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 و بموجب أحكام نظام براءات الإختراع و التصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة و الأصناف النباتية و النماذج الصناعية الصادر بالمرسوم الملكي الكريم رقم م/27 وتاريخ 1425/05/29هـ و المعدل بقرار مجلس الوزراء رقم 536 و تاريخ 1439/10/19هـ ، و لائحته التنفيذية.
يقرر منح :

ساريبتا ثيرابيوتكس، انك
SAREPTA THERAPEUTICS, INC.

براءة اختراع رقم : SA 11754

بتاريخ : 1444/05/25 هـ
الموافق : 2022/12/19 م

عن الإختراع المسمى :

مترافقات أوليجومرات تخطي الإكسون للحثل العضلي

Exon Skipping Oligomer Conjugates for 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 11754 B1

[12] **براءة اختراع**

[45] **تاريخ المنح:** 1444/05/25 هـ
الموافق: 2022/12/19 م

[21] رقم الطلب: 519402154
[22] تاريخ دخول المرحلة الوطنية: 1440/10/14 هـ
الموافق: 2019/06/17 م
[30] بيانات الأسبقية:
2016/12/19 US 62/436.182 م
2017/01/06 US 62/443.476 م
2017/03/30 US 62/479.173 م
2017/09/22 US 62/562.080 م
[72] اسم المخترع: ماركو ايه. باسيني، جونار جيه. هانسون
[73] مالك البراءة: ساريبتا ثيرابيوتكس، انك
عنوانه: 215 فيرست ستريت، كامبيردج، ماساتشوستس 02142، الولايات المتحدة الامريكية
جنسيته: امريكية
[74] الوكيل: مكتب المحامي سليمان ابراهيم العمار

[86] رقم الطلب الدولي: PCT/US2017/066222
تاريخ إيداع الطلب الدولي: 2019/12/13 م
[87] رقم النشر الدولي: WO 2018/118599
تاريخ النشر الدولي: 2018/06/28 م
[51] التصنيف الدولي(IPC[9]):
A61K 047/064, A61P 021/000
[56] المراجع:
US 20140315862, US 20120289457

الفاحص: ماجد بن غرم الله الغامدي

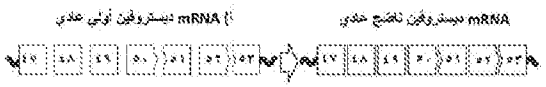
[54] اسم الاختراع: مترافقات أوليجومرات تخطي الإكسون للحَثَل العَضَلِيّ

Exon Skipping Oligomer Conjugates for Muscular Dystrophy

[57] الملخص: يتعلق الاختراع الحالي بوصف مترافقات الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ المتممة لموقع مستهدف مختار في جين الديستروفين البشري للحث على تخطي الإكسون 51. الشكل (1)

عدد عناصر الحماية (6)، عدد الأشكال (26)

شكل ١



أوليجومرات تخطي الإكسون للحَثَل العَضَلِيّ

Exon Skipping Oligomer Conjugates for Muscular Dystrophy

الوصف الكامل

خلفية الاختراع

يتعلق الكشف الحالي بمترافقات أوليجومرات مضادة لاتجاه النسخ جديدة ملائمة تخطي الإكسون 51 في جين الديستروفين البشري وتركيبات صيدلية منها. يوفر الكشف أيضًا طرقًا للحث على تخطي الإكسون 51 باستخدام بمترافقات الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ الجديدة، طرقًا لإنتاج الديستروفين في خاضع للعلاج لديه طفرة في جين الديستروفين الذي يكون مُعرّضًا لتخطي الإكسون 51، وطرقًا لعلاج خاضع للعلاج لديه طفرة في جين الديستروفين الذي يكون مُعرّضًا لتخطي الإكسون 51.

يتم تطوير التقنيات المضادة لاتجاه النسخ باستخدام نطاق من الكيمياء للتأثير على التعبير الوراثي عن الجين عند مجموعة متنوعة من المستويات المختلفة (الاستنساخ، الجدل، الثبات، التحوّر الوراثي). لقد تركز الكثير من هذا البحث على استخدام المركبات المضادة لاتجاه النسخ لتصحيح أو التعويض عن الجينات غير الطبيعية أو المصاحبة للأمراض في نطاق واسع من دواعي الاستعمال. تعتبر الجزيئات المضادة لاتجاه النسخ قادرة على تثبيط التعبير الوراثي عن الجين باستخدام النوعية، وبسبب هذا، فقد تركزت العديد من جهود البحث المتعلقة بالأوليجومرات كمعدلات للتعبير الوراثي عن الجين على تثبيط التعبير الوراثي عن الجينات المستهدفة أو وظيفة العناصر العاملة سيس. يتم نمطيًا توجيه الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ ضد RNA، إما الجديلة مع اتجاه النسخ (على سبيل المثال، mRNA)، أو الجديلة الناقصة في حالة بعض من أهداف RNA الفيروسية. لتحقيق تأثير مطلوب خاص بالتنظيم التنازلي لجين نوعي، تقوم الأوليجومرات بصفة عامة إما بتعزيز انحلال mRNA المستهدف، إعاقة التحوّر الوراثي لـ mRNA أو إعاقة وظيفة عناصر RNA العاملة سيس، وبالتالي منع إما التخليق الجديد البروتين المستهدف أو نسخ RNA الفيروسي بكفاءة.

بالرغم من ذلك، لا تعتبر هذه التقنيات مفيدة حيث يتمثل الهدف في تنظيم إنتاج البروتين الأصلي تصاعديًا أو التعويض عن الطفرات التي تحث على الإنهاء السابق لأوانه للتحوّر الوراثي، مثل الطَفْرَات الهُرَائِيَّة أو الخاصة بإزاحة الإطار. في هذه الحالات، لا ينبغي تعريض نسخة الجين المعيبة إلى التحلل المستهدف أو التثبيط الفراغي، لذا لا ينبغي أن تُعزز كيمياء الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ انحلال mRNA المستهدف أو تعيق التحوّر الوراثي.

في مجموعة متنوعة من الأمراض الجينية، يمكن تعديل تأثيرات الطفرات على التعبير النهائي عن جين من خلال عملية خاصة بتخطي الإكسون المستهدف أثناء عملية الجدل. يتم توجيه عملية الجدل بواسطة آلية متعددة المكونات معقدة تجلب وصلات الإكسون–الإنترون المتجاورة في mRNA أولي في حالة تقارب وثيق وتقوم بشطر روابط فوسفو داي إستر عند نهايات الإنترونات مع إعادة تشكيلها لاحقًا فيما بين الإكسونات التي سيتم جدلها معًا. تنشأ هذه العملية المعقدة وعالية الدقة بواسطة بواعث المتوالية في mRNA الأولي القصيرة نسبيًا، مقاطع RNA شبه المتحفظة التي ترتبط بها عوامل الجدل النووي المتنوعة المتضمنة بعد ذلك في تفاعلات الجدل. عن طريق تغيير طريقة قيام آلية الجدل بقراءة أو التعرّف على البواعث المتضمنة في معالجة mRNA أولي، يصبح من الممكن تكوين جزيئات mRNA مجدولة على نحو تفاضلي. لقد تم الآن إدراك أنه يتم على نحو بديل جدل غالبية الجينات البشرية أثناء التعبير الوراثي عن الجين الطبيعي، بالرغم من أنه لم يتم تحديد الآليات المتضمنة. يصف Bennett et al. (البراءة الأمريكية رقم 6,210,892) التعديل المضاد لاتجاه النسخ لمعالجة mRNA الخلوي من النوع غير المعالج باستخدام نظائر الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ التي لا تحث على الانشطار الناتج عن RNAse H لـ RNA المستهدف. تتمثل الفائدة من ذلك في القدرة على توليد mRNAs مجدولة على نحو بديل تفتقر إلى إكسونات نوعية (انظر، على سبيل المثال، كما هو موصوف بواسطة Sazani, Kole, et al. 2007) لتوليد مستقبلات العائلة العليا من TNF القابلة للذوبان التي تفتقر إلى الإكسونات التي تقوم بتشفير نطاقات تمديد الغشاء.

في الحالات حيث يتم إنهاء بروتين وظيفي بصورة طبيعية على نحو سابق لأوانه بسبب الطفرات الموجودة فيه، تم عرض وسيلة لاستعادة بعض من إنتاج البروتين الوظيفي من خلال التقنية المضادة لاتجاه النسخ باعتبارها ممكنة من خلال التدخل أثناء عمليات الجدل، وأنه إذا كان

بالإمكان حذف الإكسونات المصاحبة للمرض المسبب للطفرات بشكل خاص من بعض الجينات، فإنه يمكن في بعض الأحيان إنتاج منتج بروتين قصير له خصائص بيولوجية مشابهة للبروتين الأصلي أو له نشاط بيولوجي كافي لتحسين المرض الناتج بواسطة الطفرات المصاحبة للإكسون (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). يكشف Kole et al. (البراءات الأمريكية أرقام 5,627,274؛ 5,916,808؛ 5,976,879؛ و5,665,593) عن طرق لمكافحة الجدل الشاذ باستخدام نظائر الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ المعدلة التي لا تُعزز انحلال mRNA الأولي المستهدف. يصف Bennett et al. (البراءة الأمريكية رقم 6,210,892) التعديل المضاد لاتجاه النسخ لمعالجة mRNA الخلوي من النوع غير المعالج أيضًا باستخدام نظائر الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ التي لا تحث على الانشطار الناتج عن RNAse H لـ RNA المستهدف.

من المحتمل أن تكون عملية تخطي الإكسون المستهدف مفيدة تحديدًا في الجينات الطويلة حيث يوجد العديد من الإكسونات والإنترونات، حيث يوجد وفرة في التشكيل الجيني للإكسونات أو حيث يكون بروتين قادرًا على العمل بدون واحد أو أكثر من الإكسونات المحددة. لقد ركزت الجهود لإعادة توجيه معالجة الجين لعلاج الأمراض الجينية المصاحبة لحالات الاقتطاع الناتجة بواسطة الطفرات في الجينات المتنوعة على استخدام الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ التي إما: (1) تتراكب بشكل كلي أو جزئي مع العناصر المتضمنة في عملية الجدل؛ أو (2) ترتبط ب mRNA الأولي عند موضع قريب بالقدر الكافي من العنصر لتمزيق ارتباط ووظيفة عوامل الجدل التي من شأنها أن تتسبب بصورة طبيعية في تفاعل جدل بعينه يحدث عند ذلك العنصر.

يحدث الحَثَل العَضَلِيّ لدوشين (DMD) بواسطة عيب في التعبير الوراثي عن ديستروفين البروتين. يحتوي الجين المشفر للبروتين على 79 من الإكسونات المنتشرة على أكثر من 2 مليون من نوكليوتيدات DNA. يكون لأية طفرة خاصة بالإكسون تُغير من إطار القراءة الخاص بالإكسون، أو تُدخل رامزة إيقاف، أو يتم تمييزها بواسطة إزالة إكسون أو إكسونات خارج الإطار بأكمله أو بأكملها، أو تضاعفات واحد أو أكثر من الإكسونات، إمكانية لتعطيل إنتاج الديستروفين الوظيفي، مما يؤدي إلى DMD.

لقد وجد أن صورة أقل حدة من الحَثَل العَضَلِيّ، الحَثَل العَضَلِيّ لبيكر (BMD) تظهر حيث تؤدي طفرة، نمطيًا حذف واحد أو أكثر من الإكسونات، إلى إطار قراءة صحيح على طول نسخة الديستروفين بأكملها، بحيث لا يتم إنهاء التحوّر الوراثي لـ mRNA في البروتين على نحو سابق لأوانه. إذا حافظ ربط الإكسونات السابقة والتالية في عملية معالجة mRNA أولي لديستروفين مطفر على إطار القراءة الصحيح للجين، تتمثل النتيجة في تشفير mRNA للبروتين بحذف داخلي قصير يحافظ على بعض من النشاط، مما يؤدي إلى نمط بيكر ظاهري.

لعدة سنوات أصبح من المعروف أن عمليات حذف إكسون أو إكسونات لا تغير من إطار القراءة الخاص ببروتين ديستروفين ستؤدي إلى ظهور نمط BMD ظاهري، بينما سيؤدي حذف إكسون يتسبب في إزاحة إطار إلى ظهور DMD (Monaco, Bertelson et al. 1988) بشكل عام، طفرات الديستروفين المتضمنة طفرات نقطية وعمليات حذف للإكسون تُغير من إطار القراءة وبالتالي مقاطعة التحوّر الوراثي للبروتين الملائم مما يؤدي إلى DMD. ينبغي ملاحظة أن بعض من مرضى BMD وDMD يعانون من عمليات حذف للإكسون تُغطي العديد من الإكسونات.

لقد تم توضيح تعديل جدل mRNA الأولي لديستروفين الطفرة باستخدام الأوليجو ريبو نوكليوتيدات المضادة لاتجاه النسخ في كل من المعمل وجسم الكائن الحي (انظر على سبيل المثال، Matsuo, Masumura et al. 19911; Takeshima, Nishio et al. 1995; Pramono, Takeshima et al. 1996; Dunckley, Eperon et al. 1997; Dunckley, Manoharan et al. 1998; Wilton, Lloyd et al. 1999; Mann, Honeyman et al. 2002; Errington, Mann et al. 2003).

لقد تم تصميم الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ بشكل نوعي لاستهداف مناطق نوعية من mRNA الأولي، نمطيًا الإكسونات للحث على تخطي طفرة جين DMD وبالتالي استعادة هذه الطفرات خارج الإطار داخل الإطار للسماح بإنتاج بروتين الديستروفين الوظيفي المقصر داخليًا. لقد عُرفت هذه الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ للاستهداف بشكل تام داخل الإكسون (ما يُطلق عليه المتواليات الداخلية للإكسون) أو عند وصلة واهب جدل أو مستقبل جدل تعبر من الإكسون إلى جزء من الإنترون.

لقد كان اكتشاف وتطوير هذه الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ لـ DMD جزءًا من البحث السابق. تتضمن هذه التطويرات تلك الواردة من: (1) University of Western Australia and Sarepta Therapeutics (المعين لهذا الطلب) الطلبات الدولية :

000057/2006، 048586/2010، 057350/2011، 153240/2014، 153220/2014، (2) Academisch Ziekenhuis Leiden/Prosensa Technologies (الآن BioMarin Pharmaceutical):

24906/02، 083432/2004، 083446/2004، 112705/2006، 133105/2007، 139630/2009، 054725/2009، 050801/2010، 050802/2010، 123369/2010، 112053/2013، 007620/2014 ؛ (3) Carolinas Medical Center: 109296/2010 ؛ (4) Royal Holloway: البراءات والطلبات التي تستفيد من، وتتضمن، الطلبات والبراءات أرقام 096,073/61 و 164978/61 ؛ مثل البراءتين الأمريكيتين رقمي 8,084,601 و2017-0204413 (4) JCR Pharmaceuticals and Matsuo: US 6,653,466؛ البراءات والطلبات التي تستفيد من، وتتضمن، JP 2000-125448، مثل US 6,653,467؛ البراءات والطلبات التي تستفيد من، وتتضمن، JP 2000-256547، مثل US 6,727,355؛ WO 2004/048570؛ (5) Nippon Shinyaku: WO 2012/029986؛ WO 2013/100190؛ WO 2015/137409؛ WO 2015/194520؛ و(6) Association Institut de Myologie/Universite Pierre et Marie Curie/Universität Bern/Centre national de la Recherche Scientifique/Synthena AG: WO 2010/115993؛ WO 2013/053928.

يعد الإيتيبليرسين أوليجومر فوسفورو داي أميدات مورفولينو (PMO) مصمَّم لتخطي الإكسون 51 لجين الديستروفين البشري في مرضى مصابين بـ DMD مُعرّضًا لتخطي الإكسون 51 لاستعادة إطار القراءة وإنتاج صورة وظيفية أقصر لبروتين الديستروفين. وقد أجازت إدارة الأغذية والعقاقير الأمريكية (FDA) في 2016 إكسونديس 51™ (إيتيبليرسين) لعلاج الحَثَل العَضَلِيّ لدوشين (DMD) في مرضى ثبت لديهم طفرة من جين DMD مُعرّضًا لتخطي الإكسون 51.

يعد اكتشاف وتطور أوليجومرات مضادة لاتجاه النسخ مترافقة مع ببتيدات مخترقة للخلايا لـ DMD مجالًا للبحث (انظر نشرة PCT الدولية 048586/2010 ؛ Wu, B. et al., The American Journal of Pathology, Vol. 181 (2): 392-400, 2012؛ Wu, R. et al., Nucleic Acids Research, Vol. 35 (15): 5182-5191, 2007؛ Mulders, S. et al., 19th International Congress of the World Muscle Society, Poster Presentation Berlin, October 2014؛ Bestas, B. et al., The Journal of Clinical Investigation, doi: 10.1172/JCI76175, 2014؛ Jearawiriyapaisarn, N. et al., Molecular Therapy, Vol. 16(9): 1624-1629, 2008؛ Jearawiriyapaisarn, N. et al., Cardiovascular Research, Vol. 85: 444-453, 2010؛ Moulton, H.M. et al., Biochemical Society Transactions, Vol. 35 (4): 826-828, 2007؛ Yin, H. et al., Molecular Therapy, Vol. 19 (7): 1295-1303, 2011؛ Abes, R. et al., J. Pept. Sci., Vol. 14: 455-460, 2008؛ Lebleu, B. et al., Advanced Drug Delivery Reviews, Vol. 60: 517-529, 2008؛ McClorey, G. et al., Gene Therapy, Vol. 13: 1373-1381, 2006؛ Alter, J. et al., Nature Medicine, Vol. 12 (2): 175-177, 2006؛ و Youngblood, D. et al., American Chemical Society, Bioconjugate Chem., 2007, 18 (1), pp 50-60).

قد تكون الببتيدات المخترقة للخلايا (CPP)، على سبيل المثال، الشق الناقل للببتيدات الغنية بالأرجينين، فعالةً لتحسين اختراق، على سبيل المثال، مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ مع CPP، في خلية.

بالرغم من هذه المحاولات، تظل هناك حاجة للأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ المحسنة التي تستهدف الإكسون 51 وتركيبات صيدلية مناظرة من المحتمل أن تكون مفيدة للطرق العلاجية لإنتاج الديستروفين وعلاج DMD.

الوصف العام للاختراع

تتضمن مترافقات الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ الواردة بهذه الوثيقة شق مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ مع CPP. في أحد الجوانب، يوفر الكشف مترافقات أوليجومرات مضادة لاتجاه النسخ تشتمل على:

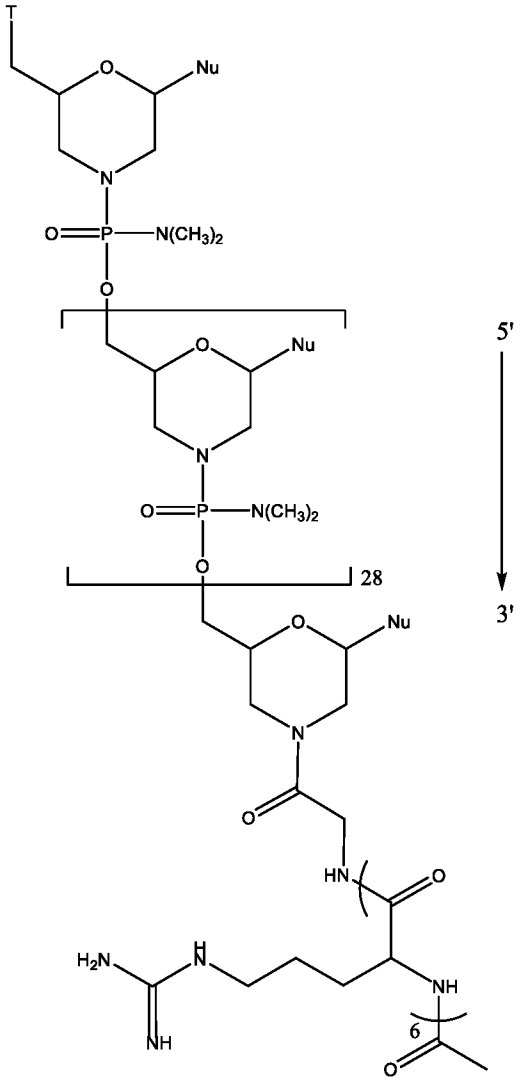
أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ يبلغ طوله 30 وحدة فرعية يمكنه ربط مستهدف محدد لحث تخطي الإكسونات في جين الديستروفين البشري، حيث يشتمل الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ على متوالية من القواعد متممة لمنطقة الإكسون 51 المستهدفة للديستروفين mRNA الأولي الذي يُطلق عليه موقع تلدين؛ و

ببتيد مخترق للخلية (CPP) مترافق مع الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ بواسطة شق رابط.

في بعض التجسيدات، يكون موقع التلدين عبارةً عن H51A(+66+95).

في بعض التجسيدات، يتم ربط قواعد الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ ببنيات حلقات مورفولينو، حيث يتم توصيل بنيات حلقات المورفولينو بواسطة وصلات وحدات فرعية متداخلة محتوية على فوسفور تقوم بربط إنتروجين مورفولينو لبنية حلقة واحدة بكربون خارج الحلقة 5 'لبنية حلقة متجاورة. في تجسيدات معينة، يكون الببتيد المخترق للخلية عبارةً عن ست وحدات أرجينين ("R6") ويكون الشق الرابط عبارةً عن جليسين. في بعض التجسيدات، يشتمل الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ على متوالية من القواعد يُطلق عليها المتوالية رقم:1.

في عدة جوانب، يوفر الكشف مترافقات أوليجومرات مضادة لاتجاه النسخ يمكنها أن تكون وفقًا للصيغة (I):

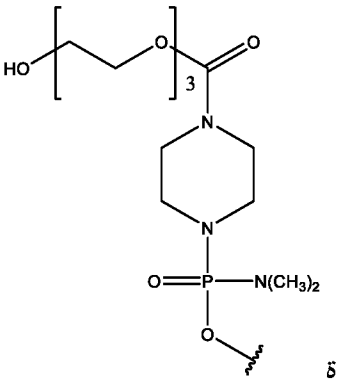
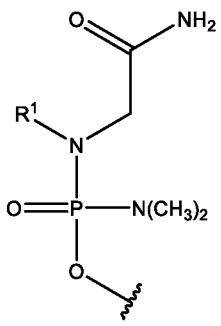
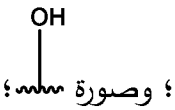


(I)

أو ملح مقبول صيدليًا منه، حيث:

تكون كل Nu عبارةً عن قاعدة نووية يتم أخذها لتكوين متوالية استهداف؛ و

تكون T عبارةً عن شق يتم اختياره من:

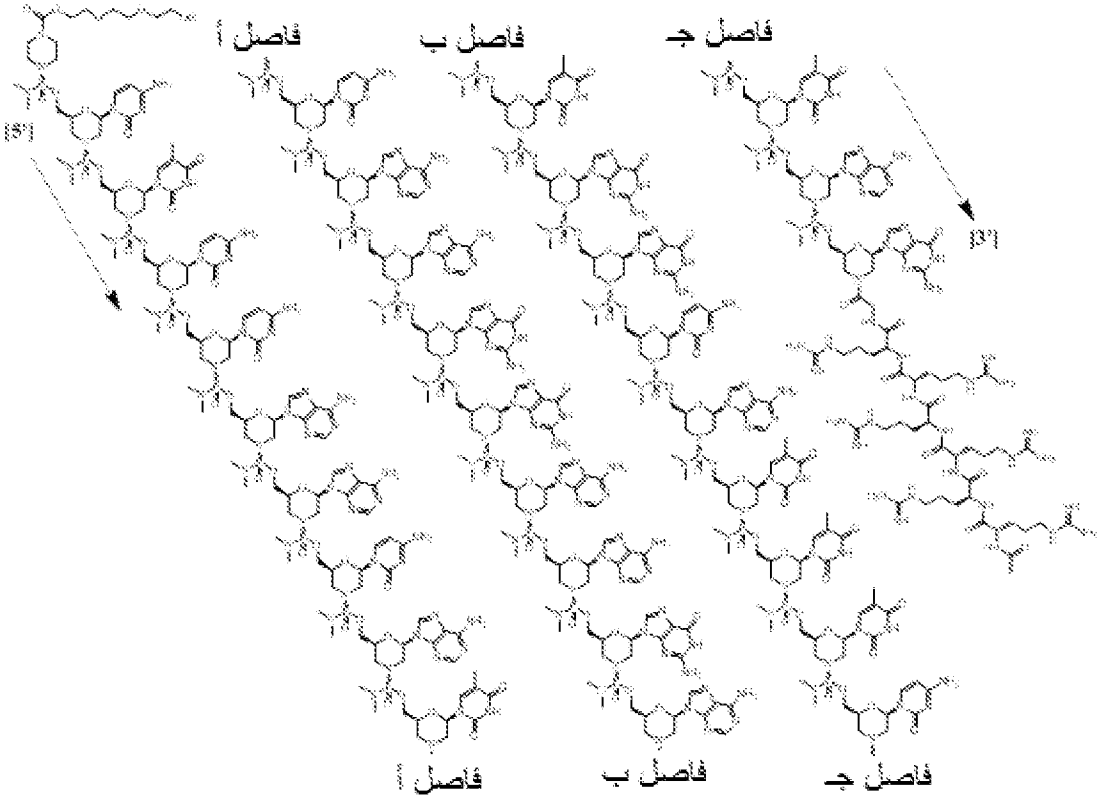
صورة  ؛صورة  ؛ وصورة  ؛

تكون R1 عبارةً عن C1-C6 ألكيل؛

حيث تكون متوالية الاستهداف متممةً لموقع تلدين الإكسون 51 في ديستروفين mRNA الأولي الذي يُطلق عليه H51A(+66+95).

في جانب آخر، يوفر الكشف مترافقات أوليجومرات مضادة لاتجاه النسخ بالصيغة (IV):

صورة

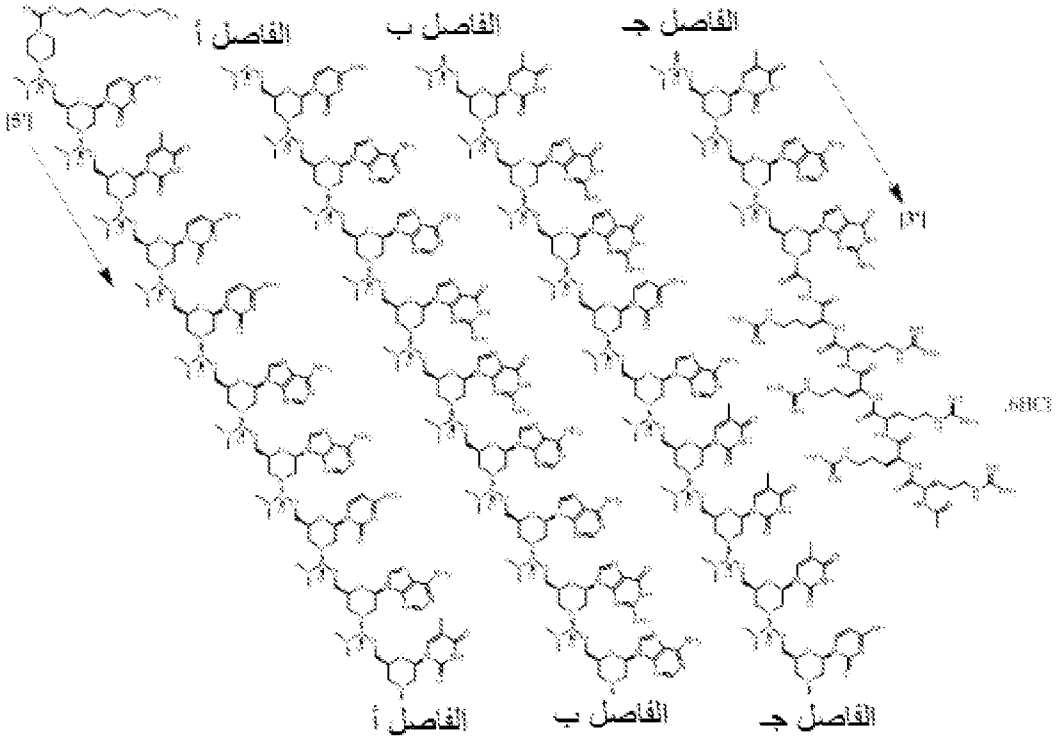


(IV)

أو ملح مقبول صيدليًا منه.

في جانب آخر، يوفر الكشف مترافقات أوليجومرات مضادة لاتجاه النسخ بالصيغة (IVA):

صورة



(IVA).

في جانب آخر، يوفر الكشف تركيبات صيدلية تتضمن مترافقات الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ وفقًا للكشف، ومادة حاملة مقبولة صيدليًا. في بعض التجسيدات، تكون المادة الحاملة المقبولة صيدليًا عبارة عن محلول ملحي مركز يتضمن محلول فوسفاتي منظم.

في جانب آخر، يوفر الكشف طريقةً لعلاج الحَثَل العَضَلِيّ لدوشين (DMD) في خاضع للعلاج بحاجة إليها حيث يكون لدى الخاضع للعلاج طفرة جين الديستروفين مُعرّضًا لتخطي الإكسون 51، حيث تشتمل الطريقة على إعطاء الخاضع للعلاج مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ وفقًا للكشف. كما يتعلق الكشف باستخدام مترافقات أوليجومرات مضادة لاتجاه النسخ وفقًا للكشف،

لتصنيع دواء لعلاج الحَثَل العَضَلِيّ لدوشين (DMD) في خاضع للعلاج بحاجة إليه حيث يكون لدى الخاضع للعلاج طفرة جين الديستروفين مُعرّضًا لتخطي الإكسون 51.

في جانب آخر، يوفر الكشف طريقة لاستعادة إطار قراءة mRNA لحث إنتاج الديستروفين في خاضع للعلاج له طفرة جين الديستروفين مُعرّضًا لتخطي الإكسون 51، حيث تشتمل الطريقة على إعطاء الخاضع للعلاج مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ وفقًا للكشف. في جانب آخر، يوفر الكشف طريقة لاستبعاد الإكسون 51 من ديستروفين mRNA أولي أثناء معالجة mRNA في خاضع للعلاج له طفرة جين الديستروفين مُعرّضًا لتخطي الإكسون 51، حيث تشتمل الطريقة على إعطاء الخاضع للعلاج مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ وفقًا للكشف. في جانب آخر، يوفر الكشف طريقة لربط الإكسون 51 لديستروفين mRNA الأولي في خاضع للعلاج له طفرة جين الديستروفين مُعرّضًا لتخطي الإكسون 51، حيث تشتمل الطريقة على إعطاء الخاضع للعلاج مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ وفقًا للكشف.

في جانب آخر، يوفر الكشف مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ وفقًا للكشف الوارد بهذه الوثيقة لاستخدامه للعلاج. في تجسيدات معينة، يوفر الكشف مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ وفقًا للكشف لاستخدامه في علاج الحَثَل العَضَلِيّ لدوشين. في تجسيدات معينة، يوفر الكشف مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ وفقًا للكشف لاستخدامه في تصنيع دواء لاستخدامه في العلاج. في تجسيدات معينة، يوفر الكشف مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ وفقًا للكشف لاستخدامه في تصنيع علاج لعلاج الحَثَل العَضَلِيّ لدوشين.

في جانب آخر، يورد الكشف كذلك أطقم لعلاج الحَثَل العَضَلِيّ لدوشين (DMD) في خاضع للعلاج بحاجة إليها حيث يكون لدى الخاضع للعلاج طفرة جين الديستروفين مُعرّضًا لتخطي الإكسون 51، حيث تشتمل الأطقم على على الأقل مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ وفقًا للكشف الحالي، مغلَّفة في حاوية مناسبة بها تعليمات لاستخدامها.

سيتم فهم هذه الأغراض والسمات وغيرها على نحو أتم عند قراءة الوصف التفصيلي للكشف جنبًا إلى جنب مع الأشكال.

<u>شرح مختصر للرسومات</u>

الشكل 1 وصف لأحد قطاعات ديستروفين mRNA أولي عادي و mRNA ناضج.

الشكل 2 وصف لأحد قطاعات ديستروفين mRNA أولي غير عادي (على سبيل المثال DMD) وديستروفين ناتج غير وظيفي وغير مستقر.

الشكل 3 وصف لإيتيبليرسين، مصمَّم لتخطي الإكسون 51، ولاستعادة القراءة "الإطارية الداخلية" لـ mRNA أولي لإنتاج ديستروفين محذوف داخليًا.

الشكل 4 يوفر مخطط أعمدة للنسبة المئوية لتخطي الإكسون 51 في خلايا عضلية بشرية متمايزة بواسطة PMO رقم 1 و PPMO رقم 1 بتركيزات متنوعة بعد 96 ساعة من العلاج، حسب قياس RT-PCR.

الأشكال 5أ-5د توفر صورًا توضيحية لتحليل بقعة ويسترن يقيس بروتين ديستروفين في العضلة رباعية الرؤوس لفئران mdx معالج بـ PMO (PMO4225) أو PPMO (PPMO4225) لمختلف النقاط الزمنية [7 أيام (5أ)، 30 يومًا (5ب)، 60 يومًا (5ج)، و90 يومًا (5د)].

يوفر الشكل 6أ رسمًا بيانيًا خطيًا يصف النسبة المئوية للديستروفين من النوع غير المعالج والذي يستحثه PMO (PMO4225) أو PPMO (PPMO4225) في العضلة رباعية الرؤوس لفئران mdx بعد 90 يومًا من الحقن، حسب تحديد تحليل بقعة ويسترن.

يوفر الشكل 6ب رسمًا بيانيًا خطيًا يصف النسبة المئوية لإكسون 23 للتخطي والذي يستحثه PMO (PMO4225) أو PPMO (PPMO4225) في العضلة رباعية الرؤوس لفئران mdx بعد 90 يومًا من الحقن، حسب تحديد RT-PCR.

توفر الأشكال 7أ-7د صورًا توضيحية لتحليل بقعة ويسترن يقيس بروتين ديستروفين في الحجاب الحاجز لفئران mdx معالج بـ PMO (PMO4225) أو PPMO (PPMO4225) لمختلف النقاط الزمنية [7 أيام (7أ)، 30 يومًا (7ب)، 60 يومًا (7ج) و90 يومًا (7د)].

الشكل 8أ يوفر رسمًا بيانيًا خطيًا يصف النسبة المئوية للديستروفين من النوع غير المعالج والذي يستحثه PMO (PMO4225) أو PPMO (PPMO4225) في الحجاب الحاجز لفئران mdx بعد 90 يومًا من الحقن، حسب تحديد تحليل بقعة ويسترن.

يوفر الشكل 8أ رسمًا بيانيًا خطيًا يصف النسبة المئوية لإكسون 23 للتخطي والذي يستحثه PMO (PMO4225) أو PPMO (PPMO4225) في الحجاب الحاجز لفئران mdx بعد 90 يومًا من الحقن، حسب تحديد RT-PCR.

توفر الأشكال 9أ-9د صورًا توضيحية لتحليل بقعة ويسترن يقيس بروتين ديستروفين في قلب فئران mdx معالج بـ PMO (PMO4225) أو PPMO (PPMO4225) لمختلف النقاط الزمنية على مدار [7 أيام (9أ)، 30 يومًا (9ب)، 60 يومًا (9جـ) و90 يومًا (9د)].

يوفر الشكل 10أ رسمًا بيانيًا خطيًا يصف النسبة المئوية للديستروفين من النوع غير المعالج والذي يستحثه PMO (PMO4225) أو PPMO (PPMO4225) في قلب فئران mdx بعد 90 يومًا من الحقن، حسب تحديد تحليل بقعة ويسترن.

يوفر الشكل 10ب رسمًا بيانيًا خطيًا يصف النسبة المئوية لإكسون 23 للتخطي والذي يستحثه PMO (PMO4225) أو PPMO (PPMO4225) في قلب فئران mdx بعد 90 يومًا من الحقن، حسب تحديد RT-PCR.

يوفر الشكل 11 تحليل الكيمياء الهيستولوجية المناعية الذي يوضح الديستروفين في العضلة اليسرى رباعية الرؤوس للفأر والذي يستحثه PMO (PMO4225) أو PPMO (PPMO4225).

يوفر الشكل 12 رسومات بيانية خطية توضح النسبة المئوية لتخطي الإكسون 51 في معالجة الأوليات غير البشرية بـ PMO رقم 1 أو PPMO رقم 1 أسبوعيًا لمدة أربعة أسابيع بجرعات مختلفة. تم قياس النسبة المئوية لتخطي الإكسون 51 من عينات عضلات للحجاب الحاجز (الأيسر) وعضلة رباعية الرؤوس (اليمنى)، حسب تحديد RT-PCR.

يوفر الشكل 13 رسومات بيانية خطية توضح النسبة المئوية لتخطي الإكسون 51 في معالجة الأوليات غير البشرية بـ PMO رقم 1 أو PPMO رقم 1 أسبوعيًا لمدة أربعة أسابيع بجرعات مختلفة. تم قياس النسبة المئوية لتخطي الإكسون 51 من عينات عضلات القلب (الأيسر) والإثنا عشر (الأيمن)، حسب تحديد RT-PCR.

يوفر الشكل 14 رسومات بيانية خطية توضح النسبة المئوية لتخطي الإكسون 51 في معالجة الأوليات غير البشرية بـ PMO رقم 1 أو PPMO رقم 1 أسبوعيًا لمدة أربعة أسابيع بجرعات مختلفة. تم قياس النسبة المئوية لتخطي الإكسون 51 من عينات عضلات ذات الرأسين (اليسرى) والعضلة الدالية (اليمنى)، حسب تحديد RT-PCR.

يوفر الشكل 15 رسومات بيانية خطية توضح النسبة المئوية لتخطي الإكسون 51 في معالجة الأوليات غير البشرية بـ PMO رقم 1 أو PPMO رقم 1 أسبوعيًا لمدة أربعة أسابيع بجرعات مختلفة. تم قياس النسبة المئوية لتخطي الإكسون 51 من عينات عضلات المَرِيء (الأيسر) والأورطى (الأيمن)، حسب تحديد RT-PCR.

توفر الأشكال 16أ-ب صورًا توضيحية لتحليل بقعة ويسترن يقيس بروتين ديستروفين في قلب فئران mdx معالج بـ PMO (PMO4225) أو PPMO (PPMO4225) بجرعات مختلفة: 40 مجم/كجم، 80 مجم/كجم، و120 مجم/كجم.

يوفر الشكل 17 مخطط أعمدة يصف النسبة المئوية للديستروفين من النوع غير المعالج والذي يستحثه PMO (PMO4225) أو PPMO (PPMO4225) في قلب فئران mdx حسب تحديد تحليل بقعة ويسترن بعد 30 يومًا من الحقن بجرعات مختلفة: 40 مجم/كجم، 80 مجم/كجم، و120 مجم/كجم.

توفر الأشكال 18أ-ب صورًا توضيحية لتحليل بقعة ويسترن يقيس بروتين ديستروفين في الحجاب الحاجز لفئران mdx معالج بـ PMO (PMO4225) أو PPMO (PPMO4225) بجرعات مختلفة 40 مجم/كجم، 80 مجم/كجم، و120 مجم/كجم.

يوفر الشكل 19 مخطط أعمدة يصف النسبة المئوية للديستروفين من النوع غير المعالج والذي يستحثه PMO (PMO4225) أو PPMO (PPMO4225) في الحجاب الحاجز لفئران mdx حسب تحديد تحليل بقعة ويسترن بعد 30 يومًا من الحقن بجرعات مختلفة: 40 مجم/كجم، 80 مجم/كجم، و120 مجم/كجم.

توفر الأشكال 20أ-ب صورًا توضيحية لتحليل بقعة ويسترن يقيس بروتين ديستروفين في العضلة رباعية الرؤوس لفئران mdx معالج بـ PMO (PMO4225) أو PPMO (PPMO4225) بجرعات مختلفة: 40 مجم/كجم، 80 مجم/كجم، و120 مجم/كجم.

يوفر الشكل 21 مخطط أعمدة يصف النسبة المئوية للديستروفين من النوع غير المعالج والذي يستحثه PMO (PMO4225) أو PPMO (PPMO4225) في العضلة رباعية الرؤوس لفئران mdx حسب تحديد تحليل بقعة ويسترن بعد 30 يومًا من الحقن بجرعات مختلفة: 40 مجم/كجم، 80 مجم/كجم، و120 مجم/كجم.

يوفر الشكل 22 مخططات أعمدة توضح النسبة المئوية لتخطي الإكسون 51 في أوليات غير بشرية معالجة بجرعة فردية تبلغ 40 مجم/كجم من PPMO رقم 1 بعد 30 و60 يومًا من الحقن. تم قياس النسبة المئوية لتخطي الإكسون 51 من عينات عضلات العضلة رباعية الرؤوس، الحجاب الحاجز، القلب، وجهاز GI، حسب تحديد RT-PCR.

يوفر الشكل 23 دورات الإقران التي تجريها الطريقة ب لتخليق PMO.

يوفر الشكل 24 تحليل الكيمياء الهيستولوجية المناعية الذي يوضح الديستروفين ولامينين في الحجاب الحاجز وقلب فأر mdx والذي يستحثه PPMO (PPMO4225) مقارنة بمحلول ملحي مركز في فئران mdx وفئران غير معالجة.

يوفر الشكل 25 مخطط أعمدة للنسبة المئوية لتخطي الإكسون 51 في أورومات عضلية بشرية صحيحة بواسطة PMO رقم 1 وPPMO رقم 1 بتركيزات متنوعة بعد 96 ساعة من العلاج، حسب قياس RT-PCR. تشير أعمدة الأخطاء إلى متوسط الانحراف المعياري ±.

الشكل 26 يوفر مخطط أعمدة للنسبة المئوية لتخطي الإكسون 51 في نبيبات بشرية صحيحة بواسطة PMO رقم 1 وPPMO رقم 1 بتركيزات متنوعة بعد 96 ساعة من العلاج، حسب قياس RT-PCR. تشير أعمدة الأخطاء إلى متوسط الانحراف المعياري ±.

الوصف التفصيلي:

تتعلق التجسيدات الخاصة بالكشف الحالي بصفة عامة بمترافقات أوليجومرات مضادة لاتجاه النسخ محسنة، وطرق لاستخدامها، تم تصميمها بشكل خاص للحث على تخطي الإكسون في جين الديستروفين البشري. يلعب الديستروفين دورًا حيويًا في وظيفة العضلات، ويتم تمييز الأمراض المتنوعة ذات الصلة بالعضلات بواسطة صور مطفرة من هذا الجين. ومن ثَم، في تجسيدات معينة، تحث مترافقات الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ المحسنة الموصوفة هنا على تخطي الإكسون في صور مطفرة من جين الديستروفين البشري، مثل جينات الديستروفين المطفرة الموجودة في الحَثَل العَضَلِيّ لدوشين (DMD) والحَثَل العَضَلِيّ لبيكر (BMD).

بسبب أحداث جدل mRNA الشاذة الناتجة بواسطة الطفرات، تعبر جينات الديستروفين البشري المطفرة هذه إما عن بروتين ديستروفين معيب أو لا تعبر عن ديستروفين قابل للقياس على الإطلاق، حالة تؤدي إلى صور متنوعة من الحَثَل العَضَلِيّ. لعلاج هذه الحالة، تهجن مترافقات الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ الخاصة بالكشف الحالي مناطق مختارة من mRNA معالج مسبقًا خاص بجين ديستروفين بشري مطفر، تحث على تخطي الإكسون والجدل التفاضلي في mRNA الديستروفين المجدول على نحو شاذ، وبالتالي تسمح لخلايا العضلات بإنتاج نسخة mRNA تقوم بتشفير بروتين ديستروفين وظيفي. في تجسيدات معينة، ليس بالضرورة أن يكون بروتين الديستروفين الناتج هو الصورة "غير المعالجة" من الديستروفين، ولكن بدلاً من ذلك يكون عبارة عن صورة مقتطعة، ولكنها وظيفية من الديستروفين.

عن طريق زيادة مستويات بروتين الديستروفين الوظيفي في خلايا العضلات، تكون هذه التجسيدات والتجسيدات ذات الصلة مفيدة في الوقاية من وعلاج الحَثَل العَضَلِيّ، بخاصة تلك الصور من الحَثَل العَضَلِيّ، مثل DMD وBMD، التي يتم تمييزها بواسطة التعبير الوراثي عن بروتينات الديستروفين المعيبة بسبب جدل mRNA الشاذ. توفر مترافقات الأوليجومرات النوعية مضادة لاتجاه النسخ الموصوفة هنا بشكل إضافي استهداف نوعي لديستروفين-إكسون محسن عن الأوليجومرات الأخرى، وبالتالي توفر فوائد مهمة وعملية مقارنة بالطرق البديلة لعلاج الصور ذات الصلة من الحَثَل العَضَلِيّ.

من ثَم، يتعلق الكشف بمترافقات أوليجومرات مضادة لاتجاه النسخ تشتمل على:

أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ يبلغ طوله 30 وحدة فرعية يمكنه ربط مستهدف محدد لحث تخطي الإكسونات في جين الديستروفين البشري، حيث يشتمل الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ على متوالية من القواعد متممة لمنطقة الإكسون 51 المستهدفة للديستروفين mRNA الأولي الذي يُطلق عليه موقع تلدين؛ و

ببتيد مخترق للخلية (CPP) مترافق مع الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ بواسطة شق رابط.

في بعض التجسيدات، يكون موقع التلدين عبارةً عن H51A(+66+95).

في بعض التجسيدات، يتم ربط قواعد الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ ببنيات حلقات مورفولينو، حيث يتم توصيل بنيات حلقات المورفولينو بواسطة وصلات وحدات فرعية متداخلة محتوية على فوسفور تقوم بربط إنتروجين مورفولينو لبنية حلقة واحدة بكربون خارج الحلقة 5 'لبنية حلقة متجاورة. في تجسيدات معينة، يكون الببتيد المخترق للخلية عبارةً عن R6 ويكون الشق الرابط عبارةً عن جليسين. في بعض التجسيدات، يشتمل الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ على متوالية قواعد يُطلق عليها المتوالية رقم:1، حيث تكون كل قاعدة ثايمين (T) اختياريًا عبارةً عن قاعدة يوراسيل (U).

ما لم يتم التعريف بما يُخالف ذلك، يكون لكل المصطلحات التقنية والعلمية المستخدمة هنا نفس المعنى كما يُدرك على نحو شائع هؤلاء من ذوي المهارة العادية في المجال الذي ينتمي إليه الكشف. بالرغم من أنه يمكن استخدام أية طرق ومواد مشابهة أو مكافئة لتلك الموصوفة هنا في تطبيق أو اختبار الكشف الحالي، يتم وصف الطرق والمواد المفضلة. للأغراض الخاصة بالكشف الحالي، يتم فيما يلي تعريف المصطلحات التالية.

1- التعريفات

يُعنى بـ "حوالي" كمية، مستوى، قيمة، عدد، تكرار، نسبة مئوية، بُعد، حجم، مقدار، وزن أو طول يتنوع بمقدار يصل إلى 30، 25، 20، 15، 10، 9، 8، 7، 6، 5، 4، 3، 2 أو 1% بالسنبة لكمية مرجعية، مستوى، قيمة، عدد، تكرار، نسبة مئوية، بُعد، حجم، مقدار، وزن أو طول.

يشير المصطلح "ألكيل"، على النحو المستخدم بهذه الوثيقة، ما لم يُشَر غير ذلك، إلى هيدروكربون مشبعة مستقيمة أو متفرعة. في تجسيدات معينة، تكون مجموعة الألكيل عبارةً عن هيدروكربون أولية، أو ثانوية، أو ثالثية. في تجسيدات معينة، تتضمن مجموعة الألكيل واحدة إلى عشر ذرات كربون، أي، C1 إلى C10 ألكيل. في تجسيدات معينة، تتضمن مجموعة الألكيل واحدةً إلى ست ذرات كربون، أي، C1 إلى C6 ألكيل. في تجسيدات معينة، يتم اختيار مجموعة الألكيل من المجموعة المشتملة على ميثيل، CF_3، CCl_3، $CFCl_2$، CF_2Cl، إيثيل، CH_2CF_3، CF_2CF_3، بروبيل، أيزو بروبيل، بيوتيل، أيزو بيوتيل، سيك- بيوتيل، T- بيوتيل، بنتيل، أيزو بنتيل، نيو بنتيل، هكسيل، أيزو هكسيل، 3-ميثيل بنتيل، 2، 2-داي ميثيل بيوتيل، و2، 3-داي ميثيل بيوتيل. يتضمن المصطلح مجموعات ألكيل بها أو ليس بها استبدال، بما في ذلك مجموعات ألكيل معالجة بالهالوجين. في تجسيدات معينة، تكون مجموعة الألكيل عبارةً عن مجموعة ألكيل معالجة بالفلور. يتم اختيار الأمثلة غير الحصرية للشقوق التي يتم استبدال مجموعة الألكيل بها من المجموعة المشتملة على هالوجين (فلورو، كلورو، بروموـ أو يودو)، هيدروكسيل، أمينو، ألكيل أمينو، أريل أمينو، ألكوكسي، أريل أوكسي، نيترو، سيانو، حمض سلفونيك، سلفات، حمض فوسفوريك، فوسفات، أو فوسفونات، محميةً كانت أو غير محمية حسب الضرورة، وحسبما هو معروف لأولئك المتمرسين في المجال، على سبيل المثال، حسبما ورد في Greene, et al., Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, Second Edition, 1991، والتي أُدرجت ضمن المراجع

يُقصد أن يتضمن "مُعرّضًا لتخطي الإكسون 51" كما يُستخدم هنا فيما يتعلق بخاضع للعلاج أو مريض الخاضعين للعلاج والمرضى الذي لديهم واحدة أو أكثر من الطفرات في جين الديستروفين الذي، بدون تخطي الإكسون 51 الخاص بديستروفين mRNA الأولي، يتسبب في أن يكون إطار القراءة خارج الإطار وبالتالي مقاطعة التحوّر الوراثي لـ mRNA الأولي مما يؤدي إلى عدم قدرة الخاضع للعلاج أو المريض على إنتاج الديستروفين وظيفي أوشبه وظيفي. تتضمن الأمثلة على الطفرات في جين الديستروفين الذي يكون مُعرّضًا لتخطي الإكسون 51، على سبيل المثال، طفرات في الإكسونات 45-50، 47-50، 48-50، 49-50، 50، 52، و52-63 (قاعدة بيانات طفرة الحَثَل العَضَلِيّ لدوشين لليدين (Leiden Duchenne muscular dystrophy

.((mutation database, Leiden University Medical Center, The Netherlands
يمكن لذي المهارة في المجال تحديد ما إذا كان مريض لديه طفرة في جين الديستروفين المُعرّضًا لتخطي الإكسونالإكسونات (انظر، على سبيل المثال، Aartsma-Rus et al. (2009) Hum Mutat. 30:293-299؛ Gurvich et al., Hum Mutat. 2009؛ 30(4) 633-640؛ and Fletcher et al. (2010) Molecular Therapy 18(6) 1218-1223.).

يشير المصطلح "أوليجومر" على النحو المستخدم بهذه الوثيقة إلى متوالية وحدات فرعية متصلة بواسطة وصلات وحدات فرعية متداخلة. في أمثلة معينة، يتم استخدام المصطلح "أوليجومر" للإشارة إلى "أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ". فيما يتعلق بـ "أوليجومرات مضادة لاتجاه النسخ"، تتألف كل وحدة فرعية من: (1) سكر ريبوز أو مشتق منه؛ و(2) قاعدة نووية مرتبطة به، بحيث يُكوّن ترتيب الأشطار المتزاوجة مع القاعدة متوالية قاعدة تكون متممة لمتوالية مستهدفة في حمض نووي (نمطيًا RNA) بواسطة إزدواج القاعدة Watson-Crick، لتكوين مضاعف متغاير من حمض نووي:أوليجومر داخل المتوالية المستهدفة. بشرط أن تكون الوحدة الفرعية أو وصلات وحدات فرعية متداخلة أو كلاهما لا يحدث بشكل طبيعي. في تجسيدات معينة، يكون الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ هو PMO. في تجسيدات أخرى، يكون الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ هو 2'-O-ميثيل فوسفورو ثيوات. في تجسيدات أخرى، يكون الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ الخاص بالكشف هو حمض نووي لببتيد (PNA)، حمض نووي مقفل (LNA)، أو حمض نووي مجسر (BNA) مثل حمض نووي مجسر بـ 2'-O،4'-C-إيثيلين (ENA). تم وصف تجسيدات نموذجية إضافية.

يشير المصطلحان "مكمل" و"تكامل" إلى اثنين أو أكثر من الأوليجومرات (أي يشتمل كل أوليجومر على متوالية قاعدة نووية) يرتبطان معًا وفقًا لقواعد إزدواج كريك-واتسون (Watson-Crick). على سبيل المثال، تكون متوالية قاعدة نووية "T-G-A (5'3')" متممة لمتوالية قاعدة نووية:-A C-T (3' 5'). قد تكون "التكامل الجزئي" التي يتم فيها مطابقة أقل من جميع قواعد نووية متوالية قاعدة نووية بعينها مع متوالية قاعدة نووية الأخرى وفقًا لقوانين إزدواج القواعد. على سبيل المثال، في بعض التجسيدات، قد تبلغ التكامل بين متوالية قاعدة نووية ما ومتوالية قاعدة نووية أخرى حوالي 70%، حوالي 75%، حوالي 80%، حوالي 85%، حوالي 90% أو حوالي 95%.

أو قد يكون هناك تكامل "كامل" أو "تام" (100%) بين متوالية قاعدة نووية ومتوالية قاعدة نووية أخرى في مثال آخر. يكون لدرجة التكامل بين متواليات قواعد النووية تأثيرات كبيرة على فاعلية وقوة التهجين بين المتواليات.

يتم استخدام المصطلحين "مقدار فعال" و "مقدار فعال علاجيًا" إلى في هذه الوثيقة بدلًا من بعضهما البعض للإشارة إلى مقدار من مركب علاجي، مثل أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ، مُعطى إلى خاضع للعلاج ثديي، إما في صورة جرعة فردية أو كجزء من سلسلة من الجرعات، تكون فعالة لإنتاج تأثير علاجي مطلوب.

لأوليجومر مضاد لاتجاه النسخ، يتم تحقيق هذا التأثير نمطيًا عن طريق تثبيط التحوّر الوراثي أو معالجة الجدل الطبيعي لمتوالية هدف مختارة، أو إنتاج مقدار ذي مغزى إكلينيكيًا من الديستروفين (أهمية إحصائية).

في بعض التجسيدات، يبلغ المقدار الفعال على الأقل 10 مجم/كجم أو 20 مجم/كجم من تركيبة متضمنة أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ لفترة زمنية لعلاج الخاضع للعلاج. في بعض التجسيدات، يبلغ مقدار فعال على الأقل 20 مجم/كجم من تركيبة متضمنة أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ لزيادة عدد ألياف الديستروفين الإيجابية في خاضع للعلاج وصولاً إلى على الأقل 20% من الطبيعي. في تجسيدات معينة، يبلغ مقدار فعال على الأقل 10 مجم/كجم أو 20 مجم/كجم من تركيبة متضمنة أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ لتثبيت، الحفاظ على، أو تحسين المسافة سيرًا على الأقدام من عيب 20%، على سبيل المثال في 6 MWT، في مريض، بالنسبة لنظير مُعافى. في تجسيدات متنوعة، يبلغ مقدار فعال على الأقل من حوالي 10 مجم/كجم/حوالي 30 مجم/كجم، على الأقل 20 مجم/كجم إلى حوالي 30 مجم/كجم، من حوالي 25 مجم/كجم إلى حوالي 30 مجم/كجم، أو من حوالي 30 مجم/كجم إلى حوالي 50 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يبلغ مقدار فعال حوالي 10 مجم/كجم/حوالي 20 مجم/كجم، حوالي 30 مجم/كجم أو حوالي 50 مجم/كجم. في جانب آخر، يبلغ المقدار الفعال على الأقل حوالي 10 مجم/كجم، حوالي 20 مجم/كجم، حوالي 25 مجم/كجم، حوالي 30 مجم/كجم، أو من حوالي 30 مجم/كجم إلى حوالي 50 مجم/كجم، لمدة على الأقل 24 أسبوع، على الأقل 36 أسبوع، أو على الأقل 48 أسبوع، وبالتالي لزيادة عدد ألياف الديستروفين الإيجابية في خاضع للعلاج وصولاً إلى على الأقل 20%،

حوالي 30%، حوالي 40%، حوالي 50%، حوالي 60%، حوالي 70%، حوالي 80%، حوالي 90%، حوالي 95% من الطبيعي، وتثبيت أو تحسين المسافة سيرًا على الأقدام من عيب 20%، على سبيل المثال في MWT 6، في المريض بالنسبة لنظير مُعافى. في بعض التجسيدات، يزيد العلاج من عدد ألياف الديستروفين الإيجابية وصولاً إلى 20-60%، أو 30-50% من الطبيعي في المريض.

تشير "يُعزز" أو " تعزيز"، أو "يزيد" أو "زيادة"، أو "يحفز" أو "تحفيز" بصفة عامة إلى قدرة واحد أو أكثر من مترافقات الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ أو التركيبات الصيدلية على إنتاج أو التسبب في استجابة فسيولوجية أكبر (أي، التأثيرات التالية) في خلية أو خاضع للعلاج، مقارنة بالاستجابة الناتجة بواسطة إما عدم وجود مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ أو مركب مقارنة. قد تتضمن استجابة فسيولوجية أكبر تعبيرًا متزايدًا عن صورة وظيفية من بروتين ديستروفين، أو نشاط بيولوجي ذي علاقة بالديستروفين متزايد في النسيج العضلي، من بين الاستجابات الأخرى الواضحة من الاستيعاب في المجال والوصف الوارد هنا. يمكن أيضًا قياس وظيفة العضلات المتزايدة، بما في ذلك الزيادات أو التحسينات في وظيفة العضلات 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%. يمكن أيضًا قياس النسبة المئوية الخاصة بالألياف العضلية التي تعبر عن ديستروفين وظيفي، بما في ذلك التعبير المتزايد عن الديستروفين بنسبة 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 الطبيعية. على سبيل المثال، لقد تم إظهار أنه يمكن أن يحدث تحسين بنسبة حوالي 40% من وظيفة العضلات إذا كان 25-30% من الألياف يعبر عن الديستروفين (انظر، على سبيل المثال، DelloRusso et al, Proc Natl Acad Sci USA 99: 12979-12984, 2002). يعتبر مقدار "متزايد" أو "معزز" نمطيًا هو مقدار "مؤثر إحصائيًا"، وقد يتضمن زيادة تبلغ 1,1، 1,2، 2، 3، 4، 5، 6، 7، 8، 9، 10، 15، 20، 30، 40، 50 ضعف أو أكثر (على سبيل المثال، 500، 1000 ضعف) (بما في

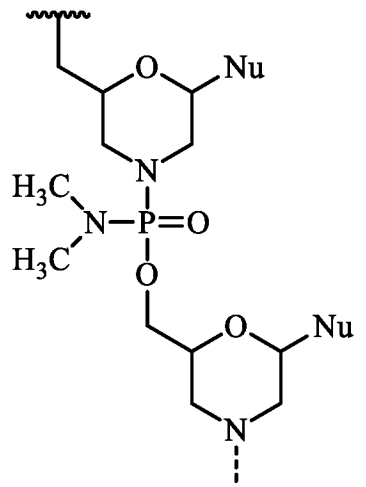
ذلك كل الأعداد الصحيحة والعلامات العشرية فيما بين وأعلى من 1)، على سبيل المثال، 1,5، 1,6، 1,7، 1,8، إلى غير ذلك) المقدار المنتج عن طريق عدم وجود مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ (عدم وجود عامل) أو مركب مقارنة.

كما يُستخدم هنا، يشير المصطلحان "وظيفة" و"وظيفي" وما شابه إلى وظيفة بيولوجية، إنزيمية، أو علاجية.

يشير بروتين ديستروفين "وظيفي" بصفة عامة إلى بروتين ديستروفين له نشاط بيولوجي كافي لتقليل التحلل المتواصل للنسيج العضلي الذي يكون بخلاف ذلك مميزًا للحَثَل العَضَلِيّ، نمطيًا مقارنة بالصورة المتغيرة أو "المعيبة" من بروتين ديستروفين الذي يكون موجودًا في خاضعين للعلاج بعينهم يعانون من DMD أو BMD. في تجسيدات معينة، قد يحتوي بروتين ديستروفين وظيفي على حوالي 10%، 20%، 30%، 40%، 50%، 60%، 70%، 80%، 90%، أو 100% (متضمنة كل الأعداد الصحيحة فيما بينها) من النشاط البيولوجي المعملي أو في جسم الكائن الحي الخاص بالديستروفين من النوع غير المعالج، كما هو مُقاس وفقًا للتقنيات الروتينية في المجال. كمثال واحد، يمكن قياس النشاط ذي الصلة بالديستروفين في مزارع العضلات في المعمل وفقًا لحجم نُبَيْب عَضَلِيّ، تنظيم (أو عدم انتظام) اللُيَيْفَة العَضَلِيَّة، نشاط القابلية للانقباض، والتجميع الفوري لمستقبلات أسيتيل كولين (انظر، على سبيل المثال، Brown et al., Journal of Cell Science. 112:209-216, 1999). تعتبر أيضًا النماذج الحيوانية موارد قيمة لدراسة الإمراض الخاص بمرض، وتوفر وسيلة لاختبار النشاط ذي الصلة بالديستروفين. يتمثل اثنان من النماذج الحيوانية الأوسع استخدامًا للبحث الخاص بـ DMD في الحَثَل العَضَلِيّ لفأر mdx والحَثَل العَضَلِيّ لكلب الصيد الذهبي (GRMD)، كلاهما يكون سالبًا للديستروفين (انظر، على سبيل المثال، Collins & Morgan, Int J Exp Pathol 84: 165-172, 2003). يمكن استخدام هذه النماذج الحيوانية وغيرها لقياس النشاط الوظيفي لبروتينات الديستروفين المتنوعة. يتم تضمين صور مقتطعة من الديستروفين، مثل تلك الصور التي يتم إنتاجها بعد إعطاء مركبات معينة من مترافقات الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ المتخطية للإكسون الخاصة بالكشف الحالي.

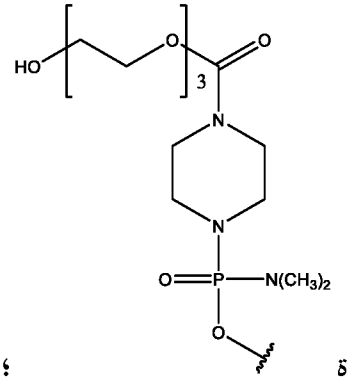
يشير المصطلحان "عدم التوافق" أو "حالات عدم التوافق" إلى واحدة أو أكثر من قاعدة نووية (سواء المجاورة أو المنفصلة) في متوالية قاعدة نووية أوليجومر غير متطابقة مع mRNA أولي مستهدف وفقًا لأحكام ازدواج القواعد. بينما تكون التتامّية المثالية مطلوبة في الأغلب، يمكن أن يتضمن بعض التجسيدات واحدة أو أكثر من ولكن يُفضل 6، 5، 4، 3، 2، أو 1 من حالات عدم التوافق فيما يتعلق بـ mRNA الأولي المستهدف. يتم تضمين التغييرات عند أي موقع داخل الأوليجومر. في تجسيدات معينة، تتضمن مترافقات الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ الخاصة بالكشف التغييرات في متوالية قاعدة نووية بالقرب من تغييرات النهايات في الجزء الداخلي، وإن وجدت تكون نمطيًا واقعة ضمن محوالي 6، 5، 4، 3، 2، أو 1 من الوحدات الفرعية عند الطرف 5' و/أو الطرف 3'.

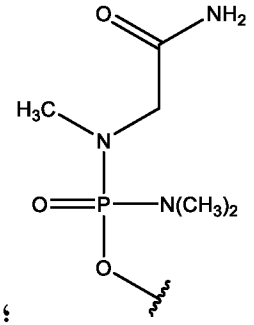
تشير المصطلحات "مورفولينو"، "مورفولينو أوليجومر،" و"PMO" إلى أوليجومر من فوسفورو داي أميدات مورفولينو بالصيغة البنائية العامة التالية:

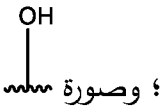


وكما يوصف في الشكل 2 من Summerton, J., et al., Antisense & Nucleic Acid Drug Development, 7: 187-195 (1997). يُقصد أن تُغطي مركبات المورفولينو كما يوصف هنا كل الأيزومرات الفراغية والمماثلات الكيميائية الخاصة بالصيغة البنائية العامة السابقة. يتم ذكر السمات المميزة للتخليق، الصيغ البنائية، والربط الخاصة بالأوليجومرات من المورفولينو بالتفصيل في البراءات الأمريكية أرقام 5,698,685، 5,217,866، 5,142,047، 5,034,506، 5,166,315، 5,521,063، 5,506,337، 8,076,476، و8,299,206، التي يتم تضمينها كلها هنا كمراجع.

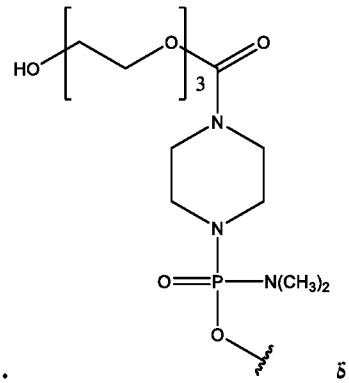
في تجسيدات معينة، يتم ترافق مورفولينو عند الطرف 5 ’أو الطرف 3 ’من الأوليجومر مع شطر "ذنبي" لزيادة ثباته و/أو قابليته للذوبان. تتضمن الأذناب النموذجية:


صورة

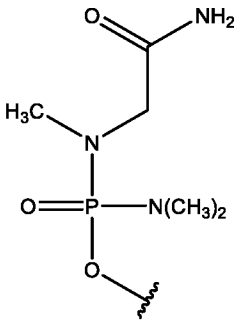

؛ صورة


؛ وصورة .

من بين الأشطار الذيلية النموذجية السابقة، يشير "TEG” أو "EG3" إلى الشطر الذيلي التالي:

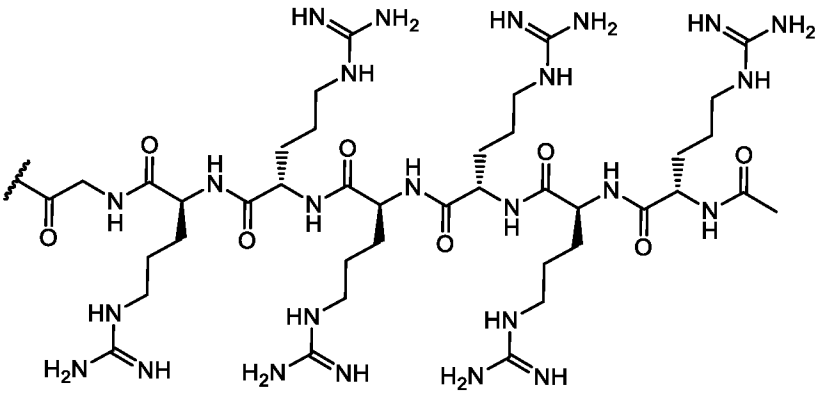

صورة .

من بين الأشطار الذيلية النموذجية السابقة، يشير "GT” إلى الشطر الذيلي التالي:

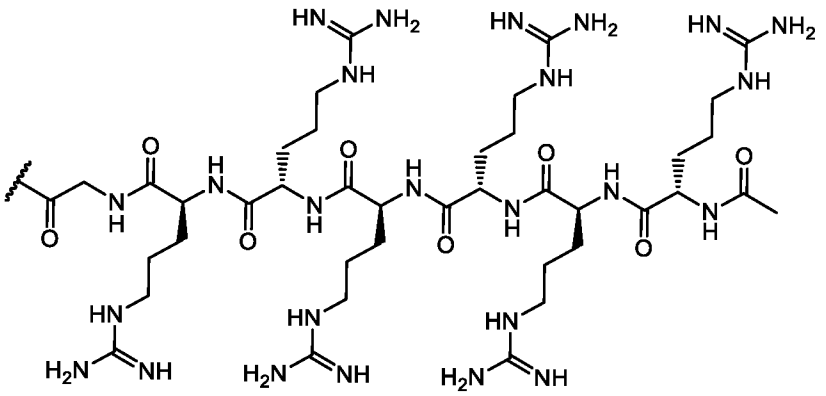

صورة .

على النحو المستخدم بهذه الوثيقة، يتم استخدام المصطلحين "-G-R6" و"-G-R6-Ac" بدلًا من بعضهما البعض للإشارة إلى شطر ببتيد مترافق مع أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ وفقًا للكشف. في تجسيدات متنوعة، "G” يمثل جليسين وحدة بنائية مترافقة مع "R6” بواسطة رابطة

أميد، وكل "R" يمثل وحدة أرجينين بنائية مترافقة معًا بواسطة رابطة أميد بحيث "R6" تعني ست (6) وحدات أرجينين بنائية مترافقة معًا بواسطة روابط أميد. قد يكون لدى وحدات الأرجينين البنائية تشكيلات فراغية، على سبيل المثال، قد تكون وحدات الأرجينين البنائية عبارةً عن وحدات L-أرجينين بنائية، وحدات D-أرجينين بنائية، أو خليط من وحدات D- وL-أرجينين بنائية. في تجسيدات معينة، يكون "G-R6-" أو "G-R6-Ac-" عبارةً عن مترافق مع حلقة إنتروجين مورفولين لوحدة المورفولينو الفرعية عند الطرف 3' لأوليجومر PMO مضاد لاتجاه النسخ وفقًا للكشف. في بعض التجسيدات، يكون "G-R6-" أو "G-R6-Ac-" عبارةً عن مترافق مع أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ عند الطرف 3' وفقًا للكشف وله الصيغة التالية:



صورة ، أو



.6HCl

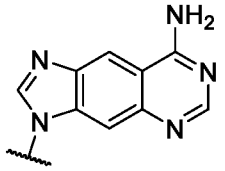
صورة .

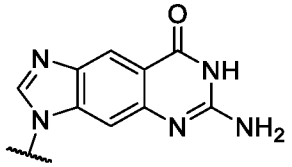
يتم استخدام المصطلحات "قاعدة نووية " (Nu)، "شطر ازدواج قواعد" أو "قاعدة" بدلًا من بعضها البعض للإشارة إلى قاعدة بيورين أو بيريميدين موجودة في DNA أو RNA طبيعي الحدوث، أو "أصلي" (على سبيل المثال، يوراسيل، ثايمين، أدينين، سيتوزين، وجوانين)، وكذلك نظائر من مركبات البيورين والبيريميدين هذه طبيعية الحدوث. يمكن أن تضفي هذه النظائر خواصًا محسنة، مثل ألفة الارتباط، بالأوليجومر. تتضمن النظائر النموذجية هيبوكسانثين (مكون قاعدة إينوزين)؛

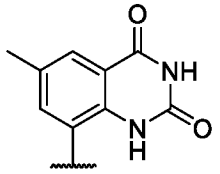
2، 6-داي أمينو بيورين؛ 5-ميثيل سيتوزين؛ مركبات بيريميدين معدلة بـ C5-بروبينيل؛ 10-(9-(أمينو إيثوكسي)فينوكسازينيل) (قامطة G) وما شابه.

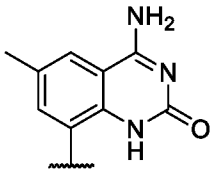
تتضمن الأمثلة الإضافية أشطار إزدواج القواعد، على سبيل المثال لا الحصر، يوراسيل، ثايمين، أدينين، سيتوزين، جوانين وهيبوكسانثين (إينوزين) بها مجموعات أمينو مناظرة محمية بمجموعات أسيل حامية، نظائر 2-فلورو يوراسيل، 2-فلورو سيتوزين، 5- برومو يوراسيل، 5-يودو يوراسيل، 2، 6-داي أمينو بيورين، أزا سيتوزين، بيريميدين مثل أشباه أيزو سيتوزين وأشباه يوراسيل وقواعد أنوية معدلة أخرى مثل مركبات بيورين بها استبدال عند الموضع 8، زانثين، أو هيبوكسانثين (يكون الأخيران منتجي تحلل طبيعيين). تم أيضًا ذكر القواعد النووية المعدلة التي ورد الكشف فيها: Chiu and Rana, RNA, 2003, 9, 1034-1048؛ Limbach et al. Nucleic Acids Research, 1994, 22, 2183-2196؛ و Revankar and Rao, Comprehensive Natural Products Chemistry, vol. 7, 313، والتي أُدرجت محتوياتها ضمن مراجع هذه الوثيقة.

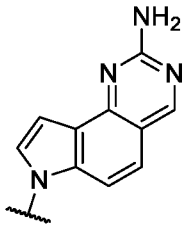
تتضمن الأمثلة الإضافية لأشطار إزدواج القواعد، على سبيل المثال لا الحصر، قواعد نووية ممتدة الحجم تم فيها إضافة واحدة أو أكثر من حلقات البنزين. وقد ورد وصف بهذه الوثيقة لاستبدالات قواعد الأحماض النووية في: كتالوج Glen Research (www.glenresearch.com)؛ Krueger AT et al., Acc. Chem. Res., 2007, 40, 141-150؛ Kool, ET, Acc. Chem. Res., 2002, 35, 936-943؛ Benner S.A., et al., Nat. Rev. Genet., 2005, 6, 553-543؛ Romesberg, F.E., et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 2003, 7, 723-733؛ و Hirao, I., Curr. Opin. Chem. Biol., 2006, 10, 622-627؛ والتي أُدرجت محتوياتها ضمن مراجع هذه الوثيقة، والتي تعد مفيدةً في مترافقات الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ. من بين أمثلة القواعد النووية ممتدة الحجم تلك الموضحة أدناه، وكذلك صورها الصنوية.

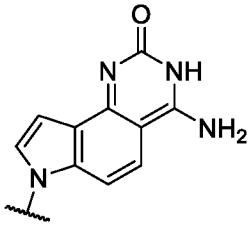
[085] 

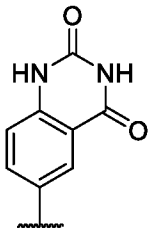
[086] 

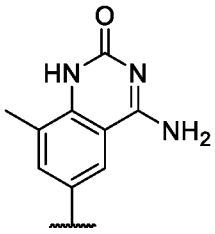
[087] 

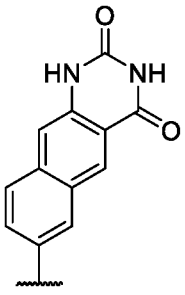
[088] 

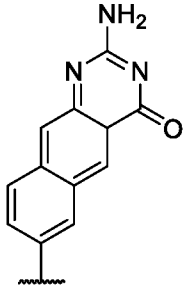
[089] 

[090] 

[091] 

[092] 

[093] 

[094] 

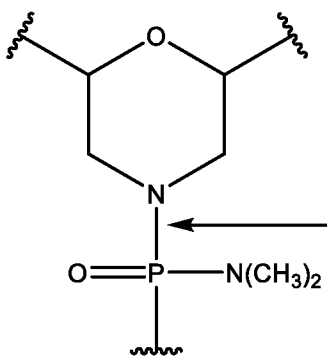
[095] [096]

تعني العبارتان "الإعطاء بالحقن غير المعوي" و"مُعطى بطريق الحقن غير المعوي" كما يُستخدم هنا أنماط الإعطاء بخلاف الإعطاء المعوي والموضعي، عادةً بالحقن، وتتضمنا، دون تحديد، الحقن والتسريب داخل الوريد، في العضل، داخل الشريان، داخل الغمد، داخِل المِحْفَظَة، داخل الحجاج، داخل القلب، داخل الأدمة، داخل الغشاء البريتوني، عبر الرغامى، تحت الجلد، تحت البشرة، داخل المفصل، تحت المحفظة، تحت العنكبوتية، دَاخِل القَنَاة الفَقَرِيَّة وداخِل القَصّ.

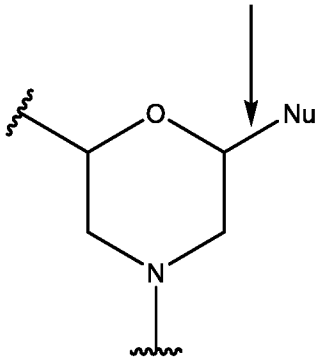
للإيضاح، تعد البنيات وفقًا للكشف التي تتضمن، على سبيل المثال، الصيغة (IV)، متصلةً من 5’ إلى 3’،، ولسهولة وصف البنية الكلية في صورة محكمة، تم تضمين عدة فواصل يُطلق عليها "الفاصل أ"، "الفاصل ب"، و"الفاصل جـ". على النحو الذي يفهمه ذو المهارة في المجال، على سبيل المثال، توضح كل إشارة "الفاصل أ" تتمةً لشرح البنية عند هذه النقاط. يفهم ذو المهارة أن نفس الأمر ينطبق على كل مثال في "الفاصل ب" و"الفاصل جـ" في البنيات السابقة. على الرغم من ذلك، لا يفهم ذو المهارة في المجال أن أي فواصل في الشرح تشير إلى انقطاع فعلي للبنية السابقة.

على النحو المستخدم بهذه الوثيقة، تشير مجموعة من الأقواس المستخدمة داخل صيغة بنائية إلى أن الميزة البنائية بين الأقواس مكررة. في بعض التجسيدات، قد تكون الأقواس المستخدمة عبارةً عن "[" و"]"، وفي تجسيدات معينة، قد تكون الأقواس المستخدمة للإشارة إلى تكرار الميزات البنائية عبارة عن "(" و")". في بعض التجسيدات، يمثل عدد تكرارات السمات البنائية بين الأقواس العدد المشار إليه خارج الأقواس مثل 2، 3، 4، 5، 6، 7، وهكذا. في تجسيدات متنوعة، يتم الإشارة إلى عدد تكرارات الميزة البنائية بين الأقواس من خلال المتغير المشار إليه خارج الأقواس مثل "Z".

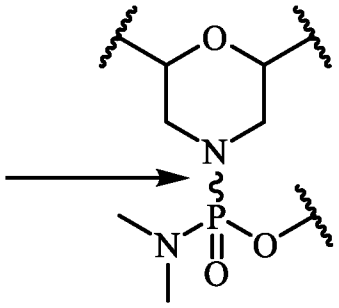
على النحو المستخدم بهذه الوثيقة، تشير الرابطة المستقيمة أو المتعرجة المرسومة على ذرة كربون أو فوسفور استقطابية داخل الصيغة البنائية إلى أن الكيمياء الفراغية لذرة الكربون أو الفوسفور الاستقطابية غير محددة ويُقصد بها تضمين جميع صور المركز الاستقطابي. تم وصف أمثلة لهذه الإيضاحات فيما بعد.



صورة



صورة



صورة

تعني العبارة "مقبول صيدليًا" أنه يتحتم أن تكون المادة أو التركيبة متوافقة، كيميائيًا و/أو على نحو سام، مع المكونات الأخرى المشتملة على صيغة، و/أو الخاضع للعلاج الذي يتم علاجه بها.

تعني العبارة "مادة حاملة مقبولة صيدليًا" كما يُستخدم هنا مادة صلبة غير سامة خاملة، مادة مالئة شبه صلبة أو سائلة، مادة مخففة، مادة ممحفظة أو مادة مساعدة للصياغة من أي نوع. تتمثل بعض الأمثلة الخاصة بالمواد التي يمكن أن تعمل كمواد حاملة مقبولة صيدليًا في مواد سكرية مثل لاكتوز، جلوكوز وسكروز؛ يمكن أيضًا أن توجد أنواع النشا مثل نشا الذرة ونشا البطاطس؛ السيليلوز ومشتقاته مثل صوديوم كربوكسي ميثيل سيليلوز، إيثيل سيليلوز وسيليلوز أسيتات؛ صمغ كثيراء في صورة مسحوق؛ الشعير؛ الجيلاتين؛ التالك؛ السواغات مثل زبدة الكاكاو وأنواع شمع التحاميل؛ الزيوت مثل زيت الفول السوداني، زيت بذر القطن، زيت العُصْفُر، زيت السمسم، زيت الزيتون، زيت الذرة وزيت فول الصويا؛ مركبات جليكول؛ مثل بروبيلين جليكول؛ إسترات مثل إيثيل أوليات وإيثيل لورات؛ آجار؛ عوامل منظمة مثل مجنسيوم هيدروكسيد وألومينيوم هيدروكسيد؛ حمض ألجينيك؛ ماء خالي من مولد حمى؛ محلول ملحي متساوي التوتر؛ محلول Ringer؛ كحول إيثيلي؛ محاليل منظمة بالفوسفات، المزلقات المتوافقة غير السامة مثل صوديوم لوريل سلفات ومجنسيوم ستيارات، العوامل الملونة، عوامل الإطلاق، عوامل التغليف، عوامل التحلية، إكساب النكهة والتعطير، المواد الحافظة ومضادات الأكسدة، وفقًا لقرار القائم بالصياغة.

يشير المصطلح "استعادة" تخليق أو إنتاج الديستروفين بصفة عامة إلى إنتاج بروتين ديستروفين متضمن صور مقتطعة من الديستروفين في مريض يعاني من الحَتَل العَضَلِيّ بعد العلاج باستخدام مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ كما يوصف هنا. في بعض التجسيدات، نتائج العلاج في زيادة في إنتاج ديستروفين جديد في مريض بمقدار 1%، 5%، 10%، 20%، 30%، 40%، 50%، 60%، 70%، 80%، 90% أو 100% (متضمنة كل الأعداد الصحيحة فيما بينها). في بعض التجسيدات، يزيد العلاج من عدد ألياف الديستروفين الإيجابية وصولاً إلى على الأقل حوالي 20%، حوالي 30%، حوالي 40%، حوالي 50%، حوالي 60%، حوالي 70%، حوالي 80%، حوالي 90 % أو حوالي 95% إلى 100% من الطبيعي في الخاضع للعلاج. في تجسيدات أخرى، يزيد العلاج من عدد ألياف الديستروفين الإيجابية وصولاً إلى نسبة من حوالي 20% إلى حوالي 60%، أو حوالي 30% إلى حوالي 50% من الطبيعي في الخاضع للعلاج. يمكن تحديد النسبة الخاصة بألياف الديستروفين الإيجابية في مريض بعد العلاج بواسطة عينة فحص عضلية باستخدام تقنيات معروفة. على سبيل المثال، قد يتم أخذ عينة فحص عضلية من عضلة ملائمة، مثل العضلة ذات الرأسين العضدية في مريض.

قد يتم تنفيذ تحليل النسبة المئوية لألياف الديستروفين الإيجابية قبل العلاج و/أو بعد العلاج أو عند نقاط زمنية خلال سياق العلاج. في بعض التجسيدات، يتم أخذ عينة فحص بعد العلاج من عضلة الجانب المقابل من عينة الفحص قبل العلاج. قد يتم إجراء تحليل التعبير عن الديستروفين قبل وبعد العلاج باستخدام أية تجربة ملائمة للديستروفين. في بعض التجسيدات، يتم تنفيذ الكشف الكيميائي الهيستولوجي المناعي على قطاعات نسيجية من عينة فحص العضلة باستخدام جسم مضاد يمثل علامة محددة للديستروفين، مثل جسم مضاد أحادي النسيلة أو متعدد النسائل. على سبيل المثال، يمكن استخدام الجسم المضاد MANDYS106 الذي يعتبر علامة محددة عالية الحساسية للديستروفين. قد يتم استخدام أي جسم مضاد ثانوي ملائم.

في بعض التجسيدات، يتم حساب النسبة المئوية لألياف الديستروفين الإيجابية عن طريق قسمة عدد الألياف الإيجابية على إجمالي الألياف التي تم عدها. تشتمل عينات العضلة الطبيعية على 100% من ألياف الديستروفين الإيجابية. لهذا، يمكن التعبير عن النسبة المئوية لألياف الديستروفين الإيجابية باعتبارها نسبة مئوية للألياف الطبيعية. للتحكم في وجود مستويات ضئيلة

من الديستروفين في العضلة قبل العلاج إضافة إلى الألياف المعكوسة يمكن ضبط قيمة قاعدية باستخدام قطاعات من العضلات قبل العلاج من كل مريض عند عد ألياف الديستروفين الإيجابية في العضلات بعد العلاج. قد يتم استخدام هذا كقيمة حدية لعد ألياف الديستروفين الإيجابية في قطاعات من العضلة بعد العلاج في ذلك المريض. في تجسيدات أخرى، يمكن أيضًا استخدام قطاعات نسيجية ملونة بالجسم المضاد لتحديد كم الديستروفين باستخدام برنامج تحليل الصورة Bioquant (Bioquant Image Analysis Corporation, Nashville, TN). يمكن إيضاح إجمالي شدة إشارة فلورة الديستروفين كنسبة مئوية للطبيعي. بالإضافة إلى ذلك، يمكن استخدام تحليل لطخة ويسترن باستخدام أجسام مضادة أحادية النسيلة أو متعددة النسائل مضادة للديستروفين لتحديد النسبة المئوية لألياف الديستروفين الإيجابية. على سبيل المثال، قد يتم استخدام الجسم المضاد الذي يكون مضادًا للديستروفين NCL-Dys1 من Leica Biosystems. يمكن أيضًا تحليل النسبة المئوية لألياف الديستروفين الإيجابية عن طريق تحديد التعبير الوراثي عن مكونات معقد ساركوجليكان (□□□) و/أو NOS للخلايا العصبية.

في بعض التجسيدات، يؤدي العلاج باستخدام مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ خاص بالكشف إلى إبطاء أو تقليل الخلل الوظيفي و/أو الإخفاق في عضلة الجهاز النفسي المتقدم في المرضى الذين يعانون من DMD الذي سيكون متوقعًا من دون العلاج. في بعض التجسيدات، قد يُقلل العلاج باستخدام مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ خاص بالكشف من أو يُزيل الحاجة لمساعدة في التنفس التي قد تكون متوقعة بدون العلاج. في بعض التجسيدات، تتضمن قياسات الوظيفة التنفسية لتتبع مسار المرض، إضافة إلى تقييم التدخلال العلاجية المحتملة الضَّغْط الشَّهيقِيّ الأقصى (MIP)، الضَّغْط الزَّفيرِيّ الأقصى (MEP) والسعة الحيوية القسرية (FVC). يقيس MIP وMEP مستوى الضغط الذي يمكن لشخص إنتاجه أثناء الشهيق والزفير، على التوالي، وتعتبر قياسات حساسة لقوة العضلة التنفسية. يمثل MIP قياسًا لضعف عضلة الحجاب الحاجز.

في بعض التجسيدات، قد يتراجع MEP قبل التغييرات في اختبارات الوظيفة الرئوية الأخرى، متضمنة MIP وFVC. في تجسيدات معينة، قد يمثل MEP مؤشرًا مبكرًا على خلل وظيفي تنفسي. في تجسيدات معينة، قد يتم استخدام FVC لقياس إجمالي حجم الهواء المخرج أثناء الزفير

القسري بعد عملية شهيق قصوى. في المرضى الذين يعانون من DMD، تزداد FVC على نحو مصاحب للنمو الفيزيائي حتى بدايات المراهقة. بالرغم من ذلك، عند تباطء النمو أو عندما تتم إعاقته بتفاقم المرض، وتفاقم ضعف العضلات، تدخل السعة الحيوية طورًا تنازليًا وتتراجع بمعدل متوسط يبلغ من حوالي 8 إلى 8,5 بالمائة في العام بعد من 10 إلى 12 سنة من العمر. في تجسيدات معينة، يعتبر MIP بالمائة المتنبأ به (MIP المضبوط للوزن)، MEP بالمائة المتنبأ به (MEP المضبوط للعمر) وFVC بالمائة المتنبأ به (FVC المضبوط للعمر والطول) تحليلات داعمة.

يتضمن المصطلحان "خاضع للعلاج" و"مريض"، كما يُستخدم هنا، أي حيوان يُظهر عرضًا، أو يكون على خطر أن يُظهر عرضًا، يمكن علاجه باستخدام مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ خاص بالكشف، مثل خاضع للعلاج (أو مريض) يعاني من أو على خطر أن يعاني من DMD أو BMD، أو أي من الأعراض المصاحبة لهذه الحالات (على سبيل المثال، فقد الألياف العضلية). يتضمن الخاضعون للعلاج الملائمون (أو المرضى) الحيوانات المعملية (مثل الفأر، الجرذ، الأرنب، أو خنزير غينيا)، حيوانات المزارع، والحيوانات الداجنة أو الحيوانات الأليفة (مثل قط أو كلب). يتم تضمين الحيوانات الرئيسة غير البشرية، ويُفضل، المرضى (أو الخاضعون للعلاج) من البشر. كذلك يتم تضمين طرق لإنتاج الديستروفين في خاضع للعلاج (أو مريض) لديه طفرة في جين الديستروفين الذي يكون مُعرّضًا لتخطي الإكسون 51.

تعني العبارات "الإعطاء المجموعي"، "مُعطى على نحو مجموعي"، "الإعطاء الطرفي" و"مُعطى على نحو طرفي" كما يُستخدم هنا إعطاء مركب، عقار أو مادة أخرى بخلاف ذلك على نحو مباشر في الجهاز العصبي المركزي، بحيث تدخل إلى جهاز المريض و، بالتالي، تكون معرضة للأيض والعمليات الأخرى المشابهة، على سبيل المثال، الإعطاء تحت الجلد.

يشير العبارة "متوالية استهداف" إلى متوالية قواعد نووية أوليجومر متممة لمتوالية نوكليوتيدات في mRNA أولي مستهدف. في بعض التجسيدات وفقًا للكشف، تمثل متوالية النوكليوتيدات في mRNA الأولي المستهدف موقع تلدين الإكسون 51 في ديستروفين mRNA الأولي الذي يُطلق عليه H51A(+66+95).

يمثل "علاج" خاضع للعلاج (على سبيل المثال، كائن ثديي، مثل إنسان) أو خلية أي نوع من التدخل المستخدم في محاولة لتغيير السياق الطبيعي للخاضع للعلاج أو الخلية. يتضمن العلاج، إلا أن الأمر ليس قاصرًا على، إعطاء أوليجومر أو تركيبة صيدلية منه، وقد يتم التنفيذ إما على نحو وقائي أو لاحق لبدء حدث مسبب للمرض أو التلامس مع عَامِل سَبَبِي. يتضمن العلاج أي تأثير مطلوب على الأعراض أو مسببات الأمراض الخاصة بمرض أو حالة مصاحبة لبروتين الديستروفين، كما في صور معينة من الحَثَل العَضَلِيّ، وقد تتضمن، على سبيل المثال، التغييرات أو التحسينات الدنيا في واحد أو أكثر من العلامات القابلة للقياس الخاصة بالمرض الذي يتم علاجه أو الحالية التي يتم علاجها. كذلك يتم تضمين علاجات "وقائية"، يمكن توجيهها إلى تقليل معدل تقدم المرض الذي يتم علاجه أو الحالة التي يتم علاجها، تأخير بدء ظهور ذلك المرض أو تلك الحالة، أو تقليل حدة بدء ظهوره/ظهورها. ليس بالضرورة أن يشير "العلاج" أو "الوقاية" إلى استئصال تام، علاج، أو منع المرض أو الحالة، أو الأعراض المصاحبة لها.

في بعض التجسيدات، يزيد العلاج باستخدام مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ خاص بالكشف من إنتاج ديستروفين جديد، يؤخر تقدم المرض، يُبطئ أو يقلل من فقد السير، يُقلل من التهاب العضلات، يُقلل من تلف العضلات، يُحسن من وظيفة العضلات، يُقلل من فقد الوظيفة الرئوية، و/أو يُعزز من تجدد العضلات الذي سيكون متوقعًا بدون علاج. في بعض التجسيدات، يحافظ العلاج على، يؤخر، أو يُبطئ تقدم المرض. في بعض التجسيدات، يحافظ العلاج على السير أو يُقلل من فقد السير. في بعض التجسيدات، يحافظ العلاج على الوظيفة الرئوية أو يُقلل من فقد الوظيفة الرئوية. في بعض التجسيدات، يحافظ العلاج على أو يُزيد مسافة سير على الأقدام ثابتة في مريض، كما هو مُقاس بواسطة، على سبيل المثال، اختبار السير لمدة 6 دقائق (6MWT). في بعض التجسيدات، يحافظ العلاج على أو يُقلل من الزمن إلى السير/الجري 10 أمتار (أي، اختبار السير/الجري 10 أمتار). في بعض التجسيدات، يحافظ العلاج على أو يُقلل من الزمن إلى الوقوف من الاستلقاء (أي، اختبار الزمن إلى الوقوف). في بعض التجسيدات، يحافظ العلاج على أو يُقلل من الزمن إلى ارتقاء أربع درجات من درجات السلّم التقليدية (أي، اختبار ارتقاء أربع درجات من السلّم). في بعض التجسيدات، يحافظ العلاج على أو يُقلل من التهاب العضلات في المريض، كما هو مُقاس بواسطة، على سبيل المثال، MRI (على سبيل المثال، MRI لعضلات

الساق). في بعض التجسيدات، يقوم MRI بقياس T2 و/أو جزء الدهون لتحديد ضمور العضلات. يمكن أن يُحدد MRI التغييرات في بنية العضلات والتركيبة الناتجة بواسطة الالتهاب، الاستسقاء، تلف العضلات وارتشاح الدهون.

في بعض التجسيدات، يزيد العلاج باستخدام مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ خاص بالكشف من إنتاج ديستروفين جديد ويُبطئ أو يُقلل من فقد السير الذي سيكون متوقعًا بدون العلاج. على سبيل المثال، قد يؤدي العلاج إلى تثبيت، الحفاظ على، تحسين أو زيادة القدرة على المشي (على سبيل المثال، تثبيت السير) في الخاضع للعلاج. في بعض التجسيدات، يحافظ العلاج على أو يُزيد مسافة سير على الأقدام ثابتة في مريض، كما هو مُقاس بواسطة، على سبيل المثال، اختبار السير لمدة 6 دقائق (6MWT)، الموصوف بواسطة McDonald, et al. (Muscle Nerve, 2010; 42:966-74، المتضمن هنا كمرجع). قد يتم التعبير عن تغير في مسافة السير لمدة 6 دقائق (6MWD) في صورة قيمة مطلقة، تغير بنسبة مئوية أو تغير في % للقيمة المتنبأ بها. في بعض التجسيدات، يحافظ العلاج على أو يُحسّن من مسافة سير على الأقدام ثابتة في 6MWT من عجز بنسبة 20% في الخاضع للعلاج بالنسبة لنظير مُعافى. يمكن تحديد أداء مريض DMD في 6MWT بالنسبة إلى الأداء النمطي لنظير مُعافى عن طريق حساب % لقيمة متنبأ بها. على سبيل المثال، قد يتم حساب % لـ 6MWD المتنبأ به باستخدام المعادلة التالية للذكور: 196,72 + (39,81 x العمر) - (1,36 x العمر2) + (132,28 x الارتفاع بالأمتار). للإناث، قد يتم حساب % لـ 6MWD المتنبأ به باستخدام المعادلة التالية: 188,61 + (51,50 x العمر) - (1,86 x العمر2) + (86,10 x الارتفاع بالأمتار) (Henricson et al. PLoS Curr., 2012, version 2، المتضمن هنا كمرجع). في بعض التجسيدات، يزيد العلاج باستخدام أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ من مسافة السير على الأقدام الثابتة في المريض من قيمة قاعدية إلى أكبر من 3، 5، 6، 7، 8، 9، 10، 15، 20، 25، 30 أو 50 متر (بما في ذلك كل الأعداد الصحيحة فيما بينها).

قد يحدث فقد وظيفة العضلات في المرضى الذين يعانون من DMD ضد الخلفية الخاصة بالنمو والتطور الطبيعي في الطفولة. بالفعل، قد يُظهر الأطفال الأصغر سنًا الذين يعانون من DMD زيادة في المسافة التي يتم سيرها أثناء 6MWT على مدار حوالي 1 عام بالرغم من ضعف

العضلات المتقدم. في بعض التجسيدات، تتم مقارنة 6MWD من المرضى الذين يعانون من DMD بالخاضعين للعلاج من عينة المقارنة المتطورة نمطيًا وبالبيانات المعيارية الموجودة من الخاضعين للعلاج متطابقي العمر والجنس. في بعض التجسيدات، يمكن تفسير النمو والتطور الطبيعيين باستخدام معادلة معتمدة على العمر والارتفاع المتواءمة مع البيانات المعيارية. يمكن استخدام هذه المعادلة لتحويل 6MWD إلى قيمة بالنسبة المئوية (%) متنبأ بها في الخاضعين للعلاج الذين يعانون من DMD. في تجسيدات معينة، يقدم تحليل بيانات 6MWD بالنسبة المئوية المتنبأ بها طريقة لتفسير النمو والتطور الطبيعيين، وقد يُظهر هذا أن قيم الكسب في الوظيفة عند الأعمار المبكرة (على سبيل المثال، أقل من أو يساوي العمر 7) تمثل قدرات ثابتة بدلاً من كونها محسنة في المرضى الذين يعانون من DMD (Henricson et al. PLoS Curr., 2012, version 2، المتضمن هنا كمرجع).

تم اقتراح نظام تسمية جزيء مضاد لاتجاه النسخ ونشره للتمييز فيما بين الجزيئات المضادة لاتجاه النسخ النمختلفة (انظر Mann et al., (2002) J Gen Med 4, 644-654). تصبح هذه التسمية ذات صلة بخاصة عند اختبار العديد من الجزيئات المضادة لاتجاه النسخ المختلفة بشكل طفيف، الموجهة كلها لنفس المنطقة المستهدفة، كما يُعرض فيما يلي:

.H#A/D(x:y)

يُدلل الحرف الأول على النوع (على سبيل المثال، H: إنسان، M: فأر، C: كلب). "#" يُدلل على عدد الإكسون للديستروفين المستهدف. "A/D" تشير إلى موقع جدل مستقبل أو مانح عند بداية ونهاية الإكسون، على التوالي. (x y) تمثل إحداثيات التلدين حيث "-" أو "+" يشيرا إلى متواليات الإنترون والإكسون على التوالي. على سبيل المثال، سيشير A(-6+18) إلى آخر 6 قواعد من الإنترون التي تسبق الإكسون المستهدف وأول 18 قاعدة من الإكسون المستهدف. سيكون موقع الجدل الأقرب هو المستقبل بحيث تكون هذه الإحداثيات بـ "A". يمكن أن يكون وصف إحداثيات التلدين عند موقع جدل المانح هو D(+2-18) حيث آخر 2 قاعدة من القواعد الخاصة بالإكسون وأول 18 قاعدة من قواعد الإنترون تناظر موقع التلدين للجزيء المضاد لاتجاه النسخ. إحداثيات التلدين الخاصة بالإكسون بالكامل التي سيتم تمثيلها بواسطة A(+65+85)، أي الموقع فيما بين النوكليوتيد 65 والنوكليوتيد 85 من بداية ذلك الإكسون.

2- الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ

أ) مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ المصممة للحث على تخطي الإكسون 51

في تجسيدات معينة، تعد مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ وفقًا للكشف متممة لمنطقة الإكسون 51 المستهدفة لجين الديستروفين وتعمل على حث تخطي الإكسون 51. على نحو محدد، يتعلق الكشف بمترافقات أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ متمم منطقة الإكسون 51 المستهدفة للديستروفين mRNA الأولي الذي يُطلق عليه موقع تلدين. في بعض التجسيدات، يكون موقع التلدين عبارةً عن H51A(+66+95).

تستهدف مترافقات أوليجومر مضادة لاتجاه النسخ وفقًا للكشف ديستروفين mRNA الأولي وتستحث تخطي الإكسون 51، لذا يتم استبعاده أو تخطيه من نسخة mRNA الناضجة المجدولة. من خلال تخطي الإكسون 51، يتم استعادة إطار القراءة الممزق إلى طفرة إطارية داخلية. في حين أن DMD يتألف من عدة أنماط فرعية جينية، تم خصيصًا تصميم مترافقات أوليجومر مضادة لاتجاه النسخ وفقًا للكشف لتخطي الإكسون 51 لديستروفين mRNA الأولي. تتألف طفرات DMD التي تكون مُعرّضًا لتخطي الإكسون 51 من مجموعة فرعية من مرضى DMD (13%).

تم تصميم متوالية قاعدة نووية مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ يستحث تخطي الإكسون 51 بحيث تكون متممة لمستهدف متوالية محدد داخل الإكسون 51 لديستروفين mRNA الأولي. في بعض التجسيدات، يكون الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ لمترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ عبارةً عن PMO حيث يتم ربط كل حلقة مورفولينو في PMO بقاعدة نووية تتضمن، على سبيل المثال، قواعد نووية موجودة في DNA (أدينين، سيتوزين، جوانين، وثايمين).

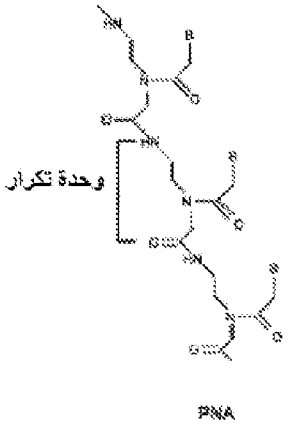
ب) السمات المميزة لكيمياء الأوليجومر

يمكن أن تستخدم مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ الخاصة بالكشف مجموعة متنوعة من الكيمياء المضادة لاتجاه النسخ. تتضمن الأمثلة على كيمياء الأوليجومر، دون تحديد، أوليجومرات من مورفولينو، أوليجومرات معدلة من فوسفورو ثيوات، أوليجومرات معدلة من 2'-O- ميثيل، حمض نووي لببتيد (PNA)، حمض نووي مقفل (LNA)، أوليجومرات من فوسفورو ثيوات، أوليجومرات معدلة من 2'-MOE، أوليجومر معدل بـ 2'-فلورو، الأحماض النووية المجسرة بـ

2 '،4C '-إيثيلين (ENAs)، تراي سيكلو-DNAs، وحدات تراي سيكلو-DNA فوسفورو ثيوات فرعية، أوليجومرات معدلة من 2'-O-[2-(N-ميثيل كرباموبل)إيثيل]، متضمنة توليفات من أي مما سبق. يمكن دمج الكيمياء المعدلة بفوسفورو ثيوات و2'-O-Me للحصول على مكوّن 2'O-Me-فوسفورو ثيوات رئيسي. انظر، على سبيل المثال، نشرات الطلبات الدولية أرقام WO/2013/112053 و WO/2009/008725، التي يتم تضمينها هنا كمرجع بأكملها. يتم بشكل إضافي وصف التجسيدات النموذجية الخاصة بكيمياء الأوليجومر الخاصة بالكشف فيما يلي.

1) الأحماض النووية لببتيد (PNAs)

تعتبر الأحماض النووية لببتيد (PNAs) نظائر لـ DNA حيث يكون المكون الرئيسي متجانسًا هيكليًا مع مكون رئيسي من ديوكسي ريبوز، متكون من وحدات N-(2-أمينو إيثيل) جليسين يتم إلحاق قواعد بيريميدين أو بيورين بها. تهجن PNAs المحتوية على قواعد بيريميدين وبيورين الطبيعية الأوليجومرات المتممة الخاضعة لأحكام ازدواج القواعد واطسون-كريك، وتحاكي DNA فيما يتعلق بالتعرف على زوج القواعد (Egholm, Buchardt et al. 1993). يتم تكوين المكون الرئيسي من PNAs بواسطة روابط ببتيد بدلاً من روابط فوسفو داي إستر، مما يجعلها ملائمة جيدًا للتطبيقات المضادة لاتجاه النسخ (انظر الصيغة البنائية التالية). يكون المكون الرئيسي بدون شحنة، مما يؤدي إلى مضاعفات PNA/DNA أو PNA/RNA التي تُظهر ثباتًا حراريًا أكبر من الثبات الحراري الطبيعي. لا يتم التعرف على PNAs بواسطة إنزيمات نيوكلياز أو إنزيمات بروتياز. يتم فيما يلي إيضاح مثال غير حصري على PNA:



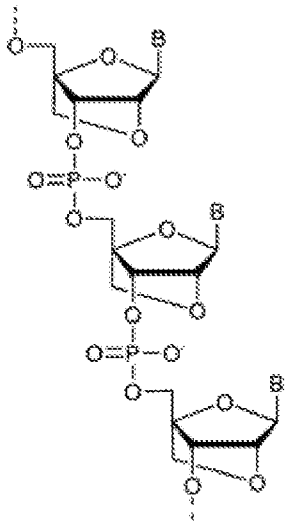
بالرغم من تغير هيكلي جذري في الصيغة البنائية الطبيعية، تكون PNAs قادرة على ارتباط متوالية نوعي في صورة حلزونية بـ DNA أو RNA. تتضمن السمات المميزة لـ PNAs ألفة ربط عالية بـ DNA أو RNA متمم، تأثير عدم ثبات ناتج بواسطة عدم توافق قاعدة فردية، مقاومة إنزيمات نيوكلياز وإنزيمات بروتياز، التهجين باستخدام DNA أو RNA المستقلة عن تركيز الملح والتكوين الثلاثي باستخدام DNA بيورين متجانس. لقد طورت PANAGENE™ مونومرات Bts PNA المملوكة لها (Bts؛ مجموعة بنزو ثيازول-2-سلفونيل) وعملية التحويل إلى أوليجومر المسجلة لها. تتكون عملية تحويل PNA إلى أوليجومر باستخدام مونومرات Bts PNA من دورات متكررة من نزع الحماية، الإقران والتغطية. يمكن إنتاج PNAs تخليقيًا باستخدام أية تقنية معروفة في المجال. انظر، على سبيل المثال، طلبات براءات الاختراع الأمريكية أرقام 6,969,766، 7,211,668، 7,022,851، 7,125,994، 7,145,006 و7,179,896. انظر أيضًا طلبات براءات الاختراع الأمريكية أرقام 5,539,082؛ 5,714,331؛ و5,719,262 لتحضير PNAs. يمكن إيجاد التعاليم الإضافية الخاصة بمركبات PNA في Nielsen et al., Science, 254:1497-1500, 1991. تم تضمين كل مما سبق كمرجع بأكمله.

2) الأحماض النووية المقفلة (LNAs)

قد تحتوي مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ أيضًا على وحدات فرعية من "حمض نووي مقفل" (LNAs). تمثل "LNAs" عددًا من فئة تعديلات يُطلق عليها حمض نووي مجسر (BNA). يتم تمييز BNA بواسطة رابط تساهمي يقفل هيئة حلقة الريبوز في تجعية سكر C30-إندو (شمالي). لـ LNA، يتم تكوين الجسر من ميثيلين فيما بين الموضعين O-'2 و C4-'. يعزز LNA من التنظيم المسبق للمكون الرئيسي وتراص القواعد لزيادة التهجين والثبات الحراري.

يمكن إيجاد الصيغ البنائية الخاصة بـ LNAs، على سبيل المثال، في Wengel, et al., Chemical Communications (1998) 455; Koshkin et al., Tetrahedron (1998) 54:3607; Jesper Wengel, Accounts of Chem. Research (1999) 32:301; Obika, et al., Tetrahedron Letters (1997) 38:8735; Obika, et al., Tetrahedron Letters (1998) 39:5401؛ و Obika, et al., Bioorganic

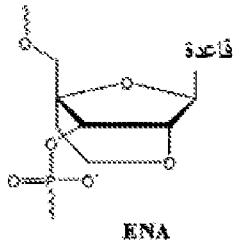
Medicinal Chemistry (2008) 16:9230، التي تم تضمينها هنا كمرجع بأكملها. يتم فيما يلي إيضاح مثال غير حصري على LNA:



LNA

قد تتضمن مترافقات أوليجومر مضادة لاتجاه النسخ وفقًا للكشف واحدًا أو أكثر من LNAs؛ في بعض الحالات، قد تكون مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ مكونة بالكامل من LNAs. يتم وصف الطرق لتخليق الوحدات الفرعية لـ LNA نوكليوزيد الفردية وتضمينها في الأوليجومرات، على سبيل المثال، في طلبات براءات الاختراع الأمريكية أرقام 7,572,582، 7,569,575، 7,084,125، 7,060,809، 7,053,207، 7,034,133، 6,794,499، و 6,670,461، التي تم تضمين كل منها كمرجع بأكملها. تتضمن روابط الوحدة الفرعية الداخلية النمطية أشطار فوسفو داي إستر وفوسفورو ثيوات؛ على نحو بديل، قد يتم استخدام روابط غير محتوية على فوسفور. تتضمن تجسيدات إضافية مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ محتوي على LNA حيث يتم فصل كل وحدة LNA فرعية بواسطة وحدة DNA فرعية. يتم تكوين مترافقات أوليجومرات مضادة لاتجاه النسخ معينة من وحدات LNA و DNA فرعية متعاقبة حيث يكون رابط الوحدة الفرعية الداخلية هو فوسفورو ثيوات.

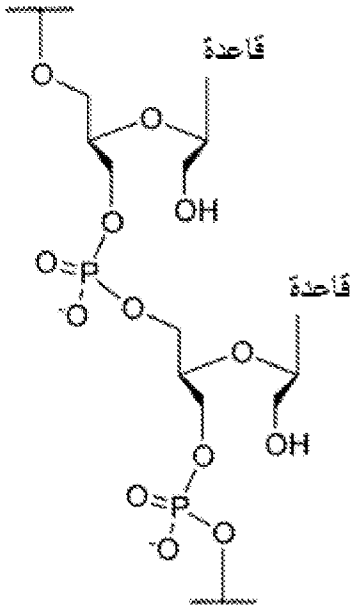
تمثل الأحماض النووية المجسرة بـ O'2، C4 '-إيثيلين (ENAs) عضوًا آخر من فئة BNAs. يتم فيما يلي إيضاح مثال غير حصري:



يتم وصف أوليجومرات ENA وتحضيرها في Obika et al., Tetrahedron Lett (1997) 38 (50): 8735، التي تم تضمينها هنا كمرجع بأكملها. قد تتضمن مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ الخاصة بالكشف واحدة أو أكثر من وحدات ENA الفرعية.

3.حمض نووي مفتوح (UNA)

كما يمكن أن تحتوي مترافقات أوليجومرات مضادة لاتجاه النسخ على وحدات حمض نووي مفتوح (UNA) فرعية. تعد أوليجومرات UNAs وUNA نظيرًا لـ RNA يتم فيها شطر رابطة C2′–C3' للوحدة الفرعية. في حين يتم تقييد LNA تشاكليًا (بالنسبة لـ DNA وRNA)، يكون UNA شديد المرونة. يتم الكشف عن UNAs، على سبيل المثال، في 070166/2016 . ورد أدناه وصف غير حصري لـ UNA.

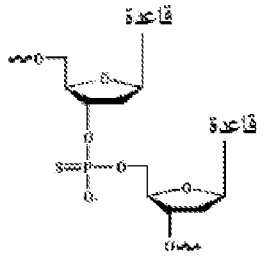


صورة

تتضمن روابط الوحدات الفرعية الداخلية النمطية أشطار فوسفو داي إستر وفوسفورو ثيوات؛ بدلًا من ذلك، يمكن استخدام روابط محتوية على غير الفوسفور.

3. مركبات فوسفورو ثيوات

تعتبر "مركبات فوسفورو ثيوات" (أو S-oligos) صورة مغايرة من DNA طبيعي حيث يتم استبدال واحدة من ذرات الأكسجين غير المجسرة بذرى سلفر. يتم فيما يلي إيضاح مثال غير حصري على فوسفورو ثيوات:



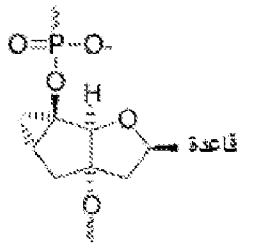
تقلل معالجة روابط النوكليوتيد الداخلي بالسلفر من تأثير إنزيمات النيوكلياز الداخلية والخارجية المضتمنة من 5 'إلى 3 'ومن 3' إلى 5' إنزيم نيوكلياز خارجي DNA POL 1، إنزيمات نيوكلياز S1 وP1، RNases، إنزيمات نيوكلياز المصل وفوسفو داي إستريار سم الحية. يتم تكوين مركبات فوسفورو ثيوات بواسطة اثنتين من الطرق الأساسية: بواسطة تأثير محلول من سلفر عنصري في كربون داي سلفيد على هيدروجين فوسفونات، أو بواسطة طريقة سلفرة فوسفيت تراي إسترات باستخدام إما تترا إيثيل ثيورام داي سلفيد (TETD) أو 3H-1، 2-بنزو داي ثيول-3-أون 1، 1-داي أكسيد (BDTD) (انظر، على سبيل المثال، Iyer et al., J. Org. Chem. 55, 4693-4699, 1990، التي تم تضمينها هنا كمرجع بأكملها). تتجنب الطرق الأخيرة مشكلة عدم ثبات السلفر العنصري في معظم المذيبات العضوية وسُمية كربون داي سلفيد. تُنتج أيضًا طرق TETD وBDTD مركبات فوسفورو ثيوات عالية النقاء.

5. وحدات فرعية من تراي سليكلو-DNAs وتراي سيكلو-فوسفورو ثيوات نوكليوتيدات

تمثل مركبات تراي سيكلو-DNA (tc-DNA) فئة من نظائر DNA مقيدة حيث يتم تعديل كل نوكليوتيد عن طريق إدخال حلقة سيكلو بروبان لتقييد المرونة الهيئية الخاصة بالمكون الرئيسي وللوصول بالشكل الهندسي للمكون الرئيسي الخاص بزاوية اللي γ إلى المستوى الأمثل. تقترن Tc-DNAs المحتوية على أدنين وثايمين القاعدية المتجانسة من قاعدة A-T الثابتة على نحو استثنائي بـ RNAs متممة. يتم وصف مركبات تراي سيكلو-DNAs وتخليقها في نشرة الطلب

الدولي رقم 115993/2010 ، التي تم تضمينها هنا كمرجع بأكملها. قد تتضمن مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ والخاصة بالكشف واحدًا أو أكثر من وحدات DNA فرعية ثلاثية الحلقات؛ في بعض الحالات، قد تكون مترافقات الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ مكونة بالكامل من وحدات DNA فرعية ثلاثية الحلقات.

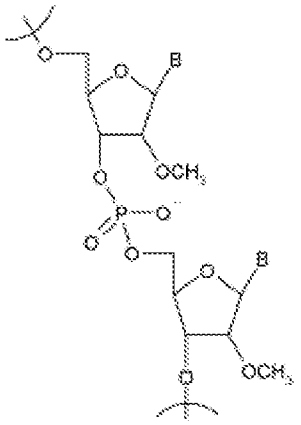
تكون وحدات التراي سيكلو-فوسفورو ثيوات الفرعية عبارة عن وحدات تراي سيكلو-DNA فرعية بروابط وحدة فرعية داخلية من فوسفورو ثيوات. يتم وصف وحدات تراي سيكلو-فوسفورو ثيوات فرعية وتخليقها في نشرة الطلب الدولي رقم 053928/2013 ، التي تم تضمينها هنا كمرجع بأكملها. قد تتضمن مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ والخاصة بالكشف واحدًا أو أكثر من وحدات DNA فرعية ثلاثية الحلقات؛ في بعض الحالات، قد تكون مترافقات الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ مكونة بالكامل من وحدات DNA فرعية ثلاثية الحلقات. يتم فيما يلي إيضاح مثال غير حصري على وحدة DNA فرعية ثلاثية الحلقات/فوسفورو ثيوات ثلاثي الحلقات:



تراي سيكلو-DNA

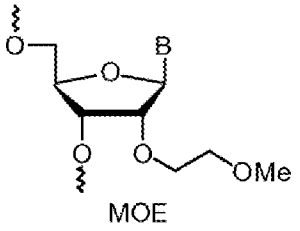
6. أوليجومرات 2'-O-ميثيل، 2'-MOE، و2'-F

تحمل جزيئات "أوليجومر 2'-O-Me" مجموعة ميثيل عند الوحدة البنائية 2'-OH من جزيء الريبوز. يُظهر 2'-O-Me-RNAs نفس السلوك (أو السلوك المشابه) الخاص بـ DNA، ولكنها تكون محمية ضد تحلل إنزيم نيوكلياز. يمكن أيضًا دمج 2'-O-Me-RNAs مع أوليجومرات من فوسفورو ثيوات (PTOs) للتثبيت بشكل إضافي. يمكن تخليق أوليجومرات 2'-O-Me (فوسفو داي إستر أو فوسفو ثيوات) وفقًا للتقنيات الروتينية في المجال (انظر، على سبيل المثال، Yoo et al., Nucleic Acids Res. 32:2008-16, 2004، التي تم تضمينها هنا كمرجع بأكملها). يتم فيما يلي إيضاح مثال غير حصري على أوليجومر 2'-O-Me:



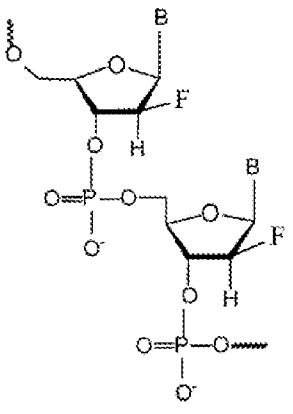
Me-’ O2

تحمل أوليجومرات O2 ’-ميثوكسي إيثيل (O MOE-’2) مجموعة ميثوكسي إيثيل عند الوحدة البنائية OH-’2 من جزيء الريبوز وتتم مناقشتها في Martin et al., Helv. Chim. Acta, 78, 486-504, 1995، التي تم تضمينها هنا كمرجع بأكملها. يتم فيما يلي إيضاح مثال غير حصري على وحدة MOE-’ O2 فرعية:



MOE

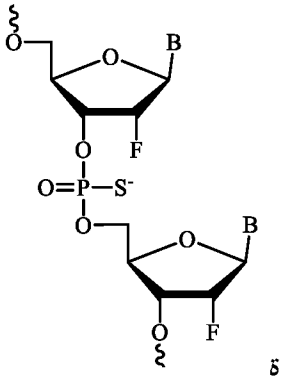
تتضمن أوليجومرات 2’-فلورو (F-’2) شق فلورو عند الموضع 2’ بدلًا من 2’OH. تم أدناه وصف مثال غير حصري لأوليجومر F-’2.



F-’2

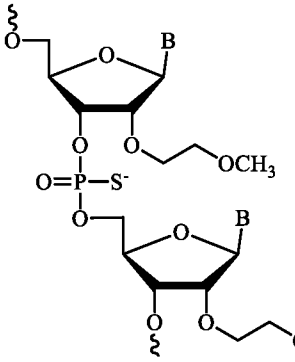
تم أيضًا وصف 2'-فلورو أوليجومرات في WO 2004/043977، والذي أُدرج بالكامل ضمن مراجع هذه الوثيقة.

كما تشتمل أوليجومرات 2'O-ميثيل، 2' O-MOE، و2'-F على واحدة أو أكثر من وصلات الفوسفورو ثيوات (PS) على النحو الموصوف أدناه.



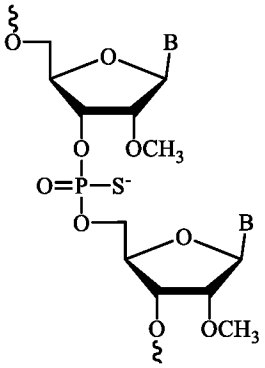
صورة

F PS-'2



صورة

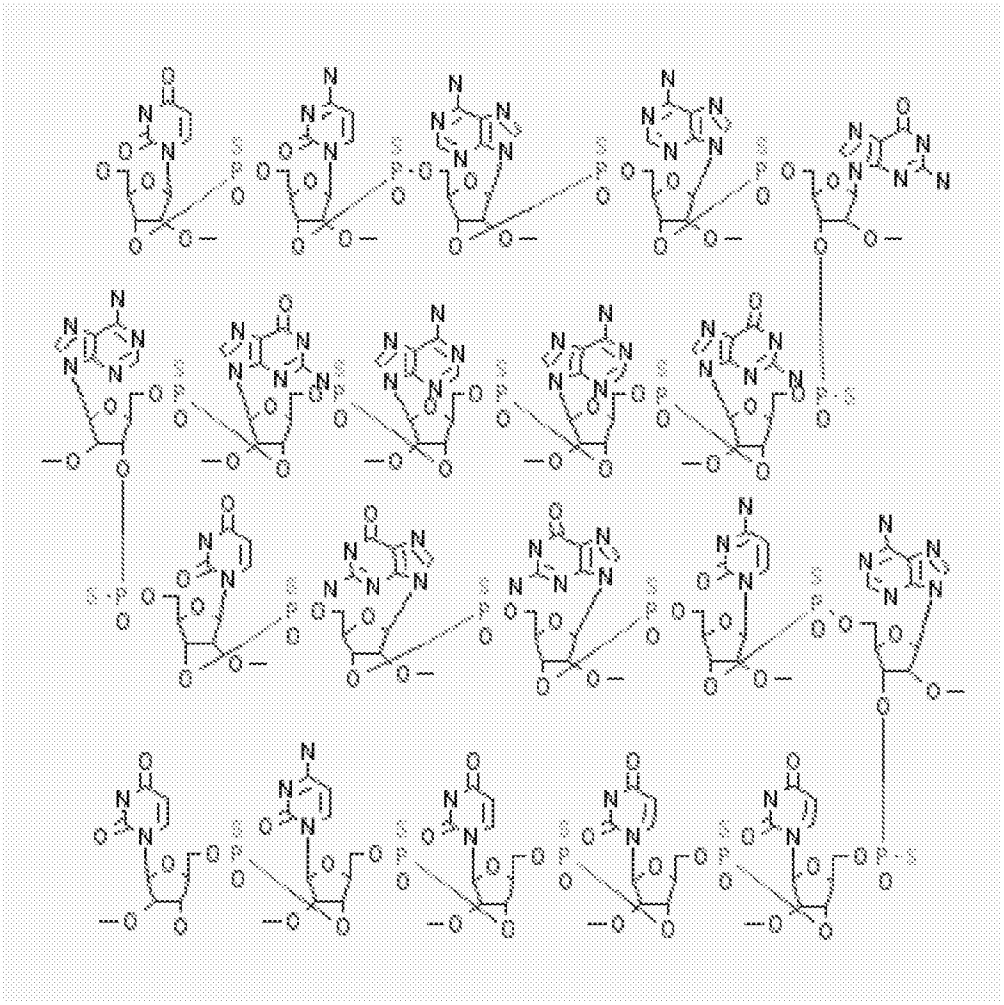
MOE PS-'O2 PS



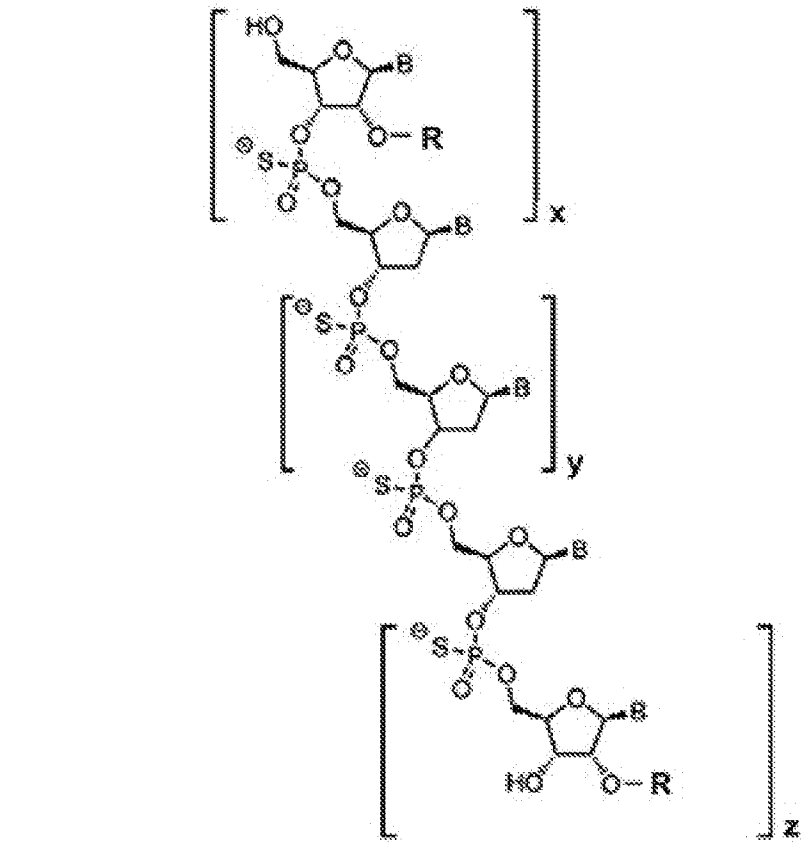
صورة

2'O-ميثيل

بشكل إضافي، قد تشتمل أوليجومرات 2'O-ميثيل، 2'O-MOE، و2'-F على روابط PS وحدة فرعية داخلية خلال الأوليجومر، على سبيل المثال، كما في درايسابرسين من أوليجومر 2'O-ميثيل PS الموضح فيما يلي:



على نحو بديل، قد تشتمل أوليجومرات 2'O–ميثيل، 2'O–MOE، و/أو 2'–F على روابط PS عند نهايات الأوليجومر كما يوضح فيما يلي:



حيث:

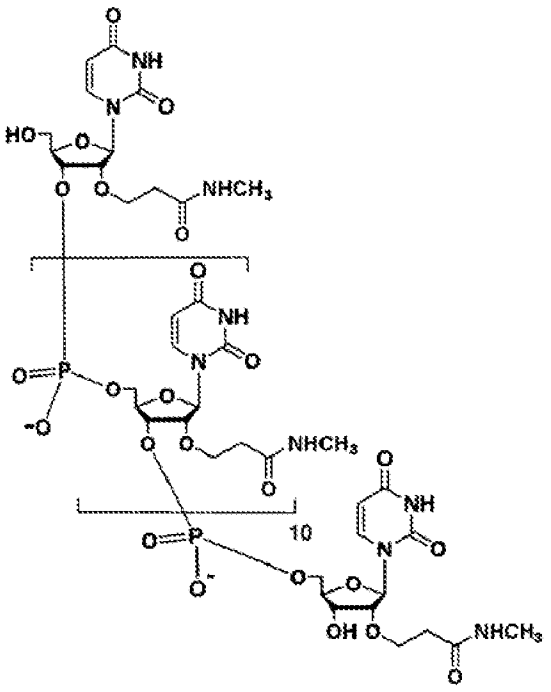
تكون R عبارةً عن CH2CH2OCH3 (ميثوكسي إيثيل أو MOE)؛ و

تشير x، y، وz إلى عدد من النوكليوتيدات المتضمنة داخل واحدة مما يُطلق عليه مناطق الجناح 5'، والفجوة المركزية، والجناح 3'، على الترتيب.

يمكن أن تدمج مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ وفقًا للكشف واحدةً أو أكثر من وحدات O2 '-ميثيل، MOE-' O2، وF-'2 الفرعية ويمكن أن تستخدم أيًا من وصلات الوحدات الفرعية المتداخلة التي ورد وصفها بهذه الوثيقة. في بعض الأمثلة، يمكن أن يتألف مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ وفقًا للكشف كليًا من وحدات O2'-ميثيل، MOE-' O2، أو F-'2 الفرعية. يتألف أحد تجسيدات مترافقات الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ وفقًا للكشف كليًا من وحدات O2'-ميثيل الفرعية.

7. أوليجومرات O-'2-[2-(N-ميثيل كربامويل)إيثيل] (MCEs)

تعتبر MCEs مثالاً آخر على ريبونوكليوزيدات معدلة بـ 2'O مفيدة في مترافقات الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ والخاصة بالكشف. هنا، يتم اشتقاق 2'OH لشطر 2-(N-ميثيل كربامويل)إيثيل لزيادة مقاومة إنزيم النيوكلياز. يتم فيما يلي إيضاح مثال غير حصري على أوليجومر MCE:

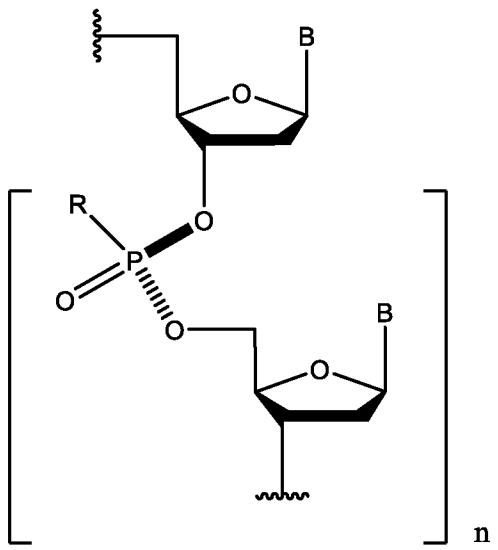


MCE

يتم وصف MCEs وتخليقها في Yamada et al., J. Org. Chem. (2011) 76(9):3042-53، التي تم تضمينها هنا كمرجع بأكملها. قد تتضمن مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ والخاصة بالكشف واحدة أو أكثر من وحدات MCE الفرعية.

8. الأوليجومرات النوعية الفراغية

تعتبر الأوليجومرات النوعية الفراغية هي تلك التي يتم تثبيت الكيمياء الفراغية الخاصة بكل رابط محتوي على فوسفور بواسطة طريقة تخليق بحيث يتم إنتاج أوليجومر فراغي نقي إلى حدٍ كبير. يتم فيما يلي إيضاح مثال غير حصري على أوليجومر نوعي فراغي:



في المثال السابق، يكون لكل فوسفور خاص بالأوليجومر نفس التشكيل الفراغي. تتضمن الأمثلة الإضافية الأوليجومرات الموصوفة فيما سبق. على سبيل المثال، يمكن تحضير الأوليجومرات التي أساسها LNAs، ENAs، مركبات تراي سيكلو-DNA، MCEs، 2'-ميثيل، 2'-MOE، 2'-F، ومورفولينو باستخدام روابط نوكليوزيد داخلي محتوية فوسفور نوعي فراغي مثل، على سبيل المثال، فوسفورو ثيوات، فوسفو داي إستر، فوسفوروراميدات، فوسفورو داي أميدات، أو روابط النوكليوزيد الداخلية المحتوية على الفوسفور الأخرى. يتم ذكر الأوليجومرات النوعية الفراغية، طرق التحضير، تخليق استقطابي متحكم فيه، تصميم استقطابي، ومواد مساعدة استقطابية للاستخدام في تحضير هذه الأوليجومرات بالتفصيل، على سبيل المثال، في البراءات الدولية :

2017192664 ، 2017192679 ، 2017062862 ، 2017015575 ، 2017015555 ، 2015107425 ، 2015108048 ، 2015108046 ، 2015108047، 2012039448، 2010064146، 2011034072، 2014010250، 2014012081، 20130127858، و 2011005761 ، التي تم تضمين كل منها هنا كمرجع بأكملها.

قد يكون للأوليجومرات النوعية الفراغية وصلات نوكليوتيد داخلي محتوية على فوسفور في تشكيلة RP أو SP. تعد الوصلات الاستقطابية المحتوية على فوسفور التي يتم فيها مقارنة التشكلية الفراغية للوصلات "نقية فراغيًا"، في حين أن الوصلات الاستقطابية المحتوية على فوسفور التي لا يتم فيها مقارنة التشكلية الفراغية للوصلات يُطلق عليها "عشوائية فراغيًا". في تجسيدات معينة،

تشتمل الأوليجومرات وفقًا للكشف على مجموعة من الوصلات النقية والعشوائية فراغيًا، بحيث يكون للأوليجومر الناتج وحدات فرعية نقية فراغيًا عند المواضع المحددة مسبقًا من الأوليجومر. وقد ورد مثال لموقع الوحدات الفرعية النقية فراغيًا في نشرة طلب البراءة الدولية 062862/2017 في الشكلين 7أ و7ب. في أحد التجسيدات، تعد جميع الوصلات الاستقطابية المحتوية على فوسفور في الأوليجومر عشوائية فراغيًا. في أحد التجسيدات، تكون جميع الوصلات الاستقطابية المحتوية على فوسفور في الأوليجومر نقية فراغيًا.

في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، تكون كل n في الوصلات الاستقطابية المحتوية على فوسفور في الأوليجومر عشوائية فراغيًا. في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، تكون كل n في الوصلات الاستقطابية المحتوية على فوسفور في الأوليجومر نقية فراغيًا. في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، تكون على الأقل 10% (إلى أقرب رقم صحيح) لوصلات n المحتوية على فوسفور في الأوليجومر نقية فراغيًا. في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، تكون على الأقل 20% (إلى أقرب رقم صحيح) لوصلات n المحتوية على فوسفور في الأوليجومر نقية فراغيًا. في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، تكون على الأقل 30% (إلى أقرب رقم صحيح) لوصلات n المحتوية على فوسفور في الأوليجومر نقية فراغيًا. في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، تكون على الأقل 40% (إلى أقرب رقم صحيح) لوصلات n المحتوية على فوسفور في الأوليجومر نقية فراغيًا. في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، تكون على الأقل 50% (إلى أقرب رقم صحيح) لوصلات n المحتوية على فوسفور في الأوليجومر نقية فراغيًا. في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، تكون على الأقل 60% (إلى أقرب

رقم صحيح) لوصلات n المحتوية على فوسفور في الأوليجومر نقية فراغيًا. في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، تكون على الأقل 70% (إلى أقرب رقم صحيح) لوصلات n المحتوية على فوسفور في الأوليجومر نقية فراغيًا. في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، تكون على الأقل 80% (إلى أقرب رقم صحيح) لوصلات n المحتوية على فوسفور في الأوليجومر نقية فراغيًا. في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، تكون على الأقل 90% (إلى أقرب رقم صحيح) لوصلات n المحتوية على فوسفور في الأوليجومر نقية فراغيًا.

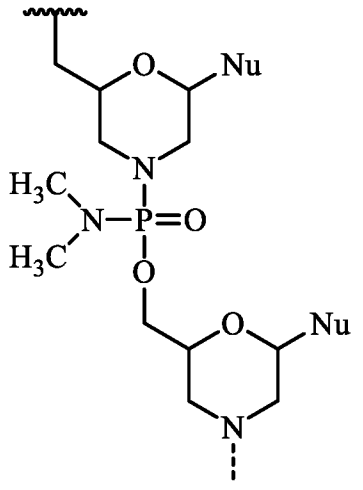
في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، يحتوي الأوليجومر على على الأقل 2 وصلات متجاورة نقية فراغيًا محتوية على فوسفور لها نفس الاتجاه الفراغي (أي من SP أو RP). في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، يحتوي الأوليجومر على على الأقل 3 وصلات متجاورة نقية فراغيًا محتوية على فوسفور لها نفس الاتجاه الفراغي (أي من SP أو RP). في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، يحتوي الأوليجومر على على الأقل 4 وصلات متجاورة نقية فراغيًا محتوية على فوسفور لها نفس الاتجاه الفراغي (أي من SP أو RP). في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، يحتوي الأوليجومر على على الأقل 5 وصلات متجاورة نقية فراغيًا محتوية على فوسفور لها نفس الاتجاه الفراغي (أي من SP أو RP). في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، يحتوي الأوليجومر على على الأقل 6 وصلات متجاورة نقية فراغيًا محتوية على فوسفور لها نفس الاتجاه الفراغي (أي من SP أو RP). في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، يحتوي الأوليجومر على على الأقل 7 وصلات متجاورة نقية فراغيًا

محتوية على فوسفور لها نفس الاتجاه الفراغي (أي من SP أو RP). في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، يحتوي الأوليجومر على على الأقل 8 وصلات متجاورة نقية فراغيًا محتوية على فوسفور لها نفس الاتجاه الفراغي (أي من SP أو RP). في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، يحتوي الأوليجومر على على الأقل 9 وصلات متجاورة نقية فراغيًا محتوية على فوسفور لها نفس الاتجاه الفراغي (أي من SP أو RP). في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، يحتوي الأوليجومر على على الأقل 10 وصلات متجاورة نقية فراغيًا محتوية على فوسفور لها نفس الاتجاه الفراغي (أي من SP أو RP). في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، يحتوي الأوليجومر على على الأقل 11 وصلات متجاورة نقية فراغيًا محتوية على فوسفور لها نفس الاتجاه الفراغي (أي من SP أو RP). في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، يحتوي الأوليجومر على على الأقل 12 وصلات متجاورة نقية فراغيًا محتوية على فوسفور لها نفس الاتجاه الفراغي (أي من SP أو RP). في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، يحتوي الأوليجومر على على الأقل 13 وصلات متجاورة نقية فراغيًا محتوية على فوسفور لها نفس الاتجاه الفراغي (أي من SP أو RP). في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، يحتوي الأوليجومر على على الأقل 14 وصلات متجاورة نقية فراغيًا محتوية على فوسفور لها نفس الاتجاه الفراغي (أي من SP أو RP). في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، يحتوي الأوليجومر على على الأقل 15 وصلات متجاورة نقية فراغيًا محتوية على فوسفور لها نفس الاتجاه الفراغي (أي من SP أو RP). في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، يحتوي الأوليجومر على على الأقل 16 وصلات متجاورة نقية فراغيًا محتوية على فوسفور لها نفس الاتجاه الفراغي (أي من SP أو RP).

في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، يحتوي الأوليجومر على على الأقل 17 وصلات متجاورة نقية فراغيًا محتوية على فوسفور لها نفس الاتجاه الفراغي (أي من SP أو RP). في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، يحتوي الأوليجومر على على الأقل 18 وصلات متجاورة نقية فراغيًا محتوية على فوسفور لها نفس الاتجاه الفراغي (أي من SP أو RP). في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، يحتوي الأوليجومر على على الأقل 19 وصلات متجاورة نقية فراغيًا محتوية على فوسفور لها نفس الاتجاه الفراغي (أي من SP أو RP). في أحد تجسيدات الأوليجومر التي لها وصلات n استقطابية محتوية على فوسفور (حيث تكون n رقمًا صحيحًا يبلغ 1 أو أكبر)، يحتوي الأوليجومر على على الأقل 20 وصلات متجاورة نقية فراغيًا محتوية على فوسفور لها نفس الاتجاه الفراغي (أي من SP أو RP).

9.أوليجومر مورفولينو ات

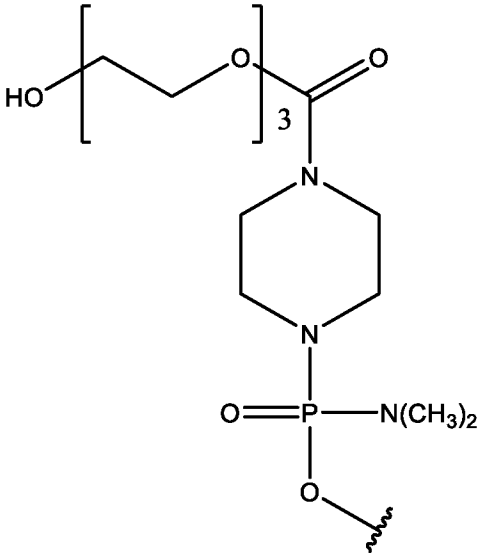
تتعلق التجسيدات النموذجية للكشف بأوليجومر فوسفورو داي أميدات مورفولينو ات له الصيغة البنائية التالية:



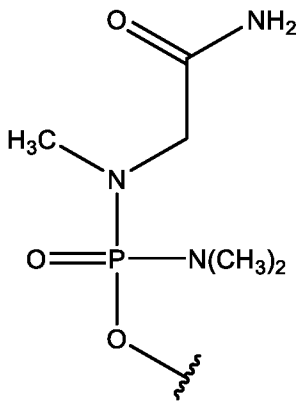
وكما يوصف في الشكل 2 لـ Summerton, J., et al., Antisense & Nucleic Acid Drug Development, 7: 187-195 (1997). يُقصد أن تُغطي مركبات المورفولينو كما

يوصف هنا كل الأيزومرات الفراغية والمماثلات الكيميائية الخاصة بالصيغة البنائية العامة السابقة. يتم ذكر السمات المميزة للتخليق، الصيغ البنائية، والربط الخاصة بالأوليجومرات من المورفولينو بالتفصيل في طلبات براءات الاختراع الأمريكية أرقام 5,698,685، 5,217,866، 5,142,047، 5,034,506، 5,166,315، 5,521,063، 5,506,337، 8,076,476، و8,299,206، التي يتم تضمينها كلها هنا كمراجع.

في تجسيدات معينة، يتم ترافق مورفولينو عند الطرف 5 ’أو الطرف 3 ’من الأوليجومر مع شطر "ذيلي" لزيادة ثباته و/أو قابليته للذوبان. تتضمن الأذناب النموذجية:



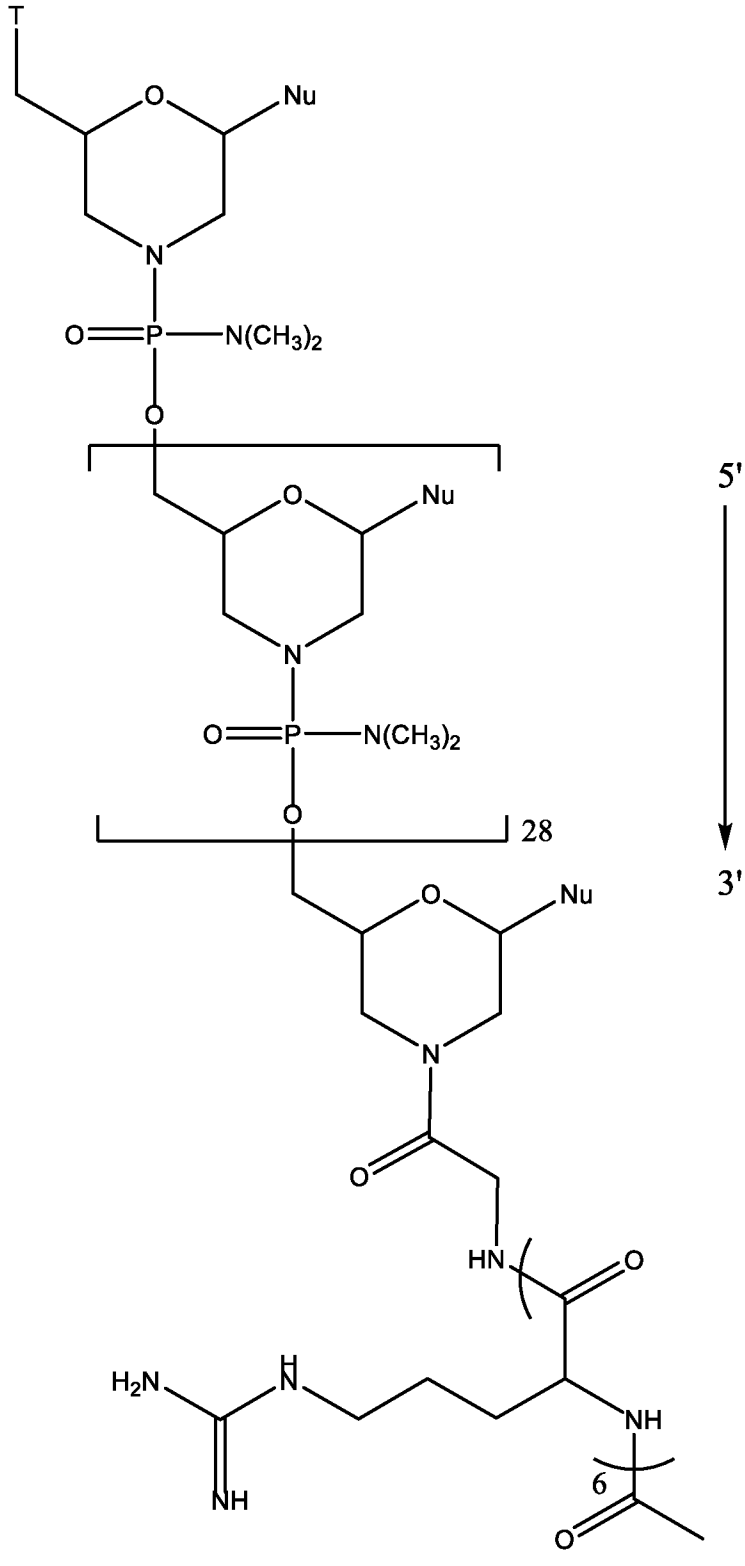
صورة ؛



صورة ؛ و

صورة .

في تجسيدات متنوعة، يكون يكون مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ وفقًا للكشف وفقًا للصيغة (I):



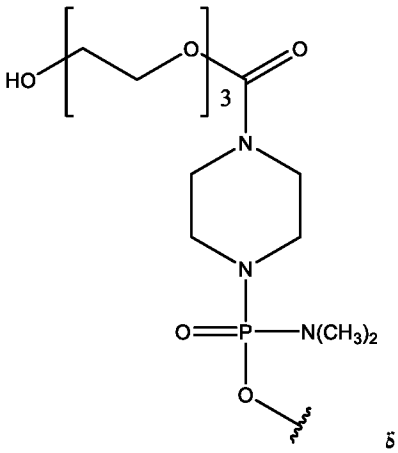
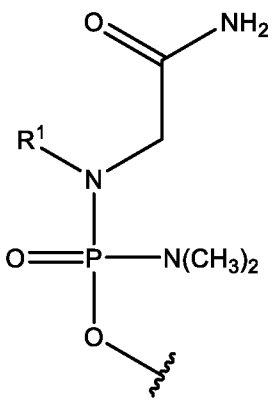
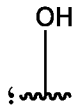
صورة

(I)

أو ملح مقبول صيدليًا منه، حيث:

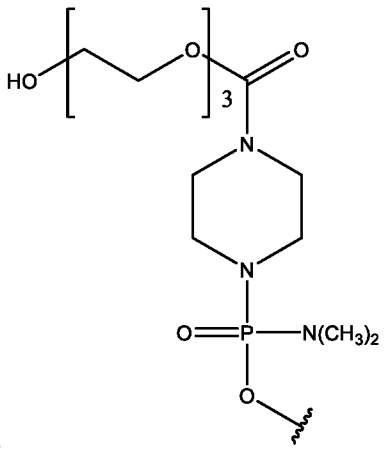
تكون كل Nu عبارةً عن قاعدة نووية يتم أخذها لتكوين متوالية استهداف؛

تكون T عبارةً عن شق يتم اختياره من:

صورة  ؛ صورة  ؛ وصورة  ؛

تكون R1 عبارةً عن C1-C6 ألكيل؛

حيث تكون متوالية الاستهداف متممةً لموقع تلدين الإكسون 51 في ديستروفين mRNA الأولي الذي يُطلق عليه H51A(+66+95).

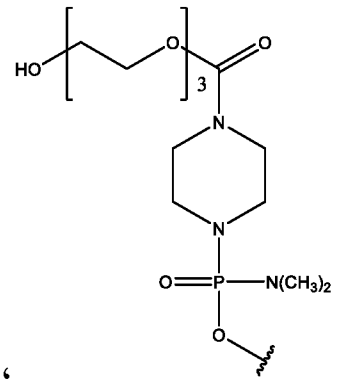
في تجسيدات متنوعة، تكون T عبارةً عن صورة  .

في تجسيدات متنوعة، تكون R1 عبارةً عن ميثيل، CF3، CCl3، CFCl2، CF2Cl، إيثيل، CH2CF3، CF2CF3، بروبيل، أيزو بروبيل، بيوتيل، أيزو بيوتيل، سيك- بيوتيل، T- بيوتيل، بنتيل، أيزو بنتيل، نيو بنتيل، هكسيل، أيزو هكسيل، 3-ميثيل بنتيل، 2، 2-داي ميثيل بيوتيل، أو 2، 3-داي ميثيل بيوتيل.

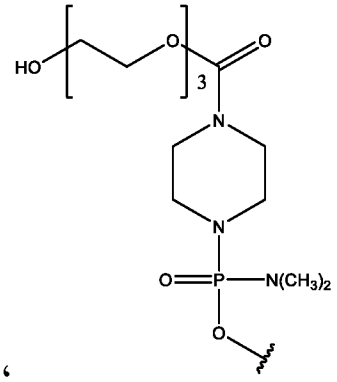
في بعض التجسيدات، يكون مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ له الصيغة (I) عبارةً عن حمض HCl (هيدروكلوريك) أو ملح منه. في تجسيدات معينة، يكون ملح HCl عبارةً عن ملح 6HCl.

في بعض التجسيدات، يتم اختيار كل Nu على حدة من سيتوزين (C)، جوانين (G)، ثايمين (T)، أدينين (A)، 5-ميثيل سيتوزين (5mC)، يوراسيل (U)، وهيبوكسانثين (I).

في بعض التجسيدات، تكون متوالية الاستهداف هي المتوالية رقم:1 (5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG-3')، حيث تكون كل ثايمين (T) عبارةً عن اختياريًا يوراسيل (U).



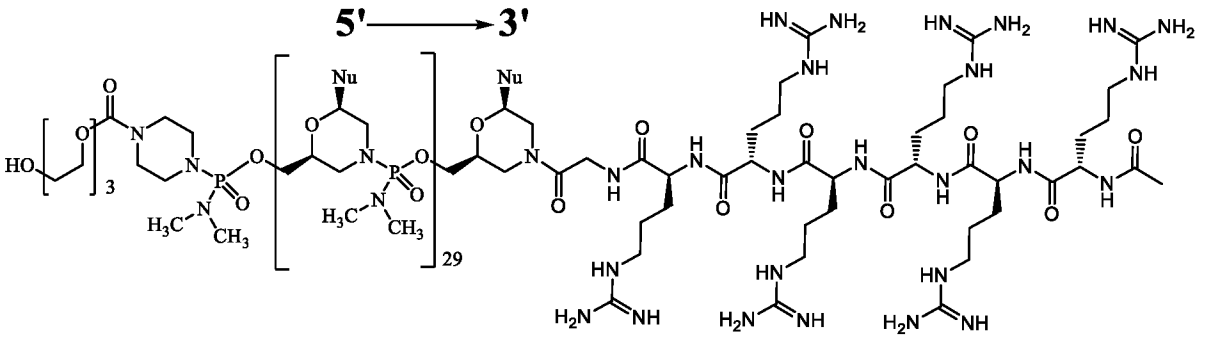
في تجسيدات متنوعة، تكون T عبارةً عن صورة ، وتكون متوالية الاستهداف هي المتوالية رقم:1 (5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG-3')، حيث تكون كل ثايمين (T) عبارةً عن اختياريًا يوراسيل (U).



في تجسيدات متنوعة، تكون T عبارةً عن صورة ، وتكون متوالية الاستهداف هي المتوالية رقم:1 (5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG-3').

في بعض التجسيدات، بما في ذلك، على سبيل المثال، بعض التجسيدات التي لها الصيغة (I)، يكون مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ وفقًا للكشف وفقًا للصيغة (II):

صورة



(II)

أو ملح مقبول صيدليًا منه، حيث:

تكون كل Nu عبارةً عن قاعدة نووية يتم أخذها لتكوين متوالية استهداف متممة لموقع تلدين الإكسون 51 في ديستروفين mRNA الأولي الذي يُطلق عليه H51A(+66+95).

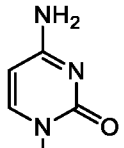
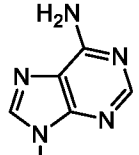
في بعض التجسيدات، يتم اختيار كل Nu على حدة من سيتوزين (C)، جوانين (G)، ثايمين (T)، أدينين (A)، 5-ميثيل سيتوزين (5mC)، يوراسيل (U)، وهيبوكسانثين (I).

في تجسيدات متنوعة، تكون كل Nu من 1 إلى 30 و5' إلى 3' عبارةً عن (المتوالية رقم:1):

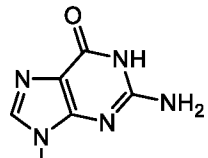
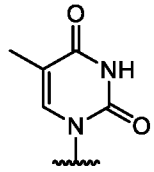
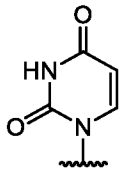
[097]	[098]	[099]	[0101]	[0102]	[0103]	[0104]	[0105]	[0106]	[0107]	[0108]	[0109]
رقم الموضع 5' إلى 3'	Nu	رقم الموضع [0100]	Nu	رقم الموضع 5' إلى 3'	Nu	رقم الموضع 5' إلى 3'	Nu	رقم الموضع 5' إلى 3'	Nu	رقم الموضع 5' إلى 3'	Nu

									5’ إلى 3’		
[0121] X	0120] [26	[0119] G	0118] [21	[0117] A	0116] [16	[0115] A	0114] [11	[0113] A	0112] [6	[0111] C	0110] [1
[0133] C	0132] [27	[0131] C	0130] [22	[0129] G	0128] [17	[0127] A	0126] [12	[0125] C	0124] [7	[0123] X	0122] [2
[0145] X	0144] [28	[0143] A	0142] [23	[0141] A	0140] [18	[0139] G	0138] [13	[0137] A	0136] [8	[0135] C	0134] [3
[0157] A	0156] [29	[0155] X	0154] [24	[0153] X	0152] [19	[0151] G	0150] [14	[0149] X	0148] [9	[0147] C	0146] [4
[016	0168] [	[016	0166] [	[016	0164] [	[016	0162] [	[016	0160] [	[015	0158] [

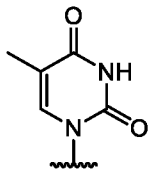
9]		7]		5]		3]		1]		9]	
	30		25		20		15		10		5
G		X		G		A		C		A	

حيث تكون A عبارةً عن صورة ، تكون C عبارةً عن صورة ، تكون G عبارةً

عن صورة ، وتكون X عبارةً عن صورة أو صورة . في

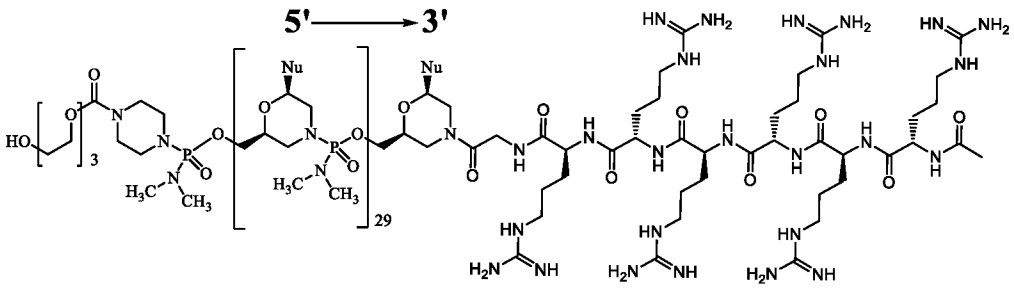


تجسيدات معينة، تكون كل X عبارةً عن صورة على حدة.

في بعض التجسيدات، يكون مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ والذي له الصيغة (II) يكون عبارةً عن حمض HCl (هيدروكلوريك) أو ملح منه. في تجسيدات معينة، يكون ملح HCl عبارةً عن ملح 6HCl.

في بعض التجسيدات، بما في ذلك، على سبيل المثال، بعض التجسيدات التي لها الصيغة (II)، يكون مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ وفقًا للكشف وفقًا للصيغة (IIA):

صورة



.6HCl

(IIA)

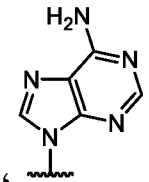
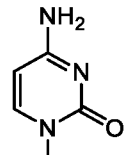
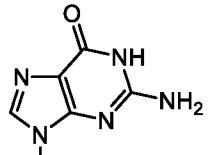
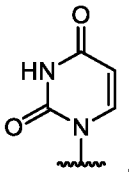
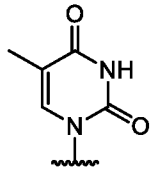
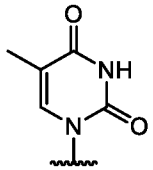
حيث تكون كل Nu عبارةً عن قاعدة نووية يتم أخذها لتكوين متوالية استهداف متممة لموقع تلدين الإكسون 51 في ديستروفين mRNA الأولي الذي يُطلق عليه H51A(+66+95).

في بعض التجسيدات، يتم اختيار كل Nu على حدة من سيتوزين (C)، جوانين (G)، ثايمين (T)، أدينين (A)، 5-ميثيل سيتوزين (5mC)، يوراسيل (U)، وهيبوكسانثين (I).

في تجسيدات متنوعة، تكون كل Nu من 1 إلى 30 و5’ إلى 3’ عبارةً عن (المتوالية رقم:1):

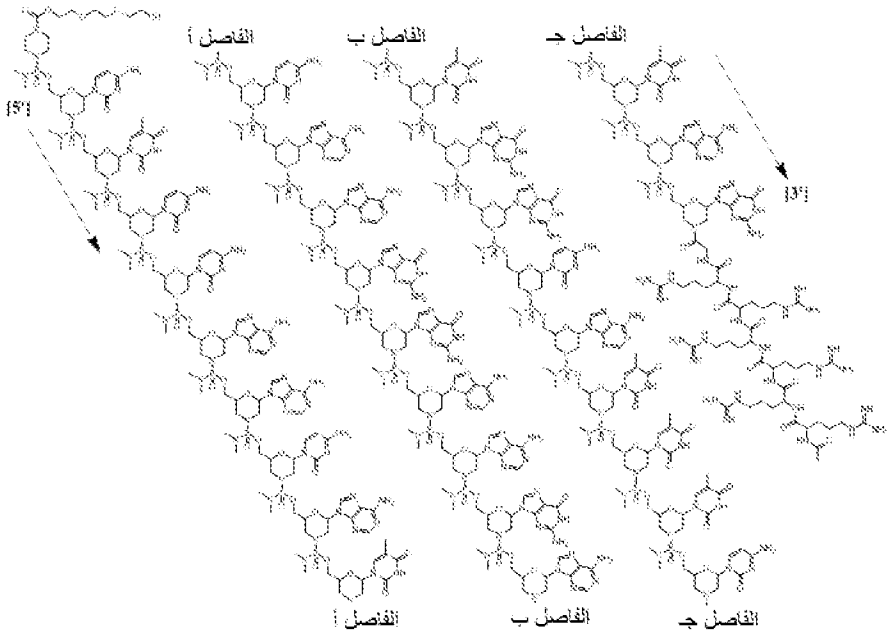
[0170] [رقم الموضع 5’ إلى 3’	[0171] [Nu	[0172] [رقم الموضع 5’ إلى 3’	[0173] [Nu	[0174] [رقم الموضع 5’ إلى 3’	[0175] [Nu	[0176] [رقم الموضع 5’ إلى 3’	[0177] [Nu	[0178] [رقم الموضع 5’ إلى 3’	[0179] [Nu	[0180] [رقم الموضع 5’ إلى 3’	[0181] [Nu
[0182] [1	[0183] [C	[0184] [6	[0185] [A	[0186] [11	[0187] [A	[0188] [16	[0189] [A	[0190] [21	[0191] [G	[0192] [26	[0193] [X
[0194] [2	[0195] [X	[0196] [7	[0197] [C	[0198] [12	[0199] [A	[0200] [17	[0201] [G	[0202] [22	[0203] [C	[0204] [27	[0205] [C

[0217] X	0216] [28	[0215] A	0214] [23	[0213] A	0212] [18	[0211] G	0210] [13	[0209] A	0208] [8	[0207] C	0206] [3
[0229] A	0228] [29	[0227] X	0226] [24	[0225] X	0224] [19	[0223] G	0222] [14	[0221] X	0220] [9	[0219] C	0218] [4
[0241] G	0240] [30	[0239] X	0238] [25	[0237] G	0236] [20	[0235] A	0234] [15	[0233] C	0232] [10	[0231] A	0230] [5

حيث تكون A عبارةً عن صورة  ، تكون C عبارةً عن صورة  ، تكون G عبارةً عن صورة  ، وتكون X عبارةً عن صورة  أو صورة  . في تجسيدات معينة، تكون كل X عبارةً عن صورة  .

في بعض التجسيدات بما في ذلك، على سبيل المثال، تجسيدات مترافقات الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ والتي لها الصيغة (II) والصيغة (IIA)، تكون متوالية الاستهداف هي المتوالية رقم:1 (5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG-3') حيث تكون كل ثايمين (T) عبارةً عن اختياريًا يوراسيل (U). في تجسيدات متنوعة بما في ذلك، على سبيل المثال، تجسيدات مترافقات الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ والتي لها الصيغة (II) والصيغة (IIA)، تكون متوالية الاستهداف هي المتوالية رقم:1 (5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG-3').

في بعض التجسيدات، بما في ذلك، على سبيل المثال، تجسيدات مترافقات الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ والتي لها الصيغة (I)، يكون مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ وفقًا للكشف وفقًا للصيغة (III):



صورة

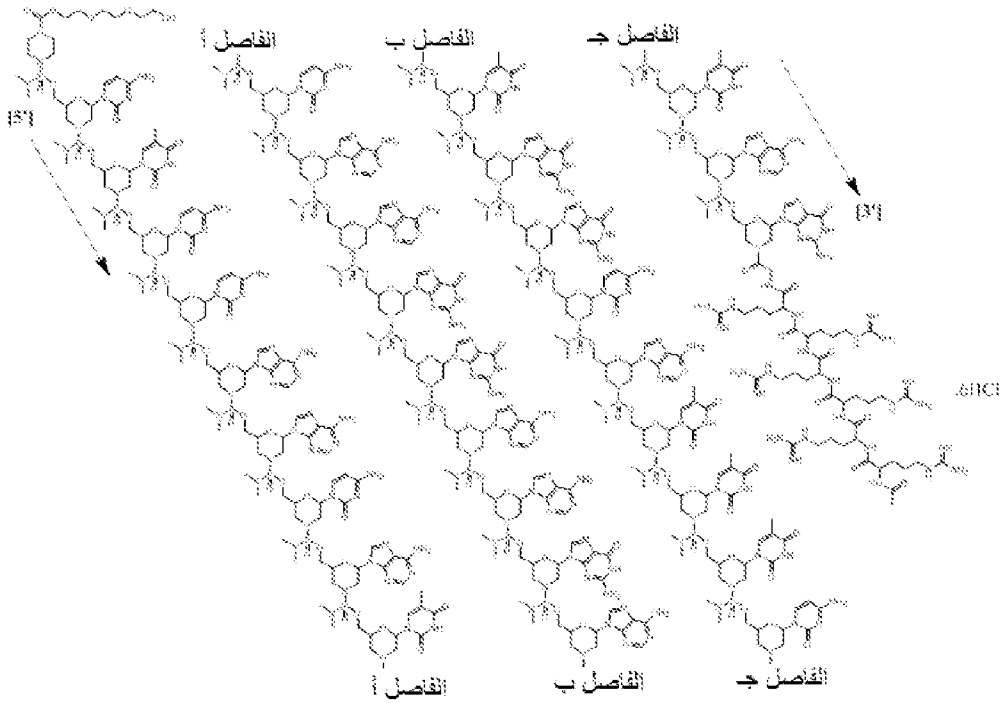
(III)

أو ملح مقبول صيدليًا منه.

في بعض التجسيدات، يكون مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ له الصيغة (III) عبارةً عن HCl (حمض الهيدروكلوريك) أو ملح منه. في تجسيدات معينة، يكون ملح HCl عبارةً عن ملح 6HCl.

في بعض التجسيدات، بما في ذلك، على سبيل المثال، تجسيدات مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ والتي لها الصيغة (III)، يكون مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ وفقًا للكشف وفقًا للصيغة (IIIA):

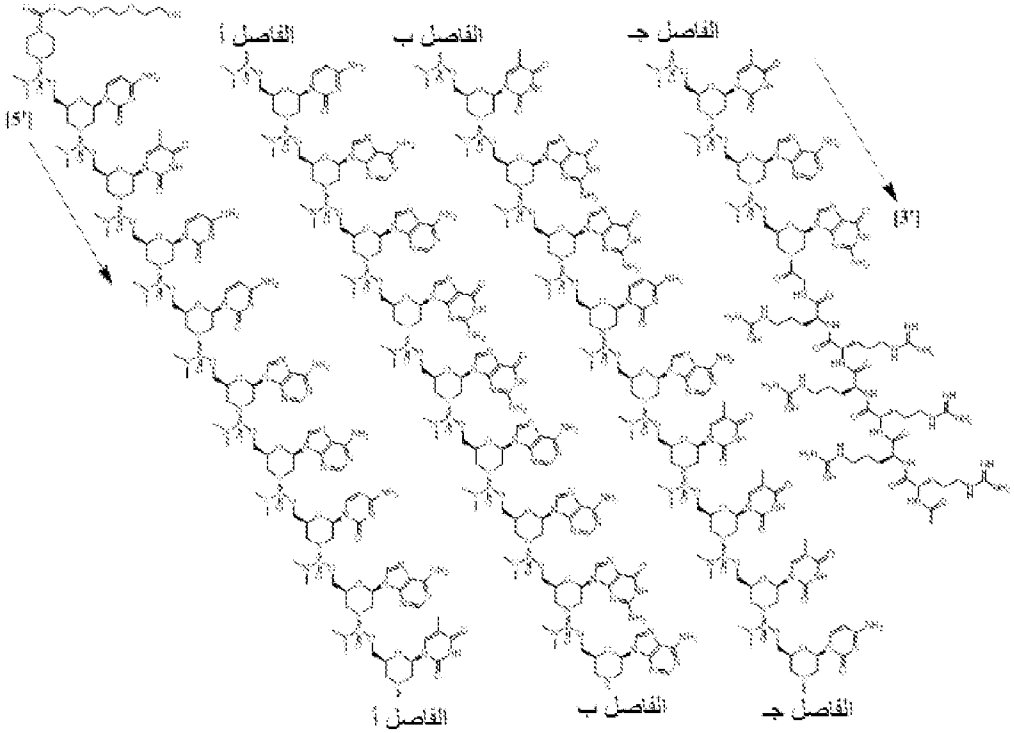
صورة



(IIIA).

في بعض التجسيدات وفقًا للكشف، بما في ذلك بعض تجسيدات مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ والتي لها الصيغة (I) وتجسيدات مترافقات الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ والتي لها الصيغة (III)، يكون مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ وفقًا للصيغة (IV):

صورة



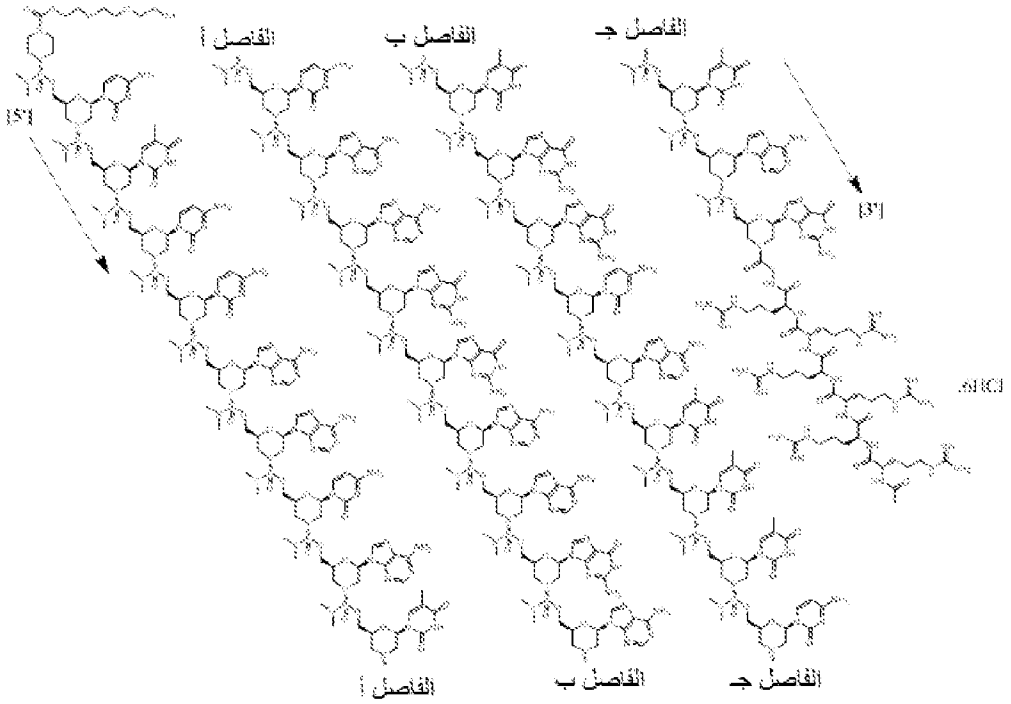
(IV)

أو ملح مقبول صيدليًا منه.

في بعض التجسيدات، يكون مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ له الصيغة (IV) عبارةً عن HCl (حمض الهيدروكلوريك) أو ملح منه. في تجسيدات معينة، يكون ملح HCl عبارةً عن ملح 6HCl.

في بعض التجسيدات، بما في ذلك، على سبيل المثال، تجسيدات مترافقات الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ والتي لها الصيغة (IV)، يكون مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ وفقًا للكشف وفقًا للصيغة (IVA):

صورة



.(IVA)

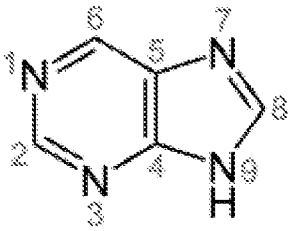
10. تعديلات واستبدالات القاعدة النووية

في تجسيدات معينة، يتم تكوين مترافقات الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ الخاصة بالكشف من قواعد نووية لـ RNA وقواعد نووية لـ DNA (غالبًا ما تتم الإشارة إليها في المجال على نحو مبسط باعتبارها "قاعدة"). تُعرف قواعد RNA على نحو شائع باعتبارها أدنين (A)، يوراسيل (U)، سيتوزين (C) وجوانين (G). تُعرف قواعد DNA على نحو شائع باعتبارها أدنين (A)، ثايمين (T)، سيتوزين (C) وجوانين (G). في تجسيدات متنوعة، تتألف مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ وفقًا للكشف من سيتوزين (C)، جوانين (G)، ثايمين (T)، أدينين (A)، 5-ميثيل سيتوزين (5mC)، يوراسيل (U)، وهيبوكسانثين (I).

في تجسيدات معينة، قد يتم تعديل واحدة أو أكثر من قواعد RNA أو قواعد DNA في أوليجومر أو استبدالها بقاعدة بخلاف قاعدة RNA أو قاعدة DNA. تتضمن الأوليجومرات المحتوية على

قاعدة معدلة أو مستبدلة الأوليجومرات حيث يتم استبدال واحدة أو أكثر من قواعد البيورين أو البيريميدين الموجودة على الأغلب في الأحماض النووية بقواعد أقل شيوعًا أو غير طبيعية.

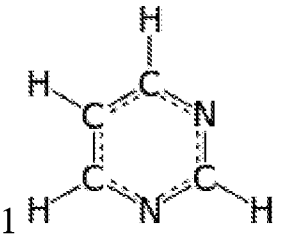
تشتمل القواعد من البيورين على حلقة بيريميدين مدمجة مع حلقة إيميدازول، كما يوصف بواسطة الصيغة العامة التالية:



بيورين

يعتبر الأدنين والجوانين هما اثنين من قواعد البيورين النووية الموجودة على النحو الأكثر شيوعًا في الأحماض النووية. تتضمن مركبات البيورين طبيعية الحدوث الأخرى، دون قصر الأمر على، N6-ميثيل أدنين، N2-ميثيل جوانين، هيبوكسانثين، و7-ميثيل جوانين.

تشتمل القواعد من البيريميدين على حلقة بيريميدين مكونة من ست ذرات كما يوصف بواسطة الصيغة العامة التالية:



بيريميدين

يمثل سيتوزين، يوراسيل، وثايمين قواعد من البيريميدين موجودة على النحو الأكثر شيوعًا في الأحماض النووية. تتضمن مركبات البيريميدين طبيعية الحدوث الأخرى، دون قصر الأمر على، 5-ميثيل سيتوزين، 5-هيدروكسي ميثيل سيتوزين، يوراسيل زائف، و4-ثيو يوراسيل. في أحد التجسيدات، تحتوي الأوليجومرات الموصوفة هنا على قواعد من الثايمين بدلاً من يوراسيل.

تتضمن القواعد الأخرى المناسبة، إلا أنها ليست قاصرة على، 2، 6-داي أمينو بيورين، حمض أوروتيك، أجماتيدين، ليزيدين، 2-ثيو بيريميدين (على سبيل المثال، 2-ثيو يوراسيل، 2-ثيو ثايمين)، G-Clamp ومشتقاتها، 5-بيريميدين به استبدال (على سبيل المثال، 5-هالو يوراسيل، 5-بروبينيل يوراسيل، 5-بروبينيل سيتوزين، 5-أمينو ميثيل يوراسيل، 5-هيدروكسي ميثيل يوراسيل، 5-أمينو ميثيل سيتوزين، 5-هيدروكسي ميثيل سيتوزين، Super T)، 7-دي آزا جوانين، 7-دي آزا أدنين، 7-آزا-2، 6-داي أمينو بيورين، 8-آزا-7-دي آزا جوانين، 8-آزا-7-دي آزا أدنين، 8-آزا-7-دي آزا -2، 6-داي أمينو بيورين، Super G، Super A، و N4-إيثيل سيتوزين، أو مشتقات منها؛ N2-سيكلو بنيل جوانين (cPenT-G)، N2-سيكلو بنيل-2-أمينو بيورين (cPenT-AP)، وN2-بروبيل-2-أمينو بيورين (Pr-AP)، يوراسيل زائف أو مشتقات منها؛ وناتج الانحلال أو القواعد العالمية، مثل 2، 6-داي فلورو تولوين أو القواعد غير الموجودة مثل مواقع عدم القدرة على المشي (على سبيل المثال، 1-ديوكسي ريبوز، 1، 2-داي ديوكسي ريبوز، 1-ديوكسي-2-O-ميثيل ريبوز؛ أو مشتقات بيروليدين حيث قد تم استبدال أكسجين الحلقة بنيتروجين (آزا ريبوز)). يمكن إيجاد الأمثلة على مشتقات Super A، Super G وSuper T في البراءة الأمريكية 6,683, 173 (Epoch Biosciences)، التي يتم تضمينها هنا كمرجع بأكملها. تم إظهار أن cPenT-G، cPenT-AP وPr-AP تُقلل من التأثيرات المحفزة للمناعة عند التضمين في siRNA (Peacock H. et al. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 9200). يعتبر اليوراسيل الزائف نسخة تمت أزمرتها طبيعية الحدوث من يوراسيل، بـ C-جليكوزيد بدلاً من N-جليكوزيد المعتاد كما في يوريدين. قد يكون لليوريدين الزائف المحتوي على mRNA تخليقي مواصفة أمان محسنة مقارنة باليوريدين المحتوي على mPvNA (WO 2009127230، المتضمن هنا بأكمله كمرجع).

هناك قواعد نووية معينة مفيدة بشكل محدد لزيادة ألفة الارتباط الخاصة بمترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ الخاصة بالكشف. وهي تتضمن مركبات 5-بيريميدين به استبدال، مركبات 6-آزا بيريميدين ومركبات N-2، N-6 وO-6 بيورين به استبدال، بما في ذلك 2-أمينو بروبيل أدنين، 5-بروبينيل يوراسيل و5-بروبينيل سيتوزين. لقد تم إظهار أن مجموعات استبدال 5-ميثيل سيتوزين تزيد من ثبات مضاعف الحمض النووي بمقدار 0,6-1,2 درجة مئوية وتعتبر حاليًا

مجموعات استبدال القواعد المفضلة، على نحو أكثر تحديدًا عند الدمج مع مجموعات تعديل السكر 2'-O-ميثوكسي إيثيل. تتضمن القواعد النووية التوضيحية الإضافية المعدلة تلك التي يتم فيها استبدال ذرة هيدروجين واحدة على الأقل من القاعدة النووية بذرة فلور.

11. أملاح مقبولة صيدليًا من مترافقات أوليجومر مضادة لاتجاه النسخ

قد تحتوي تجسيدات معينة خاصة بمترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ والموصوفة بهذه الوثيقة على مجموعة وظيفية قاعدية، مثل أمينو أو ألكيل أمينو، وبالتالي، تكون قادرة على تكوين أملاح مقبولة صيدليًا باستخدام أحماض مقبولة صيدليًا. يشير المصطلح "أملاح مقبولة صيدليًا" في هذا الصدد، إلى أملاح إضافة الحمض العضوي وغير العضوية غير السامة نسبيًا من مترافقات أوليجومر مضادة لاتجاه النسخ والخاصة بالكشف الحالي. يمكن تحضير هذه الأملاح في الموقع في مادة الإعطاء الناقلة أو عملية تصنيع صورة الجرعة، أو عن طريق تفاعل على نحو منفصل مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ منقى خاص بالكشف في صورة القاعدة الحرة منه مع حمض عضوي أو غير عضوي ملائم، وعزل الملح المتكون أثناء عملية التنقية اللاحقة. تتضمن الأملاح التوضيحية أملاح الهيدرو بروميد، هيدرو كلوريد، سلفات، مترافقات أوليجومرات مضادة لاتجاه النسخ لاكتات، توسيلات، سيترات، ماليات، فيومارات، سكسينات، طرطرات، نافثيلات، مسيلات، جلوكو هبتونات، لاكتوبيونات، ولوريل سلفونات وما شابه. (انظر، على سبيل المثال، Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19).

تتضمن الأملاح المقبولة صيدليًا الخاصة بمترافقات أوليجومر مضادة لاتجاه النسخ موضوع الطلب الأملاح غير السامة التقليدية أو أملاح الأمونيوم الرباعية من مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ، على سبيل المثال، من الأحماض العضوية أو غير العضوية غير السامة. على سبيل المثال، تتضمن هذه الأملاح غير السامة التقليدية تلك المشتقة من الأحماض غير العضوية مثل هيدرو كلوريد، هيدرو بروميك، سلفريك، سلفاميك، فوسفوريك، نيتريك، وما شابه؛ والأملاح التي تم تحضيرها من الأحماض العضوية مثل أسيتيك، بروبيونيك، سكسينيك، جليكوليك، ستياريك، لاكتيك، ماليك، طرطريك، سيتريك، أسكوربيك، بالميتيك، ماليك، هيدروكسي ماليك، فنيل أسيتيك،

جلوتاميك، بنزويك، ساليسيليك، سلفانيليك، 2-أسيتوكسي بنزويك، فيوماريك، تولوين سلفونيك، ميثان سلفونيك، إيثان داي سلفونيك، أوكساليك، أيزو ثيونيك، وما شابه.

في تجسيدات معينة، قد تحتوي مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ والخاصة بالكشف الحالي على واحدة أو أكثر من المجموعات الوظيفية الحمضية و، بالتالي، تكون قادرة على تكوين أملاح مقبولة صيدليًا باستخدام قواعد مقبولة صيدليًا. يشير المصطلح "أملاح مقبولة صيدليًا" في هذه الحالات إلى أملاح إضافة القاعدة غير السامة نسبيًا غير العضوية والعضوية من مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ والخاصة بالكشف الحالي. يمكن بالمثل تحضير هذه الأملاح في الموقع في مادة الإعطاء الناقلة أو عملية تصنيع صورة الجرعة، أو عن طريق تفاعل على نحو منفصل مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ والمنقى في صورة الحمض الحر الخاصة به مع قاعدة ملائمة، مثل الهيدروكسيد، الكربونات أو البيكربونات من كاتيون فلز مقبول صيدليًا، مع أمونيا، أو مع أمين رئيسي، ثانوي أو ثلاثي عضوي مقبول صيدليًا. تتضمن الأملاح القلوية أو القلوية الأرضية التوضيحية أملاح الليثيوم، الصوديوم، البوتاسيوم، الكالسيوم، المجنسيوم، والألومينيوم وما شابه. تتضمن مركبات الأمين العضوية التوضيحية المفيدة لتكوين أملاح إضافة القاعدة إيثيل أمين، داي إيثيل أمين، داي إيثيلين داي أمين، إيثانول أمين، داي إيثانول أمين، بيبرازين وما شابه. (انظر، على سبيل المثال، Berge et al.، المذكور فيما سبق).

3- الصيغ وأنماط الإعطاء

في تجسيدات معينة، يوفر الكشف الحالي صيغًا أو تركيبات صيدلية ملائمة للتوصيل العلاجي لمترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ المضادة لاتجاه النسخ، كما يوصف هنا. ومن ثَم، في تجسيدات معينة، يوفر الكشف الحالي تركيبات مقبولة صيدليًا تشتمل على مقدار فعال علاجيًا من واحد أو أكثر من مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ الموصوفة هنا، مصاغًا مع واحدة أو أكثر من المواد الحاملة المقبولة صيدليًا (مواد الإضافة) و/أو المواد المخففة. بينما يكون من الممكن إعطاء مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ خاص بالكشف الحالي بمفرده، يُفضل إعطاء مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ في صورة صيغة صيدلية (تركيبة). في أحد التجسيدات، يكون مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ بالصيغة (III).

يتم وصف طرق توصيل جزيئات الحمض النووي، والتي يمكن تطبيقها على مترافقات الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ وفقًا للكشف الحالي، على سبيل المثال، في Akhtar et al., 1992, Trends Cell Bio., 2:139; Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995, CRC Press; and Sullivan et al., PCT WO 94/02595. يمكن استخدام هذه البروتوكولات وغيرها لتوصيل أي جزيء حمض نووي فعليًا، مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ وفقًا للكشف الحالي.

قد تتم صياغة التركيبات الصيدلية الخاصة بالكشف الحالي بشكل خاص للإعطاء في صورة صلبة أو سائلة، متضمنة تلك المكيفة لما يلي: (1) الإعطاء عن طريق الفم، على سبيل المثال، جرعات (محاليل أو معلقات مائية أو غير مائية)، أقراص، تلك المخصصة للشدق، تحت اللسان، والامتصاص الجهازي، الجرعات الكبيرة، المساحيق، الحبيبات، المعاجين للاستخدام على اللسان؛ (2) الإعطاء بالحقن غير المعوي، على سبيل المثال، بواسطة الحقن تحت الجلد، في العضل، داخل الوريد أو فوق الجافية في صورة، على سبيل المثال، محلول أو معلق معقم، أو صيغة بإطلاق مستديم؛ (3) التطبيق الموضعي، على سبيل المثال، في صورة كريم، مرهم، أو لاصقة بإطلاق متحكم فيه أو إسبراي يتم استخدامه على الجلد؛ (4) مهبليًا أو عبر المستقيم، على سبيل المثال، في صورة فرزجة، كريم أو رغوة؛ (5) تحت اللسان؛ (6) عبر العين؛ (7) عبر الأدمة؛ أو (8) عبر الأنف.

تتضمن بعض الأمثلة الخاصة بالمواد التي يمكنها أن تعمل كمواد حاملة مقبولة صيدليًا، دون تحديد: (1) مواد سكرية، مثل لاكتوز، جلوكوز وسكروز؛ (2) أنواع النشا، مثل نشا الذرة ونشا البطاطس؛ (3) سيليلوز، ومشتقاتها، مثل صوديوم كربوكسي ميثيل سيليلوز، إيثيل سيليلوز وسيليلوز أسيتات؛ (4) صمغ كثيراء في صورة مسحوق؛ (5) الشعير؛ (6) الجيلاتين؛ (7) التالك؛ (8) السواغات، مثل زبدة الكاكاو وأنواع شمع التحاميل؛ (9) زيوت، مثل زيت الفول السوداني، زيت بذر القطن، زيت العُصْفُر، زيت السمسم، زيت الزيتون، زيت الذرة وزيت فول الصويا؛ (10) مركبات جليكول، مثل بروبيلين جليكول؛ (11) مركبات بولي أول، مثل جليسيرين، سوربيتول، مانيتول وبولي إيثيلين جليكول؛ (12) إسترات، مثل إيثيل أوليات وإيثيل لورات؛ (13) آجار؛ (14) عوامل منظمة، مثل مجنسيوم هيدروكسيد وألومينيوم هيدروكسيد؛ (15) حمض ألجينيك؛ (16) ماء

خالي من مولد حمى؛ (17) محلول ملحي متساوي التوتر؛ (18) محلول Ringer؛ (19) كحول إيثيلي؛ (20) محاليل منظمة للرقم الهيدروجيني؛ (21) بولي إسترات، مركبات بولي كربونات و/أو مركبات بولي أنهيدريد؛ و(22) المواد المتوافقة غير السامة الأخرى المستخدمة في الصيغ الصيدلية.

تتضمن الأمثلة غير الحصرية الإضافية على العوامل الملائمة للصياغة مع مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ والخاصة بالكشف الحالي: الأحماض النووية المترافقة مع PEG، الأحماض النووية المترافقة مع الشحم الفوسفوري، الأحماض النووية المحتوية على أشطار آلفة للشحم، مركبات فوسفورو ثيوات، مثبطات P-جليكو بروتين (مثل Pluronic P85) التي يمكنها تعزيز دخول العقاقير في الأنسجة المتنوعة؛ البوليمرات القابلة للتحلل بيولوجيًا، مثل كريات دقيقة من بولي (D,L-لاكتيد-جليكوليد مشترك) للتوصيل بالإطلاق المستديم بعد الغرس (Emerich, D F et al., 1999, Cell Transplant, 8, 47-58 Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.؛ وجسيمات بحجم النانو محملة، مثل تلك المكونة من بولي بيوتيل سيانو أكريلات، التي يمكنها توصيل العقاقير عبر الحائِل الدَّمَوِي الدِّماغِي ويمكنها تغيير آليات الامتصاص الخاصة بالخلايا العصبية (Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999).

يُظهر الكشف أيضًا استخدام التركيبة المشتملة على جسيمات شحمية معدلة السطح محتوية على شحوم من بولي (إيثيلين جليكول) ("PEG") (معدلة بـ PEG، متفرعة وغير متفرعة أو توليفات من ذلك، أو جسيمات شحمية دوّارة طويلة أو جسيمات شحمية انسلالية). يمكن أيضًا أن تشتمل مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ والخاصة بالكشف على جزيئات PEG ملحقة تساهميًا بأوزان جزيئية متنوعة. توفر هذه الصيغ طريقة لزيادة تراكم العقاقير في الأنسجة المستهدفة. تقاوم هذه الفئة من المواد الحاملة للعقاقير الطِهايَة والإزالة بواسطة جُمْلَة البَلْعَمِيَّات والوَحيدات (MPS أو RES)، وبالتالي تسمح بأزمنة دورة دموية أطول وتعرض نسيج محسن للعقار المغلف (Lasic et al. Chem. Rev. 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata et al., Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 1005-1011). لقد تم إظهار أن بعضًا من الجسيمات الشحمية يتراكم انتقائيًا في الأورام، من المفترض عن طريق التَسَرُّب والاحتجاز في الأنسجة المستهدفة حديثة التوعي (Lasic et al., Science 1995, 267, 1275-1276; Oku et al., 1995,

Biochim. Biophys. Acta, 1238, 86-90). تُعزز الجسيمات الشحمية الدوّارة الطويلة من الحركيات الدوائية والحركيات الديناميكية الخاصة بـ DNA وRNA، مقارنة تحديدًا بالجسيمات الشحمية الكاتيونية التقليدية المعروفة بالتراكم في أنسجة MPS (Liu et al., J. Biol. Chem. 1995, 42, 24864-24870; Choi et al.، نشرة الطلب الدولي رقم WO 96/10391؛ Ansell et al.، نشرة الطلب الدولي رقم WO 96/10390؛ Holland et al.، نشرة الطلب الدولي رقم WO 96/10392). من المحتمل أيضًا أن تحمي الجسيمات الشحمية الدوّارة الطويلة العقاقير من تحلل إنزيم نيوكلياز إلى حدٍ أكبر مقارنة بالجسيمات الشحمية الكاتيونية، اعتمادًا على قدرتها على تجنب التراكم في أنسجة MPS العدوانية أيضيًا مثل الكبد والطحال.

في تجسيد إضافي، يتضمن الكشف الحالي أوليجومر تركيبات صيدلية من مترافقات أوليجومرات مضادة لاتجاه النسخ تم تحضيرها للتوصيل كما وصف في طلبات براءات الاختراع الأمريكية أرقام 6,692,911، 7,163,695 و7,070,807. في هذا الصدد، في أحد التجسيدات، يوفر الكشف الحالي مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ خاص بالكشف الحالي في تركيبة مشتملة على بوليمرات مشتركة من ليزين وهيستيدين (HK) (كما وصف في طلبات براءات الاختراع الأمريكية أرقام 7,163,695، 7,070,807، و6,692,911) إما بمفردها أو في توليفة مع PEG (على سبيل المثال، PEG متفرع أو غير متفرع أو خليط من كلاهما)، في توليفة مع PEG وشطر استهداف أو أي مما سبق في توليفة مع عامل مرتبط تبادليًا. في تجسيدات معينة، يوفر الكشف الحالي مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ في تركيبات صيدلية مشتملة على بولي هيستيدين معدل بحمض جلوكونيك أو بولي هيستيدين/ترانسفيرين-بولي ليزين معالج بجلوكونيل. سيدرك أحد ذوي المهارة في المجال أنه قد يتم استبدال الأحماض الأمينية بالخصائص المشابهة لـ His وLys داخل التركيبة.

يمكن أيضًا أن توجد عوامل الترطيب، المستحلبات والمزلقات،)مثل صوديوم لوريل سلفات ومجنسيوم ستيارات)، إضافة إلى العوامل الملونة، عوامل الإطلاق، عوامل التغليف، عوامل التحلية، إكساب النكهة والتعطير، المواد الحافظة ومضادات الأكسدة في التركيبات.

تتضمن الأمثلة على مضادات الأكسدة المقبولة صيدليًا: (1) مضادات الأكسدة القابلة للذوبان في الماء، مثل حمض أسكوربيك، سيستيين هيدرو كلوريد، صوديوم بيسلفات، صوديوم ميتا بيسلفيت،

صوديوم سلفيت وما شابه؛ (2) مضادات الأكسدة القابلة للذوبان في الزيت، مثل أسكوربيل بالميتات، هيدروكسي أنيزول معالج بالبيوتيل (BHA)، هيدروكسي تولوين معالج بالبيوتيل (BHT)، ليستين، بروبيل جالات، ألفا-توكوفيرول، وما شابه؛ و(3) العوامل الخلابية الفلزية، مثل حمض سيتريك، حمض داي إيثيلين داي أمين تترا أسيتيك (EDTA)، سوربيتول، حمض طرطريك، حمض فوسفوريك، وما شابه.

تتضمن الصيغ الخاصة بالكشف الحالي تلك الملائمة للإعطاء عن طريق الفم، الأنف، موضعيًا (بما في ذلك الشدق وتحت اللسان)، المستقيم، المهبل و/أو الإعطاء بالحقن غير المعوي. قد يتم تقديم الصيغ على نحوملائم في صورة وحدة جرعة وقد يتم تحضيرها بواسطة أية طرق معروفة جيدًا في مجال الصيدلة. سيتنوع مقدار المكون الفعال الذي يمكن دمجه مع مادة حاملة لإنتاج صورة جرعة فردية اعتمادًا على الخاضع للعلاج الذي يتم علاجه، نمط الإعطاء المحدد. سيكون مقدار المكون الفعال الذي يمكن دمجه مع مادة حاملة لإنتاج صورة جرعة فردية بصفة عامة هو مقدار المكون الفعال الذي يُنتج تأثيرًا علاجيًا. بصفة عامة، سيتراوح هذا المقدار من حوالي 0,1 بالمائة إلى حوالي تسع وتسعين بالمائة من المكون الفعال، يُفضل من حوالي 5 بالمائة إلى حوالي 70 بالمائة، الأكثر تفضيلاً من حوالي 10 بالمائة إلى حوالي 30 بالمائة.

في تجسيدات معينة، تشتمل صيغة خاصة بالكشف الحالي على سواغ مختار من مركبات سيكلو ديكسترين، مركبات سيليلوز، جسيمات شحمية، عوامل مكونة للمذيلة، على سبيل المثال، الأحماض الصفراوية، والمواد الحاملة البوليمرية، على سبيل المثال، بولي إسترات ومركبات بولي أنهيدريد؛ ومترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ خاص بالكشف الحالي. في أحد التجسيدات، يكون مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ بالصيغة (III). في تجسيدات معينة، تؤدي الصيغة السابقة إلى الحصول على مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ وفقًا للكشف الحالي يكون متاحًا بيولوجيًا عن طريق الفم.

تتضمن طرق تحضير هذه الصيغ أو التركيبات الصيدلية خطوة تضمين مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ وفقًا للكشف الحالي مع المادة الحاملة و، اختياريًا، واحد أو أكثر من المكونات الإضافية. بشكل عام، يتم تحضير الصيغ عن طريق تضمين مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه

النسخ وفقًا للكشف الحالي على نحو منتظم ووثيق مع المواد الحاملة السائلة، أو المواد الحاملة الصلبة المقسمة على نحو دقيق، أو كلاهما، ثم، إذا لزم الأمر، تشكيل المنتج.

قد تكون الصيغ الخاصة بالكشف الملائمة للإعطاء عن طريق الفم في صورة كبسولات، برشام، حبوب، أقراص، أقراص للمص (باستخدام قاعدة ذات نكهة، عادةً ما تكون سكروز وسنط أو صمغ الكثيراء)، مساحيق، حبيبات، أو كمحلول أو معلق في مستحلب سائل مائي أو غير مائي، أو مستحلب سائل زيت في ماء أو ماء في زيت، أو في صورة إكسير أو شراب، أو في صورة أقراص محلاة للمص (باستخدام قاعدة خاملة، مثل الجيلاتين وجليسيرين، أو سكروز والسنط) و/أو في صورة محاليل غسول للفم وما شابه، كل يحتوي على مقدار محدد مسبقًا من مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ وفقًا للكشف الحالي في صورة مكون فعال. قد يتم أيضًا إعطاء مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ وفقًا للكشف الحالي في صورة جرعة كبيرة، لَعوق أو معجون.

في صور الجرعة الصلبة من الكشف للإعطاء عن طريق الفم (كبسولات، أقراص، حبوب، حبوب مسكرة، مساحيق، حبيبات، أقراص استحلاب وما شابه)، قد يتم خلط المكون الفعال مع واحدة أو أكثر من المواد الحاملة المقبولة صيدليًا، مثل صوديوم سيترات أو داي كالسيوم فوسفات، و/أو أي مما يلي: (1) مواد مالئة أو مواد باسطة، مثل أنواع النشا، اللاكتوز، السكروز، الجلوكوز، المانيتول، و/أو حمض سيليسيك؛ (2) عوامل ربط، مثل، على سبيل المثال، كربوكسي ميثيل سيليلوز، مركبات ألجينات، جيلاتين، بولي فينيل بيروليدون، سكروز و/أو سنط؛ (3) مواد مرطبة، مثل جليسرول؛ (4) عوامل تفكيك، مثل آجار-آجار، كالسيوم كربونات، نشا البطاطس أو التابيوكا، حمض ألجينيك، مركبات سيليكات معينة، وصوديوم كربونات؛ (5) عوامل تأخير للمحلول، مثل بارافين؛ (6) عوامل تعجيل الامتصاص، مثل مركبات أمونيوم رباعي وعوامل خافضة للتوتر السطحي، مثل بولوكسامير وصوديوم لوريل سلفات؛ (7) عوامل ترطيب، مثل، على سبيل المثال، كحول سيتيل، جليسرول مونو ستيارات، وعوامل خافضة للتوتر السطحي غير أيونية؛ (8) مواد ماصة، مثل كاولين وطفل بنتونيت؛ (9) مزلقات، مثل التالك، كالسيوم ستيارات، مجنسيوم ستيارات، مركبات بولي إيثيلين جليكول صلبة، صوديوم لوريل سلفات، زنك ستيارات، صوديوم ستيارات، حمض ستياريك، وخلائط من ذلك؛ (10) عوامل ملونة؛ و(11) عوامل بإطلاق متحكم فيه مثل كروس بوفيدون أو إيثيل سيليلوز. في حالة الكبسولات، الأقراص والحبوب، قد

تشتمل التركيبات الصيدلية أيضًا على عوامل منظمة. قد يتم أيضًا استخدام التركيبات الصيدلية الصلبة ذات النوع المشابه في صورة مواد مالئة في كبسولات بغلاف من الجيلاتين اللين والصلب باستخدام هذه السواغات مثل اللاكتوز أو مواد سكر اللبن، إضافة إلى مركبات بولي إيثيلين جليكول ذات الوزن الجزيئي العالي وما شابه.

قد يتم إعداد قرص عن طريق الضغط أو القولبة، اختياريًا باستخدام واحد أو أكثر من المكونات الإضافية. قد يتم تحضير الأقراص المضغوطة باستخدام مادة ربط (على سبيل المثال، جيلاتين أو هيدروكسي بروبيل ميثيل سيليلوز)، مزلق، مادة مخففة خاملة، مادة حافظة، مادة مفككة (على سبيل المثال، صوديوم جليكولات النشا أو صوديوم كربوكسي ميثيل سيليلوز مرتبط تباديليًا)، عامل نشط السطح أو مشتت. قد يتم إعداد أقراص مقولبة عن طريق قولبة خليط من المركب في صورة المسحوق المرطب باستخدام مادة مخففة سائلة خاملة في آلة ملائمة.

قد يتم اختياريًا تحزيز الأقراص، وصور الجرعة الصلبة الأخرى من التركيبات الصيدلية الخاصة بالكشف الحالي، مثل حبوب مسكرة، كبسولات، حبوب والحبيبات، أو تحضيرها باستخدام طلاءات وأغلفة، مثل الأغلفة المعوية والأغلفة الأخرى المعروفة جيدًا في مجال الصياغة الصيدلية. قد تتم أيضًا صياغتها بحيث يتم توفير المكون الفعال ذي الإطلاق البطيء أو المتحكم فيه فيها باستخدام، على سبيل المثال، هيدروكسي بروبيل ميثيل سيليلوز بنسب متغيرة لتوفير مواصفة الإطلاق المطلوبة، قوالب البوليمر الأخرى، الجسيمات الشحمية و/أو الكريات الدقيقة. قد تتم صياغتها للإطلاق السريع، على سبيل المثال، التجفيف بالتجميد. قد يتم تعقيمها بواسطة، على سبيل المثال، الترشيح من خلال مرشح محتجز للبكتيريا، أو عن طريق تضمين عوامل تعقيم في صورة تركيبات صيدلية صلبة معقمة يمكن إذابتها في ماء معقم، أو وسط آخر قابل للحقن معقم قبل الاستخدام مباشرة. قد تحتوي أيضًا هذه التركيبات الصيدلية اختياريًا على عوامل إعتام وقد تكون بتركيبة تُطلق المكون الفعال(المكونات الفعالة) فقط، أو على نحو مميز، في جزء معين من القناة المعدية المعوية، اختياريًا، بطريقة متأخرة. تتضمن الأمثلة على تضمين تركيبات يمكن استخدامها مواد بوليمرية وأنواع شمع. يمكن أيضًا أن يكون المكون الفعال في صورة مغلفة على نحو دقيق، إن كان الأمر ملائمًا، باستخدام واحد أو أكثر من السواغات الموصوفة فيما سبق.

تتضمن صور الجرعة السائلة لإعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ والخاصة بالكشف عن طريق الفم مستحلبات مقبول صيدليًا، مستحلبات دقيقة، محاليل، معلقات، أنواع شراب وأكاسير. بالإضافة إلى المكون الفعال، قد تحتوي صور الجرعة السائلة على مواد مخففة خاملة مستخدمة على نحو شائع في المجال، مثل، على سبيل المثال، الماء أو المذيبات الأخرى، العوامل القابلة للذوبان والمستحلبات، مثل كحول إيثيلي، كحول أيزو بروبيل، إيثيل كربونات، إيثيل أسيتات، كحول بنزيل، بنزيل بنزوات، بروبيلين جليكول، 1، 3-بيوتيلين جليكول، زيوت (بشكل محدد، بذور القطن، المكسرات المجروشة، الذرة، جنين القمح، الزيتون، زيوت الخروع والسمسم)، جليسرول، كحول تترا هيدرو فيوريل، مركبات بولي إيثيلين جليكول وإسترات حمض دهني من سوربيتان، وخلائط من ذلك.

إلى جانب المواد المخففة الخاملة، يمكن أيضًا أن تتضمن التركيبات الصيدلية الفموية مواد مساعدة مثل عوامل ترطيب، عوامل استحلاب وتعليق، عوامل تحلية، إكساب نكهة، تلوين، تعطير وعوامل حافظة.

قد تحتوي المعلقات، بالإضافة إلى المركبات الفعالة، على عوامل تعليق مثل، على سبيل المثال، مركبات كحول أيزو ستياريل معالجة بالإيثوكسيل، بولي أوكسي إيثيلين سوربيتول وسوربيتان إسترات، سيليلوز دقيق التبلّر، ألومينيوم ميتا هيدروكسيد، بنتونيت، آجار-آجار وصمغ الكثيراء، وخلائط من ذلك.

قد يتم تقديم الصيغ للإعطاء عن طريق المستقيم أو المهبل في صورة قمع، قد يتم تحضيره عن طريق خلط واحد أو أكثر من مترافقات الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ والخاصة بالكشف مع واحد أو أكثر من السواغات غير المهيجة الملائمة أو المواد الحاملة المشتملة على، على سبيل المثال، زبدة الكاكاو، بولي إيثيلين جليكول، شمع لقمع أو ساليسيلات، والتي تكون صلبة عند درجة حرارة الغرفة، ولكنها سائلة عند درجة حرارة الجسم و، لهذا، ستنصهر في المستقيم أو تجويف المهبل وتُطلق المركب الفعال.

تتضمن الصيغ أو صور الجرعة لإعطاء أوليجومر موضعيًا أو عبر الأدمة كما يتوفر هنا مساحيق، أنواع إسبراي، مراهم، معاجين، كريمات، أنواع غسول، أنواع هلام، محاليل، رقع لاصقة

ومستنشقات. قد يتم خلط مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ النشطة في ظل ظروف معقمة مع مادة حاملة مقبولة صيدليًا، ومع أية مواد حافظة، محاليل منظمة، أو مواد دفع قد تكون مطلوبة. قد تحتوي المراهم، المعاجين، الكريمات وأنواع الهلام على، بالإضافة إلى مركب فعال خاص بهذا الكشف، سواغات، مثل الدهون الحيوانية والنباتية، الزيوت، أنواع الشمع، البارافينات، النشا، صمغ الكثيراء، مشتقات السيليلوز، مركبات بولي إيثيلين جليكول، مركبات سيليكون، مركبات بنتونيت، حمض سيليسيك، التالك وأكسيد الزنك، أو خلائط من ذلك.

يمكن أن تحتوي المساحيق وأنواع الإسبراي على، بالإضافة إلى مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ خاص بالكشف الحالي، سواغات مثل لاكتوز، تالك، حمض سيليسيك، ألومينيوم هيدروكسيد، مركبات كالسيوم سيليكات ومسحوق بولي أميد، أو خلائط من هذه المواد. يمكن أن تحتوي أنواع الإسبراي بشكل إضافي على مواد الدفع المعتادة، مثل مركبات كلورو فلورو هيدرو كربون ومركبات الهيدرو كربون التي ليس بها استبدال الطيّارة، مثل بيوتان وبروبان.

يكون للرقع اللاصقة عبر الأدمة الفائدة المضافة الخاصة بتوفير توصيل متحكم فيه لمترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ خاص بالكشف الحالي إلى الجسم. يمكن إعداد صور الجرعة هذه عن طريق إذابة أو تشتيت الأوليجومر في الوسط الملائم. يمكن أيضًا استخدام معززات الامتصاص لزيادة دفق العامل عبر الجلد. يمكن التحكم في معدل هذا الدفق إما عن طريق توفير معدل تحكم في الغشاء أو تشتيت العامل في قالب بوليمر أو هلام، من بين الطرق الأخرى المعروفة في المجال.

قد تشتمل التركيبات الصيدلية الملائمة للإعطاء بالحقن غير المعوي على واحد أو أكثر من مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ الخاصة بالكشف في توليفة مع واحد أو أكثر من المحاليل المائية أو غير المائية متساوية التوتر المعقمة المقبولة صيدليًا، المشتتات، المعلقات أو المستحلبات، أو المساحيق المعقمة اليت قد تتم إعادة تكوينها في في محاليل أو مشتتات قابلة للحقن معقمة قبل الاستخدام مباشرة، قد تحتوي على مواد سكرية، مواد كحولية، مضادات أكسدة، محاليل منظمة، مواد كابحة للبكتيريا، مواد مذابة تجعل الصيغة متساوية التوتر مع دم المتلقي المقصود أو عوامل التعليق أو إكساب الثخانة. تتضمن الأمثلة على المواد الحاملة المائية وغير المائية الملائمة التي قد يتم استخدامها في التركيبات الصيدلية الخاصة بالكشف الماء، إيثانول،

مركبات بولي أول (مثل جليسرول، بروبيلين جليكول، بولي إيثيلين جليكول، وما شابه)، وخلائط ملائمة من ذلك، زيوت نباتية، مثل زيت الزيتون، وإسترات عضوية قابلة للحقن، مثل إيثيل أوليات. يمكن الحفاظ على الميوعة الملائمة، على سبيل المثال، عن طريق استخدام مواد مغلفة، مثل ليستين، عن طريق الحفاظ على حجم الجسيم المطلوب في حالة المشتتات، وعن طريق استخدام عوامل خافضة للتوتر السطحي. في أحد التجسيدات، يكون مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ للتركيبة الصيدلية بالصيغة (III).

قد تحتوي أيضًا هذه التركيبات الصيدلية على مواد مساعدة مثل المواد الحافظة، عوامل الترطيب، عوامل الاستحلاب وعوامل التشتيت. قد يتم ضمان منع تأثير الكائنات الحية الدقيقة على مترافقات الأوليجومر موضوع الطلب عن طريق تضمين عوامل مضادة للبكتيريا ومضادة للفطريات متنوعة، على سبيل المثال، بارابين، كلورو بيوتانول، حمض فينول سوربيك، وما شابه. قد يكون من المطلوب أيضًا تضمين عوامل متساوية التوتر، مثل مواد سكرية، صوديوم كلوريد، وما شابه في التركيبات. بالإضافة إلى ذلك، قد يتم تحقيق الامتصاص المطوّل للصورة الصيدلية القابلة للحقن عن طريق تضمين العوامل التي تؤخر الامتصاص مثل ألومينيوم مونو ستيارات والجيلاتين.

في بعض الحالات، من أجل إطالة تأثير عقار، يكون من المطلوب إبطاء امتصاص العقار من الحقن تحت الجلد أو في العضل. قد يتم إتمام هذا عن طريق استخدام معلق سائل من مادة متبلرة أو غير متبلّرة لها قابلية للذوبان في الماء ضعيفة، من بين الطرق الأخرى المعروفة في المجال. بعد ذلك يعتمد معدل امتصاص العقار على معدل ذوبانه الذي، بدوره، قد يعتمد على حجم البلورة والصورة المتبلرة. على نحو بديل، يتم تنفيذ الامتصاص المتأخر لصورة عقار معطاة بطريق الحقن غير المعوي عن طريق إذابة أو تعليق العقار في مادة ناقلة زيتية.

قد يتم إعداد الصور المدخرة القابلة للحقن عن طريق تكوين قوالب تضمين دقيق من مترافقات الأوليجومر موضوع الطلب في بوليمرات قابلة للتحلل بيولوجيًا مثل بولي لاكتيد-بولي جليكوليد. اعتمادًا على نسبة الأوليجومر إلى البوليمر، وطبيعة البوليمر المحدد المستخدم، يمكن التحكم في معدل إطلاق الأوليجومر. تتضمن الأمثلة على البوليمرات الأخرى القابلة للتحلل بيولوجيًا بولي (أورثو إسترات) وبولي (أنهيدريدات). قد يتم أيضًا تحضير الصيغ المدخرة القابلة للحقن عن طريق احتجاز العقار في جسيمات شحمية أو مستحلبات دقيقة تكون متوافقة مع أنسجة الجسم.

عندما يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ والخاصة بالكشف الحالي في صورة مواد صيدلية، إلى الإنسان والحيوانات، يمكن إعطائها في حد ذاتها أو كتركيبة صيدلية تحوي، على سبيل المثال، من 0,1 إلأى 99% (الأفضل، من 10 إلى 30%) من مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ في توليفة مع مادة حاملة مقبولة صيدليًا.

قد يتم إعطاء صيغ أو مستحضرات من الكشف الحالي عن طريق الفم، بطريق الحقن غير المعوي، موضعيًا، أو عبر المستقيم. يتم إعطائها نمطيًا في صور ملائمة لكل طريقة إعطاء. على سبيل المثال، يتم إعطائها في صورة أقراص أو كبسولات، بالحقن، الاستنشاق، غسول للعين، مرهم، قمع، التسريب؛ أو موضعيًا بواسطة غسول أو مرهم؛ وعن طريق المستقيم بواسطة أقماع.

بغض النظر عن طريقة الإعطاء المختارة، قد تتم صياغة مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ الخاصة بالكشف الحالي، التي قد يتم استخدامها في صورة مميأة ملائمة، و/أو التركيبات الصيدلية الخاصة بالكشف الحالي، في صور جرعة مقبولة صيدليًا بواسطة الطرق التقليدية المعروفة لهؤلاء من ذوي المهارة في المجال. قد تتنوع مستويات الجرعة الفعلية من المكونات الفعالة في التركيبات الصيدلية الخاصة بهذا الكشف بحيث يتم الحصول على مقدار من المكون الفعال يكون فعالاً لتحقيق الاستجابة العلاجية المطلوبة لمريض بعينه، تركيبة، ونمط إعطاء، دون أن تكون سامة على نحو غير مقبول للمريض.

سيعتمد مستوى الجرعة المختار على مجموعة متنوعة من العوامل متضمنة نشاط مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ المحدد الخاص بالكشف الحالي المستخدم، أو الإستر، الملح أو الأميد منه، طريقة الإعطاء، توقيت الإعطاء، معدل الإفراز أو أيض الأوليجومر المحدد الذي يتم استخدامه، معدل ومدى الامتصاص، مدة العلاج، العقاقير الأخرى، المركبات و/أو المواد المستخدمة في توليفة مع الأوليجومر المحدد المستخدم، العمر، الجنس، الوزن، الحالة، الصحة العامة والتاريخ الطبي السابق للمريض الذي يتم علاجه، والعوامل المشابهة المعروفة جيدًا في المجالات الطبية.

يمكن لطبيب بشري أو طبيب بيطري يتمتع بمهارة عادية في المجال أن يُحدد بسهولة ويصف المقدار الفعال من التركيبة الصيدلية المطلوب. على سبيل المثال، يمكن أن يبدأ الطبيب البشري أو الطبيب البيطري بجرعات من مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ والخاصة بالكشف

المستخدمة في التركيبة الصيدلية عند مستويات أقل من تلك المطلوبة من أجل تحقيق التأثير العلاجي المطلوب ويزيد تدريجيًا من الجرعة حتى يتم تحقيق التأثير المطلوب. بشكل عام، يتكون جرعة يومية ملائمة من مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ خاص بالكشف هي ذلك المقدار من مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ الذي يمثل الجرعة الأقل الفعالة لإنتاج تأثير علاجي. ستكون هذه الجرعة الفعالة معتمدة بصفة عامة على العوامل الموصوفة بهذه الوثيقة. بصفة عامة، ستتراوح الجرعات الفموية، داخل الوريد، داخل بطين المخ وتحت الجلد من مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ الخاصة بهذا الكشف لمريض، عند الاستخدام للتأثيرات الموضحة، من حوالي 0,0001 إلى حوالي 100 مجم لكل كجم من وزن الجسم في اليوم.

في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ وفقًا للكشف الحالي بجرعات تبلغ عامةً حوالي 10–160 مجم/كجم أو 20–160 مجم/كجم. في بعض الحالات، قد تكون الجرعات التي تتجاوز 160 مجم/كجم ضروريةً. في بعض التجسيدات، تتراوح الجرعات التي تعطى داخل الوريد من حوالي 0.5 مجم إلى 160 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ بجرعات تبلغ حوالي 0.5 مجم/كجم، 1 مجم/كجم، 2 مجم/كجم، 3 مجم/كجم، 4 مجم/كجم، 5 مجم/كجم، 6 مجم/كجم، 7 مجم/كجم، 8 مجم/كجم، 9 مجم/كجم، أو 10 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ بجرعات تبلغ حوالي 10 مجم/كجم، 11 مجم/كجم، 12 مجم/كجم، 15 مجم/كجم، 18 مجم/كجم، 20 مجم/كجم، 21 مجم/كجم، 25 مجم/كجم، 26 مجم/كجم، 27 مجم/كجم، 28 مجم/كجم، 29 مجم/كجم، 30 مجم/كجم، 31 مجم/كجم، 32 مجم/كجم، 33 مجم/كجم، 34 مجم/كجم، 35 مجم/كجم، 36 مجم/كجم، 37 مجم/كجم، 38 مجم/كجم، 39 مجم/كجم، 40 مجم/كجم، 41 مجم/كجم، 42 مجم/كجم، 43 مجم/كجم، 44 مجم/كجم، 45 مجم/كجم، 46 مجم/كجم، 47 مجم/كجم، 48 مجم/كجم، 49 مجم/كجم 50 مجم/كجم، 51 مجم/كجم، 52 مجم/كجم، 53 مجم/كجم، 54 مجم/كجم، 55 مجم/كجم، 56 مجم/كجم، 57 مجم/كجم، 58 مجم/كجم، 59 مجم/كجم، 60 مجم/كجم، 65 مجم/كجم، 70 مجم/كجم، 75 مجم/كجم، 80 مجم/كجم، 85 مجم/كجم، 90 مجم/كجم، 95 مجم/كجم، 100 مجم/كجم، 105 مجم/كجم، 110 مجم/كجم، 115 مجم/كجم، 120 مجم/كجم، 125 مجم/كجم، 130 مجم/كجم، 135 مجم/كجم،

140 مجم/كجم، 145 مجم/كجم، 150 مجم/كجم، 155 مجم/كجم، 160 مجم/كجم، بما في ذلك جميع الأرقام الصحيحة التي بينها. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء الأوليجومر عند 10 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء الأوليجومر عند 20 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء الأوليجومر عند 30 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء الأوليجومر عند 40 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء الأوليجومر عند 60 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء الأوليجومر عند 80 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء الأوليجومر عند 160 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء الأوليجومر عند 50 مجم/كجم.

في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ والذي له الصيغة (III) بجرعات تبلغ عامةً حوالي 10–160 مجم/كجم أو 20–160 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، تتراوح جرعات مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ لها الصيغة (III) للإعطاء داخل الوريد من حوالي 0.5 مجم إلى 160 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ والذي له الصيغة (III) بجرعات تبلغ حوالي 0.5 مجم/كجم، 1 مجم/كجم، 2 مجم/كجم، 3 مجم/كجم، 4 مجم/كجم، 5 مجم/كجم، 6 مجم/كجم، 7 مجم/كجم، 8 مجم/كجم، 9 مجم/كجم، أو 10 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ والذي له الصيغة (III) بجرعات تبلغ حوالي 10 مجم/كجم، 11 مجم/كجم، 12 مجم/كجم، 15 مجم/كجم، 18 مجم/كجم، 20 مجم/كجم، 21 مجم/كجم، 25 مجم/كجم، 26 مجم/كجم، 27 مجم/كجم، 28 مجم/كجم، 29 مجم/كجم، 30 مجم/كجم، 31 مجم/كجم، 32 مجم/كجم، 33 مجم/كجم، 34 مجم/كجم، 35 مجم/كجم، 36 مجم/كجم، 37 مجم/كجم، 38 مجم/كجم، 39 مجم/كجم، 40 مجم/كجم، 41 مجم/كجم، 42 مجم/كجم، 43 مجم/كجم، 44 مجم/كجم، 45 مجم/كجم، 46 مجم/كجم، 47 مجم/كجم، 48 مجم/كجم، 49 مجم/كجم 50 مجم/كجم، 51 مجم/كجم، 52 مجم/كجم، 53 مجم/كجم، 54 مجم/كجم، 55 مجم/كجم، 56 مجم/كجم، 57 مجم/كجم، 58 مجم/كجم، 59 مجم/كجم، 60 مجم/كجم، 65 مجم/كجم، 70 مجم/كجم، 75 مجم/كجم، 80 مجم/كجم، 85 مجم/كجم، 90 مجم/كجم، 95 مجم/كجم، 100 مجم/كجم، 105 مجم/كجم، 110 مجم/كجم، 115 مجم/كجم، 120 مجم/كجم، 125 مجم/كجم، 130 مجم/كجم،

135 مجم/كجم، 140 مجم/كجم، 145 مجم/كجم، 150 مجم/كجم، 155 مجم/كجم، 160 مجم/كجم، بما في ذلك جميع الأرقام الصحيحة التي بينها. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ والذي له الصيغة (III) عند 10 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ والذي له الصيغة (III) عند 20 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ والذي له الصيغة (III) عند 30 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ والذي له الصيغة (III) عند 40 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ والذي له الصيغة (III) عند 60 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ والذي له الصيغة (III) عند 80 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ والذي له الصيغة (III) عند 160 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ والذي له الصيغة (III) عند 50 مجم/كجم.

إن كان مطلوبًا، قد يتم إعطاء الجرعة اليومية الفعالة من المركب الفعال في صورة اثنتين، ثلاث، أربع، خمس، ست أو أكثر من الجرعات الفرعية المعطاة على نحو منفصل عند فواصل ملائمة خلال اليوم، اختياريًا، في صور وحدة جرعة. في مواقف بعينها، تمثل الجرعة مرة إعطاء واحدة في اليوم. في تجسيدات معينة، تمثل الجرعة واحدة أو أكثر من مرات الإعطاء كل 2، 3، 4، 5، 6، 7، 8، 9، 10، 11، 12، 13، 14 يوم، 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 شهر، حسب الحاجة، للحفاظ على التعبير المطلوب عن بروتين ديستروفين وظيفي. في تجسيدات معينة، يتم تحديد الجرعات مرة أو أكثر كل أسبوعين. في بعض التجسيدات، يتم تحديد الجرعات مرة كل أسبوعين. في تجسيدات متنوعة، يتم تحديد الجرعات مرة أو أكثر كل شهر. في تجسيدات معينة، يتم تحديد الجرعات مرة كل شهر.

في تجسيدات متنوعة، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ أسبوعيًا عند 10 مجم/كجم. في تجسيدات متنوعة، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ أسبوعيًا عند 20 مجم/كجم. في تجسيدات متنوعة، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ

أسبوعيًا عند 30 مجم/كجم. في تجسيدات متنوعة، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ أسبوعيًا عند 40 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ أسبوعيًا عند 60 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ أسبوعيًا عند 80 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ أسبوعيًا عند 100 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ أسبوعيًا عند 160 مجم/كجم. على النحو المستخدم بهذه الوثيقة، معنى أسبوعيًا كل أسبوع وفقًا لما هو معروف في المجال.

في تجسيدات متنوعة، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ كل أسبوعين عند 10 مجم/كجم. في تجسيدات متنوعة، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ كل أسبوعين عند 20 مجم/كجم. في تجسيدات متنوعة، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ كل أسبوعين عند 30 مجم/كجم. في تجسيدات متنوعة، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ كل أسبوعين عند 40 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ كل أسبوعين عند 60 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ كل أسبوعين عند 80 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ كل أسبوعين عند 100 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ كل أسبوعين عند 160 مجم/كجم. على النحو المستخدم بهذه الوثيقة، معنى كل أسبوعين وفقًا لما هو معروف في المجال.

في تجسيدات متنوعة، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ كل ثلاثة أسابيع عند 10 مجم/كجم. في تجسيدات متنوعة، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ كل ثلاثة أسابيع عند 20 مجم/كجم. في تجسيدات متنوعة، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ كل ثلاثة أسابيع عند 30 مجم/كجم. في تجسيدات متنوعة، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ كل ثلاثة أسابيع عند 40 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ كل ثلاثة أسابيع عند 60 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ كل ثلاثة أسابيع عند 80

مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ كل ثلاثة أسابيع عند 100 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ كل ثلاثة أسابيع عند 160 مجم/كجم. على النحو المستخدم بهذه الوثيقة، معنى كل ثلاثة أسابيع مرةً كل ثلاثة أسابيع حسبما هو معروف في المجال.

في تجسيدات متنوعة، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ شهريًا عند 10 مجم/كجم. في تجسيدات متنوعة، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ شهريًا عند 20 مجم/كجم. في تجسيدات متنوعة، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ شهريًا عند 30 مجم/كجم. في تجسيدات متنوعة، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ شهريًا عند 40 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ شهريًا عند 60 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ شهريًا عند 80 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ شهريًا عند 100 مجم/كجم. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ شهريًا عند 160 مجم/كجم. على النحو المستخدم بهذه الوثيقة، معنى شهريًا كل شهر حسبما هو معروف في المجال.

حسبما هو مفهوم في المجال، يتم الإعطاء أسبوعيًا، كل أسبوعين، كل ثلاثة أسابيع، أو شهريًا من جرعة أو أكثر أو جرعات مقسمة ورد شرحها بهذه الوثيقة.

يمكن إعطاء جزيئات الحمض النووي ومترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ والموصوفة بهذه الوثيقة للخلايا بواسطة مجموعة متنوعة من الطرق المعروفة لهؤلاء من المتآلفين مع المجال، بما في ذلك، دون تقييد، التغليف في جسيمات شحمية، عن طريق الإرْحَال الأيوني، أو عن طريق التضمين في مواد ناقلة أخرى، مثل أنواع الهلام المائي، مركبات سيكلو ديكسترين، كبسولات بحجم النانو قابلة للتحلل بيولوجيًا، وكريات دقيقة قابلة للالتصاق بيولوجيًا، كما يوصف هنا ومعروف في المجال. في تجسيدات معينة، قد يتم استخدام تقنية الاستحلاب الدقيق لتحسين الإتاحة الحيوية للعوامل الصيدلية الآلفة للشحم (غير القابلة للذوبان في الماء). تتضمن الأمثلة ترايمترين (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 فوائد أخرى، يوفر الاستحلاب الدقيق إتاحة حيوية معززة عن طريق توجيه الامتصاص على نحو مميز إلى الجهاز اللمفاوي بدلاً من الجهاز الدوري، الذي بالتالي يتجاوز الكبد، ويمنع تلف المركبات في الدورة الكَبِدِيَّة الصَّفْراوِيَّة.

في أحد جوانب الكشف، تحتوي الصيغ على مذيلات متكونة من أوليجومر كما يتوفر هنا ومادة حاملة مزدوجة الألفة واحدة على الأقل، حيث يكون للمذيلات متوسط قطر يبلغ أقل من حوالي 100 نانو متر. توفر التجسيدات الأكثر تفضيلاً مذيلات لها متوسط قطر أقل من حوالي 50 نانو متر، وتوفر التجسيدات الأكثر تفضيلاً أيضًا مذيلات لها متوسط قطر أقل من حوالي 30 نانو متر، أو حتى أقل من حوالي 20 نانو متر.

بينما تتم دراسة كل المواد الحاملة مزدوجة الألفة الملائمة، تكون المواد الحاملة المفضلة حاليًا بصفة عامة هي تلك التي لها بصفة عامة حالة Generally-Recognized-as-Safe (GRAS)، والتي يمكن أن تذيب مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ والخاص بالكشف الحالي وتُجري استحلابًا دقيقًا له عند مرحلة لاحقة عندما يتلامس المحلول مع طور ماء معقد (مثل طور موجود في القناة المعدية المعوية البشرية). عادةً، يكون للمكونات مزدوجة الألفة التي تفي بهذه المتطلبات قيم HLB (توازن ألفة للماء إلى ألفة للشحم) تبلغ 2-20، وتحتوي الهياكل الخاصة بها على شقوق أليفاتية بسلسلة مستقيمة في النطاق البالغ من C-6 إلى C-20. تتضمن الأمثلة مركبات جليسيريد دهنية معالجة ببولي إيثيلين-جليكول ومركبات بولي إيثيلين جليكول.

تتضمن الأمثلة على المواد الحاملة مزدوجة الألفة مركبات جليسيريد دهنية معالجة ببولي إيثيلين جليكول مشبعة أو أحادية غير مشبعة، مثل تلك التي تم الحصول عليها من الزيوت النباتية المتنوعة المهدرجة بشكل كلي أو جزئي. قد تتكون هذه الزيوت على نحو مفيد من مركبات جليسيريد لحمض تراي-، داي-، وإسترات مونو- دهني وداي- ومونو-بولي (إيثيلين جليكول) من الأحماض الدهنية المناظرة، مع تفضيل تحديدًا تركيبة حمض دهني متضمنة حمض كابريك 4-10%، حمض كابريك 3-9%، حمض لوريك 40-50%، حمض ميريستيك 14-24%، حمض بالميتيك 4-14% وحمض ستياريك 5-15%. تتضمن فئة أخرى مفيدة من المواد الحاملة مزدوجة الألفة سوربيتان و/أو سوربيتول تمت أسترته جزئيًا، باستخدام أحماض دهنية مشبعة أو أحادية غير مشبعة (سلسلة SPAN) أو نظائر معالجة بإيثوكسيل مناظرة (سلسلة TWEEN).

قد تكون المواد الحاملة مزدوجة الألفة المتاحة تجاريًا مفيدة تحديدًا، متضمنة سلسلة Gelucire، Labrafil، Labrasol، أو Lauroglycol (المصنعة والموزعة كلها بواسطة Gattefosse Corporation, Saint Priest, France)، PEG-مونو-أوليات، PEG-داي-أوليات، PEG-مونو-لورات وداي-لورات، ليستين، بولي سوربات 80، إلى غير ذلك (المنتجة والموزعة بواسطة عدد من الشركات في الولايات المتحدة الأمريكية وفي كل أنحاء العالم).

في تجسيدات معينة، قد يحدث التوصيل عن طريق استخدام جسيمات شحمية، كبسولات بحجم النانو، جسيمات دقيقة، كريات دقيقة، جسيمات شحمية، حويصلات، وما شابه، لإدخال التركيبات الصيدلية الخاصة بالكشف الحالي في خلايا العائل الملائمة. بشكل محدد، قد تتم صياغة التركيبات الصيدلية الخاصة بالكشف الحالي للتوصيل إما مغلفة في جسيم دهني، جسيم شحمي، حويصلة، كرية بحجم النانو، جسيم بحجم النانو أو ما شابه. قد يتم إجراء صياغة واستخدام المواد الناقلة المستخدمة للنقل هذه باستخدام التقنيات المعروفة والتقليدية.

تعتبر البوليمرات الآلفة للماء الملائمة للاستخدام في الكشف الحالي هي تلك التي تكون قابلة للذوبان في الماء بسهولة، يمكن إلحاقها تساهميًا بشحم مكون لحويصلة، وتكون محتملة في جسم الكائن الحي بدون تأثيرات سامة (أي، تكون متوافقة بيولوجيًا). تتضمن البوليمرات الملائمة بولي (إيثيلين جليكول) (PEG)، بولي لاكتيك (يُطلق عليه أيضًا بولي لاكتيد)، حمض بولي جليكوليك (يُطلق عليه أيضًا بولي جليكوليد)، بوليمر مشترك من حمض بولي لاكتيك-بولي جليكوليك، وكحول بولي فينيل. في تجسيدات معينة، يكون للبوليمرات متوسط وزن جزيئي يبلغ من حوالي 100 أو 120 دالتون حتى حوالي 5,000 أو 10,000 دالتون، أو من حوالي 300 دالتون إلى حوالي 5,000 دالتون. في تجسيدات أخرى، يكون البوليمر هو بولي (إيثيلين جليكول) له وزن جزيئي متوسط يبلغ من حوالي 100 إلى حوالي 5,000 دالتون، أو له وزن جزيئي يبلغ من حوالي 300 إلى حوالي 5,000 دالتون. في تجسيدات معينة، يكون البوليمر هو بولي (إيثيلين جليكول) له وزن جزيئي متوسط يبلغ حوالي 750 دالتون (على سبيل المثال (PEG(750). قد يتم تحديد البوليمرات أيضًا بواسطة عدد المونومرات فيها؛ يستخدم تجسيد مفضل خاص بالكشف الحالي بوليمرات من حوالي ثلاث مونومرات على الأقل، مثل بوليمرات PEG المتكونة من ثلاث مونومرات (يبلغ وزنها الجزيئي المتوسط تقريبًا 132 دالتون).

تتضمن البوليمرات الأخرى الآلفة للماء التي قد تكون ملائمة للاستخدام في الكشف الحالي بولي فينيل بيروليدون، بولي ميثوكسازولين، بولي إيثيل أوكسازولين، بولي هيدروكسي بروبيل ميثاكريلاميد، بولي ميثاكريلاميد، بولي داي ميثيل أكريلاميد، ومركبات سيليلوز مشتقة مثل هيدروكسي ميثيل سيليلوز أو هيدروكسي إيثيل سيليلوز.

في تجسيدات معينة، تشتمل صيغة خاصة بالكشف الحالي على بوليمر متوافق بيولوجيًا مختار من المجموعة المكونة من مركبات بولي أميد، مركبات بولي كربونات، مركبات بولي ألكيلين، بوليمرات من أكريليك وميثاكريليك إسترات، بوليمرات بولي فينيل، مركبات بولي جليكوليد، مركبات بولي سيلوكسان، مركبات بولي يوريثان وبوليمرات مشتركة منها، مركبات سيليلوز، بولي بروبيلين، مركبات بولي إيثيلين، بولي ستايرين، بوليمرات من حمض لاكتيك وحمض جليكوليك، مركبات بولي أنهيدريد، بولي (أورثو)إسترات، بولي (حمض بيوتيك)، بولي (حمض فاليريك)، بولي (لاكتيد-كابرولاكتون مشترك)، مركبات بولي سكاريد، بروتينات، أحماض بولي هيالورونيك، مركبات بولي سيانو أكريلات، ومزائج، خلائط، أو بوليمرات مشتركة منها.

تكون مركبات سيكلو ديكسترين عبارة عن مركبات أوليجو سكاريد حلقية، تتكون من 6، 7 أو 8 وحدات جلوكوز، يتم التدليل عليها بواسطة الحرف اليوناني α، β، أو γ، على التوالي. يتم ربط وحدات الجلوكوز بواسطة روابط α-1، 4-جلوكوزيديك. كتسلسل من هيئة المقعد الخاصة بوحدات السكر، يتم وضع كل مجموعات الهيدروكسيل الثانوية (عند C-2، C-3) على جانب واحد من الحلقة، بينما يتم وضع كل مجموعات الهيدروكسيل الرئيسية عند C-6 على الجانب الآخر. كنتيجة، تكون الأسطح الخارجية آلفة للماء، مما يجعل مركبات سيكلو ديكسترين قابلة للذوبان في الماء. على النقيض، تكون التجاويف الخاصة بمركبات سيكلو ديكسترين غير آلفة للماء، حيث إنها تكون مرتبطة بواسطة الهيدروجين الخاص بذرات C-3 وC-5، وبواسطة ذرات أكسجين تشبه الإيثر. تسمح هذه القوالب بالتعقيد باستخدام مجموعة متنوعة من المركبات غير الآلفة للماء نسبيًا، متضمنة، على سبيل المثال، المركبات الستيرويدية مثل α17-إيستراديُول (انظر، على سبيل المثال، van Uden et al. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 38:1-3-113 (1994)). يحدث التعقيد بواسطة تفاعلات Van der Waals وعن طريق تكوين رابطة هيدروجين.

لاستعراض عام لكيمياء مركبات سيكلو ديكسترين، انظر، Wenz Wenz, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 33:803-822 (1994).

تعتمد الخصائص الفيزيائية-الكيميائية لمشتقات السيكلو ديكسترين بقوة على نوع ودرجة الاستبدال. على سبيل المثال، قابليتها للذوبان في نطاقات الماء من غير قابلة للذوبان (على سبيل المثال، تراي أسيتيل-بيتا -سيكلو ديكسترين) إلى قابلة للذوبان بنسبة 147% (وزن/حجم) (G-2-بيتا-سيكلو ديكسترين). بالإضافة إلى ذلك، فإنها تكون قابلة للذوبان في العديد من المذيبات العضوية. تسمح خصائص مركبات السيكلو ديكسترين بالتحكم في القابلية للذوبان الخاصة بمكونات الصيغة المتنوعة عن طريق زيادة أو تقليل قابليتها للذوبان.

لقد تم وصف العديد من مركبات سيكلو ديكسترين وطرق لتحضيرها. على سبيل المثال، وصف Parmeter (I), et al. (ابراءة الاختراع الأمريكية رقم 3,453,259) و Gramera, et al.(براءة الاختراع الأمريكية رقم 3,459,731) مركبات سيكلو ديكسترين كهروطبيعية. تتضمن المشتقات الأخرى مركبات سيكلو ديكسترين ذات الخصائص الكاتيونية [Parmeter (II)، براءة الاختراع الأمريكية رقم 3,453,257]، مركبات سيكلو ديكسترين المرتبطة تبادليًا غير القابلة للذوبان (Solms، براءة الاختراع الأمريكية رقم 3,420,788)، ومركبات سيكلو ديكسترين ذات الخصائص الأنيونية [Parmeter (III)، براءة الاختراع الأمريكية رقم 3,426,011]. من بين مشتقات السيكلو ديكسترين ذات الخصائص الأنيونية، الأحماض الكربوكسيلية، أحماض الفسوفور، أحماض الفوسفين، أحماض فوسفونيك، أحماض فوسفوريك، أحماض ثيو فوسفونيك، أحماض ثيو سلفينيك، وأحماض سلفونيك قد تم إلحاقها بالسيكلو ديكسترين الرئيسي [انظر، Parmeter (III)، فيما سبق]. علاوة على ذلك، فقد تم وصف مشتقات سلفو ألكيل إيثر سيكلو ديكسترين بواسطة Stella, et al. (براءة الاختراع الأمريكية رقم 5,134,127).

تتكون الجسيمات الشحمية من غشاء شحمي ثنائي الطبقات واحد على الأقل يُغلف حجيرة داخلية مائية. قد يتم تمييز الجسيمات الشحمية بنوع الغشاء وبالحجم. تشتمل حويصلات صغيرة أحادية الصفائح (SUVs) على غشاء فردي ونمطيًا بقطر يتراوح فيما بين 0,02 و0,05 ميكرو متر؛ تكون الحويصلات الكبيرة أحادية الصفائح (LUVS) أكبر نمطيًا من 0,05 ميكرو متر. تشتمل الحويصلات الكبيرة قليلة الصفائح والحويصلات متعددة الصفائح على طبقات غشاء متعددة، عادةً

ما تكون متحدة المركز وتكون نمطيًا أكبر من 0,1 ميكرو متر. يُطلق على الجسيمات الشحمية ذات الأغشية المتعددة غير متحدة المركز، أي، الحويصلات الأصغر المتعددة المتضمنة في حوصيلة أكبر، مسمى حويصلات متعددة الحويصلات.

يتعلق أحد جوانب الكشف الحالي بالصيغ المشتملة على الجسيمات الشحمية المحتوية على مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ خاص بالكشف الحالي، حيث تتم صياغة غشاء الجسيم الشحمي لتوفير جسيم شحمي بسعة حمل متزايدة. على نحو بديل أو بالإضافة إلى ذلك، قد يتم تضمين مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ والخاص بالكشف الحالي في، أو امتزازه على، الطبقة الثنائية للجسيم الشحمي الخاصة بالجسيم الشحمي. قد يتكتل مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ خاص بالكشف الحالي مع عامل خافض للتوتر السطحي شحمي ويتم حمله داخل الحيز الداخلي للجسيم الشحمي؛ في هذه الحالات، تتم صياغة غشاء الجسيم الشحمي لمقاومة التأثيرات التمزيقية الخاصة بتكتل العامل الفعال–العامل الخافض للتوتر السطحي.

وفقًا لأحد تجسيدات الكشف الحالي، تحتوي الطبقة الثنائية للجسيم الشحمي الخاصة بجسيم شحمي على شحوم مشتقة باستخدام بولي (إيثيلين جليكول) (PEG)، بحيث تمتد سلاسل PEG من السطح الداخلي للطبقة الثنائية للجسيم الشحمي إلى الحيز الداخلي المغلف بواسطة الجسيم الشحمي، وتمتد من الجزء الخارجي للطبقة الثنائية للجسيم الشحمي إلى البيئة المحيطة.

تكون العوامل الفعالة المتضمنة داخل الجسيمات الشحمية الخاصة بالكشف الحالي في صورة مذابة. قد يتم احتجاز تكتلات من العامل الخافض للتوتر السطحي والعامل الفعال (مثل المستحلبات أو المذيلات المحتوية على العامل الفعال محل الاهتمام) داخل الحيز الداخلي من الجسيمات الشحمية وفقًا للكشف الحالي. يعمل عامل خافض للتوتر السطحي لتشتيت وإذابة العامل الفعال، وقد يتم اختياره من أي عامل خافض للتوتر السطحي أليفاتي، أليفاتي حلقي أو عطري ملائم، بما في ذلك دون قصر الأمر على مركبات ليزوفوسفاتيديل كولين متوافقة بيولوجيًا (LPGs) بأطوال سلسلة متنوعة (على سبيل المثال، من حوالي C14 إلى حوالي C20). قد يتم استخدام شحوم مشتقة من البوليمر مثل شحوم PEG لتكوين مُذَيلَة إذ أنها ستعمل لتثبيط اندماج المذيلة/الغشاء، وحيث إن إضافة بوليمر إلى العامل الخافض للتوتر السطحي جزيئات تُقلل من CMC الخاص بالعامل الخافض للتوتر السطحي وتساعد في تكوين المُذَيلَة. يتم تفضيل عوامل

خافضة للتوتر السطحي لها CMOs في نطاق الميكرو مولار؛ قد يتم استخدام عوامل خافضة للتوتر السطحي بـ CMC أعلى لتحضير مذيلات محتجزة داخل الجسيمات الشحمية الخاصة بالكشف الحالي.

قد يتم تحضير الجسيمات الشحمية وفقًا للكشف الحالي بواسطة أي من مجموعة متنوعة من التقنيات المعروفة في المجال. انظر، على سبيل المثال، براءة الاختراع الأمريكية رقم 4,235,871؛ طلبات الطلب الدولي المنشورة WO 96/14057؛ 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، قد يتم تحضير الجسيمات الشحمية الخاصة بالكشف الحالي عن طريق نشر شحم مشتق باستخدام بوليمر آلف للماء في جسيمات شحمية مشكلة مسبقًا، مثل عن طريق تعريض جسيمات شحمية مشكلة مسبقًا إلى مذيلات مكونة من بوليمرات مطعمة بالشحم، بتركيزات شحم تناظر النسبة المئوية بالمول النهائية للشحم المشتق الذي يكون مطلوبًا في الجسيم الشحمي. يمكن أيضًا تكوين الجسيمات الشحمية المحتوية على بوليمر آلف للماء عن طريق التجانس، تميه مجال الشحم، أو تقنيات البثق، كما يُعرف في المجال.

في إجراء صياغة توضيحي آخر، يتم أولاً تشتيت العامل الفعال بواسطة المعالجة بالموجات الصوتية في ليزوفوسفاتيديل كولين أو عامل خافض للتوتر السطحي آخر منخفض CMC (بما في ذلك الشحوم المطعمة ببوليمر) يذيب بالفعل الجزيئات غير الآلفة للماء. يتم بعد ذلك استخدام المعلق الناتج من المذيلات الخاص بالعامل الفعال لإعادة تميه عينة شحم مجففة تحتوي على نسبة مئوية بالمول ملائمة من شحم مطعم ببوليمر، أو كوليسترول. ثم يتم تشكيل المعلق من الشحم والعامل الفعال في جسيمات شحمية باستخدام تقنيات البثق كما يُعرف في المجال، والجسيمات الشحمية الناتجة المفصولة عن المحلول غير الممحفظ عن طريق فصل العمود القياسي.

في أحد جوانب الكشف الحالي، يتم تحضير الجسيمات الشحمية ليكون لها أحجام متجانسة إلى حدٍ كبير في نطاق حجم مختار. تنطوي إحدى طرق تشكيل الحجم الفعالة على بثق معلق مائي من

الجسيمات الشحمية خلال سلسلة من أغشية البولي كربونات التي لها حجم مسام منتظم مختار؛ سيناظر حجم المسام الخاص بالغشاء بالتقريب أحجام الجسيمات الشحمية الأكبر المنتجة عن طريق البثق من خلال ذلك الغشاء. انظر على سبيل المثال، براءة الاختراع الأمريكية رقم 4,737,323 (12 أبريل، 1988). في تجسيدات معينة، قد يتم استخدام مواد كاشفة مثل DharmaFECT® و®Lipofectamine لإدخال البولي نوكليوتيدات أو البروتينات في الخلايا.

تعتمد السمات المميزة للإطلاق لصيغة خاصة بالكشف الحالي على المادة الممحفظة، تركيز العقار الممحفظ، ووجود عوامل معدلة للإطلاق. على سبيل المثال، يمكن معالجة الإطلاق ليكون معتمدًا على الرقم الهيدروجيني، على سبيل المثال، باستخدام غلاف حساس للرقم الهيدروجيني يُطلق فقط عند رقم هيدروجيني منخفض، كما في المعدة، أو رقم هيدروجيني أعلى، كما في الأمعاء. يمكن استخدام غلاف معوي لمنع حدوث الإطلاق حتى بعد المرور خلال المعدة. يمكن استخدام أغلفة أو خلائط متعددة من سياناميد ممحفظة في مواد مختلفة للحصول على إطلاق أولي في المعدة، متبوعًا بإطلاق لاحق في الأمعاء. يمكن معالجة الإطلاق أيضًا عن طريق تضمين أملاح أو عوامل مكونة للمسام، يمكنها زيادة امتصاص الماء أو إطلاق العقار عن طريق الانتشار من الكبسولة. يمكن أيضًا استخدام السواغات التي تُعدل القابلية للذوبان الخاصة بالعقار للتحكم في معدل الإطلاق. يمكن أيضًا تضمين العوامل التي تعزز من انحلال القالب أو الإطلاق من القالب. يمكن إضافتها إلى العقار، إضافتها في صورة طور منفصل (أي، في صورة جسيمات دقائقية)، أو يمكن إذابتها على نحو مشترك في طور البوليمر اعتمادًا على المركب. في غالبية الحالات ينبغي أن يبلغ المقدار فيما بين 0,1 وثلاثين بالمائة (وزن/وزن من البوليمر). تتضمن أنواع العوامل المعززة للانحلال الأملاح غير العضوية مثل أمونيوم سلفات وأمونيوم كلوريد، الأحماض العضوية مثل حمض سيتريك، حمض بنزويك، وحمض أسكوربيك، القواعد غير العضوية مثل صوديوم كربونات، البوتاسيوم كربونات، كالسيوم كربونات، زنك كربونات، وزنك هيدروكسيد، والقواعد العضوية مثل بروتامين سلفات، سبيرمين، كولين، إيثانول أمين، داي إيثانول أمين، وتراي إيثانول أمين وعوامل خافضة للتوتر السطحي مثل ®Tween و®Pluronic. تتم إضافة عوامل مكونة للمسام تُضيف بنية دقيقة إلى القوالب (أي، المركبات القابلة للذوبان في الماء مثل الأملاح غير

العضوية والمواد السكرية) في صورة جسيمات دقائقية. يكون النطاق نمطيًا فيما بين واحد بالمائة وثلاثين بالمائة (وزن/وزن بوليمر).

يمكن أيضًا معالجة الامتصاص عن طريق تغيير زمن البقاء الخاص بالجسيمات في المعي. يمكن تحقيق هذا، على سبيل المثال، عن طريق تغليف الجسيم باستخدام، أو اختياره باعتباره المادة الممحفظة، بوليمر لاصق مخاطي. تتضمن الأمثلة غالبية البوليمرات ذات مجموعات الكربوكسيل الحرة، مثل كيتوزان، مركبات سيليلوز، وبخاصة مركبات بولي أكريلات (كما يُستخدم هنا، تشير مركبات بولي أكريلات إلى بوليمرات تتضمن مجموعات أكريلات ومجموعات أكريلات معدلة مثل مركبات سيانو أكريلات ومركيات ميثاكريلات).

قد تتم صياغة مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ ليكون متضمنًا داخل، أو، متكيفًا للإطلاق بواسطة جهاز جراحي أو طبي أو غرس. في جوانب معينة، قد يتم تغليف أو معالجة غرس باستخدام مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ. على سبيل المثال، قد يتم استخدام أنواع الهلام المائي، أو البوليمرات الأخرى، مثل البوليمرات المتوافقة بيولوجيًا و/أو القابلة للتحلل بيولوجيًا، لتغليف غرس بالتركيبات الصيدلية الخاصة بالكشف الحالي (أي، قد يتم تكييف التركيبة للاستخدام مع جهاز طبي عن طريق استخدام هلام مائي أو بوليمر آخر). تكون البوليمرات والبوليمرات المشتركة لتغليف الأجهزة الطبية باستخدام عامل معروفة جيدًا في المجال. تتضمن الأمثلة على أنواع الغرس، إلا أنها ليست قاصرة على، واقيات طُعم، واقيات طُعم لفصل العقار تتابعيًا، غرز، بِدْلَة، قساطر وعائية، قساطر بالديلزة، طعوم وعائية، صمامات قلب ترقيعية، أجهزة ضبط نبضات القلب، مزيلات الرجفان القابلة للزرع، إبر الاستخدام داخل الوريد، أجهزة لتنضيد وتكوين العظام، مثل المسامير، المسامير الملولبة، الصفائح، والأجهزة الأخرى، وقوالب النسيج الصناعية لالتئام الجروح.

بالإضافة إلى الطرق المتوفرة هنا، قد تتم صياغة مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ للاستخدام وفقًا للكشف للإعطاء بأية طريقة ملائمة للاستخدام في الطب البشري أو البيطري، عن طريق التناظر مع المواد الصيدلية الأخرى. قد يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ والصيغ المناظرة الخاصة بها بمفردها أو في توليفة مع استراتيجيات هلاجية أخرى في علاج الحَثَل العَضَلِيّ، مثل زرع أورمة عضلية، العلاجات بالخلايا الجذعية، إعطاء مضادات حيوية من

أمينو جليكوزيد، مثبطات البروتيزوم، والعلاجات بالتنظيم التصاعدي(على سبيل المثال، التنظيم التصاعدي للأوتروفين، نظير بارا للصبغ الجسدي خاص بالديستروفين).

في بعض التجسيدات، قد يتم إعطاء العامل العلاجي الإضافي قبل، على نحو متزامن مع، أو على نحو تالي لإعطاء مترافق الأوليجومر المضاد لاتجاه النسخ والخاص بالكشف الحالي. على سبيل المثال، قد يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ في توليفة مع ستيرويد و/أو مضاد حيوي. في تجسيدات بعينها، يتم إعطاء مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ لمريض بركيزة ذات علاقة بالستيرويد (على سبيل المثال، العلاج بالستيرويد ذي الركيزة المتقطعة أو المزمنة/المستمرة. على سبيل المثال، في بعض التجسيدات تم علاج المريض باستخدام كورتيكوستيرويد قبل إعطاء أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ ويستمر في تلقي العلاج بالستيرويد. في بعض التجسيدات، يكون الستيرويد هو كورتيكويد سكري أو بريدنيزون.

تكون طرق الإعطاء الموصوفة مخصصة فقط كدليل حيث سيكون أحد الممارسين من ذوي المهارة قادرًا على تحديد طريقة الإعطاء المثلى وأية جرعة أي حيوان محدد وحالة محددة بسهولة. لقد تمت محاولة أساليب متعددة لإدخال مادة جينية جديدة وظيفية في الخلايا، في المعمل وفي جسم الكائن الحي (Friedmann (1989) Science, 244:1275-1280). تتضمن هذه الأساليب تكامل الجين الذي سيتم التعبير عنه في فَيْرُوْسَات قَهْقَرِيَّة معدلة (Friedmann (1989) supra; Rosenberg (1991) Cancer Research 51(18), suppl.: 5074S-5079S)؛ التكامل في نواقل لغير الفَيْرُوْسَات القَهْقَرِيَّة (على سبيل المثال، نواقل فيروسية مصاحبة للفيروس الغدي) (Rosenfeld, et al. (1992) Cell, 68:143-155; Rosenfeld, et al. (1991) Science, 252:431-434))؛ أو توصيل جين محوّر مرتبط بعنصر معزز-محسن غير متجانس عبر الجسيمات الشحمية ((1989) Friedmann، المذكور فيما سبق؛ 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؛ و Wang and Huang (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 84:7851-7855)؛ مقترن بنظم نقل معتمدة على كاتيون نوعية لمركب ترابطي (Wu and Wu (1988) J. Biol. Chem., 263:14621-14624) أو استخدام

DNA مجرد، نواقل تعبير وراثي ((1990) .Nabel et al، المذكور فيما سبق)؛ .Wolff et al Science, 247:1465-1468 (1990)). يُنتج الحقن المباشر للجينات المحورة في النسيج تعبيرًا وراثيًا موضعيًا فقط ((1992) Rosenfeld المذكور فيما سبق)؛ .Rosenfeld et al (1991) المذكور فيما سبق؛ (1989) .Brigham et al المذكور فيما سبق؛ (1990) Nabel المذكور فيما سبق؛ و(1991) .Hazinski et al المذكور فيما سبق). أوضحت مجموعة .Brigham et al (Am. J. Med. Sci. (1989) 298:278-281 and Clinical Research (1991) 39 (الملخص)) نقل العدوى في جسم الكائن الحي فقط لرئتي افئران بعد إما إعطاء معقد من جسيم شحمي لـ DNA داخل الوريد أو داخل القصبة. يكمن مثال على مقالة مراجعة لإجراءات العلاج الجيني البشري في: Anderson, Science (1992) 256:808-813.

في تجسيد إضافي، يمكن أن تشتمل التركيبات الصيدلية وفقًا للكشف، إضافةً إلى ذلك، على كربوهيدرات على النحو الوارد في Han et al., Nat. Comms. 7, 10981 (2016)، والذي أُدرج بالكامل ضمن مراجع هذه الوثيقة. في بعض التجسيدات، يمكن أن تشتمل التركيبات الصيدلية وفقًا للكشف على 5% هكسوز كربوهيدرات. على سبيل المثال، يمكن أن تشتمل التركيبة الصيدلية وفقًا للكشف على 5% جلوكوز، 5% فركتوز، أو 5% مانوز. في تجسيدات معينة، يمكن أن تشتمل التركيبات الصيدلية وفقًا للكشف على 2.5% جلوكوز و2.5% فركتوز. في بعض التجسيدات، يمكن أن تشتمل التركيبات الصيدلية وفقًا للكشف على كربوهيدرات يتم اختياره من: أربينوزن يوجد بكمية تبلغ 5% بالحجم، جلوكوز يوجد بكمية تبلغ 5% بالحجم، سوربيتول يوجد بكمية تبلغ 5% بالحجم، جالاكتوز يوجد بكمية تبلغ 5% بالحجم، فركتوز يوجد بكمية تبلغ 5% بالحجم، زيليتول يوجد بكمية تبلغ 5% بالحجم، مانوز يوجد بكمية تبلغ 5% بالحجم، توليفة من جلوكوز وفركتوز يوجد كل منهما بكمية تبلغ 2.5% بالحجم، وتوليفة من جلوكوز يوجد بكمية تبلغ 5.7% بالحجم، فركتوز يوجد بكمية تبلغ 2.86% بالحجم، وزيليتول يوجد بكمية تبلغ 1.4% بالحجم.

4. طرق الاستخدام

استعادة إطار قراءة الديستروفين باستخدام تخطي الإكسون

يتم اقتراح أسلوب علاجي محتمل لعلاج DMD الناتج بواسطة طفرات خارج الإطار في جين الديستروفين بواسطة الصورة الأخف من أمراض الحثل العضلي المعروفة باعتبارها BMD، التي تكون ناتجة بواسطة الطفرات داخل الإطار. ستؤدي القدرة على تحويل طفرة خارج الإطار إلى طفرة داخل الإطار افتراضيًا إلى الحفاظ على إطار قراءة mRNA وإنتاج بروتين ديستروفين مقصر داخليًا ولكنه وظيفي. تم تصميم مترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ الخاصة بالكشف لإتمام هذا.

يتداخل تهجين PMO باستخدام متوالية mRNA الأولي المستهدف مع تكوين معقد جدل mRNA الأولي ويحذف الإكسون 51 من mRNA الناضج. تسمح الصيغة البنائية والهيئة الخاصتان بمترافقات الأوليجومر المضادة لاتجاه النسخ الخاصة بالكشف بازدواج القواعد النوعي للمتوالية مع المتوالية المتممة. بواسطة آلية مشابهة، يسمح إيتيبليرسين، على سبيل المثال، الذي يعتبر PMO تم تصميمه لتخطي الإكسون 51 من mRNA الأولي للديستروفين بازدواج القواعد النوعي للمتوالية مع المتوالية المتممة المتضمنة في الإكسون 51 من mRNA الأولي للديستروفين.

سينتج MRNA الديستروفين الطبيعي المحتوي على كل 79 إكسونات بروتين ديستروفين طبيعي. يوضح الرسم البياني في الشكل 1 قطاعًا صغيرًا من mRNA الأولي للديستروفين وmRNA الناضج، من الإكسون 47 إلى الإكسون 53. يوضح شكل كل إكسون كيفية تقسيم الروامز فيما بين الإكسونات؛ جدير بالملاحظة، تتكون رامزة واحدة من ثلاثة نوكليوتيدات. تبدأ الإكسونات المشكلة على شكل مستطيل وتنتهي بروامز كاملة. تبدأ الإكسونات المشكلة على شكل سهم برامزة كاملة ولكن تنتهي برامزة مقسمة، محتوية فقط على نوكليوتيد #1 من الرامزة. يتم تضمين النوكليوتيدين #2 و#3 من هذه الرامزة في الإكسون التالي الذي سيبدأ بشكل شيفرون.

يؤدي mRNA الديستروفين المفتقر إلى إكسونات كاملة من جين الديستروفين نمطيًا إلى DMD. يبين الرسم البياني في الشكل 2 نوعًا من الطفرة الجينية (حذف الإكسون 50) المعروفة بأنها تتسبب في DMD. حيث إن الإكسون 49 ينتهي برامزة كاملة ويبدأ الإكسون 51 بالنوكليوتيد الثاني من رامزة، تتم إزاحة إطار القراءة بعد الإكسون 49، مما يؤدي إلى إطار قراءة mRNA خارج الإطار وتضمين الأحماض الأمينية غير الصحيحة بعد الطفرة. يؤدي الغياب التالي لنطاق ربط ديستروجليكان وظيفي عند الطرف C إلى إنتاج بروتين ديستروفين غير ثابت.

يتخطي الإيتيبليرسين الإكسون 51 لاستعادة إطار قراءة mRNA. حيث إن الإكسون 49 ينتهي برامزة كاملة والإكسون 52 يبدأ بالنوكليوتيد الأول من رامزة، يؤدي حذف الإكسون 51 إلى استعادة إطار القراءة، مما يؤدي إلى إنتاج بروتين ديستروفين تم تقصيره داخليًا بموقع ربط ديستروجليكان سليم، مشابه لطفرة BMD "في الإطار" (الشكل 3).

يتم دعم جدوى تحسين النمط الظاهري لـ DMD باستخدام تخطي الإكسون لاستعادة إطار القراءة المفتوح لـ mRNA الديستروفين بواسطة البحث غير الإكلينيكي. لقد أظهرت العديد من الدراسات في النماذج الحيوانية المتعلقة بالخثل العضلي لـ DMD أن استعادة الديستروفين بواسطة تخطي الإكسون تؤدي إلى تحسينات يمكن الوثوق بها في قوة ووظيفة العضلات (Sharp 2011; Yokota 2009; Wu 2008; Wu 2011; Barton-Davis 1999; Goyenvalle 2004; Gregorevic 2006; Yue 2006; Welch 2007; Kawano 2008; Reay 2008; van Putten 2012). ينشأ مثال إجباري على هذا من دراسة حيث تمت مقارنة مستويات الديستروفين بعد العلاج بتخطي الإكسون (باستخدام PMO) بوظيفة العضلات في النفس النسيج. في فأر mdx خاص بالحثل، حافظت العضلات الظُّنْبُوبِيَّة الأَمامِيَّة (TA) المعالجة باستخدام PMO نوعي لفأر على ~75% من سعة القدرة القصوى لها بعد الانقباضات الحاثة على الإجهاد، بينما حافظت عضلات TA للجانب المقابل فقط على ~25% من سعة القدرة القصوى لها ($p < 0,05$) (Sharp 2011). في دراسة أخرى، تلقى 3 من كلاب CXMD ذات الحثل، عند عمر يبلغ 2-5 شهور، العلاج بتخطي الإكسون باستخدام PMO نوعي للطفرة الجينية الخاصة بها مرة في الأسبوع لمدة من 5 إلى 7 أسابيع أو أسبوع بعد الآخر لمدة 22 أسبوع. بعد العلاج بتخطي الإكسون، أظهر كل الكلاب الثلاثة تعبير وراثي شامل في كل أنحاء الجسم عن الديستروفين في العضلة الهيكلية، إضافة إلى الحفاظ على أو تحسين السير (اختبار الجري لمسافة 15 متر) بالنسبة إلى القيمة القاعدية. على النقيض، أظهرت كلاب CXMD من نفس العمر غير المعالجة انخفاضًا ملحوظًا في السير على مدار الدراسة (Yokota 2009).

تم إظهار أن PMOs لها نشاط تخطي للإكسون أكثر عند تركيزات متساوية المولية من مركبات فوسفورو ثيوات في كل من فئران mdx وفي نموذج الفأر لـ DMD المتوافق مع البشر (hDMD)، التي تعبر عن كامل نسخة DMD البشرية (Heemskirk 2009). في التجارب المعملية يؤدي

استخدام تفاعل سلسلة بوليميراز للنسخ العكسي (RT-PCR) ولطخة Western (WB) في خلايا العضلات الهيكلية البشرية العادية أو خلايا العضلات من مرضى DMD بطفرات مختلفة مُعرّضًا لتخطي الإكسون 51 إلى تحديد الإيتيبليرسين (PMO) كعامل حاث فعال لتخطي الإكسون 51. لقد تم تأكيد تخطي الإكسون 51 المستحث بالإيتيبليرسين في جسم الكائن الحي في نموذج الفأر لـ hDMD (Arechavala-Gomeza 2007).

تتضمن النتائج الإكلينيكية لتحليل تأثير مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ يكون متممًا لمنطقة مستهدفة من الإكسون 51 الخاصة بـ mRNA الأولي للديستروفين البشري ويحث على تخطي الإكسون 51: نسبة مئوية من الألياف الإيجابية للديستروفين (PDPF)، اختبار السير لمدة ست دقائق (6MWT)، فقد السير (LOA)، North Star Ambulatory Assessment (NSAA)، اختبارات الوظيفة الرئوية (PFT)، القدرة على النهوض (من وضع استلقاء) بدون دعم خارجي، إنتاج الديستروفين الجديد والقياسات الوظيفية الأخرى.

في بعض التجسيدات، يوفر الكشف الحالي طرقًا لإنتاج الديستروفين في خاضع للعلاج لديه طفرة في جين الديستروفين الذي يكون مُعرّضًا لتخطي الإكسون 51، تشتمل الطريقة على إعطاء الخاضع للعلاج مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ، أو ملح مقبول صيدليًا منه، كما يوصف هنا. في تجسيدات معينة، يوفر الكشف الحالي طرقًا لاستعادة إطار قراءة mRNA للحث على إنتاج بروتين ديستروفين في خاضع للعلاج يعاني من الحَثَل العَضَلِيّ لدوشين (DMD) لديه طفرة جين الديستروفين الذي يكون مُعرّضًا لتخطي الإكسون 51. يمكن قياس إنتاج البروتين عن طريق تفاعل سلسلة بوليميراز للنسخ العكسي (RT-PCR)، تحليل لطخة Western، أو الكِيمْياء الهيستولوجية المَناعِيَّة (IHC).

في بعض التجسيدات، يوفر الكشف الحالي طرقًا لعلاج DMD في خاضع للعلاج في حاجة لذلك، حيث يكون لدى الخاضع للعلاج طفرة لجين الديستروفين الذي يكون مُعرّضًا لتخطي الإكسون 51، تشتمل الطريقة على إعطاء الخاضع للعلاج مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ، أو ملح مقبول صيدليًا منه، كما يوصف هنا. في تجسيدات متنوعة، يتم قياس علاج الخاضع للعلاج بواسطة تأخير تقدم المرض. في بعض التجسيدات، يتم قياس علاج الخاضع للعلاج عن طريق الحفاظ على السير في الخاضع للعلاج أو خفض فقد السير في الخاضع للعلاج. في بعض

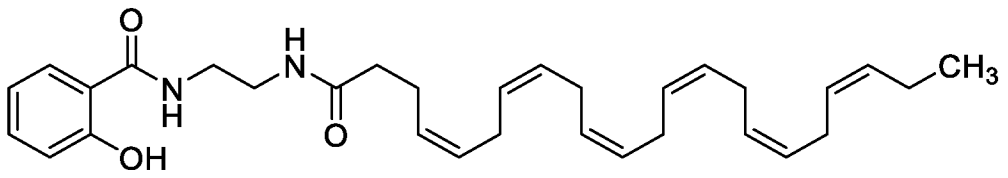
التجسيدات، يتم قياس السير باستخدام اختبار السير لمدة 6 دقائق (6MWT). في تجسيدات معينة، يتم قياس السير باستخدام North Start Ambulatory Assessment (NSAA).

في تجسيدات متنوعة، يوفر الكشف الحالي طرقًا للحفاظ على الوظيفة الرئوية أو تقليل فقد الوظيفة الرئوية في خاضع للعلاج يعاني من DMD، حيث يكون لدى الخاضع للعلاج طفرة لجين DMD يكون مُعرّضًا لتخطي الإكسون 51، تشتمل الطريقة على إعطاء الخاضع للعلاج مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ، أو ملح مقبول صيدليًا منه، كما يوصف هنا. في بعض التجسيدات، يتم قياس الوظيفة الرئوية باعتبارها الضَّغْط الزَّفيريّ الأقصى (MEP). في تجسيدات معينة، يتم قياس الوظيفة الرئوية باعتبارها الضَّغْط الشَّهيقيّ الأقصى (MIP). في بعض التجسيدات، يتم قياس الوظيفة الرئوية باعتبارها السعة الحيوية القسرية (FVC).

في تجسيد إضافي، يمكن إعطاء التركيبات الصيدلية وفقًا للكشف مع كربوهيدرات في طرق الكشف، إما في نفس الصيغة أو صيغة منفصلة، على النحو الوارد في Han et al., Nat. Comms. 7, 10981 (2016)، والذي أُدرج بالكامل ضمن مراجع هذه الوثيقة. في بعض التجسيدات، يمكن إعطاء التركيبات الصيدلية الخاصة بالكشف مع 5% هكسوز كربوهيدرات. على سبيل المثال، يمكن إعطاء التركيبات الصيدلية الخاصة بالكشف مع 5% جلوكوز، 5% فركتوز، أو 5% مانوز. في تجسيدات معينة، يمكن إعطاء التركيبات الصيدلية الخاصة بالكشف مع 2.5% جلوكوز و2.5% فركتوز. في بعض التجسيدات، يمكن إعطاء التركيبة الصيدلية الخاصة بالكشف مع كربوهيدرات يتم اختياره من: أربينوز يوجد بكمية تبلغ 5% بالحجم، جلوكوز يوجد بكمية تبلغ 5% بالحجم، سوربيتول يوجد بكمية تبلغ 5% بالحجم، جالاكتوز يوجد بكمية تبلغ 5% بالحجم، فركتوز يوجد بكمية تبلغ 5% بالحجم، زيليتول يوجد بكمية تبلغ 5% بالحجم، مانوز يوجد بكمية تبلغ 5% بالحجم، توليفة من جلوكوز وفركتوز يوجد كل منهما بكمية تبلغ 2.5% بالحجم، وتوليفة من جلوكوز يوجد بكمية تبلغ 5.7% بالحجم، فركتوز يوجد بكمية تبلغ 2.86% بالحجم، وزيليتول يوجد بكمية تبلغ 1.4% بالحجم.

في تجسيدات متنوعة، يتم إعطاء مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ وفقًا للكشف مع كمية فعالة علاجيًا من مركب غير ستيرويدي مضاد للالتهاب. في بعض التجسيدات، يكون المركب غير الستيرويدي المضاد للالتهاب عبارةً عن مثبط NF-kB. على سبيل المثال، في بعض التجسيدات،

قد يكون مثبط NF-kB عبارةً عن CAT-1004 أو ملح مقبول صيدليًا منه. في تجسيدات متنوعة، قد يكون مثبط NF-kB عبارةً عن مترافق من ساليسيلات وDHA. في بعض التجسيدات، يكون مثبط NF-kB عبارةً عن CAT-1041 أو ملح مقبول صيدليًا منه. في تجسيدات معينة، يكون مثبط NF-kB عبارةً عن مترافق من ساليسيلات وEPA. في تجسيدات متنوعة، يكون مثبط NF-kB عبارةً عن



، أو ملح مقبول صيدليًا منه.

في بعض التجسيدات، يكون المركب غير الستيرويدي المضاد للالتهاب عبارةً عن مثبط TGF-b. على سبيل المثال، في تجسيدات معينة، يكون مثبط TGF-b عبارةً عن HT-100.

في تجسيدات معينة، تم وصف مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ على النحو الموصوف والوارد بهذه الوثيقة لاستخدامه للعلاج. في تجسيدات معينة، تم وصف مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ على النحو الموصوف بهذه الوثيقة لاستخدامه في علاج الحَتَل العَضَلِيّ لدوشين. في تجسيدات معينة، تم وصف مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ على النحو الموصوف بهذه الوثيقة لاستخدامه في تصنيع دواء لاستخدامه في العلاج. في تجسيدات معينة، تم وصف مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ على النحو الموصوف بهذه الوثيقة لاستخدامه في تصنيع علاج لعلاج الحَتَل العَضَلِيّ لدوشين.

5. الأطقم

يوفر الكشف أيضًا أطقمًا لعلاج مريض يعاني من مرض جيني يشتمل الطقم على جزيء مضاد لاتجاه النسخ على الأقل (على سبيل المثال، مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ يشتمل على مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ موضح في المتوالية رقم: 1)، معبأ في حاوية ملائمة، مع تعلميات لاستخدامه. قد تحتوي الأطقم أيضًا على مواد كاشفة طرفية مثل محاليل منظمة، مثبتات، إلى غير ذلك. ينبغي أن يدرك هؤلاء من ذوي المهارة في المجال أن التطبيقات الخاصة بالطريقة

السابقة لها استخدام واسع النطاق لتحديد الجزيئات المضادة لاتجاه النسخ الملائمة للاستخدام في علاج العديد من الأمراض الأخرى. في أحد التجسيدات، يشتمل الطقم على مترافق أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ وفقًا للصيغة (III).

الأمثلة

بالرغم من أنه قد تم وصف الكشف السابق ببعض من التفصيل على سبيل الإيضاح وإفراد أمثلة لأغراض تتعلق بوضوح الاستيعاب، سيتضح بالفعل لأحد ذوي المهارة العادية في المجال في ضوء تعاليم هذا الكشف أنه قد يتم إجراء تغييرات وتعديلات معينة عليها دون الخروج عن فحوى ونطاق عناصر الحماية الملحقة. يتم توفير الأمثلة التالية على سبيل الإيضاح فقط وليس على سبيل التحديد. سيدرك هؤلاء من ذوي المهارة في المجال بسهولة مجموعة متنوعة من المتغيرات غير المهمة التي يمكن تغييرها أو تعديلها للحصول على نتائج متشابهة بشكل أساسي.

المواد والطرق

ظروف معالجة الخلايا ومزارع النسيج

تم استخدام خلايا عضلية بشرية متمايزة (ZenBio, Inc.) لقياس تخطي الإكسونات. على نحو محدد، تم زراعة أرومات عضلية (ZenBio, Inc., SKB-F) إلى تجمع 80-90% عند 37 درجة مئوية و5% CO2 في أوساط نمو (SKB-M; ZenBio, Inc.). تم بدء التمايز باستبدال أوساط النمو أوساط تمايز (SKM-D; ZenBio, Inc.). لاختبار تخطي الإكسون 51، تم وضع 1 × 104 خلية متمايزة في أطباق بها 24 عينًا و1 ملليلتر أوساط تمايز (SKM-D; ZenBio, Inc.) تحتوي على تركيزات مختلفة من PMO أو تم إضافة PPMO إلى كل عين وحضانتها لمدة 96 ساعة.

تحليل بقعة ويسترن

فيما يتعلق بتحليل بقعة ويسترن، تم مجانسة النسيج محلول مجانسة منظم (4% SDS، 4 مولار يوريا، 125 مللي مولار تريس-HCl (برقم هيدروجيني 6.8)) بنسبة 9 إلى 18 × 20-ميكرو متر من قطاعات من النسيج بقطر يبلغ تقريبًا 5 مم في 133 ميكرو لتر محلول منظم. تم تجميع

ناتج التحلل المناظر وإخضاعه احتساب كمية البروتين باستخدام طقم تجربة بروتين RC DC وفقًا لتعليمات الشركة المصنعة (BioRad Cat. 500-0122). تم تخفيف عينات النسيج المستخلصة بنسبة 10:1 باستخدام محلول مجانسة منظم بحيث تبلغ نطاق منحنى BSA القياسي. تم تحضير العينات بحيث يحتوي 35 ميكرو لتر من العينة على المقدار المطلوب من البروتين باستخدام 25 ميكرو لتر من بروتين ناتج تحلل، 7 ميكرو لتر من محلول عينة NuPAGE LDS منظم (Life Technologies Cat. NP0008, Carlsbad, California, USA)، و3 ميكرو لتر من عامل NuPAGE مختزل (مركز 10 مرات) (Life Technologies Cat. NP0004). بعد تسخين عينات البروتين لمدة 5 دقائق عند 95 درجة مئوية، تم طرد العينات مركزيًا وتحميل المادة الطافية على عين 10 NuPAGE Novex، 1 مم، ميني 3-8% جل بولي أكريل أميد تريس-أسيتات (Life Technologies Cat. EA0375) عند حد أقصى يبلغ 50 ميكرو جرام من حمل البروتين الكلي لكل جزء. تم تدوير الجل عند 150 فولت عند درجة حرارة الغرفة إلى أن نضحت واجهة الصبغ من الجل. تم نقل جلات البروتين الناتجة إلى أغشية PVDF (Life Technologies Cat. LC2007) لمدة 75 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة عند 30 فولت باستخدام محلول نقل NuPAGE منظم (Life Technologies NP006-1)، 10% ميثانول و0.1% مضاد أكسدة NuPAGE (Life Technologies NP0005).

بعد نقل البروتين، تم غمر أغشية PVDF في محلول TTBS منظم (TBS مركز مرةً واحدة (Amresco Cat. J640-4L)، 0.1% (حجم/حجم) tween-20). تم نقل الأغشية إلى محلول إعاقة منظم (5% (وزن/حجم) حليب جاف ليس به دهون (Lab Scientific Cat. M0841) في TTBS) ونقعها طوال الليل عند 4 درجة مئوية مع الرج الخفيف. بعد الإعاقة، تم حضانة الأغشية إما لمدة 60 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة في DYS1 (Leica Cat. NCL-DYS1) مخفف بنسبة 20:1 باستخدام محلول إعاقة منظم، أو 20 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة في جسم ألفا-أكتينين مضاد (Sigma-Aldrich Cat. NA931V) مخفف بنسبة 100000:1 باستخدام محلول إعاقة منظم، متبوعًا بالغسل ست مرات (خمس دقائق لكل منها مع TTBS). تم تخفيف مترافق IgG فأري مضاد مع بيروكسيداز الجرجار الحار (GE Healthcare Cat. NA931V) بنسبة 40000:1 باستخدام محلول إعاقة منظم وإضافته إلى الأغشية لمدة 45 دقيقة

(DYS1) أو 15 دقيقة (□-أكتينين)، متبوعًا بالغسل ست مرات. باستخدام طقم اكتشاف ECL Prime Western (GE Healthcare Cat. RPN2232)، تم تعريض الطبقة الغشائية للجل وتحميضها وفقًا لذلك. تم فحص الطبقة الغشائية المحمضة وتحليلها باستخدام برنامج صورة ImageQuant TL Plus (الإصدار 8.1) وإجراء تحليل بالتقهقر الخطي باستخدام برنامج Graphpad.

يتضمن كل جل بقعة ويسترن منحنى ديستروفين قياسي مكون من 4 أو 5 يتم تحضيره باستخدام البروتين الكلي المستخلص من نسيج عادي (عضلة الفأر رباعية الرؤوس، الحجاب الحاجز، أو القلب) مخفف، على سبيل المثال، إلى 64%، 16%، 4%، 1%، و0.25% (انظر. على سبيل المثال. الأشكال 5أ و5ب) وزيادته إلى نسيج DMD (على سبيل المثال، خلاصة عضلة الفأر رباعية الرؤوس mdx، الحجاب الحاجز، أو القلب، أو عضلة رباعية الرؤوس NHP، الحجاب الحاجز، أو العضلة الملساء (GI)). تم معالجة عينات المنحنى القياسي على النحو الموصوف أعلاه. تم تحديد مستويات بروتين الديستروفين بالنسبة المئوية للديستروفين من النوع غير المعالج (WT%) من خلال مقارنة قيم شدة نطاق الديستروفين إلى منحنى الجل القياسي.

تحليل RT-PCR

فيما يتعلق تحليل RT-PCR، تم عزل RNA من الخلايا باستخدام طقم تدوير Illustra GE باتباع بروتوكول الشركة المصنعة. تم تحديد تركيز ونقاء RNA باستخدام NanoDrop. تم قياس تخطي الإكسون 51 من خلال RT-PCR له مادة بادئة أمامية تربط إكسون 49 المتوالية رقم:5 (5'-CCAGCCACTCAGCCAGTGAAG-3') ومادة بادئة خلفية تربط إكسون 52 المتوالية رقم:6 (5'-CGATCCGTAATGATTGTTCTAGCC-3'). وقد أدى الإكسون 51 المتخطى إلى أمبليكون 246 زوج قاعدة وقد أدى الإكسون 51 غير المتخطى إلى أمبليكون 478 زوج قاعدة.

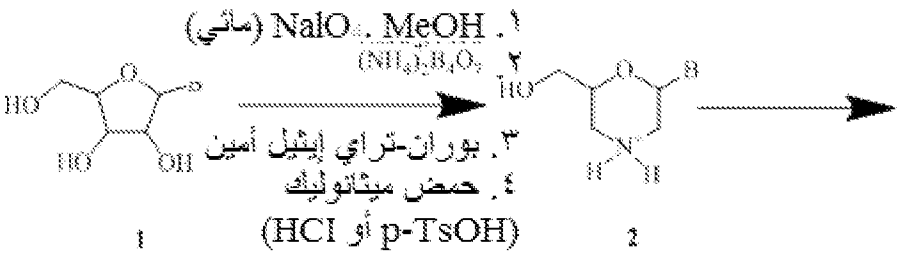
تم قياس تخطي الإكسون الفأري 23 باستخدام RT-PCR له بادئة أمامية-المتوالية رقم:7 (5'-CACATCTTTGATGGTGTGAGG-3') وبادئة خلفية المتوالية رقم:8 (5'-CAACTTCAGCCATCCATTTCTG-3').

بعد إخضاع RNA لـ RT-PCR، تم تحليل العينات باستخدام ماكينة Caliper، استخدمت رحلان الجل الشعري الكهربي. تم احتساب النسبة المئوية لتخطي الإكسونات بالمعادلة التالية: (المساحة أسفل منحنى النطاقات المتخطاة)/(إجمالي المساحة أسفل منحنى النطاقات المتخطاة وغير المتخطاة)×100.

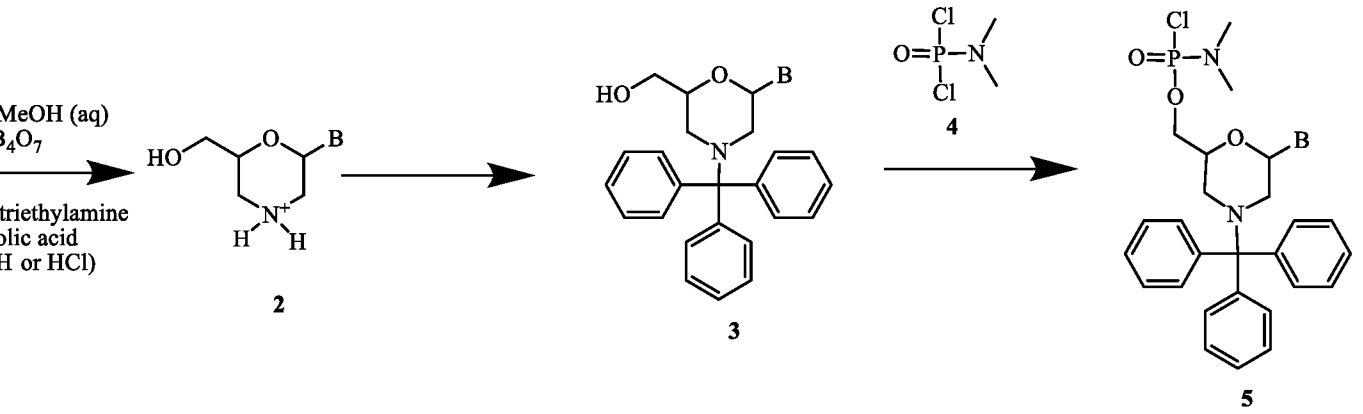
الكيمياء الهيستولوجية المناعية: تبقيع الديستروفين:

تم استخدام 10 ميكرون من القطاعات المجمدة من نسيج عضلة الفأر رباعية الرؤوس لاكتشاف ديستروفين بواسطة ديستروفين جسم مضاد أولي (تخفيف 250:1، أرنب، Abcam، رقم الكتالوج ab15277) في 10% مصل ماعز + 1% BSA في PBS وجسم مضاد ثانوي Alexa-فلورو 488 مضاد مشتق من أرنب وماعز (نسبة التخفيف 1000:1) في 10% مصل ماعز + 1% BSA.

تحضير وحدات مورفولينو فرعية



صورة



المخطط 1: طريقة التخليق العامة لوحدات PMO الفرعية

بالإشارة إلى المخطط 1، حيث B تمثل شطر ازدواج القاعدة، قد يتم تحضير وحدات المورفولينو الفرعية من الريبونوكليوزيد المناظر (1) كما يُعرض. قد تتم حماية وحدة المورفولينو الفرعية (2) اختياريًا بواسطة التفاعل مع مادة منتجة لمجموعة حماية ملائمة، على سبيل المثال ترايتيل كلوريد. تتم إزالة مجموعة الحماية عند الموضع 3 ’بصفة عامة أثناء تخليق الأوليجومر في الحالة الصلبة كما يوصف بمزيد من التفصيل فيما يلي. قد تتم على نحو ملائم حماية شطر ازدواج القاعدة لتخليق الأوليجومر في الحالة الصلبة. تتضمن مجموعات الحماية الملائمة بنزويل لأدنين وسيتوزين، فنيل أسيتيل لجوانين، وبيفالويل أوكسي ميثيل لهيبوكسانثين (I). يمكن إدخال مجموعة البيفالويل أوكسي ميثيل على الموضع N1 من قاعدة الهيبوكسانثين الحلقية غير المتجانسة. بالرغم من أنه قد يتم استخدام وحدة هيبوكسانثين فرعية غير محمية، فإن حصائل تفاعلات التنشيط تكون فائقة للغاية عندما تكون القاعدة محمية. تتضمن مجموعات الحماية الملائمة الأخرى تلك التي تم الكشف عنها في براءة الاختراع الأمريكية رقم 8,076,476، التي تم تضمينها هنا كمرجع بأكملها.

يؤدي تفاعل 3 مع مركب الفوسفور المنشط 4 إلى وحدات مورفولينو فرعية بها شطر الرابط المطلوب 5.

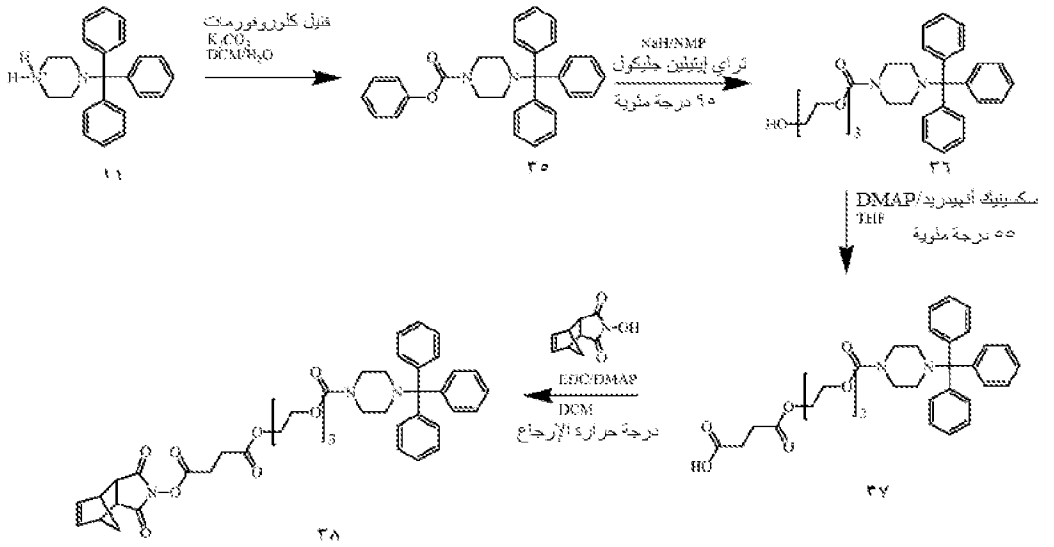
يمكن تحضير المركبات بالصيغة البنائية 4 باستخدام أي عدد من الطرق المعروفة لهؤلاء من ذوي المهارة في المجال. ثم يستمر الإقران بشطر المورفولينو كما هو موضح فيما سبق.

يمكن استخدام المركبات بالصيغة البنائية 5 في تخليق الأوليجومر في الحالة الصلبة لتحضير الأوليجومرات المشتملة على روابط الوحدة الفرعية الداخلية. تكون هذه الطرق معروفة جيدًا في المجال. باختصار، قد يتم تعديل مركب بالصيغة البنائية 5 عند الطرف 5 ’ليحتوي على رابط بمادة حاملة صلبة. بمجرد تحميلها، تتم إزالة المجموعة المحمية الخاصة بـ 5 (على سبيل المثال، ترايتيل عند الطرف 3’)) ويتم تفاعل الأمين الحر مع شطر فوسفور منشط لمركب ثان بالصيغة البنائية 5. يتم تكرار هذه المتوالية حتى يتم الحصول على طول الأوليجو المطلوب. قد تتم إما إزالة المجموعة المحمية في الطرف النهائي 3 ’أو تركها إذا كانت هناك رغبة في حدوث تعديل عند الطرف 3’. يمكن إزالة الأوليجو من المادة الحاملة الصلبة باستخدام أي عدد من الطرق، أو العلاج النموذجي باستخدام قاعدة لشطر الرابط بالمادة الحاملة الصلبة.

يتم وصف تحضير الأوليجومرات من المورفولينو بشكل عام والأوليجومرات من المورفولينو النوعية الخاصة بالكشف بمزيد من التفصيل في الأمثلة.

تحضير أوليجومرات من مورفولينو

يتم تنفيذ تحضير مترافقات الأوليجومرات المضادة لاتجاه النسخ والخاصة بالكشف باستخدام البروتوكول التالي وفقًا للمخطط 2:



المخطط 2: تحضير حمض ذيلي منشط

تحضير ترايتيل بيبرازين فنيل كربامات 35: إلى معلق مبرد من المركب 11 في داي كلورو ميثان (6 ملليلتر/جم 11) تمت إضافة محلول من بوتاسيوم كربونات (3,2 مكافئ) في ماء (4 ملليلتر/جم بوتاسيوم كربونات). إلى هذا الخليط ثنائي الأطوار تمت ببطء إضافة محلول من فنيل كلورو فورمات (1,03 مكافئ) في داي كلورو ميثان (2 جم/جم فنيل كلورو فورمات). تمت تدفئة خليط التفاعل وصولاً إلى 20 درجة مئوية. عند إتمام التفاعل (1-2 ساعة)، تم فصل الطبقات. تم غسيل الطبقة العضوية باستخدام الماء، وتجفيفه على بوتاسيوم كربونات لامائية. تم عزل المنتج 35 عن طريق التبلّر من أسيتو نيتريل.

تحضير كحول كربامات 36: تم تعليق صوديوم هيدريد (1,2 مكافئ) في 1-ميثيل-2-بيروليدينون (32 ملليلتر/جم صوديوم هيدريد). إلى هذا المعلق تمت إضافة تراي إيثيلين جليكول (10,0 مكافئ) والمركب 35 (1,0 مكافئ). تم تسخين الملاط الناتج وصولاً إلى 95 درجة مئوية.

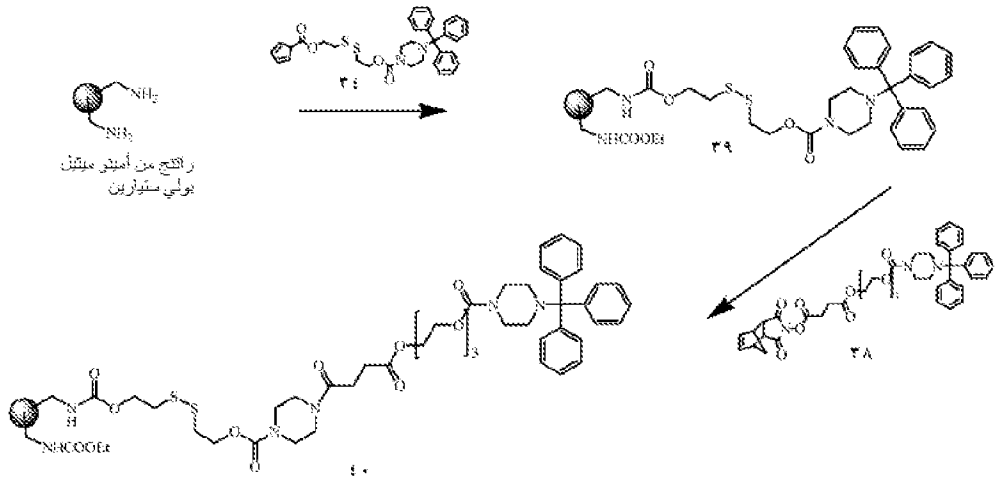
عند إتمام التفاعل (1–2 ساعة)، تم تبريد الخليط وصولاً إلى 20 درجة مئوية. إلى هذا الخليط تمت إضافة 30% من داي كلورو ميثان/ميثيل T–بيوتيل إيثر (حجم:حجم) والماء. تم غسيل الطبقة العضوية المحتوية على المنتج تتابعيًا باستخدام NaOH مائي، حمض سكسينيك مائي، وصوديوم كلوريد مائي مشبع. تم عزل المنتج 36 عن طريق التبلّر عن داي كلورو ميثان/ميثيل T–بيوتيل إيثر/هبتان.

تحضير الحمض الذيلي 37: إلى محلول من المركب 36 في تترا هيدرو فيوران (7 ملليلتر/جم 36) تمت إضافة سكسينيك أنهيدريد (2,0 مكافئ) وDMAP (0,5 مكافئ). تم تسخين الخليط وصولاً إلى 50 درجة مئوية. عند إتمام التفاعل (5 ساعات)، تم تبريد الخليط وصولاً إلى 20 درجة مئوية وضبطه على الرقم الهيدروجيني 8,5 باستخدام NaHCO3 مائية. تمت إضافة ميثيل T–بيوتيل إيثر، وتم استخلاص المنتج في الطبقة المائية. تمت إضافة داي كلورو ميثان، وتم ضبط الخليط على الرقم الهيدروجيني 3 باستخدام حمض سيتريك مائي. تم غسيل الطبقة العضوية المحتوية على المنتج باستخدام خليط من محلول منظم بسيترات وصوديوم كلوريد مائي مشبع برقم هيدروجيني = 3. تم استخدام محلول الداي كلورو ميثان هذا الخاص بـ 37 بدون عزل في تحضير المركب 38.

تحضير 38: إلى المحلول من المركب 37 تمت إضافة إيميد حمض N–هيدروكسي –5–نوربورنين–2، 3– ثنائي الكربوكسيل (HONB) (1,02 مكافئ)، 4–داي ميثيل أمينو بيريدين (DMAP) (0,34 مكافئ)، ثم 1–(3–داي ميثيل أمينو بروبيل)–N'–إيثيل كربو داي إيميد هيدرو كلوريد (EDC) (1,1 مكافئ). تم تسخين الخليط وصولاً إلى 55 درجة مئوية. عند إتمام التفاعل (4–5 ساعات)، تم تبريد الخليط وصولاً إلى 20 درجة مئوية وغسيله تتابعًا باستخدام 1: 1 0.2 مولار من حمض سيتريك/براين وبراين. خضع محلول الداي كلورو ميثان لتبادل المذيب مع أسيتون ثم مع N، N–داي ميثيل فورماميد، وتم عزل المنتج عن طريق الترسيب من أسيتون/ N، N–داي ميثيل فورماميد في صوديوم كلوريد مائي مشبع. تم تحويل المنتج الخام إلى ملاط عدة مرات في الماء لإزالة N، N–داي ميثيل فورماميد المتبقي والأملاح.

طريقة تخليق PMO أ: استخدام مثبت داي سلفيد

تم تنفيذ إدخال "حمض ذيلي" منشط على الراتنج المحمل على مثبت في داي ميثيل إيميدازوليدينون (DMI) بواسطة الإجراء المستخدم لتضمين الوحدات الفرعية أثناء تخليق الطور الصلب.



المخطط 3: تحضير المادة الحاملة الصلبة لتخليق أوليجومرات من مورفولينو

تم تنفيذ هذا الإجراء في وعاء ببتيد مغلف معالج بالسيلان (ChemGlass, NJ, USA) بوسيلة تقليب علوية من فريت زجاجي بمسامية خشنة (40-60 ميكرو متر)، ومحبس ثلاثي الاتجاهات من التيفلون للسماح بإدخال فقاعات من N2 لأعلى خلال الفريت أو استخلاص خوائي.

تتكون خطوات معالجة الراتنج/الغسيل في الإجراء التالي من اثنتين من العمليات الأساسية: تميع الراتنج أو مفاعل بطبقة تقليب واستخلاص للمذيب/المحلول. لتميع الراتنج، تم وضع المحبس للسماح بتدفق N2 لأعلى خلال الفريت وتمت إضافة محلول معالجة/غسيل الراتنج المخصص إلى المفاعل والسماح بإنفاذ وترطيب الراتنج بشكل تام. ثم تم بدء الخلط وتم خلط ملاط الراتنج للمدة الزمنية المحددة. لاستخلاص للمذيب/المحلول، تم إيقاف الخلط وتدفق N2 وتم بدء تشغيل المضخة الخوائية ثم تم وضع المحبس للسماح بتفريغ محلول معالجة/غسيل الراتنج في المخلفات. بلغت كل أحجام محلول معالجة/غسيل الراتنج 15 ملليلتر/جم من الراتنج ما لم يُذكر ما يُخالف ذلك.

إلى راتنج من أمينو ميثيل بولي ستايرين (100-200 مش؛ حمل ~1,0 مللي مول/جم معتمد على مجموعة استبدال بالنيتروجين؛ 75 جم، 1 مكافئ، Polymer Labs, UK, part #1464-X799) في وعاء ببتيد مغلف معالج بالسيلان تمت إضافة 1-ميثيل-2-بيروليدينون (NMP؛ 20

ملليلتر/جم من الراتنج) وتم السناح بانتفاخ الراتنج باستخدام الخلط لمدة 1–2 ساعة. بعد تفريغ المذيب المنتفخ، تم غسيل الراتنج باستخدام داي كلورو ميثان (2 x 1–2 دقيقة)، 5% من داي أيزو بروبيل إيثيل أمين في 25% من أيزو بروبانول/داي كلورو ميثان (2 x 3–4 دقائق) وداي كلورو ميثان (2 x 1–2 دقيقة). بعد تفريغ محلول الغسيل الأخير، تمت معالجة الراتنج باستخدام محلول من مثبت من داي سلفيد 34 في 1–ميثيل–2–بيروليدينون (0,17 مولار؛ 15 ملليلتر/جم من الراتنج، ~2,5 مكافئ) وتم تسخين خليط الراتنج/المادة الكاشفة عند 45 درجة مئوية لمدة 60 ساعة. عند إتمام التفاعل، تم إيقاف التسخين وتم تفريغ محلول المثبت وغسيل الراتنج باستخدام 1–ميثيل–2–بيروليدينون (4 x 3–4 دقائق) وداي كلورو ميثان (6 x 1–2 دقيقة). تمت معالجة الراتنج باستخدام محلول من 10% (حجم/حجم) من داي إيثيل داي كربونات في داي كلورو ميثان (16 ملليلتر/جم؛ 2 x 5–6 دقائق) ثم غسيله باستخدام داي كلورو ميثان (6 x 1–2 دقيقة). تم تجفيف الراتنج 39 في ظل تيار من N2 لمدة 1–3 ساعات ثم في وسط مفرغ وصولاً إلى وزن ثابت (± 2%). الحصيلة: 110–150% من وزن الراتنج الأصلي.

تحديد حمل الراتنج من أمينو ميثيل بولي ستايرين–داي سلفيد: يتم تحديد حمل الراتنج (عدد المواقع المتفاعلة المتاحة على نحو محتمل) بواسطة تجربة قياس طيف لعدد من مجموعات تراي فنيل ميثيل (ترايتيل) لكل جرام من الراتنج.

يتم نقل وزن معروف من راتنج مجفف (25 ± 3 مجم) إلى قارورة حجمية سعة 25 ملليلتر معالجة بسيلان وتتم إضافة ~5 ملليلتر من 2% (حجم/حجم) حمض تراي فلورو أسيتيك في داي كلورو ميثان. يتم خلط المحتويات عن طريق التدويم المعتدل ثم السماح باستقرارها لمدة 30 دقيقة. يتم توصيل الحجم إلى 25 ملليلتر باستخدام 2% (حجم/حجم) إضافية من حمض تراي فلورو أسيتيك في داي كلورو ميثان وخلط المحتويات بشكل تام. باستخدام ماصة إزاحة إيجابية، يتم نقل جزء متساوي من المحلول المحتوي على ترايتيل (500 ميكرو لتر) إلى قارورة حجمية سعة 10 ملليلتر ويتم توصيل الحجم إلى 10 ملليلتر باستخدام حمض ميثان سلفونيك.

يتم قياس محتوى كاتيون الترايتيل في المحلول النهائي بواسطة الامتصاص بالأشعة فوق البنفسجية عند 431,7 نانو متر وحمل الراتنج المحسوب في مجموعات الترايتيل لكل جرام من الراتنج

(ميكرو مول/جم) باستخدام الأحجام الملائمة، عمليات تخفيف، مُعامِل الانْطِفاء (ε: 41 ميكرو مول-1 سم-1) ووزن الراتنج. يتم تنفيذ التجربة ثلاث مرات وحساب متوسط الحمل.

سيوفر إجراء تحميل الراتنج في هذا المثال راتنج بتحميل يبلغ تقريبًا 500 ميكرو مول/جم. تم الحصول على حمل يبلغ 300-400 في ميكرو مول/جم إذا تم تنفيذ خطوة تضمين المثبت من داي سلفيد لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة الغرفة.

الحمل الذيلي: باستخدام نفس الإعداد والأحجام مثل تحضير الراتنج من أمينو ميثيل بولي ستايرين-داي سلفيد، يمكن إدخال الحمل الذيلي في المادة الحاملة الصلبة. تم أولاً نزع الحماية من الراتنج المحمل بالمثبت في ظل ظروف حمضية ومعادلة المادة الناتجة قبل الإقران. لخطوة الإقران، تم استخدام محلول من 38 (0,2 مولار) في DMI محتوي على 4-إيثيل مورفولين (NEM، 0,4 مولار) بدلاً من محلول المثبت من داي سلفيد. بعد 2 ساعة عند 45 درجة مئوية، تم غسيل الراتنج 39 مرتين باستخدام 5% من داي أيزو بروبيل إيثيل أمين في 25% من أيزو بروبانول/داي كلورو ميثان ومرة باستخدام DCM. إلى الراتنج تمت إضافة محلول من بنزويك أنهيدريد (0,4 مولار) وNEM (0,4 مولار). بعد 25 دقيقة، تم تبريد غلاف المفاعل وصولاً إلى درجة حرارة الغرفة، وغسيل الراتنج مرتين باستخدام 5% من داي أيزو بروبيل إيثيل أمين في 25% من أيزو بروبانول/داي كلورو ميثان وثمان مرات باستخدام DCM. تم ترشيح الراتنج 40 وتجفيفه في وسط عالي التفريغ. تم تحديد الحمل للراتنج 40 ليكون حمل الراتنج الأصلي من أمينو ميثيل بولي ستايرين-داي سلفيد 39 المستخدم في الحمل الذيلي.

تخليق الطور الصلب: تم تحضير الأوليجومرات من المورفولينو على Gilson AMS-422 Automated Peptide Synthesizer في أعمدة تفاعل بولي بروبيلين من نوع Gilson سعة 2 ملليلتر (Part # 3980270). تم وضع كتلة ألومينيوم بقنوات لتدفق الماء حول الأعمدة عند ارتكازها على وحدة التخليق. سيضيف AMS-422 على نحو بديل المادة الكاشفة/محاليل الغسيل، الحفاظ عليها بفترة زمنية محددة، وتفريغ الأعمدة باستخدام وسط خوائي.

للأوليجومرات في النطاق بالطول الذي يصل حتى حوالي 25 من الوحدات الفرعية، يتم تفضيل راتنج من أمينو ميثيل بولي ستايرين-داي سلفيد بحمل يُقارب 500 ميكرو مول/جم من الراتنج.

للأوليجومرات الأكبر، يتم تفضيل راتنج من أمينو ميثيل بولي ستايرين–داي سلفيد بحمل يبلغ 300–400 ميكرو مول/جم من الراتنج. إذا كان جزيء بحمل ذيلي عند الطرف 5' مطلوبًا، يتم اختيار الراتنج الذي تم تحميله بحمل ذيلي باستخدام نفس إرشادات التحميل.

تم تحضير محاليل المادة الكاشفة التالية:

- محلول نزع الترايتيل: 10% من حمض سيانو أسيتيك (وزن/حجم) في 4: 1 داي كلورو ميثان/أسيتو نيتريل؛
- محلول المعادلة: 5% من داي أيزو بروبيل إيثيل أمين في 3: 1 داي كلورو ميثان/أيزو بروبانول؛ و
- محلول الإقران: 0,18 مولار (أو 0,24 مولار للأوليجومرات التي نمت لما يزيد عن طول من 20 وحدة فرعية) من وحدة مورفولينو فرعية منشطة بالقاعدة ونوع الرابط المطلوبين و0,4 مولار من N إيثيل مورفولين، في 1، 3–داي ميثيل إيميدازوليدينون.

تم استخدام داي كلورو ميثان (DCM) كمحلول غسيل انتقالي يفصل نواتج غسيل محلول المادة الكاشفة المختلفة.

على وحدة التخليق، مع ضبط الكتلة على 42 درجة مئوية، إلى كل عمود محتوي على 30 مجم من راتنج من أمينو ميثيل بولي ستايرين–داي سلفيد (أو الراتنج الذيلي) تمت إضافة 2 ملليلتر من 1–ميثيل–2–بيروليدينون والسماح بالترسيب عند درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة. بعد الغسيل 2 مرة باستخدام 2 ملليلتر من داي كلورو ميثان، تم استخدام دورة التخليق التالية:

الخطوة	الحجم	التوصيل	زمن الاحتجاز
نزع الترايتيل	1,5 ملليلتر	مُشعب	15 ثانية
نزع الترايتيل	1,5 ملليلتر	مُشعب	15 ثانية
نزع الترايتيل	1,5 ملليلتر	مُشعب	15 ثانية
نزع الترايتيل	1,5 ملليلتر	مُشعب	15 ثانية

	نزع الترايتيل	1,5 ملليلتر	مُشعب	15 ثانية
	نزع الترايتيل	1,5 ملليلتر	مُشعب	15 ثانية
	نزع الترايتيل	1,5 ملليلتر	مُشعب	15 ثانية
	DCM	1,5 ملليلتر	مُشعب	30 ثانية
5	معادلة	1,5 ملليلتر	مُشعب	30 ثانية
	معادلة	1,5 ملليلتر	مُشعب	30 ثانية
	معادلة	1,5 ملليلتر	مُشعب	30 ثانية
	معادلة	1,5 ملليلتر	مُشعب	30 ثانية
	معادلة	1,5 ملليلتر	مُشعب	30 ثانية
10	معادلة	1,5 ملليلتر	مُشعب	30 ثانية
	DCM	1,5 ملليلتر	مُشعب	30 ثانية
	الإقران	350–500 ميكرو لتر	محقنة	40 دقيقة
	DCM	1,5 ملليلتر	مُشعب	30 ثانية
	معادلة	1,5 ملليلتر	مُشعب	30 ثانية
15	معادلة	1,5 ملليلتر	مُشعب	30 ثانية
	DCM	1,5 ملليلتر	مُشعب	30 ثانية
	DCM	1,5 ملليلتر	مُشعب	30 ثانية
	DCM	1,5 ملليلتر	مُشعب	30 ثانية

تمت برمجة متواليات الأوليجومرات الفردية في وحدة التخليق بحيث يستقبل كل عمود محلول الإقران الملائم (A,C,G,T,I) في المتوالية الملائمة. عندما يُتم الأوليجومر الموجود في عمود تضمين الوحدة الفرعية النهائية الخاصة به، تمت إزالة من العمود الكتلة وتنفيذ دورة نهائية يدوياً باستخدام محلول إقران مُكوّن من 4-ميثوكسي تراي فنيل ميثيل كلوريد (0,32 مولار في DMI) محتوي على 0,89 مولار 4-إيثيل مورفولين.

الانشطار عن الراتنج وإزالة القواعد ومجموعات الحماية الأساسية: بعد المعالجة بميثوكسي ترايتيل، تم غسيل الراتنج 8 مرات باستخدام 2 ملليلتر من 1-ميثيل-2-بيروليدينون. تمت إضافة واحد ملليلتر من محلول انشطار متكون من 0,1 مولار 1، 4-داي ثيو ثريتول (DTT) و0,73 مولار تراي إيثيل أمين في 1-ميثيل-2-بيروليدينون، تمت تغطية العمود، والسماح له بالاستقرار عند درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة. بعد ذلك الوقت، تم تصريف المحلول في قنينة Wheaton سعة 12 ملليلتر. تم غسل الراتنج المنكمش بصورة كبيرة مرتين باستخدام 300 ميكرو لتر من محلول الانشطار. إلى المحلول تمت إضافة 4,0 ملليلتر من أمونيا مائية مركزة (مخزنة عند -20 درجة مئوية)، تمت تغطية القنينة بإحكام (باستخدام غطاء ملولب مبطن بالتيفلون)، وتم تدويم الخليط لمزج المحلول. تم وضع القنينة في فرن عند 45 درجة مئوية لمدة 16-24 ساعة لتفيعل انشطار القاعدة ومجموعات الحماية الأساسية.

تنقية المنتج الخام: تمت إزالة محلول التفكيك بإقحام الأمونيا المعبأ في قنينات من الفرن والسماح له بالتبريد وصولاً إلى درجة حرارة الغرفة. تم تخفيف المحلول باستخدام 20 ملليلتر من 0,28% أمونيا مائية وتمريره من خلال عمود 2,5 × 10 سم محتوي على راتنج Macroprep HQ (BioRad). تم استخدام تدرج ملح (A: 0,28% أمونيا مع B: 1 مولار صوديوم كلوريد في 0,28% أمونيا؛ صفر-100% B في 60 دقيقة) لفصل الذروة المحتوية على ميثوكسي ترايتيل تتابعيًا. تم تبريد الأجزاء المدمجة ومعالجتها بشكل إضافي اعتمادًا على المنتج المطلوب.

عملية نزع ميثوكسي ترايتيل لأوليجومرات من مورفولينو: تمت معالجة الأجزاء المجمعة من عملية التنقية Macroprep باستخدام 1 مولار H3PO4 لخفض الرقم الهيدروجيني وصولاً إلى 2,5. بعد الخلط الأولي، تم وضع العينات عند درجة حرارة الغرفة لمدة 4 دقائق، في ذلك الوقت تمت

معادلتها وصولاً للرقم الهيدروجيني 10-11 باستخدام 2,8% أمونيا/الماء. تمت تنقية المنتجات بواسطة استخلاص طور صلب (SPE).

تعبئة وتكييف عمود SPE: تتم تعبئة Amberchrome CG-300M (Rohm و Haas؛ Philadelphia، PA) (3 ملليلتر) في أعمدة من الفريت سعة 20 ملليلتر (BioRad Econo-Pac Chromatography Columns (732-1011) وشطف الراتنج باستخدام 3 ملليلتر مما يلي: 0,28% من NH4OH/80% من أسيتو نيتريل؛ 0,5 مولار NaOH/20% من إيثانول؛ الماء؛ 50 مللي مولار H3PO4/80% من أسيتو نيتريل؛ الماء؛ 0,5 من NaOH/20% من إيثانول؛ الماء؛ 0,28% من NH4OH.

تنقية SPE: تم تحميل المحلول من خطوة نزع ميثوكسي ترايتيل على العمود وشطف الراتنج ثلاث مرات باستخدام 3-6 ملليلتر من 0,28% أمونيا مائية. تم وضع قنينة Wheaton (12 ملليلتر) تحت العمود وفصل المنتج تتابعيًا بواسطة مرتي غسيل باستخدام 2 ملليلتر من 45% أسيتو نيتريل في 0,28% أمونيا مائية.

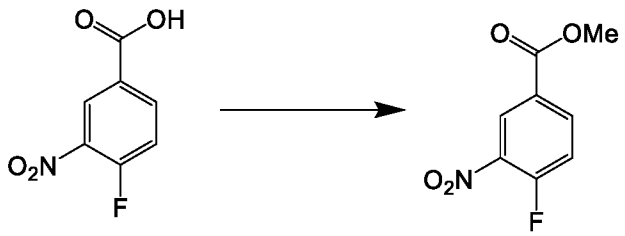
عزل المنتج: تم تجميد المحاليل في ثلج جاف ووضع القنينات في مجفف بالتجميد لإنتاج مسحوق أبيض خفيف. تمت إذابة العينات في الماء، ترشيحها من خلال مرشح 0,22 ميكرون (Pall Life Sciences، مرشح بمحقنة سعة 25 مللي مولار من نوع Acrodisc، بغشاء 0,2 ميكرون من نوع HT Tuffryn) باستخدام محقنة وتم قياس الكثافة البصرية (OD) على مقياس طيف ضوئي بالأشعة فوق البنفسجية لتحديد وحدات OD للأوليجومر الموجود، إضافة إلى عينة توزيع للتحليل. ثم تم وضع المحاليل مرة أخرى في قنينات Wheaton للتجفيف بالتبريد.

تحليل الأوليجومرات من المورفولينو بواسطة MALDI: تم استخدام قياس الطيف الكتلي MALDI-TOF لتحديد تركيبة الأجزاء في عمليات التنقية إضافة إلى توفير دليل لتحديد (الوزن الجزيئي) الأوليجومرات. تم تشغيل العينات بعد التخفيف باستخدام محلول من حمض 3، 5-داي ميثوكسي-4-هيدروكسي سينابيك (حمض سينابينيك)، 3، 4، 5-تراي هيدروكسي أسيتوفينون (THAP) أو حمض ألفا-سيانو-4-هيدروكسي سينابيك (HCCA) كمواد مصفوفة.

الطريقة ب لتخليق PMO: استخدام مثبت NCP2

تخليق مثبت NCP2:

1. تحضير ميثيل 4-فلورو -3-نيترو بنزوات (1)

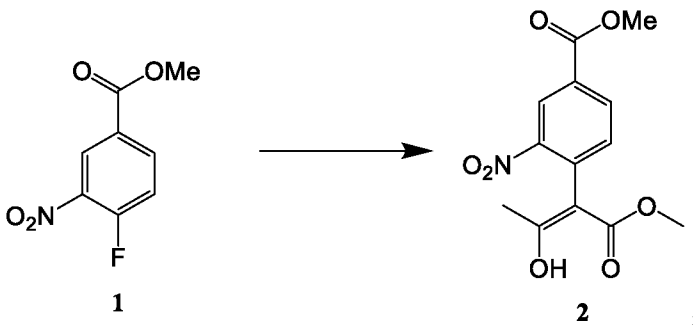


صورة **1**

إلى دورق 100 ملليلتر تم شحن 12.7 كجم حمض 4-فلورو -3-نيترو بنزويك وإضافة 40 كجم ميثانول و2.82 كجم حمض سلفوريك مركز. تم تقليب الخليط عند الارتجاع (65 درجة مئوية) لمدة 36 ساعة. تم تبريد خليط التفاعل إلى صفر درجة مئوية. تم احتجاز البلورات المتكونة عند 38 درجة مئوية. تم بعد ذلك ترشيح الخليط عند صفر درجة مئوية لمدة 4 ساعات في جو من الإنتروجين. تم غسل دورق 100 لتر وغسل عجينة الترشيح بـ 10 كجم ميثانول تم تبريده إلى صفر درجة مئوية. تم تجفيف عجينة الترشيح الصلبة على القمع لمدة 1 ساعة، ونقلها إلى صينيات، وتجفيفها في فرن تفريغ عند درجة حرارة الغرفة إلى وزن ثابت يبلغ 13.695 كجم ميثيل 4-فلورو -3-نيترو بنزوات (100% حصيلة؛ HPLC 99%).

2. تحضير حمض 3-نيترو -4-(2-أوكسو بروبيل) بنزويك

أ. (Z)-ميثيل 4-(3-هيدروكسي -1-ميثوكسي -1-أوكسو بت-2-ين-2-يل)-3-نيترو بنزوات (2)

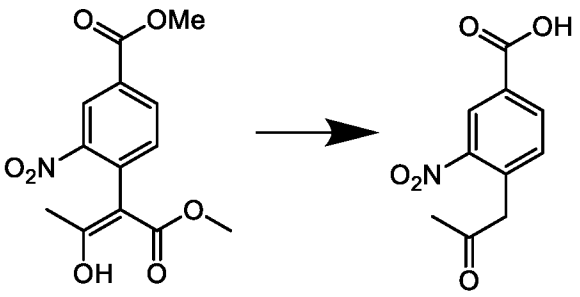


1 **2**

صورة

إلى دورق 100 ملليلتر تم شحن 3.98 كجم ميثيل 4-فلورو -3-نيترو بنزوات (1) من الخطوة السابقة 9.8 كجم DMF، 2.81 كجم ميثيل أسيتو أسيتات. تم تقليب الخليط وتبريده إلى صفر درجة مئوية. إلى ذلك تم إضافة 3.66 كجم DBU لمدة حوالي 4 ساعات مع الإبقاء على درجة الحرارة عند 5 درجة مئوية أو أقل. تم تقليب الخليط لمدة 1 ساعة إضافية. إلى دورق التفاعل تم إضافة محلول من 8.15 كجم حمض سيتريك في 37.5 كجم ماء نقي مع الإبقاء على درجة حرارة التفاعل عند 15 درجة مئوية أو أقل. بعد الإضافة، تم تقليب خليط التفاعل لمدة 30 دقيقة إضافية ثم ترشحه في جو من الإنتروجين. تم إعادة عجينة الترشيح الرطبة إلى دورق 100 لتر مع 14.8 كجم ماء نقي. تم تقليب الملاط لمدة 10 دقائق ثم ترشيحه. تم مرةً أخرى إعادة العجينة الرطبة إلى دورق 100 لتر، وتمليطها مع 14.8 كجم ماء نقي لمدة 10 دقائق، وترشيحها إلى (Z)-ميثيل 4-(3-هيدروكسي -1-ميثوكسي -1-أوكسو بت-2-ين-2-يل)-3-نيترو بنزوات خام.

B. حمض 3-نيترو -4-(2-أوكسو بروبيل) بنزويك



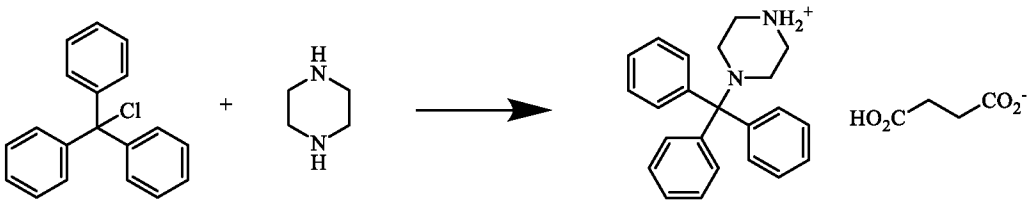
2 3

صورة

تم شحن (Z)-ميثيل 4-(3-هيدروكسي -1-ميثوكسي -1-أوكسو بت-2-ين-2-يل)-3-نيترو بنزوات خام إلى دورق تفاعل 100 لتر في جو من الإنتروجين. إلى ذلك تم إضافة 14.2 كجم 1، 4-دايوكسان ثم تمليطه. إلى الخليط تم إضافة محلول من 16.655 كجم HCl مركز و13.33 كجم ماء نقي (6 مولار HCl) على مدار ساعتين في حين أن درجة حرارة خليط التفاعل تم الإبقاء عليها أقل من 15 درجة مئوية. عند اكتمال الإضافة، تم تسخين خليط التفاعل عند الارتجاع (80 درجة مئوية) لمدة 24 ساعة، وتبريده إلى درجة حرارة الغرفة، وترشيحه في جو من الإنتروجين. تم معالجة عجينة الترشيح الصلبة بتريتيوم مع 14.8 كجم ماء نقي، وترشيحها،

ومعالجتها بتريتيوم مرةً أخرى مع 14.8 كجم ماء نقي، وترشيحها. تم إعادة المادة الصلبة إلى الدورق 100 لتر مع 39.9 كجم DCM وإرجاعها بالتقليب لمدة 1 ساعة. تم إضافة 1.5 كجم ماء نقي لإذابة المواد الصلبة المتبقية. تم شطر الطبقة العضوية المترسبة إلى دورق 72 لتر مسخن مسبقًا، ثم إعادتها إلى دورق نظيف جاف 100 لتر. تم تبريد المحلول إلى صفر درجة مئوية، والإبقاء عليه لمدة 1 ساعة، ثم ترشيحه. تم غسل عجينة الترشيح الصلبة مرتين كل مرة بمحلول 9.8 كجم DCM و5 كجم هبتان، ثم تجفيفها على القمع. تم نقل المادة الصلبة إلى صينيات وتجفيفها إلى وزن ثابت يبلغ 1.855 كجم حمض 3-نيترو -4-(2-أوكسو بروبيل) بنزويك. الحصيلة الكلية 42% من مركب 1. HPLC 99.45%.

3. تحضير N-تريتيل بيبرازين سكسينات (NTP)



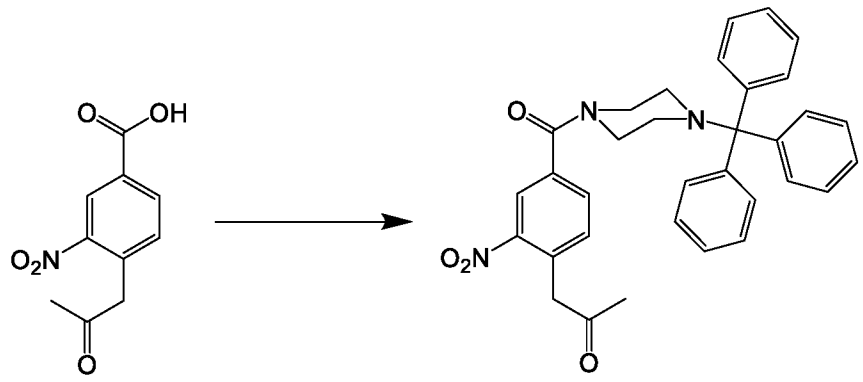
صورة

إلى دورق مبطن سعته 72 لتر تم شحنه في جو من الإنتروجين 1.805 كجم بتراي فينيل ميثيل كلوريد و8.3 كجم تولوين (محلول TPC). تم تقليب الخليط حتى ذوبان المواد الصلبة. إلى دورق التفاعل المبطن الذي سعته 100 لتر تم إضافة في جو من الإنتروجين 5.61 كجم بيبرازين، 19.9 كجم تولوين، و3.72 كجم ميثانول. تم تقليب الخليط وتبريده إلى صفر درجة مئوية. إلى ذلك تم وببطء إضافة أجزاء من محلول TPC على مدار 4 ساعات مع الإبقاء على درجة حرارة التفاعل عند أو أقل من 10 درجة مئوية. تم تقليب الخليط لمدة 1.5 ساعة عند 10 درجة مئوية، ثم السماح بتدفئته إلى 14 درجة مئوية. تم شحن 32.6 كجم ماء نقي إلى دورق 72 لتر، ثم نقله إلى الدورق 100 لتر إلى أن تم المحافظة على درجة حرارة الدفعة الداخلية عند 20 /+- 5 درجة مئوية. تم السماح بتقسيم الطبقات وفصل الطبقة المائية السفلية وتخزينها. تم استخلاص الطبقة العضوية ثلاث مرات كل مرة بـ 32 كجم ماء نقي، وفصل الطبقات المائية وتجمعها مع المحلول المائي المخزن.

تم تبريد الطبقة العضوية المتبقية إلى 18 درجة مئوية وإضافة محلول 847 جم من حمض سكسينيك في 10.87 كجم ماء نقي ببطء في أجزاء إلى الطبقة العضوية. تم تقليب الخليط لمدة 1.75 ساعة عند 20 /+- 5 درجة مئوية. تم ترشيح الخليط، وغسل المواد الصلبة بـ 2 كجم TBME و2 كجم أسيتون ثم تجفيفها على القمع. تم طحن عجينة الترشيح مرتين بـ 5.7 كجم، كل مرة بأسيتون وترشيحها وغسلها بـ 1 كجم أسيتون بين مرات الطحن. تم تجفيف المادة الصلبة على القمع، ثم نقلها إلى صينيات وتجفيفها في فرن مفرغ عند درجة حرارة الغرفة إلى وزن ثابت يبلغ 2.32 كجم NTP. حصيلة 80%.

4. تحضير (4-(2-هيدروكسي بروبيل)-3-نيترو فينيل)(4-تريتيل بيبرازين -1-يل) ميثانون

أ. تحضير 1-(2-نيترو -4(4-تريتيل بيبرازين -1-كربونيل) فينيل) بروبان -2-أون

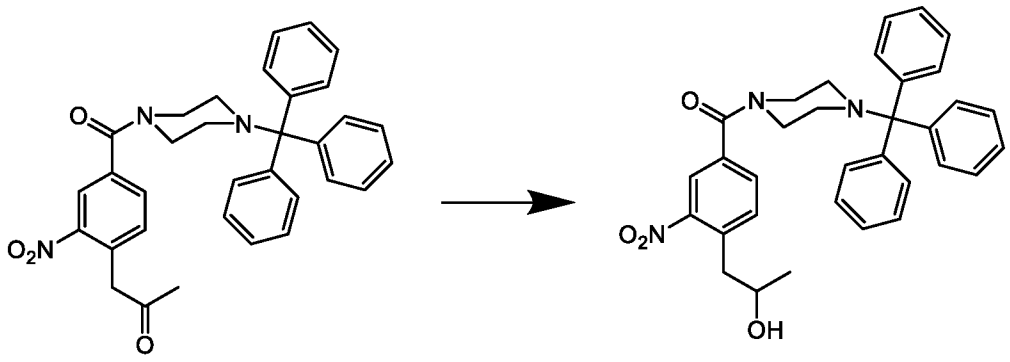


صورة

إلى دورق مبطن سعته 100 لتر تم شحن في جو من الإنتروجين 2 كجم بحمض 3-نيترو -4-(2-أوكسو بروبيل) بنزويك (3)، 18.3 كجم DCM، و1.845 كجم N-(3-داي ميثيل أمينو بروبيل)-N′-إيثيل كربو داي إيميد هيدرو كلوريد (EDC.HCl). تم تقليب المحلول إلى أن تكوَّن خليط متجانس. تم إضافة 3.048 كجم NTP على مدار 30 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة وتقليبه لمدة 8 ساعات. تم إضافة 5.44 كجم ماء نقي إلى خليط التفاعل وتقليبه لمدة 30 دقيقة. تم السماح بفصل الطبقات وتفريغ الطبقة العضوية السفلية المحتوية على المنتج وتخزينها. تم استخلاص الطبقة المائية مرتين بـ 5.65 كجم DCM. تم غسل الطبقات العضوية المجمعة بمحلول من 1.08 كجم صوديوم كلوريد في 4.08 كجم ماء نقي. تم تجفيف الطبقات العضوية فوق 1.068 كجم صوديوم سلفات وترشيحها. تم غسل الصوديوم سلفات بـ 1.3 كجم DCM. تم

تمليط الطبقات العضوية المجمعة بـ 252 جم سيليكا جل وترشيحها من خلال قمع ترشيح له طبقة 252 جم جل سيليكا. تم غسل طبقة جل السيليكا بـ 2 كجم DCM. تم تبخير الطبقات العضوية المجمعة على مبخر دوار. تم إضافة 4.8 كجم THF إلى الوحدة البنائية ثم تبخيرها على المبخر الدوار إلى أن تم الحصول على 2.5 حجم من 1-(2-نيترو -4(4-تريتيل بيبرازين -1-كربونيل) فينيل) بروبان -2-أون الخام في THF.

ب. تحضير (4-(2-هيدروكسي بروبيل)-3-نيترو فينيل)(4-تريتيل بيبرازين -1-يل) ميثانون (5)



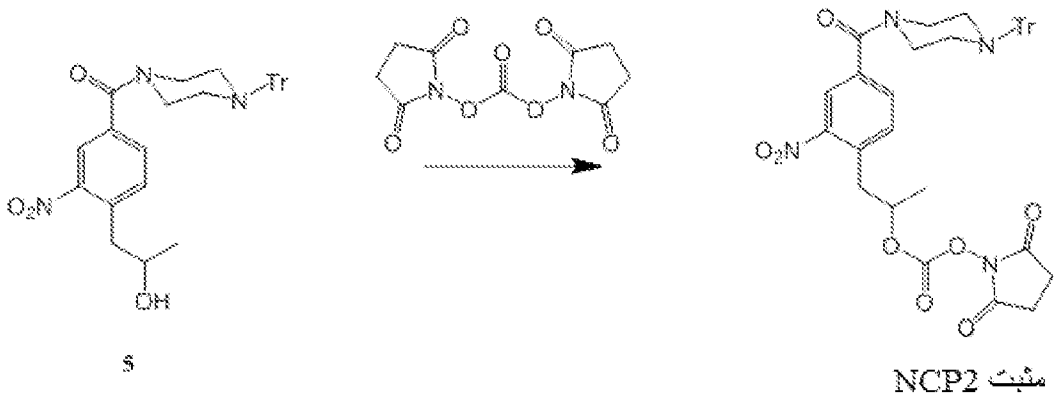
صورة

إلى دورق مبطن سعته 100 لتر تم شحن في جو من الإنتروجين 3600 جم 4 من الخطوة السابقة و9800 جم THF. تم تبريد المحلول المقلَّب إلى أكبر من أو يساوي 5 درجة مئوية. تم تخفيف المحلول بـ 11525 جم إيثانول وإضافة194 جم صوديوم بورو هيدريد على مدار حوالي ساعتين عند أكبر من أو يساوي 5 درجة مئوية. تم تقليب خليط التفاعل ساعتين إضافيتين عند أكبر من أو يساوي 5 درجة مئوية. تم إخماد التفاعل بمحلول به حوالي 1.1 كجم أمونيوم كلوريد في حوالي 3 كجم ماء مع الإضافة البطيئة للإبقاء على درجة الحرارة عند أكبر من أو يساوي 10 درجة مئوية. تم تقليب خليط التفاعل 30 دقيقة إضافية، وترشيحه لإزالة المواد غير العضوية، وشحنها إلى دورق مبطن سعته 100 لتر واستخلاصها بـ 23 كجم DCM. تم فصل الطبقة العضوية واستخلاص الطقة المائية مرتين أخريين كل مرة بـ 4.7 كجم DCM. تم غسل الطبقات العضوية المجمعة بمحلول به حوالي 800 جم صوديوم كلوريد في حوالي 3 كجم ماء، ثم تجفيفها فوق 2.7 كجم صوديوم سلفات. تم ترشيح المعلق وغسل عجينة الترشيح بـ 2 كجم DCM. تم

تركيز نواتج الترشيح المجمعة إلى 2.0 حجم، وتجفيفها بحوالي 360 جم إيثيل أسيتات، وتبخيرها. تم شحن المنتج الخام على حجم جل سيليكا و4 كجم سيليكا مغلف بـ DCM في جو من الإنتروجين وتصفيته تتابعيًا بـ 2.3 كجم إيثيل أسيتات في 7.2 كجم DCM. تم تبخير الأجزاء المجمعة واستهلاك المتبقي في 11.7 كجم تولوين. تم ترشيح محلول تولوين وغسل عجينة الترشيح مرتين كل مرة بـ 2 كجم تولوين. تم تجفيف عجينة الترشيح إلى وزن ثابت 2.275 كجم من المركب 5 (46% حصيلة من مركب 3) HPLC 96.99%.

5. تحضير 2، 5-داي أوكسو بيروليدين-1-يل(1-(2-نيترو -4-(4-تراي فينيل ميثيل بيبرازين -1 كربونيل) فينيل) بروبان -2-يل) كربونات (مثبت NCP2)

صورة



5

مثبت NCP2

إلى دورق مبطن سعته 100 لتر تم شحن في جو من الإنتروجين 4.3 كجم مركب 5 (تم ضبط الوزن بناءً على التولوين المتبقي بواسطة H1 NMR؛ تم تقشير جميع المواد الكاشفة فيما بعد وفقًا لذلك) و12.7 كجم بيريدين. إلى ذلك تم شحن 3.160 كجم DSC (78.91 وزن % بواسطة H1 NMR) مع الإبقاء على درجة الحرارة الداخلية عند أكبر من أو يساوي 35 درجة مئوية. تم تعتيق خليط التفاعل لمدة حوالي 22 ساعة عند درجة حرارة الغرفة ثم ترشيحه. تم غسل عجينة الترشيح بـ 200 جم بيريدين. في دفعتين تشتمل كل منهما على نصف حجم الترشيح، وشحن ناتج غسل الترشيح ببطء إلى دورق مبطن سعته 100 لتر به محلول من حوالي 11 كجم حمض سيتريك في حوالي 50 كجم ماء وتقليبه لمدة 30 دقيقة للسماح بترسيب المواد الصلبة. تم تجميع

المادة الصلبة باستخدام قمع ترشيح، وغسلها مرتين بـ 4.3 كجم ماء لكل غسلة، وتجفيفها على قمع الترشيح في جو من التفريغ.

تم شحن المواد الصلبة المجمعة إلى دورق مبطن سعته 100 لتر وإذابتها في 28 كجم DCM وغسلها بمحلول من 900 جم بوتاسيوم كربونات في 4.3 كجم ماء. بعد 1 ساعة، تم السماح بفصل الطبقات وإزالة الطبقة المائية. تم غسل الطبقة العضوية بـ 10 كجم ماء، وفصلها، وتجفيفها فوق 3.5 كجم صوديوم سلفات. تم ترشيح DCM، وتبخيره، وتجفيفه مع التفريغ إلى 6.16 كجم مثبت NCP2 (114% حصيلة).

تخليق راتنج محمل بمثبت NCP2

إلى 75 لتر تم شحن مفاعل تخليق في الطور الصلب له سدادة تيفلون بحوالي 52 لتر NMP و2300 جم راتنج أمينو ميثيل بولي ستيرين. تم تقليب الراتنج في NMP لنفخه لمدة حوالي ساعتين ثم نزحه. تم غسل الراتنج مرتين بحوالي 4 لتر DCM لكل غسلة، ثم مرتين بـ 39 لتر محلول تعادل لكل غسلة، ثم مرتين بـ 39 لتر DCM لكل غسلة. تم وببطء إضافة محلول مثبت NCP2 إلى محلول الراتنج المقلب، وتقليبه لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة الغرفة، ونزحه. تم غسل الراتنج أربع مرات بـ 39 لتر NMP لكل غسلة، وست مرات بـ 39 لتر DCM لكل غسلة. تم معالجة الراتنج وتقليبه 2/1 محلول سدادة DEDC لمدة 30 دقيقة، ونزحه، ومعالجته وتقليبه بالنصف الثاني من 2/1 محلول سدادة DEDC لمدة 30 دقيقة ونزحه. تم غسل الراتنج ست مرات بـ 39 لتر DCM لكل غسلة ثم تجفيفه في فرن إلى وزن ثابت يبلغ 3573.71 جم راتنج محمل على مثبت.

تحضير أوليجومر مورفولينو باستخدام مثبت NCP2

50 لتر تخليق الإيتيبليرسين في الطور الصلب (PMO رقم 1) مادة عقار خام

1. المواد

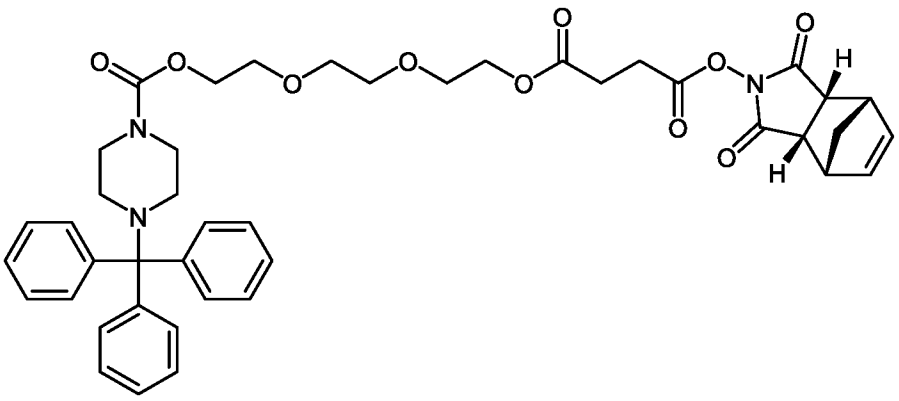
الجدول 2: المواد البادئة

[0242] اسم المادة	[0243] الاسم الكيميائي	[0244] رقم CAS	[0245] الصيغة الكيميائية	[0246] الوزن الجزيئي
[0247] وحدة A الفرعية المنشطة	[0248] إستر حمض فوسفوراميدوكلوريديك، N، N-داي ميثيل -، [6-[6-(بنزويل أمينو)-9H-بيورين-9-يل]-4-(تراي فينيل ميثيل)-2-مورفولينيل]ميثيل	[0249] 11-55373-30-0	[0250] C38H37ClN7O4P	[0251] 722.2
[0252] وحدة C الفرعية المنشطة	[0253] إستر حمض فوسفوراميدوكلوريديك، N، N-داي ميثيل -، [6-[4-(بنزويل أمينو)-2- أوكسو -1(2H)-بيريميدينيل]-4-(تراي فينيل ميثيل)-2-مورفولينيل]ميثيل	[0254] 11-55373-31-1	[0255] C37H37ClN5O5P	[0256] 698.2
[0257] وحدة DPG الفرعية المنشطة	[0258] إستر حمض بروبانويك، 2، 2-داي ميثيل -، 4-[[[9-[6-[[[كلورو (داي ميثيل أمينو)فوسفينيل]أوكسي]ميثيل]-4-(تراي فينيل ميثيل)-2-مورفولينيل]-2-[(2- فينيل	[0259] 11-55309-89-9	[0260] C51H53ClN7O7P	[0261] 942.2

	أسيتيل)أمينو]-9H-بيورين-6-يل]أوكسي]ميثيل] فينيل			
[0262]] وحدة T الفرعية المنشطة	[0263] إستر حمض فوسفوراميدوكلوريديك، N، N-داي ميثيل -، [6-(3، 4-داي هيدرو -5-ميثيل -2، 4-داي أوكسو -1(2H)-بيريميدينيل)]-4-(تراي فينيل ميثيل)-2-مورفولينيل]ميثيل	[0264] 11 -55373 4-34	[0265] C31H34 ClN4O5P	[0266] [609.1
[0267]] ذيل EG3 المنشط	[0268] إستر حمض بيوتان دايوك، 1-[3aR، 4S، 7aS ،7R)-1، 3، a3، 4، 7، a7-هكسا هيدرو -1، 3-داي أوكسو -4، 7-ميثانو-2H- أيزو إندول-2-يل] 4-[2-[2-[2-[[[4-(تراي فينيل ميثيل)-1-بيبرازين yl]كربونيل]أوكسي] إيثوكسي] إيثوكسي]إيثيل]	[0269] 13 -80600 5-06	[0270] C43H47 N3O10	[0271] [765.9

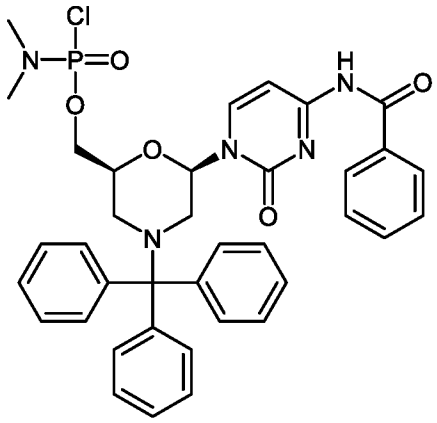
البنيات الكيميائية للمواد البادئة:

أ. ذيل EG3 المنشَّط



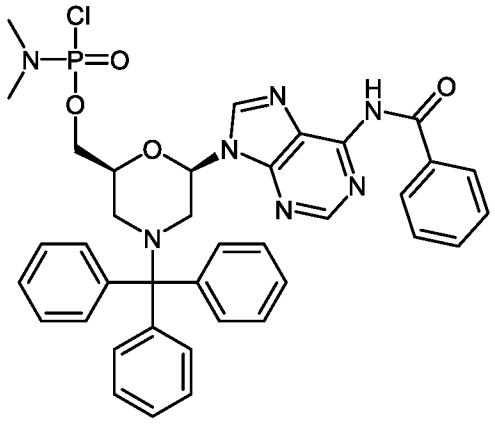
صورة

ب. وحدة C الفرعية المنشطة (للتحضير، انظر البراءة الأمريكية رقم 8,067,571)



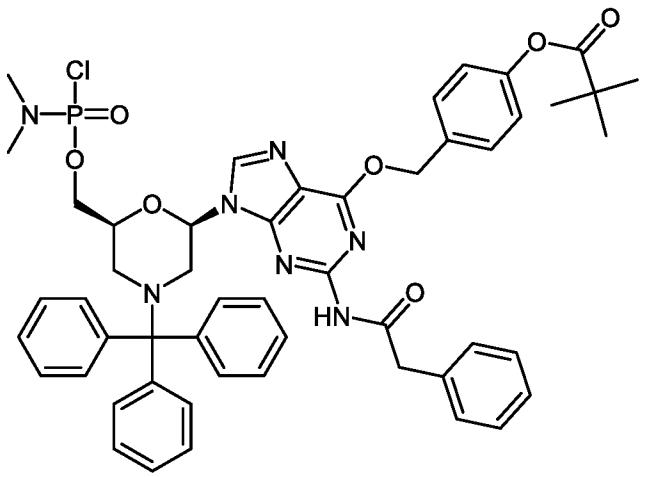
صورة

جـ. وحدة A الفرعية المنشطة (للتحضير، انظر البراءة الأمريكية رقم 8,067,571)



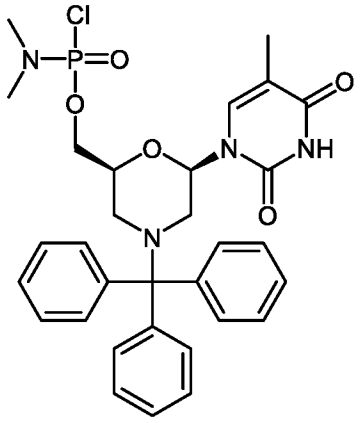
صورة

د. وحدة DPG الفرعية المنشطة (للتحضير، انظر الطلب الدولي WO 2009/064471)



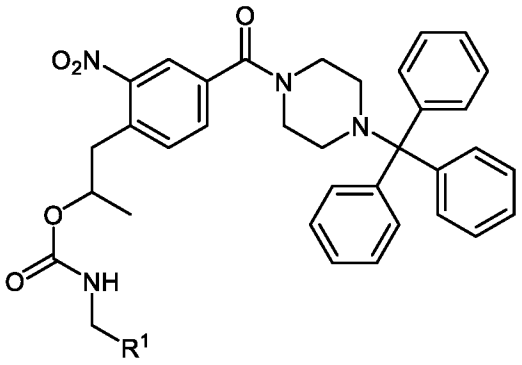
صورة

هـ. وحدة T الفرعية المنشطة (للتحضير، انظر الطلب الدولي WO 2013/082551)



صورة

و. راتنج محمل على مثبت



صورة

حيث تكون R1 عبارةً عن حامل-وسط.

الجدول 3: وصف محاليل لتخليق أوليجومرات في الطور الثابت لمادة عقار إيتيبليرسين خام

[0272] اسم المحلول	[0273] تركيبة المحلول
[0274] محلول مثبت NCP2	[0275] 37.5 لتر NMP و1292 جم مثبت NCP2
[0276] محلول انسداد DEDC	[0277] 4.16 لتر داي إيثيل داي كربونات (DEDC)، 3.64 لتر NEM، و33.8 لتر DCM
[0278] محلول CYTFA	[0279] 2.02 كجم 4-سيانو بيريدين، 158 لتر DCM، 1.42 لتر TFA، 39 لتر TFE، و2 لتر ماء نقي
[0280] محلول تعادل	[0281] 35.3 لتر IPA، 7.5 لتر داي PEA، و106.5 لتر DCM
[0282] محلول انشطار	[0283] 1، 530.04 جم DTT، 6.96 لتر NMP، و2.98 لتر DBU

2. تخليق مادة عقار إيتيبليرسين خام

أ. انتفاخ الراتنج

تم شحن 750 جم راتنج محمل على مثبت و10.5 لتر NMP إلى مفاعل معالج بسيلان 50 لتر وتقليبه لمدة 3 ساعات. تم نزح NMP وتم غسل الراتنج المحمل على مثبت مرتين كل مرة بـ 5.5 لتر DCM ومرتين بـ 5.5 لتر كل 30% TFE/DCM.

ب. الدورة صفر: إقران ذيل EG3

تم غسل الراتنج المحمل على مثبت ثلاث مرات كل مرة بـ 5.5 لتر 30% TFE/DCM ونزحه، وغسله بـ 5.5 لتر محلول CYFTA لمدة 15 دقيقة ونزحه، وغسله مرةً أخرى بـ 5.5 لتر محلول CYTFA لمدة 15 دقيقة دون نزح مع شحن 122 ملليلتر NEM/DCM 1:1 وتقليب المعلق لمدة دقيقتين ونزحه. تم غسل الراتنج مرتين بـ 5.5 لتر محلول تعادل لمدة 5 دقائق ونزحه، ثم مرتين بـ 5.5 لتر كل DCM ونزحه. تم شحن محلول من 706.2 جم ذيل EG3 المنشَّط (الوزن الجزيئي 765.85) و234 ملليلتر NEM في 3 لتر DMI إلى الراتنج وتقليبه لمدة 3 ساعات عند درجة حرارة الغرفة ونزحه. تم غسل الراتنج مرتين مرة بـ 5.5 لتر محلول تعادل لمدة 5 دقائق لكل غسله، ومرةً بـ 5.5 لتر DCM ونزحه. تم شحن محلول من 374.8 جم بنزويك أنهيدريد و195 ملليلتر NEM في 2680 ملليلتر NMP وتقليبه لمدة 15 دقيقة ونزحه. تم تقليب الراتنج بـ 5.5 لتر محلول تعادل لمدة 5 دقائق، ثم غسله مرةً بـ 5.5 لتر DCM ومرتين بـ 5.5 لتر 30% TFE/DCM. تم تعليق الراتنج في 5.5 لتر 30% TFE/DCM واحتجازه لمدة 14 ساعة.

جـ. دورات إقران الوحدة الفرعية 1-30

1. علاجات الإقران المسبق

قبل كل دورة إقران على النحو الموصوف في الشكل 23، تم غسل الراتنج: 1) بـ 30% TFE/DCM؛ 2) أ) معالجته بمحلول CYTFA لمدة 15 دقيقة ونزحه، وب) معالجته بمحلول CYTFA لمدة 15 دقيقة وإليه تم إضافة NEM/DCM 1:1، وتقليبه، ونزحه؛ 3) تقليبه ثلاث مرات بمحلول تعادل؛ و4) غسله مرتين بـ DCM. انظر الشكل 23.

2. علاجات الإقران البعدية

بعد نزح كل محلول وحدة فرعية على النحو الموصوف في الشكل 23، تم غسل الراتنج: 1) بـ DCM؛ و2) غسله مرتين بـ 30% TFE/DCM. إذا تم احتجاز الراتنج لفترة زمنية قبل دورة الإقران التالية، لم يتم نزح محلول غسل TFE/DCM الثاني واحتجاز الراتنج في محلول غسل TFE/DCM المذكور. انظر الشكل 23.

3. دورات إقران الوحدة الفرعية المنشطة

تم إجراء دورات الإقران على النحو الموصوف في الشكل 23.

4. محلول غسل IPA النهائي

بعد خطوة الإقران النهائية على النحو الموصوف في الشكل 23، تم غسل الراتنج 8 مرات بـ 19.5 لتر كل IPA، وتجفيفه تحت التفريغ عند درجة حرارة الغرفة لمدة حوالي 63.5 ساعة إلى وزن مجفف يبلغ 5579.8 جم.

جـ. الانشطار

تم تقسيم مادة عقار إيتيبليسين خام مرتبط بالراتنج السابق إلى دفعتين، ومعالجة كل دفعة على النحو التالي. تم تقليب الدفعة 2، 789.9 جم راتنج: 1) بـ 10 لتر NMP لمدة ساعتين، ثم نزح NMP؛ 2) غسله ثلاث مرات بـ 10 لتر 30% TFE/DCM؛ 3) معالجته بـ 10 لتر محلول CYTFA لمدة 15 دقيقة؛ و4) 10 لتر محلول CYTFA لمدة 15 دقيقة تم إليه إضافة 130 ملليلتر 1:1 NEM/DCM وتقليبه لمدة دقيقتين ونزحه. تم معالجة الراتنج ثلاث مرات بـ 10 لتر محلول تعادل، وغسله ست مرات بـ 10 لتر DCM، وثمان مرات بـ 10 لتر NMP. تم معالجة الراتنج بمحلول انشطار 1530.4 جم DTT و2980 DBU في 6.96 لتر NMP

لمدة ساعتين لفصل مادة عقار الإيتيبليرسين الخام عن الراتنج. تم نزح محلول الانشطار واحتجازه في وعاء منفصل. تم غسل المفاعل والراتنج بـ 4.97 لتر NMP تم دمجه مع محلول الانشطار.

د. إزالة الحماية

تم نقل محلول الانشطار المدمج وغسول NMP إلى وعاء مضغوط تم إليه إضافة 39.8 لتر NH4OH (NH3•H2O) تم تبريده إلى درجة حرارة -10 درجة مئوية إلى -25 درجة مئوية في مجمد. تم منع تسريب وعاء الضغط وتسخينه إلى 45 درجة مئوية لمدة 16 ساعة ثم السماح بتبريده إلى 25 درجة مئوية. تم تخفيف محلول إزالة الحماية هذا والمحتوي على مادة عقار الإيتيبليرسين الخام بـ 1:3 ماء نقي وضبط رقمه الهيدروجيني إلى 3.0 بـ 2 مولار حمض فوسفوريك، ثم إلى رقم هيدروجيني 8.03 بـ NH4OH. HPLC (C18) 73-74%.

تنقية مادة عقار الإيتيبليرسين (PMO رقم 1) الخام

تم تحميل محلول إزالة الحماية من الجزء د السابق، والمحتوي على مادة عقار الإيتيبليرسين الخام على عمود راتنج تبادل أنيوني ToyoPearl Super-Q 650S (Tosoh Bioscience) وتصفيته تتابعيًا بتدرج 0-35% ب فوق حجم عمود 17 (محلول منظم أ: 10 مللي مولار صوديوم هيدروكسيد؛ محلول منظم ب: 1 مولار صوديوم كلوريد في 10 مللي مولار صوديوم هيدروكسيد) وتجميع أجزاء ذات نقاء مقبول (C18 وSCX HPLC) إلى محلول منتج عقار نقي. HPLC: 97.74% (C18) 94.58% (SCX).

تم إزالة الملح من محلول مادة العقار النقي وتجفيده إلى 1959 جم مادة عقار إيتيبليرسين النقي. حصيلة 61.4%؛ HPLC: 97.7% (C18) 94.6% (SCX).

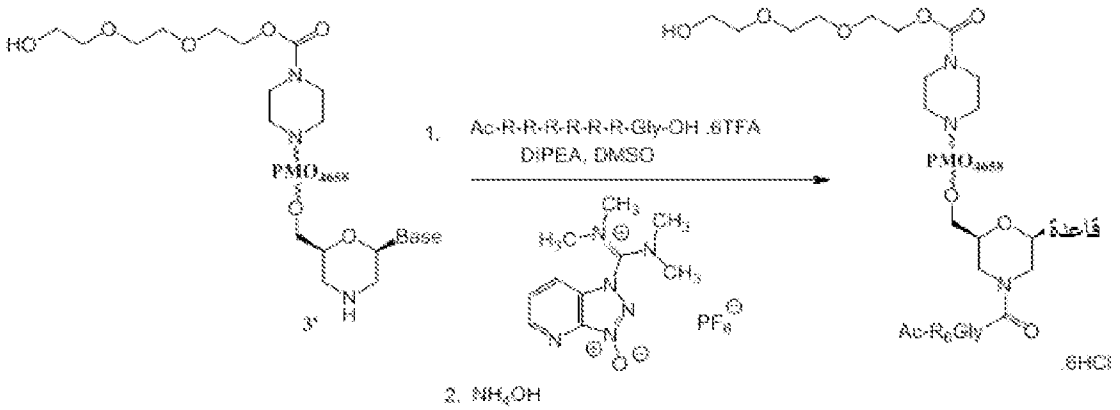
الجدول 5. الاختصارات

[0284]	الاختصار	[0285]	الاسم
[0286]	DBU	[0287]	1، 8-داي أزا بيسيكلو أنديك-7-ين
[0288]	DCM	[0289]	داي كلورو ميثان
[0290]	DIPEA	[0291]	N، N-داي أيزو بروبيل إيثيل أمين
[0292]	DMI	[0293]	1، 3-داي ميثيل -2- إيميدازوليدانون
[0294]	DTT	[0295]	داي ثيو ثريتول
[0296]	IPA	[0297]	كحول أيزو بروبيل
[0298]	MW	[0299]	الوزن الجزئيي

[0300]	NEM	[0301]	N-إيثيل
[0302]	NMP	[0303]	N-ميثيل -2-بيروليدون
[0304]	RT	[0305]	درجة حرارة الغرفة
[0306]	TFA	[0307]	حمض 2، 2، 2-تراي فلورو أسيتيك
[0308]	TFE	[0309]	2، 2، 2-تراي فلورو إيثانول

ترافق CPP

صورة



الإجراءات التحليلية: تم تسجيل أطياف كتلة زمن الانتقال بالتآين والمج بالليزر المساعَد على مصفوفة (MALDI-TOF-MS) على جهاز Bruker AutoflexTM Speed، باستخدام مصفوفة حمض سينابينيك (SA). تم إجراء SCX-HPLC على جهاز Thermo Dionex UltiMate 3000 مزود بكاشف مصفوفات 3000 دايود وعمود ProPacTM SCX-20 (250 × 4 مم) بمعدل تدفق 1.0 ملليلتر/دقيقة (برقم هيدروجيني = 2؛ درجة حرارة العمود 30

درجة مئوية). الأطوار المتحركة أ (25% أسيتو نيتريل في ماء يحتوي على 24 مللي مولار H3PO4) وب (25% أسيتو نيتريل في ماء يحتوي على 1 مولار KCl و24 مللي مولار H3PO4). تم استخدام التصفية التتابعية للتدرج: صفر دقيقة، 35% ب؛ 2 دقيقة، 35% ب؛ 22 دقيقة، 80% ب؛ 25 دقيقة، 80% ب؛ 25.1 دقيقة، 35% ب؛ 30 دقيقة، 35% ب.

إلى خليط PMO رقم 1 (1.82 جم، 0.177 مللي مول، مجفف خامًا بالتجفيد لمدة يومين)، OH-Gly-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Ac هكسا تراي فلورو أسيتات (614.7 مجم، 0.354 مللي مول)، و1-[بيس (داي ميثيل أمينو)ميثيلين]-1H-1، 2، 3-تريازولو [4، 5-b]بيريدينيوم 3-أكسيد هكسا فلورو فوسفات (HATU، 134.4 مجم، 0.354 مللي مول) تم إضافة داي ميثيل سلفوكسيد (DMSO، 20 ملليلتر). تم تقليب الخليط عند درجة حرارة الغرفة لمدة 3 دقائق، ثم إضافة N، N-داي أيزو بروبيل إيثيل أمين (DIPEA، 68.5 مجم، 0.530 مللي مول). بعد 5 دقائق، أصبح الخليط المغبر محلولًا شفافًا. تم مراقبة التفاعل بواسطة SCX-HPLC. بعد ساعتين، تم إضافة 20 ملليلتر 10% أمونيوم هيدروكسيد محلول (2.8% NH3). تم تقليب الخليط عند درجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين إضافيتين. تم إنهاء التفاعل بإضافة 400 ملليلتر ماء. تم إضافة تراي فلورو إيثانول (2.0 ملليلتر) إلى المحلول.

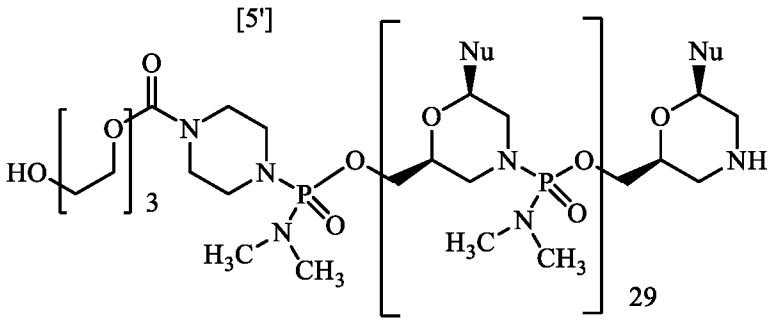
تم تقسيم المحلول إلى جزئين وتنقية كل جزء بواسطة عمود WCX (10 جم راتنج لكل عمود). تم أولًا غسل كل عمود WCX بـ 20% أسيتو نيتريل في ماء (حجم/حجم) لإزالة مادة PMO البادئة رقم 1. تم إيقاف عمليات الغسل (225 ملليلتر لكل عمود) عندما أظهر تحليل طيف كتلة MALDI-TOF غياب إشارة PMO رقم 1. تم بعد ذلك غسل كل عمود بماء (100 ملليلتر لكل عمود). تم تصفية المنتج المطلوب، PPMO رقم 1، تتابعيًا بواسطة 2.0 مولار جواندين HCl (140 ملليلتر لكل عمود). تم تجميع محاليل PPMO رقم 1 المجمعة معًا ثم تقسيمها إلى جزئين وإزالة الملح منهما بواسطة عمود SPE (10 جم راتنج لكل عمود).

تم أولًا غسل عمود SPE بـ 1.0 مولار محلول NaCl مائي (100 ملليلتر لكل عمود) لتوليد ملح هكسا هيدرو كلوريد من PPMO رقم 1. تم بعد ذلك غسل كل عمود SPE بماء (200 ملليلتر لكل عمود). تم تصفية PPMO رقم 1 النهائي الذي تم إزالة الملح منه بواسطة 50% أسيتو نيتريل في ماء (حجم/حجم، 150 ملليلتر لكل عمود). تم إزالة الأسيتو نيتريل بالتفريغ عند درجة

حرارة منخفضة. تم تجفيد المحلول المائي الناتج للحصول على مترافق هكسا هيدرو كلوريد PPMO رقم 1 الناتج (1.93 جم، 94.5% حصيلة).

المثال 1: PMO رقم 1

باستخدام الطريقة ب لتخليق بروتوكول PMO الموصوف أعلاه، تم تخليق PMO رقم 1:



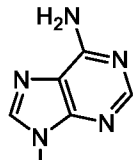
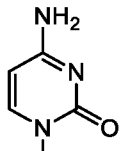
صورة 5

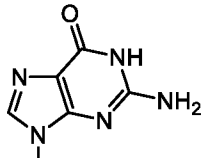
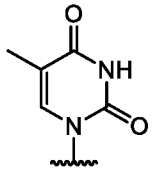
PMO رقم 1

حيث تكون كل Nu من 1 إلى 30 و5' إلى 3' عبارةً عن:

[0310]	[0311]	[0312]	[0314]	[0316]	[0318]	[0320]	[0322]
الموضع رقم 5' إلى 3'	Nu	الموضع رقم 5' إلى 3'	الموضع رقم 5' إلى 3'	الموضع رقم 5' إلى 3'	الموضع رقم 5' إلى 3'	الموضع رقم 5' إلى 3'	[0323] 1 C
[0324]	[0325]	[0326]	[0328]	[0330]	[0332]	[0333]	
[0324] 6	[0325] A	[0326] 11	[0328] 16	[0330] 21	[0332] 26	[0333] T	

[0345] C	0344] [27	[0343] C	0342] [22	[0341] G	0340] [17	[0339] A	0338] [12	[0337] C	0336] [7	[0335] T	0334] [2
[0357] T	0356] [28	[0355] A	0354] [23	[0353] A	0352] [18	[0351] G	0350] [13	[0349] A	0348] [8	[0347] C	0346] [3
[0369] A	0368] [29	[0367] T	0366] [24	[0365] T	0364] [19	[0363] G	0362] [14	[0361] T	0360] [9	[0359] C	0358] [4
[0381] G	0380] [30	[0379] T	0378] [25	[0377] G	0376] [20	[0375] A	0374] [15	[0373] C	0372] [10	[0371] A	0370] [5

حيث تكون A عبارةً عن صورة  ، تكون C عبارةً عن صورة  ، تكون G عبارةً

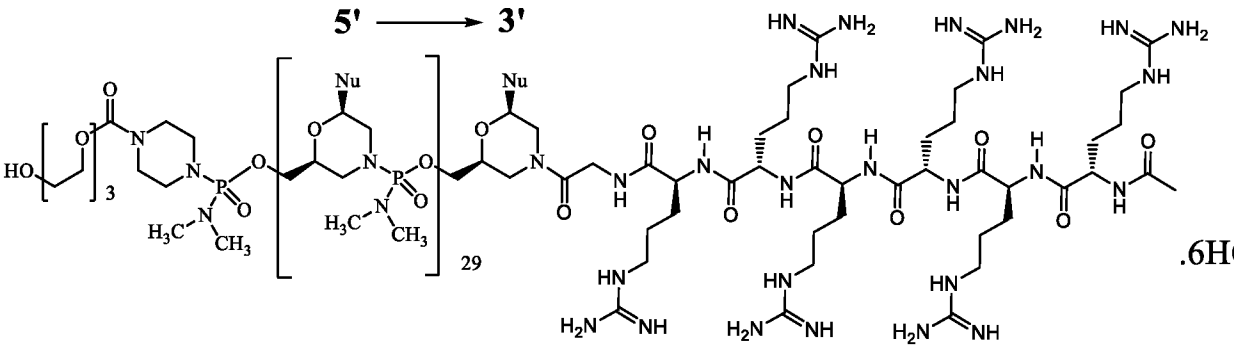
عن صورة  ، وتكون T عبارةً عن صورة  .

HPLC: 97.7% (C18) 94.6% (SCX).

المثال 2: PPMO رقم 1

باستخدام البروتوكول الموصوف أعلاه، تم تخليق PPMO رقم 1 من PMO رقم 1:

صورة



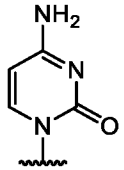
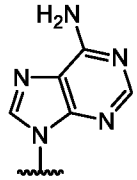
PPMO رقم 1

حيث تكون كل Nu من 1 إلى 30 و5' إلى 3' عبارةً عن:

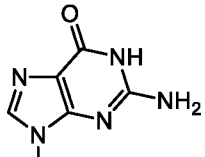
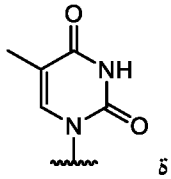
[0382]	[0383]	الموضع رقم	Nu	[0384]	[0385]	الموضع رقم	Nu	[0386]	[0387]	الموضع رقم	Nu	[0388]	[0389]	الموضع رقم	Nu	[0390]	[0391]	الموضع رقم	Nu	[0392]	[0393]	الموضع رقم	Nu

	5’ إلى 3’		5’ إلى 3’		5’ إلى 3’		5’ إلى 3’		5’ إلى 3’		5’ إلى 3’
[0405] T	0404] [26	[0403] G	0402] [21	[0401] A	0400] [16	[0399] A	0398] [11	[0397] A	0396] [6	[0395] C	0394] [1
[0417] C	0416] [27	[0415] C	0414] [22	[0413] G	0412] [17	[0411] A	0410] [12	[0409] C	0408] [7	[0407] T	0406] [2
[0429] T	0428] [28	[0427] A	0426] [23	[0425] A	0424] [18	[0423] G	0422] [13	[0421] A	0420] [8	[0419] C	0418] [3
[0441] A	0440] [29	[0439] T	0438] [24	[0437] T	0436] [19	[0435] G	0434] [14	[0433] T	0432] [9	[0431] C	0430] [4
[045	0452] [	[045	0450] [	[044	0448] [	[044	0446] [	[044	0444] [	[044	0442] [

3]		1]		9]		7]		5]		3]	
	30		25		20		15		10		5
G		T		G		A		C		A	

حيث تكون A عبارةً عن صورة ، تكون C عبارةً عن صورة ، تكون G عبارةً

عن صورة ، وتكون T عبارةً عن صورة .

يوضح تحليل SCX-HPLC أن النقاء بلغ 93.3% من خلال دمج القمة الأساسية و99.69% من خلال دمج PPMO الكلي رقم 1. طيف كتلة MALDI-TOF: m/z المحسوب لـ C404H647N202O130P30 [M + 1]:+ 11342.25؛ موجودة: 11342.12.

المثال 3: تخطي الإكسون 51 في المعمل (الخلايا العضلية)

تم تقييم مركبين يستهدفان ديستروفين الإكسون 51 البشري على النحو الموصوف في الجدول التالي، PMO رقم 1 وPPMO رقم 1 وقد تم تجميع كل منهما في نفس المتوالية، لتحديد قدرتهما على حث تخطي الإكسون 51.

[0458]	04] [57]	[0456]	متوالية استهداف (TS) [0455]	045] [4]
3’	5’	رقم متوالية TS		الاسم
[0463] H	[04 62]	[0461] 1	[0460] CTCCAACATCAAGGAAGATGG CATTTCTAG	[045 9]

	EG 3			PM O رقم 1
[0468] -G-R6	[0467] EG 3	[0466] 1	[0465] CTCCAACATCAAGGAAGATGG CATTTCTAG	[0464] PPM O رقم 1

على نحو محدد، تم استخدام خلايا عضلية بشرية متمايزة لتحديد قدرة المركبات السابقة على حث تخطي الإكسون 51 عند تركيزات مختلفة (أي، 40 ميكرو متر، 20 ميكرو متر، 10 ميكرو متر، 5 ميكرو متر، 2.5 ميكرو متر، و1.25 ميكرو متر). بعد التمايز، تم حضانة الخلايا مع المركبات لمدة ست وتسعين ساعة متبوعةً بعزل RNA وقياس تخطي الإكسون 51 بواسطة RT-PCR على النحو الموصوف أعلاه. تم عرض النتائج، التي توضح أن PPMO رقم 1 يعمل كبيرة على زيادة تخطي الإكسون 51 مقارنةً بـ PMO رقم 1، في الجدول التالي والشكل 4:

[0469]	[0470] النسبة المئوية لتخطي الإكسونات					
[0471] الجرعة (ميكرو متر)	[0472] 40	[0473] 20	[0474] 10	[0475] 5	[0476] 2.5	[0477] 1.25
[0478] المركب	[0479]	[0480]	[0481]	[0482]	[0483]	[0484]

[0491]	[0490]	[0489]	[0488]	[0487]	[0486]	[0485]
4.16	12.8	15.3	22.23	34.56	41.93	PMO رقم 1
[0498]	[0497]	[0496]	[0495]	[0494]	[0493]	[0492]
12.13	23.53	37.46	56.76	58.9	68.03	PPMO رقم 1

المثال 4: دراسة فأر MDX

يعد فأر mdx نموذجًا مقبولًا من الحيوانات ومعروف جيدًا بإصابته بالحَتَل العَضَلِيّ لدوشين (Duchene) (DMD) ويحتوي على طفرة في إكسون 23 بجين الديستروفين. من المعروف أن متوالية M23D المضادة لاتجاه النسخ (المتوالية رقم:2) تقوم بحث تخطي إكسون 23 وتستعيد تعبير الديستروفين الوظيفي. تم إعطاء فئران MDX عمرها 6-7 أسابيع حقنةً واحدة في وريد الذيل من PPMO4225 أو PMO4225 وفقًا للجدول التالي عند جرعة 40 مجم/كجم، أو مع محلول ملحي مركز.

[0499]	[0500] متوالية الاستهداف (TS)	[0501]	[05 02]	0] 50 [3
الاسم		رقم متوالية TS	5'	3'
[0504]	[0505]	[0506]	[05 07]	[0 50 8]
PMO42 25	GGCCAAACCTCGGCTTACCT GAAAT	[		

H	EG3	2		
[0513]-G-R6	[0512] EG3	0511] [2	[0510] GGCCAAACCTCGGCTTACCT GAAAT	[0509] PPMO4225

تم تحضير كل من PMO4225 وPPMO4225 بالطريقة PMO أ وطرق ترافق CPP الموصوفة أعلاه.

تم ذبح الفئران المعالجة عند بعد 7، 30، 60 و90 يومًا من إعطاء حقنة واحدة (n = 6 لكل مجموعة). تم معالجة الحجاب الحاجز، القلب والعضلة رباعية الرؤوس اليمنى لتحليل بقعة ويسترن لقياس إنتاج بروتين ديستروفين ودرجة حرارة الغرفة من خلال تحليل RT-PCR لقياس النسبة المئوية لتخطي الإكسونات، ومعالجة العضلة رباعية الرؤوس اليسرى لتحديد الكيمياء الهيستولوجية المناعية وتبقيع H/E على النحو الموصوف أعلاه.

تم احتساب كمية استعادة بروتين الديستروفين ببقعة ويسترن، وقياس النسبة المئوية لتخطي إكسون 23 من خلال RT-PCR على النحو الموصوف أعلاه.

تم عرض نتائج RT-PCR في الأشكال 5أ-10ب وفي الجداول التالية. على نحو مدهش، أدى PPMO4225 إلى حث مستويات أعلى ومستدامة على نحو دال إحصائيًا من استعادة الديستروفين وتخطي الإكسون 23 مقارنة بـ PMO4225، مع وجود أعلى المستويات بعد 30 يومًا من الحقن. والمدهش أكثر أن PPMO4225 قد أدى إلى زيادة مستويات الديستروفين في

القلب بينما لم يؤدي PMO4225 إلى ذلك؛ لم يلاحظ الديستروفين وتخطي الإكسونات في القلب عند جميع النقاط الزمنية باستخدام PMO4225.

[0514] [0515] كمية بروتين ديستروفين باعتباره النسبة المئوية للبروتين غير المعالج (WT%) ببقعة ويسترن							
[0516] المركب	[0517] PMO4225			[0518] PPMO4225			
[0519] اليوم	[0520] 7	[0521] 30	[0522] 60	[0523] 90	[0524] 7	[0525] 30	[0526] 60	[0527] 90
[0528] النسيج	[0529]	[0530]	[0531]	[0532]	[0533]	[0534]	[0535]	[0536]
[0537] العضلة رباعية الرؤوس	[0538] 1.1	[0539] 2.3	[0540] 1.6	[0541] 0.7	[0542] 20.7	[0543] 28.1	[0544] 20.8	[0545] 8.2
[0546] الحجاب الحاجز	[0547] 1.4	[0548] 1.9	[0549] 1.3	[0550] 0.6	[0551] 14.5	[0552] 15.2	[0553] 9.8	[0554] 2.3
[0555] القلب	[0556]	[0557]	[0558]	[0559]	[0560]	[0561]	[0562]	[0563]

	0	0	0	0	2.0	1.0	0.9	0.1

[0565] النسبة المئوية لتخطي الإكسونات حسب قياس RT-PCR								[0564]
[0566] المركب	[0567] PMO4225				[0568] PPMO4225			
[0569] اليوم	[0571]	[0572]	[0573]	[0574]	[0575]	[0576]	[0577]	[0578]
7	30	60	90	7	30	60	90	
[0579] النسيج	[0580]	[0581]	[0582]	[0583]	[0584]	[0585]	[0586]	
[0587] العضلة رباعية الرؤوس	[0589]	[0590]	[0591]	61.5	42.02	[0594]	[0595]	
21.2	5.5	7.9	2.8			28.8	6.9	
[0596] الحجاب الحاجز	[0598]	[0599]	[0600]	51.6	36.76	[0603]	[0604]	
29.9	2.6	0.5	0			3.05	0	

[0605] القلب	[060 6] 0	[06 07] 0	[06 08] 0	[06 09] 0	[0610] 13.15	[0611] 2.64	[061 2] 0	[06 13] 0

تم عرض نتائج الكيمياء الهيستولوجية المناعية في الشكل 11. هنا، أدى PPMO4225 إلى استعادة الديستروفين في العضلة رباعية الرؤوس، في حين أن 4225 أدى إلى إنتاج نمط تعبير مرقع. يشير التوزيع المنتظم للديستروفين من خلال علاج PPMO4225 إلى انتشار استهداف العضلة الهيكلية. وقد أدى PPMO4225 وبدرجة كبيرة إلى تحسين الإعطاء مقارنةً PMO4225 في الخلية الحية.

المثال 5: تخطي الإكسون 51 في NHP

لإيضاح فاعلية تخطي إكسونات أوليجومرات PPMO المضادة لاتجاه النسخ، تم استخدام أوليات غير بشرية. على نحو محدد، تم حقن قرود رباح ذات أنسجة عضلية سليمة، بـ PPMO رقم 1، PMO رقم 1 (من المثال 2)، أو محلول ملحي مركز وفقًا لجدول الإعطاء في الجدول التالي:

جدول إعطاء الرباح

المجموعة	المركب	الجرعة (مجم/كجم)	رقم كل مجموعة	استراتيجية الإعطاء
1	PPMO رقم 1	20	3	1
2	PPMO رقم 1	40	3	

3	PPMO رقم 1	80	3	2 3 4 SAC الأسابيع
4	PPMO رقم 1	160	3	
5	PMO رقم 1	40	3	
6	Saline	0	2	مرةً أسبوعيًا، بإجمالي 4 جرعات تم ذبح الحيوانات بعد 48 ساعة من آخر جرعة، في اليوم 22
7	PPMO رقم 1	40	2	1 SAC 30 يومًا

				جرعة واحدة في اليوم 1 مع الاستعادة لمدة 4 أسابيع
8	PPMO رقم 1	40	2	1 60 يومًا SAC جرعة واحدة في اليوم 1 مع الاستعادة لمدة 8 أسابيع

تحملت الحيوانات في المجموعات 1-5 جميع الجرعات 4 عند 20، 40 و80 مجم/كجم. لم تتحمل الحيوانات 160 مجم/كجم بعد الجرعة الثالثة، مما أدى إلى تخدير حيوانين يوم إعطاء الجرعات وتخدير حيوان واحد في اليوم التالي. أظهرت هذه الحيوانات انخفاضًا في وزن الجسم.

5 في كل مرة تشريح، أو تخدير وقت الاحتضار مجدولة، تم تجميع قطاعات من الحجاب الحاجز، العضلة الملساء للإثنا عشر، المَرِيء، والأورطى، العضلة رباعية الرؤوس، العضلة الدالية، العضلة ذات الرأسين، والقلب وتجميدها في الحال. تم تحديد النسبة المئوية لتخطي الإكسون 51 باستخدام RT-PCR على النحو الموصوف أعلاه. تم عرض النتائج في الأشكال 12-15، وفي الجدول التالي.

[0614]	[0615]	النسبة المئوية لتخطي الإكسونات

[0616]	[0617] PPMO رقم 1				[0618] PMO رقم 1
العضلة	[0619] 20 مجم/كجم	[0620] 40 مجم/كجم	[0621] 80 مجم/كجم	[0622] 160 مجم/كجم	[0623] 40 مجم/كجم
[0624] عضلة رباعية الرؤوس	[0625] 5.2	[0626] 43.8	[0627] 92.4	[0628] nd	[0629] 0.0
[0630] الحجاب الحاجز	[0631] 30.2	[0632] 80.5	[0633] 94.9	[0634] 100.0	[0635] 0.0
[0636] ذات الرأسين	[0637] 4.4	[0638] 30.2	[0639] 65.7	[0640] 90.6	[0641] 0.0
[0642] العضلة الدالية	[0643] 6.8	[0644] 36.4	[0645] 78.2	[0646] 95.0	[0647] 0.0
[0648] القلب	[0649] 0.0	[0650] 2.6	[0651] 60.7	[0652] 98.5	[0653] 0.0

[0654]	[0655]	[0656]	[0657]	[0658]	[0659]
الإثنا عشر	14.9	17.0	61.0	71.4	0.0
[0660]	[0661]	[0662]	[0663]	[0664]	[0665]
المَرِيء	4.1	22.4	66.6	97.4	0.0
[0666]	[0667]	[0668]	[0669]	[0670]	[0671]
الأورطى	26.1	40.8	60.1	nd	4.8

nd = غير محدد

على نحو مدهش، أدى PPMO رقم 1 إلى إنتاج مستويات عميقة لتخطي الإكسونات في الأنسجة السليمة المختبرة مقارنةً بـ PMO رقم 1. على نحو محدد، في حين أن إعطاء PMO رقم 1 لم يؤدي أي تخطي ملاحظ في أي من الأنسجة المجمعة، فقد أدى PPMO رقم 1 إلى تخطي الإكسونات، على سبيل المثال، بزيادة 90% في عضلة رباعية الرؤوس والحجاب الحاجز وبزيادة 60% الإثنا عشر عند مستوى جرعات 80 مجم/كجم. وما يدهش على نحو خاص مستوى تخطي الإكسونات الذي تحقق لدى القلب عند، على سبيل المثال، 80 مجم/كجم في حين أن تخطي الإكسونات تم لكن بزيادة 60%. دون الرغبة في التقيد بنظرية بعينها، قد أدى الإعطاء الجهازي وإيصال PPMO رقم 1 إلى نسيج عضلة NHP غير الحثلية السليمة إلى تخطي الإكسون 51 بينما لم تُتوقع درجة PPMO رقم 1 على نحو محدد في عضلة القلب من فأر mdx السابق في المثال 4. بدلًا من ذلك، فقد اختلف الإعطاء لنسيج صحيح مثل NHP عن الإعطاء لنسيج حثلي.

فيما يتعلق بالمجموعتين 7 و8، تم تحديد النسبة المئوية لتخطي الإكسون 51 باستخدام RT-PCR على النحو الموصوف أعلاه. تم عرض النتائج في الشكل 22، وفي الجدول التالي.

[0672] العضلة	[0673] [0674] النسبة المئوية لتخطي الإكسونات PPMO رقم 1		
	[0675] يومًا	30	[0676] 60 يومًا
[0677] العضلة رباعية الرؤوس	[0678]	13.7	[0679] 4.6
[0680] الحجاب الحاجز	[0681]	62.4	[0682] 49.1
[0683] القلب	[0684]	3.1	[0685] 0
[0686] الجهاز المَعدي	[0687]	1.25	[0688] 0

على النحو الملاحظ من النتائج، كان تخطي الإكسونات أعلى عند 30 يومًا مقارنة بـ 60 يومًا في كل عضلة تم تحليلها، مما يوضح زيادة فاعلية تخطي الإكسونات على مدار الوقت بعد إعطاء جرعة واحدة.

المثال 6: دراسة استجابة فأر MDX للجرعات

تم إعطاء فئران MDX عمرها 6-7 أسابيع حقنة واحدة في وريد الذيل من PPMO4225 أو PMO4225 الموصوف أعلاه عند جرعة 40 مجم/كجم، 80 مجم/كجم، أو 120 مجم/كجم (n = 6 لكل مجموعة).

تم ذبح الحيوانات المعالجة عند 30 يومًا من الحقن. تم معالجة الحجاب الحاجز، العضلة رباعية الرؤوس، والقلب لتحليل بقعة ويسترن لقياس إنتاج بروتين الديستروفين بناءً على بروتوكول بقعة ويسترن السابق وصفه (المستخدم، على سبيل المثال، في المثال 4) مع التعديلات التالية:

[0689] المؤثر	[0690] بروتوكول بقعة ويسترن في المثال 4	[0691] تعديلات بروتوكول بقعة ويسترن
[0692] حساب البروتين	[0693] تجربة طقم بروتين RC DC	[0694] طريقة BCA
[0695] خطوة الإيقاف	[0696] طوال الليل عند 4 درجة مئوية	[0697] 1 ساعة عند درجة حرارة الغرفة
[0698] حضانة الجسم المضاد الأولي	[0699] 1 ساعة عند درجة حرارة الغرفة	[0700] طوال الليل عند 4 درجة حرارة الغرفة
[0701] تركيز الجسم المضاد الأولي	[0702] 20:1	[0703] 500:1

تم عرض استعادة بروتين ديستروفين بالنسبة المئوية للنوع غير المعالج % في الجدول التالي وفي الأشكال 16-19.

[0704]

[0705] احتساب بروتين الديستروفين بالنسبة المئوية للبروتين غير المعالج (%WT) ببقعة ويسترن

[0706] المركب	[0707] PMO4225			[0708] PPMO4225		
[0709] الجرعة (مجم/كجم)	[0710]] 40	[0711]] 80	[0712]] 120	07] [13 40	[0714] 80	[0715] 120

[0716] النسيج	[0717]	[0718]	[0719]	[0720]	[0721]	[0722]
[0723] الحجاب الحاجز	[0724] 0.80	[0725] 0.97	[0726] 1.83	[0727] 8.02	[0728] 26.03	[0729] 42.77
[0730] القلب	[0731] 0.13	[0732] 0.24	[0733] 0.34	[0734] 0.61	[0735] 6.34	[0736] 19.48
[0737] العضلة رباعية الرؤوس	[0738] 3.5	[0739] 2.6	[0740] 3.0	[0741] 43	[0742] 90	[0743] 144

على نحو مدهش، توضح البيانات أن جرعةً واحدة من PPMO4225 قد أدت إلى زيادة مستويات الديستروفين بصورة معتمدة على الجرعة في فئران mdx إلى مدى أكبر بكثر على نحو دال إحصائيًا من PMO4225.

المثال 7: دراسة IHC للحجاب الحاجز والقلب لدى فئران MDX

تم إعطاء فئران MDX عمرها 6-7 أسابيع حقنة واحدة في وريد ذيل PPMO4225 تبلغ 80 مجم/كجم أو محلول ملحي مركز، وإعطاء فئران غير معالجة عمرها 6-7 أسابيع حقنة من محلول ملحي مركز. تم ذبح فئران mdx غير المعالجة، فئران mdx تم إعطاؤها جرعة واحدة محلول ملحي مركز، وفئران غير معالجة بعد 30 يومًا (n = 4 لكل مجموعة). تم إيضاح نتائج الكيمياء الهيستولوجية المناعية في الشكل 24. هنا، توضح النتائج زيادةً منتظمة في الديستروفين في الأنسجة المرتبطة بالمرض والوفاة في DMD في فئران mdx المعالجة بـ PPMO4225.

المثال 8: تخطي الإكسون 51 في المعمل (الأرومات العضلية)

تم تقييم مترافقي أوليجومر مضادين لاتجاه النسخ يستهدفان ديستروفين (DMD) الإكسون 51 البشري على النحو الموصوف في الجدول التالي، PMO رقم 1 وPPMO رقم 1 يحتوي كل منهما على نفس المتوالية، لتحديد تخطي الإكسون DMD 51 في أرومات عضلية بشرية صحيحة.

متواليات PMO رقم 1 وPPMO رقم 1 لإكسون DMD 51 البشري.

[0744]	[0745] متوالية الاستهداف (TS)	[074] [6] رقم متوالية TS	[07] [47] ’5	[0] [74] [8] ’3
[0749]	[0750] CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTT CTAG	[075] [1] 1	[07] [52] EG 3	[0] [75] [3] H

[0754]	[0755]	[075]	[07	[0
]	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTT CTAG	[6	57]	75
PPM		1	EG	8]
O رقم			3	-
1				G
				-
				R
				6

على نحو محدد، تم وضع أورومات عضلية بشرية صحيحة (الممر 5-6، SKB-F-SL يباع لدى Zen-Bio, Inc.) على أطباق عند تجمع ~40% عند معالجتها بـ PMO رقم 1 أو PPMO رقم 1 بتركيزات متنوعة (أي، 40 ميكرو متر، 20 ميكرو متر، 10 ميكرو متر، 5 ميكرو متر، 2.5 ميكرو متر، و1.25 ميكرو متر) في أوساط SKM-M (Zen-Bio, Inc.). بعد ست وتسعين ساعة من الحضانة، تم غسل الأورومات العضلية بـ PBS وتحليلها بواسطة محلول RA1 منظم في طقم Illustra GE RNAspin 96 (رقم الكتالوج 25-055-75، GE Healthcare Bio-Sciences). تم عزل RNA الكلي وفقًا لتوصيات الشركة المصنعة، باستثناء استخدام 40 ميكرو لتر ماء خالٍ من RNase لتصفية RNA تتابعيًا.

لتحديد تخطي الإكسون 51 بواسطة كلا المركبين، تم إجراء RT-PCR عند النقطة الأخيرة والمكون من خطوتين. على نحو محدد، تم أولًا نسخ أحد عشر ميكرو لتر من RNA الكلي نسخًا عكسيًا إلى cDNA بواسطة طقم تخليق جدائل SuperScript IV أول (رقم الكتالوج 18091200، Invitrogen) باستخدام وحدات الهكساير العشوائية وفقًا لتعليمات الشركة المصنعة. تم إجراء PCR بإضافة 9 ميكرو لتر cDNA في PCR Supermix High Fidelity لبوليميراز Platinum Taq DNA (رقم الكتالوج 12532024، Invitrogen) ببادئات استهدفت إكسوني DMD البشريين 49 و52 [بادئة أمامية (المتوالية رقم:5) :

CCAGCCACTCAGCCAGTGAAG؛ بادئة عكسية (المتوالية رقم:6) :
CGATCCGTAATGATTGTTCTAGCC]. تم إجراء تضخيم PCR باستخدام برنامج دوران حراري في الزمن الفعلي من نوع BioRad CFX96 باستخدام البرنامج الموضح في الجدول التالي. تم تقييم تعبير منتجات PCR المتخطاة وغير المتخطاة بتحميل 32 ميكرو لتر من منتج PCR على جهاز LabChip GX باستخدام طقم DNA High Sensitivity Reagent (CLS760672, Perkin Elmer). تم احتساب النسبة المئوية تخطي الإكسون 51 DMD بالنسبة المئوية للمولارية (نانو مولار/لتر) لنطاق الإكسون 51 المتخطى (246 زوج قاعدة) مقارنة بالمولارية الكلية للنطاقات المتخطاة (246 زوج قاعدة) وغير المتخطاة (478 زوج قاعدة).

تم استخدام اختبار t للطلاب غير مقرون ثنائي الأطراف (متجانس التباين) لتقييم ما إذا كان متوسط المجموعتين يختلف إحصائيًا عن بعضهما البعض عند كل جرعة. تم اعتبار القيمة P أقل من 0.05 دالةً إحصائيًا.

برنامج الدوران الحراري المستخدم لتضخيم أمليكونات DMD مع أو بدون تخطي الإكسون 51.

[0759] الخطوة	[0760] درجة الحرارة	[0761] الزمن
[0762] 1.نزع الخواص الطبيعية	[0763] 94 درجة مئوية	[0764] 2 دقيقة
[0765] 2.نزع الخواص الطبيعية	[0766] 94 درجة مئوية	[0767] 30 ثانية
[0768] 3.التلدين	[0769] 55 درجة مئوية	[0770] 30 ثانية
[0771] 4.التمديد	[0772] 68 درجة مئوية	[0773] 1 دقيقة

[0774] 5.خطوة التكرار 4-2		[0775] 34 دورة			
[0776] 6.التمديد النهائي		[0777] 68 درجة مئوية		[0778] 5 دقيقة	
[0779] 7.التخزين		[0780] 4 درجة مئوية		[0781] ∞	

تم عرض النتائج في الجدول التالي وفي الشكل 25.

النسبة المئوية تخطي الإكسون DMD 51 بواسطة PMO رقم 1 وPPMO رقم 1 في أرومات عضلية بشرية.

[0782]	[0783] النسبة المئوية لتخطي الإكسونات (المتوسط ± SD)					
المركب/الجرعة (ميكرو متر)	[0784] 1.25	[0785] 2.5	[0786] 5	[0787] 10	[0788] 20	[0789] 40
[0790] PMO رقم 1	[0791] 0.66 ± 0.76	[0792] 1.49 ± 0.67	[0793] 2.76 ± 1.69	[0794] 2.63 ± 0.48	[0795] 5 ± 29. 1.36	[0796] 8 ± 46. 1.83
[0797] PPMO رقم 1	[0798] 2.20	[0799] 2.92	[0800] 6.28	[0801] 8.71	[0802] 1 ± 8.92 0.73	[0803] 2 ± 9.24 1.64

	± 0.09	± 0.69	± 0.14	± 1.26		

توضح النتائج المعملية هذه أن PPMO رقم 1 قد أدى على نحو دال إحصائيًا إلى زيادة تخطي إكسون DMD 51 مقارنة بـ PMO رقم 1 في أرومات عضلية بشرية.

المثال 9: تخطي الإكسون 51 في المعمل (نبيبات)

تم تقييم مترافقي أوليجومر مضادة لاتجاه النسخ يستهدفان إكسون الديستروفين (DMD) البشري 51، PMO رقم 1 وPPMO رقم 1 يحتوي كل منهما على نفس المتوالية، لتخطي إكسون DMD 51 في نبيبات بشرية صحيحة.

[0804]	[0805] متوالية الاستهدف (TS)	[080][6]	[08][07]	[0][80][8]
الاسم		رقم متوالي ة TS	5’	3’
[0809]	[0810] CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG	[081][1]	[08][12]	[0][81][3]
PMO رقم 1		1	EG 3	H
[0814]	[0815] CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG	[081][6]	[08][17]	[0][81][8]

PPMO رقم 1		1	EG3	-G-R6

على نحو محدد، تم استزراع أورمات عضلية بشرية صحيحة (الممر 5-6، SKB-F-SL يباع لدى Zen-Bio, Inc.) للوصول إلى تجمع 80-90% في أوساط SKM-M قبل بدء التمايز من خلال الحضانة في أوساط مصلية منخفضة (SKM-D, Zen-Bio, Inc.). بعد خمسة أيام من التمايز، تم حضانة النبيبات الناضجة مع PMO رقم 1 أو PPMO رقم 1 بتركيزات متنوعة (أي، 40 ميكرو متر، 20 ميكرو متر، 10 ميكرو متر، 5 ميكرو متر، 2.5 ميكرو متر، و1.25 ميكرو متر). بعد ست وتسعين ساعة من الحضانة، تم غسل النبيبات بـ PBS وتحليلها بمحلول تحليل RA1 منظم في طقم Illustra GE RNAspin 96 (رقم الكتالوج 25-055-75، GE Healthcare Bio-Sciences). تم عزل RNA الكلي وفقًا لتوصيات الشركة المصنعة، باستثناء استخدام 40 ميكرو لتر ماء خالٍ من RNase لتصفية RNA تتابعيًا.

لتحديد DMD تخطي الإكسون 51 بواسطة PMO رقم 1 أو PPMO رقم 1، تم إجراء RT-PCR عند النقطة الأخيرة والمكون من خطوتين. على نحو محدد، تم أولًا نسخ أحد عشر ميكرو لتر من RNA الكلي نسخًا عكسيًا إلى cDNA بواسطة طقم تخليق جدائل SuperScript IV أول (رقم الكتالوج 18091200، Invitrogen) باستخدام وحدات الهكساميرالعشوائية وفقًا لتعليمات الشركة المصنعة. تم إجراء PCR بإضافة 9 ميكرو لتر cDNA في PCR Supermix High Fidelity لبوليميراز Platinum Taq DNA (رقم الكتالوج 12532024، Invitrogen) ببادئات استهدفت إكسوني DMD البشريين 49 و52 [بادئة أمامية (المتوالية رقم:5) : CCAGCCACTCAGCCAGTGAAG؛ بادئة عكسية (المتوالية رقم:6) : CGATCCGTAATGATTGTTCTAGCC]. تم إجراء تضخيم PCR باستخدام برنامج دوران

حراري في الزمن الفعلي من نوع BioRad CFX96 باستخدام البرنامج الموضح في الجدول التالي. تم تقييم تعبير منتجات PCR المتخطاة وغير المتخطاة بتحميل 32 ميكرو لتر من منتج PCR على جهاز LabChip GX باستخدام طقم DNA High Sensitivity Reagent (CLS760672, Perkin Elmer). تم احتساب النسبة المئوية تخطي الإكسون 51 DMD بالنسبة المئوية للمولارية (نانو مولار/لتر) لنطاق الإكسون 51 المتخطى (246 زوج قاعدة) مقارنة مقارنة بالمولارية الكلية للنطاقات المتخطاة (246 زوج قاعدة) وغير المتخطاة (478 زوج قاعدة).

تم استخدام اختبار t للطلاب غير مقرون ثنائي الأطراف (متجانس التباين) لتقييم ما إذا كان متوسط المجموعتين يختلف إحصائيًا عن بعضهما البعض عند كل جرعة. تم اعتبار القيمة P أقل من 0.05 دالةً إحصائيًا.

برنامج الدوران الحراري المستخدم لتضخيم أمليكونات DMD مع أو بدون تخطي الإكسون 51.

[0819]	الخطوة	[0820]	درجة الحرارة	[0821]	الزمن
[0822]	8.نزع الخواص الطبيعية	[0823]	94 درجة مئوية	[0824]	2 دقيقة
[0825]	9.نزع الخواص الطبيعية	[0826]	94 درجة مئوية	[0827]	30 ثانية
[0828]	10.التلدين	[0829]	55 درجة مئوية	[0830]	30 ثانية
[0831]	11.التمديد	[0832]	68 درجة مئوية	[0833]	1 دقيقة
[0834]	12.خطوة التكرار 2-4	[0835]	34 دورة		

[0836]	13.التمديد النهائي	[0837]	68 درجة مئوية	[0838]	5 دقيقة
[0839]	14.التخزين	[0840]	4 درجة مئوية	[0841]	∞

تم عرض النتائج التي توضح أن PPMO رقم 1 قد أدى وعلى نحو دال إحصائيًا إلى زيادة تخطي إكسون DMD 51 مقارنة بـ PMO رقم 1، في الجدول التالي وفي الشكل 26.

النسبة المئوية لتخطي إكسون DMD 51 بواسطة PMO رقم 1 وPPMO رقم 1 في نبيبات بشرية.

[0842]	[0843] النسبة المئوية لتخطي الإكسونات (متوسط ± SD)					
المركب/الجرعة (ميكرو متر)	[0844] 1.25	[0845] 2.5	[0846] 5	[0847] 10	[0848] 20	[0849] 40
[0850] PMO رقم 1	[0851] 0.64 ± 0.84	[0852] 0.70 ± 0.08	[0853] 1.23 ± 0.49	[0854] 2.11 ± 0.88	[0855] 2 ± 85. 1.06	[0856] 5 ± 68. 1.83
[0857] PPMO رقم 1	[0858] 1.61	[0859] 2.80	[0860] 5.71	[0861] 8.18	[0862] 1 ± 6.08 1.90	[0863] 2 ± 7.79 4.04

		± 2.94	± 2.19	± 0.98	± 1.16	

****

يتم هنا تضمين كل النشرات وطلبات البراءات المذكورة في هذه المواصفة كمرجع كما لو أنه تم إيضاح كل نشرة فردية أو طلب براءة فردي بشكل خاص وعلى نحو متفرد ليتم تضمينها/تضمينه كمرجع.

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.

Abes, R., et al. (2008). "Arginine-rich cell penetrating peptides: design, structure-activity, and applications to alter pre-mRNA splicing by steric-block oligonucleotides." J Pept. Sci. 14: 455-460.

Alter, J., et al. (2006). "Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology." Nat. Med. 12(2): 175-177.

Bestas, B., et al. (2014). "Splice-Correcting ligonucleotides restore BTK function in X-linked agammaglobulinemia model." J. Clin. Invest.

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 .1668-1665 :(9-7)16

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

Jearawiriyapaisarn, N., et al. (2010). "Long-term improvement in mdx cardiomyopathy after therapy with peptide-Conjugated morpholino .oligomers." Cardiovascular Research 85: 444-453

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

Leblue, B., et al. (2008). "Cell penetrating peptide conjugates of steric .block oligonucleotides." Adv. Drug Deliv. Rev. 60: 517-529

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.

McClory, G., et al. (2006). "Antisense oligonucleotide-induced exon skipping restored dystrophin expression in vitro in a canine model of .DMD." Gene Therapy 13: 1373-1381

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

Moulton, H.M., (2007). "Cell-penetrating peptide-morpholino conjugates alter pre-mRNA splicing of DMD (Duchenne muscular dystrophy) and inhibit murine coronavirus replication in vivo." Biochem. Society Trans .828-826 :(4)35

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 .95-187 :(3)7

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 .86-2677 :(26)357

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

Wu, B., et al. (2012). "Long-term rescue of dystrophin expression and improvement in muscle pathology and function in dystrophic mdx mice by .peptide-Conjugated morpholino." The Am. J. Pathol. 181(2): 392-400

Wu, P., et al. (2007) "Cell-penetrating peptides as transporters for morpholino oligomers: effects of amino acid composition on intracellular .delivery and cytotoxicity." Nucleic Acids Research 35(15): 5182-5191

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): .18-3909

Yin, H., et al. (2011). "Pip5 transduction peptides direct high efficiency oligonucleotide-mediated dystrophin exon skipping in heart and .phenotypic correction in mdx mice." Mol. Ther 19(7): 1295-1303

Youngblood, D., et al. (2006). "Stability of cell-penetrating peptide-morpholino oligomer conjugates in human serum and in cells." Am. Chem. .Soc

قائمة المتواليات

الوصف	متوالية 5’ إلى 3’ أو الطرف N إلى الطرف C	المتوالية رقم
H51A(+66+9) (5	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCT AG	1
mdx4225	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	2
R6	RRRRRR	3
R6-G	RRRRRRG	4
بادئة ربط أمامية لإكسون 49 بشري	CCAGCCACTCAGCCAGTGAAG	5
بادئة ربط عكسية لإكسون 52 بشري	CGATCCGTAATGATTGTTCTAGCC	6
بادئة ربط أمامية لإكسون 23 فأري	CACATCTTTGATGGTGTGAGG	7
بادئة ربط عكسية لإكسون 23 فأري	CAACTTCAGCCATCCATTTCTG	8

قائمة المتواليات 5

<110> SAREPTA THERAPEUTICS, INC.

<120>مترافقات أوليجومرات تخطي الإكسون للحَثَل العَضَلِيّ

<130> AVN-026PC

<140> PCT/US2017/066222

<141> 2017-12-13

<150> US 62/436,182

<151> 2016-12-19

<150> US 62/443,476

<151> 2017-01-06

<150> US 62/479,173

<151> 2017-03-30

<150> US 62/562,080

<151> 2017-09-22

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213>المتوالية الاصطناعية

<220>

<223> Synthetic: H51A(+66+95)

<400> 1

ctccaacatc aaggaagatg gcatttctag 30

<210> 2 5

<211> 25

<212> DNA

<213>المتوالية الاصطناعية

<220>

<223> Synthetic: mdx4225 10

<400> 2

ggccaaacct cggcttacct gaaat 25

<210> 3

<211> 6

<212> PRT 15

<213>المتوالية الاصطناعية

<220>

<223> Synthetic: R6

<400> 3

Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT 5

<213>المتوالية الاصطناعية

<220>

<223> Synthetic: R6-G

<400> 4

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly 10

1 5

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213>المتوالية الاصطناعية 15

<220>

<223> Synthetic: Human exon 49 binding forward primer

<400> 5

ccagccactc agccagtgaa g 21

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213>المتوالية الاصطناعية

<220> 5

<223> Synthetic: Human exon 52 binding reverse primer

<400> 6

cgatccgtaa tgattgttct agcc 24

<210> 7

<211> 21 10

<212> DNA

<213>المتوالية الاصطناعية

<220>

<223> Synthetic: Mouse exon 23 binding forward primer

<400> 7 15

cacatctttg atggtgtgag g 21

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213>المتوالية الاصطناعية

<220>

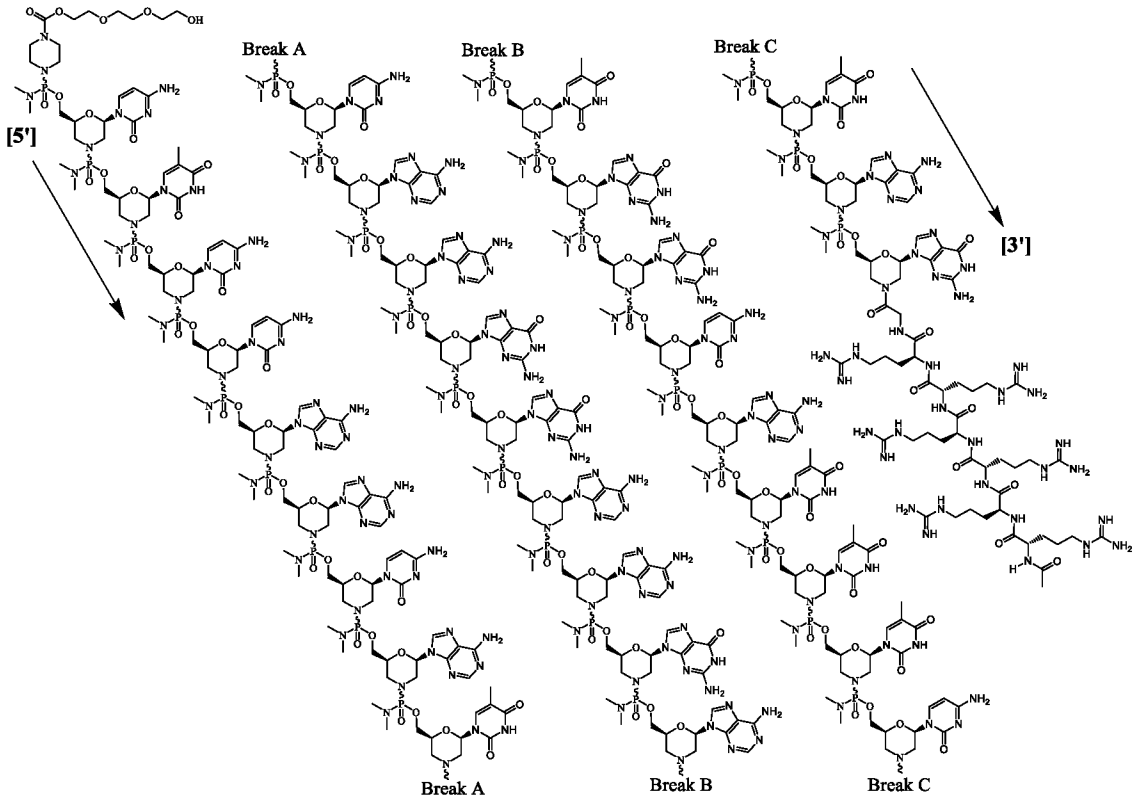
<223> Synthetic: Mouse exon 23 binding reverse primer

<400> 8

caacttcagc catccatttc tg 22 5

عناصر الحماية

1- متقارن قليل الوحدات/أوليجومر مضاد لاتجاه النسخ له الصيغة (IV):

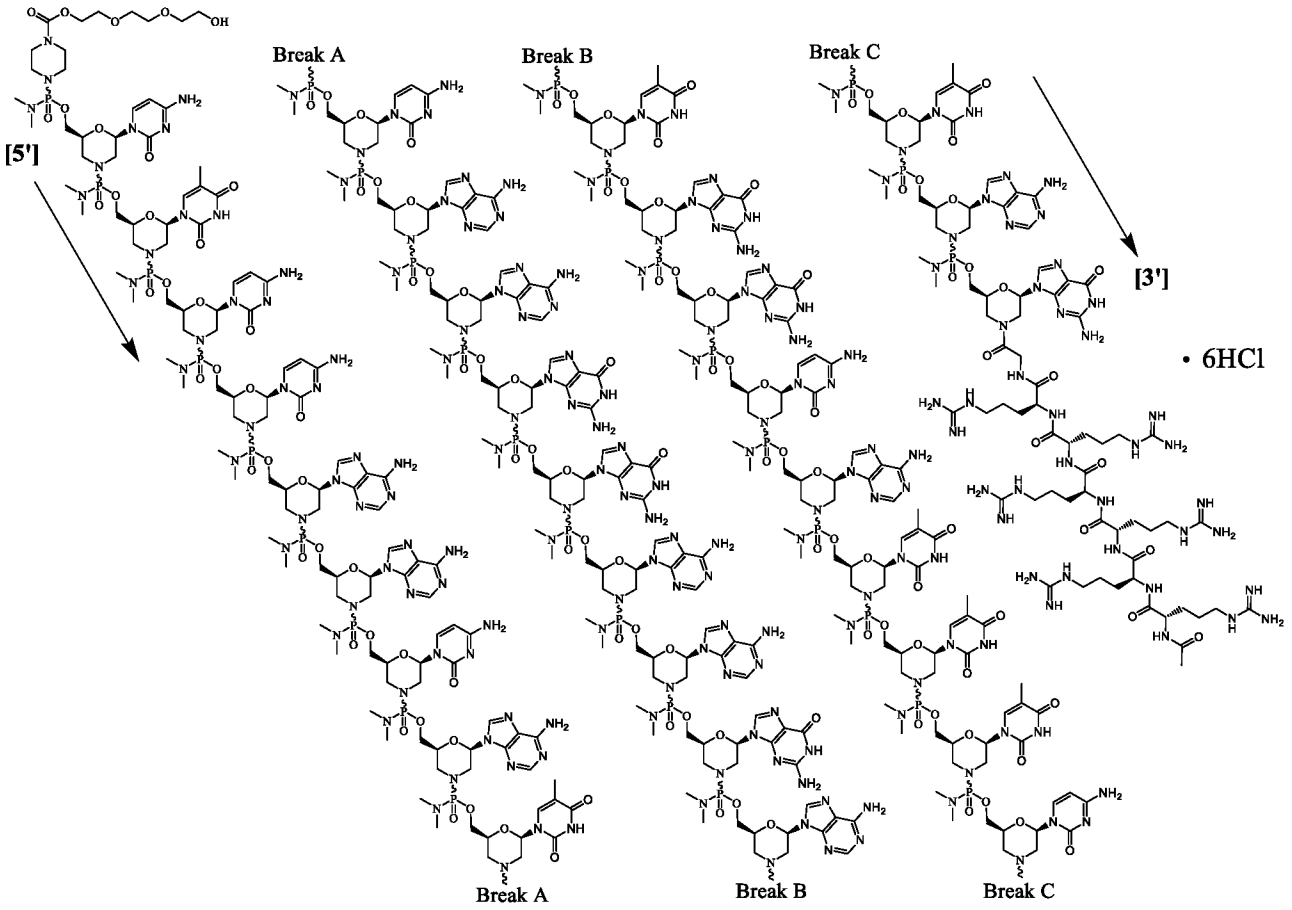


(IV)،

أو ملح مقبول صيدلانيًا منه.

2- المتقارن قليل الوحدات/أوليجومر المضاد لاتجاه النسخ وفقًا لعنصر الحماية 1، في صورة ملح مقبول صيدلانيًا.

3- المتقارن قليل الوحدات/أوليجومر المضاد لاتجاه النسخ وفقًا لعنصر الحماية 2 في صورة ملح مقبول صيدلانيًا له الصيغة (IVA):



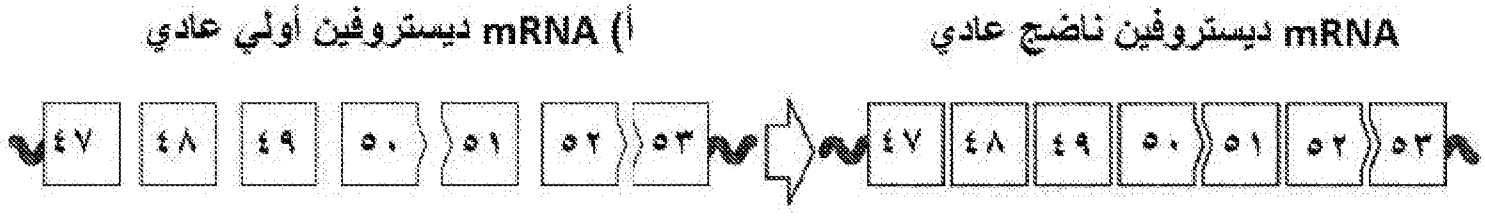
.(IVA)

4- المتقارن قليل الوحدات/أوليجومر المضاد لاتجاه النسخ وفقًا لعنصر الحماية 1 أو ملح مقبول صيدلانيًا منه، يشتمل أيضًا على مادة حاملة مقبولة صيدلانيًا.

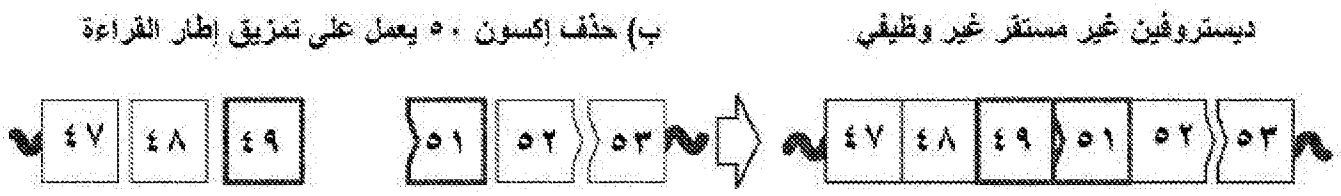
5- المتقارن قليل الوحدات/أوليجومر المضاد لاتجاه النسخ وفقًا لعنصر الحماية 2 في صورة ملح مقبول صيدلانيًا، يشتمل أيضًا على مادة حاملة مقبولة صيدلانيًا.

6- المتقارن قليل الوحدات/أوليجومر المضاد لاتجاه النسخ وفقًا لعنصر الحماية 3 في صورة ملح مقبول صيدلانيًا له الصيغة (IVA)، يشتمل أيضًا على مادة حاملة مقبولة صيدلانيًا.

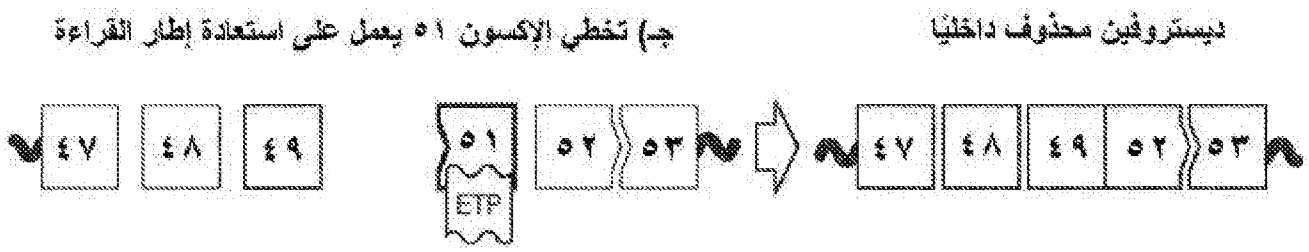
شكل ١


mRNA ديستروفين ناضج عادي
أ) mRNA ديستروفين أولي عادي
٤٧
٤٨
٤٩
٥٠
٥١
٥٢
٥٣
٤٧
٤٨
٤٩
٥٠
٥١
٥٢
٥٣

شكل ٢

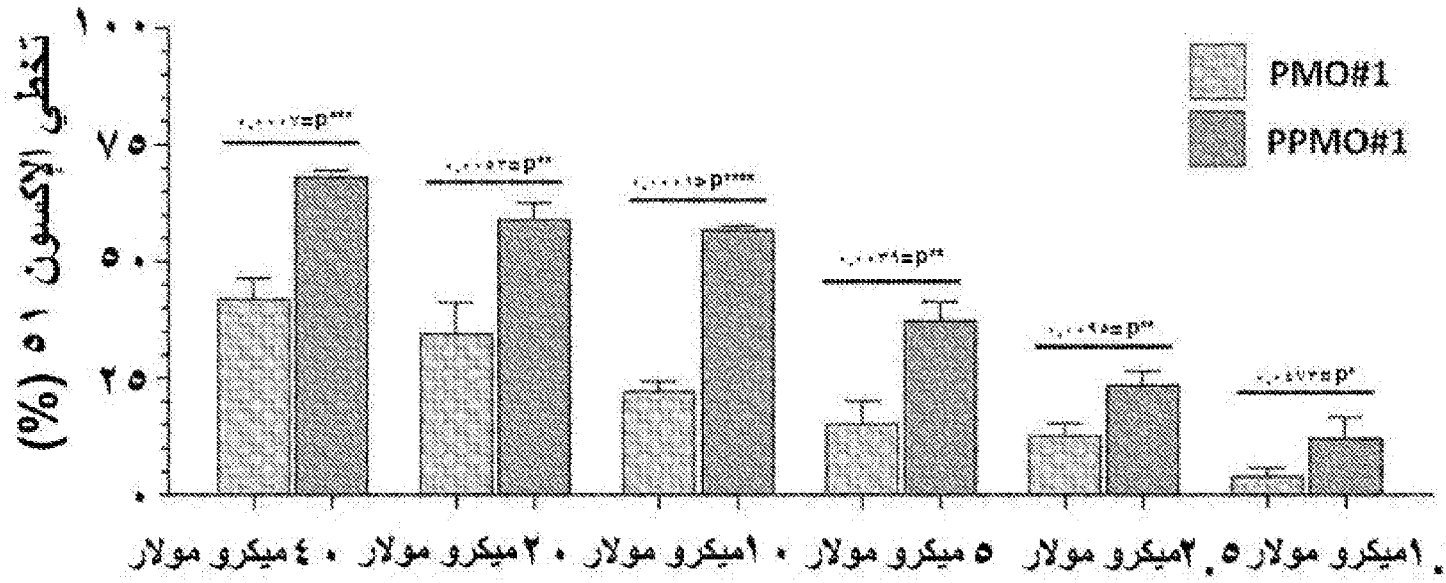

ديستروفين غير مستقر غير وظيفي
٤٧ ٤٨ ٤٩ ٥١ ٥٢ ٥٣
ب) حذف إكسون ٥٠ يعمل على تمزيق إطار القراءة
٥١ ٥٢ ٥٣
٤٧ ٤٨ ٤٩

شكل ٣



المصدر: متوافق مع Kole 2012.

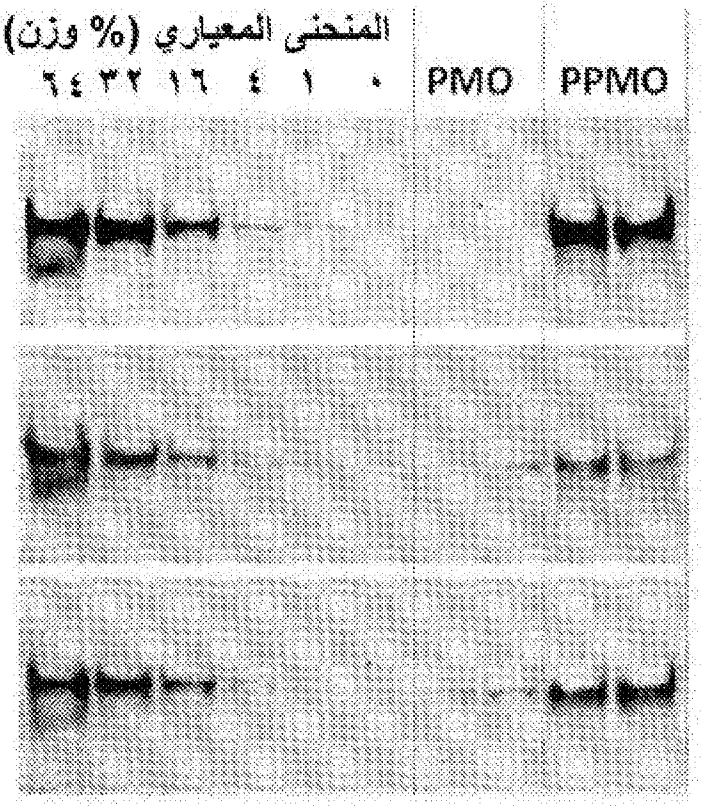
شكل ٤



المتوسط +/- SE

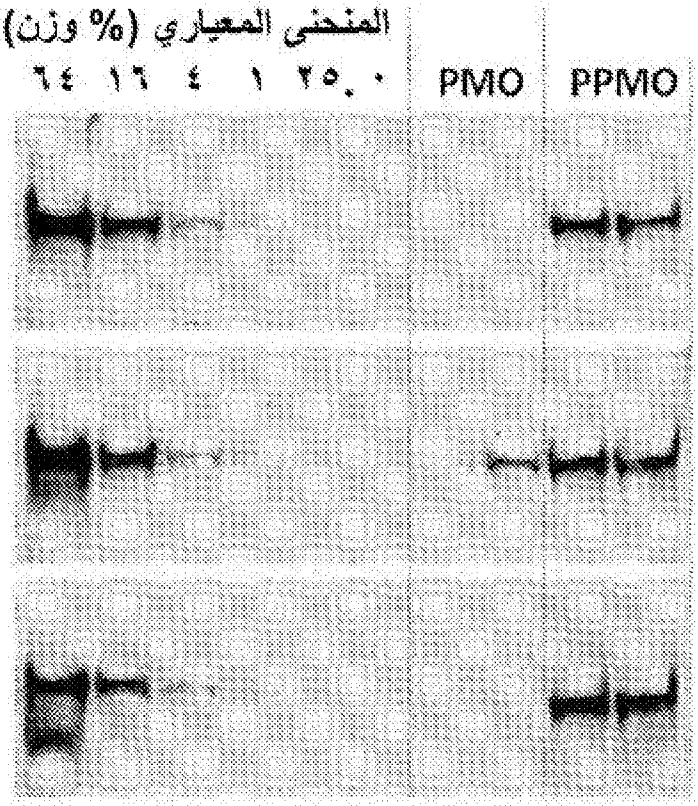
شكل ٥ب

٣٠ يومًا



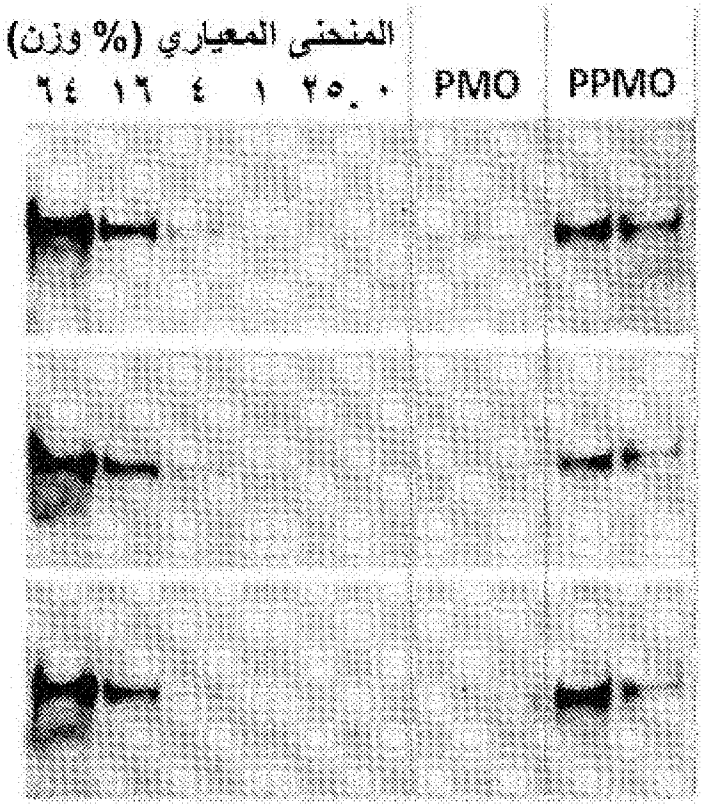
شكل ٥أ

٧ أيام



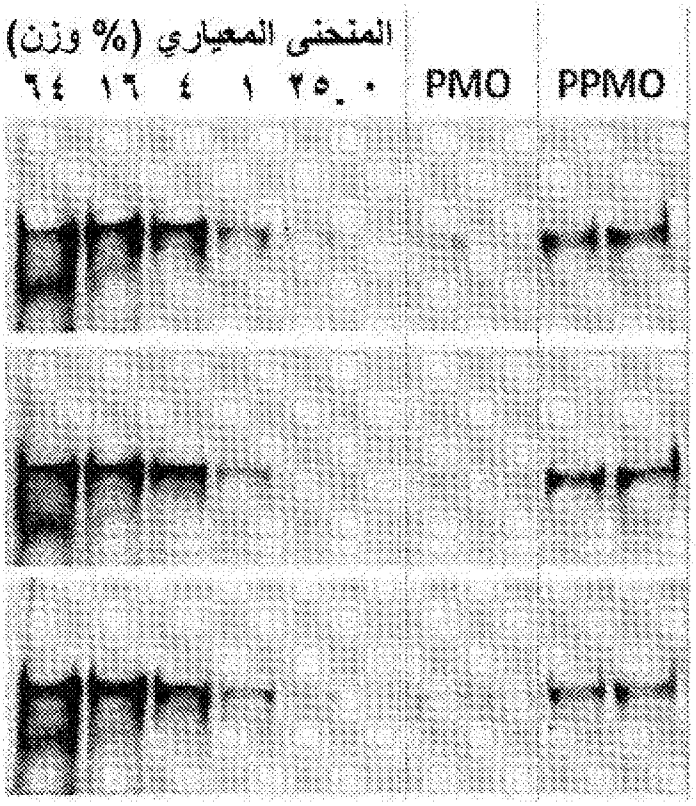
شكل ٥ج

٦٠ أيام



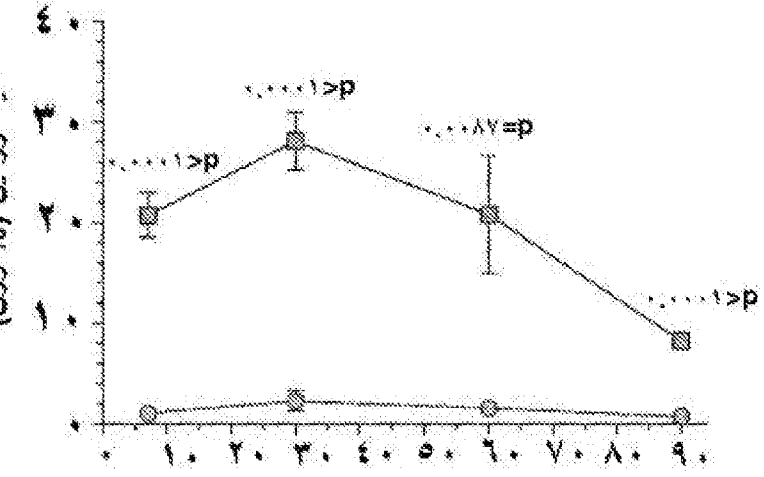
شكل ٥د

٩٠ يومًا



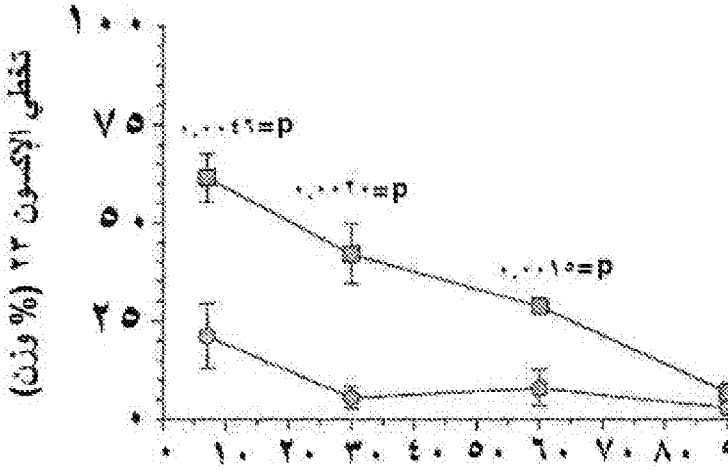
شكل ٦أ

بقع ويسترن



شكل ٦ب

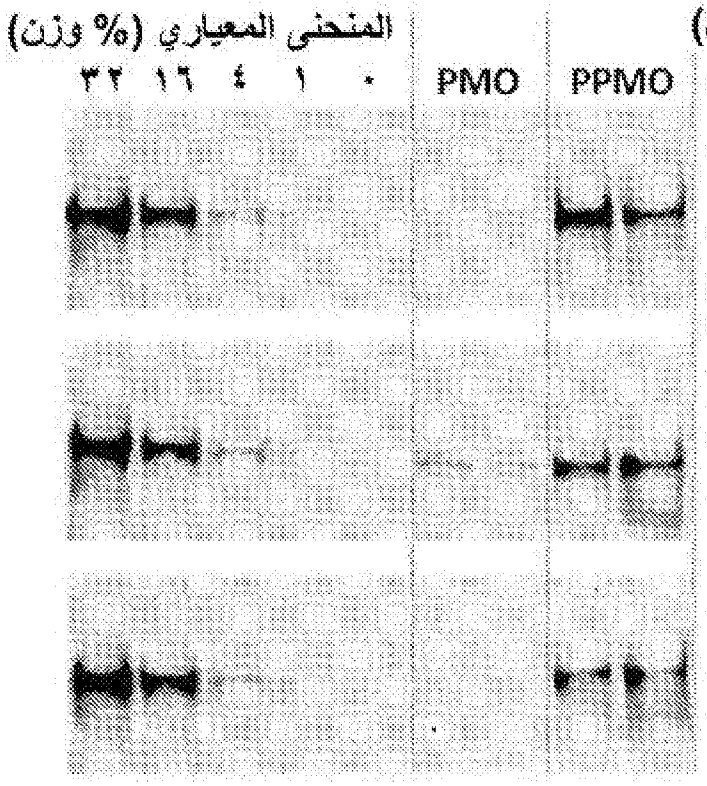
RT-PCR



4225-R6G (PPMO)
4225 (PMO)

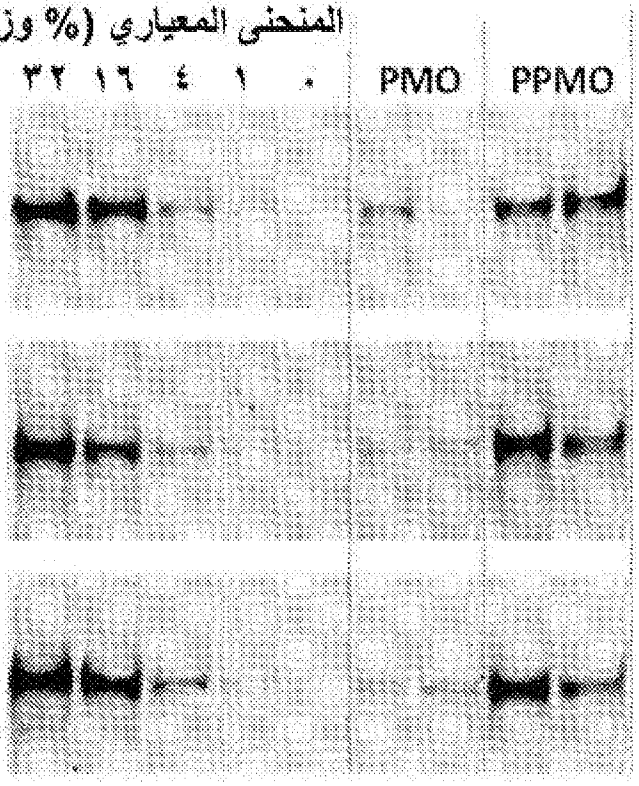
شكل ٧أ

٧ يومًا



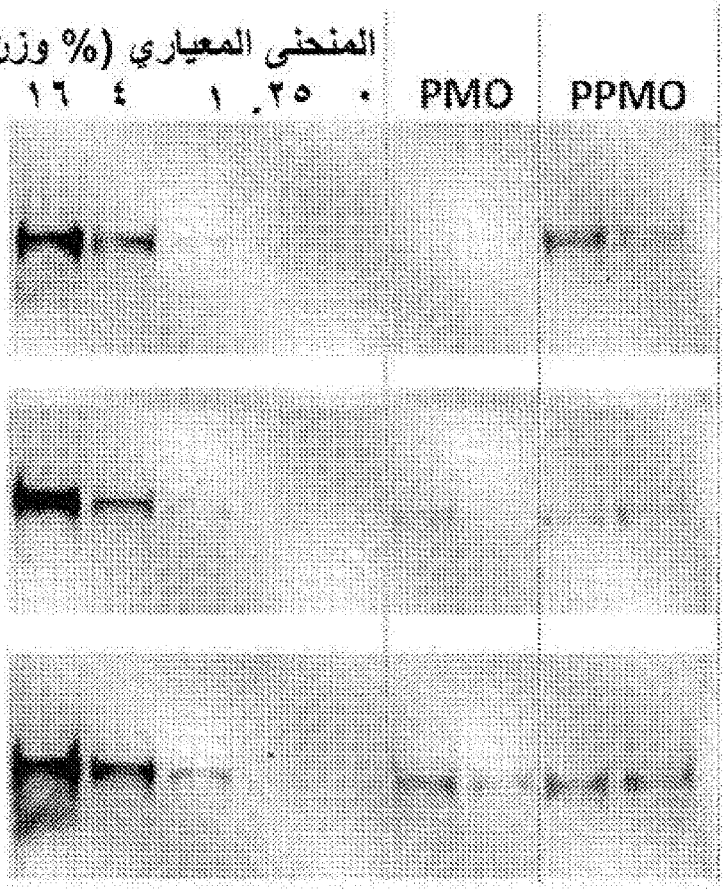
شكل ٧ب

٣٠ أيام



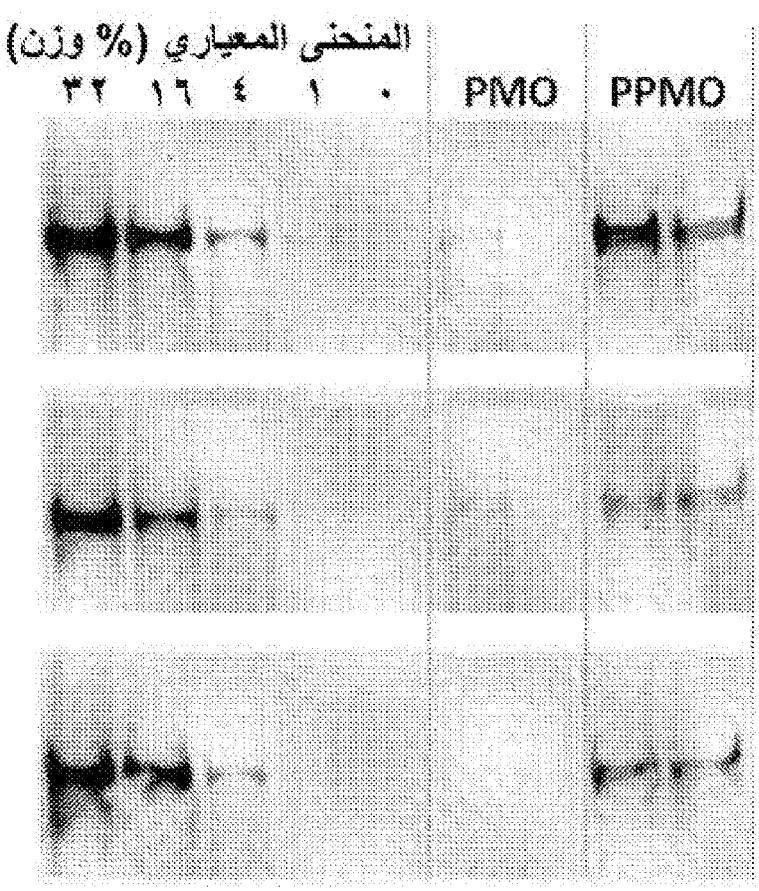
شكل ٧د

٩٠ أيام

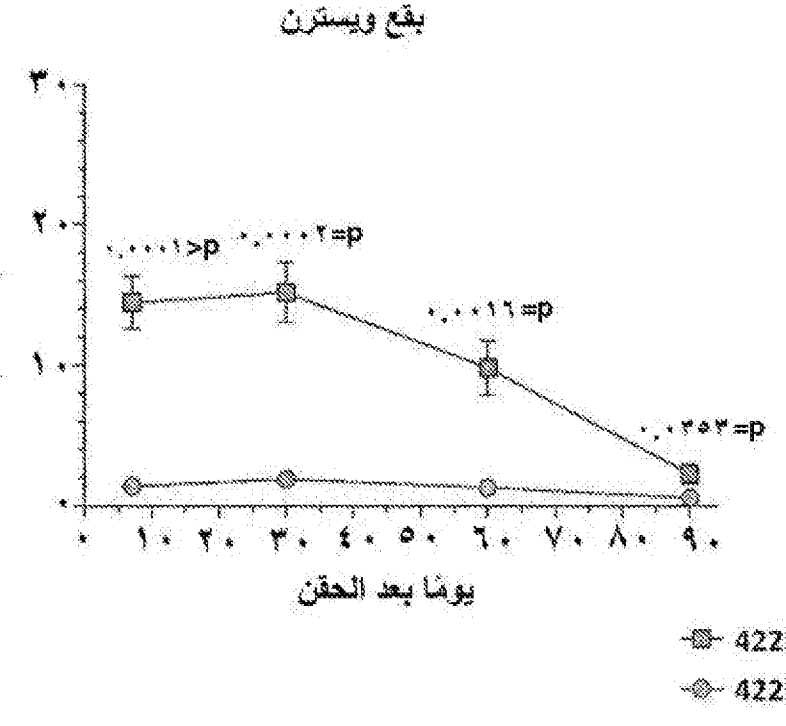


شكل ٧ج

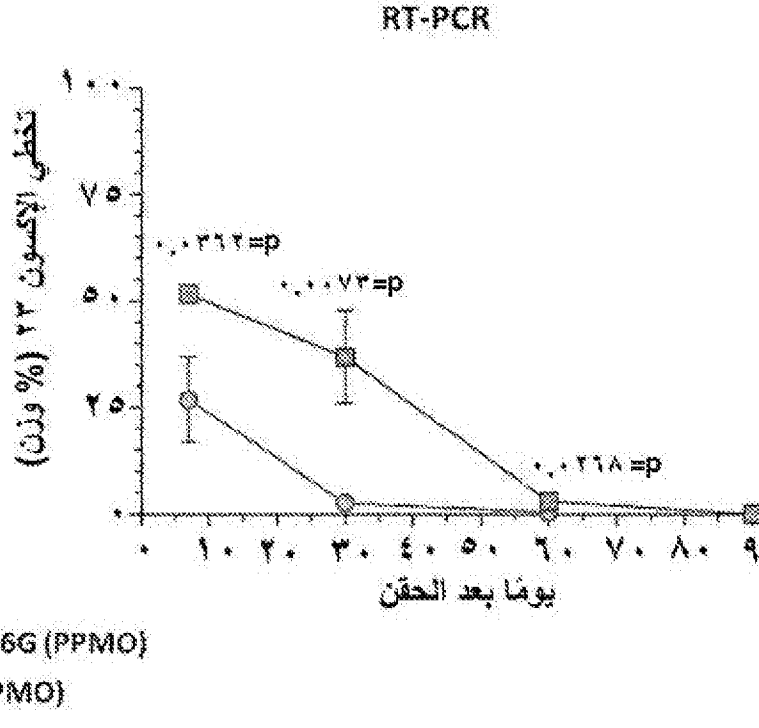
٦٠ يومًا



شكل ٨أ


بقع ويسترن
٣٠
٢٠
١٠
٠
p<٠,٠٠٠١
p=٠,٠٠٠٢
p=٠,٠٠١٦
p=٠,٠٣٥٣
٠ ١٠ ٢٠ ٣٠ ٤٠ ٥٠ ٦٠ ٧٠ ٨٠ ٩٠
يومًا بعد الحقن

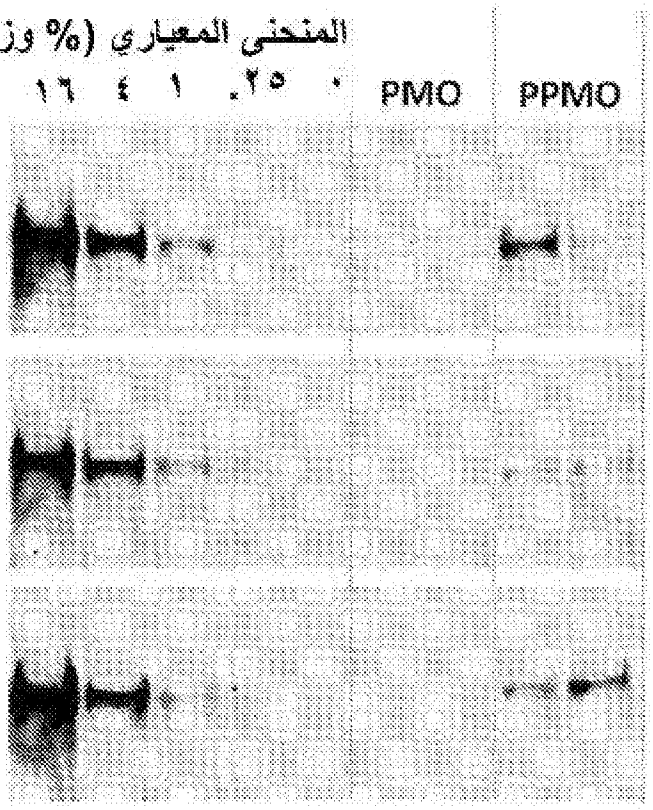
شكل ٨ب


RT-PCR
تخطي الإكسون ٢٣ (% وزن)
١٠٠
٧٥
٥٠
٢٥
٠
p=٠,٠٣٦٢
p=٠,٠٠٧٣
p=٠,٠٢١٨
٠ ١٠ ٢٠ ٣٠ ٤٠ ٥٠ ٦٠ ٧٠ ٨٠
يومًا بعد الحقن

4225-R6G (PPMO)
4225 (PMO)

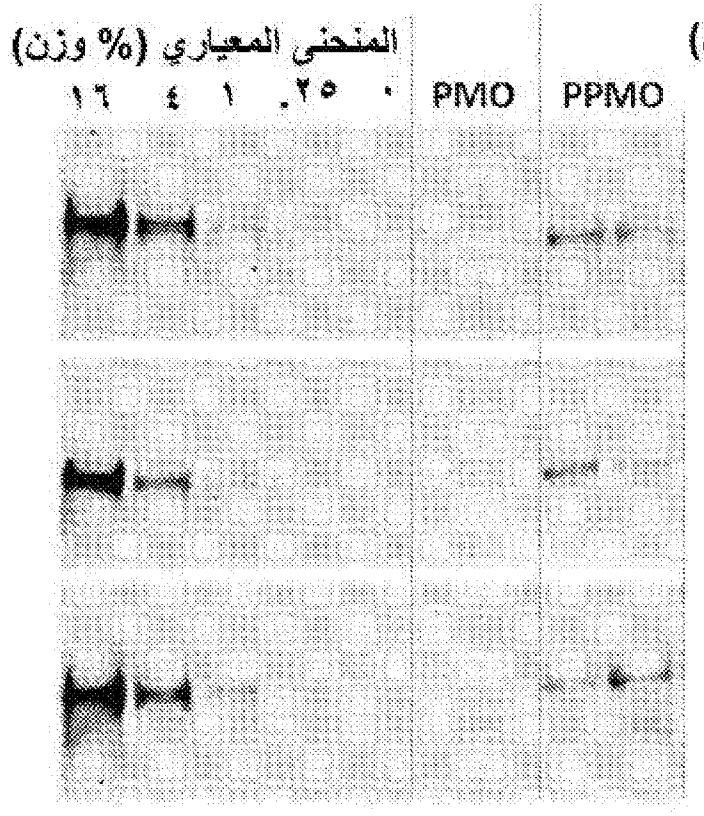
شكل ٩ب

٣٠ يومًا



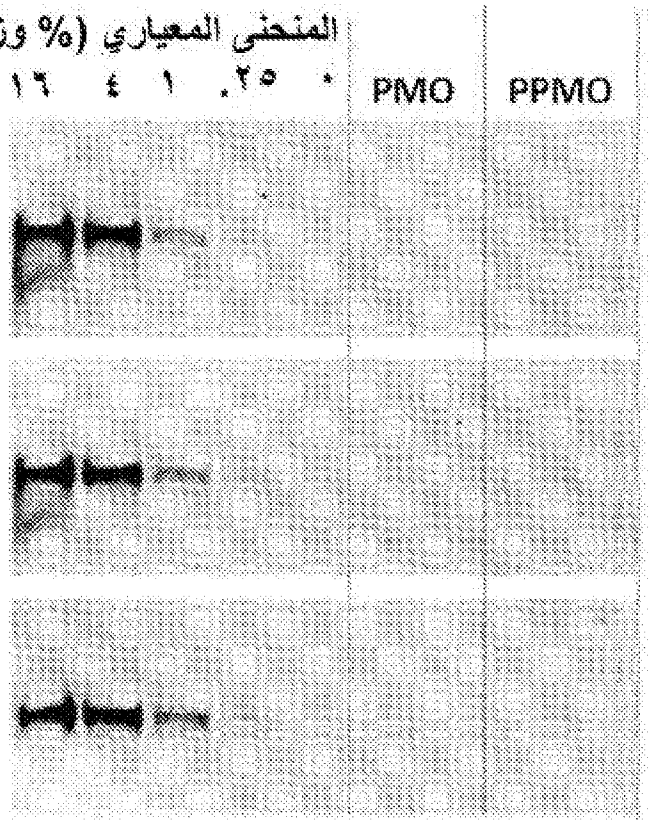
شكل ٩أ

٧ أيام



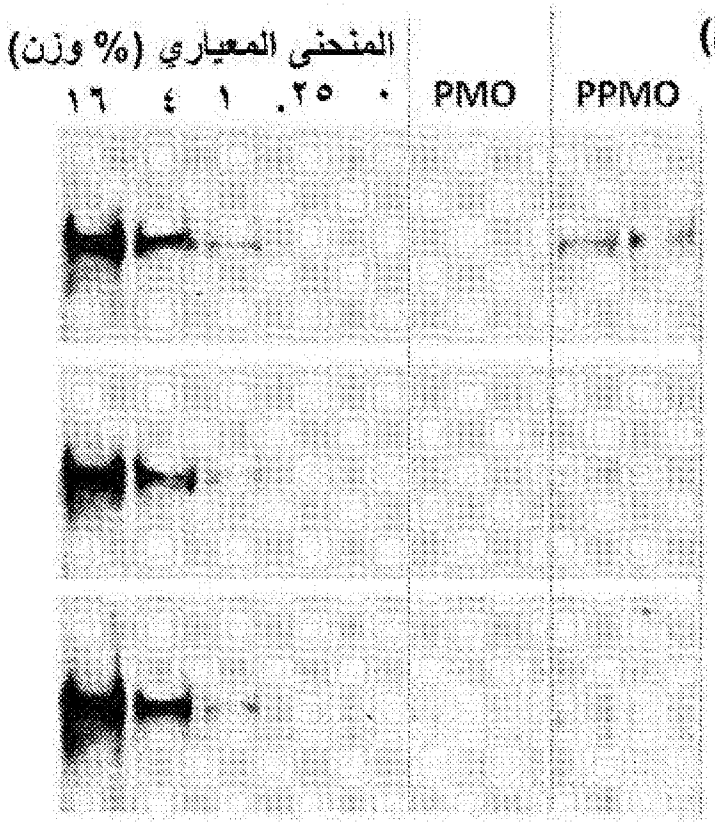
شكل ٩ج

٩٠ يومًا

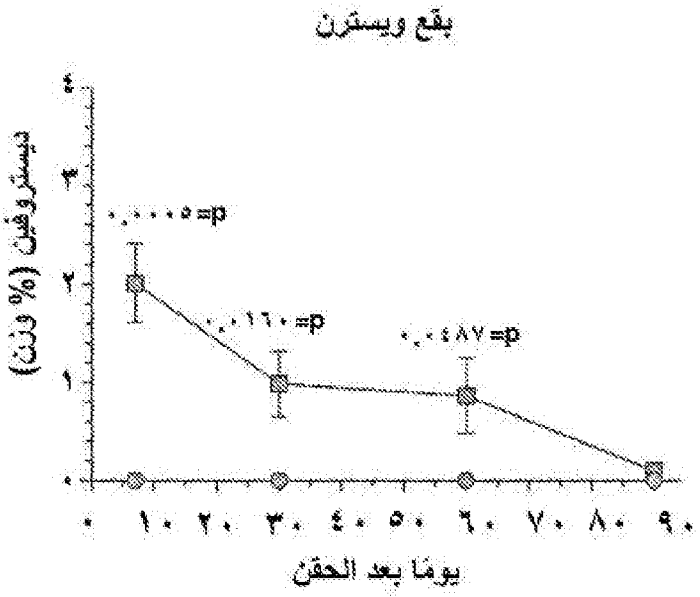


شكل ٩د

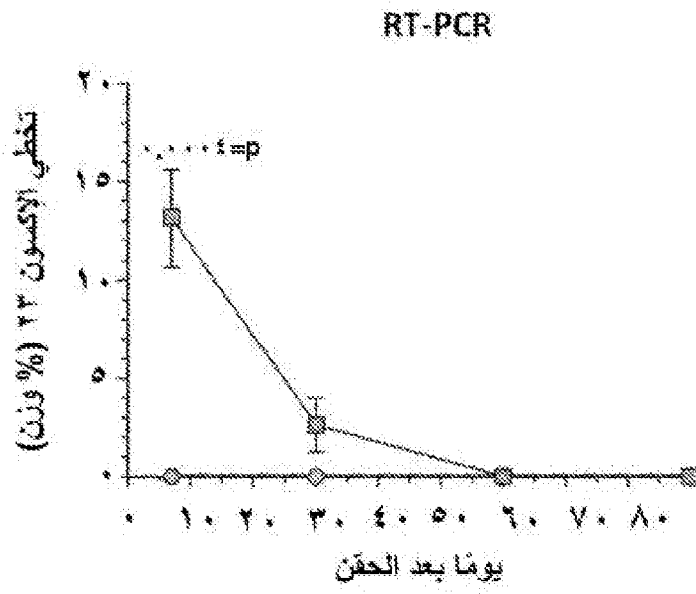
٦٠ يومًا

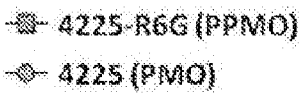


شكل ١٠أ

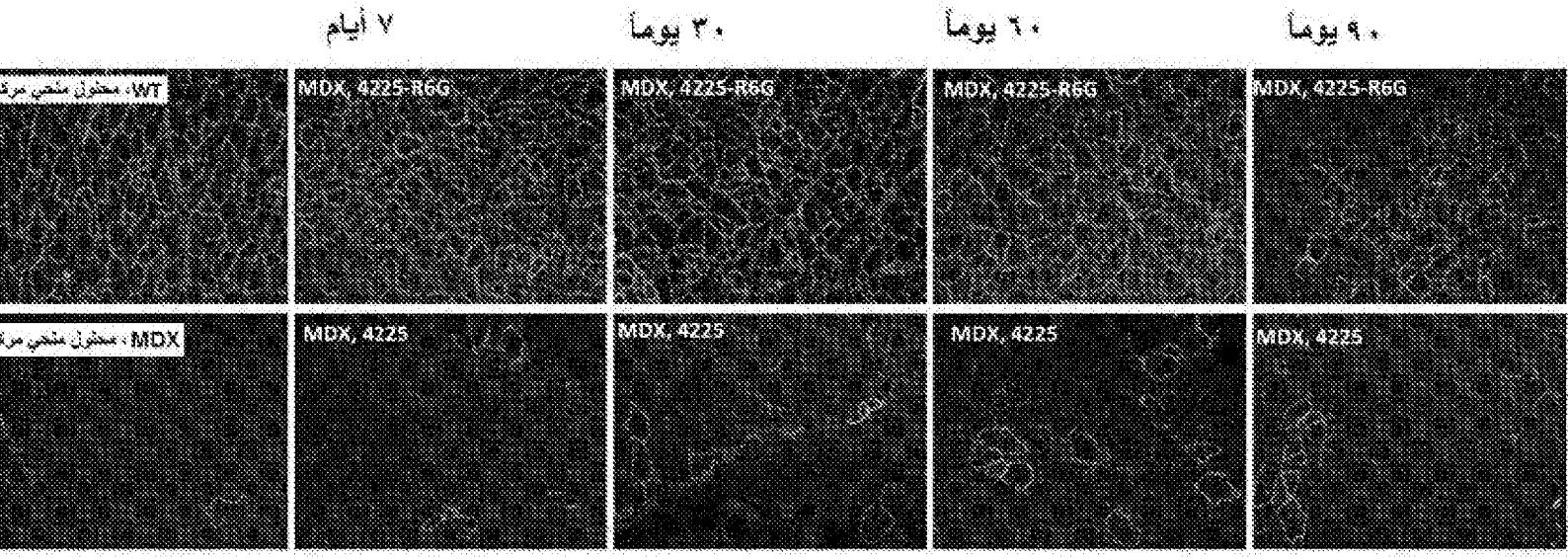


شكل ١٠ب

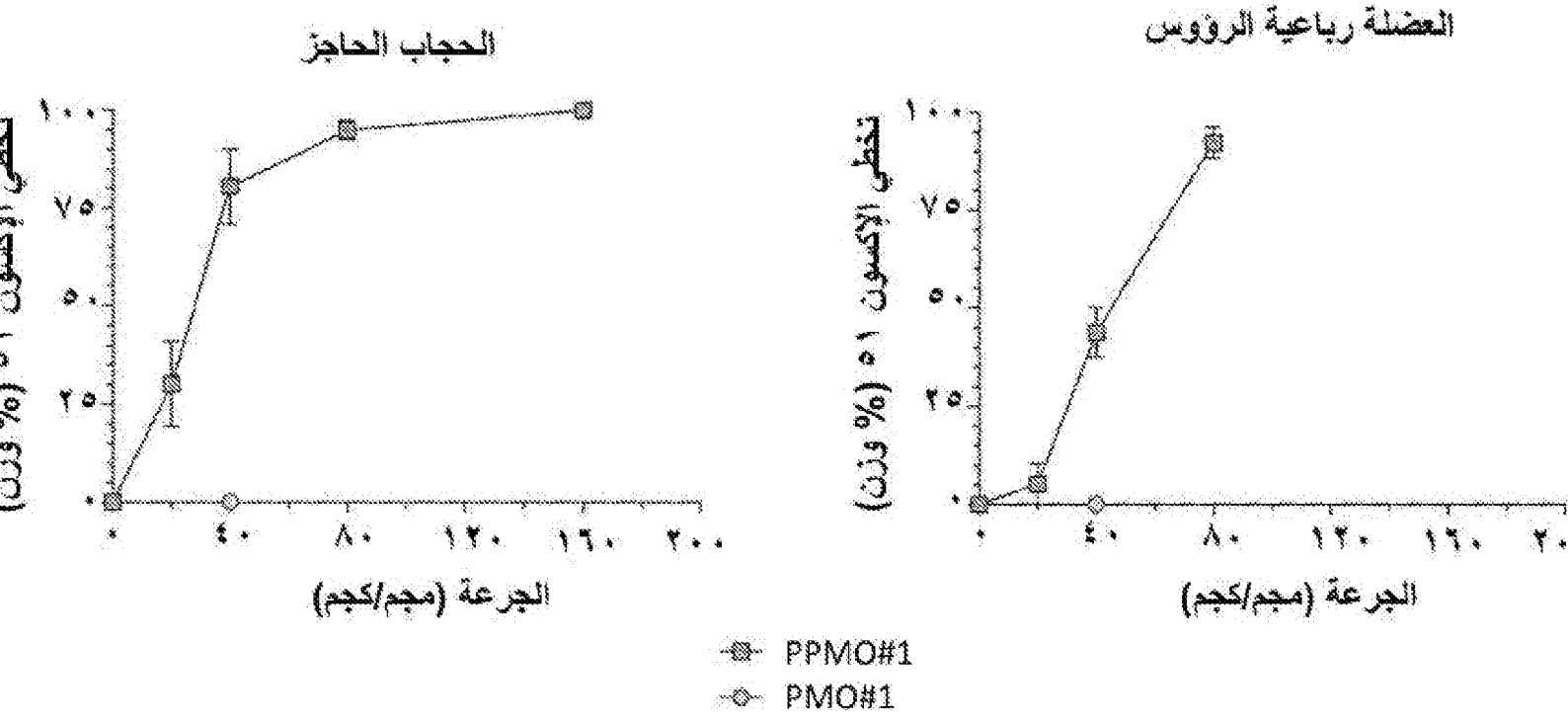




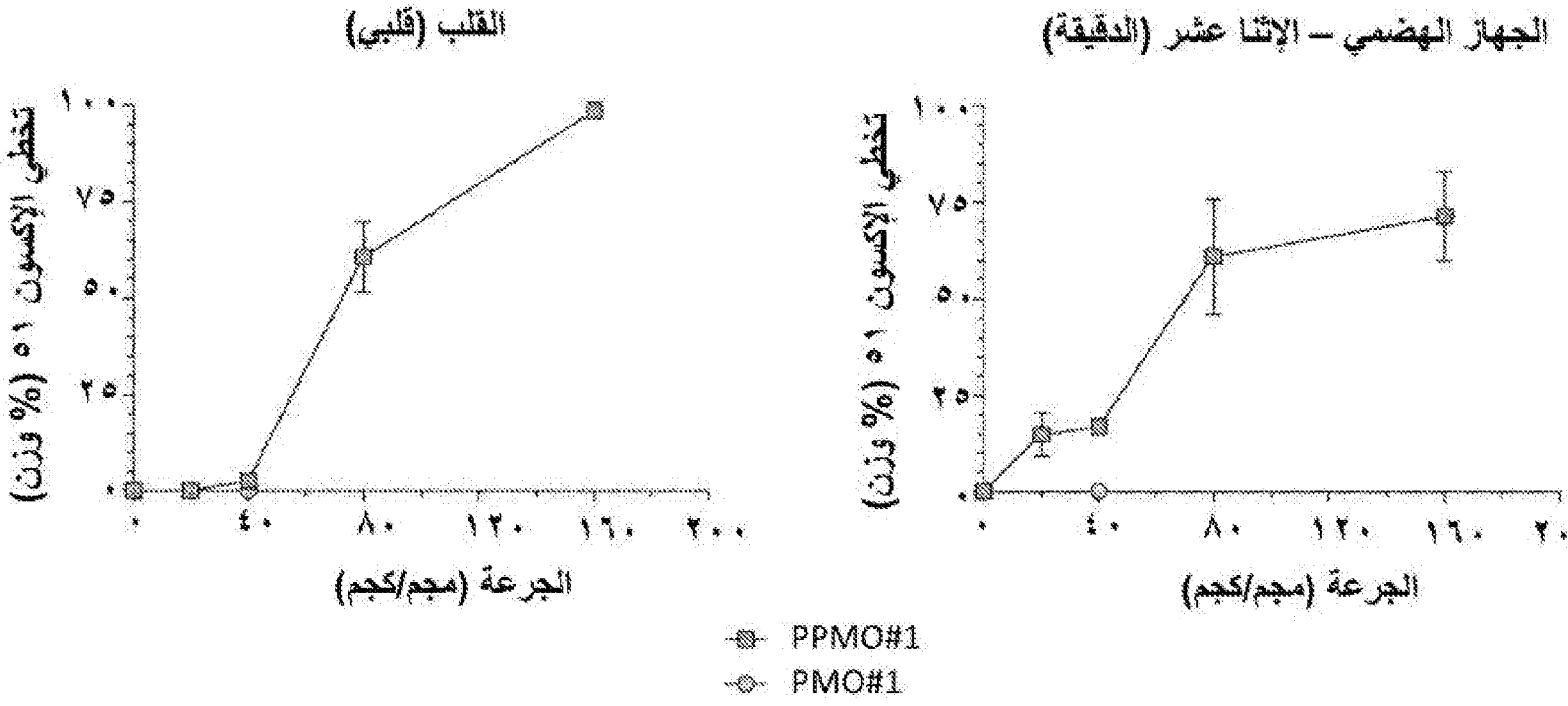
شكل ١١


٧ أيام
٣٠ يوماً
٦٠ يوماً
٩٠ يوماً
WT، محقون منخي مرة
MDX، محقون منخي مرة
MDX, 4225-R6G
MDX, 4225

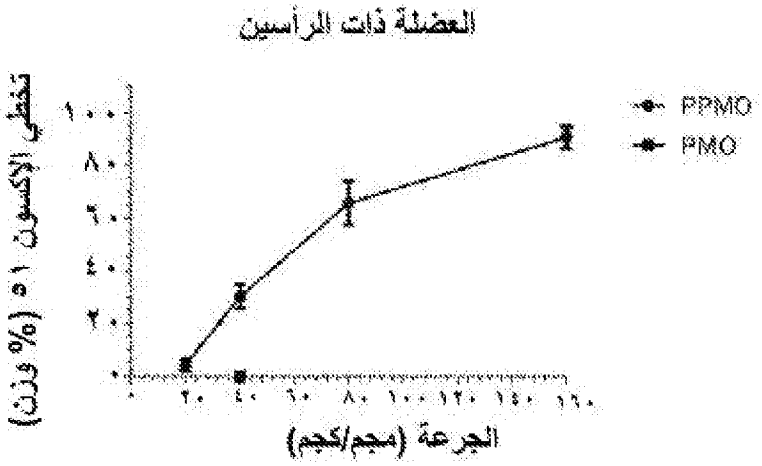
شكل ١٢

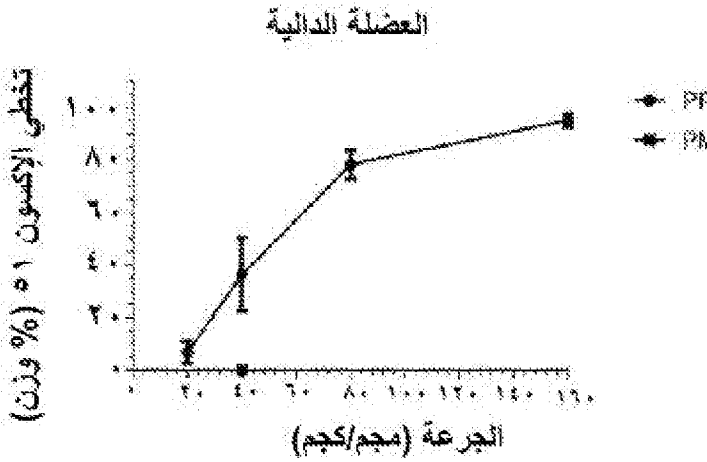

العضلة رباعية الرؤوس
الحجاب الحاجز
تخطي الإكسون ٥١ (% وزن)
١٠٠
٧٥
٥٠
٢٥
٠
٠
٤٠
٨٠
١٢٠
١٦٠
٢٠٠
الجرعة (مجم/كجم)
PPMO#1
PMO#1

شكل ١٣

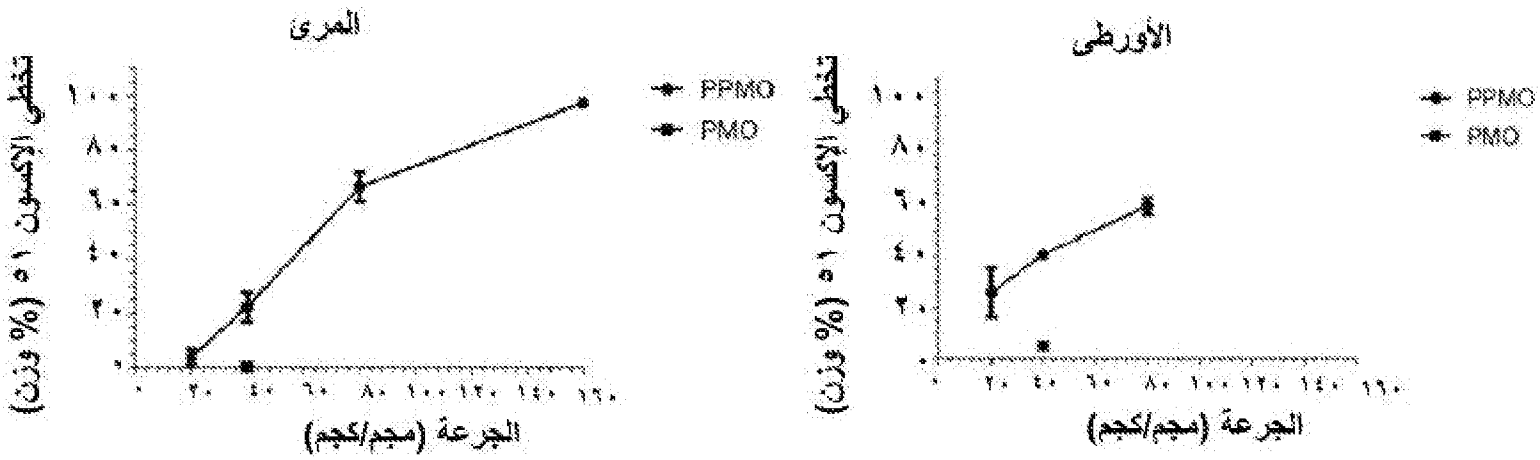

القلب (قلبي)
تخطي الإكسون ٥١ (% وزن)
١٠٠
٧٥
٥٠
٢٥
٠
٠
٤٠
٨٠
١٢٠
١٦٠
٢٠٠
الجرعة (مجم/كجم)
الجهاز الهضمي – الإثنا عشر (الدقيقة)
تخطي الإكسون ٥١ (% وزن)
١٠٠
٧٥
٥٠
٢٥
٠
٠
٤٠
٨٠
١٢٠
١٦٠
٢٠
الجرعة (مجم/كجم)
PPMO#1
PMO#1

شكل ١٤

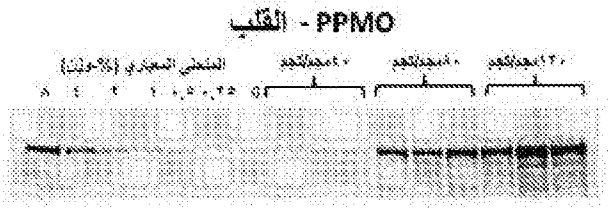

العضلة ذات الرأسين
تخطي الإكسون ٥١ (% وزن)
١٠٠
٨٠
٦٠
٤٠
٢٠
٠
٢٠ ٤٠ ٦٠ ٨٠ ١٠٠ ١٢٠ ١٤٠ ١٦٠
الجرعة (مجم/كجم)
PPMO
PMO


العضلة الدالية
تخطي الإكسون ٥١ (% وزن)
١٠٠
٨٠
٦٠
٤٠
٢٠
٠
٢٠ ٤٠ ٦٠ ٨٠ ١٠٠ ١٢٠ ١٤٠ ١٦٠
الجرعة (مجم/كجم)

شكل ١٥

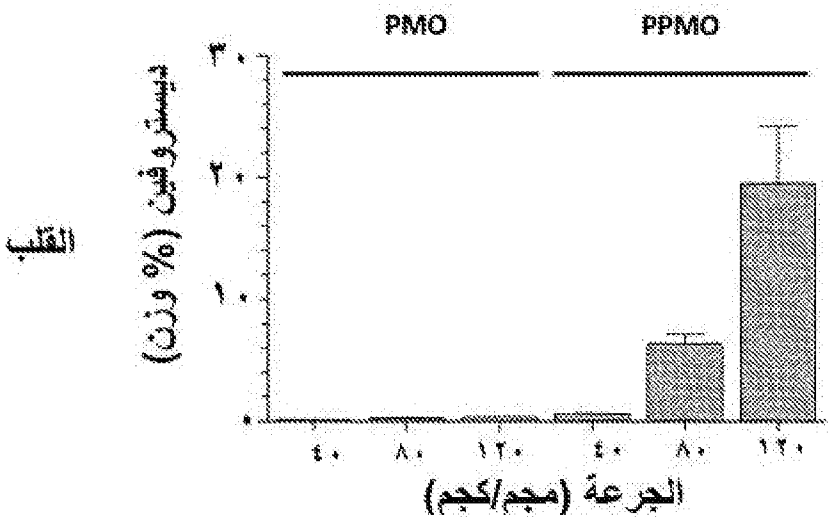

المرئ
تخطي الإكسون ٥١ (% وزن)
١٠٠
٨٠
٦٠
٤٠
٢٠
٠
٠ ٢٠ ٤٠ ٦٠ ٨٠ ١٠٠ ١٢٠ ١٤٠ ١٦٠
الجرعة (مجم/كجم)
PPMO
PMO
الأورطى
تخطي الإكسون ٥١ (% وزن)
١٠٠
٨٠
٦٠
٤٠
٢٠
٠
٠ ٢٠ ٤٠ ٦٠ ٨٠ ١٠٠ ١٢٠ ١٤٠ ١٦٠
الجرعة (مجم/كجم)
PPMO
PMO

شكل ١٦ب



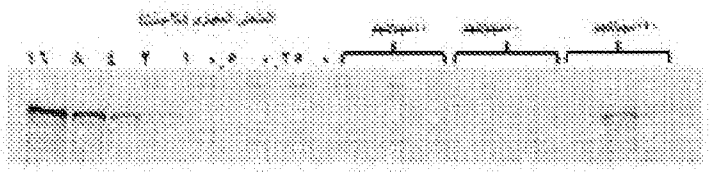
شكل ١٦أ

شكل ١٧


PMO
PPMO
٣٠
٢٠
١٠
٠
٤٠
٨٠
١٢٠
٤٠
٨٠
١٢٠
ديسترفين (% وزن)
القلب
الجرعة (مجم/كجم)

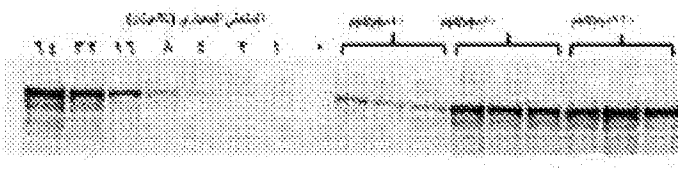
شكل ١٨أ

الحجاب الحاجز - PMO

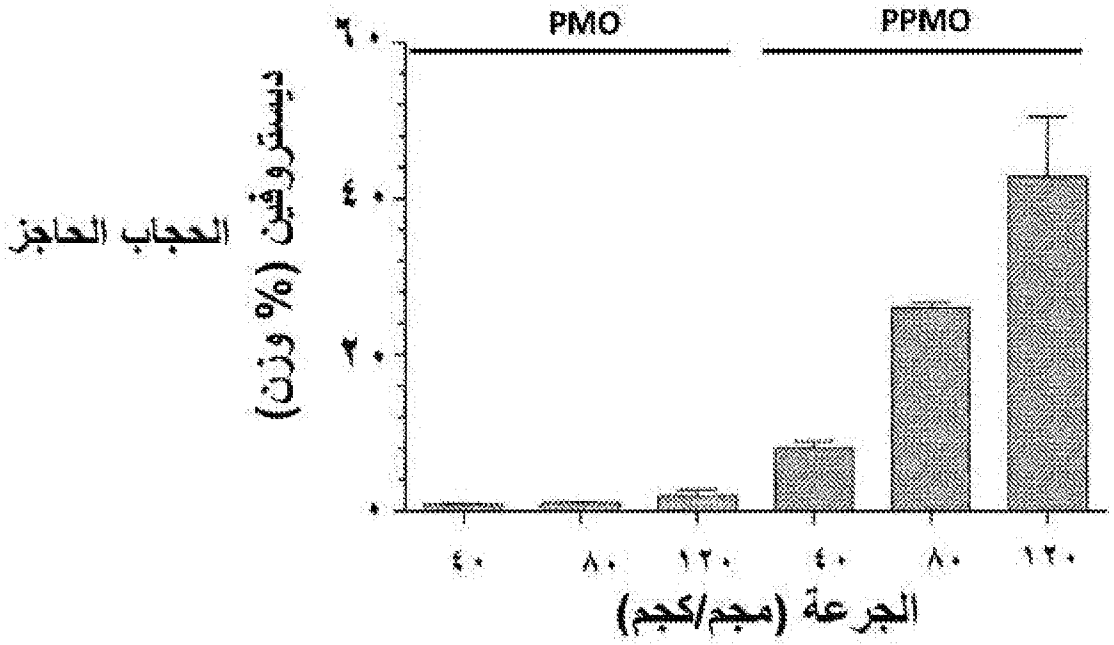


شكل ١٨ب

الحجاب الحاجز - PPMO

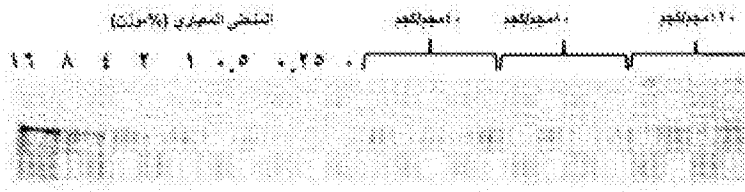


شكل ١٩


PMO
PPMO
الحجاب الحاجز
ديستروفين (% وزن)
٦٠
٤٠
٢٠
٠
٤٠
٨٠
١٢٠
٤٠
٨٠
١٢٠
الجرعة (مجم/كجم)

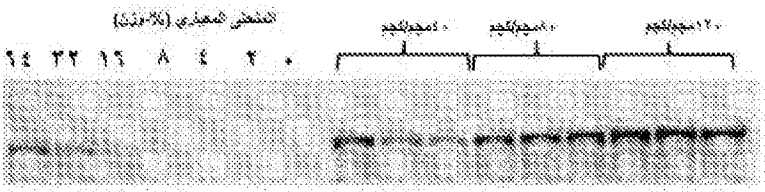
شكل ٢٠ب

العضلة رباعية الرؤوس - PMO

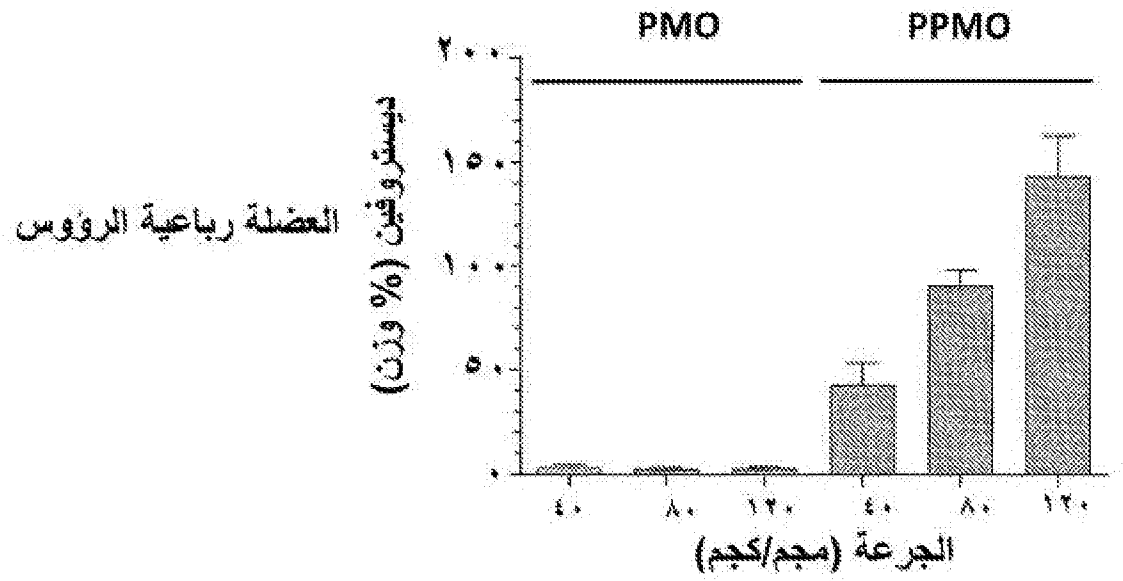


شكل ٢٠أ

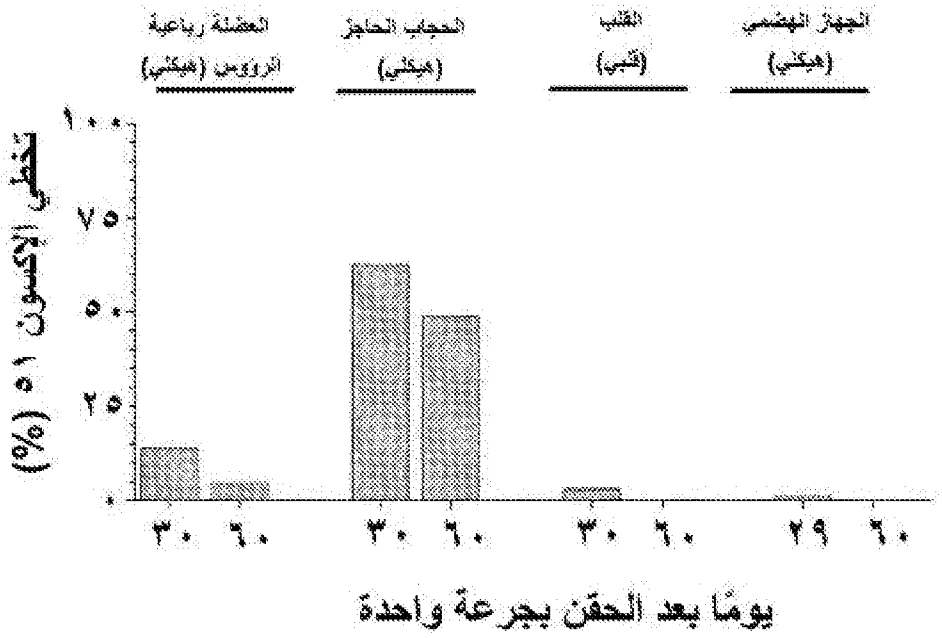
العضلة رباعية الرؤوس - PPMO



شكل ٢١


PMO
PPMO
العضلة رباعية الرؤوس
ديستروفين (% وزن)
٢٠٠
١٥٠
١٠٠
٥٠
٠
٤٠
٨٠
١٢٠
٤٠
٨٠
١٢٠
الجرعة (مجم/كجم)

شكل ٢٢


الجهاز الهضمي
(هيكلي)
القلب
(قلبي)
الحجاب الحاجز
(هيكلي)
العضلة رباعية
الرؤوس (هيكلي)
تخطي الإكسون ٥١ (%)
١٠٠
٧٥
٥٠
٢٥
٠
٣٠ ٦٠ ٣٠ ٦٠ ٣٠ ٦٠ ٢٩ ٦٠
يومًا بعد الحقن بجرعة واحدة

رقم الدورة: الوحدة القرعية (SU)	العلاج قبل الإقران				دورة الإقران		العلاج بعد الإقران	
	١	٢	٣	٤			١	٢
	٣٠% غسول TFE/DCM	مخلوط CYTFA	مخلوط تعمق غسول DCM	غسول DCM	كمية SU (عدد) NEM (لتر) DMI (كغ)	زمن الإقران عند درجة حرارة الغرفة (ساعة)	غسول DCM	٣٠% غسول TFE/DCM
1:C	٥,٥ لتر	أ) ٥,٥ لتر ب) ٥,٥ لتر ١٢٢مل	٣ × ٥,٥ لتر	٥,٥ لتر	٣٦,٧ بو ١٦٥ مل ٣,٣ NEM لتر DMI	٥	٥,٥لتر	٢ × ٥,٥ لتر
2:?	٧ لتر	أ) ٧ لتر ب)٧ لتر ١٥٨مل	٣ × ٧ لتر	٢ × ٧ لتر	٤٦,٢ بو ١٩٨ مل ٤,٢ NEM لتر DMI	٤,٢٥	٧لتر	٢ × ٧ لتر
3:C	٨ لتر	أ) ٨ لتر ب) ٨ لتر ١٨٢مل	٣ × ٨ لتر	٢ × ٨ لتر	٥٢,٨ بو ١٩٨ مل ٤,٨ NEM لتر DMI	٤,٢٥	٨لتر	٢ × ٨ لتر
4:C	٩ لتر	أ) ٩ لتر ب)٩ لتر ٢٠٩مل	٣ × ٩ لتر	٢ × ٩ لتر	٥٩,٤ بو ٢٢٠ مل ٥,٤ NEM لتر DMI	٤,٢٥	٩لتر	٢ × ٩ لتر
5:A	٩,٥ لتر	أ) ٩,٥ لتر ب)٩,٥ لتر ٢٢٠	٣ × ٩,٥ لتر	٢ × ٩,٥ لتر	٦٥,٢ بو ١٦٥ مل NEM ٤,٧ لتر DMI	٤,٢٥	٩,٥لتر	٢ × ٩,٥ لتر
6:A	١٠ لتر	أ) ١٠ لتر ب) ١٠ لتر ٢٣٢مل	٣ × ١٠ لتر	٢ × ١٠ لتر	٧٣,٩ بو ١٦٥ مل NEM ٥,٤ لتر DMI	٤,٢٥	١٠لتر	٢ × ١٠ لتر
7:C	١١ لتر	أ) ١١ لتر ب)١١ لتر ٢٥٩مل	٣ × ١١ لتر	٢ × ١١ لتر	٨١,٧ بو ١٦٥ مل NEM	٤,٢٥	١١لتر	٢ × ١١ لتر

شكل ٢٣

---

[١] مل يشير إلى مقدار ١:١ NEM/DCI

[٢] رانتج محتجز عند هذه الخطوة لمدة ١/٠ يوم

[٣] رانتج محتجز عند هذه الخطوة لمدة ١/٠ يو،

[٤] رانتج محتجز عند هذه المرحلة ٠,٤ يوم

رقم الدورة: الوحدة القرعية (SU)	العلاج قبل الإقران				دورة الإقران		العلاج بعد الإقران	
	١	٢	٣	٤			١	٢
	٣٠% غسول TFE/DCM	مخلوط CYTFA	مخلول تعادل غسول DCM	غسول DCM	كمية SU (جم) NEM (لتر) DMI (لتر)	زمن الإقران عند درجة حرارة الغرفة (ساعة)	غسول DCM	٣٠% غسول TFE/DCM
					٢٢ لتر DMI			
8:A	١١ لتر	أ) ١١ لتر ب) ١١ لتر ٢٥٦ مل	٣ × ١١ لتر	٢ × ١١ لتر	٢٢٠ جم ٢٢ لتر NEM DMI	٤,٢٥	١١ لتر	٢ × ١١ لتر
9:T	١١,٥ لتر	أ) ١١,٥ لتر ب) ١١,٥ لتر ٢٦٨ مل	٣ × ١١,٥ لتر	٢ × ١١,٥ لتر	٢٣٠ جم ٢٣ لتر NEM DMI	٤,٢٥	١١,٥ لتر	٢ × ١١,٥ لتر
10:C	١٢ لتر	أ) ١٢ لتر ب) ١٢ لتر ٢٨٠ مل	٣ × ١٢ لتر	٢ × ١٢ لتر	٢٤٠ جم ٢٤ لتر NEM DMI	٤,٢٥	١٢ لتر	٢ × ١٢ لتر
11:A	١٣,٥ لتر	أ) ١٣,٥ لتر ب) ١٣,٥ لتر ٢٠٤ مل	٣ × ١٣,٥ لتر	٢ × ١٣,٥ لتر	٢٥٠ جم ٢٥ لتر NEM DMI	٤,٢٥	١٣,٥ لتر	٢ × ١٣,٥ لتر
12:A	١٣,٥ لتر	أ) ١٣,٥ لتر ب) ١٣,٥ لتر ٢٠٤ مل	٢ × ١٣,٥ لتر	٢ × ١٣,٥ لتر	٢٥٠ جم ٢٥ لتر NEM DMI	٤,٢٥	١٣,٥ لتر	٢ × ١٣,٥ لتر
13:DPG	١٤ لتر	أ) ١٤ لتر ب) ١٤ لتر ٢١٦ مل	٢ × ١٤ لتر	٢ × ١٤ لتر	٢٦٠ جم ٢٦ لتر NEM DMI	٤,٢٥	١٤ لتر	٢ × ١٤ لتر
14:DPG	١٤,٥ لتر	أ) ١٤,٥ لتر ب) ١٤,٥ لتر ٢٢٨ مل	٣ × ١٤,٥ لتر	٢ × ١٤,٥ لتر	٢٧٠ جم ٢٧ لتر NEM	٤,٢٥	١٤,٥ لتر	٢ × ١٤,٥ لتر

شكل ٢٣ (يتبع)

[٥] رانتج محتجز عند هذه المرحلة لمدة ٢,٥ يوم

[٦] رانتج محتجز عند هذه المرحلة لمدة ½ يوم

[٧] رانتج محتجز عند هذه المرحلة لمدة ٠,٤ يوم

[٨] رانتج محتجز عند هذه المرحلة لمدة ٠,٤ يوم

رقم الدورة: الوحدة الفرعية (SU)	العلاج قبل الإقران				دورة الإقران		العلاج بعد الإقران	
	١	٢	٣	٤			١	٢
	٣٠% غسول TFE/DCM	بحلول CYTFA	محلول تعادل غسول DCM	غسول DCM	كمية SU (جم) (لتر) NEM (لتر) DMI	زمن الإقران عند درجة حرارة الغرفة (ساعة)	غسول DCM	٣٠% غسول TFE/DCM
					١,١ لتر DMI			
15:A	١٥,٥لتر	أ) ١٥,٥ لتر ب) ١٥,٥ لتر ٣٥٤مل	٣ × ١٥,٥لتر	٢ × ١٥,٥ لتر	٢,٢ (جم) ٢٥٣ مل ٤,٤ لتر NEM DMI	٤,٢٥	١٥,٥لتر	٢ × ١٥,٥ لتر
16:A	١٥,٥لتر	أ) ١٥,٥ لتر ب) ١٥,٥ لتر ٣٥٤مل	٣ × ١٥,٥ لتر	٢ × ١٥,٥لتر	٢,٢ (جم) ٢٥٣ مل ٤,٤ لتر NEM DMI	٤,٢٥	١٥,٥لتر	٢ × ١٥,٥لتر[١٠]
17:DPG	١٦لتر	أ) ١٦لتر ب) ١٦لتر ٣٦٩مل	٣ × ١٦لتر	٢ × ١٦لتر	٢,٢ (جم) ٢٥٣ مل ٤,٤ لتر NEM DMI	٤,٧٥	١٦لتر	٢ × ١٦لتر
18:A	١٦,٥لتر	أ) ١٦,٥ لتر ب) ١٦,٥ لتر ٣٧٨مل	٣ ×	٢ × ١٦,٥لتر	٢,٢ (جم) ٢٥٣ مل ٤,٤ لتر NEM DMI	٤,٢٥	١٦,٥لتر	٢ × ١٦,٥لتر[١]
19:T	١٦,٥لتر	أ) ١٦,٥ لتر ب) ١٦,٥ لتر ٣٧٨مل	٣ × ١٦,٥لتر	٢ × ١٦,٥ لتر	٢,٢ (جم) ٢٥٣ مل ٤,٤ لتر NEM DMI	٤,٢٥	١٦,٥لتر	٢ × ١٦,٥ لتر
20:DPG	١٧لتر	أ) ١٧لتر ب) ١٧لتر ٣٩٠مل	٣ × ١٧لتر	٢ × ١٧لتر	٢,٢ (جم) ٢٥٣ مل ٤,٤ لتر NEM DMI	٤,٧٥	١٧لتر	٢ × ١٧لتر[١١]
21:DPG	١٧لتر	أ) ١٧لتر ب) ١٧لتر ٣٩٠مل	٣ × ١٧لتر	٢ × ١٧لتر	٢,٢ (جم) ٢٥٣ مل ٤,٤ لتر NEM DMI	٤,٢٥	١٧لتر	٢ × ١٧لتر

شكل ٢٣ (يتبع)

[١٠] راتنج محتجز عند هذه المرحلة لمدة ١,٥ يوم

[١١] راتنج محتجز عند هذه المرحلة لمدة ٠,٣ يوم

رقم الدورة: / الوحدة الفرعية (SU)	العلاج قبل الإقران				دورة الإقران		العلاج بعد الإقران	
	١	٢	٣	٤			١	٢
	٣٠% فصول TFR/DCM	محفز CTTFA	مخزون تحميل فصول DCM	فصول DCM	الحقنة SU (بعد) (قبل) DSMI	بعد الإقران عند درجة حرارة الغرفة (ساعة)	فصول DCM	٣٠% فصول TFR/DCM
					٤,٢٥ نقر DSMI			
22:C	٨,٥ نقر	أ) ١٧,٥ نقر ب) ٨,٥ نقر ٤٠٢ مل	٣ × ١٧,٥ نقر	٢ × ١٧,٥ نقر	DSMI	٤,٧٥	١٧,٥ نقر	٢ × ٨,٥ نقر[١٦]
23:A	١٧,٥ نقر	أ) ١٧,٥ نقر ب) ١٧,٥ نقر ٤٠٢ مل	٣ × ١٧,٥ نقر	٢ × ١٧,٥ نقر	DSMI	٤,٧٥	١٧,٥ نقر	٢ × ١٧,٥ نقر
24:T	١٨ نقر	أ) ١٨ نقر ب) ١٨ نقر ٤١٤ مل	٣ × ١٨ نقر	٢ × ١٨ نقر	DSMI	٤,٧٥	١٨ نقر	٢ × ١٨ نقر[١٣]
25:T	١٨ نقر	أ) ١٨ نقر ب) ١٨ نقر ٤١٤ مل	٣ × ١٨ نقر	٢ × ١٨ نقر	DSMI	٤,٧٥	١٨ نقر	٢ × ١٨ نقر
26:T	١٨,٥ نقر	أ) ١٨,٥ نقر ب) ١٨,٥ نقر ٤٢٦ مل	٣ × ١٨,٥ نقر	٢ × ١٨,٥ نقر	DSMI	٤,٢٥	١٨,٥ نقر	٢ × ١٨,٥ نقر[١٤]
27:C	١٨,٥ نقر	أ) ١٨,٥ نقر ب) ١٨,٥ نقر ٤٢٦ مل	٣ × ١٨,٥ نقر	٢ × ١٨,٥ نقر	DSMI	٤,٧٥	١٨,٥ نقر	٢ × ١٨,٥ نقر
28:T	١٩ نقر	أ) ١٩ نقر ب) ١٩ نقر ٤٣٨ مل	٣ × ١٩ نقر	٢ × ١٩ نقر	DSMI	٤,٧٥	١٩ نقر	٢ × ١٩ نقر[١٥]

شكل ٢٣ (يتبع)

[١٢] رائع محتجز عند هذه المرحلة لمدة ٠,٤ يوم

[١٣] رائع محتجز عند هذه المرحلة لمدة ٠,٤ يوم

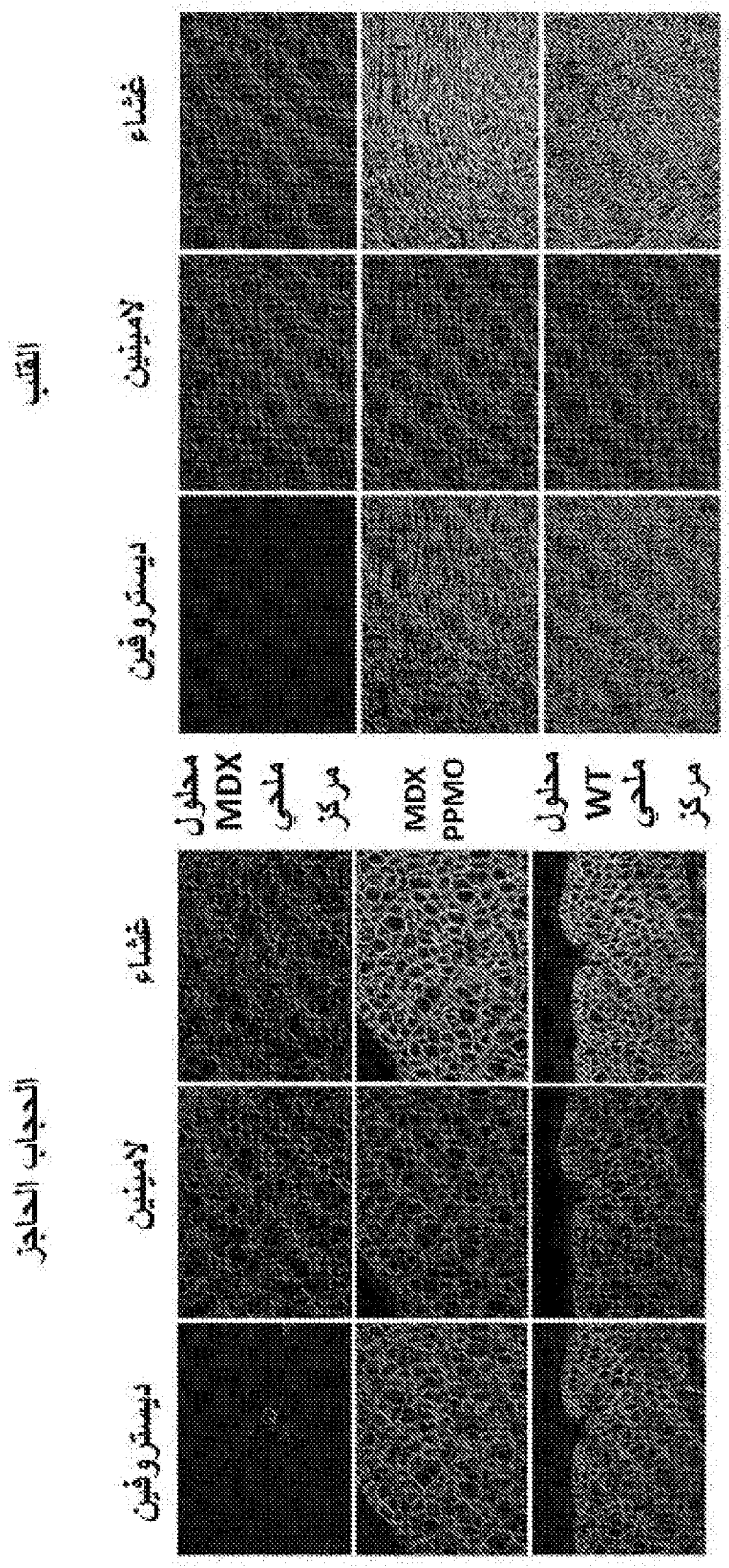
[١٤] رائع محتجز عند هذه المرحلة لمدة ٠,٤ يوم

[١٥] رائع محتجز عند هذه المرحلة لمدة ٠,٣ يوم

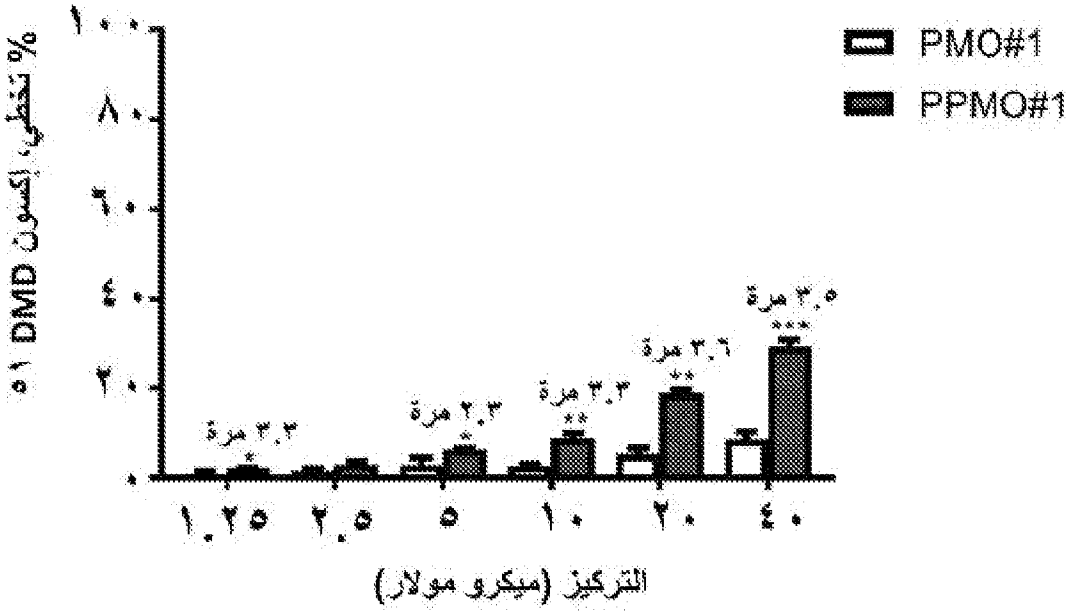
رقم الدورة: الوحدة الفرعية (SU)	العلاج قبل الإقران				دورة الإقران		العلاج بعد الإقران	
	١	٢	٣	٤			١	٢
	٣٠% غسول TFE/DCM	محلول CYTFA	محلول تعادل غسول DCM	غسول DCM	كمية SU (جم) NEM (لتر) DBM (لتر)	زمن الإقران عند درجة حرارة الغرفة (ساعة)	غسول DCM	٣٠% غسول TFE/DCM
					٤,٢٥ لتر SIMS			
29:A	١٩ لتر	أ) ١٩ لتر ب) ١٩ لتر ٤٣٨مل	×٣ ١٩ لتر	×٢ ١٩ لتر	٤,٢٥ مل NEM DBM	٤,٢٥	١٩ لتر	×٢ ١٩ لتر
30:DPG	١٩,٥ لتر	أ) ١٩,٥ لتر ب) ١٩,٥ لتر ٤٥٠مل	×٣ ١٩,٥ لتر	×٢ ١٩,٥ لتر	٤,٢٥ مل NEM SIMS	٤,٢٥	١٩,٥ لتر	×٢ ١٩,٥ لتر

شكل ٢٣ (يتبع)

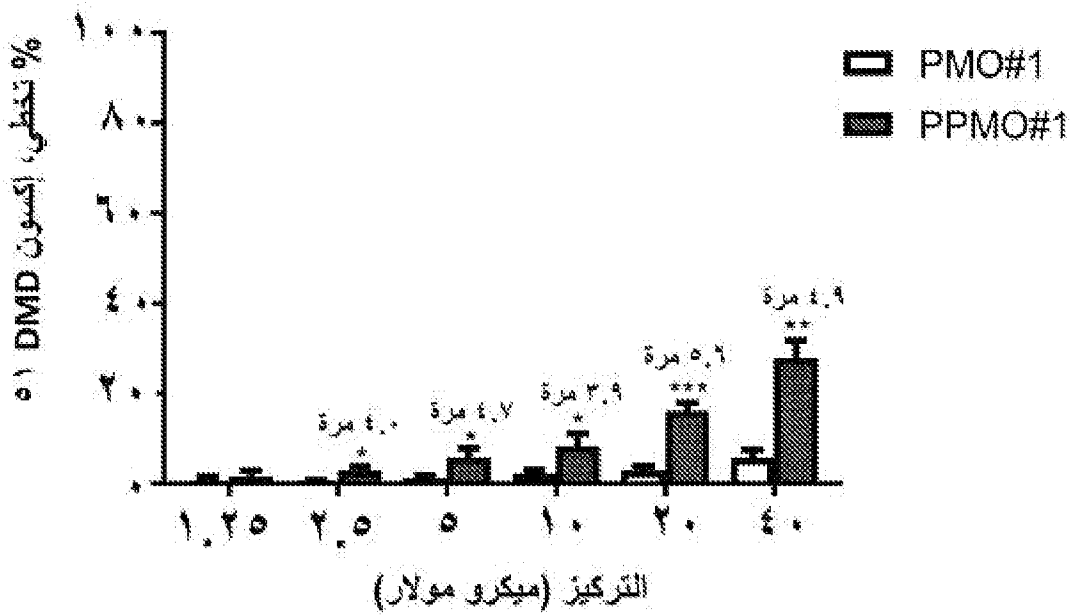
شكل ٢٤


الحجاب الحاجز
القلب
ديستروفين
لامينين
غشاء
ديستروفين
لامينين
غشاء
محلول
MDX
ملحي
مركز
MDX
PPMO
محلول
WT
ملحي
مركز

شكل ٢٥


PMO#1
PPMO#1
% تخطي إكسون ٥١ DMD
١٠٠
٨٠
٦٠
٤٠
٢٠
٠
٣.٣ مرة
٢.٣ مرة
٣.٣ مرة
٣.٦ مرة
٣.٥ مرة
١.٢٥
٢.٥
٥
١٠
٢٠
٤٠
التركيز (ميكرو مولار)

شكل ٢٦


PMO#1
PPMO#1
% تخطي إكسون ٥١ DMD
١٠٠
٨٠
٦٠
٤٠
٢٠
٠
٤.٠ مرة
٤.٧ مرة
٣.٩ مرة
٥.٦ مرة
٤.٩ مرة
*
*
***
**
١.٢٥
٢.٥
٥
١٠
٢٠
٤٠
التركيز (ميكرو مولار)

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