزء الداخلي.

يمكن تصميم الأوليجيومر المضاد للحس بحي يعيق أو يثبط ترجمة mRNA أو يثبط معالجة ربط mRNA بشكل أولي طبيعي ويمكن أن يتم "توجيهه إلى" مستهدف في مقابل" متوالية مستهدفة والتي يتم تهجينها. تكون المتوالية المستهدفة بشكل نمطي عبارة عن منطقة تشتمل على كودون بداية AUG من mRNA ، أوليجيومر كابت للترجمة، أو موضع ربط خاصة بـ mRNA معالجة أولية وأوليجيومر كابت للربط Splice Suppressing Oligomer (SSO). يمكن أن تشتمل متوالية مستهدف من الموضع على متوالية mRNA لها الطرف 5 ' من 1 إلى حوالي 25 زوج قاعدة أسفل من رابطة مستقبل خاصة بالرابط في معالج بشكل أولي mRNA. تكون المتوالية المستهدفة المفضلة عبارة عن أي منطقة من mRNA معالجة بشكل أولي والتي تشتمل على موضع رابط أو يتم تضمينها بشكل كامل في متوالية مشفرة لأكسون أو يتم تمديدها فيما يتعلق بمرسل رابط أو موضع مانح. يكون الأوليجيومر بصفة عامة عبارة عن "مستهدف مضاد" مستهدف ذي صلة بيولوجي مثل البروتين، الفيروس، أو البكتريا عندما يتم استهداف في مقابل الحمض النووي من المستهدف في طريقة تم وصفها أعلاه.

تشير المصطلحات "أوليجيومر مروفولينو morpholino oligomers" أو " PMO " (فوسفور أميدات – أو فسفور أميدات مورفولينو أوليجيومر phosphorodiamidate morpholino oligomers) إلى نظير أوليجيونيكليوتيد مكون من بنيات فرعية من مورفولينو، حيث (i) يتم ربط البنيات معا بواسطة روابط محتوية على الفسفور واحدة إلى ثلاث ذرات مع ويفضل أثنين من الذرات في الطول، يفضل وحدات غير مشحونة أو وحدات كاتيونية أو محدات نيتروجين مورفولينو من واحدة أو وحدة فرعية خاصة بكربون حلقي خارجي 5 ' من وحدة فرعية و(ii) وكل منها عبارة عن حلقة مورفولينو تحمل بيورين أو جزيء مزدوج من بيريميدن أو جزيء فعال خاص بالارتباط بواسطة قاعدة رابطة هيدروجينية من هيدروكربون إلى قاعدة في البولي نيوكليوتيد. انظر، على سبيل المثال، البنية في الشكل رقم 1أ، والتي تعرض فوسفورو داي أميدات من النوع الرابط. يمكن استخدام "بنية حلقية رابطة من مورفولينو morpholino ring structure " على نحو تبادلي باستخدام المصطلح "وحدة فرعية من مورفولينو morpholino subunit ". يمكن أن يتم تحضير الصور المتغيرة الخاصة بالرابطة المذكورة بمجرد أنها لا تتفاعل في الارتباط أو النشاط. على سبيل المثال، فإن الأكسجين oxygen يتم ربطه مع الفسفور ويمكن أن يتم استبداله باستخدام فوسفور (ثيو فوسفور داي أميدات thiophosphorodiamidate). يمكن استبدال 5 ' أكسجين باستخدام أمينو amino أو أمينو به استبدال من ألكيل. تكون ذرة النيتروجين nitrogen المفضلة المعلقة قد تم ربطها مع الفسفور ويمكن أن لا يكون بها استبدال أو يكون بها استبدال أحادي أو يكون بها استبدال ثنائي باستخدام (مستبدلة بشكل اختياري) مع ألكيل صغير. انظر أيضاً المناقشة الخاصة بالروابط الكاتيونية فيما يلي. يكون جزء زوج بيورين purine او بيريميدين pyrimidine بشكل نمطي عبارة عن أدينين adenine وسيتوسين cytosine وجوانين guanine ، ويوراسيل uracil ، ثيميدين thymine أو أيونوسين inosine.

تم الوصف التفصيلي للتخليق وخصائص الالترباط الخاصة بأوليجيومرات مورفولين في طلبات البراءات الأمريكية أرقام 5698685، 5217866، 5142047، 5034506, 5166315، 5521063، 5506337، 8076476 ، 8299206 ، و 7943762 (روابط كاتيونية cationic linkages)، تم تضمينها كلها هنا كمرجع. تم الوصف التفصيلي لمجموعات رابطة معدلة بداخل الوحدات والمجموعات الطرفية في PCT من الطلب الأمريكي رقم 038459/2011

ونشرة الطلب الدولي رقم /150408/2011 والتي تم تضمينها هنا كمرجع بكاملها.يمكن أن يشير "وحدة فرعية لحمض أمينو amino acid subunit " أو "وحدة بنائية لحمض أميني amino acid residue " إلى وحدة حمض أمينية α – (–CO–CHR–NH–) α–amino acid (–CO–CHR–NH–) residue أو β – أو من الوحدة البنائية للحمض الأميني (على سبيل المثال، –CO–(CH2)nCHR–NH–)، حيث تكون R عبارة عن سلسلة جانبية (والتي يمكن أن تشتمل على هيدروجين hydrogen) وتكون n من 1 إلى 6 ويفضل من 1 إلى 4.

يشير المصطلح "حمض أميني يحدث بشكل طبيعي naturally occurring amino acid " إلى حمض أميني موجود في بروتينات موجودة في الطبيعة. يشير المصطلح "أحماض أمينية غير طبيعية non–natural amino acids " إلى تلك الأحماض التي لا تكون موجودة في البروتينات الموجودة في الطبيعة وتشتمل الأمثلة على بيتا– ألانين (β–Ala) (β–Ala) beta–alanine ، حمض 6– أمينو هيسكانويك (Ahx) (Ahx) 6–aminohexanoic acid و 6– حمض أمينو هيكسانويك (Ahx) وحمض 6– أمينو بيتانويك 6–aminopentanoic acid.

يشير مصطلح "حمض نووي يحدث بشكل طبيعي" إلى حمض نووي موجودة في الطبيعة. وعلى نحو نمطي، فإن الأحماض النوويةv التي تحدث بشكل طبيعي تكون عبارة عن بوليمرات polymers من نيوكليوتيدات (تشتم لكل منها على بيورين أو بيريميدين من قاعدة نووية وسكر بنتوز pentose sugar) يتم ربطهما معاً بواسطة روابطة فيوسفو داي إستر phosphodiester. تشتمل جزيئات حمض نووي على RNA و DNA. تشير "أحماض نووية تحدث بشكل طبيعي" إلى حمض نووي الذي لا يكون موجوداً في الطبيعية. على سبيل المثال، فإن الأحماض النووية التي تحدث بشكل غير طبيعي تشتمل على واحدة أو أكثر من القواعد غير الطبيعية و/أو الروابط الخاصة بالوحدة الداخلية، على سبيل المثال، السكر، القاعدة، و/أو الرابطة التي تم تعديلها أو تم استبدالها لتلك الموجودة في جزيء حمض نووي طبيعي. تم وصف التعديلات التوضيحية هنا. في بعض النماذج، تشتمل الأحماض النووية غير الحادثة بشكل طبيعي على أكثر من نوع من التعديل، على سبيل المثال، تعديلات السكر، القاعدة، وتعديلات رابطة السك ر والقاعدة وتعديلات القاعدة والرابطة أو القاعدة والسكر وتعديلات الرابطة. في نموذج مفضل، فإن الأوليجيو نيوكليوتيدات من الاختراع الحالي تكون عبارة عن جزيئات حمض نووي

غير حادثة بشكل طبيعي. على سبيل المثال، في بعض النماذج فإن الأوليجيونيوكليوتيدات مضاد للحس تشتمل على قاعدة غير طبيعية (على سبيل المثال، معدلة أو بها استبدال). في بعض النماذج، فإن الأوليجيو نيوكليوتيدات مضاد للحس يشتمل على سكر غير طبيعي (على سبيل المثال، معدل أو به استبدال). في بعض النماذج، فإن يشتلم الأوليجيونيوكليوتيد المضاد للحس على رابطة بداخل الوحدات غير طبيعية (على سبيل المثال، معدلة أو بها استبدال). في بعض النماذج، فإن الأوليجيونيوكليوتيد يشتمل على أكثر من نوع من التعديل أو الاستبدال، على سبيل المثال، قاعدة غير طبيعية و/أو سكر غير طبيعي و/أو رابطة بداخل الوحدات غير طبيعية. في نماذج أخرى، فإن الأوليجيونيوكليوتيدات مضاد للحس يكون لها تركيبة كيميائية او جزيء حمض نووي يحدث بشكل طبيعي، أي، أوليجيونيوكليوتيد مضاد للحس لا يشتلم على قاعدة معدلة أو بها استبدال أو سكر أو رابطة بداخل الوحدات. بغض النظر عن التركيبة فإن الأوليجيونيوكليوتيدات مضاد للحس من الاختراع يتم تخليقها في المعمل ولا تحث التركيبات المضادة لعكس الاتجاه من أصل بيولوجي.

يشير "إكسون exon " إلى جزء محدد من جزء محدد من حمض نووي والذي يشفر بروتين أو متوالية حمض نووي التي تم تمثلها في صورة طبيعية من جزيء RNA بعد أي أجزاء من RNA معالج بشكل مسبق أو من خلال الارتباط. يمكن أن يكون جزيء RNA عبارة عن RNA مرسل (mRNA) أو صورة وظيفية من RNA غير مشفر، مثل rRNA أو tRNA . يكون لجين ديستروفين بشري حوالي 79 أكسون.

يشير "إنترون intron " إلى منطقة حمض نووي (بداخل الجين) والتي لا تتم ترجمتها في البروتين. يكون الإنترون عبارة عن جزء غير مشفر والذي يتم انتساخه في ناتج انتساخ mRNA (mRNA أولي) وبعد ذلك الإزاحة من خلال الربط أثناء تشكيل RNA ناضج.

يشير مصطلح "كمية فعالة" أو "كمية فعالة بشكل علاجي" إلى كمية من المركب العلايج مثل الأوليجيومر المضاد للحس والذي يتم إعطاؤه لخاضع ثديي إما في شكل جرعة منفردة أو جزء من سلسلة من الجرعات، والتي تكون فعالة لإنتاج التأثير العلاجي المطلوب. بالنسبة لأوليجيومر مضاد للحس، فإن ذلك يكون فعالاً بشكل نمطي حول تثبيط الترجمة أو المعالجة الخاصة بالربط الطبيعي من متوالية مستهدفة مختارة.

يشير "تخطي الأكسون Exon skipping " بصفة عامة إلى عملية تتم فيها إزالة الأكسون أو جزء منه بالكامل من RNA لم تتم معالجتها بشكل أولي وبالتالي يتم استثناؤه من RNA الناضج مثل mRNA الناضج والذي تتم ترجمته في البروتين. وبالتالي فإن جزء من البروتين يتم تشفيره خلال ذلك من خلال تخطي الأكسون والذي لا يكون موجوداً في صورة تم التعبير عنها من البروتين ولعى نحو نمطي إنشاء صورة وظيفية مستمرة من البروتين. في نماذج معينة، فإن الأكسون يتم تخطيه ويكون عبارة عن أكسون غير منتظم في جين الديستروفين البشري والذي يمكن أن يشتم لعلى تطفيرات أو أي تغييرات أخرى في المتوالية خلاف الربط غير المنتظم. في نماذج معينة، فإن الأكسون يتم تخطيه في أي واحد أو أكثر من أكسونات 1-79 من جين الديستروفين وخلال الأكسون 44 من جين الديستروفين البشري الذي يكون مفضلاً.

يكون "الديستروفين Dystrophin " عبارة عن بروتين سيتوبلازمي cytoplasmic protein له شبه قضيب rod-shaped وجزء هام من معقد البروتين الذي يربط الهيكل الخلوي من ألياف العضلة muscle fiber مع قالب خارج الخلية محيطة بها من خلال غشاء خلوي cell membrane. يشتمل الديستروفين على نطاقات وظيفية متعددة. على سبيل المثال، فإن الديستروفين يشتلم على نطاق رابط لأكتين عند حوالي 14-240 حمض أميني ونطاق ضيب مركزي عند حوالي أحماض أمينية 253-3040. يكون النطاق المركزي الأكبر قد تم تشكيله بواسطة 24 عناصر حلزونية ثلاثية مشابهة لاسبكتيرين من حوالي 109 حمض أميني، والتي لها تشابه عند ألفا-أكتينين وسبيكترين. يتم تقاطع تلك التكررات بشكل نمطي من خلال أربة أجزاء غير مكررة من البرولين والتي يطلق عليها أيضاً مناطق مفصلية. يتم فصل الوحدات المتكررة 15 و16 بواسطة تمديد 18 حمض أميني والتي تظهر لتوفير موضع أساسي خاص بانشطار حال للبروتين من ديستروفين. تكون الهوية الين معظم الأمداء المتكررة من 10-25٪. تشتمل واحدة من التكرارات على ثلاثة من حلزونات ألفا alpha-helices: 1، 2 و 3. يتم تشكيل كل من حلزونات ألفا 1، و3 بواسطة 7 لفات حلزونية ويمكن أن يتم التفاعل في شكل أنابيب ملتفة خلال واجهة غير آلفة للماء. يكون لألفا- حلزوني 2 بنية معقدة ويتم تشكيلها من خلال الأجزاء الخاصة بأربعة و ست وحدات حلزونية ويتم فصلها بواسطة وحدة بنائية جلايسين Glycine أو برولين Proline. يتم تشفير كل وحدة متكررة بواسطة اثنين من الأكسونات وعلى نحو نمطي يتم تفسيرها

من خلال الإنترون بين الأحماض الأمينية 47 و48 في جزء أول من حلزون ألفا -2. تم اكتشاف الإنترون الآخر عند مواضع مختلفة من التكرار، وعلى نحو خاص يتم تشتتيه على الحلزون -3. يشتمل ديستورفين أيضاً على نطاق غني بالسيستين cysteine عند حوالي أحماض الأمينية 30-80 3360)، والتي تشتمل على جزء غني بالسيستين (أي، 15 وحدة سيسيتن في 280 حمض أميني) يوضح التشابه الخاص بنطاق الطرف C من القالب اللزج (ديكتوسيتيليوم داي سكوديوم Dictyostelium discoideum) ألفا أكتينينalpha-actinin . يكون النطاق الطرفي من الكربوكسي عند حوالي الأحماض الأمينية من 3361 -3685.

يكون طرف الأمين من ديستروفين مرتبطاً مع F – أكتين طرف كربوكسي يرتبط بمعقد بروتين يرتبط بديستروفين dystrophin-associated protein complex (DAPC) عند غمد الليف الخلوي. تشتمل DAPC على مركبات ديستروجليكان، ساكروجليكان وإنترجرينات وكافيولين وتطفيرات في أي من تلك المكونات تم التسبب بها من خلال ضمور عضلي موروث ذاتي في الجسد. يكون DAPC غير مستقبل عندما يكون الديستروفين غائباً، والذييينتج عنه تقليل في مستويات بروتين عضو وبدوره يؤدي إلى تلف الاليف المتطور والتسرب في الغشاء. في العدد من صور الضمور العضلي، مثل الضمور العضلي لدوشينDuchenne's muscular dystrophy (DMD) والضمور العضلي لبيكر Becker's muscular dystrophy (BMD)، تنتج الخلايا العضلية وتقوم بتغيير الصور الناقصة الوظيفية من ديستروفين أو خلاف ديستروفين على الإطلاق والتي تكون بشكل أساسي نتيجة تطفيرات في متوالية الجين والتي تؤدي إلى رابط غير صحيح. يفتقر التعبير المفرط السائد عن بروتين ديستورفين فعال أو الافتقار الكامل لديستروفين أو بروتين مشابه لديستروفين إلى التطور السريع أو الضمور العصبي كما تمت ملاحظته أعلاه. في هذا السياق فإن "بروتين ديستروفين" يمكن تهيئته من خلال صور خاصة بديستروفين والذي يتم إنتاجه في خاضعين معينين مع DMD أو BMD كما هو معروف في المجال أو من خلال وجود ديستروفين قابل للاكتشاف detectable dystrophin.

وكما تم استخدامه هنا فإن مصطلحات "وظيفة function " و "وظيفي" وما شابه ذلك تشير على وظيفة بيلووجية أو إنزيمية أو علاجية.

يشير مصطلح بروتين ديستروفين "وظيفي" بصفة عامة إلى بروتين ديستروفين له نشاط بيولوجي كاف لتقليل التحلل الخاص بتطور نسيج العضلة والتي تكون خصائص الضمور العضلي، نمطية بالمقارنة مع صور متغيرة أو "معينية" من بروتين ديستروفين والذي يكون موجوداً في خاضعين معينين مصابين بـ DMD أو BMD. في نماذج معينة فإن فإن بروتين الديستروفين الوظيفي يمكن أن يكون به حوالي 10٪، 20٪، 30٪، 40٪، 50٪، 60٪، 70٪، 80٪، 90٪، أو 100٪ (التي تشتمل على كل الأعداد بينها) من المعول أو النشاط البيولوجي في الكائن الحي من ديستروفين من النوع غير المعالج، كما تم قياسه طبقاً لتقنيات روتينية في المجال. وكأحد الأمثلة فإن النشاط المرتبط بديستروفين في العضلة تتم زراته في المعمل ويمكن أن يتم قياسه طبقاً لحجم الأنبوب العضلي العضلي، يكون تنظيم الألياف العضلي (أو عدم التنظيم) ، النشاط المضاد ومجموعات طارئة من مستقبلات أسيتي كولين acetylcholine (انظر، على سبيل المثال، Brown et al., Journal of Cell Science. 112:209-216, 1999). تكون نماذج الحيوانات عبارة عن مصادر مفيدة خصاة بدراسة الإمراض الخاص بالمرض وتوفير وسائل خاصة باختبار أنشطة تعتمد على الديستروفين.يكون هناك اثنين من أكثر النماذج الحيوانية المستخدمة لبحوث DMD هي فئران mdx والضمور العضلي المرتجع لكل بالصيد الذهبي (GRMD)، والذي تكون كل منها سالبة بالنسبة لديستروفين (انظر، على سبيل المثال، Collins & Morgan, Int J Exp Pathol 84: 165-172, 2003). يمكن استخدام تلك النماذج ونماذج أخرى لقياس الفعالية الوظيفية الخاصة ببروتينات ديستروفين متعددة. تم أيضاً تضمين صور مقطوعة من ديستروفين مثل تلك لاصور التي يتم إنتجاها من خلال بعض مركبات مضادة للنسخ خاصة بتخطي الأكسون من الاختراع الحالي.

يشير مصطلح "معزول isolated " إلى مادة تكون خالية إلى حد كبير أو بشكل أساسي من المكونات الموجودة بشكل طبيعي في الحالة الأساسية. على سبيل المثال، يمكن أن يشير "بولي نيولكيوتيد معزول isolated polynucleotide " كما تم استخدامه هنا إلى بولي نيولكيوتيد الذي تمت تنقيته أو تمت إزالته من المتواليات والتي تحيطه به في الحالة الطبيعية، على سبيل المثال، شظية DNA fragment والتي تمت إزالتها من المتواليات التي تقوم مجاورة بشكل طبيعي إلى الشظية.

وكما تم استخدامه هنا، يشير مصطلح "طول كاف" إلى أوليجيونيوكليوتيد مضاد للنسخ الذي يكون متمماً لـ 8 على لأقل، وعلى نحو نمطي من 8- 30 ، قواعد نيكلو متجاورة في ديستروفين مستهدف من mRNA أولي. في بعض النماذج، تشتمل الصورة التي مضاد للحس التي لها طول مناسب على الأقل على 8، 9، 10، 11، 12، 13، 14، 15، 17، 20 أو أكثر من قواعد نيكليو متجاورة في ديستروفين مستهدف من mRNA أولي . في نماذج أخرى تشتمل الصورة التي مضاد للحس التي لها طول مناسب على الأقل على 16، 17، 18، 19، 20، 21، 22، 23، 24، أو 25 قواعد نيكليو متجاورة في ديستروفين مستهدف من mRNA أولي . يكون لأوليجيونيوكليوتيد مضاد للحس طول كامل على الأقل عدد عند الحد الأدنى له من نيوكليوتيد بحيث يكون قادراً على التهجين بشكل خاص لـ إكسون 44. يفضل أن يكون أوليجيونيوكليوتيد بطول كامل من حوالي 10 إلى حوالي 50 نيوكليوتيد في الطول، بما في ذلك أوليجية نيوكليوتيد من 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 و 40 أو أكثر من نيوكليوتيد. في أحد النماذج ، يكون أوليجيونيوكليوتيد بطول كامل من 10 إلى حوالي 30 نيوكليوتيد في الطول. في نموذج آخر ، يكون أوليجيونيوكليوتيد بطول كامل من 15 إلى حوالي 25 نيوكليوتيد في الطول. في نموذج آخر أيضاً ، يكون أوليجيونيوكليوتيد بطول كامل من 20 إلى 30، أو 20 إلى 50، نيوكليوتيد في الطول. في نموذج آخر أيضاً ، يكون أوليجيونيوكليوتيد بطول كامل من 22 إلى 25، 22 إلى 28، 24 إلى 28، 24 إلى 29، 25 إلى 28، 20 إلى 30، أو 25 إلى 30 نيوكليوتيد في الطول. يشير التعبير "يحسن" أو "تحسين" أو "يزيد " أو " زيادة" أو "يحثن أو "يحث" بصفة عامة إلى قدرة واحد أو أكثر من مركبات مضادة لاتجاه النسخ أو التركيبات في إنتاج أو التسبب في وجود استجابة فسيولوجية أكبر (أي، تأثيرات بعدية) في خلية أو خاضع بالمقارنة مع الاستجابة الناتجة عن مركب ليس في اتجاه النسخ أو مركب عينة مقارنة. يمكن أن تشتمل استجابة فسيولوجية قابلة للقياس على التعبير المتزايد عن صورة وظيفية من بروتين ديستروفين أو نشاط بيولوجي يرتبط بديستروفين متزايد في نسج العضلة من بين استجابات أخرى واضحة من الفهم الخاص بالمجال والوصف الموجود هنا. يمكن قياس وظيفة العضلة المتزايدة، بما في ذلك الزيادات او التحسينات في وظيفة العضلة بمقدار حوالي 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٪، أو 100٪. إن النسبة المئوية الخاصة بألياف العضلة التي تعبر عن ديستروفين يمكن أن يتم قياسها بما في ذلك تعبير ديستروفين المتزايد في حوالي 1٪، 2٪، ٪، 15٪، 16٪، 17٪، 18٪، 19٪، 20٪، 25٪، 30٪، 35٪، 40٪، 45٪، 50٪، 55٪، 60٪، 65٪، 70٪، 75٪، 80٪، 85٪، 90٪، 95٪، أو 100٪ من الألياف العضلية على سبيل المثال، تم توضح أن حوالي 40٪ من التحسين في وظيفة العضلة يمكن أن يحد إذا كان هناك م 25-30٪ من الألياف تعبر عن ديستروفين (انظر، على سبيل المثال، DelloRusso et al, Proc Natl Acad Sci USA 99: 12979-12984, 2002). تكون الكمية "الزائدة" أو "المحسنة" بشكل نمطي "محسنة بشكل استاتيكي" ويمكن أن تشتمل على زيادة والتي تكون 1.1، 1.2، 2، 3، 4، 5، 6، 7، 8، 9، 10، 15، 20، 30، 40، 50 مرة أو أكثر (على سبيل المثال، 500، 100 مرة)(بما في ذلك كل الأعاد والنقاط العشرية بيها وأعلى من 1) (على سبيل المثال، 1.5، 1.6، 1.7، 1.8، إلخ)، تكون الكمية المنتجة من خلال المركب مضاد للحس (غياب العامل) أو مركب عينة المقارنة.

يمكن أن يرتبط مصطلح "يقلل" أو " يثبط" بصفة عامة لقدرة واحدة أو أكثر من المركبات المضادة لاتجاه النسخ من الاختراع على "تقليل" الاستجابة الفسيولوجية ذات الصلة أو الاستجابة الخلوية " مثل عرض خاص بالمرض أو الحالة التي تم وصفها هنا كما تم قياسه طبقاً لتقنيات روتينية في المجال الذي تم توضيحه. سوف تكون الاستجابة الفسيولوجية ذات الصلة أو الاستجابات الخلوية (في الكائن الحي أو في المعمل) واضحة للشخص ذي المهارة في المجال ويمكن أن يشتمل على تقليل في أعراض الصور المرضية للحثل العضلي او تقليلات في التعبير عن الصور المُعدية من ديستورفين مثل الصور التي تغير ديستروفين والتي تم التعبير عنها بشكل منفرد باستخدام DMD أو BMD . يكون هناك "نقص" في الاستجابة ومهم من الناحية الإحصائية كما تمت مقارنة ذلك بالإستجابة التي تم إنتاجها من خلال المركب مضاد للحس أو تركيبة عينة المقارنة والتي يمكن أن تشتمل على 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٪، أو 100٪ من النقص بما في ذلك كل القيم بين تلك الأعداد.

تم أيضاً تضمين أنظمة توصيل ناقل والتي تكون قادرة على التعبير عن متواليات تستهدف ديستروفين dystrophin أوليجيومرية oligomeric من الاختراع الحالي، تشتمل النواقل المذكورة التي تعبر عن متوالية البولي نيوكليوتيد polynucleotide على واحدة أو أكثر من المتواليات من 1-12، 46 و 47 كما تم وصفه هنا. يعني مصطلح "ناقل vector " أو " بنية حمض نووي nucleic acid construct " جزيء بولي نيوكليوتيد ويفضل جزيء DNA مشتق، على سبيل المثال، من بلازميد، ملتهمة بكتيرية bacteriophage ، أو خميرة yeast أو فيروس virus الذي يمكن أن يتم به إدراج بولي نيوكليوتيد أو استنساخه. يفضل أن يشتمل الناقل على واحدة أو أكثر من مواضع التقييد الفريدة والتي تكون قادرة على الانتساخ المستقل في خلية عائلة محددة والتي تشتمل على خلية مستهدفة أو نسيج أو خلية سليفة أو نسيج منها أو تكون قابلة للدمج مع جينوم genome من عائل محدد مثل المتوالية التي تم انتساخها والقابلة لإعادة الإنتاج. ونتيجة لذلك فإن الناقل يمكن أن يكون عبارة عن ناقل انتساخ مستقل، أي، ناقل يوجد عند كيان كروموسوم chromosome زائد والذي يعمل على الانتساخ الذي يكون مستقلاً عن انتساخ الكروموسوم، على سبيل المثال، بالزميد دائري أو خطي مقفل أو عنصر كروموسومي زائد أو كروموسوم دقيق أو كروموسوم صناعي. يمكن أن يشتلم الناقل على أي وسيلة خاصة بضمان الانتساخ الذاتي. وعلى نحو بديل، فإن الناقل يمكن أن يكون واحد والذي عندما يتم إدخاله في خلية عائلة فإنه يتكامل بداخل الجينوم ويتم انتساخهما معاً باستخدام كروموسوم(كروموسومات) chromosome(s) والتي تم تكاملها بينهما.

تكون "معالجة" فرد (على سبيل المثال، يديي مثل بشري) أو خلية عبارة عن أي نوع من التدخل يتم استخدامه في محاولة لتغيير حالة طبيعية لفرد أو خلية. تشتمل المعالجة، على سبيل المثال لا الحصر على، إعطاء تركيبة صيدلانية ويمكن أن يتم إجراؤها إما بشكل وقائي أو تالية لبدء حدوث حالة مرضية أو في تلامس مع عامل وبائي. تشتمل المعالجة على أي تأثير مطلوب على الأعراض أو الصورة المرضية للمرض أو الحالة المرتبطة مع بروتين ديستروفين، في شكل صور معينة من الحثل العضلية والتي يمكن أن تشتمل، على سبيل المثال على التغييرات عد الحد الأدنى

لها أو التحسينات في واحد أو أكثر م المرقمات التي تم قياسها من المرض أو الحالة المراد معالجتها. تم أيضاً تضمين المعالجات "الوقائية" والتي يمكن أن يتم توجيهها إلى تقليل معدل التطور الخاص بالمرض أو الحالة المراد معالجتها، تأثير بداية المرض أو الحالة أو تقليل الشدة الخاصة ببدايته. لا تكتمل "المعالجة" أو "الوقاية" بالضرورة وتوضح الاستئصال الكامل أو الشفاء أو الوقاية م المرض أو الحالة أو الأعراض المرتبطة بها.

وبالتالي، تم تضمين طرق خاصة بمعالجة الحثل العضلي، مثل DMD و BMD بواسطة إعطاء واحد أو أكثر من أوليجيومرات مضادة للانتساخ من الاختراع الحالي (على سبيل المثال، متوالية رقم 1-12، 46 و 47 والصور المتغيرة منها) والتي تكون بشكل اختياري عبارة عن جزء من لاصيغة الصيدلانية أو صورة الجرعة لخاضع في حاجة لها. تم أيضاً تضمين طرق خاصة بحث تخطي الأكسون في خاضع من خلال إعطاء واحدة أو أكثر من أوليجيومرات مضادة لاتجاه النسخ والتي يكون فيها الأكسون exon عبارة عن أكسون 44 من جين ديستروفين، ويفضل جين ديستروفين بشري. وكما تم استخدامه هنا، فإن "خاضع" كما تم استخدامه هنا يشتمل على أي حيوان والذي يعرض عرض أو يكون في خطوة من ظهور عرض والذي يمكن معالجته باستخدام مركب مضاد للحس من الاختراع، مثل الخاضع الذي له خطورة أو يكون في خطورة من DMD أو BMD أو أي أعراض مرتبطة بها مع تلك الحالات (على سبيل المثال، فقط ألياف عضلية). يشتمل الخاضعين المناسبين (المرضى) على حيوانات المعمل (مثل الفأر، الجرذ، الأرنب والخنزير الغيني) وحيوانات المزرعة والحيوانات المنزلية أو الحيوانات الأليفة (مثل القط أو الكلب). تفضل الرئيسيات غير البشرية، على مرضى بشريين يتم تضمينهم.

يشير مصطلح "ألكيل Alkyl " أو " ألكيلين alkylene " لكل من شق هيدروكربون بسلسلة مستقيمة أو متفرعة مشبعة يشتمل على ما بين 1 إلى 18 ذرة كربون. تشتمل الأمثلة بدون حصر على ميثيل methyl ، إيثيل ethyl ، بروبيل propyl ، أيزو - بروبيل iso-propyl ، بيوتيل butyl ، أيزو - بيوتيل iso-butyl ، t- بيوتيل tert-butyl ، n- بنتيل n-pentyl و n-هيكسل n-hexyl.

يشير مصطلح "ألكيل صغير lower alkyl " على مجموعة ألكيل alkyl كما تم تحديده أعلاه والتي تشتمل علا ما بين 1 و8 ذرات كربون.

يشير مصطلح "ألكنيل Alkenyl " إلى شق هيدروكربون hydrocarbon بسلسلة متفرعة أو مستقيمة غير مشبعة يشتمل على ما بين 2 إلى 18 ذرة كربون وتشتمل على رابطة مزدوجة من ذرة كروبن واحدة إلى ذرة كربون. تشتمل الأمثلة بدون حصر على إيثنيل ethenyl ، بروبينيل propenyl ، أيزو – بروبينيل iso–propenyl ، بيوتينيل butenyl ، أيزو – بيوتينيل iso– butenyl ، t– بيوتينيل tert–butenyl ، n– بنتينيل n–pentenyl و n– هيكسينيل n– hexenyl . يشتمل المصطلح "ألكنيل صغير" على مجموعة ألكنيل، كما تم تعريفه هنا بين 2 و8 ذرات كربون.

يشير "ألكينيل" إلى سلسلة متفرعة أو سلسلة مستقيمة غير مشبعة من شق هيدروكربون بها من 2 إلى 18 ذرة كربون تشتمل على الأقل على رابطة ثلاثية من ذرة كربون إلى ذرة كربون. تشتمل الأمثلة بدون حصر على إيثنيل ، بروبينيل ، أيزو – بروبينيل ، بيوتينيل ، أيزو – بيوتينيل ، t– بيوتينيل ، بنتينيل و هيكسينيل. يشير المصطلح "ألكينيل صغير lower alkynyl " إلى مجموعة ألكينيل كما تم تعريفه هنا، والتي تشتمل بين 2 و8 ذرات كربون.

يشير مصطلح "سيكلو أليكل Cycloalkyl " إلى شق ألكيل حلقي أحادي أو متعدد. تشتمل الأمثلة بدون حصر على بدون حصر على سيكلو بيوتيل cyclobutyl ، سيكلو بنتيل cyclopentyl ، سيكلو هيكسل cyclohexyl ، سيكلو هيبتيل cycloheptyl و سيكلو أوكتيل cyclooctyl .

يشير "أريل Aryl " إلى جزيء هيدروكربون عطري من 18 ذرة كربون بها واحدة أو أكثر من الحلقات المقفلة. تشتمل الأمثلة بدون حصر، على فينيل phenyl ، بنزيل benzyl ، نافثيل naphthyl ، أنثراسينيل anthracenyl ، فينانثراسينيل phenanthracenyl وباي فينيل biphenyl.

يشير المصطلح "أرلكيل Aralkyl " على شق من الصيغة RaRb حيث تكون Ra عبارة عن سلسلة ألكيلين alkylene chain كما تم تعريفه أعلاه و Rb تكون عبارة عن واحدة أو اكثر من شقوق الأريل كما تم تحديه أعلاه، على سبيل المثال، بنزيل benzyl أو داي فينيل ميثيل diphenylmethyl وما شابه ذلك.

يشير مصطلح "ثيو ألكوكسي Thioalkoxy " إلى شق من الصيغة SRc– حيث تكون Rc عبارة عن شق ألكيل كما تم تعريفه هنا. يشير المصطحل " ثيو ألكوكسي صغير lower thioalkoxy " إلى مجموعة ألكوكسي كما تم تعريفها هنا والتي تشتمل بين 1 و8 ذرات كربون.

يشير "ألكوكسي Alkoxy " إلى شق من الصيغة ORda– حيث تكون Rd عبارة عن شق ألكيل كما تم تعريفه هنا. يشير المصطلح " ألوكسي صغير" إلى مجموعة ألكوكسي، كما تم تعريفها هنا والتي تشتمل على ما بين 1 و8 ذرات كربون. تشتمل أمثلة مجموعات ألكوكسي، بدون حصر على ميثوكسي methoxy وإيثوكسي ethoxy.

يشير مصطلح "ألكوكسي ألكيل Alkoxyalkyl " إلى مجموعات ألكيل بها استبدال بمجموعة ألوكسي alkoxy.

يشير "كربونيل Carbonyl " إلى شق C(=O) .

يشير مصطلح "جوانيدينيل Guanidynyl " إلى شق NH– H2N(C=NH2).

يشير مصطلح "أميدينيل Amidinyl " إلى شق H2N(C=NH2)CH.

يشير "أمينو Amino " إلى شق NH2.

يشير "ألكيل أمينو Alkylamino " إلى شق من الصيغة NHRd– أو NRdRd– حيث تكون كل Rd ، بشكل مستقبل عبارة عن شق ألكيل، كما تم تحديده هنا. يشير المصطلح "ألكيل أمينو "منخفض lower alkylamino " إلى مجموعة ألكيل أمينو، كما تم تحديده هنا، والذي يشتمل على ما بين 1 و 8 ذرات كربون.

يشير المصطلح "سيكليل غير متجانس Heterocycle " غلى حلقة بها من 5- إلى 7- ذرات حلقية أحادية أو 7- إلى 10 ذرات ثنائية الحلقة أو حلقة غير متجانسة والتي تكون إما عبارة عن حلقة مشبعة أو غير مشبعة أو عطرية والتي تشتمل على ما بين 1 إلى 4 ذرات غير متجانسة يتم اختيارها بشكل مستقل من نيتروجين nitrogen ، أكسجين oxygen وكبريت sulfur وحيث أن

النيتروجين والكبريت تكون عبارة عن ذرات غير متجانسة والتي يمكن أكسدتها بشكل اختياري وأن الذرة غير المتجانسة من الكربون يمكن أن تتم معالجتها بشكل رباعي والتي تشتمل على حلقة ثنائية والتي يكون بها أي من الحلقات غير المتجانسة السابقة والتي يتم دمجها مع حلقة بنزين. يمكن أني تم ربط الحلقة غير المتجانسة من خلال ذرة غير متجانسة أو ذرة كربون. تشتمل الحلقات غير المتجانسة على مركبات أريل غير متجانسة كما تم تحديده فيما يلي. وبالتالي وبالإضافة إلى مركبات الأريل غير المتجانسة التي تم توضيحها فيما يلي تشتمل حلقات غير متجانسة أيضاً على مورفولينيل morpholinyl ، بيروليديينونيل pyrrolidinonyl ، بيرو ليدينيل pyrrolidinyl ، وبيبريدينيل piperidinyl وبيبريزينيل piperizinyl ، وهيدانتونيل hydantoinyl وفاليرولاكتاميل valerolactamyl ، وأوكسيرانيل oxiranyl ، وأوكسيتانيل oxetanyl ، وتترا هيدرو فيورانيل tetrahydrofuranyl ، وتترا هيدرو بيرانيل tetrahydropyranyl ، تترا هيدرو بيريدينيل tetrahydropyridinyl ، تترا هيدرو ثيو فينيل tetrahydrothiophenyl ، تترا هيدرو ثيو بيرانيل tetrahydrothiopyranyl ، تترا هيدرو بيميدينيل tetrahydropyrimidinyl ، تتر ا هيدرو ثيو بيرانيل tetrahydrothiopyranyl ، وما شابه ذلك.

يشير المصطلح "أريل غير متجانس" على حلقة غير مجانسة عطرية بها من 5- إلى 10 ذرات وبها ذرة غير متجانسة واحدة على لأقل تم اختيارها من نيتروجين، أكسجين وكبريت وتشتمل على الأقل على ذرة كربون واحدة والتي تشتمل على كل من نظام حلقي أحادي- حلقي ثنائي. تكون مركبات الأريل غير المتجانسة التوضيحية عبارة عن بيريديل pyridyl ، فيوريل furyl ، بنزو فيورانيل benzofuranyl ، ثيو فينيل thiophenyl ، بنزو ثيو فينيل benzothiophenyl ، كينولينيل quinolinyl ، بيرولويل pyrrolyl ، إندوليل indolyl ، أوكسازوليل oxazolyl ، بنزو كسازوليل benzoxazolyl ، إيميداوليل imidazolyl ، بنز إيميداوليل benzimidazolyl ، ثيازوليل thiazolyl ، بنزو ثيازوليل benzothiazolyl ، أيزوكسازوليل isoxazolyl ، بيرازوليل pyrazolyl ، أيزو ثيازوليل isothiazolyl ، بيريدازينيل pyridazinyl ، بيريميدينيل pyrimidinyl ، بيرازينيل pyrazinyl ، ترايازينيل triazinyl ، سينولينيل cinnolinyl ، فثالازينيل phthalazinyl ، و كيونازولينيل quinazolinyl.

تشير مصطلحات "ألكيل به استبدال اختياري"، ألكنيل به استبدال اختياري"، "ألكوكسي به استبدال اختياري"، "ثيو ألكوكسي به استبدال اختياري"، "ألكيل أمينو به استبدال اختياري"، "ألكيل صغير به استبدال اختياري"، "ألكينيل صغير به استبدال اختياري"، و"ألكوكسي صغير به استبدال اختياري"، " ثيو ألكوكسي صغير به استبدال التياري" و" ألكيل أمنيو صغير به استبدال اختياري"، و "سيكليل غير متجانس به استبدال اختياري" الذي يشير إلى، عندما يكون به استبدال، إلى ذرة هيدروجين واحدة على الأقل يتم استبدالها باستخدام مجموعة استبدال. في حالة مجموعة استبدال من أوكسو (=O)، واثنين م ذرات الهيدروجين يتم استبدالها. في هذا السياق، تشتمل مجموعات الاستبدال على ديوتيريوم، ألكيل به استبدال اختياري، وألكنيل به استبدال اختياري، وألكينيل به استبدال اختياري، أريل به استبدال اختياري، سيكليل به اسبتدلا اختيار، وسيكلو ألكيل به استبدال اختياري، وهالوجين –CN، –ORx، NRxRy، NRxC(=O)Ry، NRxSO2Ry، NRxC(=O)NRxRy–، C(=O)Rx، C(=O)ORx، C(=O)NRxRy، SOmRx– و SOmNRxRy– حيث تكون m عبارة عن 0 ، 1 أو 2، وتكون Rx و Ry متشابه أو مختلفة وتكون بشكل مستقل عبارة عن هيدروجين، ألكيل به استبدال اختياري، ألكنيل به استبدال اختياري، وألكينيل به استبدال أختياري أو أريل به استبدال اختياري، ووعلى نحو اختياري، سيكلي غير متجانس أو سيكلو ألكيل به استبدال اختياري، ويكون بكل من ألكيل به استبدال اختياري المذكور ، أكليني لبه استبدال أختياري، وأيضا ألكيني لبه استبدال اختيار وأريل به استبدال اختياري، وسيكليل غير متجانس به استبدال اختياري وسيكلو ألكليل به استبدال أختياري والذي يمكن استبداله باستخدام واحدة أو أكثر من أوكسو oxo ، هالوجين halogen ، CN، ORx–، NRxRy، NRxC(=O)Ry, NRxSO2Ry, – NRxC(=O)NRxRy، C(=O)Rx، C(=O)ORx، C(=O)NRxRy، SOmRx– و SOmNRxRy .

تم عرض نظام التسمية الجزيئية لمضاد اتجاه النسخ ، وتم نشره بحيث يتم التمييز بين جزيئات مضادة لاتجاه النسخ مختلفة (انظر، Mann et al., (2002) J Gen Med 4, 644-654). تكون كل الأسماس المذكورة مرتبطة بشلك خاص عندما يكون هناك العديد من جزيئات مضاد للحس مختلفة وتم توجيهها كلها إلى نفس منطقة المستهدف كما هو موضح فيما يلي:

H#A/D(x:y).

يحدد السطر الأول الأنواع (على سبيل المثال، H: بشري، M: من القوارض C: من الكلاب). تشير "#" لعدد أكسون دسيتروفين dystrophin exon مستهدف. توضح " A/D " موضح شريحة مستهدف أو مانح عند البداية وعند نهاية الأكسون، على الترتيب. تمثل (x y) إحداثيات التدلين حي تكون "-" أو "+" موضحة لمتوالية إنترونية أو متوالية خارجية على الترتيب. على سبيل المثال، فإن A(-6+18) توضح أن هناك 6 قواعد على الأقل من الإنترون تسبق الإكسون المستهدف و الـ 18 قاعدة من الإكسون المستهدف. يكون موضح الحيز القريب عبارة عن مستقبل بحيث أن الإحداثيات يمكن أن يسبقها " A ". سوف تكون إحداثيات التلدين الموصوفة عند موضح شريحة المانح عبارة عن D(+2-18) حيث أن هناك على الأقل اثنين من قواعد الإكسون والـ 18 قاعدة من الإنترون مناظرة لموضع تلدين من جزيء مضاد للانتساخ. هناك إحداثيات تلدين إكسون كاملة والتي يمكن أن يتم تمثيلها من خلال (85+65 +) ، والتي تكون عبارة عن موضع بين النيوكليوتيد 65 و85 من بداية الأكسون.

II –أوليجيو نيوكليوتيدات Oligonucleotides عكس اتجاه النسخ

عندما يتم استهداف جزيء "جزيئات" مضاد للحس فيما يتعلق بمتوالية نيوكليوتيد تم تضمينها في شطر الأكسونات بداخل متواليات mRNA أولي، فإن الشطر الطبيعي للأكسون يمكن أن يتم تثبيته ويتم التسبب فيه من خلال آلية التشطير بواسطة إمرار إكسون مستهدف كامل من mRNA ناضج. في العديد من الجينات، فإن حذف الإكسون الكامل سوف يؤدي إلى إنتاج بروتين غير وظيفي خلال فقد نطاقات وظيفية مهمة أو إتلاف إطار القراءة. وعلى الرغم من ذلك وفي بعض البورتينات، من الممكن أن يتم تقليل البروتين من خلال حذف واحد أو أكثر من الأكسونات من داخل البروتين بدون إتلاف إطار القراءة وبدون التغيير الشديد للنشاط البيولوجي للبروتين. وعلى نحو نمطي فإن تلك البروتينات يكون لها دوراً هيكلياً و/أو تشتمل نطاقات وظيفية عند أطرافها. ينتج الحثل العضلي دوشين من تطفيرات تعيق تخليق متج جين ديستروفين وظيفي، وعلى نحو نمطي من خلال إتلاف إطار القراءة. يمكن أن تسمح الأوليجيو نيوكليوتيدات مضاد للحس التي تحث خروج الأكسون من المنطقة من جين ديستورفين المشتمل على تطفيرات بخلايا العضلة بأن تنتج ناتج نسخ لـ mRNA ناضج الذي يشفر بروتين ديستروفين وظيفي. لا يكون بروتين ديستروفين الناتج بالضرورة عبارة عن صورة "من النوع غير المعالج" من ديستروفين ولكن عبارة

عن جزء مقطوع، وأيضاً وظيفي أو شبه وظيفي يشكل ديستروفين. يصف الاختراع الحالي جزيئات مضاد للحس قادرة على ربط ديستروفين محدد مع مستهدفات mRNA أولية في إكسون 44 ومعالجة إعادة توجيه من الجين المذكور.

بصفة خاصة ، يتعلق الاختراع بأوليجيونيوكليوتيد معزول مضاد للحس من 20 إلى 50 نيوكليوتيد في الطول، بما في ذلك على الأقل 10، 12، 15، 17، 20 أو أكثر، من النيوكليوتيدات المتممة المتعاقبة إلى منطقة مستهدفة لأكسون 44 من جين ديستروفين تم تحديده في شكل موضع تلدين تم اختياره مما يلي H44A :(-07+17)، H44A(-07+20)، H44A(-07+22)، H44A(-8+15)، H44A(-7+15)، H44A(-6+15)، H44A(-8+17)، H44A(-6+17)، H44A(+77+101)، H44A(+64+91)، H44A(+62+89)، H44A(+62+85)، H44A(-13+14)، H44A(-14+15). أوليجيونيوكليوتيد مضاد للحس يتم تهجينها بشكل خاص إلى موضع التلدين ، لحث تخطي أكسون 44 .

تكون أوليجيونيوكليوتيدات مضاد للحس لـ RNA مستهدفة متممة لبعضها لابعض عندما يكون هناك عدد كاف من التركيبات الناظرة في كل جزيء تم شغله بواسطة نيوكليوتيدات والتي يمكن أن تكون رابطة هيدروجين مع كل منها بحيث أنه وعندما يكون هناك ربط خاص يحدث بين الأوليجيونيوكليوتيد بين أوليجيونيوكليوتيد والمستهدف. وبالتالي فإن "قابلية التهجين بشكل خاص" و "التتميم" تشير إلى مصطلحات والتي يتم استخدامها لتوضيح دركة كافية من التتميم أو إزدواج دقيق بحيث تكون ثابتة وتكون خاصة بربط معين يحدث بين الأوليجيونيوكليوتيد والمستهدف. من المفهوم في المجال أن المتوالي تكون عبارة عن جزيء مضاد لعكس اتجاه النسخ والتي لا تحتاج لـ 100٪ من التتميم الخاص بمتوالية مستهدفة التي تكون قابلة للتهجين بشكل خاص. يكون جزيء مضاد للحس قابل للتهجين بشكل خاص عندما يكون هناك ربط أوليجيونيوكليوتيد مع جزيء مستهدف يتداخل مع وظيفة طبيعية من RNA مستهدف، ويكون ذلك بدرجة كافية للتميم بحيث يتم تجنب الارتباط غير النوعي من أوليجيونيوكليوتيد مضاد للحس لمتواليا غير مستهدفة تحت ظروف يكون الارتباط المعين مطلوباً فيها، أي، تحت الظروف الفسيولوجية في حالة الاختبارات في المعمل أو المعالجة العلاجية في حالة الاختبارات في المعمل، تحت ظروف يتم فيها إجراء الاختبارات. يمكن أن يكون الطول والجزيء متنوع بحيث يكون طويلاً وقادراً للارتباط على نحو

انتقائي مع موضع مقصود مع جزيء mRNA أولي. يتم تحديد طول تلك المتواليات طبقاً لإجراءات الانتقاء تم وصفها هنا. بصفة عامة، فإن الجزيء مضاد للحس يمكن أن يكون من حوالي 10 نيوكليوتيدات في الطول إلى حوالي 50 نيوكليوتيد في الطول. وعلى الرغم من ذلك سوف يتم إدراك أن أي طول من النيوكليوتيدات يكون في المدى المذكور وتم استخدامه في الطريقة. يفضل أن يكون طول جزيء عكس اتجاه النسخ بين 10-30 نيوكليوتيد في الطول.

في أحد النماذج، تكون الأوليجيو نيوكليوتيدات من الاختراع بطول من 20 إلى 50 نيوكليوتيد في الطول و تشتمل على على الأقل 10، 12، 15، 17، 20 أو أكثر، نيوكليوتيد من أيٍ من المتوالية رقم: 1-12، 46، و 47. في بعض النماذج، ثيمين قواعد في المتوالية رقم: 1-12، 46، و 47 تكون بشكل خاص عبارة عن يوراسيل .

يمكن أن لا يؤدي حذف الأكسون على إزاحة إطار القراءة في mRNA تم انتساخه قصير. وبالتالي كان هناك متوالية خطية من ثلاثة أكسونات فإن الطرف الخاص بالأكسون الأول يشفر اثنين من ثلاثة في الكودون والإكسون التالي يتم حذفه وبعد ذلك فإن الأكسون الثالث في المتوالية الخطية يجب أن يبدأ مع نيوكليوتيد منفرد والذي يكون قادراً على إكتمال ثلاثية نيوكليوتيد خاصة بالكودون. وإذا لم يبدأ الكودون الثالث مع نيوكليوتيد منفرد فإن هناك إزاحة خاصة بإطار القراءة التي تؤدي إلى إنشاء برتين مقطوع أو غير وظيفي.

سوف يتم إدراك أن تجيهزات الكودون عند نهاية الأكسونات في بروتينات هيكلية والتي لا تنكسر دائماً عند نهاية الكودودة، وبالتالي فيكون هناك حاجة لحذف أكثر من كودون واحد من mRNA أولي، والذي يضمن القراءة في الإطار من mRNA. في مثل تلك الحالات، فإن هناك مجموعة من الأوليجيو نيوكليوتيدات المضادة لاتجاه النسخ التي يمكن أن تكون في حاجة تم اختيارها من خلال طريقة الاختراع حيث أن كل منها يتم توجيهها إلى منطقة مختلفة مسئولة عن حث الربط في أكسونات وتكون قابلة للحذف.

في بعض النماذج، فإن الأوليجيونيوكليوتيدات التي مضاد للحس يكون لها تركيبة كيميائية من جزيء حمض نووي يحدث بشكل طبيعي، أي، أوليجيونيوكليوتيدات مضاد للحس والتي لا تشتمل على قاعدة مت تعديلها أو قاعدة بها استبدال، سكر أو روابط بين الوحدات الصغيرة. في نموذج

مفضل، فإن الأوليجيو نيوكليوتيدات مضاد للحس من الاختراع الحالين لا تكون جزيئات حمض نووي تحدث بشكل طبيعي. على سبيل المثال، فإن الأحماض النووية التي لا تحدث بشكل طبيعي تشتمل على واحدة أو اكثر من قواعد غير طبيعية، سكر و/أو رابطة في وحدة فرعية، على سبيل المثال، قاعدة، سكر، و/أو رابطة التي تم تعديلها أو استبدالها فيما يتعلق بما هو موجود في جزيء الحمض النووي الذي يحدث بشكل طبيعي. تم فيما يلي وصف التعديلات التوضيحية. في بعض النماذج، فإن الأحماض النووية التي لا تحدث بشكل طبيعي تشتمل على واحد أو أكثر من أنواع التعديلات، على سبيل المثال، تعديلات سكر وتعديلات قاعدة وسكر وتعديلات رابطة وقاعدة وتعديلات رابطة أو قاعدة، سكر، وتعديلات رابطة. على سبيل المثال، في بعض النماذج، فإن الأوليجيو نيوكلوتيدات مضاد للحس تشتمل على قاعدة غير طبيعية (على سبيل المثال، تم تعديلها أو استبدالها بـ) قاعدة. في بعض النماذج، فإن الأوليجيونيوكليوتيدات مضاد للحس تشتمل على سكر (غير طبيعي (على سبيل المثال، معدل أو به استبدال). في بعض النماذج، فإن أوليجيونيوكليوتيدات مضاد للحس تشتمل على رابطة بداخل الوحدات غير طبيعية (على سبيل المثال، معدلة، أو بها استبدال). في بعض النماذج، فإن الأوليجيونيوكليوتيدات تشتمل على واحد أو أكثر من التعديلات أو الاستبدالات، على سبيل المثال، قاعدة غير طبيعية و/أو سطر غير طبيعي و/أو رابطة بداخل الوحدات غير طبيعية.

لكي يتم تجنب التحلل، فإن mRNA الأولي أثناء تشكيل المزدوج باستخدام جزيئات مضاد للحس، وجزيئات مضاد للحس يمكن تهيئتها لتقليل أو منع الانشطار بواسطة RNase H داخلي المنشأ. تكون تلك الخاصية مفضلة بشكل عال مثلما هو الحال مع المعالجة بـ RNA وباستخدام أولجيونيوكليوتيدات غير معالجة بميثيل إما بداخل الخلايا أو في مستخلصات خام والتي تشتمل على RNase H التي تؤدي إلى تحلل mRNA أوليّ: صور مزدوجة من أوليجيونيوكليوتيد مضاد للحس. يمكن استخدام أي صورة من جزيء مضاد للحس معدل والذي يكون قادراً على التمرير أو لا يحدث التحلل المذكور والذي يتم استخدامه في الطريقة الحالية. لا يتم انشطار مثال من جزيئات مضاد للحس والتي عندما تكون في صورة مزدوجة مع RNA لا يتم اشنطارها باستخدام RNase H خلوي والذي يكون عبارة عن مشتق '2- O –ميثيل 2'-O-methyl. تكون أوليجيونيوكليوتيدات 2 '- O –ميثيل 2'-O-methyl-oligoribonucleotides ثابتة جداً في

الوسط الخلوي cellular environment وفي الأنسجة الحيوانية والصور المزدوجة منها مع RNA التي لها قيم Tm أعلى بالمقارنة مع ريبو -ribo أو صور عكسية من دي اوكسي ريبو-deoxyribo-. تكون المعالجة بالميثيل لموضع 2 ' هيدروكسي ريبوز 2' hydroxyribose والتضمين الخاص بفسفورو ثيوات phosphorothioate اساسي عبارة عن استراتيجية مشتركة خاصة بجزيئات إنتاج والتي يتم إعادة تجميعها عند السطح من RNA ولكن يكون له مقومة أكبر فيما يتعلق بتحلل النيوكلياز nuclease.

يمكن تحضير جزيئات مضاد للحس لا تنشط RNase H طبقاً لتقنيات معروفة (انظر، على سبيل المثال البراءة الأمريكية رقم 5149797). تكون جزيئات مضاد للحس المذكورة بعبارة عن متواليات دي أوكسي ريبو نيوكليوتيد deoxyribonucleotide أو ريبو نيوكليوتيد ribonucleotide التي تشتمل بشكل مبطس على تعديل هيكلي والذي يتم إعاقته بشكل فراغي أو يتم منع ربطه مع RNase H لجزيئات مزدوجة تشتمل على نيوكليوتيدات مثل عضو منه والذي يكون له تديل هيكلي لا يعيق إلى حد كبير أو يتلف التكوين المزدوج. وبسبب تضمين أجزاء من الأوليجيونيوكليوتيدات في التكوين المزدوج والتي تكون مختلفة إلى حد كبير عن البروتينات المذكورة في ربط RNase H منه فإن جزيئات في عكس النسخ من الأعصاب لا تنشط RNase H المتاح. على سبيل المثال، فإن جزيئات مضاد للحس يمكن أن تكون عبارة عن أوليجيو نيوكليوتيدات حيث أن واحد على الأقل أو كل الوحدات البنائية من الفوسفات الرابطة لنيوكليوتيد داخلي عبارة عن فوسفات معدلة، مثل ميثيل فسوفونات methyl phosphonates ، وميثيل فوسفورو ثيوات methyl phosphorothioates ، وفسفورو مورفو ليدات phosphoromorpholidates ، وفوسفورو بيبرازيدات phosphoropiperazidates وفسفواروراميدات phosphoramidates. على سبيل المثال، فإن كل من الوحدات البنائية من الفوسفات الرابطة لنيوكليوتيد داخلي يمكن أن يتم تعديلها كما تم وصفه. في مثال غير حصري آخر، فإن الجزيئات مضاد للحس تكون عبارة عن جزيئات حيث أن هناك واحد على الأقل أو كل النيوكليوتيدات المشتملة على '2 من أجزاء ألكيل الصغير (على سبيل المثال، C1-C4 ، ألكيل خطي أو متفرع أو مشبع أو غير مشبع مثل ميثيل methyl ، إيثيل ethyl ، إيثينيل ethenyl ، بروبيل propyl ، 1- بروبينيل 1-propenyl ، 2- بروبينيل 2-propenyl ، وأيزو بروبيل

isopropyl). على سبيل المثال، فإن كل واحدة من النيوكليوتيدات يمكن أن يتم تعديلها كما تم وصفه هنا.

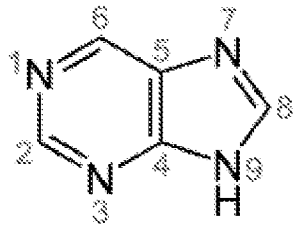
تكون الأمثلة المعينة من أوليجيو نيوكليوتيدات مضاد للحس مفيدة في الاختراع الحالي وتشتمل على أوليجيو نيوكليوتيدات التي تشتمل على أجزاء أساسية معدلة أو روابط بداخل أجزاء فرعية بداخل الوحدات غير طبيعية. يكون للأوليجيو نيوكليوتيدات صور معدلة والتي تشتمل على تلك التي تحتفظ بذرة فسفور في الجزء الأساسي وتلك التي لا يكون بها ذرة فسفور في الصورة الأساسية. يمكن الأخذ في الاعتبار لأوليجيونيوكليوتيدات التي لا يكون بها ذرة فسفور في أي من الجزء الأساسي الداخلي للنيوكليوتيد والذي يمن أخذه في الاعتبار بأنه أوليجيو نيوكليوتيدات.

في جزيئات مضاد للحس الأخرى، فإن كل من الروابط السكرية وروباط النيوكليوتيد الداخلي، أي، الصورة الأصلية من وحدات النيوكليوتيد يتم استبدالها باستخدام مجموعات جديدة. يتم الحفاظ على الوحدات الأساسية فيما يتلعق بالتهجين باستخدام مركب يستهدف حمض نووي مناسب. يكون واحد أو أكثر من المركب الأوليجيومري المذكور عبارة عن محاكي أوليجيونيوكليوتيد والذي تم توضيح أنه به خصائص تهجين جيدة ويطلق عليها حمض نووي ببتيدي peptide nucleic acid (PNA). في أحد المركبات فإن المركبات PNA ، والصورة الأساسية من السكر من الأوليجيونيوكليوتيدات يتم استبدالها باستخدام صورة أساسية تشتمل على الميد وعلى نحو خاص صورة أساسية من أمينو إيثيل جلايسين. تكون قواعد النيوكليوتيد قد تم الحفاظ عليها مرتبطة بشكل مباشر أو بشكل غير مباشر مع ذرات نيتروجين آزا من جزء أميد من الصورة الأصلية.

يمكن أن تشتمل الأوليجيو نيوكليوتيدات على واحدة أو أكثر من الأجزاء السكرية التي بها استبدال.

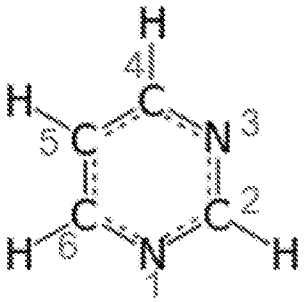
يمكن أن تشتمل الأوليجيونيوكليوتيدات على تعديلات قواعد نيوكليوتيد (التي يتم غليها في الغالب في المجال ببساطة "قاعدة") أو استبدالات. تشتمل الأوليجيو نيوكليوتيدات المشتملة على قاعدة معدلة أو قاعدة بها استبدال على أوليجيو نيوكليوتيدات والتي تكون بها واحدة أو أكثر من البيورين أو قواعد البريميدين موجودة بكشل عام في أحماض نووية والتي يتم استبدالها على نحو أقل انتشارا أو قواعد غير طبيعية.

تشتمل قواعد البيورتين على حلقة بريميدين يتم دمجها مع حلقة إيميدازول imidazole ring كما تم وصفه من خلال الصيغة العامة التالية:



بيورين

يكون الأدينين والجوانين عبارة عن اثنين من القواعد الخاصة بنيوكليوتيد بيورين والتي تكون موجودة في الغالب في أحماض نووية. يمكن أن تكون تلك القواعد بها اسبتدلا بواسطة مركبات بيورين موجودة بشكل طبيعي والتي تشتمل على N6 - ميثيل أدينين N6-methyladenine ، N2-ميثيل جوانين N2-methylguanine ، وهيبوكسنثين hypoxanthine و7- ميثيل جوانين 7-methylguanine. تشتمل قاعدة بيريميدة على حلقة بيريميدين pyrimidines بها سبعة أعضاء كما تم وصفه من خلال الصيغة العامة التالية:



بيريميدين

يكون سيتوسين Cytosine ، يوراسيل uracil وثيميدين thymine عبارة عن قواد بيريميدين pyrimidine الموجودة في الغالب في الأحماض النووية nucleic acids. يمكن أن تكون تلك المركبات بها استبدال مع مركبات بيريميدين تحدث بشكل طبيعي أخرى ولاتي تشتمل، على سبي المثال وليس الحصر، 5-ميثيل سيتوسين 5-methylcytosine ، 5- هيدروكسي ميثيل سيتوسين 5-hydroxymethylcytosine ، ويوراسيل pseudouracil غير حقيقي و 4- ثيو

يوراسيل 4-thiouracil. في أحد النماذج فإن الأوليجيو نيوكليوتيدات oligonucleotides التي تم وصفها هنا تشتمل على قواعد ثيميدين thymine في مكان اليوراسيل uracil.

تشتمل القواعد المعدلة او القواعد التي بها استبدال، على سبيل المثال لا الحصر على، 2، 6- دأي أمينو بيورين 2,6-diaminopurine ، حمض أوروتيك orotic acid ، أماتيدين agmatidine ، لايسيدين lysidine ، 2- ثيو بيريميدين 2-thiopyrimidine (على سبيل المثال، 2- ثيو يوراسيل 2-thiouracil ، 2- ثيوثيمين 2-thiothymine) G -كلامب- G clamp والمشتقات الخاصة بها و5- بيريميدين 5-pyrimidine بها استبدال (على سبيل المثال، 5- هالو يوراسيل 5-halouracil ، 5- بيروبينيل يوراسيل 5-propynyluracil ، 5- بروبينيل سيتوسين 5-propynylcytosine ، 5- أمينو ميثيل يورساسيل 5-aminomethyluracil ، 5- هيدروكسي ميثيل يوراسيل 5-hydroxymethyluracil ، 5- أمينو ميثيل سيتوسين 5-aminomethylcytosine ، 5- هيدروكسي ميثيل سيتوسين 5-hydroxymethylcytosine ، T فائق)، 7- دي آزا جوانين 7-deazaguanine ، 7- دي آزا أدينين 7-deazaadenine ، 7 – آزا، -2، 6- ديا أمين بيورين 7-aza-2,6-diaminopurine ، 8- آزا-7- دي أزا جوانين 8-aza-7-deazaguanine ، 8- آزا -7- دي أزا أدينين 8-aza-7-deazaadenine ، ، 8- آزا -7-دي آزاا -2، 6- داي أمينو بيورين 8-aza-7-deaza-2,6-diaminopurine ، G فائق، و A فائق و N4 – إيثيل سيتوسن N4-ethylcytosine ، أو مشتقات منها؛ N2 -سيكلو بنتيل جواني N2-cyclopentylguanine (cPent-G)، N2-سيكلو بنتيل-2-أمينو بيورين N2-cyclopentyl-2-aminopurine (cPent-AP) و N2-بروبيل-2- أمينو بيورين N2-propyl-2-aminopurine (Pr-AP)، أو مشتقات منها؛ وقواعد متحللة أو قواد أساسية مثل 2، 6- دي فلورو تولوين 2,6-difluorotoluene أو قواغ غير موجودة مثل مواضع غير أساسية (على سبيل المثال، 1- ديو أوكسي ريبوز 1-deoxyribose ، 1، 2- داي أوكسي ريبوز 1,2-dideoxyribose ، 1- ديو أوكسي -2- O -ميثيل ريبوز -l deoxy-2-O-methylribose ؛ أو بيروليدين pyrrolidine أو مشتقات منها والتي يكون بها أكسجين oxygen حلقيه تم استبداله باستخدام نيتروجين nitrogen (آزا ريبوز azaribose)).

تكون أملة مشتقات من A فائق، G فائق، و T فائق في البراءة لأمريكية رقم 6683173 (Epoch Biosciences)، والذي تم تضمينه هناك كمرجع بكامله، cPent-G، cPent-AP ، Pr-AP والذي تم توضيح أو يقلل من التأثيرات الحاثة للمناعة عندما يتم تضمينه في siRNA (Peacock H. et al. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 9200). يكون اليوراسيل الكاذب Pseudouracil عبارة عن نسخة أيزومرية isomerized معالجة بشكل طبيعي من اليوراسيل مع C – جلايكوسيد C-glycoside خلاف N – جليكوسيد N-glycoside منتظم في يوريدين uridine. يمكن أن يكون mRNA التخليقي المشتمل على يوريدين كاذب Pseudouridine له خصائص سلامة محسنة بالمقارنة مع mPvNA يشتمل على يوريدين (الطلب الدولي رقم 127230/2009 الذي تم تضمينه هنا بكامله كمرجع).

تكون قواعد نيوكليوتيد معدلة أو بها استبدال معينة مفيدة بشكل خاص فيما يتعلق بألفة الربط المتزايدة الخاصة باوليجونيوكليوتيدات مضاد للحس من الاختراع. تشتمل تلك المركبات على مركبات 5-بيريميدين pyrimidines -5 بها استبدال، 6- زأ بيريميدين azapyrimidines-6 و N -2 ، N -6، و O -6 O-6 بها استبدال من مركبات بيورين purines والتي تشتمل على 2- أمين بروبيلي أدينين 2-aminopropyladenine ، 5- بربينيل يروساسيل -5 propynyluracil و 5- بروبينيل سيتوسين 5-propynylcytosine. تم توضيح استبدالات 5- ميثيل سيتوسين 5-methylcytosine لزيادة الصورة المزدوجة النووية الخاصة بالثبات بمقدار 0.6- 1.2 م والتي تكون موجودة من استبدالات قاعدة مفضلة والتي تكون مفضلة بشكل أكبر عند دمجها مع تعديلات سكر من 2'- O – ميثوكسي إيثيل 2'-O-methoxyethyl.

في بعض النماذج، فإن قواعد نيكلو المعدلة أو التي بها استبدال تكون مفيدة في تسهيل تنقية الأوليجيونيوكليوتيدات مضاد للحس والتي تشتمل على ثلاثة أو أكثر (على سبيل المثال، 3، 4، 5، 6 أو أكثر) من قواعد جوانيني أساسية. في أوليجيونيوكليوتيدات مضاد للحس معينة، فإن هناك حلقة من ثلاثة أو أكثر من قواعد الجوانين guanine bases المتعاقبة ينتج عنها تكتل للأوليجيو نيوكليوتيدات، وتعقيد التنقية. في أوليجيونيوكليوتيدات مضاد للحس فإن واحد أو أكثر من مركبات الجوانين المتتابعة يمكن أن يكون به استبدال باستخدام إينوسين inosine. إن استبدال أينوسين

inosine لواحد أو أكثر من مركبات جوانين في السلسلة من ثلاثة أو أكثر من قواعد جوانين يمكن أن تقلل الارتباط الخاص بأوليجيو نيوكليوتيدات مضاد للحس وبالتالي تسهيل التنقية.

في أحد النماذج، يشتمل تعديل آخر من الاختراع الحالي على أوليجيونيوكليوتيدات مضاد للحس الذي يشتمل على الارتباط الكيميائي بأوليجيونيوكليوتيد مع واحد أو أكثر من الأجزاء أو المترافقات التي تحسن الفعالية، التوزيع الخلوي أو الامتصاص الخلوية لأوليجيونيوكليوتيد. تشتمل مثل تلك الأجزاء على سبيل المثال لا الحصر على أجزاء شحم مثل جزء الكوليستيرول cholesterol moiety ، حمض كوليك cholic acid وثيو إيثر thioether ، على سبيل المثال، هيكسيل – 5– تراي تيلثيول hexyl–5–tritylthiol ، ثيو كولييستيرول thiocholesterol وسلسلة أليفاتية aliphatic chain ، على سبيل المثال، دوديكان دايول dodecandiol أو وحدات بنائية من أنديسيل undecyl وفوسفو شحمي phospholipid ، على سبيل المثال، داي –هيكا ديسيل – rac – جليسيررول di–hexadecyl–rac–glycerol أو تراي إيثيل أمنيومو، 1، 2– داي – O – هيكسا ديسيل – rac –جليسيرول–3– H –فوسفونات 1,2–di–O– triethylammonium hexadecyl–rac–glycero–3–H–phosphonate ، وبولي أمين polyamine أو سلسلة بروبيل إيثيلين جليكول polyethylene glycol chain أوحمض أسيتيك أدمانتان adamantane acetic acid ، جزيء بالميتيل palmityl moiety ، أو أوكتا ديسيل أمين octadecylamine أو جزء هيكسي أمينو –كربونيل– أوكسي كوليستيرول hexylamino– carbonyl–oxycholesterol moiety.

من غير الضروري لكل المواضع في مركب معين أن يتم التعديل المنتظم، وفي الواقع أكثر م التعديلات التي تم ذكرها أعلاه والتي يمكن أن يتم تضمينها في مركب منفرد واحد أو حتى نيوكليوتيد منفرد مع أوليجيونيوكليوتيد. يشتمل الاختراع الحالي أيضاً على أوليجيونيوكليوتيدات مضاد للحس والذي يكون عبارة عن مركبات خيمرية. تكون المركبات "الخميرية" مضاد للحس أو " الصور الخميرية"، في هذا السياق من الاختراع، عبارة عن جزيئات مضاد للحس، وعلى نحو خاص أوليجيونيوكليوتيدات والتي تشتمل على أثنين أو اكثر من المناطق التي تم تمييزها بشكل كيميائي يتم تحضير كل منها عند وحدة مونومر واحدة على الأقل، أي، نيوكليوتيد في حالة مركب أوليجيونيوكليوتيد. تشتمل الأوليجيونيوكليوتيدات بشكل نمطي على منطقة واحدة على الأقل حيث

يتم تعديل الأوليجيونيوكليوتيد بحيث يتم منح مقاومة زائدة لتحلل النيوكلياز والامتصاص الخلوي ومطقة الإضافة الخاصة بألفة الارتباط المتزايدة الخاصة بحمض نووي مستهدف.

يمكن أن تكون الجزيئات مضاد للحس المستخدمة طبقاً للاختراع بشكل نمطي أو بشكل روتيني خلال تقنية معروفة بشكل جيد من تخليق الطور الصلب. يتم بيع الجهاز الخاص بهذا التخليق عند عدة مصادر بيع والتي تشتمل، على سبيل المثال على، Applied Biosystems (Foster City, Calif.). تم وصف إحدى الطرق الخاصة بتخليق أوليجيونيوكليوتيد على مادة صلبة معدلة في الطلب الدولي رقم 4458066.

يمكن استخدام أي من الوسائل الخاصة بالتخليق المعروف في المجال بشكل إضافي أو على نحو بديل. سوف يكون من المعروف استخدام تقنيات مشابهة لتحضير أوليجيونيوكليوتيدات مثل فوسفورو ثيواتومشتقات معالجة بألكيل. في أحد النماذج المعالجة المذكورة فإن داي إيثيل فسوفراميدات يتم استخدامها في شكل مواد بدء ويمكن أن يتم تخليقها ما تم وصفه بواسطة by Beaucage, et al., (1981) Tetrahedron Letters, 22:1859-1862.

يتم تخليق جزيئات مضاد للحس من الاختراع في المعمل ولا تشتمل على تركيبات مضادة لاتجاه النسخ من أصل بيولوجي. يمكن أن يتم خلط جزيئات الاختراع، ويمكن كبسلتها وترافقها أو ربطها مع جزيئات أخرى أو بنيات جزيئية أو خلائط من المركبات، مثل، على سبيل المثال، جسيمات أو جزيئات مستهدفة لمستقبل أو صيغ تؤخذ عن طريق الفم أو المستقيم أو بشكل موضعي أو أي صور أخرى للمصاعدة في الامتصاص و/أو التوزيع والامتصاص.

أ- أوليجيومرات مورفولينو Morpholino Oligomers

تتعلق نماذج توضيحية من الاختراع بأوليجيومرات مورفولينو والتي لها روابط أصلية تشتمل على فسفور والتي تم توضيحها في الأشكال 1أ-1ج. في أحد النماذج فإن فسفورو داي أميدات- المرتبطة مع أوليجيومر مورفولينو مثلما هو موضح في الشكل رقم 1ج، والذي يتم تعديله، طبقاً لواحدة من سمات الاختراع لكي يتم تشمين مجموعات مشحونة بشكل موجب ويفضل عند 10-50٪ من الروابط الأساسية لها. تشتلم أوليجيومرات مورفولينو مع روابط أساسية على أوليجيومرات مضاد للحس والتي تم توضيح تفاصيل لها على سبيل المثال، في (Summerton and Weller

1997) وفي البراءات الأمريكية المملوكة بشكل مشترك أرقام 5698685، 5217866، 5142047، 5034506، 5166315، 5185444، 5521063، 5506337، 8076476، 8299206 ،7943762 وقد تم التعبير على كل منها وتم تضمينها هنا كمرجع بكاملها. سوف يتم تعديل أوليجيومرات مورفولينو باستخدام روباط معدلة تشتمل على روابط مشحونة والتي توجد في الطلب رقم 118,298/13 (تم تضمينها هنا كمرجع).تشتمل الخصائص الهامة من وحدات فرعية تعتمد على مورفولينو على: 1) القدرة على الارتباط في صورة أوليجيومرية من خلال روابط أساسية غير ثابتة وغير مشحونة أو روابط أساسية مشحونة بشكل موجب؛ 2) القدرة على حمل قاعدة نيوكليوتيد (على سبيل المثال، أدينين adenine، سيتوسن cytosineand ، جوانين guanine، ثيميدين thymidine ، يوراسيل uracil وأينوسين inosine) بحيث أن البوليمر الذي تم تشكيله يمكن تهجينه باستخدام حمض نووي مستهدف لقاعدة متممة والتي تشتمل على RNA مستهدف، وقيم Tm أعلى من حوالي 45 م في أوليجيو نيوكليوتيدات قصيرة (على سبيل المثال، 10–15 قاعدة)؛ 3) القدرة على نقل الأوليجيونيوكليوتيد بشكل فعال أو على نحو سلبي بداخل خلايا ثديية ؛ و4) القدرة على وضع الأوليجيونيوكليوتيد المضاد للحس: مزدوج لـ RNA لكي يتم مقاومة تحلل RNAse و RNase H ، على الترتيب.

تشتلم البنيات الأساسية التوضيحية الخاصة بأوليجيونيوكليوتيدات من المادة المذكورة التي تمت حايتها على أنوع وحدة فرعية من مروفولينو موضعة في الأشكال من 1د– ز، يتم ربط كل منها من خلال رابطة غير مشحونة أو رابطة مشحونة بشكل موجب أو رابطة فرعية تشتمل على فسفور. يوضح الشكل رقم 1د، رابطة تشتمل على فسفور والتي تشكل خمسة ذرات من وحدة أساسية متكررة حيث أن حلقات المورفولينو تم ربطها بواسطة رابطة 1–ذرة من فوسفو أميد phosphoamide. يوضح الشكل رقم 1هـ الرابطة التي تنتج وحدة أساسية من 6– ذرات. في تلك البنية، فإن الذرة الرابطة من Y وكربون مروفولينو 5' لمجموعة الفسفور يمكن أن تكون عبارة عن كبريت، نيتروجين أو كربون أو يفضل أكسجين. يمكن أن يكون جزء X محلق من الفسفور والذي يمكن أن يكون عبارة عن فلور، ألكيل، أو أكليل به استبدال أو ألكوكسي أو ألكوكسي به استبدال أو ثيو ألكوكسي thioalkoxy أو ثيو ألكوكسي به استبدال أو نيتروجين ليس به استبدال، أو به استبدال أحادي أو نيتروجين به استبدال ثنائي والذي يشتمل على بنيات حلقية مثل مركبات

مركبات مورفولين أو مركبات بيبريدين. يفضل أن يشتمل ألكيل أو ألكوكسي وثيو ألكوكسي على 1-6 ذرات كربون. تكون أجزاء Z عبارة عن كبريت أو أكسجين ويفضل أن تكون أكسجين.

يتم تصميم الروابط المفضلة في الأشكال من 1 و ، 1 ز فيما يتعلق بتصميم وحدة من 7- ذرات في الطول من الصورة الأساسية. في البنية 1 و، فإن جزء X يكون كما هو موجود في البنية 1 هـ، و الجزء Y يمكن أن يكون ميثيلين methylene ، كبريت، ويفضل أكسجين. في البنية 1ز، فإن أجزاء X و Y تكون كما هي في البنية وعلى نحو خاص فإن الأوليجيو نيوكليوتيدات المفضلة من مورفولينو تشتمل على تلك التي تم تكوينها من بنيات وحدة فرعية من المورفولينو من الصورة الموضحة في الشكل رقم 1هـ، حيث تكون X=NH2، N(CH3)2 أو 1- بيبرازين -1 piperazine أو أي مجموعة مشحونة أخرى، Y=O, و Z=O .

يمكن أن يتم تعديل الأوليجيونيوكليوتيد غير المشحون وتعديله طبقاً لسمة من الاختراع لكي يشتلم على روابط مشحونة، على سبيل المثال، ما يصل لحوالي 1 لكل 2-5 روابط غير مشحونة مثل، 4-5 كل 10 من الروابط غير المشحونة. في نماذج معينة فإن التحسينات في النشاط يمكن أن تتم رؤيته عندما يكون هناك حوالي 25٪ من الروابطة الأساسية عبارة عن روابط كاتيونية cationic. في نماذج معينة، فإن التحسين يمكن أن تتم رؤيته في عدد صغير، على سبيل امثال، من 10-20 من الروابط الكاتيونية ، أو حيث أن عدد الروابط الكاتيونية في المدى من 50-80٪ مثل 60٪.

تم توفير أوليجيومرات لها عدد من الروابط الكاتيونية والتي تشتمل على أوليجيومرات مرتبطة على نحو كاتيوني. على الرغم من ذلك يفضل أن تكون الأوليجيومرات مشحونة بشكل جزئي والتي لها على سبيل المثال، ، 10٪-80٪. في نماذج مفضلة ، حوالي 10٪ إلى 60٪، و يفضل 20٪ إلى 50٪ من الروابط التي تكون كاتيونية.

في أحد النماذج فإن الروابط الكاتيونية يتم إدخالها بطول الصورة الأساسية. يفضل أن تشتمل الأوليجيومرات المشحونة بشكل جزئي على الأقل على اثنين من الروابط غير المشحونة المتعاقبة ؛ حيث يفضل أن لا يشتمل الأوليجيومر على نمطي بديل بطول على كامل طوله.

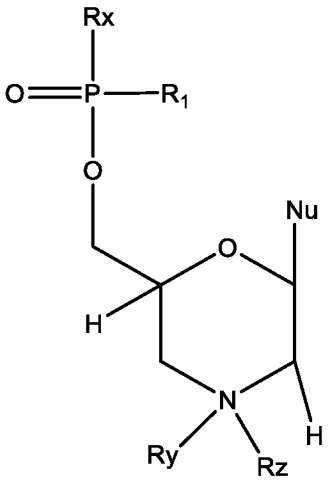
تم أيضاً الأخذ في الاعتبار لأوليجيومرات التي تعيق الروابط الكاتيونية وتعيق الروابط غير المشحونة؛ على سبي لامثال، الإعاقة المركزية الخاصة بروابط غير مشحونة والتي يمكن أن تتم إحاطتها من خلال كتل خاصة بروابط كاتيونية أو العكس صحيح. في أحد النماذج فإن الطول التقريب المساوي لـ 5'، 3' والمناطق المركزية والنسبة المئوية من الروابط الكاتيونية في منطقة مركزية والتي تكون أعلى من حوالي 50٪ ويفضل أعلى من 70٪.

في نماذج معينة، فإن الأوليجيونيوكليوتيدات مضاد للحس يمكن تحضيرها م خلال تخليق بطور صلب متدرج. مع استخدام طرق تم تفصلها في المراجع المذكورة هنا أعلاه وفيما يلي بالنسبة لتخليق أوليجيونيوكليوتيدات التي لها خليط أو روابط أساسية كاتيونية cationic غير مشحونة أساسية، وفي الأمثلة هنا. في بعض الحالات، يمكن أن يكون من المرغوب أن تتم إضافة أجزاء كيميائية غضافية خاصة بالمركب مضاد للحس، على سبيل المثال، لتحسين الحركيات الدوائية أو لتسهيل التقاط أو اكتشاف المركب. يمكن أن يتم ربط الجزء المذكور بشكل تساهميل طبقاً لطرق تخليقية قياسية. على سبيل المثال، فإن إضافة جزيء بولي إيثيلين جليكول polyethylene glycol أو أي بوليمر آلف للماء hydrophilic polymer ، على سبيل المثال، المشتمل على 1-100 وحدة فرعية من المونومر يمكن أن تكون مفيدة لتحسين قابلية الإذابة.

يمكن أن يتم ربط جزيء مسجل، مثل الفلوروسين fluorescein أو مجموعة مرقمة بشكل إشعاعي لأغراض الاكتشاف. وعلى نحو بديل، فإن مرقم المسجل يمكن أن يتم ربطه مع أوليجيومر يمكن أن يكون عبارة عن مركب ترابطي مثل مولد ضد أو بيوتين قادر على ربط جسم مضاد مرق أو ستربتافيدين streptavidin. في اختيار جزء خاص بالربط أو التعيل لأوليجيونيوكليوتيدات في عكس اتجاه الربط، من المفضل على نحو طبيعي أن يتم التوجيه لاختيار مركبات كيميائية من مجموعات تكون متوافقة من الناحية الحيوية ويمكن تحملاه من خلال الخاضع بدون تأثيرات جانبية غير مرغوبة. تتراوح الأوليجيو نيوكليوتيدات الخاصة بالاستخام في الاستخدامات مضاد للحس بصفة عامة في الطول من حوالي 10 إلى حوالي 50 وحدة فرعية ويفضل أكثر من حوالي 10 إلى 30 وحدة فرعية وعلى نحو نمطي من 15-25 قاعدة. على سبيل المثال، فإن أوليجيون نيوكليوتيد من الاختراع الحالي يكون له من 19-20 وحدة فرعية من الطول المفيد فيما يتلعق باوليجيونيوكليوتيد يمكن أن يكون بصفة مثالية له اثنين إلى عشرة، على

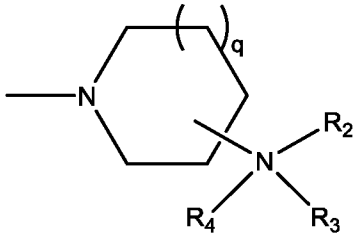
سبيل المثال أربعة على ثمانية روابط كاتيونية، على سبيل المثال، من أربعة على ثمانية وروابط كاتيونية وروباط غير مشحونة متبقية. يكون بالأوليجيونيولكيوتيد من 14-15 وحدة فرعية والتي لها من اثنين إلى سبعة، على سبيل المثال، من 3، 4، أو 5 روابط كاتيونية والروابط غير المشحونة المتبقية. في نموذج مفضل فإن الأوليجيونيوكليوتيدات يمكن أن يكون بها من 25-28 وحدة فرعية.

تحمل كل بنية حلقية من مورفولينو جزء زوج قاعدة لتشكيل متوالية من أجزاء زوج قاعدة والتي تم تصميمها بشكل نمطي فيما يتعلق بتهجين مستهدف مضاد للانتساخ في خلية أو في خاضع تمت معالجته. يمكن أن يكون جزء الزوج عبارة عن بيورين أو بريميدين موجود في DNA اصلي أو RNA (على سبيل المثال، A ، G ، C ، T أو U) أو أي جزء قياسي مثل هيبوكسانثين hypoxanthine (مكون القاعدة من نيوكليوتيد إينوسين nucleoside inosine)، 5- ميثيل سيتوسين، 2-6 داي أمينو بيورين أو قواعد معدلة أخرى معروفة في المجال وتم وصفها فيما يلي. وكما تمت ملاحظته أعلاه، تم توجيه نماذج معينة إلى أوليجيونيوكليوتدات تشتمل على روابط داخل الوحدة والتي تشتمل على أوليجيومرات PMO-X وتلك التي تشتمل على مجموات طرفية معدلة. في بعض النماذج، فإن الأوليجيومرات المذكورة يكون لها ألفة عالية لـ DNA و RNA بالمقارنة مع الأوليجيومرات غير المعدلة المناظرة والديمونسترات demonstrate من توصيل خلية محسنة ، الفعالية و/أو خصائص توزيع النسيج بالمقارنة مع أليجيومرات التي لها روابط داخل الوحدات. توضح السمات البنائية خصائص أنواع الروابط والأوليجيومرات التي تم وصفها بالتفصيل في المناقشة التالية. تم وصف تخليق تلك الأوليجيومرات وأوليجيومرات ذات صلة في الطلب الأمريكي مشترك الملكية رقم 118298/13 ، والذي تم تضمينه هنا كمرجع. في نماذج معينة، فإن الاختراع يوفر أوليجيونيوكليوتيد له متوالية متممة لمتوالية مستهدفة والتي ترتبط مع مرض بشري وتشتمل على متوالية من النيوكليوتيدات التي لها الصيغة:



حيث تكون Nu عبارة عن قاعدة نواة nucleobase .

يكون لـ R1 الصيغة التالية

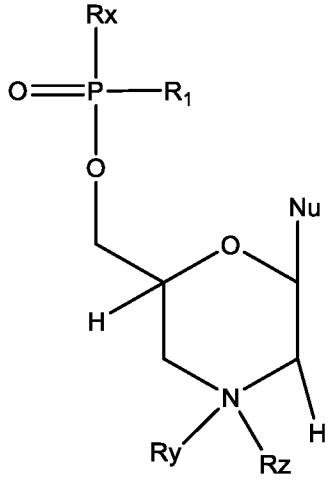


تكون q عبارة عن 0، 1، أو 2؛

تكون R2 مختارة من المجموعة المكونة من هيدروجين ، C1-C5 ألكيل alkyl ، C1-C5 أرالكيل aralkyl ، و مجموعة فورواميديينيل formamidinyl ، و تكون R3 مختارة من المجموعة المكونة من هيدروجين ، C1-C10 أسيل ، C1-C10 أمينو أسيل aminoacyl ، جزيء أسيل acyl من حمض أميني amino acid طبيعي أو غير طبيعي من ألفا alpha أو بيتا beta ، C1-C10 أرالكيل aralkyl ، و C1-C10 ألكيل alkyl ، أو تم ربط R2 و R3 لتشكيل حلقة بها 5-7 ذرات حيث يمكن الاستبدال الاختياري للحلقة بواسطة مجموعة استبدال مختارة من المجموعة المكونة من C1-C10 ألكيل alkyl ، فينيل phenyl ، هالوجين halogen ، و C1-C10 أرالكيل ؛ تكون R4 مختارة من المجموعة المكونة من زوج إليكترون ، هيدروجين ، C1-C6 ألكيل و C1-C6 أرالكيل ؛ تم اختيار Rx من المجموعة المكونة من

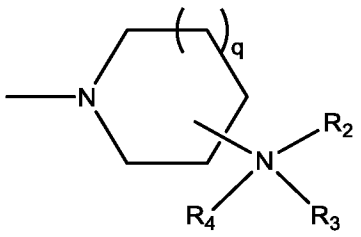
ساكروسيناميد sarcosinamide ، هيدروكسيل hydroxyl ، نيوكليوتيد nucleotide ، جزء ببتيد peptide moiety مخترق للخلية ، و بيبرازينيل piperazinyl ؛

تم اختيار Ry من المجموعة المكونة من هيدروجين ، C1-C6 ألكيل alkyl ، نيوكليوتيد جزء ببتيد مخترق للخلية ، حمض أميني ، مجموعة فورواميديدينيل formamidinyl ، و C1-C6 أسيل acyl ؛ و ، تم اختيار Rz من المجموعة المكونة من زوج إليكترون electron pair ، هيدروجين ، C1-C6 ألكيل ، و C1-C6 أسيل أملاح مقبولة بشكل صيدلاني منها.يمكن اختيار Nu من المجموعة المكونة من أدينين adenine ، جوانين guanine ، ثيمين thymine ، يوراسيل uracil، سيتوسين cytosine، و هيبو كسانثين hypoxanthine . يفضل أكثر أن يكون Nu عبارة عن ثيمين أو يوراسيل . في نماذج مفضلة، يوفر الاختراع نيوكليوتيد به متوالية



من نيوكليوتيد لها الصيغة :

حيث تكون Nu عبارة عن قاعدة نواة؛ تم اختيار R1 من المجموعة المكونة من R1' و R1'' حيث تكون R1' عبارة عن داي ميثيل - أمينو dimethyl- amino و R1'' له الصيغة



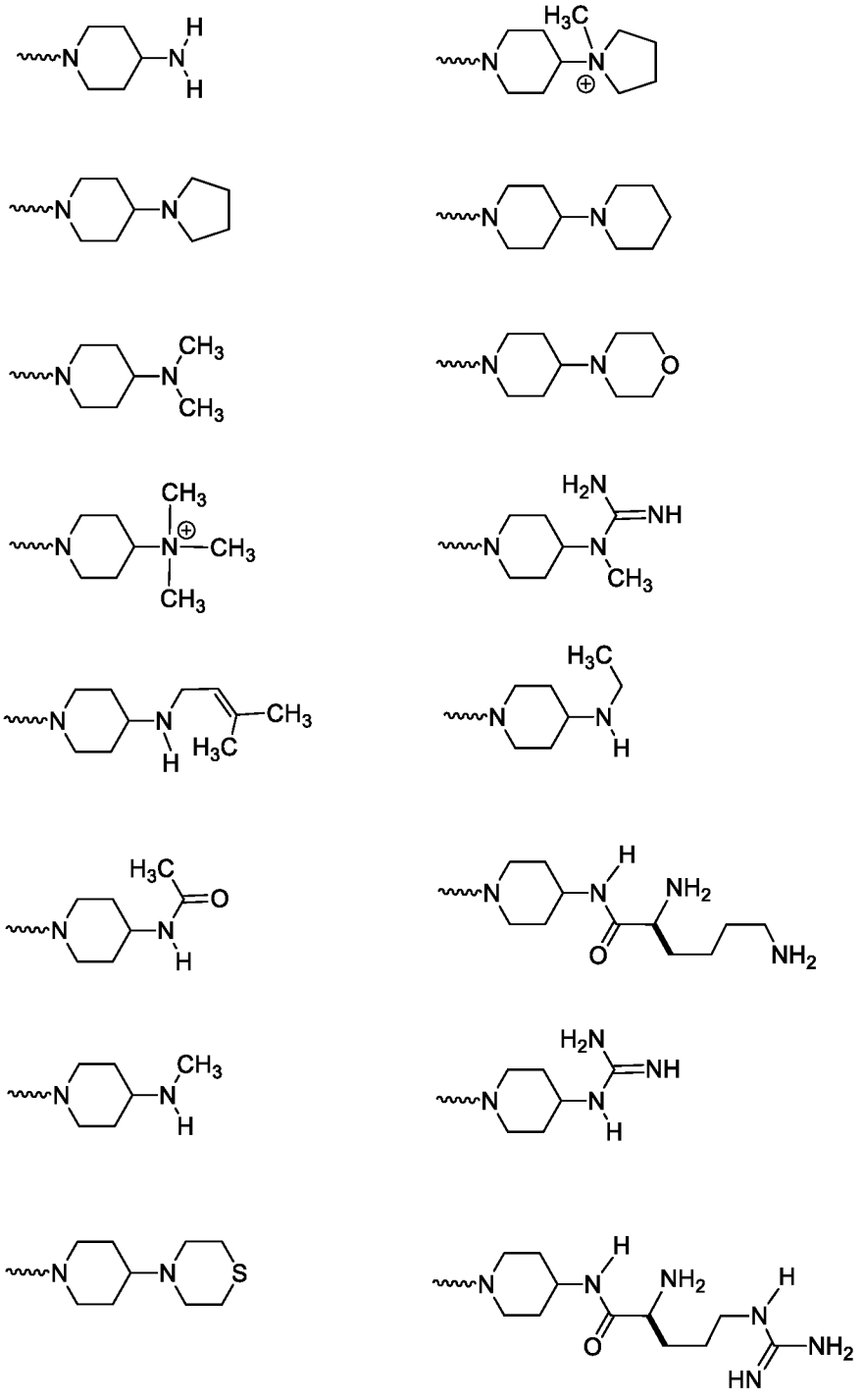
حيث واحدة على الأقل من يكونR1 عبارة عن R1''؛ تكون q عبارة عن 0، 1، أو 2؛ بشرط أن واحدة على الأقل من R1 عبارة عن جزء بيبريدينيل piperidinyl ؛ تكون R2 مختارة من المجموعة المكونة من هيدروجين، C1-C5 ألكيل alkyl ، C1-C5 أرالكيل، ومجموعة

فروماميديينيل formamidinyl ، و تكون R3 مختارة من المجموعة المكونة من هيدروجين، C1-C10 أسيل acyl ، C1-C10 أمينو أسيل aminoacyl ، جزيء أسيل acyl من حمض أميني طبيعي أو غير طبيعي من ألفا أو بيتا، C1-C10 أرالكيل aralkyl ، و C1-C10 ألكيل، أو

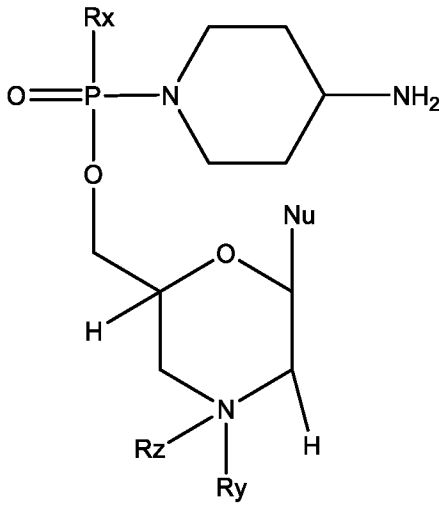
تم ربط R2 و R3 لتشكيل حلقة بها 5-7 ذرات حيث يمكن الاستبدال الاختياري للحلقة بواسطة مجموعة استبدال مختارة من المجموعة المكونة من C1-C10 ألكيل، فينيل phenyl ، هالوجين halogen ، و C1-C10 أرالكيل؛ تكون R4 مختارة من المجموعة المكونة من زوج إليكترون، هيدروجين، C1-C6 ألكيل و أرالكيل؛ تم اختيار Rx من المجموعة المكونة من ساكروسيناميد sarcosinamide ، هيدروكسيل hydroxyl، نيوكليوتيد، جزء ببتيد مخترق للخلية، و بيبرازينيل piperazinyl ؛ تم اختيار Ry من المجموعة المكونة من هيدروجين، C1-C6 ألكيل، نيوكليوتيد جزء ببتيد مخترق للخلية، حمض أميني، مجموعة فروماميديينيل، و C1-C6 أسيل؛ و، تم اختيار Rz من المجموعة المكونة من زوج إليكترون، هيدروجين، C1-C6 ألكيل، و C1-C6 أسيل أملاح مقبولة بشكل صيدلاني منها .يمكن اختيار Nu من المجموعة المكونة من أدينين، جوانين، ثيمين، يوراسيل، سيتوسين، و هيبو كسانثين . يفضل أكثر أن يكون Nu عبارة عن ثيمين أو يوراسيل .

حوالي 90-50٪ من مجموعات R1 عبارة عن داي ميثيل أمينو dimethylamino (أي 'R1). وعلى نحو أكثر تفضيلاً، 66٪ من مجموعات R1 عبارة عن داي ميثيل أمينو.يمكن اختيار "R1

من مجموعة مكونة من:



يفضل على الأقل نيوكليوتيد واحد من الأوليجيونيوكليوتيد الذي له الصيغة:



حيث تكون Rx و Ry و Rz و Nu كما تم توضيحه أعلاه. يفضل أكثر أن تكون Nu عبارة عن ثمين أو يوراسيل.

على الرغم من ذلك يفضل أن يكون ثيمين thymine (T) عبارة عن جزيء مزدوج (Nu أو Pi) يشتمل على تعديلات كيميائية تم وصفها أعلاه، وأي وحدة فرعية لقاعدة معروفة للشخص الماهر في المجال والتي يمكن استخدامها في شكل جزء مزدوج من قاعدة.

ب-مرسلات الببتيد

يمكن أن تشتمل الأوليجيو نيوكليوتيدات من الاختراع على جزيء أوليجيو نيوكلويتيد يتم تضمينه بداخل CPP ، يفضل جزيء ناقل ببتيد غني بالأرجينين فعال لتحسين المركب بداخل الخلايا. يفضل أن يتم ربط الجزيء الناقل بالطرف الخاص بالأوليجيومر كما هو موضح، على سبيل المثال، في الشكل رقم 1ب و1ج. يكون للببتيد قدرة حث اختراق الخلية باستخدام 30٪، 40٪، 50٪، 60٪ ، 70٪، 80٪، 90٪ أو 100٪ من الخلايا لمجموعة مزرعة خلية معينة والتي تشتمل على أعداد بينها وتسمح بنقل الموضع في الجزيئات الكبيرة بداخل أنسجة متعددة في الكائن الحي عند الإعطاء الذي يشمل الجسم كله. في أحد النماذج فإن ببتيد اختراق الخلية يمكن أن يكون عبارة عن ناقل ببتيد غني بالأرجينين.

في نموذج آخر فإن ببتيد اختراق الخلية يمكن أن يكون عبارة عن اختراق أو ببتيد Tat. تكون تلك الببتيدات معروفة في المجال وتم الكشف عنها، على سبيل المثال، في نشرة البراءة الأمريكية رقم 2010-0016215-1أ ، والتي تم تضمينها هنا كمرجع بكاملها. يمكن الوصول لطريقة مفضلة

بشكل خاص للترافق خاص ببتيدات مع أوليجيونيوكليوتيدات مضاد للحس في نشرة PCT للطلب الدولي رقم 150960/2012 والذي تم تضمينه هنا كمرجع بكامله. يستخدم نموذج مفضل من ببتيد أوليونيوكليوتيد مترافق من الاختراع الحالي جلايسين في شكل رابط بين CPP والأوليجيونيوكليوتيد المضاد للحس.

على سبيل المثال، فإن الببتيد المفضل المترافق مع PMO يتكون من R6-G-PMO.

تم توضيح أجزاء ناقل كا تم وصفها أعلاه لكي يتم التحسين الكبير لمدخل الخلية الخاصة بأوليجيوميرات تم ربطها لامتصاص الأوليجيومر في غياب الجزيء الناقل. يفضل أن يتم تحسين الامتصاص عند عشرة أضعاف فقط ويفضل أكثر عند اثنين وعشرين ضعفاً بالنسبة لمركب غير مترافق.

إن استخدام نواقل ببتيد غنية بأرجينين (أي ببتيدات اختراق الخلية) تكون مفيدة بكشل خاص في ممارسة الاختراع الحالي.

تم توضيح نواقل ببتيد معينة حيث أنها فعالة بشكل عال عند توصيل مركبات مضادة للحس من الخلايا والتي تشتمل على خلايا عضلية :

(Marshall, Oda et al. 2007; Jearawiriyapaisarn, Moulton et al. 2008; Wu, Moulton et al. 2008).

بالإضافة إلى ذلك وبالمقارنة مع مرسلات الببتيد المعروفة مثل بنتراتي وببتيد Tat ، فإن النواقل التي تم وصفها هنا عندما يتم ترافقها مع PMO مضاد للحس توضح القدرة المحسنة لتغيير الشق الخاص بنواتج انتساخ الجينات المتعددة (Marshall, Oda et al. 2007). تم وصف النماذج المفضلة من مترافقات ناقل مروفولينو –ببتيد في الطلب الدولي رقم 150960/2012 والذي تم تضمينه هنا بكامله كمرجع.

تشتمل ناقل الببتيد التوضيحة ، باستثناء الروابط فيما يلي في الجدول رقم 1 .

الجدول رقم 1 نواقل الببتيد التوضيحية

الاسم (التحديد)	المتوالية	رقم هوية المتوالية NOa
rTAT	RRRQRRKKR	24
Tat	RKKRRQRRR	25
R9F2	RRRRRRRRRFF	26
R5F2R4	RRRRRFFRRRR	27
R4	RRRR	28
R5	RRRRR	29
R6	RRRRRR	30
R7	RRRRRRR	31
R8	RRRRRRRR	32
R9	RRRRRRRRR	33
(RX)8	RXRXRXRXRXRXRXRX	34
(RAhxR)4; (P007)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	35
(RAhxR)5; (CP04057)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	36

(RAhxRRBR)2; (CP06062)	RAhxRRBRRAhxRRBR	37
(RAR)4F2	RARRARRARRARFF	38
(RGR)4F2	RGRRGRRGRRGRFF	39

a متواليات محددة برقم المتواليات والتي لا تشتمل على جزء الارتباط (على سبيل المثال، C, G, P, Ahx, B, AhxB ، حيث Ahx و B تشير إلى حمض 6-أمينو هيكسانويك -6 aminohexanoic acid و بيتا -ألانين beta-alanine ، على الترتيب).

ج-نواقل التعبير Expression Vectors

في أحد النماذج، فإن الاختراع يشتمل على نواقل تعبير خاصة باتلعبير عن متواليات تستهدف ديستروفين تم وصفها هنا في الخلايا. تكون أنظمة توصيل الناقل قادرة على التعبير عن متواليات تستهدف ديستروفين أوليجيومرية oligomeric dystrophin من الاختراع الحالي. في أحد النماذج، فإن النواقل المذكورة تعبر عن متوالية بولي نيوكليوتيد تشتمل على الأقل على 10 نوكليوتيدات مترابطة على الأقل من واحد أو أكثر م متواليات 1-12، 46 و 47. في نموذج آخر، فإن تلك النواقل تعبر عن متوالية بولي نيوكليوتيد polynucleotide تشتمل على واحدة أو أكثر من المتواليات 1-12، 46 و 47 . تكون نواقل التعبير المناسبة لتوصيل الجين معروفة في المجال. يتم تعديل نواقل التعبير المذكورة للتعبير عن متواليات تستهدف ديستروفين تم وصفها هنا. تشتمل نواقل التعبير التوضيحية على جزيئات بولي نيولكيوتيد، ويفضل جزيئات DNA والتي تم اشتقاقها، على سبيل المثال، من بالازميد plasmid ، ملتهمة بكتيرية bacteriophage أو فيروس virus او خميرة yeast (على سبيل المثال، فيروس غدي، وفيروس مرتبط بالغدة، الفيروس البطيء، إلخ) والذي يمكن بداخله إدراج البولي نيوكليوتيد أو انتساخه. يفضل أن يشتمل الناقل على واحد أو اكثر من مواضع التقييدات الفريدة ولاتي تكون قادرة على الانتساخ الفردي في خلية عائل محدد والتي تشتمل على خلية مستهدفة أو نسيج أو خلية إنذار أو نسيج منها أو تكون قابلة للتكامل مع الجينوم من عائل محدد بحيث أن المتوالية المستنسخة تكون قابلة لإعادة الانتساخ. ونتيجة لذكل فإن الناقل يمكن أن يكون عبارة عن ناقل انتساخ مستقل، أي، ناقل يوجد

في شكل كيان كروموسومي خارجي extra-chromosomal، يكون الانتساخ الخاص به مستقلاً عن انتساخ الكروموسوم، على سبي لامثال، بلازميد خطي linear plasmid أو بلازميد دائري مقفل closed circular plasmid وعنصر كروموسومي زائد وكروموسوم دقيق أو كروموسوم صناعي artificial chromosome. يمكن أن يشتمل الناقل على أي وسائل خاصة بتحديد الانتساخ الذاتي. وعلى نحو بديل فإن الناقل يمكن أن يكون أحد النواقل التي عندما يتم إدخالها في خية العائل تكون متكاملة مع الجنيوم ويتم الانتساخ معا بداخل الكروموسوم (الكروموسومات) التي تم تكاملها معها.

في أحد النماذج، تشتمل نواقل التعبير على معزز خاص بنسيج، على سبيل المثال، معزز خاص بعضلة و/أو محسن والذي يعمل على تحسين التعبير عن متواليات تستهدف ديستروفين أوليجيومرية تم وصفها هنا في خلايا معينة أو نسيج محل الاهتمام (على سبيل المثال، في العضلة). يمكن أن تكون متواليات المعزز ونواقل التعبير مناسبة للتعبير في خلايا العضالات والتي تشتمل، على تلك التي تم وصفها في الطلب الأمريكي رقم 0212529/2011 وقد تم تضمين محتويات كاملة هنا كمرجع. تشتمل أمثلة معززات خاصة بالعضلة التوضيحية، على معزز ديسمين desmin، معزز كيناز كرياتينين عضلة muscle creatine kinase (MCK) ومعزز Pitx3 ومعزز ألفا -أكتيني هيكلي أو معزز تروبونين I . تم الوصف الإضافي لمعززات خاصة بالعضلة، على سبيل المثال، في Talbot et al., Molecular Therapy (2010), 18(3): 601-608; Wang et al., Gene Therapy (2008), 15(22): 1489-99; and Coulon et al., Journal of Biological Chemistry (2007), 282(45): 33192-33200.

III – صيغ وطرق الإعطاء

في نماذج معينة، يوفر الاختراع الحالي صيغ أو تركيبات مناسبة للتوصيل العلاجي لأوليجيومرات عكس اتجاه النسخ كما تم وصفه هنا. في نماذج معينة، يوفر الاختراع الحالي صيغ أو تركيبات مناسبة للتوصيل العلاجي من أوليجيومرات مضاد للحس كما تم وصفه هنا. وبالتالي وفي نماذج معينة، فإن الاختراع يوفر تركيبات صيدلانية التي تشتمل على كمية فعالة بشكل علاجي من واحدة او أكثر من الأوليجيومرات التي تم وصفها هنا، التي تمت صياغتها مع واحدة أو اكثر من المواد

الحاملة المناسبة (مواد الإضافة) و/أو المواد المخففة. وعلى الرغم من أنه من الممكن للأوليجومرات من الاختراع الحالي أني تم إعطاؤها بمفرده، من المفضل أن يتم الإعطاء للمركب في شكل صيغة صيدلانية (تركيبة).

تم وصف طرق توصيل جزيئات الحمض النووي، على سبيل المثال، في Akhtar et al., 1992, Trends Cell Bio., 2:139; and Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar; Sullivan et al., ، طلب الاختراع الدولي رقم 94/02595 يمكن استخدام تلك البروتوكولات وبروتوكولات أخرى للتوصيل الافتراضي لأي جزيء حمض نووي بما في ذلك الأوليجيومرات المعزولة من الاختراع الحالي.

وكما تم وصفه فيما يلي فإن التركيبات الصيدلانية من الاختراع الحالي يمكن صياغتها بشكل خاص فيما يتعلق بالإعطاء في صورة صلبة solid أو سائلة liquid، والتي تشتمل على تلك التي تمت تهيئتها فيما يتعلق بما يلي: (1) الإعطاء عن طريق الفم oral، على سبيل المثال، مستحضرات الشُرب (محاليل مائية aqueous أو غير مائية non-aqueous solutions أو معلقات suspensions)، أقراص، على سبيل المثال، تلك التي تستهدف الشدقيقن buccal أو تحت اللسان sublingual أو الإعطاء الذي يعمل الجسم كله بجرعات كبيرة أو مساحيق او حبيبات أو عجائن خاصة بالإعطاء للسان؛ (2) الإعطاء عن غير طريق القناة الهضمية، على سبيل المثال، تحت الجلد subcutaneous أو بداخل العضلات intramuscular أو في الوريد intravenous أو الحقن في البشرة epidural injection، مثل، على سبيل المثال، محاليل معقمة sterile solution او معلقات suspension أو صيغ بإطلاق مستمر sustained-release formulation ؛ (3) الاستخدام الموضعي، على سبيل المثال، كريم، مرهم أو لاصقة بإطلاق يتم التحكم فيه أو رش يتم وضعه على الجلد؛ (4) بداخل المهبل intravaginally أو بداخل المستقيم intrarectally ، على سبيل المثال، مثل تحميلة أو كريم أو سائل رغوي foam ؛ (5) تحت اللسان sublingually ؛ (6) في العين ocularly ؛ (7) عبر الجلد transdermally ؛ (8) في الأنف nasally

يشير المصطلح "مقبول بشكل صيدلاني" والذي تم استخدامه هنا إلى تلك المركبات والمواد والتركيبات و/أو صور الجرعة لويت تكون في مجال القياس الطبي السليم والمناسب لاستخدامه في ارتباط مع الانسجة أو الأشخاص والحيوانات بدون السمية الزائدة أو الاحتكاك أو الاستجابة الخاصة بالحساسية أو أي مشكلة أو مضاعفات أو المترابطة مع الفائدة الطبيعية /نسبة الخطورة.

يشير المصطلح "مادة حاملة carrier مقبولة صيدلانياً" كما تم استخدامه هنا إلى مادة حاملة مقبولة بشكل صيدلاني وتركيبة أو مادة ناقلة مثل مادة سائلة أو مادة ملء صلبة solid filler أو مادة مخففة أو سواغ أو وسيلة مساعدة في التصنيع (على سبيل المثال، مادة مزلقة lubricant ، ماغنسيوم magnesium ، كالسيوم calcium أو سيتياارت زنك zinc stearate أو حمض سيتياريك steric acid) أو مادة مكبسلة لمذيب، يتم تضمينها في حامل أو نقال خاص بمركب خاضع من أحد الأعضاء أو جزء من الجسم لكائن آخر أو جزء من الجسم. يجب أن تكون كل مادة حاملة "مقبولة" في سياق أن تكون متوافقة مع المكونات الأخرى من الصيغة وغير ضارة للمريض.

تشتمل بعض أمثلة المواد التي يمكن استخدامها في شكل مواد حاملة مقبولة بشكل صيدلاني، على سبيل المثال لا الحصر على: (1) سكريات sugars ، مثل اللاكتوز lactose ، والجلوكوز glucose والسكروز sucrose ؛ (2) البراشيم مثل برشامة النشا أو البطاطا؛ (3) السيليلوز cellulose ، ومشتقاتها مثل كربو ميثيل سيليلوز صوديوم sodium carboxymethyl cellulose ، إيثيل سيليلوز ethyl cellulose وأسيتات سيليلوز cellulose acetate ؛ (4) صمغ كثيرات مسحوق powdered tragacanth ؛ (5) شعير malt ؛ (6) جيلاتين gelatin ؛ (7) تلك talc ؛ (8) سواغات excipients مثل زبدة الكاكاو cocoa butter وشموع خاصة بالتحميلة suppository waxes ؛ (9) زيوت، مثل زيت الفول السوداني وزيت بذرة القطن وزيت العصفر وزيت السمسم وزيت الزيتون وزيت الذرة وزيت فول الصويا؛ (10) مركبات جليكول glycol مثل بولي بروبيلين جليكول propylene glycol ؛ (11) مركبات بوليول polyols مثل الجلايسين glycerin والسوربيتول sorbitol والمانيتول mannitol وبولي إيثيلين جليكول polyethylene glycol ؛ (12) إسترات esters مثل إيثيل أوليات ethyl oleate وإيثيل ليورات ethyl laurate ؛ (13) آجار؛ (14) عوامل منظمة مثل هيدروكسيد الماغنسيوم magnesium

hydroxide، هيدروكسيد ألومنيو aluminum hydroxide ؛ (15) حمض ألجينيك alginic acid ؛ (16) ماء خالي من البروجين pyrogen-free water ؛ (17) محلول ملحي متساوي التوتر isotonic saline ؛ (18) محلول رنجر Ringer's solution ؛ (19) كحول إيثيل ethyl alcohol ؛ (20) محاليل منظمة للرقم الهيدروجين pH؛ (21) مركبات بوليستر polyesters ، بولي كربونات polycarbonates و/أو بولي أنهيدريدات polyanhydrides ؛ و (22) ومواد متوافقة غير سمة أخرى يتم استخدامها في الصيغ الصيدلانية.

تشتمل الأمثلة الإضافية غير الحصرية من العوامل المناسبة للصياغة مع أوليجيومرات مضادة للانتساخ من الاختراع الحالي على: أحماض نووية مترافقة مع PEG، أحماض نووية مترافقة مع شحم فوسفو phospholipid ، وأحماض نووية nucleic acids ، أجزاء آلفة للشحم تشتمل على أحماض نووية، مركبات فوسفورو ثيوات phosphorothioates ، ومثبطات P – جليكوبروتين P-glycoprotein (مثل Pluronic P85) والتي يمكن أن تحسن من دخول العقاقير في الأنسجة المختلفة؛ وبوليميرات قابلة للتحلل الحيوي biodegradable polymers مثل كريات دقيقة بولي poly microspheres (DL –لاكتيد– جليكوليد lactide-coglycolide مشترك) فيما يتعلق بتوصيل إطلاق مستمر بعد الزراعة (Emerich, D F et al., 1999, Cell Transplant, 8, 47-58) Alkermes, Inc. Cambridge, Mass وجسيمات في حجم النانو محملة مثل تلك التي تم تحضيرها من بولي بيوتيل سيانو أكلريلات polybutylcyano acrylate والتي يمكن أن توصل العقاقير عبر حاجز الدم في المخ وتغير من آليات الامتصاص العصبي neuronal uptake mechanisms :

(Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999).

يوضح الاختراع أيضاً سمات استخدام تركيبة تشتمل على جسيمات دهنية معدلة للسطح والتي تشتمل على شحومات lipids بولي إيثيلين جليكول poly ethylene glycol (PEG) معدل، ومترفعة وغير متفرعة أو توليفاتمنها أو جسيمات دوارة على المدى الطويل منها أو جسيمات شحمية قذفية). يمكن أن تشتمل الأوليجيومرات الخاصة بالاختراع على جزيئات PEG مرتبطة بشكل تساهمي من أوزان جزيئية مختلفة. تعرض تلك الصيغ طريقة خاصة بزيادة التراكم للعقاقير في أنسجة مستهدفة. تكون تلك الفئة من المواد الحاملة للعقاقير مقاومة للطهايات ويتم القضاء

عليها من خلال نظام الالتهام أحادي نووي mononuclear phagocytic system (MPS أو RES)، وبالتالي توفير أزمنة دورات في الدم أطول وتحسين تعرض النسيج لعقار تمت كبسلته (Lasic et al. Chem. Rev. 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata et al., Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 1005-1011). أوضحت الجسيمات الشحمية المذكورة أنها تتراكم بشكل انتقائي في الأورام وعلى نحو مفترض بواسطة الانصباب والإمساك في أنسجة مستهدفة وعائية جديدة (Lasic et al., Science 1995, 267, 1275-1276; Oku et al., 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1238, 86-90). تحسن جسيمات التدوير الطويلة من الخصائص الصيدلانية والحركيات الدوائية لـ DNA و RNA ، وعلى نحو خاص بالمقارنة مع جسيمات شحمية كاتيونية تقليدية والتي تكون معروفة لاحتوائيها في الأنسجة الخاصة بـ :

Liu et al., J. Biol. Chem. 1995, 42, 24864-24870; Choi et al., International PCT Publication الطلب الدولي رقم 96/10391 و

Ansell et al., International PCT Publication ، الطلب الدولي رقم 96/10390 و

Holland et al., International، الطلب الدولي رقم 96/10392 . تكون الجسيمات الشحمية الخاصة بالتدوير محتملة أن تحمي العقاقير من التحلل النووي إلى مدى أكبر بالمقارنة مع جسيمات كاتيونية cationic liposomes بالاعتماد على قدرة تجنب التراكب في أنسجة MPS متراكمة ومكافحة بشكل أيضي مثل الكبد liver والطحال spleen.

في نموذج إضافي فإن الاختراع الحالي يشتلم على تركيبات أوليجيومر تم تحضيره للتوصيل كما تم وصفه في البراءة الأمريكية رقم 6692911 ورقم 7163695 ورقم7070807. في هذا السياق، وفي أحد النماذج فإن الاختراع الحالي يوفر أوليجيومر من الاختراع الحالي في تركيبة تشتمل على بوليمرات خاصة باللايسين lysine والهيستيدين histidine (HK) (كما تم وصفه في البراءة الأمريكية رقم 7163695 ورقم 7070807 ورقم 6692911 بمفردها أو في توليفة مع بولي إيثيلين جليكول poly ethylene glycol (PEG) (على سبيل المثال، PEG متفرغة أو غير متفرعة أو خليط من كل منها) في توليفة مع PEG وجزيء مستهدف أو اي مما سبق في توليفة مع عامل ربط تشابكي. في نماذج معينة، يوفر الاختراع الحالي أوليجيومرات مضاد للحس في

تركيبات تشتمل على بولي هيستيدينpolyhistidine معدل لحمض جلوكونيك أو بولي هيستيدن معالج بجلوكونيلات / ترانسفيرين –بولي ليسين –gluconylated–polyhistidine/transferrin polylysine. سوف يتعرف الماهر في المجال على الأحماض الأمينية التي لها خصائص مشابهة لـ His و Lys والتي يمكن أن يتم استبدالها بداخل التركيبة.

يمكن أن تشتمل نماد معينة من الأوليجيومرات التي تم وصفها هنا على مجموعة وظيفية أساسية، مثل أمينو أو ألكيل أمينو وبالتالي، تكون قادرة على تشكيل أملاح مقبولة بشكل صيدلاني مع أحماض مقبولة بشكل صيدلاني. تشير "الأملاح المقبولة بشكل صيدلاني" في هذا السياق إلى أملاح إضافة غير سامة، غير عضوية وعضوية من المركبات الخاصة بالاختراع الحالي. يمكن تحضير تلك الأملاح في الموضع في مادة ناقلة خاصة بالإعطاء او صورة جرعة من عملية التصنيع أو من خلال تفاعل منفرد لمركب نقي من الاختراع في صورة القاعدة الحرة منه مع حمض عضوي أ وغير عضوي مناسب وعزل الملح وبالتالي التشكيل أثناء التنقية التالية. تشتمل الأملاح التوضيحة، على هيدروبروميد hydrobromide ، هيدروكلوريد hydrochloride ، وكبريتات sulfate وبيكبريتات bisulfate وفوسفات phosphate ونترات nitrate وأسيتات ، acetate وفاليرات valerate وأوليات oleate وبالميتات palmitate وسيتيارات stearate وليورات laurate ، وبنوزات benzoate ولاكتات lactate وفوسفات phosphate ، وتوسيلات tosylate وسيترات citrate وماليات maleate وفيومرات fumarate ، وسكسينات succinate وطرطرات tartrate ونفيلات napthylate وميسيلات mesylate وجلوكوهيبتونات glucoheptonate ولاكتوبوانات lactobionate وأملاح ليوريل سولفونات laurylsulphonate وما شابه ذلك. (انظر، على سبيل المثال، Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19).

تشتمل الأملاح المقبولة بشكل صيدلاني من أوليجيومرات الاختراع على أملاح غير سامة تقليدية أو أملاح أمونيوم رباعية من المركبات، على سبيل المثال، من أحماض غير سامة أو أحماض غير عضوية. على سبيل المثال، تشتمل أملاح غير سامة تقليدية على تلك التي تم اشتقاقها من أحماض غير عضوية مثل هيدروكلوريد hydrochloride وحمض هيدروبروميك hydrobromic وحمض كبريتيك sulfuric حمض سولفاميك sulfamic وحمض فسفوريك phosphoric وحمض

نيتريك nitric وما شابه ذلك؛ وأملاح تم تحضيرها من أحماض عضوية مثل حمض أسيتيك acetic وحمض بروبيونيك propionic وحمض سكسينيك succinic وجليكوليك glycolic ، وحمض سيتياريك stearic وحمض لاكتيك lactic ، وحمض ماليك malic وحمض طرطريك tartaric وحمض سيتريك citric ، وحمض أسكوربيك ascorbic وحمض بالميتيك palmitic وحمض ماليك maleic ، وهيدروكسي ماليك hydroxymaleic ، وفينيل لاكتيك phenylacetic وجلوتاميك glutamic ، وحمض بنزويك benzoic ، حمض ساليسيكليك salicyclic وسولفاميليك sulfanilic ، 2-أسيتوكسي بنزويك 2-acetoxybenzoic ، فيوماريك fumaric ، تولوين سولفونيك toluenesulfonic ، وميثا سولفونيك methanesulfonic ، وغيثا نداي سولفونيك ethane disulfonic ، أوكساليك oxalic ، وأيزو ثيونيك isothionic ، وما شابه ذلك.

في نماذج معينة، فإن الأوليجيومرات من الاختراع الحالي يمكن أن تشتمل على واحدة أو أكثر من مجموعات وظيفية حمضية وبالتالي، تكون قابلة لتشكيل أملاح مقبولة بشكل صيدلاني مع قواعد مقبولة بشكل صيدلاني. تشير أملاح مقبولة بشكل صيدلاني" في تلك الأمثلة إلى أملاح إضافة قاعدة عضوية وغير عوضية وغير سامة إلى حد كبير من المركبات الخاصة بالاختراع الحالي. يمكن تحضير تلك الأملاح على مماثل في الموضع وفي ناقل خاص بالإعطاء أو عملية تصنيع صورة جرعة أو من خلال التفاعل على نحو منفصل لمركب منقى في صورة الحمض الحر الخاص به مع قاعدة مناسبة مثل الهيدروكسيد hydroxide ، الكربونات carbonate، أو البيكربونات bicarbonate أو كاتيون فلزي metal cation مقبول بشكل صيدلاني مع أمونيا ammonia أو مع جزء أساسي عضوي مقبول بشكل صيدلاني، أو أمين ثانوي أو أمين ثلاثي secondary or tertiary amine. تشتمل الأملاح الأرضي القولية alkaline earth salts أو أملاح أقلاء توضيحية على ليثيوم lithium وصوديوم sodium وبوتاسيوم potassium وكالسيوم calcium وماغنسيوم magnesium وأملاح ألومنيوم aluminum وما شابه ذلك. تكون الأمينات العضوية organic amines التوضيحية المفيدة لتكوين أملاح إضافة قاعدة مشتملة على إيثيل أمين ethylamine وداي إيثيل أمين diethylamine وإيثيلين داي أمين

ethylenediamine ، وإيثانول أمين ethanolamine وداي إيثانول أمين diethanolamine وببرازين piperazine وما شابه ذلك (انظر، على سبيل المثال، Berge et al., supra).

يمكن أن توجد عوامل الترطيب والمستحلبات والمزلقات مثل كبريتات لوريل صوديوم sodium lauryl sulfate وسيتيارات ماغنسويم magnesium stearate وعوامل ملونة coloring agents وعوامل إطلاق release agents وعوامل تغليف coating agents ومواد محلية sweetening وعوامل إعطاء نكهة flavoring وعوامل تعطير perfuming ومواد حافظة preservatives ومواد مضادة للأكسدة antioxidants في التركيبة.

تشتمل أمثلة مضادات الأكسدة المقبولة بشكل صيدلاني على: (1) مضادات الأكسدة القابلة للذوبان في الماء، مثل حمض اسكوربيك ascorbic acid وسيستين هيدروكلوريد cysteine hydrochloride وبيكبريتات صوديوم sodium bisulfate وميتا بيس كبريتيت sodium metabisulfite وكبريتيد صوديوم sodium metabisulfite وما شابه ذلك؛ (2) مضادات أكسدة قابلة للذوبان في الزيت oil-soluble antioxidants مثل بالميتات أسكوربيل ascorbyl palmitate وهيدروكسي أنيسول معالج بالبيوتيل butylated hydroxyanisole (BHA)، هيدروكسي تولوين معالج بالبيوتيل butylated hydroxytoluene (BHT)، وليسيثين lecithin ، وبروبيل جلات propyl gallate وألفا توكوفيرول alpha-tocopherol وما شابه ذلك؛ و (3) عوامل خلابية فلزية metal chelating agents ، مثل حمض سيتياريك citric acid وحمض تترا أسيتيك إيثيلين داي أمين ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)، وسوربيتول sorbitol وحمض طرطريط tartaric acid وحمض فسفوريك phosphoric acid وما شابه ذلك.

تشتمل صيغ الاختراع الحالي على تلك المناسبة للإعطاء في الفم، الأنف، الإعطاء الموضعي (بما في ذلك في الشدقين، تحت اللسان) في المستقيم، المهبل و/أو الإعطاء في عن غير طريق القناة الهضمية. يمكن عرض الصيغ بشكل مناسب في صورة جرعة وحدة ويمكن أن يتم تحضيرها باستخدام طرق معروفة في مجال الصيدلة. تتنوع كمية المكون الفعال الذي يتم دمجه في المادة الحاملة لإنتاج صورة جرعة منفردة بالاعتماد على العائل الذي تمت معالجته والمسار المعين الخاص بالإعطاء. سوف تكون كمية المكون الفعال الذي يتم دمجه مع المادة الحاملة لإنتاج صورة

جرعة منفردة بصفة عامة في كمية من المركبات التي تنتج تأثيراً علاجياً. وبصفة عامة ومن النسبة المئوية التي تساوي مائة فإن مقدار المدى يكون بين حوالي 0.1 من المائة غلى حوالي تسعة وتسعون من المائة من المكون الفعال ويفضل أن يكون من حوالي 5 ٪ إلى حوالي 70٪ ويفضل من حوالي 10٪ إلى حوالي 30٪ .

في نماذج معينة، يشتمل مستحضر الاختراع الحالي على سواغ excipient تم اختياره من مركبات سيكلو ديكستيرين cyclodextrins ، مركبات سيليلوز celluloses ، جسيمات شحمية liposomes وعوامل مشكلة للميزيلات micelle forming agents على سبيل المثال، أملاح الصفراء bile acids ، ومواد حاملة بوليميرية polymeric carriers ، على سبيل المثال، بوليسترات polyesters وبولي أنهيدريدات polyanhydrides وأوليجيومر oligomer من الاختراع الحالي. في نماذج معينة فإن المستحضر المذكور فيما سبق يقلل الإتاحة الحيوية في الفم للأوليجيومر الخاص بالاختراع الحالي.

تشتمل طرق تحضير الصيغ المذكورة أو التركيبات على خطوة ربط أوليجيومر الاختبار الحالي مع مادة حاملة، وعلى نحو اختياري واحد أو أكثر من المكونات الإضافية. بصفة عامة فإ الصيغ يتم تحضيرها بشكل منتظمة وتبدأ بشكل أساسي في الارتباط مع مركب الاختراع الحالي ومع المواد الحاملة السائلة أو المواد الحاملة الصلبة المقسمة بشكل دقيق أو كل منها وبعد ذلك إذا كان ذلك ضرورياً تشكيل المنتج.

يمكن أن تكون صيغ الاختراع الحالي المناسبة للإعطاء عن طريق الفم في صورة كبسولات أو براشيم أو حبوب أو أقراص أو أقراص معينة الشكل (باستخدام قاعدة نكهة وعلى نحو خاص سكروز وصمغ عربي أو صمغ كثيراء)، مساحيق وحبيبات أو في شكل محلول أو معلق في سائل مائي أو سائل غير مائي او في شكل مستحلب سائل زيت في ماء أو ماء في زيت أو في شكل إكسير أو شراب أو أقراص سكرية (تستخدم قاعدة خاملة مثل الجيلاتين أو الجيلايسين أو السكروز وصمغ عربي) و/أو في شكل غسولات للفم وما شابه ذلك وتشتمل كل منها على كمية محددة بشكل مسبق من مركب الاختراع الحالي في شكل مكون فعال. يمكن إعطاء أوليجيومر الاختراع الحالي في شكل جرعة كبيرة أو في شكل معجون أو عجينة.

في صور الجرعة الصلبة من الاختراع الخاصةب الإعطاء في الفم (كبسولات، أقراص، حبوب ملبسات، مساحيق، حبيبات وتحاميل وما شابه ذلك)، يمكن أن يكون المكون الفعال مختلطاً مع واحدة أو أكثر من المواد الحاملة المقبولة بشكل صيدلاني مثل سترات الصوديوم sodium citrate أو فوسفات ثنائية الصوديوم dicalcium phosphate و/أو أحد ما يلي: (1) مواد ملء أو مواد تمديد مثل أنواع النشا واللاكتوز والسكروز والجلوكوز والمانيتول mannitol و/أو حمض سيليك silicic acid ؛ (2) مواد رابطة مثل، على سبيل المثال، كربوكسي ميل سيليوز carboxymethylcellulose ، مركبات ألجينات alginates ، وجيلاتين gelatin ، وبولي فينيل بيروليدون polyvinyl pyrrolidone وسكروز sucrose و/أو صمغ عربي acacia ؛ (3) تحميلات مثل الجليسيرول glycerol ،؛ (4) عوامل مشتتة disintegrating مثل آجار- آجار agar-agar ، كربونات كالسيوم calcium carbonate وبطاطس و نشا تابيوكا، حمض ألجينيك alginic acid ، وسيليكات silicates معينة وكروبنات صوديوم sodium carbonate ؛ (5) عوامل إعاقة للمحلول solution retarding agents مثل البرافين paraffin ؛ (6) مواد تسريع امتصاص مثل كربونات أمونيوم رباعية quaternary ammonium و/أو مواد خافضة للتوتر السطحي surfactants مثل بوليكسامير poloxamer وكبريتات لوريل صوديوم sodium lauryl sulfate ؛ (7) عوامل ترطيب wetting agents ، مثل، على سبيل المثال، كحول سيتيل cetyl alcohol ، جليسيرو مونو سيتيارات glycerol monostearate ومواد خافضة للتورت غير أيونية non-ionic surfactants ؛ (8) مواد ماصة مثل، كوالين kaolin وصلصال بنتونيت bentonite clay ؛ (9) مواد مزلقة مثل التلك talc ، سييتيارات كالسيوم calcium stearate ، سيتيارات ماغنسيوم magnesium stearate ، ومركب جليكول بولي إيثيلين صلب solid polyethylene glycols ، كبريتات لوريل صوديوم sodium lauryl sulfate ، وسيتيارات زنك zinc stearate ، سيتيارات صوديوم sodium stearate ، حمض سيتريك stearic acid ، وخلائط منها؛ (10) عوامل تلوين ؛ (11) عوامل إطلاق متحكم فيه مثل كروسبوفيون crospovidone او سيليلوز إيثيل ethyl cellulose. في حالة الكبسولات، فإن الأقراص والحبوب والتركيبات الصيدلانية يمكن أن تشتمل أيضاً على عوامل منظمة.يمكن استخدام تركيبات صلبة من نفس النوع مثل مواد الملء في كلسولات جيلاتين صلبة الغلاف باستخدام

سواغات مثل لاكتوز أو سكريات حليب وأيضاً مركبات بولي إيثلين جليكول polyethylene glycols بوزن جزيئي عال وما شابه ذلك.

يمكن تحضير القرص بواسطة الضغط أو القولبة، وعلى نحو اختياري باستخدام واحد أو أكثر من المكونات الإضافية. يمكن تحضير الأقراص التي تم ضغطها باستخدام مادة رابطة (على سبيل المثال، جيلاتين gelatin أو هيدروكسي بروبيل ميثيل سيليلوز hydroxypropylmethyl cellulose)، مادة مزلقة مادة مخففة خاملة inert diluent ، مادة حافظة، مادة مشتتة (على سبيل المثال، جليكوليات نشا صوديوم sodium starch glycolate أو كربوكسي ميثيل سيليلوز صوديوم sodium carboxymethyl cellulose مرتبط على نحو تشابكي)، عامل فعال عند السطح أو عامل تشتيت. يمكن تحضير أقراص مقولبة من خلال عملية قولبة في آلة منسابة لخليط من مركب مسحوق يتم ترطيبه بمادة مخففة سائلة خاملة inert liquid diluent.

يمكن وضع الأقراص وصور الجرعة الصلبة الأخرى من التركيبات الصيدلانية من الاختراع الحالي مثل الملبسات والكبسولات والحبوب والجبيبات بشكل اختياري في شكل منتج بدرجات أو يتم تحضيرها مع تغليفات وغلافات، مثل تغليفات معوية وتغليفات أخرى معروفة في مجال الصياغة الصيدلانية. يمكن صياغته أيضاً بحيث يوفر إطلاق متحكم فيه بطيء من المكون الفعال هنا باستخدام هيدروكسي بروبيل ميثيل سيليلوز hydroxypropylmethyl cellulose في نسب متغيرة لكي يتم توفير شكل الإطلاق المطلوب، وقوالب بوليمرية أخرى وجسيمات شحمية و/أو كريات دقيقة. يمكن صياغتها لإطلاق سريع، على سبيل المثال، تكون مجففة بالتجميد. يمكن أن تكون معقمة، على سبيل المثال، من خلال الترشيح خلال مرشح يشتمل على بكتريا أو من خلال تضمين عوامل تعقيم في صورة تركيبات صلبة معقمة والي يمكن أن يتم تحللها في ماء معقم أو بعض الأوساط القابلة للحقن المعقم الأخرى بشكل فوري بعد الاستخدام. يمكن أن تشتمل تلك التركيبات بشكل اختياري أيضاً على عوامل ظليلية والتي يمكن أن تكون من تركيبا تطلق المكون (المكونات) الفعالة فقطا أو على نحو مفضل في جزء معينة من المسار المعدي المعوي في طريقة متأخرة. تشتمل أمثلة تركيبات داخلية والتي يمكن استخدامها على مواد بوليمرية وشموع. يكون المكون الفعال في صورة كبسولات دقيقة، وإذا كان ذكل مناسباً مع واحد أو أكثر من السواغات المصوفة فيما سبق. تقوم صور الجرعة السائلة الخاصة بالإعطاء عن طريق الفم من المركبات

الخاصةب الاختراع مشتملة على مستحلبات مقوبلة بشكل صيدلاني ومستحلبات دقيقة ومحاليل ومعلقات وأدوية شرب وإكسيرات. بالإضافة إلى المكون الفعال وصور الجرعة السائلة التي يمكن أن تشتمل على مادة مخففة خاملة والتي يتم استخدامها بشكل عام في المجال مثل، على سبيل المثال، الماء او المذيبات الأخرى، والعوامل القابلة للذوبان والمستحلبات مثل إيثيل ألكحول ethyl alcohol ، أيزو بروبيل ألكحول isopropyl alcohol وإيثيل كربونات ethyl carbonate وإيثيل أسيتات ethyl acetate وبنزيل ألكحول benzyl alcohol وبنزيل بنزوات benzyl benzoate وبروبيلين جليكول propylene glycol ، 1، 3- بيوتيلين جليكول 1,3- butylene glycol ، زيوت oils (على نحو خاص بذرة القطن وزيت الفول السوداني وزيت البذور وزيت الزيتون وزيت الخروع وزيوت السمسم) وجليسيرول glycerol وتترا هيدرو فيوريل ألكحول tetrahydrofuryl alcohol وبولي إيثيلين جليكول polyethylene glycols وإسترات حمض شحمي fatty acid esters من السوربيتان sorbitan وخلائط منها.

بالإضافة إلى المواد المخففة الخاملة، فإن التركيبات الفموية يمكن أن تشتمل على مواد مساعدة مثل عوامل ترطيب واستحلاب وعوامل تعليق وعوامل تحلية وعوامل إعطاء نكهة وعوامل تلوين وعوامل تعطير وعوامل حافظة.

يمكن أن تشتمل المعلقات بالإضافة إلى المركبات النشطة على عوامل تعليق مثل، على سبيل المثال، كحولات أيزو سيتياريل معالج بالإيثوكسيل ethoxylated isostearyl alcohols ، بولو أوكسي غيثيلين سوربيتول polyoxyethylene sorbitol وإسترات سوربيتات sorbitan esters وسيليلوز دقيق التبلر microcrystalline cellulose والومنيوم ميتا هيدروكسيد aluminum metahydroxide وبنتونيت bentonite وآجرا آجار agar-agar وصمغ الكثيراء tragacanth وخلائط منها.

يمكن تقديم صيغ خاصة بالإعطاء في المستقيم أو في المهبل مثل التحميلة والتي يتم تحضيرها من خلال خلط واحد أو أكثر من مركبات الاختراع الحالي مع واحد أو أكثر من سواغات غير مستثيرة مناسبة أو مواد حاملة تشتمل، على سبيل المثال، على زبدة كاكاو، وبولي إيثيلين جليكول وتحميلة شمع أو ساليسيلات والذي يكون صلباً عند درجة حرارة الرغفة ولكنه سائلاً في درجة حرارة الجسم وبالتالي ينصهر في المستقيم أو في فجوة المهبل ويطلق المركب الفعال.

تشتمل صيغ أو صور الجرعة الخاصة بالإعطاء عبر الجلد الموضعي من الأوليجيومر كما ت توفير هنا على مساحيق ومواد للرش ومراهم وعجائن وكريمات وغسولات وهلامات ومحاليل ورقعات ومواد مستنشقة. يمكن خلط الأوليجيومرات النشطة تحت ظروف تعقيم مع مادة حاملة مقبولة بشكل صيدلاني ومع أي مواد حافظة، ومحاليل منظملة ومادة دافعة والتي تكون مطلوبة. تكون المراهم والعجائين والكريمات وأنواع الهلام مشتملة، بالإضافة غلى المركب الفعال من الاختراع الحالي، على سواغات مثل دهون حيوانية ونباتية وزيوت ومواد شمعين وبرافين ونشا وصمغ كثيرات ومشتقات سيليلوز ومركبات بولي إيثيلين جليكلو polyethylene glycols ومركبات سيليكون silicones ومركبات بنتونيت bentonites وحمض سيليسيك silicic acid وتلك talc وأكسيد زنك zinc oxide أو خلائط منها.

يمكن أن تشتمل المساحيث ومواد الرش بالإضافة إلى ذلك، إلى أوليجيومرات من الاختراع الحالي وسواغات مثل اللاكتوز و التالك talc وحمض سيليسيك وهيدروكسيد ألومنيوم و وسيليكات كالسيوم calcium silicates ومسحوق بولي أميد polyamide أو خلائط من تلك المواد وأنواع رش يمكن أن تشتمل بشكل اختياري عى مواد دافعة تقليدية مثل كلورو فلورو هيدروكربونات chlorofluorohydrocarbons وهيدروكربونات hydrocarbons ليس بها اسبتدال متطايرة مثل، بيوتان butane وبروبان propane.

تمت للملصقات عبر الجدل إضافة ميزة خاصة بتوفير توصيل متحكم فيه خاص بالأوليجيومر الخاص بالاختراع الحالي للجسم. يمكن تحضير صور الجرعة المذكورة من خلال التحلل أو التشتيت الخاص بالأوليجيومر في وسط مناسب. يمكن أيضاً استخدام محسنات امتصاص لزيادة الارتجاع الخاص بعامل عبر الجلد. يمكن التحكم في معدل الارتجاع بواسطة إما توفير معدل خاص بغشاء التحكم أو تشتيت عامل في قالب بوليمر أو هلام من بين طرق أخرى معروفة في المجال.

يمكن أن تشتمل التركيبات الصيدلانية المناسبة لإعطاء عن غير طريق القناة الهضمية على واحد أو أكثر من الأوليجيومرات الخاصة بالاختراع في توليفة مع واحد أو أكثر من المحاليل المعقمة المقبولة بشكل صيدلاني متساوية التوتر أو المحاليل غير المائية أو المشتتات أو المعلقات أو المستحلبات أو المساحيق المعقمة والتي يمكن أن يتم إعادة تشكيلها في محاليل قابلة لحقن معقمة

أو مشتتات قبل استخدامها والتي يمكن أن تشتمل على سكريات وكحولات ومضادات أكسدة ومحاليل منظمة ومضادت بكتيرية وذوابات التي تقوم بتحويل الصيغة متساوية التوتر مع الدم من السواغ المقصود أو عوامل تعليق أو عوامل تغليظ قوام. تكون أمثلة المواد الحاملة المناسبة المائية وغير المائية التي يمكن استخدامها في التركيبات لاصيدلانية من الاختراع مشتملة على ماء، إيثانول، مركبات بوليول (مثل جليسيرول polyethylene glycol ، بروبيليلن جليكول propylene glycol وبولي إيثيلين جليكلول polyethylene glycol وما شابه ذلك) وخلائط مناسبة منها وزيوت نباتية مثل زيت الزيتون وإسترات عضوية غير قابلة للحقن مثل إيثيل أولييات ethyl oleate. يمكن الحصول على ميوعة مناسبة، على سبيل المثال، من خلال استخدام مواد حاملة مثل ليسيثين lecithin بواسطة الحفاظ على حجم الجسيم المطلوب في حالة التشتت ومن خلال استخدام مواد خافضة للتوتر السطحي surfactants.

يمكن أن تشتمل تلك التركيبات أيضاً على مواد مساعدة مثل مواد حافظة، وعوامل ترطيب وعوامل استحلاب وعوامل تشتيت. يمكن ضمان الوقاية من تأثير الكائنات الدقيقة عند الأوليجيومرات من خلال ضمان التضمين لعوامل مضادة للبكتريا مختلفة وعوامل مضادة للفطريات، على سبيل المثال، برابين paraben وكلورو بيوتانول chlorobutanol وحمض سوربيك فينول phenol sorbic acid وما شابه ذلك. يمكن أن يكون من المطلوب أيضاً أن يتم تضمين عوامل متساوية التوتر مثل السكريات وكلوريد الصوديوم sodium chloride وما شابه ذلك بداخل التركيبات. بالإضافة إلى ذلك، فإن امتصاص الصورة الصيدلانية القابلة للحقن يمكن أن يكون بواسطة تضمين عوامل والتي تقوم بتأخير الامتصاص مثل مونو سيتيارات أمونيوم aluminum monostearate وجيلاتين gelatin.

في بعض الحالات، لكي تتم زيادة تأثير العقار ، من المرغوب أن تتم تبطئة امتصاص العقار من الحقن تحت الجلد او بداخل العضلات. يمكن تحقيق ذلك من خلال استخدام معلق سائل من مادة متبلرة أو غير متبلرة بها قابلية ذوبان ضعيفة في الماء، من بين الطرق الأخرى المعروفة في المجال. يعتمد معدل امتصاص العقار بعد ذلك على معدل التحلل والذي يمكن بدوره أن يعتمد على حجم البللورة وصورة التبلر. وعلى نحو بديل، فإن تأخير الامتصاص الخاص بصورة عقار

يتم إعطاؤه عن غير طريق القناة الهضمية يتم تحقيقها من خلال التحلل أو تعليق العقار في مادة ناقلة زيتية oil vehicle.

يمكن أن يتم تحضير صور مخزون قابل للحقن من خلال تشكيل قوالب مكبسلة لدقيقة خاصة بالأوليجيومرات ذات الصلة في بوليمرات قابلة للتحلل الحيوي مثل بولي لاكتيد- بولي جليكوليد polylactide-polyglycolide. وبالاعتماد على نسبة الأوليجيومر إلى البوليمر، يمكن التحكم في طبيعة البوليمر المعين المستخدم ومعدل إطلاق البوليمر، تشتمل أمثلة البوليمرات القابلة للتحلل الأخرى على بولي (أورثو إستر) poly(orthoesters) وبولي (أنهيدريدات) poly(anhydrides). يمكن تحضير الصيغ القابلة للحقن في مستودع من خلال احتجاز العقار في جسيم دهني أو مستحلبات دقيقة والتي تكون متوافقة مع أنسجة الجسم.

عندما يتم إعطاء الأوليجيومرات من الاختراع الحالي في شكل مواد صيدلانية إلى أحد البشر أو الحيوانات يمكن إعطاؤها بذاتها أو في شكل تركيبة صيدلانية تشتمل، على سبيل المثال، على 0.1 إلى 99٪ (ويفضل أكثر من 10 إلى 30٪) من المكون الفعال في توليفة مع مادة حاملة مقبولة بشكل صيدلاني.

وكما تمت ملاحظته أعلاه فإن الصيغ أو المستحضرات من الاختراع الحالي يمكن أن يتم إعطاؤها عن طريق الفم أو عن غير طريق القناة الهضمية أو بشكل موضعي أو في المستقيم. يتم إعطاؤها بشكل نمطي في صور مناسبة لكل مسار إعطاء. على سبيل المثال، يتم إعطاؤها في أقراص أو في صورة كبسولة من خلال الحقن، الاستنشاق وغسول العين والمراهم والتحاميل suppositories إلخ ويتم الإعطاء عن طريق الحقن أو التسريب أو الاستنشاق والإعطاء الموضعي بواسطة غسول أو مرهم والإعطاء في المستقيم عن طريق التحاميل .

تشير العبارات "الإعطاء حقنا parenteral administration " و "الإعطاء عن غير طريق القناة الهضمية administered parenterally " كما تم استخدامه هنا إلى طرق الإعطاء خلاف الإعطاء المعوي والإعطاء الموضعي topical administration وعلى نحو عادي من خلال الحقن والذي يشتمل، بدون حصر على الإعطاء في الوريد intravenous أو بداخل العضلات intramuscular أو بداخل الشريان intraarterial أو بداخل الجافية intrathecal أو في

الكبسولة أو بداخل الحجاج intraorbital أو في القلب intracardiac ، عبر الجلد intradermal ، في البريتون intraperitoneal ، وعبر الرغام transtracheal أو تحت الجلد subcutaneous أو تحت البشرة subcuticular أو بداخل المفصل intraarticular أو تحت المحفظة subcapsular أو تحت العنكبوتية subarachnoid ، أو بداخل النخاع intraspinal والحقن بداخل الفم intrasternal injection وبالتسريب infusion.

تشير المصطلحات "الإعطاء المجموعي"، "الإعطاء الذي يعم الجسم كله"، "الإعطاء الطرفي" ، "الإعطاء المحيطي" من مركب أو عقار أو أي مادة أخرى بشكل مباشر بداخل الجهاز العصبي المركزي بحيث تدخل إلى أجهزة المريض وبالتالي تخضع للأيض وعمليات مشابهة أخرى، على سبيل المثال، الإعطاء تحت الجلد.

وعلى الرغم من ذلك، فغن مسار الإعطاء تم ايختراه ويمكن استخدام أوليجيومرات الاختراع الحالي في صورة هيدرات مناسبة و/أو تركيبات صيدلانية من الاختراع والتي يمكن أن تتم صياغتها في صورة جرعة مقبولة بشكل صيدلاني والتي يمكن أن تكون عبارة عن طرق تقليدية معروفة لذوي المهارة في المجال. يمكن أن تتنوع مستويات الجرعة الفعلية من الكونات لافعالة في تركيبات خاصة بالاختراع بحيث يتم الحصول على المقدار الخاص من المكون الفعال الذي يكون فعالاً لتحقيق الاستجابة العلاجية المطلوبة لمريض معين مع تركيبة وطريقة الإعطاء بدون السمية غير المطلوبة لمريض.

سوف يعتمد مستوي الجرعة المناسب على العديد من العوامل التي تشتمل على النشاط الخاص بأوليجيومر معين مستخدم من الاختراع الحالي أو إستر أو ملح أو أميد منه ومسار الإعطاء وزمن الإعطاء ومعدل الإفراز أو الإيض لأوليجيومر معين يتم استخدامه ، ومعدل ومدى الامتصاص ومدة المعالجة وعقاقير أخرى ومركبات مشتركة و/أو مواد يتم استخداما في توليفة مع أوليجيومر مستخدم معين، وعمر وجنس ووزن والحالة والصحة العامة للمريض والتاريخ الطبي السابق الخاص بالمريض المراد معالجته وما شابه ذلك م عوامل معروفة بشكل جيد في المجالات الطبية.

يمكن أن يحدد الفيزيائي أو البيطري ذي المهارة العادية في المجال ويصف الكمية الفعالة الخاصة بتركيبة صيدلانية مطلوبة. على سبيل المثال، فإن الفيزيائي أو البيطري يمكن أن يبدأ جرعات من

المركبات الخاصة بالاختراع المستخدمة في التركيبة الصيدلانية عند مستويات أقل من تلك المطلوبة لكي يتم تخفيف التأثير العلاجي المطلوب وتزيد تدريجياً من الجرعة حتى تحقيق التأثير المطلوب. وبصفة عامة فإن الجرعة اليومية المناسبة من المركب الخاص بالاختراع تكون عبارة عن تلك الكمية الخاصة بالمركب والتي تكون جرعة فعالة أقل لإنتاج تأثير علاجي. تعتمد الجرعة الفعالة المذكورة بصفة عامة على عوامل تم وصفها أعلاه. وبصفة عامة فإن الجرعات بداخل الفم أو بداخل الوريد أو بداخل البطين والمخ وتحت الجلد من المركبات الخاصة بالاختراع لمريض عندما يتم استخدامه له تأثيرات موضح والتي تكون متراوحة من حوالي 0.0001 إلى حوالي 100 مجم لكل كيلو جرام من وزن الجسم في اليوم.

وإذا كان ذلك مطلوباً فإن الجرعة اليومية الفعالة من المركب الفعال يمكن أن يتم إعطاؤها عند جرعتين أو ثلاثة أو أربعة أو خمسة أو ست أو أكثر من الجرعات الفرعية على نحو منفصل عند فواصل مناسبة خلال اليوم، وعلى نحو اختياري في صور جرعة وحدة. في حالات معينة، فإن الجرعة يتم إعطاؤها كل يوم. في نماذج معينة، فإن الجرعة تكون عبارة عن واحدة أو أكثر من جرعات الإعطاء كل 2، 3، 4، 5، 6، 7، 8، 9، 10، 11، 12، 13، 14 يوماً، أو كل 1، 2، 3، 4، 5، 6، 7، 8، 9، 10، 11، 12 أسبوع ، أو كل 1، 2، 3، 4، 5، 6، 7، 8، 9، 10، 11، 12 شهراً طبقاً لما هو مرغوب للحصول على التعبير المطلوبب من بروتين ديستروفين. يمكن إعطاء جزيئات حمض نووي للخلايا من خلال العديد من الطرق المعروفة للأشخاص العاديين في المجال بما في ذلك، ليس على سبيل الحصر، الكبسلة في الجسيمات الشحمية من خلال الارتحال الأيوني أو من خلال التضمين بداخل نواقل أخرى مثل، أنواع هلام مائية ومركبات سيكلو ديكستيرين وكبسولات دقيقة قابلة للتحلل البيولوجي و وكريات دقيقة لاصقة بشكل حيوي كما هو مطلوب هنا ومعروفة في المجال. في نماذج معينة، فإن تقنية المعالجة بمستحلب دقيق يمكن استخدامها لتحسين الإتاحة الحيوية الخاصة بعوامل صيدلانية آلفة للشحم (غير قابلة للذوبان في الماء). تشتمل الأمثلة على :

Trimetrine (Dordunoo, S. K., et al., Drug Development and Industrial Pharmacy, 17(12), 1685-1713, 1991 and REV 5901 (Sheen, P. C., et al., J Pharm Sci 80(7), 712-714, 1991) . من بين الفوائد الأخرى توف المعالجة

بمستحلب دقيق إتاحة حيوية محسنة من خلال التوجيه التفاضلي للامتصاص لنظام لمفاوي بدلاً من النظام الدوري وبالتالي المرور عبر البد ومنع إتلاف المركبات في التدوير في الكبد والغدة الصفراوية.

في أحد سمات الاختراع، تشتمل الصيغ على ميزيلات تم توفيرها من أوليجيومر كما تم توفيره هنا ومادة حاملة واحدة على الأقل آلفة للدهون والماء والتي تكون فيها الميزيلات لها قطر متوسط أقل من حوالي 100 نانو متر. توفر نماذج مفضلة بشكل أخير ميزيلات لها قطر متوسط أقل من حوالي 50 نانو متر وحتى في نماذج أكثر تفضيلاً فإنها توفير ميزيلات لها قطر متوسط أقل من حوالي 30 نانو متر أو حتى أقل من حوالي 20 نانو متر.

وعلى الرغم من أن المواد الحاملة الآلفة للماء والدهون المناسبة يتم استخدامها، تكون المواد الحاملة المفضلة حالياً بصفة عامة عبارة عن تلك التي لها حالة أمان تم التعرف عليها بشكل عام Generally-Recognized-as-Safe (GRAS) والتي يمكن أن يكون لكل منها قابلية ذوبان للمركب الخاص بالاختراع الحالي والاستحلاب الدقيق له في مرحلة تالية عندما يصبح المحلول في تلامس مع طور الماء المعقد complex water phase (مثل ذلك الموجود في القناة المعدية المعوية). وعلى نحو عادي، فإن المكونات الآلفة للماء والدهون التي تفي بالمتطلبات يكون لها قيم HLB (توازن ألفة للماء وألفة للشحوم hydrophilic to lipophilic balance) من 2-20 وتشتمل البينات على شقوق أليفاتية مستقيمة في مدى من C-6 إلى C-20. تكون الأمثلة عبارة عن مركبات بولي إيثيلين – جليسريدات شحمية معالجة بالجليكول polyethylene-glycolized fatty glycerides ومركبات جليكول بولي إيثيلين polyethylene glycols.

تشتمل أمثلة المواد الحاملة مزدوجة الألفة للماء والشحم على جليسريدات حمض شحمي معالجة ببولي إيثيلين جليكول أحادية مشبعة monounsaturated polyethyleneglycolyzed fatty acid glycerides مثل تلك التي تم الحصول عليها من زيوت نباتية مختلفة معالجة بالهيدروجين hydrogenated بشكل جزئي أو بشكل كامل. يمكن أن تتكون تلك الزيوت من جليسريدات ثلاثية وثنائية وأحادية من حمض شحمي tri-, di-, and mono-fatty acid glycerides وإسترات بولي ايثيلين جليكول أحادية وثنائية di- and mono-polyethyleneglycol esters من أحماض شحمية مناظرة مع تركيبة حمض شحمي مفضلة على نحو خاص والتي تشتمل على

حمض كابريك capric acid 4-10، حمض كابريك 3-9 ، حمض ليوريك lauric acid 40-50 وحمض ميريستيك myristic acid 14-25، وحمض بالمتيك palmitic acid 4-14 وحمض سياتريك stearic acid 5- 15٪. تشتمل فئة مفيدة أخري من المواد مزدوجة الألفة على مركبات سوربيتان sorbitan تشتمل على مركبات سوربيتات معالجة بالاستر بشكل جزئي و/أو سوربيتول، مع أحماض شحمية أحادية -غير مشبعة أو مشبعة (مجموعات SPAN)، أو نظائر معالجة بإيثوكسي مناظرة (مجموعات TWEEN) . يمكن أن تكون المواد الحاملة الآلفة للشحوم المتاحة تجارياً مفيدة والتي تشتمل على مجموعات جيلوسير Gelucire ، لابرافيل Labrafil ، لابراسول Labrasol ، أو لاروجليكول Lauroglycol (تم تصنيعها كلها وتوزيعها بواسطة Gattefosse Corporation, Saint Priest, France)، أوليات -أحادية - PEG، و PEG -ثنائي- أوليات PEG-mono-oleate, PEG-di-oleate و PEG - أحادي-ليورات PEG-mono-laurate and di-laurate ، وليسيثين Lecithin ، بولي سوربات Polysorbate 80 ، إلخ (تم الانتاج والتوزيع بواسطة عدد من الشركات في الولايات المتحدة وحول العالم).

في نماذج معينة فإن التوصيل يمكن أن يتم باستخدام جسيمات شحمية، كبسولات في حجم النانو ، جسيمات دقيقة، كريات دقيقة جسيمات شحمية وحويصلات وما شابه ذلك لغدخال تركيبات من الاختراع الحالي في خلايا عائلة مناسبة. وعلى نحو خاص فإن تركيبات الاختراع الحالي يمكن صياغتها للتوصيل إما في شكل كبسولة أو في شكل جسيم شحم، في شكل جسيم دهني أو في شكل حويصلة او في شكل كريات في حجم النانو أو جسيم في حجم النانو أو ما شابه ذلك. يمكن إجراء الصياغة واستخدام نواقل التوصيل بواسطة تقنيات معروفة وتقليدية.

تكون البوليميرات الآلفة للماء المناسبة للاستخدام في الاختراع الحالي عبارة عن لك التي تكون قابلة للذوبان في الماء بسهولة ويتم ربطها على نحو تساهمي مع شحم مشكل للحويصلات والتي يتم تحملها في الكائن الحي بدون تأثيرات سامة (أي تلك المتوافقة بشكل حيوي). تشتمل البوليمرات المناسبة على بولي إيثيلين جليكول polyethylene glycol (PEG)، بولي لاكتيك polylactic (التي يطلق عليها ايضاً بولي لاكتيد polylactide) وحمض بولي جلايكوليك polyglycolic acid (يطلق عليها ايضاً مركب بولي جليكوليد polyglycolide)، بوليمر مشترك من حمض

بولي لاكتيكيد بولي جلاكوليك polylactic–polyglycolic acid وكحول بولي فينيل polyvinyl alcohol. في نماذج معينة، يكون للبوليمرات وزن جزيئي من حوالي 100 أو 120 دالتون وحتى 5000 أو 10000 دالتون أو من حوالي 300 دالتون إلى حوالي 5000 دالتون. في نماذج أخرى، فإن البوليمر يكون عبارة عن بولي إيثيلين جليكول به وزن جزيئي من حلوالي 100 إلى حوالي 5000 دالتون أو له وزن جزيئي من حوالي 300 إلى حوالي 5000 دالتون. في نماذج معينة، يكون البوليمر عبارة عن بولي إيثيلين جليكول من 750 دالتون. يمكن أن يتم تحديد البوليمرات من خلال عدد من المونومرات بداخلها؛ يستخدم النموذج المفضل للاختراع الحالي بوليميرات عند الأقل حوالي ثلاثة مونومرات ، مثل بوليمرات بولي إيثيلين جليكول تتكون من ثلاثة مونومرات monomers (حوالي 150 دالتون).

يمكن ان يكون هنا بوليمرات آلفة للماء والتي تكون مناسبة للاستخدام في الاختراع الحالي والتي تشتمل على بولي فينيل بيروليدون polyvinylpyrrolidone ، بولي مثوكسازولين polymethoxazoline ، وبولي إيثيلين أوكازولين polyethyloxazoline ، وبولي هيدروكسي بروبيل ميث أكريل أميد polyhydroxypropyl methacrylamide ، وبولي ميثو أكريل أميد polymethacrylamide ، وبولي داي ميثيل أكريل أميد polydimethylacrylamide ومركبات سيليلوز celluloses مشتقة مثل هيدروكسي ميثيل سيليلوز hydroxymethylcellulose أو هيدروكس إيثيل سيليلوز hydroxyethylcellulose.

في نماذج معنية، فإن صيغة الاختراع الحالي تشتمل على بوليمر متوافق بشكل حوي تم اختياره من مجموعة مكونة من بولي أميدات polyamides ، بولي كربونات polycarbonates ، وبولي أكليلين polyalkylenes وبوليميرات من إستارت أكريليك وإسترات ميث أكريليك acrylic and methacrylic esters وبوليميرات بولي فينيل polyvinyl polymers ، ومركبات بولي جلايكوليد polyglycolides ومركبات بولي سيلوكسان polysiloxanes ومركبات بولي يوريثان polyurethanes وبوليمرات مشتركة منها، مركبات سيليلوز celluloses وبولي بروبيلين polypropylene ومركب بولي إيثيلين polyethylenes وبوليستيرين polystyrene وبوليمرات polymers من حمض لاكتيك lactic acid وحمض جلايكوليك glycolic acid وبولي أنهيدريد polyanhydrides وإسترات (بولي أورثو) poly(ortho)esters ، وبولي (حمض بيوتيك)

poly(butic acid) وبولي (حمض فالريك) poly(valeric acid) ، وبولي (لاكتيك كابرولاكتون مشترك) poly(lactide-co-caprolactone) وبولي سكاريدات polysaccharides وبروتينات وأحماض بولي هيلورونيك polyhyaluronic acids ، وبولي أسيانو أكريلات polycyanoacrylates ، ووتوليفات وخلائط أو بوليمرات مشتركة منها.

تكون مركبات سيكلو ديكستيرين Cyclodextrins عبارة عن أوليجيو سكاريدات cyclic oligosaccharides تتكون من 6، 7، أو 8 وحدات جلوكوز glucose units ، تم تصميمها بواسطة الأحرف اللاتينية α، β، أو γ على الترتيب. يتم ربط وحدات الجلوكوز بواسطة α-1 ، روابط 4- جلوكوسيديك α-1,4-glucosidic bonds. ونتيجة المعلومات المشتركة في تشاكلات كرسية من وحدات السكر ومجموعات الهيدروكسيل الثانوية secondary hydroxyl (C-2 ، C-3) والتي تكون موجودة على جانب من الحلقة حيث أن كل مجموعات الهيدوركسيل الأولية primary hydroxyl عند C-6 والتي تمت إحاطتها عند جانب آخر. ونتيجة لذلك، فإن الأوجه الخارجية تكون عبارة عن غير آلفة للماء والتي تكون عبارة سيكلو ديكسترين cyclodextrins قابل للذوبان في الماء. وعلى العكس من ذلك، تكون فجوات سيكلو ديكستيران غير آلفة للماء حيث أنها تكون على خط بواسطة الهيدروجين من الذرات C-3 و C-5 وبواسطة مركبات أوكسجين مشابهة لإيثر. تسمح تلك القوالب بالتعقيد مع صور متنوعة من مركبات غير آلفة للماء والتي تشتمل، على سبيل المثال على مركبات ستيرويد steroid مثل 17α -إستراديول 17α-estradiol (انظر، على سبيل المثال، van Uden et al. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 38:1-3-113 (1994)). يتم إجراء التعقيد من خلال تفاعلات Van der Waals ومن خلال تشكيل روابط الهيدروجين. لمراجعة عامة للخصائص الكيميائية لسيكلو ديكستيرين، انظر، Wenz, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 33:803-822 (1994) .

تعتمد الخصائص الكيميائية والفسيولوجية الخاصة بمشتقات سيكلو ديكستيرين بشكل قوي على نوع ودرجة الاستبدال. على سبيل المثال، قابلة الذوبان في أمداء مائية من الجزء غير القابل للذوبان (على سبيل المثال، تراي أسيتيل -بيتا - سيكلو ديكستيرين triacetyl-beta-cyclodextrin) إلى 147 ٪ من قابلية الذوبان (وزن/حجم) (G -2-بيتا- سيكلو ديكستيرين G-2-beta-cyclodextrin). بالإضافة إلى ذلك تكون تلك الصور قابلة للذوبان في العديد من

المذيبات العضوية. توفر خصائص سيكلو ديكستيرين قابلية التحجم في العديد من مكونات الصيغة من خلال زيادة أو تقليل قابلية الذوبان.

هناك العديد من مركبات سيكلو ديكستيرين وطرق التحضير التي تم وصفها. على سبيل المثال، المتغير (I)، .et al (البراءة الأمريكية رقم 3,453,259) و Gramera, et al. (البراءة الأمريكية رقم 3,459,731) والتي تصف مركبات سيكلو ديكستيرات إليكترونية عصبية described electroneutral cyclodextrins. تشتمل مشتقات أخرى على مركبات سيكلو ديكستيرين مع خصائص كاتيونية cationic [(II) Parmeter ، البراءة الأمريكية رقم 3,453,257] مركبات سيكلو ديكستيرين مرتبطة على نحو تشابكي غير قابلة للذوبان Solms (البراءة الأمريكية رقم 3,420,788) ومركبات سيكلو ديكستيين مع خصائص أنيونية anionic [(III) Parmeter)، والبراءة الأمريكية رقم 3,426,011]. ومن بين مشتقات سيكلو ديكستيرين الأخرى، مع الخصائص الأنيونية، فإن الأحماض الكربوكسيلية carboxylic acids وأحماض الفسفور phosphorous acids وأحماض فوسفينو phosphinous acids وأحماض فوسفونيك phosphonic acids وأحماض فسفوريك phosphoric acids وأحماض ثيو فسفونيك thiophosphonic acids واحماض ثيو سوفينيك thiosulphinic acids وأحماض سولفونيك sulfonic acids قد تم تذييلها مع مركب سيكلو ديسترين اساسي (انظر،،(III) Parmeter ، أعلاه). بالإضافة إلى ذلك، فإن مشتقات سيكلو ديسترين إيثر سولفو ألكيل sulfoalkyl ether cyclodextrin قد تم وصفها بواسطة .Stella, et al (البراءة الأمريكية رقم 5,134,127).

تتكون الجسيمات الدهنية من غشاء ثنائي الطبقة شحمي على الأقل يشتمل على حجيرة داخلية مائية. جسيمات يمكن تهيئتها من خلال نوع الغشاء وحجمه. حويصلات أحادية الصفائح Small unilamellar vesicles (SUVs) التي لها غشاء منفرد وله مدى نمطي بين 0.02 و 0.05 ميكرو متر في القطر؛ وحويصلات أحادية الصفائح كبيرة large unilamellar vesicles (LUVS) التي تكون بشكل نمطي أكبر من 0.05 ميكرو جرام. يكون لحويصلات كبيرة صفائحية أوليجيومرية وحويصلات متعددة الصفائح التي لها في الغالب طبقات غشاء مشتركة المركز أكبر بشكل نمطي من 0.1 ميكرو متر. تكون الجسيما الشحمية التي لها أغشية غير مركزية ، أي، حويصلات أصغر متعددة موجودة بداخل حويصلات أكبر والتي يطلق عليها حويصلات متعددة.

تتعلق سمة من الاختراع الحالي بصيغ تشتمل على جسيمات شحمية تشتمل على أوليجيومر من الاختراع الحالي، حيث أن الغشاء الجسيمي يتم تشكيله لتوفير سيم به قدرة حمل متزايدة. وعلى نحو نمطي أو بالإضافة إلى ذلك، فإن المركب الخاصة بالاختراع يمكن أن يتم تضمينه بداخل أو احتفاظه على طبقة ثنائية من جسيم شحمي من الجسيم الشحمي. وعلى نحو بديل أو بالإضافة إلى ذلك، فإن مركب الاختراع يمكن أن يتم تضمينه بداخل أو يتم امتصاصه على طبقة ثنائية من الجسيم الشحمي من جسيم شحمي. يمكن أن يتم تكامل أوليجيومر الاختراع الحالي باستخدام مادة خافضة للتوتر السطحي شحمية ويمكن حملها بداخل حيز داخلي للجسيم الشحمي؛ في تلك الحالات، فإن غشاء الجسيم الشحمي تتم صياغته لمقاومة التأثيرات التدميرية الخاصة بتكتل مادة خافضة لتوتر السطح فعالة.

وطبقاً لأحد النماذج من الاختراع الحالي فإن الطبقة الثنائية من الشحم من الجسيم الشحمي تشتمل على شحومات تم اشتقاقها مع بولي إيثيلين جليكول (PEG)، بحيث أن سلاسل PEG تمتد من السطح الداخلي للطبقة الثانية من الشحم بداخل الحيز الداخلي المكبسل بواسطة جسيم شحمي ويمتد من الجزء الخارجي من الطبقة الثانية للشحم إلى لبيئة المحيطة.

تكون العوامل النشطة الموجودة بداخل الجسيمات الشحمية من الاختراع في الصورة القابلة للذوبان. تكون تكتلات المادة الخافضة للتوتر السطحي والعامل الفعال (مثل المستحلبات أو المزيلات المشتملة في عامل فعال محل الاهتمام) والذي يمكن احتجازه بداخل حيز داخلي من الجسيمات الشحمة طبقاً للاختراع الحالي. تؤثر المادة الخافضة للتوتر السطحي في تشتتي وقابلية الذوبان للمكون الفعال، ويمكن أن يتم اختيارها من مادة خافضة للتورت السطحي أليفاتي أو سيكول اليفاتية أو طريقة والتي تشتمل، على سبيل المثال لا الحصر، على مركبات ليزو فوسفاتيديلن كولين (LPGs) من أطوال سلسلة متنوعة (على سبيل المثال، من حوالي C14 إلى حوالي C20). يمكن أيضاً استخدام شحوم مشتقة من البوليمر مثل شحومات PEG التي يتم استخدامها من تكوين ميزيلات حيث أنها تؤثر في تثبيط اندماج الميزيلات والغشاء وتكون في شكل إضافة لبوليمر بالنسبة لتناقصات من الجزيئات من المادة الخافضة للتوتر السطحي من CMC من المادة الخافضة للتوتر السطح والتي تساعد في تكوين الميزيلات. تكون الصور المفضلة عبارة عن مواد

خافضة للتوتر مع CMOs في أمداء جزيئية دقيقة؛ ومواد خافضة للتوترر من CMC والتي يتم استخدامها لتحضير ميزيلات يتم احتجازها بداخل الجسيمات الشحمية من الاختراع الحالي.

يمكن تحضير الجسيمات طبقاً للاختراع من خلال أي من التقنيات المتعددة المعروفة في المجال، انظر، على سبيل المثال، البراءة الأمريكية رقم 4,235,871 ونشرات الـ بي سي تي من الطلب الدولي رقم 14057/96؛ New RRC, Liposomes: A practical approach, IRL Press, Oxford (1990), pages 33-104; Lasic DD, Liposomes from physics to applications, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1993 . على سبيل المثال، فإن الجسيمات الشحمية من الاختراع الحالي يمكن تحضيرها من خلال شحوم انتشارية تم اشتقاقها باستخدام بوليمر غير آلف للماء بداخل جسيمات شحمية تم إنشاؤها، على سبيل المثال، عن طريق تعريض الجسيمات التي تم إجرؤها مع الميزيلات المكونة من بوليمرات مطعمة بالشحم عند تركيزات شحم مناظرة لنسبة مئوية بالمول نهائية من شحم مشتق والذي يتم وصفه في الشحم. يمكن تشكيل الجسيمات الشمحية المشتملة على بوليمر آلف للماء من خلال التجانس، ومعالجة بالهيدرات في مجال الشحم أو تقنيات الاستخلاص كما هو موضح في المجال.

في إجراء صيغة توضيحة آخر، فإن المكون الفعال قد تم تشتيته أولاً من خلال المعالجة بالموجات في ليزو فوسفاتيديل كولين أو أي مادة خافضة للتوتر السطحي CMC منخفضة آخري (بما في ذلك شحوم مطعمة من البوليمر) والتي تكون قابلة للتحلل بسرعة وغير آلفة لماء. تكون معلقات الميزيلات الناتجة من الكون الفعال قد تم استخدامها بعد ذلك في إعادة المعالجة بالهيدرات لعينة شحم مجففة والتي تشتمل على نسبة مئوية بالمول مناسبة من شحم مطعم بالبوليمر أو كوليستيرول. يكون للشحم معلق عامل فعال والذي يتم تشكيله بعد ذلك في جسيمات شحمية باستخدام تقنيات بثق كما هو معروف في المجال وينتج عنها جسيمات تم فصلها من محلول غير مكبسل من خلال فصل عمودي قياسي.

في واحدة من سمات الاختراع الحالي، فإن الجسيمات الشحمية يتم تحضيرها بحيث يكون لها أحجام متجانسة إلى حد كبير في مدى حجمي تم اختياره. تشتمل طريقة ضبط حجم مناسب على بثق ملق مائي من الجسيمات بداخل مجموعات من أغشية لابولي كروبنات التيها لها صورة منتظمة لحجم الثقب وحجم ثقب من الغشاء يكون مناظراً بشكل كبير لأحجام أكر من الجسيمات

الشحمية التي تم إنتاجها من خلال البثق خلال الغشاء المذكور، انظر، على سبيل المثال، البراءة الأمريكية رقم 4,737,323 (12 إبريل 1988). في نماذج معينة، فإن المواد المتفاعلة مثل DharmaFECT® و Lipofectamine® يمكن استخدامها لإنتاج بولي نيوكليوتيدات polynucleotides أو بروتينات بداخل الخلايا.

تعتمد خصائص إطلاق الصيغة الخاصة بالاختراع الحالي على مادة كبسلة، تركيز عقار تمت كبسلته، ووجود محددات إطلاق. على سبيل المثال، فإن الإطلاق يمكن إجراؤه عند الرقم الهيدروجيني بالاعتماد، على سبيل المثال، على استخدام تغليف حساس للرقم الهيدروجيني pH الذي يطلق فقط عند رقم هيدروجيني منخفض كما هو الحال في المعدة أو عند رقم هيدروجيني عال، كما هو الحال في الأمعاء. يمكن استخدام التغليف الداخلي لمنع الإطلاق من الحدوث حتى المرور خلال المعدة.يمكن استخدام التغليفات المتعددة أو خلائط من السيانيد المكبسل في مواد مختلفة للحصول على الإطلاق الأولي في المعدة ويلي ذلك الإطلاق التالي في الأمعاء. يمكن أن تتم معالجة الإطلاق من خلال تضمين أملاح أو عوامل تشكيل ثقب والتي تزيد من امتصاص الماء أو إطلاق العقار من خلال التشتت من الكبسول. يمكن أيضاً استخدام السواغات التي تعدل قابلية الذوبان من لاعقار والتي يمكن استخدامها للتحكم في معدل الإطلاق. يمكن أيضاً تضمين عقاقير التي تحسن من التحلل الخاص بقالب أو الإطلاق من قالب. يمكن إضافتها إلى العقار أو إضافتها في شكل مرحلة منفصلة (أي في شكل جسيمات) أو يمكن أن يتم تحللها في طور البوليمر بالاعتماد على المركب. في معظم الحالات، فإن المركب يجب أن يكون بين 0.1 وثلاثين ٪ (وزن/وزن من البوليمر). تشتمل أنواع محسنات التحلل على أملاح غير عضوية مثل كبريتات أمونيوم ammonium sulfate وكلوريد أمونيوم ammonium chloride ، أحماض عضوية مثل حمض السيتريك citric acid وحمض بنزويك benzoic acid وحمض أسكوربيك ascorbic acid وقواعد غير عضومية مثل كربونات صوديوم sodium carbonate وكربونات بوتاسيوم potassium carbonate وكربونات كالسيوم calcium carbonate وكربونات زنك zinc carbonate وهيدروكسيد زنك zinc hydroxide وقواعد عضوية مثل كبريتات بروتامين protamine sulfate ، سبيرمين spermine وكوالين choline وإيلانول أمينن ethanolamine وداي إيثانول أمين diethanolamine وتراي إيثانول أمين triethanolamine

ومواد خافضة للتوتر السطح مثل ®Tween و ®Pluronic . تقوم عوامل تشكيل الثقوب بإضافة بنيات دقيقة للقوالب (أي المركبات القابلة للذوبان في الماء مثل أملاح غير عضوية وسكريات sugars) والتي تمت إضافتها في شكل جسيمات. يكون المدى النمطي بين واحد وثالثة وثلاثين بالمائة (وزن/ وزن من البوليمر polymer).

يمكن معالجة الامتصاص من خلال تغيير زمن الوجود الخاص بالجسيمات في الأحشاء. يمكن أن يتم تحقيق ذلك، على سبيل المثال، من خلال تغليف الجسيم باستخدام أو اختيار مادة مكبسلة ، وبوليمر لاصق جسيمي. تشتمل الأمثلة على معظم البوليمرات التي لها مجموعات كربوكسيل carboxyl مثل شيتوسان chitosan ، سيليلوز وعلى نحو خاص بولي أكريلات polyacrylates (كما تم استخدامها هنا، تشير بولي أكريلات غلى بوليمرات تشتمل على مجموعات أكريلات ومجموعات أكريلات معدلة مثل سيانو أكريلات cyanoacrylates وميث أكريلات methacrylates).

يمكن صياغة الأوليجيمر بحيث يتم تضمينه بداخل أو تتم تهيئته للإطلاق من خلال وسيلة جراحية أو طبيقة أو غريسة. في سمات معينة فإن الغريسة يمكن أن يتم تغليفها أو معالجتها باستخدام أوليجيومر. على سبيل المثال، مركبات جلات مائية، أو بوليمرات أخرى مثل بوليميرات متوافقة على نحو حيوي و/أو بوليمرات قابلة للتحلل الحيوي التي يتم استخدامها لتغليف الغريسة باستخدام تركيبات من الاختراع الحالي (أي، تركيبة يمكن أن تتم تهيئتها لاستخدامها مع وسيلة طبيعة باستخدام جلات مائية أو أي بوليمر آخر). تكون البوليمرات والبوليمرات المشتركة الخاصة بالتغليف خاصة بوسائل طبية مع عامل يكون معروفاً في المجال. تشتمل أمثلة المواد المزروعة ، على سبيل المثال لا الحصر على الدعامات ودعامات مخففة للعقار وخيوط لجراحة ورقع جراحية والقثطرات الوعائية وقثطرات خاصة بالديلزة ورقع وعائية وصمامات قلب صناعية وجهاز تنظيم ضربات القلب، وأجهزة تنظيم ضربات القلب الاليكترونية وإبر IV needles وأجهزة خاصة بضبط العظم والتشكيل مثل المسامير واللوالب والأطباق ووسائل أخرى وقوالب أنسجة صناعية خاصة بالتئام الجروح.

بالإضافة إلى ذلك، فإن الطرق التي تم توفيرها هنا والأوليجومرات الخاصة بالاستخدام طبقاً للاختراع يمكن صياغتها للإعطاء بأي طريقة مناسبة للاستخدام في البشر أو الأدوية البيطرية من

خلال التشابه مع مواد دوائية أخرى. يمكن أن يتم إعطاء أوليجيومرات مضاد للحس بمفردها أو في توليفة مع استراتيجيات علاجية في معالجة الضمور العضلي، مثل زراعة الأرومة العضلية، علاجات خلية جذعية وإعطاء مضادات حيوية من أمينو جلايكوسيد aminoglycoside ، مثبطات بروتياسوم proteasome وعلاجات تنظيم فائق (على سبيل المثال، تنظيم من يتروفين utrophin ، وثنائي جين جسدي من ديستروفين dystrophin).

يُقصد من مسارات الإعطاء الموصوفة هنا فقط بأنها استرشادات للمتمرس الجيد في المجال بحيث يكون قادراً على التحديد بسهولة لمسار الإعطاء المناسب وأي جرعات خاصة بحيوان معين وحالة معينة. وقد تم توضيح العديد من الطرق الخاصة بإدخال مادة دينية جديدية فعالة في الخلايا، سواء في المعمل وفي الكائن الحي (Friedmann (1989) Science, 244:1275-1280). تشتمل تلك الطرق على تكامل الجين المراد التعبير عنه في فيروسات بطيئة معدلة (Friedmann (1989) supra; Rosenberg (1991) Cancer Research 51(18), suppl.: 5074S-5079S)؛

والتكامل بداخل نواقل فيروسية غير بطيئة (على سبيل المثال، نواقل فيروسية مرتبطة بشكل غدي) (Rosenfeld, et al. (1991) Science, 252:431-434)؛ أو توصيل جين انتقالي مرتبطة مع عنصر معزز -محسن غير متجانس من خلال جسيمات شحمية (Friedmann (1989), supra; Brigham, et al. (1989) Am. J. Med. Sci., 298:278-281; Nabel, et al. (1990) Science, 249:1285-1288; Hazinski, et al. (1991) Am. J. Resp. Cell Molec. Biol., 4:206-209; and Wang and Huang (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 84:7851-7855)؛ واقتران مع نظام خاص بمركب ترابيط، أنزمة ناقل تعتمد على الكاتيون (Wu and Wu (1988) J. Biol. Chem., 263:14621-14624) أو استخدام DNA مجرد، نواقل التعبير (Nabel et al. (1990), supra); Wolff et al. (1990) Science, 247:1465-1468). ينتج الحقن المباشر لجينات انتقالية في النسيج فقط تعبير موضعي (Rosenfeld (1992) supra); Rosenfeld et al. (1991) supra; Brigham et al. (1989) supra; Nabel (1990) supra; and Hazinski et al. (1991) supra)) .

قامت مجموعة The Brigham et al. group (Am. J. Med. Sci. (1989) 298:278-281 و Clinical Research (1991) 39 (abstract) تقرير نقل العدوى في الكائن الحي فقط في رئات الفئران بعد أي إعطاء في الوريد أو في القصدة الهوائية لمعقد جسيم دهني DNA. ينطوي مثال لمقار يراجع إجراءات العلاج الجيني البشري في : Anderson, Science 256:808-813 (1992).

IV -الأطقم

يوفر الاختراع أيضاً أطقماً خاصة بمعالجة المريض باستخام مرض جيني حيث أن الطقم يشمل على جزيء مضاد للحس (على سبيل المثال، مجموعة أوليجيومر مضاد للحس في المتوالية رقم 1-12، 46 و 47) ويتم التغليف في حاوية مناسبة مع تعليمات خاصة بالاستخدام. يمكن أن تشتمل الأطقم أيضاً على مواد تفاعل طرفية مثل المحاليل المنظمة والمواد المثبتة، إلخ. سوف يدرك ذي المهارة العادية في المجال أن التطبيقات الخاصة بالطرق السابقة لها العديد من التطبيقات الخاصة بتحديد جزيئات مضاد للحس مناسبة للاستخدام في معالجة العديد من الأمراض.

V - الأمثلة

على الرغم من أن الاختراع السابق تم وصف ببعض التفاصيل للتوضح وكمثال لأغراض الوضوح والفهم، فسوف يكون من الواضح بسهولة لذي المهارة العادية في المجال في ضوء مبادئ الاختراع الحالي أن هنا تغييرات معينة وتعديلات يمكن إجراؤها لعيها بدون الخروج من فحوى ومجال عناصر الحماية اللاحقة. تم توفير الأمثلة التالية للتوضيح فقط وليس للحصر. سوف يتعرف الماهرون في المجال بسهولة على العديد من المتغيرات غير الهامة التي يمكن أن يتم تغييرها أو تعديلها لإنتاج نتائج مشابهة بشكل أساسي.

الطرق والمواد

الخلايا وظروف معالجة مزرعة النسيج

تمت زراعة خلايا السركوما المخططة البشرية (خلايا RD ;ATCC, CCL-136) في خلية النسيج من قوارير تمت معالجتها T75 (Nunc) عند 1.5 × 10 6 خلية/ القارورة في 24 مل من DMEM دافئ مع L جلوتامين L-Glutamine (HyClone)، و10٪ من مصل ألبومين بقري fetal bovine serum و1٪ من محلول مضاد حيوي من بنسيلين –سبربتوميسين Penicillin-Streptomycin (CelGro) ، وبعد 24 ساعة، فإن الأوساط يتم سحب الغاز منها ويتم غسلها مرة واحدة باستخدام PBS دافئ ويتم إضافة أوساط جديدة. تمت زراعة الخلايا عند 80٪ من التلافيف في 37° م من وسيلة حضانة عند 5.0٪ من CO2 ويتم التجميع باستخدام تريبسين. يتم إعادة تعليق أوليجيومرات مروفولينو فوسفورو أميدات مجفف بالتجميد phosphorodiamidate morpholino oligomers (PMOs) عند حوالي 0.5 إلى 2.0 مل مولار من ماء خالي من نيوكلياز؛ لكي يتم التثبت من الاستقطاب، وتم قياس محاليل PMO باستخدام مقياس طيفي ضوئي NanoDrop 2000 (Thermo Scientific)، تم توصيل PMOs إلى خلايا RD باستخدام المعالجة بالتثقب النووي طبقاً لتعليمات المُصنع وطقم SG (Lonza). تم اختبار PMOs عند العديد من التركيزات الموضحة (على سبيل المثال، ، 2.5، 5، 10، 12.5، 20 و 25 ميكرو مولار). تمت حضانة الخلايا لمدة 24 ساعة مع التثقب النووي البعدي عند حوالي 2-3 × 10 5 خلية لكل عين من طبقه به 12 أو 24 عينا (n = 2 أو 3) وبعد ذلك يتم التعريض إلى استخلاص RNA كما تم وصفه فيما يلي.

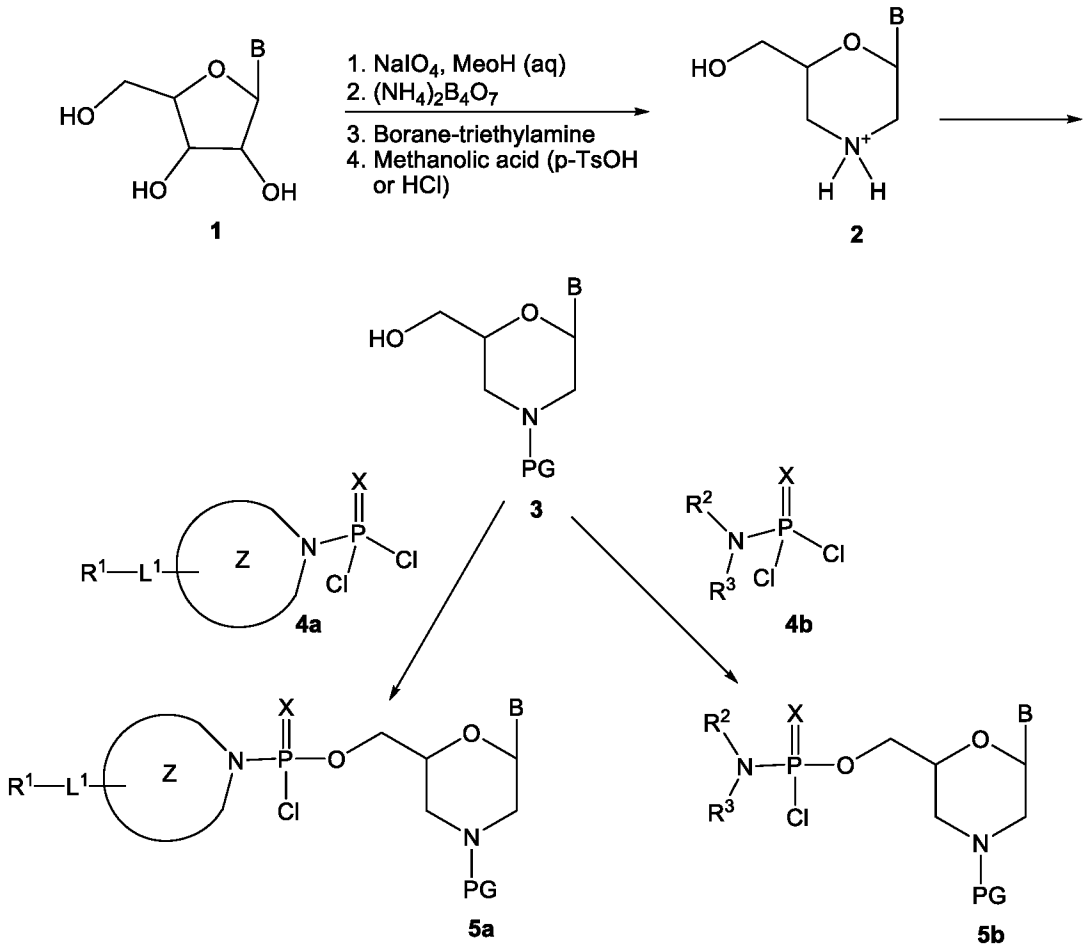
تمت زراعة أورام أرومية في أوساط نمو خلية عضلةMuscle Cell (PromoCell) باستخدام تقنيات قياسية. إن التثقب النووي لـ PMOs عند العديد من التركيزات قد تم إجراؤه كما تم وصفه في خلايا RD السابقة. تم وضع الخلايا بعد ذلك في أطبقا في عيون ثلاثية بها طبق به 12 عيناً في اوساط نمو خلية من نوع PromoCell ويتم السماح لها بالحضانة قبل استخلاص RNA كما تم وصفه فيما يلي.

استخلاص RNA وتضخيم PCR

تم استخلاص RNA من خلايا معالجة بـ PMO (خلايا RD ، أو أورمات عضلية بشرية أساسية primary human myoblasts) باستخدام طقم عزلRNA 96 عينا باستخدام RNAspin من GE ويتم التعريض إلى أي من RT-PCR الموجود أو غير الموجود باستخدام تقنيات قياسية مع

أزواج أساسية تالية. البادئات الخارجية: 5- caatgctcctgacctctgtgc -3’(متوالية رقم : 40)، العكسية 5- gctcttttccaggttcaagtgg -3’(متوالية رقم :41)؛ البادئات الداخلية : الأمامية 5- gtctacaacaaagctcaggtcg -3’(متوالية رقم :42)، العكسية 5-’ 3gcaatgttatctgcttcctccaacc -’(متوالية رقم :43). في بعض الحالات ، فإن PCR الذي ليس له مأوي قد تم إجراؤه باستخدام البادئات الداخلية. تم قياس تخطي الأكسون exon بواسطة الإستشراد الكهربي للجل أو من خلال استخدام وسيلة تحليل حيوية Caliper LabChip و ٪ المشوية للتخطي (أي، شدة نطاق منتج تخطي الأكسون بالنسبة للطول الكامل من منتج PCR) والذي يتم تخطيطه كما هو موضح في الشكل رقم 3 إلى 6.

تحضير وحدات بنائية من مورفولينو Morpholino، PMOوPMO مع روباط بداخل الوحدات معدلة



المخطط 1: مسار التخليق العام لـ PMO و ووحدات بنائية معدلة PMO

وبالرجوع إلى مخطط التفاعل رقم 1، حيث يتم تمثيل B في شكل جزء مزدوج من قاعدة ويمثل PG مجموعة حامية، يمكن تحضير الوحدات الفرعية من المروفولينو من ريبو نيولكيوتيد ribinucleoside مناظر (1) كما هو موضح. يمكن أن تتم حماية الوحدة الفرعية من المورفولينو morpholino (2) بشكل اختياري وتتم مايتها من خلال التفاعل مع مادة منتجة لمجموعة حماية مناسبة على سبيل المثال، تراي إيثيل كلوريد trityl chloride. تتم إزالة مجموعة الحماية 3' بصفة عامة أثناء تخلي الأوليجيومر من الحالة الصلبة كما تم وصفه بشكل تفصيلي فيما يلي. يمكن أن تتم حماية زوج القاعدة بشكل مناسب فيما يتعلق بتخلي أليجيومر في الطور الصلب. تشتمل مجموعات الحماية المناسبة على بنزويل benzoyl خاص بأدينين adenine وسيتوسين cytosine وفينيل أسيتيل phenylacetyl فيما يتعلق بجوانين وبيفا لويل أوكسي ميثيل pivaloyloxymethyl خاص بهيوبكسانثين hypoxanthine (I). يمكن إدخال مجموعة بيفالويل أوكسي ميثيل pivaloyloxymethyl في موضع N1 من قاعدة هيبوكسانثين حلقية غير متجانسة hypoxanthine heterocyclic base. وعلى الرغم من وجود وحدة فرعية من هيبوكثانثين يمكن استخدامها لإنتاج تفاعلات تنشيط والتي تكون فائقة عندما يكون هنا قاعدة تتم حمايتها. تشتمل مجموعات حماية مناسبة أخرى على تلك التي تم الكشف عنها في طلب البراءة الأمريكي رقم 8,076,476 والتي تم تضمينها هنا كمرجع بكاملها.

ينتج عن التفاعل 3 مع مركب الفسفور المنشط 4أ أو 4ب وجود وحدات فرعية من مروفولينيو لها جزء رابط مطلوب (5أ، أو 5ب). يجب أن تتم ملاحظة أن R1 و/أو L1 يمكن أن يتم تركيبها أيضاً على حلقة Z غير متجانسة حلقية بعد تشكيل رابطةP–O أو حتى بعد تضمين الرابطة الفرعية في الأوليجومر.

يمكن تحضير المركبات من البنيات 4أ أو 4ب باستخدا عدد من الطرق المعروفة لذوي المهارة في المجال والتي تشتمل على تلك التي تم وصفها في الأمثلة. إن الإقران باستخدام جزء مروفولينو يسبقه بعد ذلك ما تم تلخيصه أعلاه.

تكون مركبات البنية 5أ أو 5ب مستخدمة في تخليق أوليجيومر من الطور الصلب فيما يتعلض بتحضير الأوليجيومرات المشتملة على روابط بداخل الوحدات. تكون تلك الطرق معروفة بشكل جيد في المجال. وعلى نحو مختصر فإن المركب الذي له البنية 5أ أو 5ب يمكن أن يتم تعديله عند

الطرف 5’ لكي يتم الحصول على رابط خاص بحامل صلب. وبمجرد ن يتم حمله فإن المجموعة الخاصة بالحماية من 5أ أو 5ب (على سبيل المثال، تراتيل عند الطرف 3 ’)) تتم إزالته ويتم تفاعل الأمين الحر باستخدام جزيء فوسفوري منشط من المركب الذي له البنية 5أ أو 5ب (أو نظير لها). يتم تكرار تلك المتوالية حتى يتم الحصول على الطول الكافي. يمكن إما إزالة مجموعة الحماية في الطرف 3’ أو تركيها إذا كان هناك التعديل المطلوب 3’. يمكن إزالة الأوليجيو من المادة الصلبة الحاملة باستخدام أي عدد من الطرق أو معلاجات توضيحية مع قاعدة لكي يتم تركب الرابطة الخاصة بالمادة الحاملة الصلبة.

تم وصف تحضير أولجيومرات مورفولينو morpholino oligomers بصفة عامة وعلى نحو خاص أوليجيومرات مورفولينو من الاختراع بالتفصيل في الأمثلة.

المثال رقم 1

تحضير مورفولينو من الأوليجيومرات

إن تحضير مركبات الاختراع يتم إجراؤه باستخدام البروتوكول التالي:

تحضير تراتيل بيبرازين فينيل كربامات trityl piperazine phenyl carbamate 35 (الشكل رقم 2أ و2ب): إلى معلق مبرد من المركب 11 في داي كلورو ميثان dichloromethane (6 مل/ جم 11) تمت إضافة محلول من كربونات بوتاسيوم potassium carbonate (3.2 مكافئ) في ماء (4 مل/جم من كربونات البوتاسيوم). إلى هذا الخليط ثنائي الطور two-phase ، تم ببطء إضافة محلول من كلورو فورمات فينيل phenyl chloroformate (1.03 مكافئ) في داي كلورو ميثان dichloromethane (2 جم/جم فينيل كلورو فورمات phenyl chloroformate). تمت تدفئة خليط التفاعل إلى 20° م. وعند اكتمال التفاعل (1-2 ساعة)، تم فصل الطبقات. تم غسل الطبقة العضوية باستخدام ماء وتم التجفيف فوق كربونات بوتاسيوم غير مائية. تم عزل المنتج 35 بواسطة التبلر crystallization من أسيتونيتريل acetonitrile.

تحضير كحول كربونات 36: تم تعليق هيدريد صوديوم sodium hydride (1.2 مكافئ) في 1- ميثيل -2- بيروليدين (32 مل/جم من هيدريد الصوديوم). إلى هذا المزاد تمت إضافة تراي إيثيلين جليكول triethylene glycol(10.0 مكافئ) والمركب 35 (1.0 مكافئ). تم تسخين

الملاط الناتج عند 95° م. وعند اكتمال التفاعل (1-2 ساعة)، تم تبريد الخليط إلى 20° م. إلى هذا الخليط تمت إضافة 30٪ من داي كلورو ميثانdichloromethane / ميثيل t-بيوتيل إيثر methyl tert-butyl ether(حجم: حجم) وماء. تم غسل الطبقة العضوية المتشملة على المنتج على نحو متكرر باستخدام هيدروكسيد الصوديوم Sodium hydroxide (NaOH) مائي، وحمض سكسينيك مائي؛ كلوريد صوديوم مائي مشبع. تم عزل المنتج 36 من خلال التبلر من داي كلورو ميثان / ميثيل t- بيوتيل إيثر/ هيبتان.

تحضير حمض طرفي 37: على محلول من المركب 36 في تترا هيدرو فيوران (7 مل/ جم 36) تمت إضافة سكسينيك succinic acid (2.0 مكافئ) وDMAP (0.5 مكافئ). تم تسخين الخليط إلى 50° م. وعند اكتمال التفاعل (5 ساعات)، تم تبريد الخليط عند 20° م وتم الضبط عند 8.5 باستخدام بيكربونات الصوديوم Sodium bicarbonate (NaHCO3) مائي. تمت إضافة t-بيوتيل إيثر وتم استخلاص المنتج بداخل طبقة مائية. تمت إضافة داي كلورو ميثان، وتم ضبط الخليط عند الرقم الهيدروجيني pH 3 باستخدام حمض سيتريك مائي. تم غسل الطبقة العضوية المشتملة على المنتج باستخدام خليط من رقم هيدروجيني = 3 من محلول منظم من السترات وكلوريد صوديوم مائي مشبع. تم استخدام محلول داي كلورو ميثان المذكور 37 بدون عزل المستحضر من المركب 38.

المستحضر 38: إلى محلول من المركب رقم 37 تمت إضافة N – هيدروكسي-5-نوربورونين – 2، 3- داي كربوكسيلي إيميد N-hydroxy-5-norbornene-2,3-dicarboxylic acid imide (HONB) (1.02 مكافئ)، 4- داي ميثيل أمينو بيريدين 4-dimethylaminopyridine (DMAP) (0.34 مكافئ)، وبعد ذلك 1- (3- داي ميثيل أمنيو بروبيل) -N'- إيثيل كربو داي إيميد هيدروكلوريد 1-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) (1.1 مكافئ). تم تسخين الخليط عند 55° م. وعند اكتمال التفاعل، (4-5) ساعات، تم تبريد الخليط إلى 20° م وتم الغسل على نحو متتابع باستخدام 1:1 0.2 مولار من حمض سيتريك citric acid / محلول ملحي brine ومحلول ملحي. يخضع محلول داي كلورو ميثان لمذيب يتم تبادله مع أسيتون وبعد ذلك مع N,N –داي ميثيل فورماميد N,N-dimethylformamide وتم عزل المنتج بواسط الترسيب من أسيتون/

N,N – داي ميثيل فورماميد acetone/ N,N-dimethylformamide بداخل كلوريد صوديوم sodium chloride مشبع مائي. تم إعادة معالجة الملاط مرة أخرى عدة مرات في الماء لإزالة N,N – داي ميثيل فورماميد المتبقي والأملاح.

إن إدخال "الطرف" على راتنج محمل على ركيزة يتم إجراؤه في داي ميثيل إيميدازوليدينون dimethyl imidazolidinone (DMI) بواسطة إجراء يتم استخدامه فيما يتعلق بتضمين وحدات فرعية أثناء تخليق الطور الصلب. تحضير المادة الحاملة الصلبة الخاصة بتخليق أوليجيومرات مورفولينو: تم تنفيذ الإجراء المذكور في مركب سيلانيزيد silanized ووعاء ببتيد peptide مغلف (ChemGlass, NJ, USA) باستخدام مسامية خشنة (40-60 ميكرو مولار) من زجاج فريت مع وسيلة تقلب علوية ووسيلة إيقاف من التيفلون Teflon ثلاثية الطرق للسماح لـ N2 بأن يقوم بتشكيل فقاعات خلال الفريت أو استخلاص خاص بالتبخير.

تتكون خطوات معالجة الراتنج resin/ الغسل في الإجراء التالي من اثنين من عمليات التشغيل الأساسية: المعالجة المائعة للراتنج أو مفاعل طبقة وسيلة الترسيب واستخلاص المذيب/ المحلول. بالنسبة للطبقة المائعة من الراتنج، فإن وسيلة الإيقاف يتم تثبيتها للسماح لـ N2 بأن يتدفق لأعلى خلال الفريت ومعالجة راتنج معين/ الغسل الذي تتم إضافته إلى المفاعل والسماح بالنفاذ الكامل لترطيب الراتنج. يتم بعد ذلك البدء في الخلط ويتم خلط ملاط الراتنج لفترة زمنية محددة. بالنسبة لاستخلاص المذيب/ المحلول، فإن الخلط و تدفق N2 يتم إيقافهما ويتم بدء تشغيل مضخة بالتفريغ وبعد ذلك وسيلة الإيقاف التي يتم تثبيتها لتدفق ناتج تبخير معالجة الراتنج / ناتج الغسل إلى مهدور. كانت كل أحجام معلاجة الراتنج/ وأحجام الغسل هي 15 مل /جم من الراتنج ما لم يتم توضيح خلاف ذلك.

إلى راتنج أمينو إيثيل بوليستيرين aminomethylpolystyrene resin (100-200 مش؛ حوالي 1.0 مل ممول / جم، يتم التحمل بالاعتماد على استبدال نيتروجين nitrogen؛ 75 جم، 1 مكافئ، Polymer Labs, UK, part #1464-X799) في ببتيد مغلف بسيلازيد والذي تمت إضافته عند 1- ميثيل -2- بيروليدينون 1-methyl-2-pyrrolidinone (NMP ؛ 20 مل / جم راتنج) وتم السماح للراتنج بان ينتفخ مع الخلط لمدة 1-2 ساعة. وبعد التبخير الخاص بمذيب اتفاخ فإن الراتنج يتم غسله باستخدام داي كلورو ميثان dichloromethane (2 × 1-2

دقيقة)، 5٪ داي أيزو بروبيل إيثيل أمين في 25٪ من أيزو بروبانولisopropanol / داي كلورو ميثان (2 × 3-4 دقيقة) وداي كلورو ميثان (2 × 1-2 دقيقة). وبعد تبخير ناتج الغسل النهائي، فإن الراتنج تتم معالجتها باستخدام محللو من مثبت داي كبريتيد disulfide مزدوج من 34 في 1-ميثيل -2- بيروليديون 1-methyl-2-pyrrolidinone(0.17 مولار؛ 15 مل/ جم راتنج، حوالي 2.5 مكافئ) وخليط راتنج/ مادة تفاعل والتي تم تسخينها عند 45°م لمدة 60 ساعة. وعند اكتمال التفاعل، يتم إيقاف التسغيل ويتم تفريغ المحلول الأساسي ويتم غسل الراتنج باستخدام 1-ميثيل -2- بيروليدينون (4× 3-4 دقيقة) وداي كلورو ميثان (6 × 1-2 دقيقة). تمت معلاجة الراتنج باستخدام محلول من 10٪ (حجم/حجم) من داي إيثيل داي كربونات في داي كلورو ميثان (16 مل/جم؛ 2 × 5-6 دقيقة) وبعد ذلك يتم الغسل باستخدام داي كلورو ميثان (6 × 1-2 دقيقة). تم تجفيف الراتنج 39 (انظر الشكل رقم 4) تحت تيار من N2 لمدة 1-3 ساعات وبعد ذلك يتم التفريغ إلى وزن ثابت (± 2٪). الصحيلة : 110-150 ٪ من وزن الراتنج الأصلي.

إن تحديد التحميل الخاص براتنج أمينو إيثيل بوليستيرين – داي كبريتيد Aminomethylpolystyrene-disulfide resin: فإن تحميل الراتنج (عدد المواضع المتفاعلة المحتملة المتاحة) يتم تحديدها من خلال اختبار قياسي طيفي من عدد من مجموعات تراي فيينل ميثيل (تريتيل) triphenylmethyl (trityl) لكل جرام من الراتنج.

يكون هناك وزن معروف من راتنج مجفف (25 ± 3 مجم) يتم نقله إلى قارورة قياس حجمي من سيلازيد 25 مل و حوالي 5 مل من 2٪ (حجم/ حجم) من حمض تراي فلورو أسيتيك trifluoroacetic acid في داي كلورو ميثان. يتم خلط المحتويات بواسطة التدويم الرقيق وبعد ذلك يتم السماح بالاستقرار لمدة 30 دقيقة. تم زيادة الأحجام إلى 25 مل باستخدام 2٪ إضافي (حجم/حجم) من حمض تراي فلورو أسيتيك في داي كلورو ميثان ويتم خلط المحتويات بشكل جيد. وباستخدام أنبوب استبدال موجب، فإن الجزء المساوي من محلول يشتمل على تريتيل 500 مل) يتم نقله إلى 10 مل من قارورة حجمية ويتم جعل الحجم عند حوالي 10 مل باستخدام حمض ميثان سولفونيك methanesulfonic.

تم قياس محتوي كاتيون تريتيل trityl cation في المحلول النهائي بواسطة امتصاص UV عند 431.7 نانو متر وتم حساب حمل الراتنج في مجموعات تريتيل trityl لكل جرام راتنج (ميكرو

مول/جم) باستخدام أحجام مناسبة، وتخفيفا ومعامل كبت (ε:41 ميكرو مول-1 سم-1) مع وزن الراتنج. تم إجراء الاختبار المذكور في ثلاثيات ويكون له متوسط تحميل يتم حسابه.

سوف يتم توفير إجراء تحيل الراتنج resin مع الراتنج والتحميل عند حوالي 500 ميكرو مول/جم. إن تحميل 300-400 في ميكرو مول/جم يتم الحصول عليه إذا كان هناك خطوة تضمين تثبيت بكبريتيد ثنائي يتم إجراؤها لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة الغرفة.

التحميل الطرفي: وباستخدام نفس الخطوة والأحجام كما هو الحال مع مستحضر من راتنج أمينو إيثيل بوليستيرين- ثاني كبريتيد يمكن إدخال الجزء الطرفي في مادة حاملة صلبة. يتم تحميل الراتنج أولا من خلال إزالة الحماية تحت ظروف حمضي ويتم تعديل المادة الناتجة قبل الإقران. بالنسبة لخطوة الإقران، فإن محلول من 38 (0.2 مولار) في DMI يشتمل على 4- إيثيل مورفولين 4-ethylmorpholine (NEM ، 0.4 مولار) يتم استخدامه بدلاً من محلول مثبت ثنائي الكبريتيد disulfide. وبعد ساعتين عند 45° م، فإن الراتنج 39 يتم غسله مرتين باستخدام 5٪ من داي أيزو بروبيل إيثيل أمين diisopropylethylamine في 25٪ أيزو بروبانول isopropanol / داي كلورو ميثان ويتم التركيز باستخدام DCM. إلى الراتنج تمت إضافة محلول من أنهيدريد بنزويك benzoic anhydride (0.4 مولار) و NEM (0.4 مولار). وبعد 25 دقيقة تم تغليف المفاعل وتم التبريد إلى درجة حرارة الرغفة وتم غسل الراتنج مرتين باستخدام 5٪ من داي أيزو بروبيل إيثيل أمين في 25٪ من أيزو بروبانول/ داي كلورو ميثان وثمانية مرات باستخدام DCM. تم ترشيح الراتنج 40 وتم التجفف تحت تفريغ عال. تم تحديد التحميل الخاص بالرتنج 40 بحيث يكون لها تحميل من أمية ميثيل بولي سيترين polystyrene أصلي- من راتنج ثاني كبريتيد 39 يتم استخدامه في تحميل الجزء الطرفي.

تخليق الطور الصلب: تم تحضير أوليجومرات مورفولين على Gilson AMS-422 من وسيلة تخليق ببتيد ألية في 2 مل من أعمدة تفاعل بولي بروبيلين جليسون Gilson polypropylene (Part # 3980270). تتدفق كتلة ألومنيوم aluminum block مع قنوات خاصة بتدفق الماء ويتم وضعها حول الأعمدة مثلما هو الحال مع وسيلة التخليق. تمت إضافة AMS-422 على نحو بديل عند محاليل تفاعل/ محاليل غسل ويتم التثبيت لفترة زمنية محددة، ويتم التفريغ من الأعمدة باستخدام وسيلة تفريغ.

بالنسبة لأوليجيورمات في مدى من حوالي 25 وحدة فرعية في الطول، راتنج أمينو ميثيل بوليستيرين – داي كبريتيد aminomethylpolystyrene–disulfide resin مع التحميل بالقرب من 500 ميكرو مول /جم من الراتنج والذي تم تفضيله. بالنسبة لأوليجيومرأت أكبر، فإن راتنج داي كبريتيد أمينو ميثيل بوليستيرين aminomethylpolystyrene–disulfide resin مع التحميل الخاص بـ 300 –400 ميكرو مول/ جم من الراتنج الذي يكون مفضلاً. إذا كان هناك جزيء باستخدام 5' – من الطرف مطلوباً، فإن الراتنج تم تحميله باستخدام طرف تم اختياره بنفس وسائل التخطيط الخاصة بالتحميل.

تم تحضير محاليل متفاعلة تالية:

محلول معالج بيتريتيل: 10٪ من حمض سيانو أسيتيك Cyanoacetic (وزن/ حجم) في4: 1 داي كلورو ميثان/ أسيتو نيتريل؛ ومحلول التعادل: 5٪ من داي إيزو بوبيل إيثيل أمين في 3: 1 ، داي كلورو ميثان / أيزو بروبانول؛ محلول إقران: 0.18 مولار (أو 0.24 مولار من أوليجيومرات تزيد بشكل أطول من 20 وحدة فرعية) يتم تنشيطها فيما يتعلق بوحدة فرعية من مورفولينو من القاعدة المطلوبة ونوع رابطة و 0.4 مولار من N إيثيل مروفولين وفي 1، 3– داي ميثيل إيميدازوليدونون 1,3–dimethylimidazolidinone. تم استخدام داي كلورو ميثان Dichloromethane (DCM) في شكل مادة غسل انتقالية لفصل محاليل الغسل المتفاعلة.

وعلى وسيلة التخليق وباستخدام مجموعة إعاقة عند 42°م عند كل عمود يشتمل على 30 مجم من راتنج أمينو إيثيل بوليستيرين – داي كبريتيد aminomethylpolystyrene–disulfide resin (أو راتنج طرفي Tail resin) تتم الإضافة عند 2مل من 1– ميثيل –2– بيروليدون –1 methyl–2–pyrrolidinone ويتم السماح بضبط درجة حرارة الرغفة عند 30 دقيقة وبعد الغسل مرتين باستخدام 2 مل من داي كلور ميثان يتم إجراء دورة التخليق التالية.

حجم الخطوة مع زمن تثبيت خاص بالتوصيل

الخطوة	الحجم	التوصيل	زمن التثبيت
معالجة بداي تريتيل Detritylation	1.5 مل	وسيلة تفريع	15 ثانية
معالجة بداي تريتيل	1.5 مل	وسيلة تفريع	15 ثانية
معالجة بداي تريتيل	1.5 مل	وسيلة تفريع	15 ثانية
معالجة بداي تريتيل	1.5 مل	وسيلة تفريع	15 ثانية
معالجة بداي تريتيل	1.5 مل	وسيلة تفريع	15 ثانية
معالجة بداي تريتيل	1.5 مل	وسيلة تفريع	15 ثانية
معالجة بداي تريتيل	1.5 مل	وسيلة تفريع	15 ثانية
DCM	1.5 مل	وسيلة تفريع	30 ثانية
التعديل	1.5 مل	وسيلة تفريع	30 ثانية
التعديل	1.5 مل	وسيلة تفريع	30 ثانية
التعديل	1.5 مل	وسيلة تفريع	30 ثانية
التعديل	1.5 مل	وسيلة تفريع	30 ثانية
التعديل	1.5 مل	وسيلة تفريع	30 ثانية
التعديل	1.5 مل	وسيلة تفريع	30 ثانية
التعديل	1.5 مل	وسيلة تفريع	30 ثانية
DCM	1.5 مل	وسيلة تفريع	30 ثانية
الإقران	350-500ميكرو لتر	محقنة	40 دقيقة
DCM	1.5 مل	وسيلة تفريع	30 ثانية

التعديل	1.5 مل	وسيلة تفريع	30 ثانية
التعديل	1.5 مل	وسيلة تفريع	30 ثانية
DCM	1.5 مل	وسيلة تفريع	30 ثانية
DCM	1.5 مل	وسيلة تفريع	30 ثانية
DCM	1.5 مل	وسيلة تفريع	30 ثانية

تمت برمجة متواليات الأوليجيومرات الفردية في وسيلة تخليق بحيث أن كل عمود يستقبل محلول إقران مناسب (A،C،G،T،I) في متوالية مناسبة. عندما يتم إكتمال تضمين الأوليجيومر فيما يتعلق بالوحدة الفرعية النهائية منها، فإن العمود تتم إزالته من الدائرة الخاصة بالإغلاق حتى الدائرة النهائية والتي يتم إجراؤها بشكل يدوي مع محلول الإقران فيما يتعلق بتضمين 4- ميثوكسي تراي فينيل ميثيل كلوريد (0.32 مولار في DMI) التي تشتمل على على 0.89 مولار من 4- إيثيل مورفولين.

إن الانشطار من الراتنج وإزالة القواعدة ومجموعات الحماية الرئيسية: وبعد المعالجة بميثيوكسي تراي إيثيل، فإن الراتنج يتم غسله لـ 8 مرات مع 2 مل من 1- ميثيل -2- بروليدينون -1 methyl-2-pyrrolidinone. يتكون واحد مل من محلول الانشطار من 0.1 مولار من 1، 4- داي ثيو ثريتول 1,4-dithiothreitol (DTT) و 0.73 مولار من تراي إيثيل أمين في 1- ميثيل -2- بيروليدون الذي تمت إضافته ويتم تغطية العمود والسماح له بأن يستقر عند درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة. وبعد ذلك الوقت فإن المحلول يتم تجفيفه في زجاجة سعة 12 من نوع Wheaton . تم غسل الراتنج الذي تم انكماشه بشكل زائد باستخدام 300 ميكرو لتر من محلول الانشطار. إلى المحلول الذي تمت غضافته فإن هناك 4.0 مل من أمونيا ammonia مركزة (تم تخزينها عند -20° م) وتم تغطية الزجاجة على نحو دقيق (باستخدام غطاء لولبي مبطن بالتيفلون) وتم تدويم الخليط لكي يتم خلط المحلول. تم وضع الزجاجة في 45° م في فرن لمدة 16-24 ساعة لكي يتم التأثير على انشطار القاعدة ومجموعات الحماية الأساسية.

تنقية المنتج الخام: تمت إزالة محلول تحليل أمونيا من الفرن وتم السماح له بأن يبرد لدرجة حرارة الغرفة. تم تخفيف المحلول باستخدام 20 مل من 0.28٪ من المحلول المائي من الأمونيا ويتم التمرير خلال عمود به 2.5 × 10 سم يشتمل على راتنج من نوع Macroprep HQ (BioRad). تم استخدام تدريج ملح (أ: 0.28 ٪ من الأمونيا ammonia مع ب :1 مولرا من كلوريد صوديوم في 0.28 ٪ من الأمونيا؛ 0-100٪ من ب في 60 دقيقة) للتصفية التتابعية باستخدام ميثوكسي تريتيل عند القمة. تم تجميع الأجزاء المجمعة وتمت المعالجة بشكل غضافي بالاعتماد على المنتج المطلوب.

معالجة بديميثوكسي ترتيل Demethoxytritylation من أوليجيومرات مورفولينو: لكي يتم تجميع الأجزاء من التنقية الخاصة بـ Macroprep ، تمت المعالجة باستخدام 1 مولار من H3PO4 إلى رقم هيدروجيني أقل من 2.5. وبعد الخلط الأولي، فإن العينات يتم تثبيتها عند درجة حرارة الرغفة لمدة 4 دقائق وعند هذا الوقت يتم التعادل عند رقم هيدروجيني 10-11 باستخدام 2.8٪ من أمونيا/ ماء. تمت تنقية المنتجات بواسطة استخلاص الطور الصلب solid phase extraction (SPE).

تجميع عمود SPE وتهيئته: تمت تعبئة Amberchrome CG-300M (Rohm and Haas; Philadelphia, PA) في 20 مل من أعمدة الفريت (BioRad Econo-Pac Chromatography Columns (732-1011) وتم غسل الراتنج باستخدام 3 مل من مما يلي: 0.28٪ منNH4OH / 80٪ من أسيتونيتريل؛ 0.5 مولار من NaOH / 20٪ إيثانول؛ ماء ؛ 50 نانو مولار H3PO4/ 80٪ من أسيتونيتريل؛ ماء ؛ 0.5 من NaOH / 20٪ من الإيثانول؛ ماء 0.28 ٪ من NH4OH.

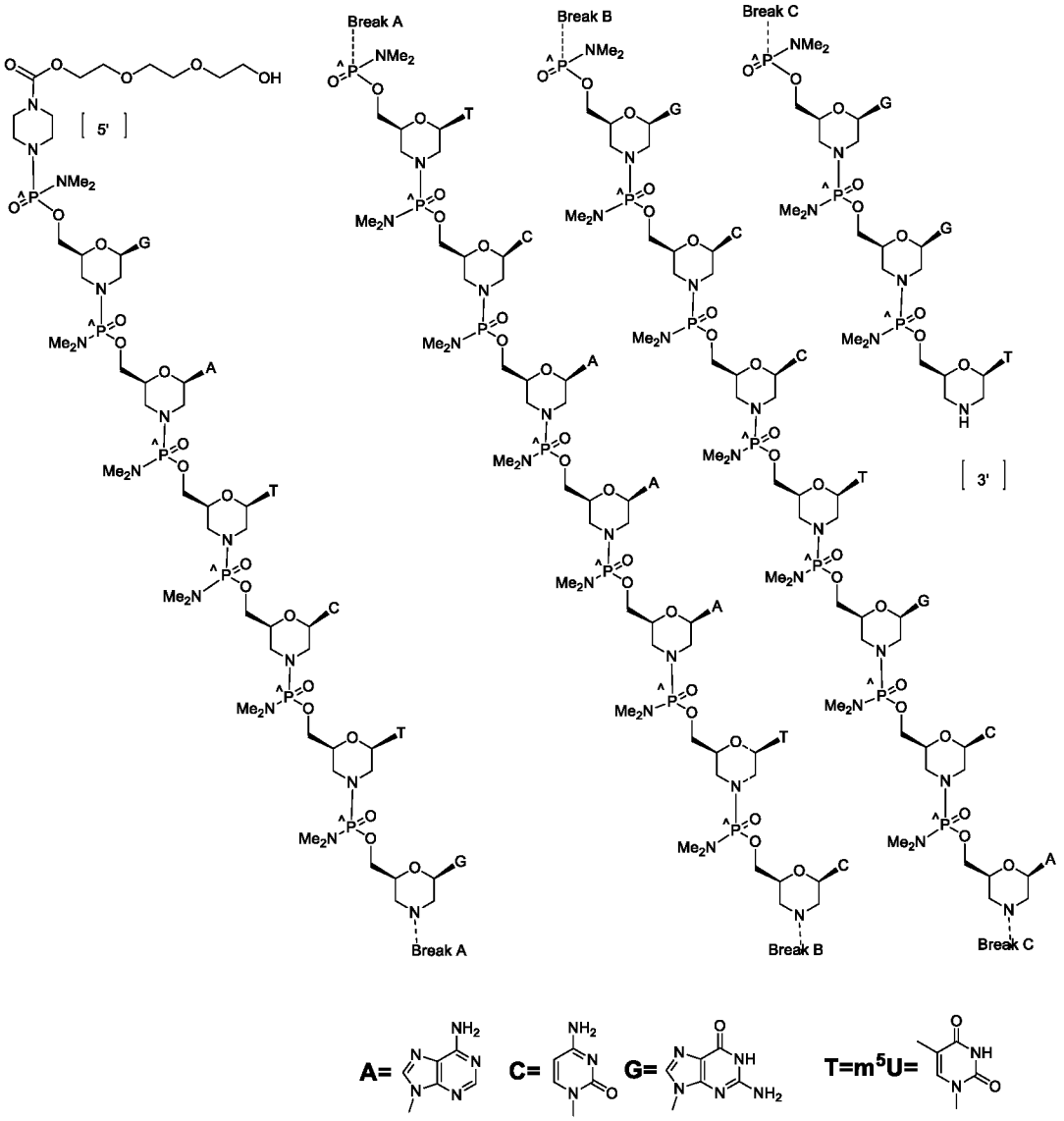
تنقية SPE: تم تحميل محلول معالج بدي ميثوكسي ترتيل demethoxytritylation على العمود وتم الغسل بالرتنج ثلاثة مترات باستخدام 3-6 مل من 0.28٪ من الأمونيا المائية. تم وضع زجاجة Wheaton (12 مل) تحت العمود وتمت التصفية التتابعية للمنتج من خلال مرتين غسل باستخدام 2 مل من 45٪ من الأمونيا المائية.

عزل المنتج: تم تجميد المحاليل في ثلج جاف وتم وضع الزجاجات في وسيلة تجفيف وتجميد لإنتاج مسحو أبيض مزغب. تمت إذابة العينات في الماء وتم الترشيح خلال مرشح 0.22 ميكرون من غشاء HT Tuffryn) باستخدام محقنة وتم قياس الكثافة البصرية Optical Density (OD) على مقياس طيفي لتحديد القياس الطيفي من وحدات OD من الأوليجيومر الوجود وأيضاً عينة مشتتة خاصة بالتحليل.يتم بعد ذلك وضع المحاليل في زجاجات Wheaton فيما يتعلق بالتجفيف بالتجميد.

تم استخدام تحليل أوليجيومرات مروفولينو بواسطة قياس كتلة طيفي MALDI: MALDI-TOF لتحديد تركيبة من الأجزاء في التنقية وأيضاً لتوفير دليل خاص بالهوية (وزن جزيئي) من الأوليجومرات. تم إجراء العينات بعد التخفيف باستخدام محلول من حمض 3، 5- ديا ميثوكسي - 4- هيدرو سيناميك (حمض سينابينيك) 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (sinapinic acid)، 3، 4، 5- تراي هيدوكسي أسيتوفينون 3,4,5- trihydoxyacetophenone (THAP) أو حمض ألفا – سيانو -4- هيدوكسي سيناميك alpha-cyano-4-hydoxycinnamic acid (HCCA) في شكل قوالب.

المثال 2

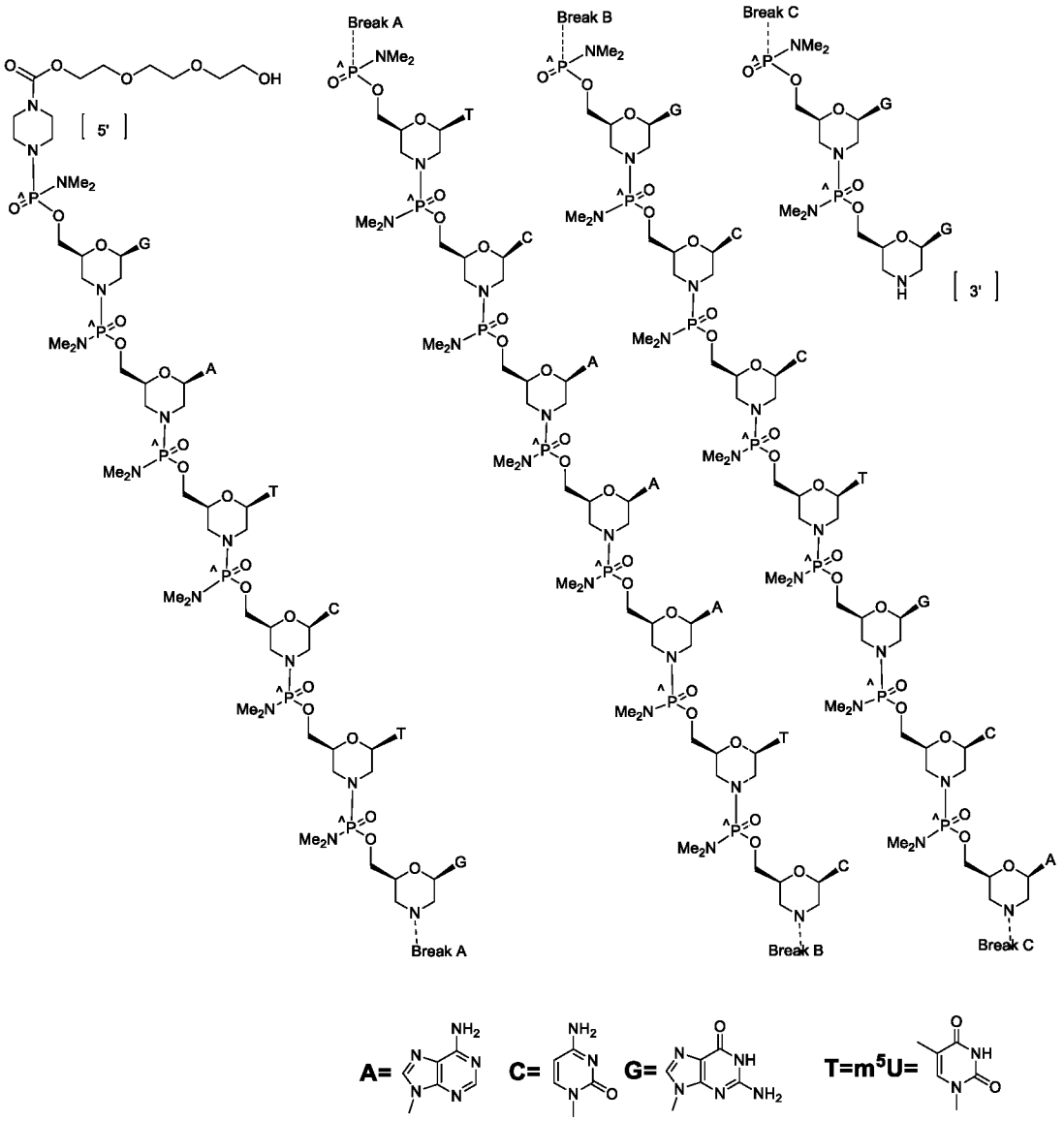
باستخدام البروتوكول الموصوف في المثال 1، تم تخليق PMO التالي ، NG-13-0391 H44A(-8+15)، متوالية رقم :4 (5'-GAT CTG TCA AAT CGC CTG CAG GT-3') و المستخدمة في المثالين 8 و 9.



^ لم يتم تحديد الخصائص الكيميائية الخاصة بمركز الفسفور

المثال 3

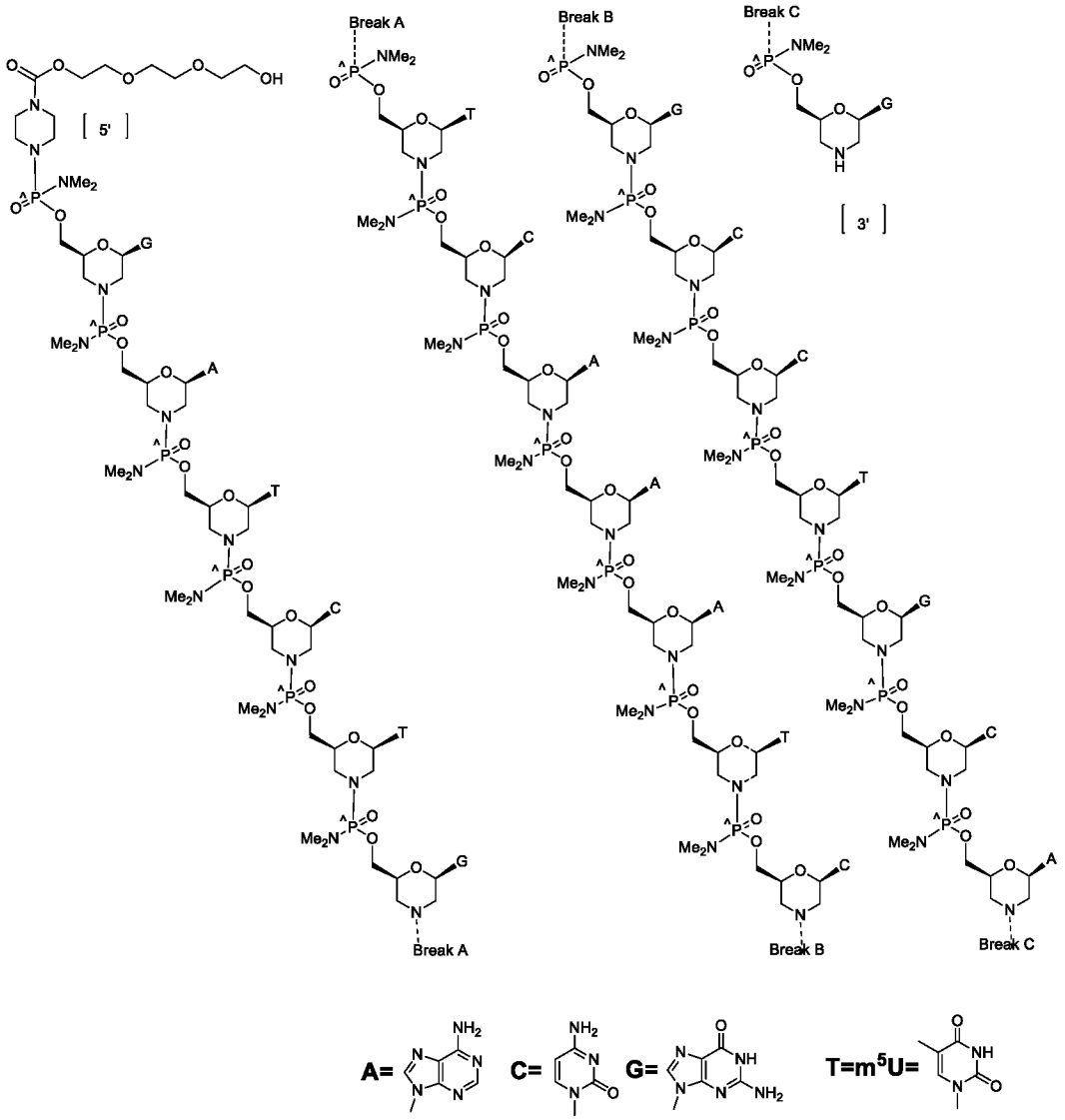
باستخدام البروتوكول الموصوف في المثال 1، تم تخليق PMO التالي ، NG-13-zzz0392 '- GAT CTG TCA AAT CGC CTG CAG G-5) 5: متوالية رقم ،(15+7-)H44A 5 3') و المستخدمة كما تم وصفها في المثالين 8 و 9.



^ لم يتم تحديد الخصائص الكيميائية الخاصة بمركز الفسفور

المثال 4

باستخدام البروتوكول الموصوف في المثال 1، تم تخليق PMO التالي ، 0393NG-13-
H44A(-6+15)، متوالية رقم :6 (5- CAG CTG CGC AAT TCA GAT -3’)
و المستخدمة كما تم وصفها في المثالين 8 و 9.



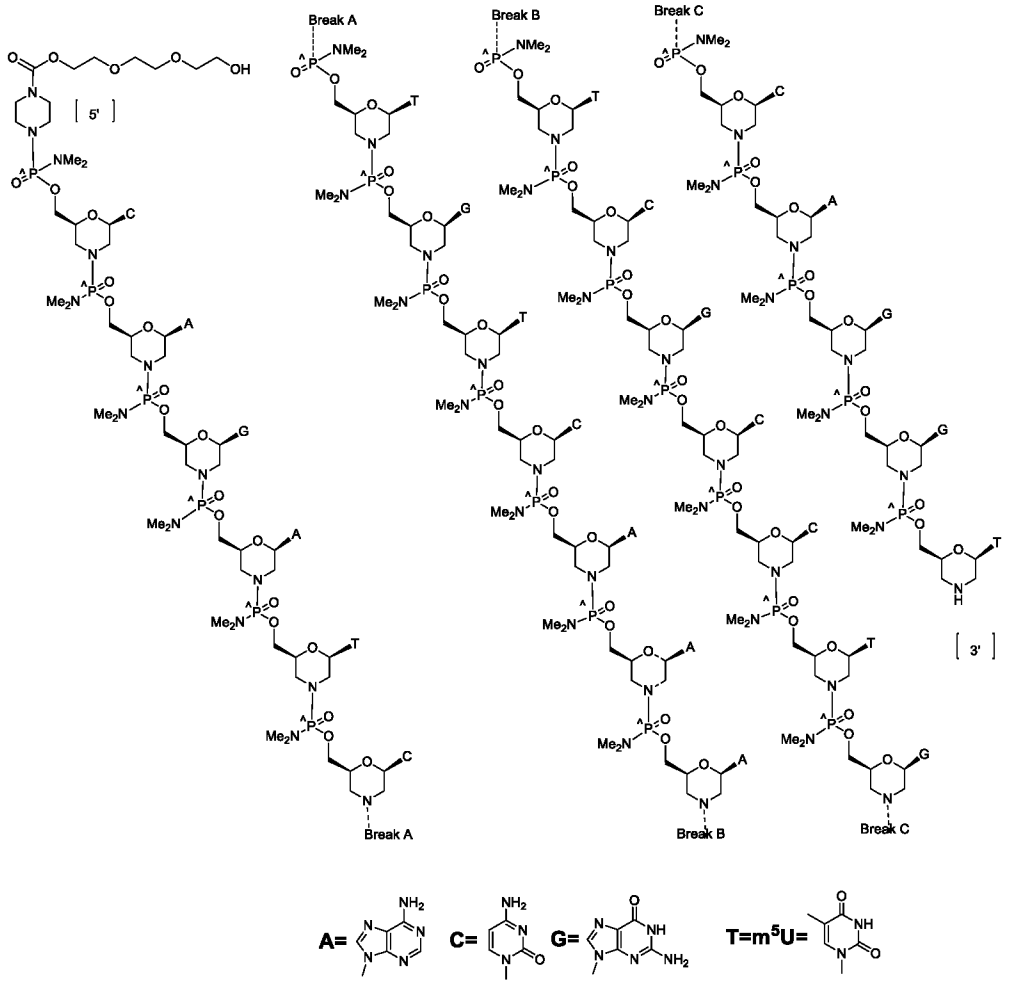
^ لم يتم تحديد الخصائص الكيميائية الخاصة بمركز الفسفور

المثال 5

باستخدام البروتوكول الموصوف في المثال 1، تم تخليق PMO التالي ، NG-13-zzz0394

5 H44A(-8+17)، متوالية رقم :7 (5' CAG ATC TGT CAA ATC GCC TGC -3'

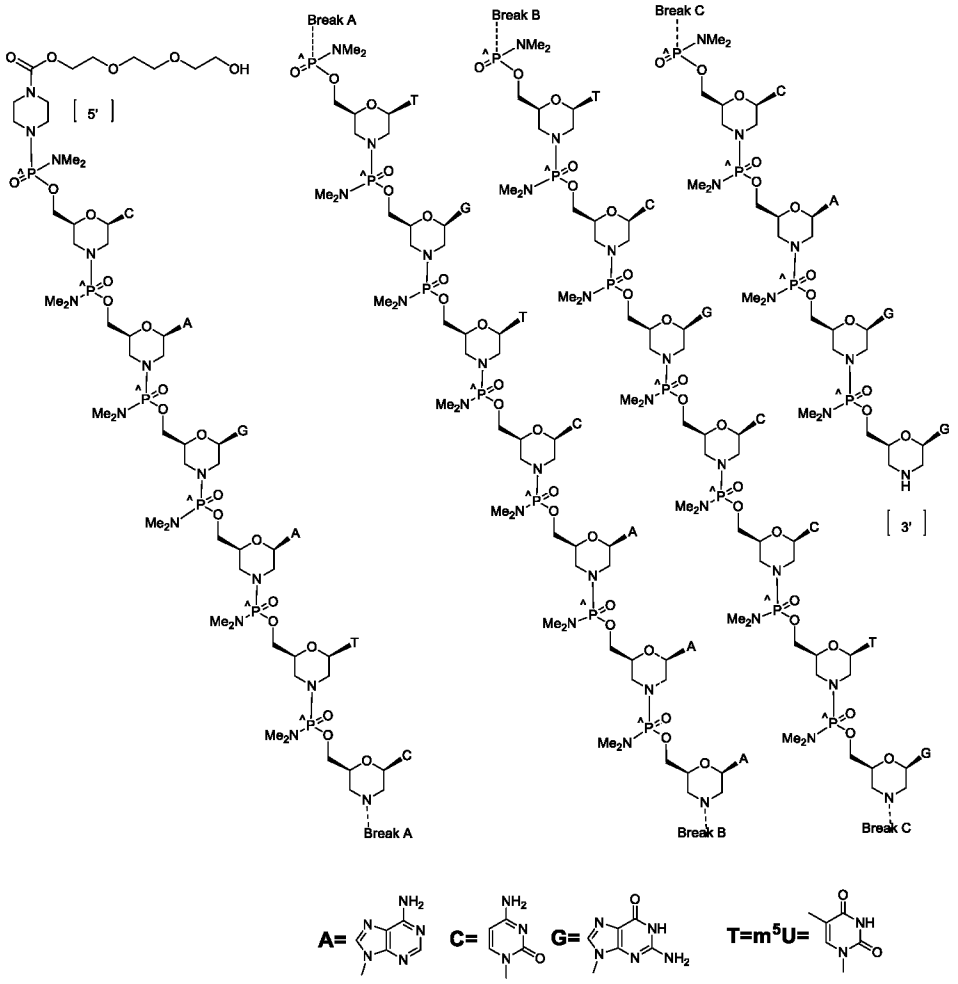
T GGA 3') و المستخدمة كما تم وصفها في المثالين 8 و 9.



^ لم يتم تحديد الخصائص الكيميائية الخاصة بمركز الفسفور

المثال 6

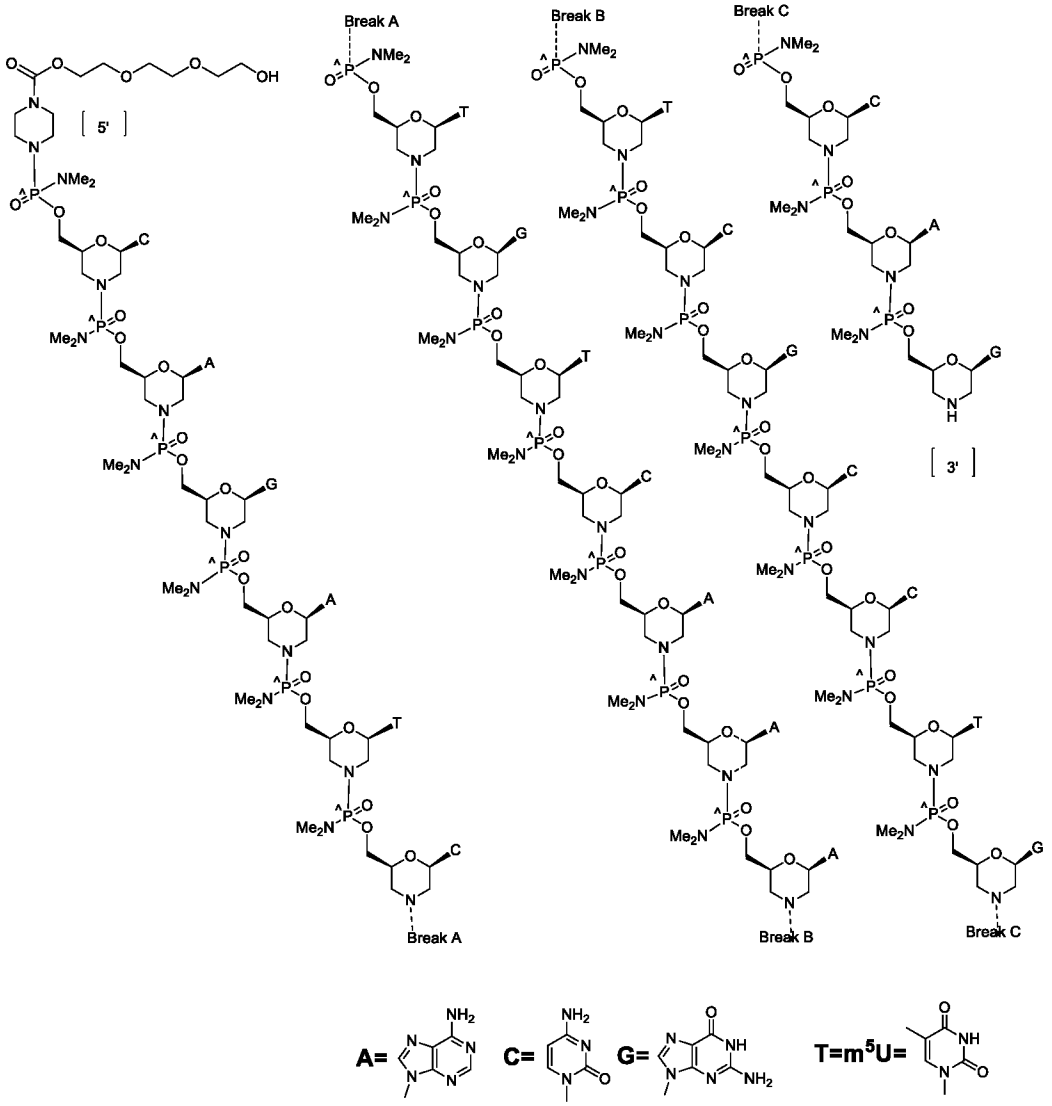
باستخدام البروتوكول الموصوف في المثال 1، تم تخليق PMO التالي ، -13-NG8000 5 H44A(-7+17)، متوالية رقم :1 (5 TGC CCA ATC GTT CAG -'3AGG-') و المستخدمة كما تم وصفها في المثالين 8 و 9.



^ لم يتم تحديد الخصائص الكيميائية الخاصة بمركز الفسفور

المثال 7

باستخدام البروتوكول الموصوف في المثال 1، تم تخليق PMO التالي ، NG-13-zzz0395 H44A(-6+17)، متوالية رقم: 8 (5' - CAG ATC TGT CAA ATC GCC TGC AG - 3') و المستخدمة كما تم وصفها في المثالين 8 و 9.



^ لم يتم تحديد الخصائص الكيميائية الخاصة بمركز الفسفور

المثال رقم 8 تخطي الأكسون 44

تم تصميم أوليجيومرات مضاد للحس التي تستهدف إكسون ديستروفين 44 وتم التخليق كما يلي:

متوالية رقم	المتوالية	الوصف
1	CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG	H44A(-07+17)

H44A(-07+20)	CAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG	2
H44A(-07+22)	CTCAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG	3
H44A(-8+15)	GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGT	4
H44A(-7+15)	GATCTGTCAAATCGCCTGCAGG	5
H44A(-6+15)	GATCTGTCAAATCGCCTGCAG	6
H44A(-8+17)	CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGGT	7
H44A(-6+17)	CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAG	8
H44A(+77+101)	GTGTCTTTCTGAGAAACTGTTCAGC	9
H44A(+64+91)	GAGAAACTGTTCAGCTTCTGTTAGCCAC	10
H44A(+62+89)	GAAACTGTTCAGCTTCTGTTAGCCACTG	11
H44A(+62+85)	CTGTTCAGCTTCTGTTAGCCACTG	12
H44A(-13+14)	ATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAAAAG	46
H44A(-14+15)	GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAAAAGC	47

تم تقييم أوليجيومرات مضاد للحس مختارة أعلاه فيما يتعلق بفعالية تخطي الأكسون بواسطة خلايا RD معالجة عند العديد من التركيزات. في تلك التجارب، تم نشر الأوليجيومرات المناظرة لـ H44A(-06+14) و H44A(+85+104) (384,232,8؛ المتوالية رقم: 167 و 165، على الترتيب) و H44A(-06+20)، H44A(-09+17)، H44A(+59+85) و H44A(+65+90) (057350/2011؛ المتوالية رقم: 68، 220، 54 و 10، على الترتيب) التي تم استخدامها في شكل أوليجومرات مقارنة. وكما هو موضح في الشكل رقم 3، كان أوليجيومر H44A(-07+17) (المتوالية رقم 1) له فعالية عالية عند حث تخطي الأكسون 44 في خلايا RD بالمقارنة مع متواليات معروفة. وكما هو موضح في الشكل رقم 4، H44A(+62+89) (المتوالية رقم 11) تم جعلها فعالة في حث تخطي الأكسون 44 في خلايا RD مزروعة بالمقارنة مع أوليجيونوكليوتيدات مضاد للحس عالية الفعالية معروفة في المجال.

المثال رقم 9

تخطي الأكسون 44 في أورمات عضلية بشرية أساسية

بالاعتماد على النتائج السابقة الموصوفة في المثال رقم 8، تم تصميم الأوليجيوميرات وتم اختباره فيما يتعلق بأورمات عضلية بشرية. تكون هناك متواليات إضافية معروفة في املجال ويتم تضمينها في التحليل H44A(-10+15)و H44A(-20+5) ؛ المتوالية رقم 44 و 45 على الترتيب) كوسائل مقارنة خاصة بأوليجيومرات تم تصميمها على نحو جديد. تم الكشف عن تلك المتواليات في شكل المتوالية رقم 4 و 2 في نشرة PCT من الطلب رقم 048586/2010. وكما هو موض في الأشكال من 5-6، فإن المدى الخاص بالأوليجيومرات التي تم وضعها بداخل المنطقة المستهدفة يتم تحدديها في شكل H44A(-07+17) تكون لك منها لها القدرة على حث تخطي الأكسون 44 عند مستويات عالية بشكل نسبي بالمقارنة مع المتواليات المعروفة في المجال. تم توضيح الأوليجيومرات المفضلة أعلاه في الأمثلة 2-7 (المتواليات أرقام 4، 5، 6، 7، 1 و8 على الترتيب).

تم تضمين كل النشرات وطلبات البراءات المذكورة ي المواصفة الحالية كمرجع حيث أن كل نشرة أو طلب نشرة توضح بشكل خاص وعلى نحو فردي أنه تم تضمينها كمرجع هنا.

قائمة المتواليات

متوالية رقم	المتوالية	الوصف
1	CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG	H44A(−07+17)
2	CAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG	H44A(−07+20)
3	CTCAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGG	H44A(−07+22)
4	GAT CTG TCA AAT CGC CTG CAG GT	H44A(−8+15)
5	GAT CTG TCA AAT CGC CTG CAG G	H44A(−7+15)
6	GAT CTG TCA AAT CGC CTG CAG	H44A(−6+15)
7	CAG ATC TGT CAA ATC GCC TGC AGG T	H44A(−8+17)
8	CAG ATC TGT CAA ATC GCC TGC AG	H44A(−6+17)
9	GTGTCTTTCTGAGAAACTGTTCAGC	H44A(+77+101)
10	GAGAAACTGTTCAGCTTCTGTTAGCCAC	H44A(+64+91)
11	GAAACTGTTCAGCTTCTGTTAGCCACTG	H44A(+62+89)
12	CTGTTCAGCTTCTGTTAGCCACTG	H44A(+62+85)
13	ATCTGTCAAATCGCCTGCAG	H44A(−06+14)

H44A(+85+104)	TTTGTGTCTTTCTGAGAAAC	14
H44A(+61+84)	TGTTCAGCTTCTGTTAGCCACTGA	15
H44A(−10+15)	GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAA	16
H44A(+64+88)	AAACTGTTCAGCTTCTGTTAGCCAC	17
H44A(+79+103)	TTGTGTCTTTCTGAGAAACTGTTCA	18
H44A(−06+20)	CAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCAG	19
H44A(−09+17)	CAGATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTA	20
H44A(+59+85)	CTGTTCAGCTTCTGTTAGCCACTGATT	21
H44A(+59+89)	GAAACTGTTCAGCTTCTGTTAGCCACTGATT	22
H44A(+65+90)	AGAAACTGTTCAGCTTCTGTTAGCCA	23
rTAT	RRRQRRKKR	24
Tat	RKKRRQRRR	25
R9F2	RRRRRRRRRFF	26
R5F2R4	RRRRRFFRRRR	27
R4	RRRR	28
R5	RRRRR	29

R6	RRRRRR	30
R7	RRRRRRR	31
R8	RRRRRRRR	32
R9	RRRRRRRRR	33
(RX)8	RXRXRXRXRXRXRXRX	34
(RAhxR)4; (P007)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	35
(RAhxR)5; (CP04057)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	36
(RAhxRRBR)2; (CP06062)	RAhxRRBRRAhxRRBR	37
(RAR)4F2	RARRARRARRARFF	38
(RGR)4F2	RGRRGRRGRRGRFF	39
Primer	caatgctcctgacctctgtgc	40
Primer	gctcttttccaggttcaagtgg	41
Primer	gtctacaacaaagctcaggtcg	42
Primer	gcaatgttatctgcttcctccaacc	43
H44A(-10+15)	GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAA	44
H44A(-20+5)	ATCGCCTGCAGGTAAAAGCATATGG	45

H44A(-13+14)	ATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAAAAG	46
H44A(-14+15)	GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAAAAGC	47

المراجع

Aartsma-Rus, A., A. A. Janson, et al. (2004). "Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense." Am J Hum Genet 74(1): 83-92.

Cirak, S., V. Arechavala-Gomeza, et al. (2011). "Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study." Lancet 378(9791): 595-605.

Dunckley, M. G., I. C. Eperon, et al. (1997). "Modulation of splicing in the DMD gene by antisense oligoribonucleotides." Nucleosides & Nucleotides 16(7-9): 1665-1668.

Dunckley, M. G., M. Manoharan, et al. (1998). "Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured Mdx muscle cells by antisense oligoribonucleotides." Hum Mol Genet 7(7): 1083-90.

Errington, S. J., C. J. Mann, et al. (2003). "Target selection for antisense oligonucleotide induced exon skipping in the dystrophin gene." J Gene Med 5(6): 518-27.

Goemans, N. M., M. Tulinius, et al. (2011). "Systemic Administration of PRO051 in Duchenne's Muscular Dystrophy." N Engl J Med.

Jearawiriyapaisarn, N., H. M. Moulton, et al. (2008). "Sustained Dystrophin Expression Induced by Peptide-conjugated Morpholino Oligomers in the Muscles of mdx Mice." Mol Ther.

Kinali, M., V. Arechavala-Gomeza, et al. (2009). "Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study." Lancet Neurol 8(10): 918-28.

Lu, Q. L., C. J. Mann, et al. (2003). "Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse." Nat Med 9(8): 1009-14.

Mann, C. J., K. Honeyman, et al. (2002). "Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy." J Gene Med 4(6): 644-54.

Marshall, N. B., S. K. Oda, et al. (2007). "Arginine-rich cell-penetrating peptides facilitate delivery of antisense oligomers into murine leukocytes and alter pre-mRNA splicing." Journal of Immunological Methods 325(1-2): 114-126.

Matsuo, M., T. Masumura, et al. (1991). "Exon skipping during splicing of dystrophin mRNA precursor due to an intraexon deletion in the dystrophin gene of Duchenne muscular dystrophy kobe." J Clin Invest 87(6): 2127-31.

Monaco, A. P., C. J. Bertelson, et al. (1988). "An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus." Genomics 2(1): 90-5.

Pramono, Z. A., Y. Takeshima, et al. (1996). "Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence." Biochem Biophys Res Commun 226(2): 445-9.

Sazani, P., R. Kole, et al. (2007). Splice switching oligomers for the TNF superfamily receptors and their use in treatment of disease. PCT WO2007058894, University of North Carolina

Sierakowska, H., M. J. Sambade, et al. (1996). "Repair of thalassemic human beta-globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides." Proc Natl Acad Sci U S A 93(23): 12840-4.

Summerton, J. and D. Weller (1997). "Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties." Antisense Nucleic Acid Drug Dev 7(3): 187-95.

Takeshima, Y., H. Nishio, et al. (1995). "Modulation of in vitro splicing of the upstream intron by modifying an intra-exon sequence which is deleted from the dystrophin gene in dystrophin Kobe." J Clin Invest 95(2): 515-20.

van Deutekom, J. C., M. Bremmer-Bout, et al. (2001). "Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells." Hum Mol Genet 10(15): 1547-54.

van Deutekom, J. C., A. A. Janson, et al. (2007). "Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051." N Engl J Med 357(26): 2677-86.

Wilton, S. D., A. M. Fall, et al. (2007). "Antisense oligonucleotide-induced exon skipping across the human dystrophin gene transcript." Mol Ther 15(7): 1288-96.

Wilton, S. D., F. Lloyd, et al. (1999). "Specific removal of the nonsense mutation from the mdx dystrophin mRNA using antisense oligonucleotides." Neuromuscul Disord 9(5): 330-8.

Wu, B., H. M. Moulton, et al. (2008). "Effective rescue of dystrophin improves cardiac function in dystrophin-deficient mice by a modified morpholino oligomer." Proc Natl Acad Sci U S A 105(39): 14814-9.

Yin, H., H. M. Moulton, et al. (2008). "Cell-penetrating peptide-conjugated antisense oligonucleotides restore systemic muscle and cardiac dystrophin expression and function." Hum Mol Genet 17(24): .3909-18

عناصر الحماية

1- أوليجونوكليوتيد مضاد لاتجاه النسخ antisense oligonucleotide يتم اختياره من المجموعة التي تتكون من:

أ) أوليجونوكليوتيد مضاد لاتجاه النسخ antisense oligonucleotide له 22 قاعدة تشتمل على متوالية أساسية GAT CTG TCA AAT CGC CTG CAG G base sequence (متوالية رقم: 5)؛

ب) أوليجونوكليوتيد مضاد لاتجاه النسخ antisense oligonucleotide له 24 قاعدة تشتمل على متوالية أساسية base sequence

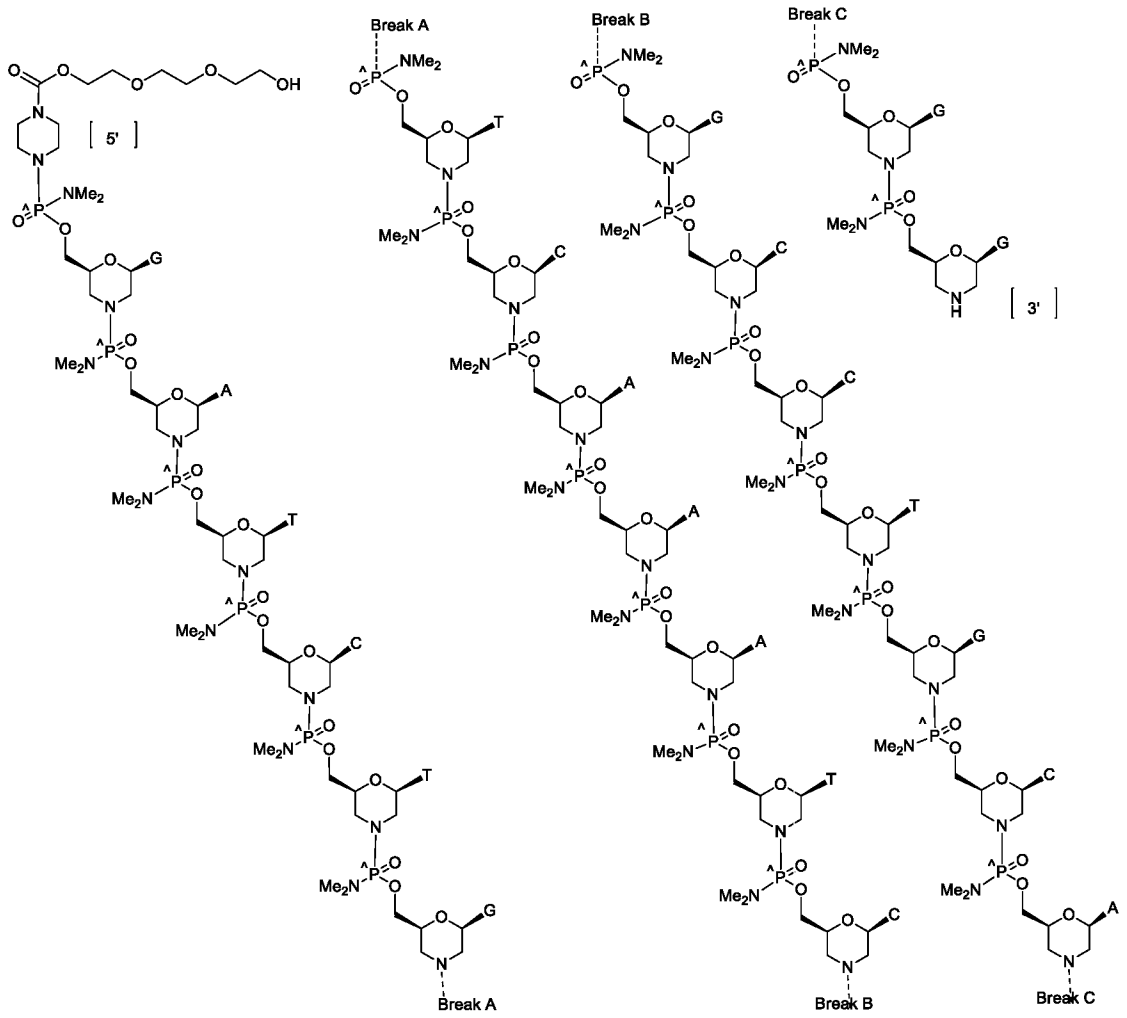
CAG ATC TGT CAA ATC GCC TGC AGG (متوالية رقم: 1)؛

حيث يتم استبدال مركبات MOs بشقوق السكر في السلسلة الرئيسية لأوليجونكليوتيد oligonucleotide ،

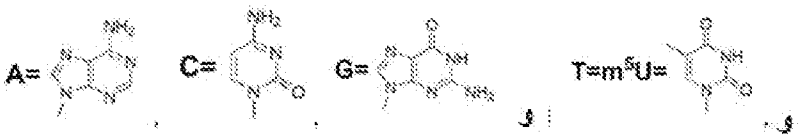
وملح مقبول صيدلانياً منه.

2- أوليجونوكليوتيد مضاد لاتجاه النسخ antisense oligonucleotide وفقا لعنصر الحماية 1, حيث يرتبط أوليجونيوكليوتيد oligonucleotide كيميائيا بجزئ بولي إيثيلين جليكول polyethylene glycol molecule.

3- أوليجونوكليوتيد مضاد لاتجاه النسخ antisense oligonucleotide وفقا لعنصر الحماية 1, حيث يكون لأوليجونوكليوتيد مضاد لاتجاه النسخ البنية التالية:

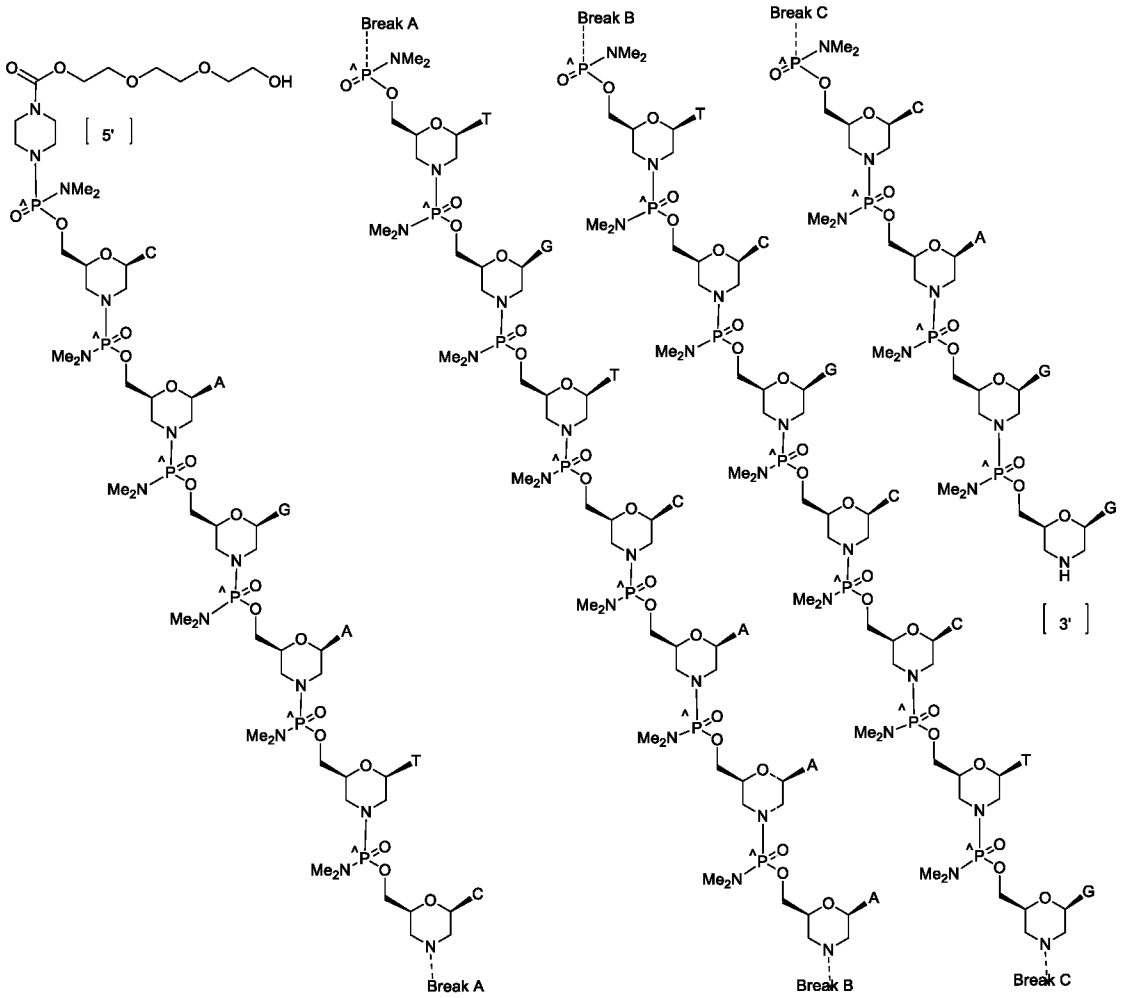


حيث أن

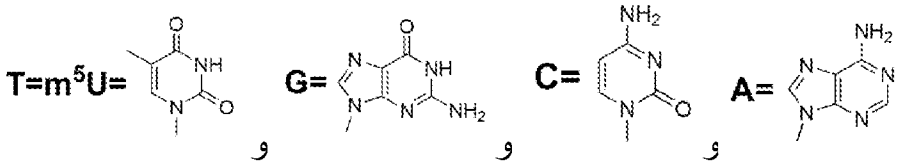


وحيث أن ^ = لم يتم تحديد الكيمياء الفراغية stereochemistry الخاصة بمركز فسفور phosphorous center.

4- أوليجونوكليوتيد مضاد لاتجاه النسخ antisense oligonucleotide وفقا لعنصر الحماية 1، حيث يكون لأوليجونوكليوتيد مضاد لاتجاه النسخ البنية التالية:



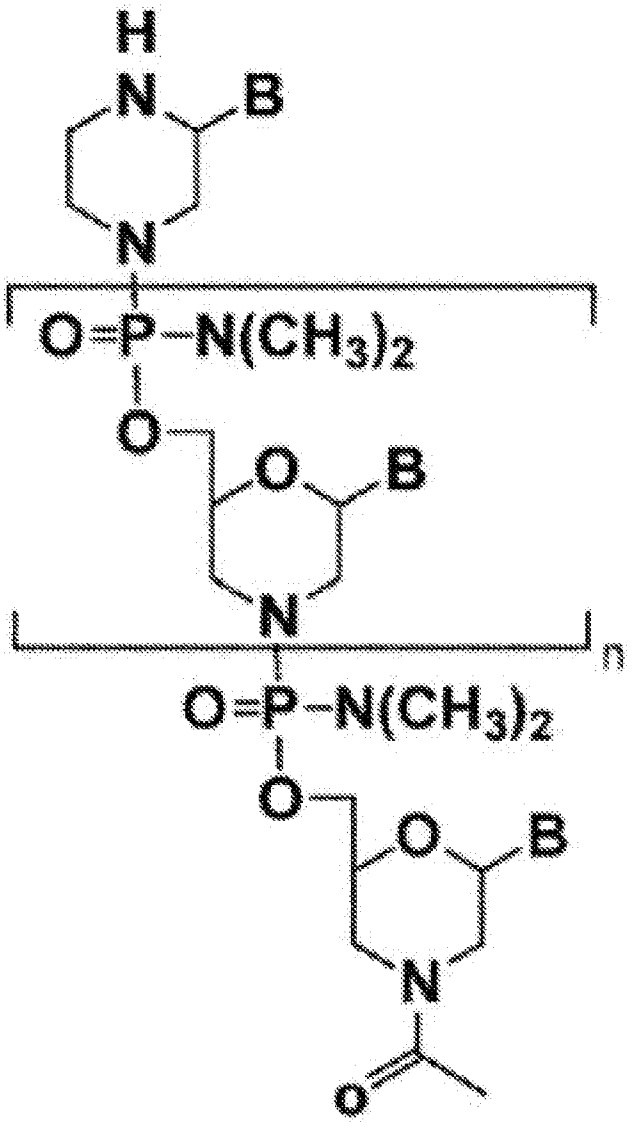
حيث أن:



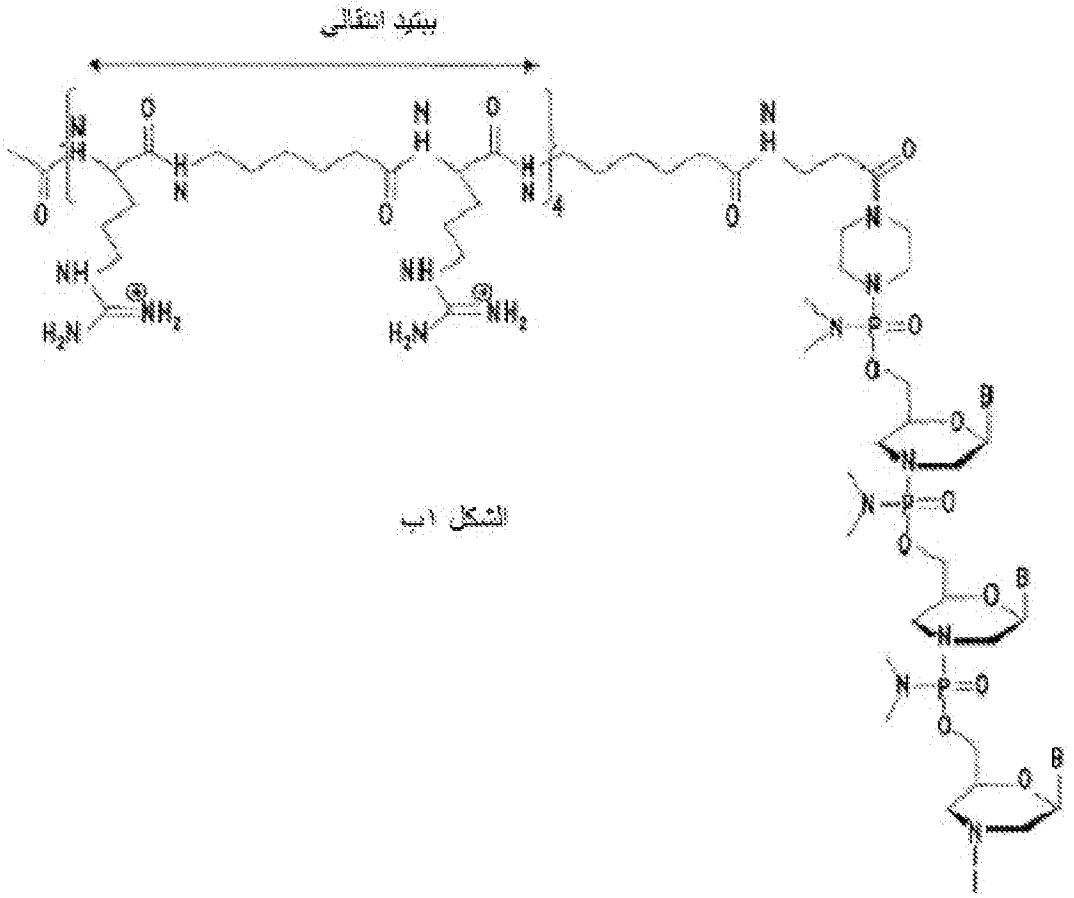
و و و

5 وحيث أن ^ = لم يتم تحديد الكيمياء الفراغية stereochemistry الخاصة بمركز فسفور phosphorous center.

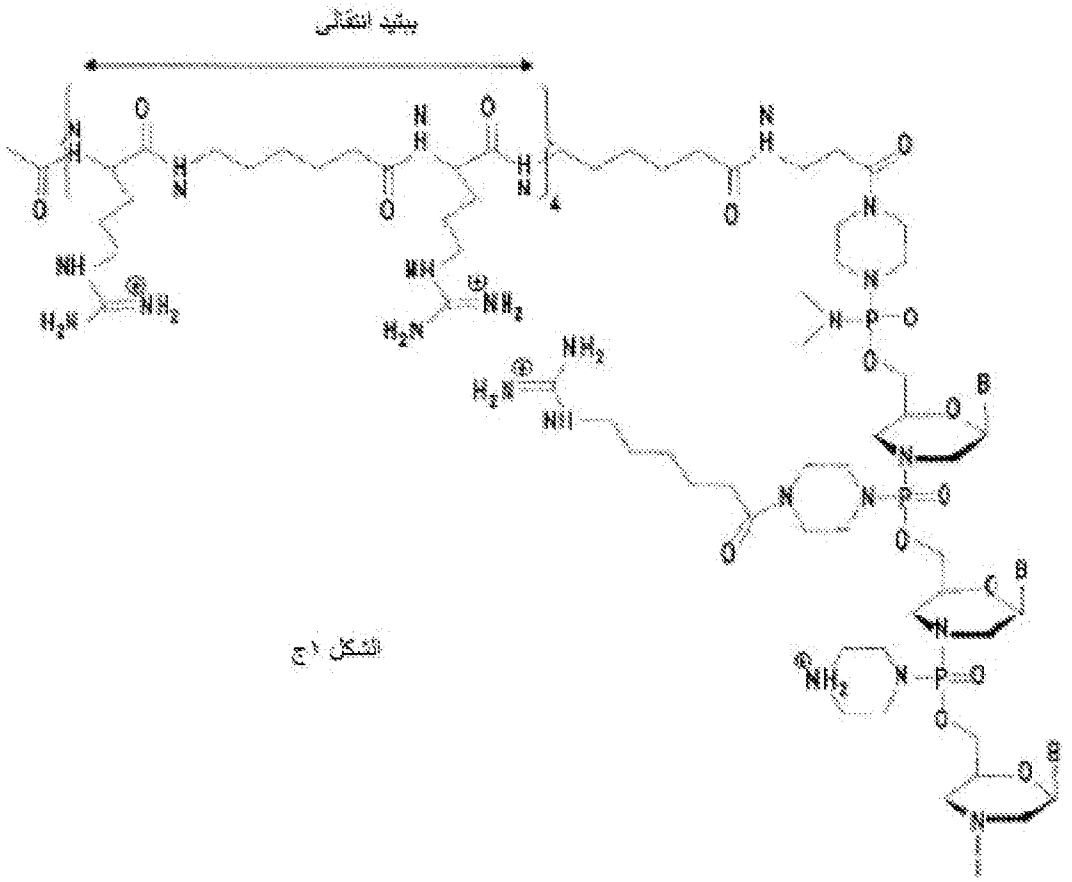
5- تركيبة صيدلانية تشتمل على أوليجيونيوكليوتيد مضاد لاتجاه النسخ antisense oligonucleotide وفقاً لأيٍ من عناصر الحماية من 1-4 ومادة حاملة مقبولة صيدلانياً.



الشكل ١أ

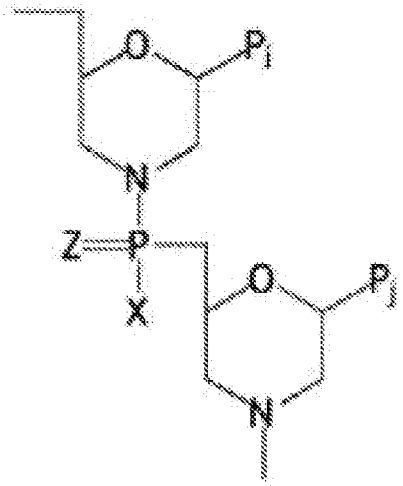


الشكل ١ب

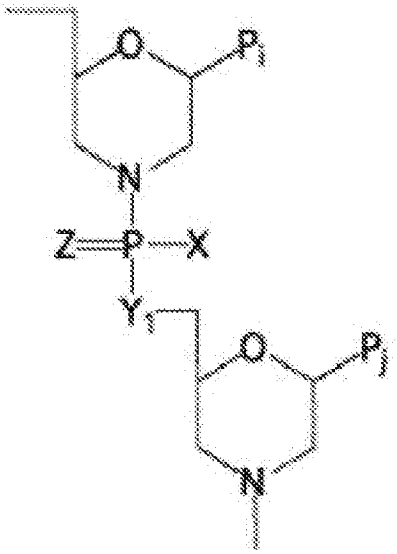


الشكل ١ ج

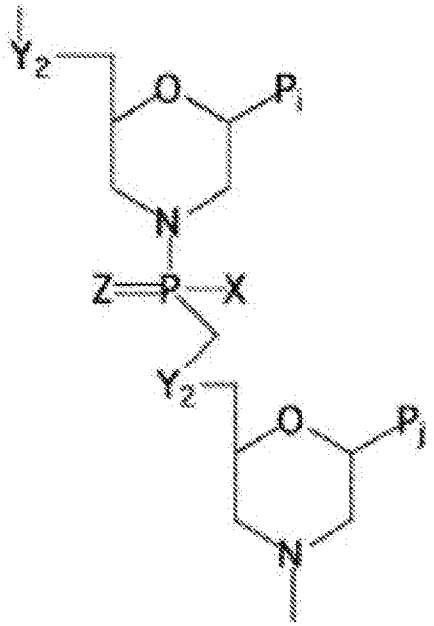
الشكل ١د



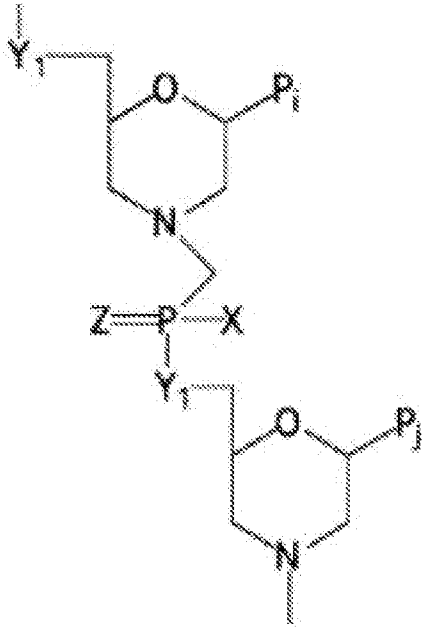
الشكل ١هـ

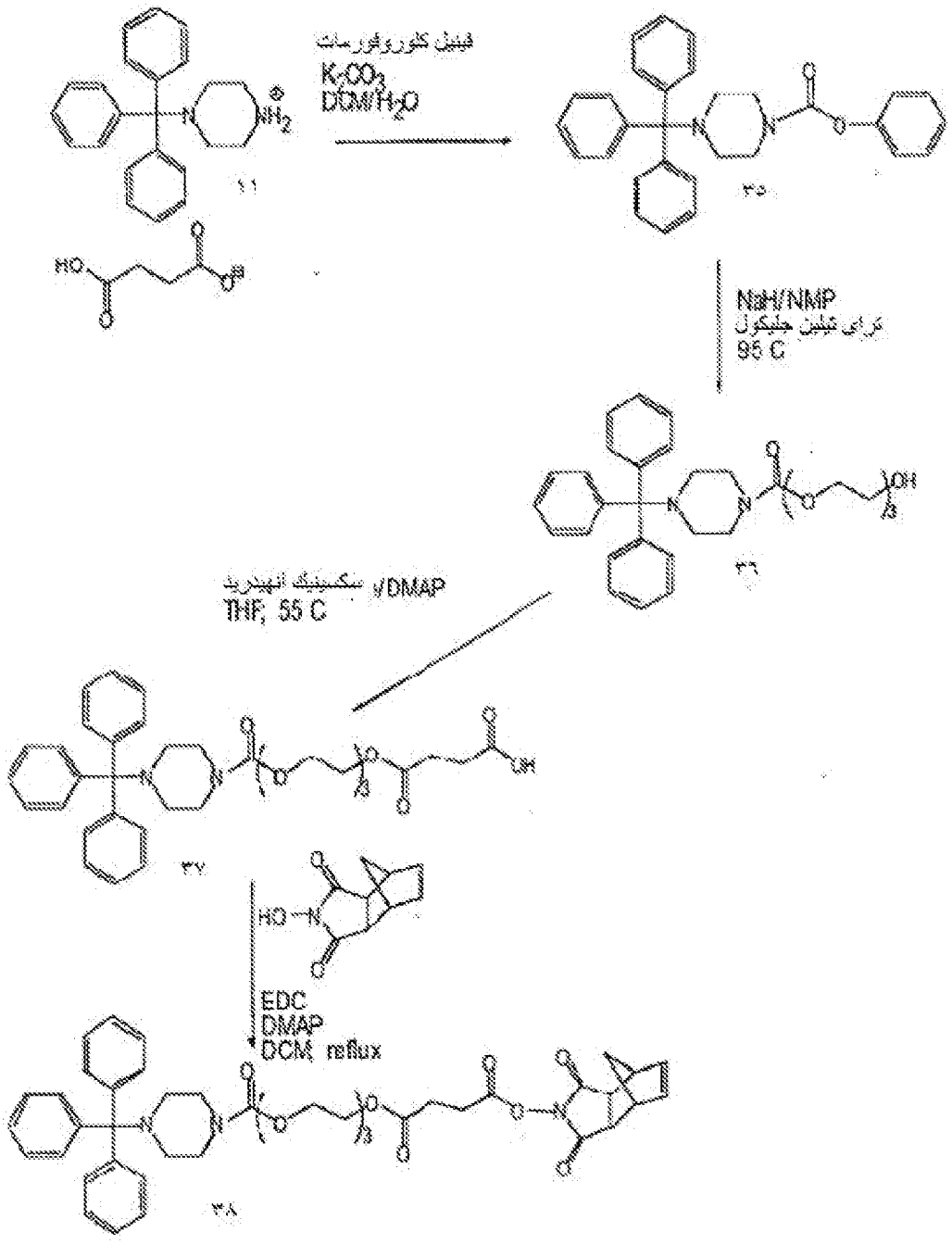


الشكل ١و

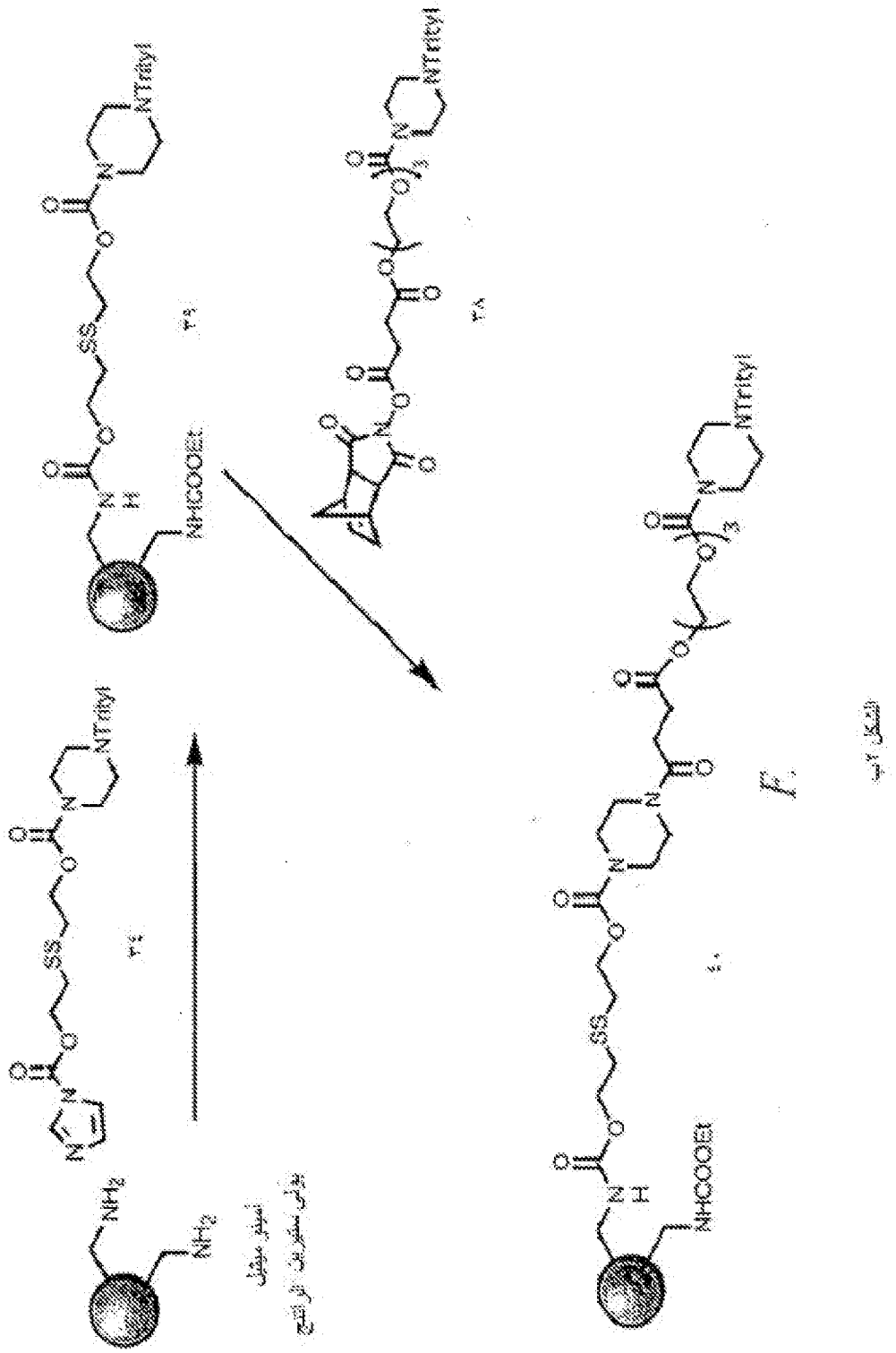


الشكل ١ز

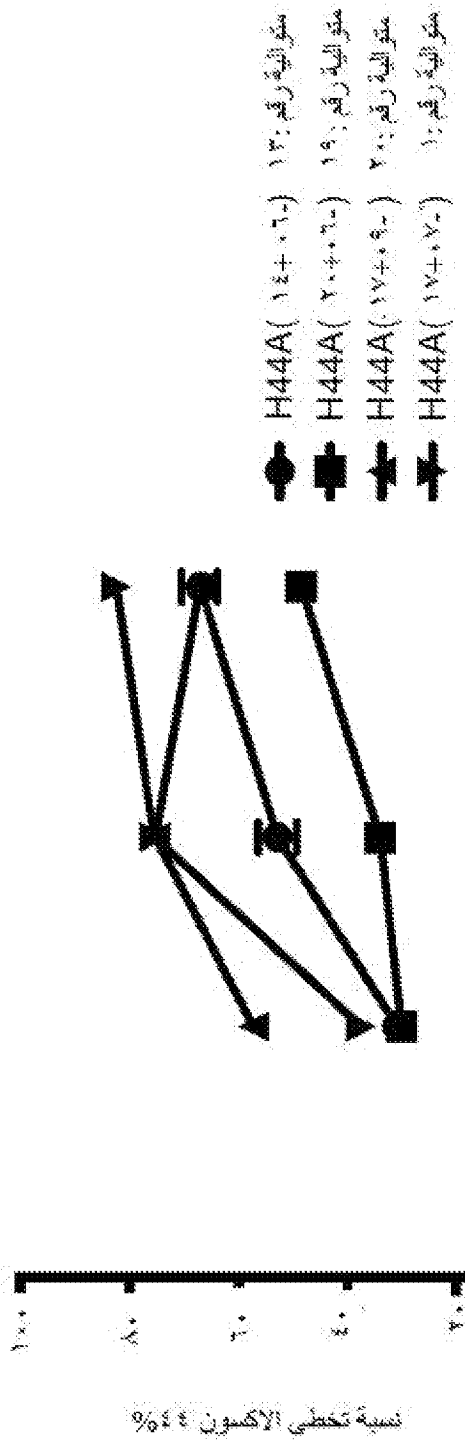



فنیل کلوروفورمات
K_2CO_3
DCM/H_2O
NaH/NMP
گلیکول اتیلن برای
95 C
سکسینیک انهیدرید /DMAP
THF, 55 C
EDC
DMAP
DCM, reflux

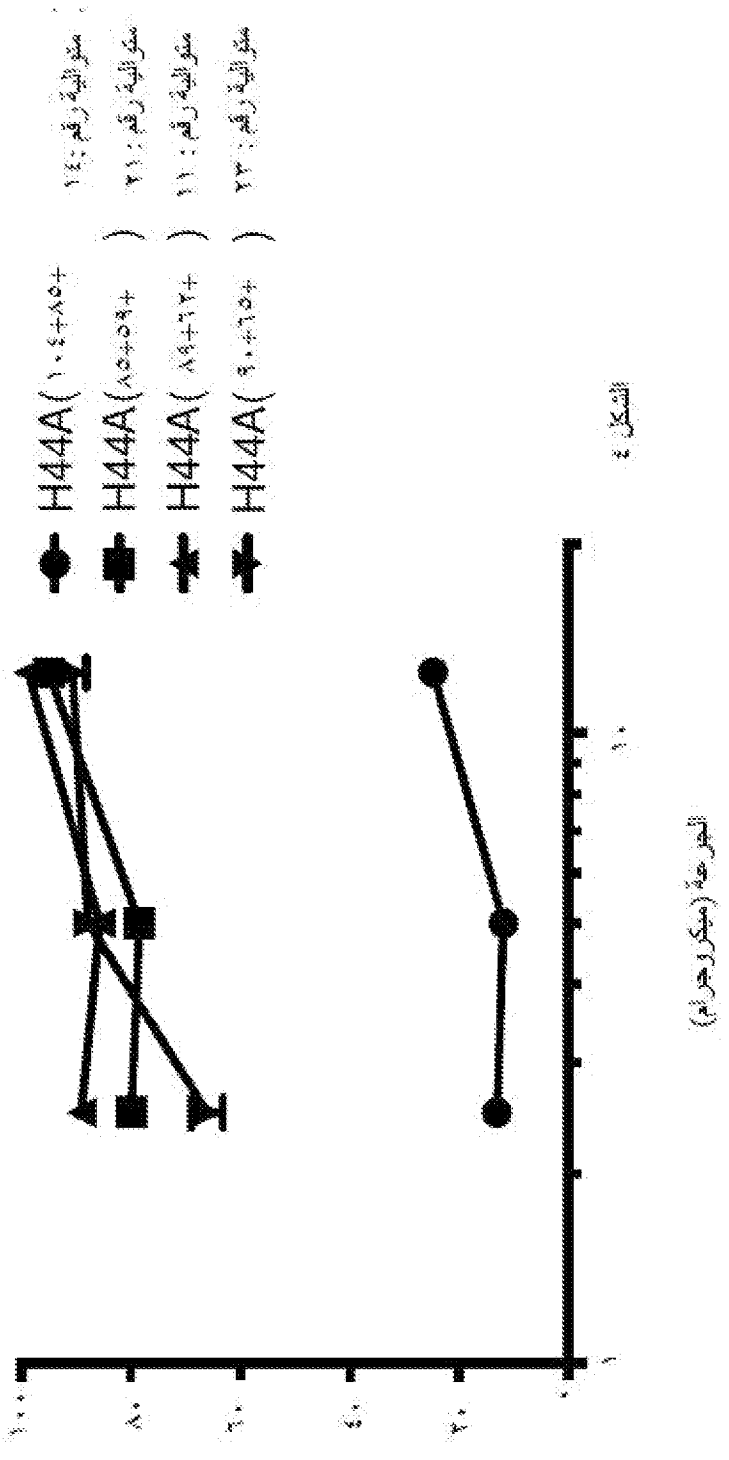
شکل ۲

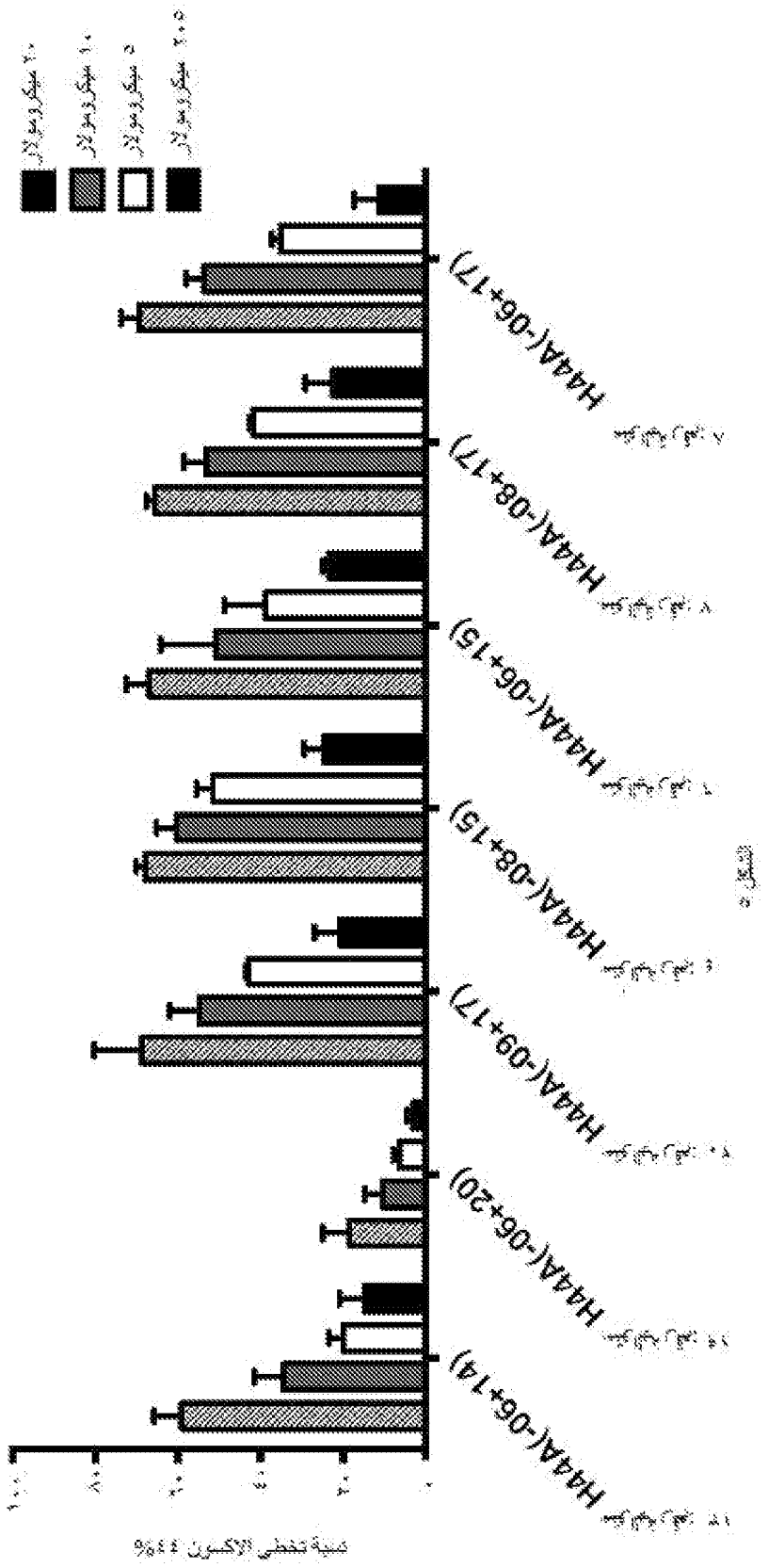

NH2
NH2
لسفير مثل
بولي سكسينيك انهيدريد
NTrityl
SS
NHCOOEt
NTrityl
NTrityl
NHCOOEt

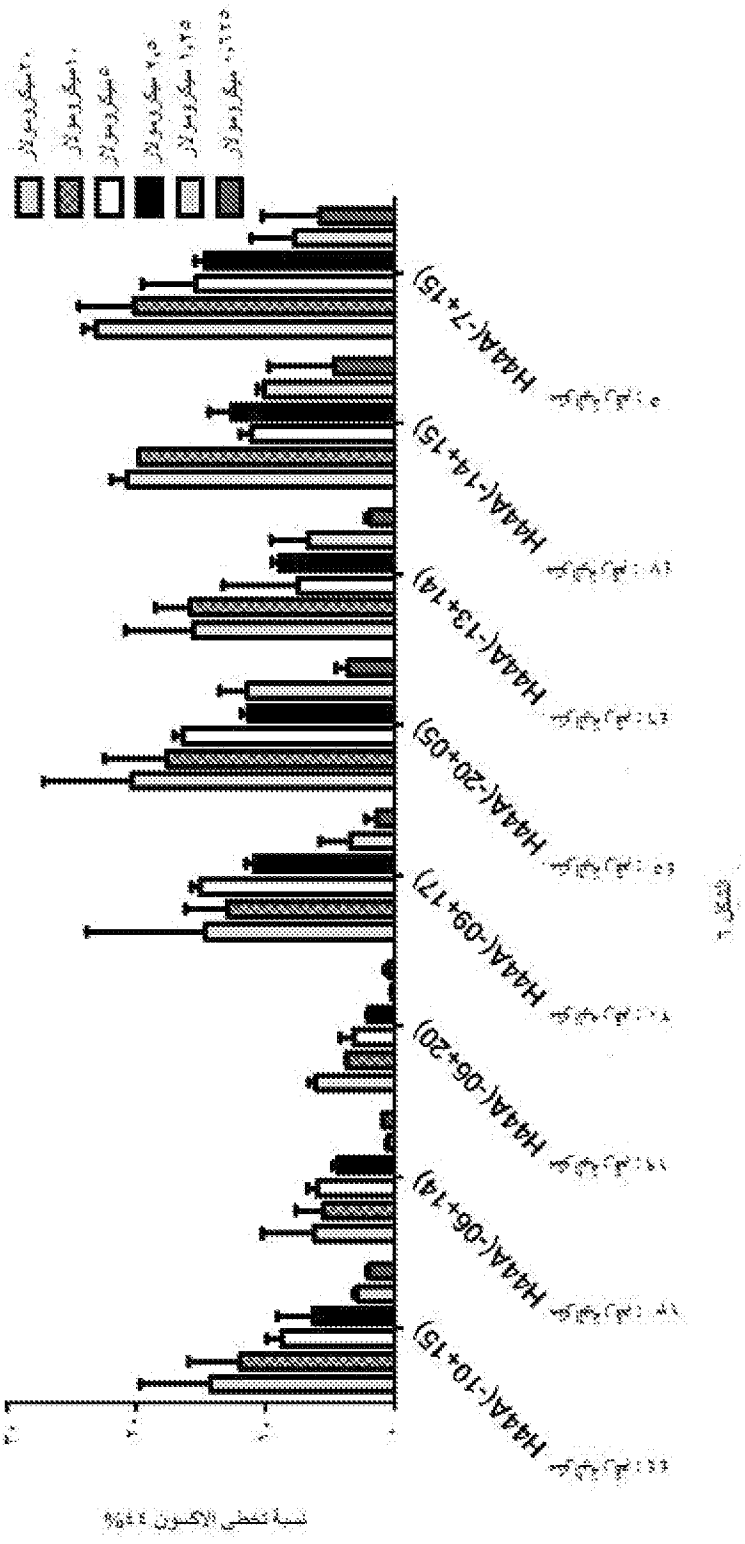
الشكل ٢ب


H44A(١٤+٠٦-) متوالية رقم: ١٣
H44A(٢٠+٠٦-) متوالية رقم: ١٩
H44A(١٧+٠٤-) متوالية رقم: ٢٠
H44A(١٧+٠٧-) متوالية رقم: ١
١٠٠
٨٠
٦٠
٤٠
٢٠
٠
١
١٠
الجرعة (ميكروجرام)
نسبة تحطي الاكسون ٤٠%

الشكل ٣


H44A(١٠٤+٨٥+) متوالية رقم: ١٤
H44A(٨٥+٥٩+) متوالية رقم: ٢١
H44A(٨٩+٦٢+) متوالية رقم: ١١
H44A(٩٠+٦٥+) متوالية رقم: ٢٣
نسبة تخطي الاكسون ٤٤%
الجرعة (ميكروجرام)
الشكل ٤


٢٠ ميكرومولار
١٠ ميكرومولار
٥ ميكرومولار
٢٫٥ ميكرومولار
H4AA(-08+17)
H4AA(-08+17)
H4AA(-08+15)
H4AA(-08+15)
H4AA(-09+17)
H4AA(-06+20)
H4AA(-06+14)
نسبة تخطي الإكسون ٤٤%


٢٠ ميكرومولار
١٠ ميكرومولار
٥ ميكرومولار
٢,٥ ميكرومولار
١,٢٥ ميكرومولار
٠,٦٢٥ ميكرومولار
H4AA(-7+15)
H4AA(-14+15)
H4AA(-13+14)
H4AA(-20+05)
H4AA(-09+17)
H4AA(-05+20)
H4AA(-05+14)
H4AA(-10+15)
نسبة تحطي الأكسون ٤٤%

مدة سريان هذه البراءة عشرون سنة من تاريخ إيداع الطلب

وذلك بشـرط تسـديد المقابل المالي السـنوي للبراءة وعدم بطلانها أو سـقوطها لمخالفتها لأي من أحكام نظام براءات الاختراع والتصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة والأصناف النباتية والنماذج الصناعية أو لائحته التنفيذية.

صادرة عن

الهيئة السعودية للملكية الفكرية

ص ب ٦٥٣١ ، الرياض ١٣٣٢١ ، المملكة العربية السعودية

SAIP@SAIP.GOV.SA