

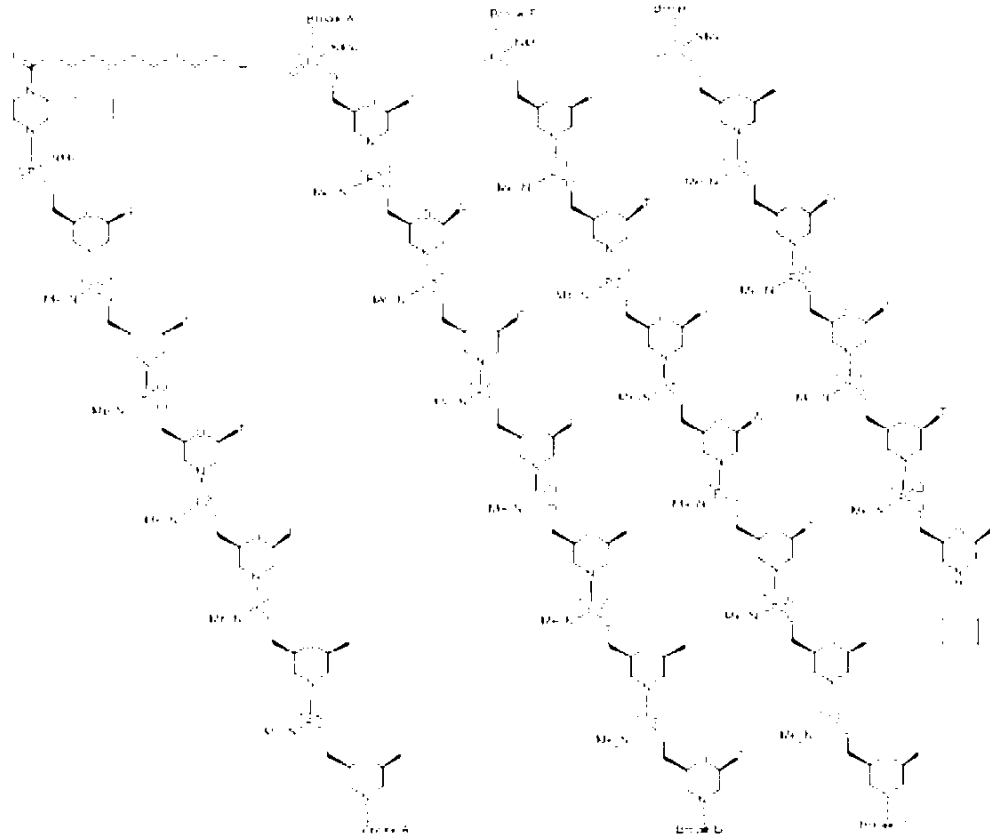
ÖZET**MUSKÜLER DİSTROFİ TEDAVİSİNE YÖNELİK EKSON ATLAMA BİLEŞİMLERİ**

Ekson 53 atlamasını indüklemek üzere insan distrofin genindeki seçilmiş hedef bölgeye
5 bağlanabilen antisens moleküller açıklanır.

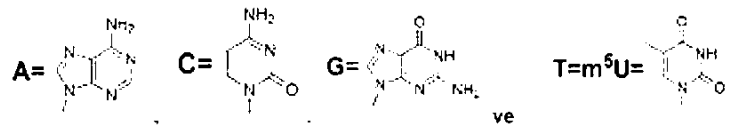
İSTEMLER

1. Aşağıdaki yapıya sahip antisens oligonükleotid veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzudur:

5



burada



10

ve

burada ^ = fosfor merkezinin stereokimyası tanımlanmamıştır.

2. İstem 1'deki antisens oligonükleotidi ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcıyı içeren farmasötik bir bileşimdir.

15

3. Duchenne musküler distrofisi tedavisinde kullanılmaya yönelik istem 2'deki bileşimdir.

TARİFNAME

Musküler distrofi tedavisine yönelik ekson atlama bileşimleri

BULUŞUN SAHASI

5

Mevcut buluş, insan distrofin geninde ekson atlamasını kolaylaştırmak için uygun yeni antisens bileşikler ve bileşimler ile ilgilidir. Aynı zamanda buluşun yöntemlerinde kullanılmak üzere adapte edilmiş yeni antisens bileşimler kullanılarak ekson atlamasının indüklenmesine yönelik yöntemleri sağlar.

10

BULUŞUN ALT YAPISI

15

Antisens teknolojileri, çeşitli ekspresyonlarda gen ekspresyonunu etkilemek için bir dizi yapı kullanarak (transkripsiyon, birleştirme, stabilite, translasyon) geliştirilmektedir. Bu araştırmanın çoğu, çok çeşitli endikasyonlarda anormal veya hastalıkla ilişkili genleri düzeltmek veya kompanse etmek için antisens bileşiklerin kullanımına odaklanmıştır. Antisens molekülleri, gen ekspresyonunu spesifiklikle inhibe edebilir ve bu nedenle, gen ekspresyonunun modülatörleri olarak oligonükleotidlerle ilgili birçok araştırma çalışması, hedef genlerin ekspresyonunu veya cis-etkili elementlerin fonksiyonunu inhibe etmeye odaklanmıştır. Antisens oligonükleotidleri, tipik olarak, bazı viral RNA hedefleri durumunda, sens iplikçik (örneğin, mRNA) veya eksi-iplikçik olan RNA'ya yöneliktir. Spesifik gen aşağı yönde regülasyonunun arzu edilen bir etkisini elde etmek için, oligonükleotidler genellikle ya hedeflenen mRNA'nın bozunmasını artırır, mRNA'nın translasyonunu bloke eder veya cis-etkili RNA elemanlarının fonksiyonunu bloke eder, böylece hedef proteinin *novo* sentezini veya viral RNA'nın replikasyonunu etkili bir şekilde önler.

25

30

Bununla birlikte, bu tür teknikler yararlı değildir, burada amaç natif proteinin üretimini yukarı doğru regüle etmek veya non-sens veya çerçeve-kaydırma mutasyonları gibi erken translasyonların sonlandırılmasını sağlayan mutasyonları kompanse etmek içindir. Bu durumlarda, defektif gen transkripti, hedeflenen bozunmaya veya sterik inhibisyona maruz bırakılmamalıdır, bu nedenle antisens oligonükleotid kimyası, hedef mRNA bozulmasını veya blok translasyonu desteklememelidir.

Çeşitli genetik hastalıklarda, mutasyonların bir genin nihai ekspresyonu üzerindeki etkileri, birleştirme prosesi sırasında hedeflenen bir ekson atlama prosesi yoluyla modüle edilebilir. Birleştirme prosesi, pre-mRNA'daki bitişik ekson-intron bağlantılarını yakın mesafeye getiren ve birbirine birleştirilmesi gereken eksonlar arasındaki reformasyonları ile intronların ucundaki fosfodiester bağlarının ayrılmasını sağlayan karmaşık çok bileşenli makineler tarafından yönlendirilir. Bu kompleks ve son derece hassas prosese, mRNA'da bulunan ve daha sonra birleştirme reaksiyonlarında yer alan çeşitli nükleer birleştirme faktörlerinin bağlandığı, nispeten kısa yarı-korunmuş RNA segmentleri olan dizi motifleri aracılık eder. Birleştirme makinesinin, mRNA proseslerinden önceki motifleri okuma veya tanıma şeklini değiştirerek, diferansiyel olarak birleştirilmiş mRNA molekülleri oluşturmak mümkündür. İlgili mekanizmalar tanımlanmamasına rağmen, insan genlerinin çoğunluğunun normal gen ekspresyonu sırasında alternatif olarak birleştirildiği artık bilinmektedir. Bennett vd. (U.S. Patent No. 6,210,892), hedef RNA'nın RNase H-aracılı klevajını indüklemeyen antisens oligonükleotid analogları kullanılarak doğal suş hücrel mRNA'nın antisens modülasyonunu açıklar. Bu, membranı kapsayan domenleri kodlayan eksonlardan yoksun olan çözünür TNF süper aile reseptörlerinin oluşturulması amacıyla spesifik eksonlardan (örneğin (Sazani, Kole, et al. 2007 tarafından açıklandığı üzere) yoksun olan alternatif olarak birleştirilmiş mRNA'ların üretiminde kullanılır.

Normalde fonksiyonel bir proteinin, buradaki mutasyonlar nedeniyle erken sonlandırıldığı durumlarda, bir kısım fonksiyonel protein üretiminin antisens teknolojisi yoluyla geri kazanılması için bir araç, birleştirme prosesleri sırasında müdahale yoluyla göstermiştir ve hastalıklarla ilişkili eksonlar varsa mümkün olabileceği gösterilmiştir ve hastalığa neden olan mutasyonlarla ilişkili eksonlar bazı genlerden spesifik olarak silinebiliyorsa, bazen natif proteinin benzer biyolojik özelliklerine sahip olan veya ekson ile ilişkili mutasyonların neden olduğu hastalığı iyileştirmek için yeterli biyolojik aktiviteye sahip olan bir kısaltılmış protein ürünü üretilebilir. (örneğin bakınız Sierakowska, Sambade et al. 1996; Wilton, Lloyd ve et al., 1999; van Deutekom, Bremmer-Bout ve et al., 2001; Lu, Mann ve et al., 2003; Aartsma-Rus, Janson ve et al., 2004). Kole et al., (US Patentleri No. 5,627,274; 5,916,808; 5,976,879; ve 5,665,593), hedeflenen mRNA'nın bozunmasını azaltmayan modifiye edilmiş antisens oligonükleotid analogları kullanılarak anormal birleşme ile mücadele yöntemlerini açıklar. Bennett et al., (US Patenti No. 6,210,892), hedef RNA'nın RNase H-aracılı

ayrılmasını indüklemeyen antisens oligonükleotid analoglarını kullanarak doğal suş hücrel mRNA prosesinin antisens modülasyonunu tarif eder.

Hedeflenen ekson atlama prosesinin uzun genlerde özellikle yararlı olması muhtemeldir, burada birçok ekson ve intron bulunur, burada eksonların genetik yapısında fazlalık vardır veya bir protein bir veya daha fazla özel ekson olmadan işlev görebilir. Çeşitli genlerdeki mutasyonların neden olduğu tepe kesmelerine bağlı genetik hastalıkların tedavisi için gen prosesini yönlendirmeye yönelik çabalar antisens oligonükleotidlerin kullanımına odaklanmıştır, burada oligonükleotidler (1) birleştirme prosesinde yer alan elemanlarla tamamen veya kısmen örtüşür; veya (2) normal olarak bu elementte meydana gelen belirli bir birleştirme reaksiyonuna aracılık edecek olan birleştirme faktörlerinin bağlanmasını ve fonksiyonunu bozmak için elemente yeterince yakın bir konumda pre-mRNA'ya bağlanır.

Duchenne musküler distrofisine (DMD), protein distrofin ekspresyonundaki bir defekt neden olur. Proteini kodlayan gen, 2 milyondan fazla DNA nükleotidine yayılmış 79 ekson içerir. Eksonun okuma çerçevesini değiştiren veya bir durdurma kodonu dahil eden veya bir eksonun bütün bir çerçeve eksonu veya eksonlarından veya bir veya daha fazla eksonun kopyalarının çıkarılmasıyla karakterize edilen herhangi bir eksonik mutasyon, DMD ile sonuçlanan işlevsel distrofin üretimini bozma potansiyeline sahiptir.

Daha az şiddetli bir muskuler distrofisi olan Becker muskuler distrofisinin (BMD) ortaya çıktığı bulunmuştur, burada tipik olarak bir veya daha fazla eksonun delesyonu bir mutasyonun, tüm distrofin transkripti boyunca doğru bir okuma çerçevesi ile sonuçlandır, şöyle ki mRNA'nın protein içine translasyonun erken sonlanmaz. Mutasyona uğramış bir distrofin pre-mRNA'nın işlenmesinde yukarı ve aşağı yönde eksonların birleştirilmesi durumunda gen doğru okuma çerçevesini koruyorsa, sonuç bir Becker fenotipi ile sonuçlanan bir aktiviteyi tutan kısa bir dahili delesyon prosesine sahip bir proteini kodlayan bir mRNA'dır.

30

Uzun yıllardan beri distrofin proteininin okuma çerçevesini değiştirmeyen bir ekson veya eksonların delesyonlarının, bir BMD fenotipine yol açarken, bir çerçeve-kaymasına neden olan bir ekson delesyonunun DMD'ye yol açacağı bilinmektedir (Monaco, Bertelson et al., 1988). Genel olarak, nokta mutasyonları ve okuma çerçevesini değiştiren ve böylece uygun protein translasyonunu kesen ekson

35

delesyonları içeren distrofin mutasyonları, DMD ile sonuçlanır. Ayrıca bazı BMD ve DMD hastalarının çoklu eksonları kapsayan ekson delesyonları olduğu da belirtilmelidir.

- 5 Antisens oligonükleotidler ile mutant distrofin pre-mRNA birleştirme işleminin modülasyonu, *in vitro* ve *in vivo* olarak rapor edilmiştir (*bakınız örneğin*, Matsuo, Masumura et al. 1991; Takeshima, Nishio et al. 1995; Pramono, Takeshima et al. 1996; Dunckley, Eperon et al. 1997; Dunckley, Manoharan et al. 1998; Errington, Mann et al. 2003).

10

Mdx fare modelinde atlanan spesifik ve yeniden üretilebilir eksonun birinci örneği Wilton ve et al. tarafından rapor edilmiştir (Wilton, Lloyd ve et al., 1999). Bir antisens molekülü donör birleştirme bölgesine yönlendirerek, kültürlenmiş hücrelerin tedavisinden 6 saat sonra distrofin mRNA'sında uygun ve etkili ekson 23 atlama indüklendi. Wilton et al. ayrıca, fare distrofin pre-mRNA'nın akseptör bölgesini daha uzun antisens oligonükleotidlerle hedeflemeyi de tarif eder. İntron 23 donör birleştirme bölgesine yönlendirilen birinci antisens oligonükleotidi, primer kültürlenmiş miyoblastlarda uygun ekson atlamasını uyarsa da, bu bileşiğin daha yüksek distrofin seviyelerini ekprese eden immortalize hücre kültürlerinde çok daha az etkili olduğu bulundu. Ancak gelişmiş hedefleme ve antisens oligonükleotid tasarımı ile spesifik ekson çıkarma işleminin etkinliği, neredeyse bir büyüklük sırası kadar arttırıldı (Mann, Honeyman et al. 2002).

15

Yapılan son çalışmalar, distrofin yokluğundan etkilenen dokularda minimal advers etkilerin eşlik ettiği sürekli distrofin ekspresyonunun sağlanmasındaki zorluğu ele almaya başlamıştır. Ekson 51'e (PRO051) hedeflenen antisens oligonükleotidinin, DMD'li dört hastada tibialis anterior kasına intramüsküler enjeksiyonu, klinik olarak görünür herhangi bir advers etki olmadan ekson 51'in spesifik atlanması ile sonuçlanmıştır (Mann, Honeyman et al. 2002; van Deutekom, Janson et al. 2007). *mdx* farelerde ekson 23'e hedeflenmiş hücreye nüfuz eden bir peptide (PPMO) konjuge edilmiş antisens fosforodiamidat morfolino oligomerinin sistemin uygulamasını inceleyen çalışmalar, saptanabilir toksisite olmadan iskelet ve kalp kaslarında yüksek ve sürekli distrofin protein üretimi sağlamıştır (Jearawiriyapaisarn, Moulton et al. 2008; Wu, Moulton et al. 2008; Yin, Moulton et al. 2008).

25

30

DMD tedavisine yönelik olarak birleştirmeyi değiştiren oligonükleotidlerin (SSO'lar) güvenliğini ve etkinliğini test eden son klinik çalışmalar, splisozomun sterik blokajı ile pre-mRNA'ların alternatif birleşmesini indüklemek üzere SSO teknolojiye dayalıdır (Cirak *et al.*, 2011; Goemans *et al.*, 2011; Kinali *et al.*, 2009; van Deutekom *et al.*, 2007).

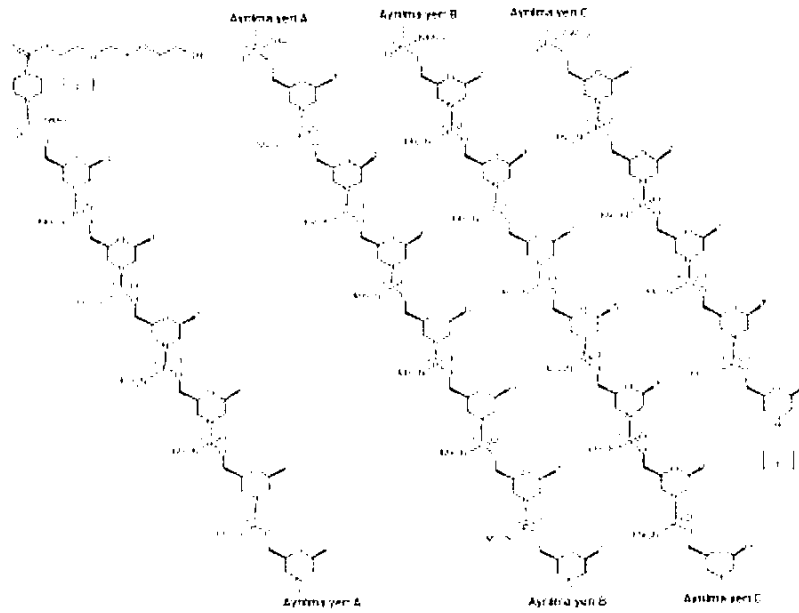
Bu başarılarla rağmen distrofin eksonlarının çoğaltılması için hedeflenen gelişmiş antisens oligomerlere ve terapötik DMD uygulamalarına yönelik gelişmiş uygulama bileşimlerine ve yöntemlerine gereksinim vardır.

10

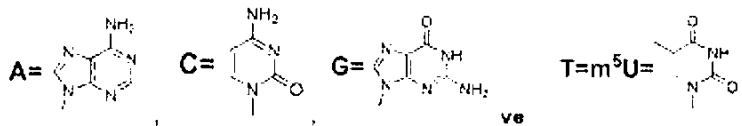
BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

Mevcut buluş, aşağıdaki yapıya sahip bir antisens oligonükleotidini veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu sağlar:

15



burada



20

ve

burada ^ = fosfor merkezin stereokimyası tanımlanmamıştır.

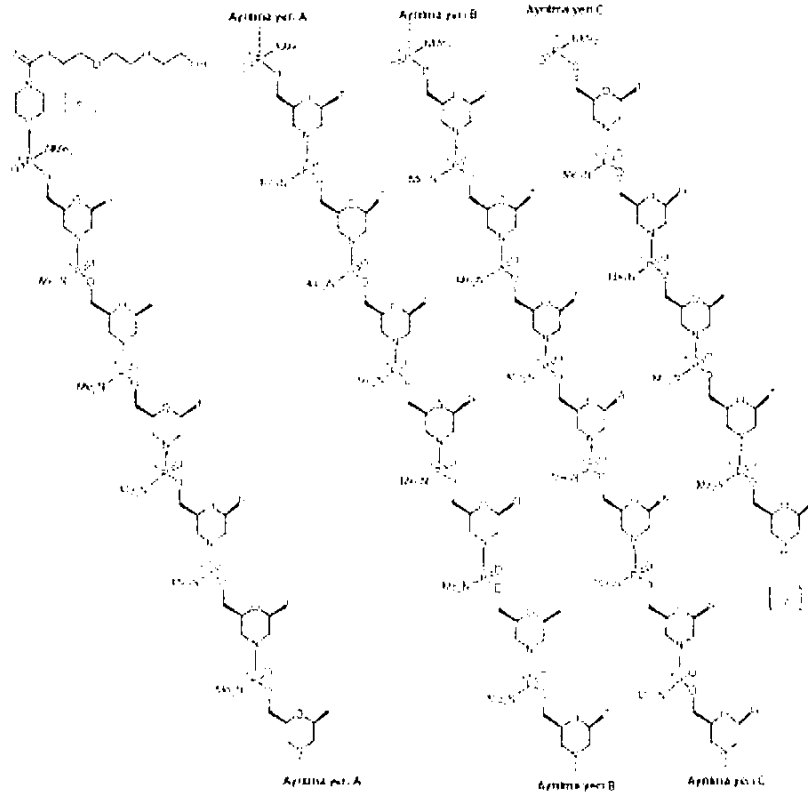
Mevcut buluş aynı zamanda, mevcut buluşa göre antisens oligonükleotidi ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcıyı içeren farmasötik bir bileşimi sağlar.

5 Mevcut buluş aynı zamanda, Duchenne musküler distrofisi tedavisinde kullanılmaya yönelik mevcut buluşa göre farmasötik bir bileşimi sağlar.

Antisens oligomer, bir polietilen glikol molekülüne kimyasal olarak bağlanır.

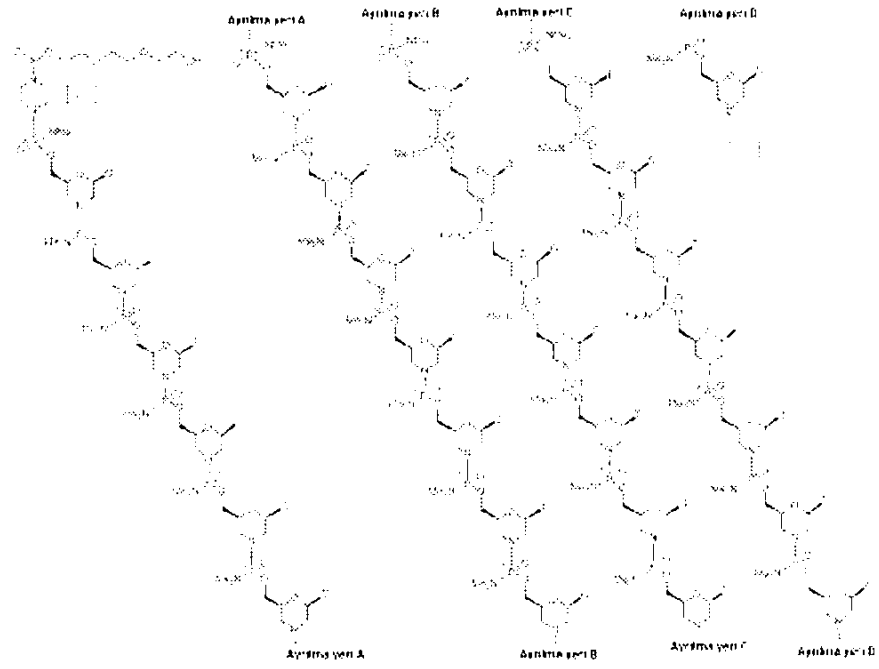
Buluş, bir antisens oligomeri sağlar, burada oligomer aşağıdaki yapıya sahiptir:

10

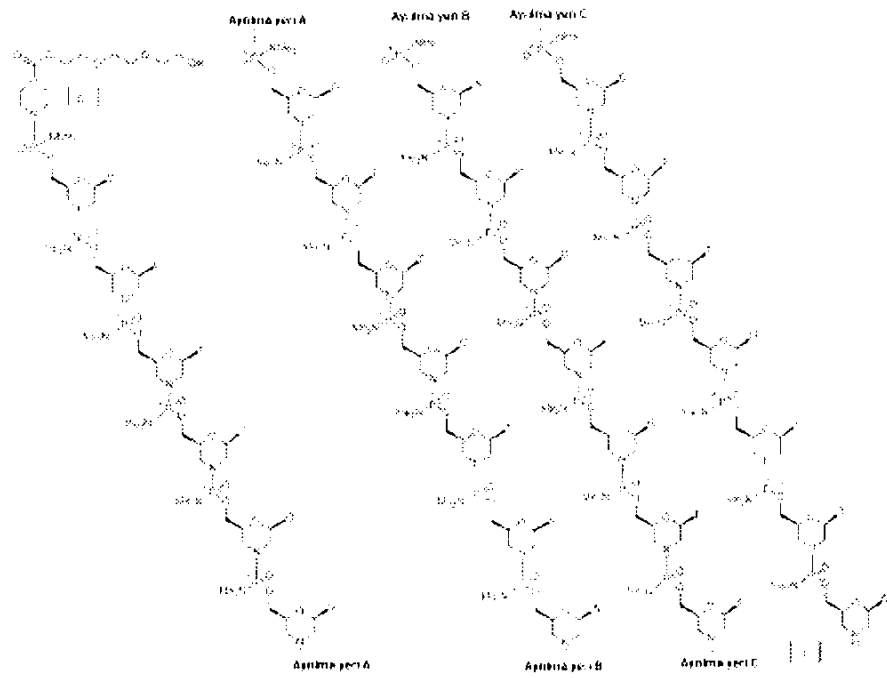


H53A(+36+60).

15 Burada, aşağıdaki yapılara sahip diğer antisens oligomerleri açıklanır:

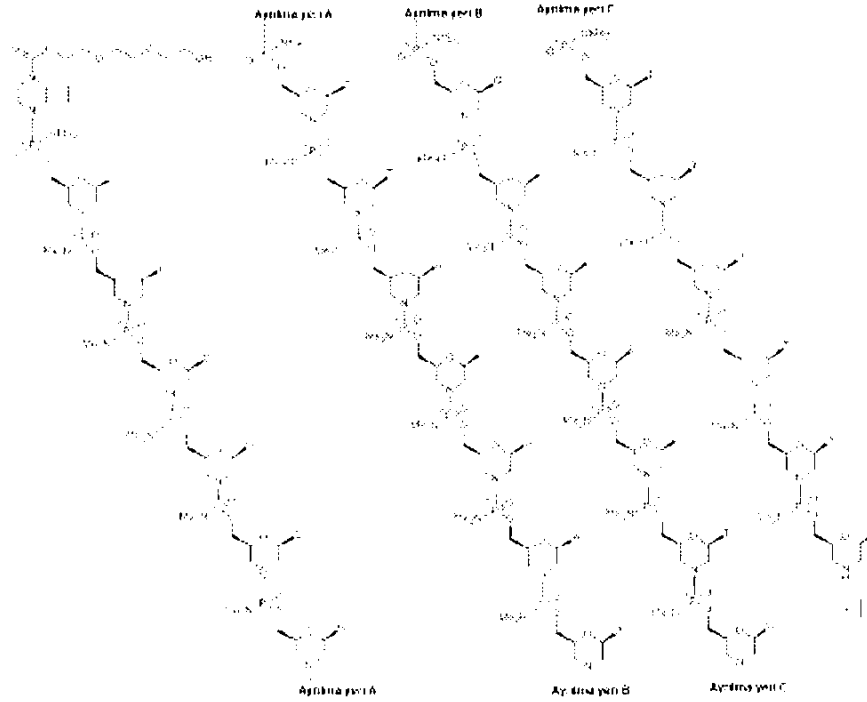


H53A(+30+57),



5

H53A(+30+56) ve



H53A(+30+55).

- 5 Bir yöne göre buluş, ekson atlamasını indüklemek üzere insan distrofin pre-mRNA'sında seçilmiş bir hedefe bağlanabilen bir antisens molekülü sağlar.

Mevcut tarifname, aşağıda tanımlanan, ekson 53'e hedeflenmiş antisens dizileri içerir.

H53A(+36+60): 5'-GTTGCCTCCGGTCTGAAGGTGTTC-3' (SEQ ID NO:1)

10

Antisens oligomeri spesifik olarak tavlama bölgesine H53A(+36+60) hibritlenir ve SEQ ID NO: 1 dizisine sahiptir.

Mevcut buluşa göre antisens oligonükleotidi, bir polietilen glikol bölümüne kimyasal olarak bağlanır.

15

Bir başka yönde buluş, mevcut buluşa göre antisens oligonükleotidleri ve fosfat tamponu içeren bir salin solüsyonunu içeren farmasötik bileşimleri sağlar.

20

Bir başka yönde buluş, burada tanımlandığı üzere belirli bir proteini kodlayan bir gende mutasyonun olduğu ve mutasyon etkisinin, ekson atlaması ile kaldırıldığı genetik bir hastalıktan şikayet eden bir hastanın tedavisinde kullanılmaya yönelik antisens

molekölü sağlar. Tedavi: (a) burada açıklanan yöntemlere göre bir antisens molekülünün seçilmesi ve (b) bu molekülün bu tür bir tedaviye ihtiyacı olan hastaya uygulanması adımlarını içerir.

- 5 Başka bir yönde buluş, Duchenne musküler distrofisi tedavisinde kullanılmaya yönelik mevcut buluşa göre farmasötik bir bileşimi sağlar.

Bu ve diğer amaçlar ve özellikler, aşağıdaki detaylı açıklama şekiller ile birlikte okunduğunda daha iyi anlaşılacaktır.

10

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

Şekil 1A, fosforodiamidat bağı olan örnek niteliğindeki bir morfolino oligomeri yapısını gösterir.

15

Şekil 1B, arjininden zengin bir peptit ve antisens oligomerinin konjugatını gösterir.

Şekil 1C, Şekil 1'deki gibi bir konjugatı (buluşa göre değildir) gösterir, burada omurga bağları, bir veya birkaç pozitif yüklü grubu içerir.

20

Şekiller 1D-G, D ila G olarak gösterilen, örnek niteliğindeki morfolino oligonükleotidlerinin tekrarlayan alt birim segmentini gösterir.

25

Şekiller 2A-2B, katı faz sentezine yönelik bir bağlayıcı ve oligomer sentezine yönelik katı bir desteğin hazırlanışına yönelik reaksiyon şemasını gösterir.

Şekil 3, kültürlenmiş primer miyoblastlarda ekson 53 atlamasının indüklenmesine yönelik örnek niteliğindeki antisens oligomerlerinin nispi aktivitelerini gösteren bir grafiği gösterir. Belirtilen oligomerler ile muamele edilen primer miyoblastlardan izole edilen RNA, ekson 53'e spesifik yuvalanmış RT-PCR amplifikasyonuna tabi tutulmuştur, akabinde jel elektroforezi ve bant şiddeti ölçümü yapılmıştır. Veriler, PCR ile değerlendirilen ekson atlama %'si, yani tam uzunluktaki PCR ürününe göre eksonu atlanmış ürünün bant şiddeti olarak grafiklenir.

30

35

Şekil 4, kültürlenmiş insan rabdomiyosarkom hücrelerinde ekson 53 atlamasının indüklenmesine yönelik örnek niteliğindeki antisens oligomerlerinin nispi aktivitelerini gösteren bir grafiği gösterir. Belirtilen oligomerler ile muamele edilmiş rabdomiyosarkom hücrelerinden izole edilen RNA, ekson 53'e spesifik

5 yuvalanmış RT-PCR amplifikasyonuna tabi tutulmuştur, akabinde jel elektroforezi ve bant şiddeti ölçümü yapılmıştır. Veriler, PCR ile değerlendirilen ekson atlama %'si, yani tam uzunluktaki PCR ürününe göre eksonu atlanmış ürünün bant şiddeti olarak grafiklenir.

Şekil 5A-B, kültürlenmiş primer miyoblastlarda ekson 53 atlamasının indüklenmesine yönelik örnek niteliğindeki antisens oligomerlerinin nispi aktivitelerini gösteren grafikleri gösterir. Belirtilen oligomerler ile muamele edilen primer miyoblastlardan izole edilen RNA, ekson 53'e spesifik yuvalanmış RT-PCR amplifikasyonuna tabi tutulmuştur, akabinde jel elektroforezi ve bant

10 şiddeti ölçümü yapılmıştır. Veriler, PCR ile değerlendirilen ekson atlama %'si, yani tam uzunluktaki PCR ürününe göre eksonu atlanmış ürünün bant şiddeti olarak grafiklenir.

15

BULUŞUN DETAYLI AÇIKLAMASI

Mevcut buluşun uygulamaları, genel olarak, geliştirilmiş antisens bileşikler ve bunların, özellikle insan distrofin geninde ekson atlamasını indüklemek için tasarlanan kullanım yöntemleri ile ilgilidir. Distrofin kas fonksiyonunda hayati bir rol oynar ve kasla ilgili çeşitli hastalıklar bu genin mutasyona uğramış formları ile karakterize edilir. Bu

20 nedenle, burada tarif edilen geliştirilmiş antisens bileşikler, Duchenne muskuler distrofisinde (DMD) ve Becker muskuler distrofisinde (BMD) bulunan mutasyona uğramış distrofin genleri gibi insan distrofin geninin mutasyona uğramış formlarında ekson atlamasını indükler.

Mutasyonların neden olduğu anormal mRNA birleştirme olayları nedeniyle, bu mutasyona uğramış insan distrofin genleri, ya defektif distrofin proteinini eksprese eder veya çeşitli muskuler distrofisi formlarına yol açan bir koşul olarak ölçülebilir hiçbir distrofini eksprese etmez. Bu durumu gidermek için, mevcut buluşun antisens bileşikler mutasyona uğramış bir insan distrofin geninin önceden işlenmiş bir RNA'sının seçilen

30 bölgelerine hibritleşir, aksi takdirde anormal şekilde birleşmiş distrofin mRNA'sında

35

ekson atlama ve diferansiyel birleştirmeye neden olur ve böylece kas hücrelerinin fonksiyonel bir distrofin proteinini kodlayan bir mRNA transkripti üretmesine olanak sağlar. Bazı uygulamalarda ortaya çıkan distrofin proteini, zorunlu olarak "doğal suş" bir distrofin formu değil, kesilmiş, ancak işlevsel veya yarı fonksiyonel bir distrofin formudur.

Kas hücrelerinde fonksiyonel distrofin proteini seviyelerinin artırılmasıyla, bu ve ilişkili uygulamalar, muskuler distrofisinin profilaksisinde ve tedavisinde, özellikle anormal mRNA birleştirilmesi nedeniyle defektif distrofin proteinlerinin ekspresyonu ile karakterize edilen DMD ve BMD gibi muskuler distrofisinin formlarında yararlıdır. Burada tarif edilen spesifik oligomerler ayrıca, kullanımdaki diğer oligomerlere göre geliştirilmiş, distrofin-ekson-spesifik hedefleme sağlar ve böylece ilgili musküler distrofi formlarını tedavi etmenin alternatif yöntemlerine kıyasla önemli ve pratik avantajlar sunar.

Burada açıklanan antisens oligomer, aşağıda verilen SEQ ID NO: 1'deki dizi listesine sahiptir:

H53A(+36+60): 5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3' (SEQ ID NO: 1)

Aksi belirtilmediği sürece, burada kullanılan tüm teknik ve bilimsel terimler, buluşun ait olduğu teknikte sıradan uzmanlığa sahip kişilerce genel olarak anlaşılanlarla aynı anlama sahiptir. Burada tarif edilenlere benzer veya eşdeğer herhangi bir yöntem ve materyal, mevcut buluşun uygulamasında veya testinde kullanılabilse de, tercih edilen yöntemler ve materyaller tarif edilir. Mevcut buluşun amaçlarına göre, aşağıdaki terimler aşağıda tanımlanmaktadır.

I. Tanımlar

"Yaklaşık" ifadesi, %30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 veya 1 referans miktar, seviye, değer, sayı, frekans, yüzde, boyut, boyut, miktar, ağırlık veya uzunluk kadar değişen miktar, seviye, değer, sayı, frekans, yüzde, boyut, boyut, miktar, ağırlık veya uzunluk anlamına gelir.

"Tamamlayıcı" ve "tamamlayıcılık" terimleri, baz eşleştirme kuralları ile ilgili

polinükleotidleri (diğer bir deyişle bir nükleotid dizisini) ifade eder. Örneğin, "T-G-A (5'-3')" dizisi, "T-C-A (5'-3')" dizisine tamamlayıcıdır. Tamamlayıcılık, bazı nükleik asitlerin bazlarının baz eşleştirme kurallarına göre eşleştirildiği "kısmi" olabilir. Veya nükleik asitler arasında "tam" veya "toplam" tamamlayıcılık olabilir. Nükleik asit iplikçikleri arasındaki tamamlayıcılık derecesinin, nükleik asit iplikçikleri arasındaki hibridizasyonun etkinliği ve gücü üzerinde önemli etkileri vardır. Mükemmel bir tamamlayıcılık sıklıkla istense de, bazı uygulamalar, hedef RNA'ya göre bir veya daha fazla fakat tercihen 6, 5, 4, 3, 2 veya 1 yanlış eşleşme içerebilir. Oligomer içindeki herhangi bir yerde varyasyonlar dahil edilmiştir. Bazı uygulamalarda, bir oligomerin terminusuna yakın dizideki varyasyonlar genellikle iç kısımdaki varyasyonlara tercih edilir ve eğer mevcutsa tipik olarak 5' ve/veya 3' terminuslarının yaklaşık 6, 5, 4, 3, 2 veya 1 nükleotidleri içinde bulunur.

"Hücreye nüfuz eden peptit" ve "CPP" terimleri, birbirlerinin yerine kullanılır ve ayrıca transport peptitleri, taşıyıcı peptitler veya peptit transdüksiyon domainleri olarak da adlandırılan katyonik hücreye nüfuz eden peptitleri ifade eder. Burada gösterildiği gibi, peptitler, belirli bir hücre kültürü popülasyonunun hücrelerinin %100'ü dahilinde hücre penetrasyonunu indüklemeye kabiliyetine sahiptir ve sistemik uygulama üzerine *in vivo* olarak çoklu dokularda makromoleküler translokasyona izin verir. Tercih edilen bir CPP düzenlemesi, aşağıda ayrıca açıklanan arjininden zengin bir peptittir.

"Antisens oligomeri" ve "antisens bileşiği" ve "antisens oligonükleotidi" terimleri, birbirlerinin yerine kullanılır ve her biri, hedef dizi içinde bir nükleik asit:oligomer heterodupleks oluşturmak için baz eşleştirme molekül bölümlerinin, bir nükleik asitte (tipik olarak bir RNA), Watson-Crick baz eşleşmesi ile bir hedef diziye hibritlenmesini sağlayan, arabirimlerarası bağlantılarla bağlanmış bir baz eşleştirme molekül bölümü içerir. Siklik alt birimler, riboz veya başka bir pentoz şekeri veya tercih edilen bir uygulamada, bir morfolino grubuna dayanır (aşağıdaki morfolino oligomerlerinin tarifine bakınız). Oligomer, hedef dizi ile tam veya tama yakın dizi tamamlayıcılığına sahip olabilir; bir oligomerin terminalleri yanındaki dizide bulunan varyasyonlar genel olarak iç kısımdaki varyasyonlara tercih edilir.

Bu gibi bir antisens oligomeri, mRNA'nın translasyonunu bloke etmek veya inhibe etmek veya natif mRNA öncesi natif birleşme prosesini inhibe etmek için tasarlanabilir ve hibritlendiği bir hedef diziye "yönelik" veya "hedeflenmiş" olduğu söylenebilir. Hedef

dizi tipik olarak, Translasyon Baskılayıcı Oligomer olan bir mRNA'nın AUG başlangıç kodonunu veya Birleştirme Baskılayıcı Oligomer (SSO) olan önceden işlenmiş bir mRNA'nın birleştirme bölgesini içeren bir bölge içerir. Hedef dizi bir ekson içinde veya bir intron içinde olabilir. Bir birleştirme bölgesi için hedef dizi, önceden işlenmiş bir mRNA'da normal bir birleştirme akseptör birleşim yerinin aşağısında 5' ucu 1 ila yaklaşık 25 baz çifti içeren bir mRNA dizisi içerebilir. Tercih edilen bir hedef dizi, bir birleştirme yeri içeren veya tamamen bir ekson kodlama dizisi içinde bulunan veya bir birleştirme akseptör veya donör yerini kaplayan önceden işlenmiş bir mRNA'nın herhangi bir bölgesidir. Bir oligomerin, hedefin nükleik asidine karşı yukarıda tarif edildiği şekilde hedeflendiğinde protein, virüs veya bakteri gibi biyolojik olarak ilgili bir hedefe "karşı hedeflendiği" söylenir.

"Morfolino oligomer" veya "PMO" (fosforamidat- veya fosforodiamidat morfolino oligomer) terimleri, morfolino alt birim yapılarından oluşan bir oligonükleotid analogunu ifade eder, burada (i) yapılar, bir alt birimin morfolino nitrojenini bir bitişik alt ünitenin 5' ekosiklik karbonuna birleştiren, bir ila üç atom uzunluğunda, tercihen iki atom uzunluğunda ve tercihen yüksüz veya katyonik olan, fosfor içeren bağlarla birbirine bağlanır ve (ii) her bir morfolino halkası, bir bazik hidrojen bağıyla bir polinükleotid içindeki bir baza bağlanmak için etkili bir pürin veya pirimidin baz eşleştirme molekül bölümü taşır. Örneğin Şekil 1A'daki yapıya, tercih edilen bir fosforodiamidat bağlantı tipini gösteren yapıya bakınız. Bu bağda, bağlanma veya aktiviteye müdahale etmediği sürece değişiklikler yapılabilir. Örneğin, fosfora bağlı oksijen, sülfür (tiyofosforodiamidat) ile süstitüe edilebilir. 5' oksijen, amino veya düşük alkil ile süstitüe edilmiş amino ile süstitüe edilebilir. Fosfora bağlanan pendant nitrojen süstitüe edilmemiş, monosüstitüe edilmiş veya (isteğe bağlı olarak süstitüe edilmiş) düşük alkil ile süstitüe edilmiş olabilir. Ayrıca aşağıdaki katyonik bağlantıların tartışmasına bakınız. "Morfolino halka yapısı" terimi, "morfolino alt birimi" teriminin yerine kullanılabilir. Fosfora bağlanan pendant nitrojen metil ile disüstitüe edilmiştir. Pürin veya pirimidin bazını eşleştirme kısmı adenin, sitozin, guanin veya timindir. Morfolino oligomerlerinin sentezi, yapıları ve bağlanma özellikleri, U.S. Patent No. 5,698,685, 5,217,866, 5,142,047, 5,034,506, 5,166,315, 5,521,063, 5,506,337, 8,076,476, 8,299,206 ve 7,943,762'de (katyonik bağlar) detaylı olarak açıklanır. Modifiye alt birimler arası bağlar ve terminal gruplar, PCT başvurusu US2011/038459 ve WO/2011/150408 yayınında detaylı olarak açıklanır.

Bir "amino asit alt birimi" veya "amino asit kalıntısı", α -amino kalıntısı residue (-CO-CHR-NH-) veya β - veya diğer bir amino asit kalıntısına (*örneğin*, CO-(CH₂)_nCHR-NH-) refere eder, burada R, yan zincirdir (hidrojen içerebilen) ve n, 1 ila 6, tercihen 1 ila 4'tür.

- 5 "Doğal olarak oluşan amino asit" terimi, doğada bulunan proteinlerde bulunan bir amino aside refere eder. "Doğal olmayan amino asitler" terimi, doğada bulunan proteinlerde bulunmayan amino asitlere refere eder, örnekleri beta-alanin (β -Ala), 6-aminohekzanoik asit (Ahx) ve 6-aminopentanoik asidi içerir.
- 10 Bir "ekson", bir proteini kodlayan nükleik asidin tanımlanmış bir bölümünü veya önceden işlenmiş (veya prekürsör) bir RNA'nın her iki bölümününün birleştirilerek çıkarılmasından sonra bir RNA molekülünün matür formunda temsil edilen bir nükleik asit dizisi anlamına gelir. Matür RNA molekülü bir haberci RNA (mRNA) veya rRNA veya tRNA gibi kodlayıcı olmayan bir RNA'nın fonksiyonel bir formu olabilir. İnsan
- 15 distrofin geninde yaklaşık 79 ekson vardır.

Bir "intron", bir proteine çevrilmemiş olan bir nükleik asit bölgesini (bir gen içinde) ifade eder. Bir intron, bir prekürsör mRNA'ya (pre-mRNA) kopyalanan ve daha sonra olgun RNA oluşumu sırasında birleştirilerek çıkartılan kodlama yapmayan bir bölümdür.

20

"Etkili bir miktar" veya "terapötik olarak etkili miktar", tek doz olarak veya bir dizi dozun bir parçası olarak memeli deneğe uygulanan antisens oligomeri gibi terapötik bir bileşiğin, istenen terapötik etkiyi oluşturmada etkili olan bir miktarına refere eder. Bir antisens oligomeri için bu etki tipik olarak, seçilen hedef dizinin translasyonunun veya

25 doğal birleşme prosesinin inhibe edilmesi yoluyla gerçekleştirilir.

- "Ekson atlama", genel olarak, bütün bir eksonun veya bunun bir bölümünün, önceden işlenmiş bir RNA'dan çıkarıldığı ve bu nedenle, matür RNA'da bulunması durumunun hariç tutulduğu prosese karşılık gelir, şöyle ki matür mRNA bir proteine çevrilir. Bu
- 30 nedenle, atlanan ekson tarafından başka bir şekilde kodlanan proteinin bölümü, proteinin eksprese edilmiş formunda mevcut değildir, tipik olarak proteinin değişmiş ancak işlevsel bir formu oluşturur. Bazı uygulamalarda atlanan ekson, insan distrofin geninden, aksi halde anormal birleştirmeye neden olan dizide bir mutasyon veya başka bir değişiklik içerebilen bir anormal eksondur. Belirli uygulamalarda atlanan ekson,

distrofin geninin 1-79 eksonlarından herhangi biri veya daha fazlasıdır, ancak insan distrofin geninin ekson 53'ü tercih edilir.

"Distrofin", çubuk şeklinde bir sitoplazmik proteindir ve bir kas lifinin hücre iskeletini hücre dışı matrise hücre zarı boyunca bağlayan protein kompleksinin hayati bir parçasıdır. Distrofin çoklu fonksiyonel domainler içerir. Örneğin, distrofin, yaklaşık amino asitler 14-240'ta bir aktin bağlama domaini ve yaklaşık amino asitler 253-3040'ta bir merkezi çubuk domaini içerir. Bu büyük merkezi domain, alfa-aktin ve spektrin ile homolojiye sahip yaklaşık 109 amino asidin, 24 spektrin-benzeri üçlü-heliks element tarafından oluşturulur. Tekrarlar tipik olarak menteşe bölgeleri olarak da adlandırılan dört prolin bakımından zengin tekrarlanmayan bölüm ile ayrılır. 15 ve 16 nolu tekrarlar, distrofinin proteolitik bölünmesi için majör bir bölge sağladığı görünen 18 amino asitlik bir gerilme ile ayrılmıştır. Çoğu tekrar arasındaki dizi özdeşliği %10-25 arasında değişmektedir. Bir tekrar, üç alfa-heliks içerir: 1, 2 ve 3. Alfa heliksleri 1 ve 3, her biri, bir hidrofobik ara yüz boyunca kıvrımlı spiral olarak etkileşime giren 7 heliks dönüşle oluşturulur. Alfa-heliks 2 daha karmaşık bir yapıya sahiptir ve bir Glisin veya Prolin kalıntısı ile ayrılmış dört ve üç heliks dönüşlü segmentlerden oluşur. Her bir tekrar, tipik olarak alfa-heliks 2'nin birinci bölümünde amino asitler 47 ve 48 arasındaki bir intron tarafından kesilen iki ekson tarafından kodlanır. Diğer intron, tekrar heliks-3'ün üzerine dağılmış, tekrardaki farklı konumlarda bulunur. Distrofin ayrıca, civık mantar (*Dictyostelium discoideum*) alfa aktininin C-terminal domainine homoloji gösteren bir sistein bakımından zengin segment (diğer bir deyişle, 280 amino asitte 15 Sistein) dahil olmak üzere, yaklaşık 3080-3360 amino asitinde sistein bakımından zengin bir alan içerir. Karboksi terminal domaini yaklaşık 3361-3685 amino asitlerindedir.

25

Distrofin amino terminusu F-aktin'e bağlanır ve karboksi terminus sarkomdaki distrofinle ilişkili protein kompleksine (DAPC) bağlanır. DAPC, distroglikanlar, sarkoglikanlar, integrinler ve kaveolini içerir ve bu bileşenlerin herhangi birindeki mutasyonlar otozomal kalıtsal musküler distrofisine neden olur. DAPC, distrofin mevcut olmadığına kararsız hale gelir, bu da üye proteinlerin seviyelerinin azalmasına neden olur ve sırayla ilerleyici lif hasarı ve membran sızıntısına yol açar. Duchenne'in musküler distrofisi (DMD) ve Becker'in musküler distrofisi (BMD) gibi çeşitli musküler distrofisi biçimlerinde, kas hücreleri, esasen gen dizisindeki mutasyonlar nedeniyle hiç değişmemiş ve fonksiyonel olarak defektif bir distrofin formu üretir veya hiç distrofin üretmezler, bu da yanlış birleştirmeye yol açar. Defektif distrofin proteininin baskın

35

eskpresyonu veya tamamen distrofin veya bir distrofin benzeri proteinin eksikliği, yukarıda belirtildiği gibi kas dejenerasyonunun hızlı ilerlemesine yol açar. Bu bağlamda, bir "defektif" distrofin proteini, teknikte bilindiği gibi DMD veya BMD'li bazı deneklerde üretilen veya farklı tespit edilebilir distrofin yokluğu ile üretilen distrofin formaları ile karakterize edilebilir.

Bu tarifnamede kullanıldığı haliyle, "fonksiyon" ve "işlevsel" ve benzerleri terimleri, biyolojik, enzimatik veya terapötik bir işlevi ifade etmektedir.

"İşlevsel" bir distrofin proteini, genellikle, tipik olarak değiştirilmiş veya "defektif" distrofin proteininin değiştirilmiş veya "defektif" formuyla karşılaştırıldığında, muskuler distrofisinin karakteristik özelliği olan kas dokusunun ilerleyici bozunmasını azaltmak için yeterli biyolojik aktiviteye sahip bir distrofin proteini anlamına gelir. DMD veya BMD ile bazı konularda mevcuttur. Bazı uygulamalarda fonksiyonel bir distrofin proteini, teknikte rutin tekniklere göre ölçülen doğal suş distrofinin *in vitro* veya *in vivo* biyolojik aktivitesinin yaklaşık %10, %20, %30, %40, %50, %60, %70, %80, %90 veya %100'üne (aralarındaki tüm tamsayılar dahil) sahip olabilir. Bir örnek olarak, *in vitro* kas kültürlerinde distrofine bağlı aktivite, miyotüp büyüklüğüne, miyofibril düzenine (veya düzensizleşmesine), kasılma aktivitesine ve asetilkolin reseptörlerinin spontan kümelenmesine (bakınız örneğin, Brown ve et al., Journal of Cell Journal Science 112:209-216, 1999) göre ölçülebilir. Hayvan modelleri aynı zamanda hastalığın patogenezi için değerli kaynaklardır ve distrofine bağlı aktiviteyi test etmek için bir araç sağlar. DMD araştırması için en yaygın kullanılan hayvan modellerinden ikisi, her ikisi de distrofin negatif olan mdx fare ve golden retriever muskuler distrofisi (GRMD) köpeğidir (bakınız örneğin, Collins & Morgan, Int J Exp Pathol 84: 165-172, 2003). Bu ve diğer hayvan modelleri, çeşitli distrofin proteinlerinin fonksiyonel aktivitesini ölçmek için kullanılabilir. Mevcut buluşun ekson atlayan antisens bileşiklerinin bazılarının ürettiği formlar gibi tepesi kesilmiş distrofin formları dahildir.

"İzole edilmiş" ile, normal haliyle kendisine natif haliyle eşlik eden bileşenlerden büyük ölçüde veya esasen serbest olan malzeme kastedilmektedir. Örneğin, burada kullanıldığı şekliyle "izole edilmiş bir polinükleotid", natif olarak oluşan bir durumda, örneğin, normal olarak fragmana bitişik dizilerden çıkarılmış bir DNA fragmanından, doğal olarak oluşan bir durumda onu çevreleyen dizilerden artırılmış veya uzaklaştırılmış olan bir polinükleotid anlamına gelebilir.

Burada kullanıldığı üzere "yeterli uzunluk", hedef bir distrofin pre-mRNA'sında en az 8, daha tipik olarak 8-30 bitişik nükleobaza tamamlayıcı olan bir antisens oligonükleotidine refere eder.

5 "İyileştirmek" veya "iyileştirici" veya "arttırmak" veya "arttırıcı" veya "uyarmak" veya "uyarıcı", genellikle bir veya antisens bileşiklerin veya bileşimlerinin bir hücre veya bir denekte antisens bileşiği veya bir kontrol bileşiğinin neden olmadığı yanıtla karşılaştırıldığında daha büyük bir fizyolojik yanıt üretme veya buna neden olma kabiliyetini ifade eder (diğer bir deyişle, aşağı yönde etkiler). Ölçülebilir bir fizyolojik

10 yanıt, bir distrofin proteininin işlevsel bir formunun ekspresyonunun arttırılmasını veya kas dokusunda artmış distrofin ile ilgili biyolojik aktivitenin, teknikte anlayış ve buradaki tarifnameden açıkça anlaşılan diğer yanıtlarını içerebilir. Artmış kas işlevi, kas işlevinde yaklaşık %1, %2, %3, %4, %5, %6, %7, %7, %8, %9, %10, %11, %12, %13, %14, %15, %16, %17, %18, %19, %20, %25, %30, %35, %40, %45, %50, %55, %60 %65,

15 %70, %75, %80, %85, %90, %95 veya %100 artış veya iyileştirmeler dahil olmak üzere ölçülebilir. Fonksiyonel bir distrofin eksprese eden kas liflerinin yüzdesi, yaklaşık %1, %2, %, %15, %16, %17, %18, %19, %20, %25, %30, %35, %40, %45, %50, %55, %60, %65, %70, %75, %80, %85, %90, %95 veya %100 kas lifi oranında artmış distrofin ekspresyonu dahil olmak üzere ölçülebilir. Örneğin, liflerin %25-30'unun

20 distrofini eksprese etmesi durumunda kas fonksiyon iyileşmesinin yaklaşık %40 olabileceği gösterilmiştir (bakınız örneğin, DelloRusso ve et al., Proc Natl Acad Sci USA 99: 12979-12984, 2002). Bir "arttırılmış" veya "yükseltilmiş" bir miktar tipik olarak "istatistiksel olarak anlamlı" bir miktardır ve antisens bileşiği (bir ajan yokluğu) veya bir kontrol bileşiği tarafından üretilen miktardan 1.1, 1.2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 ,

25 30, 40, 50 veya daha fazla kez (örneğin, 500, 1000 kez) (1 arasındaki ve üzerindeki tüm tamsayılar ve ondalık noktalar dahil), örneğin, 1.5, 1.6, 1.7. 1.8, vb.) bir artışı içerebilir.

"Azaltma" veya "inhibe etme" terimi, genel olarak, buluşa ait bir veya daha fazla

30 antisens bileşiğinin, burada tarif edildiği gibi teşhis alanındaki rutin tekniklerle ölçülen bir hastalık veya durum semptomu gibi ilgili bir fizyolojik veya hücrel yanıtı "azaltması" ile ilgili olabilir. İlgili fizyolojik veya hücrel yanıtlar (*in vivo* veya *in vitro*), teknikte uzman kişilerce açıkça görülecektir ve muskuler distrofisinin semptomlarında veya patolojisinde veya değiştirilmiş DMD veya BMD'li bireylerde eksprese edilen

35 distrofin formları gibi defektif distrofin formlarının ekspresyonunda azalma içerebilir. Bir

yanıtta "azalma", antisens bileşiği veya bir kontrol bileşimi tarafından üretilen yanıt ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olabilir ve aradaki tüm tamsayılar dahil %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 veya %100 düşüş içerebilir.

Bir bireyin (örneğin, bir insan gibi bir memelinin) veya bir hücrenin "tedavisi", bireyin veya hücrenin doğal seyrini değiştirme denemesinde kullanılan herhangi bir müdahale tipidir. Tedavi bir farmasötik bileşimin uygulanmasını içerir ancak bununla sınırlı değildir ve bir patolojik olayın başlatılmasından veya bir etiyolojik ajan ile temasın ardından profilaktik olarak veya takiben yapılabilir. Tedavi, distrofinle ilişkili bir hastalık veya durumun semptomları veya patolojisi üzerinde arzu edilen herhangi bir etkiyi içerir. Bazı muskuler distrofisi formlarında olduğu gibi protein; örneğin, tedavi edilen hastalığın veya rahatsızlığın bir veya daha fazla ölçülebilir marköründe minimal değişiklikler veya iyileştirmeler içerebilir. Aynı zamanda, tedavi edilen hastalığın veya rahatsızlığın ilerleme hızını azaltmaya, bu hastalığın veya durumun başlangıcını geciktirmeye veya başlangıcının şiddetini azaltmaya yöneltilebilecek "profilaktik" tedaviler de dahildir. "Tedavi" veya "profilaksi", mutlaka hastalığın veya durumun tamamen ortadan kaldırılmasını, iyileştirilmesini veya önlenmesini veya bunlarla ilişkili semptomları göstermez.

Burada kullanıldığı haliyle bir "denek", bir antisens bileşiği ile tedavi edilebilir bir DMD veya BMD semptomu sergileyen veya bu şartlarla ilişkili semptomların herhangi biri ile ilgili bir semptom (örneğin, kas lifi kaybı) sergileme riski taşıyan herhangi bir hayvanı içerir. Uygun denekler (hastalar), laboratuvar hayvanlarını (fare, sıçan, tavşan veya gine domuzu gibi), çiftlik hayvanlarını ve evcil hayvanları veya evde beslenen hayvanları (bir kedi veya köpek gibi) içerir. İnsan olmayan primatlar ve tercihen insan hastalar dahil edilir.

"Alkil" veya "alkilen", 1 ila 18 karbon içeren bir doymuş düz veya dallanmış zincirli hidrokarbon radikalini ifade eder. Örnekler, sınırlama olmaksızın metil, etil, propil, izo-propil, bütül, izo-bütül, tert-bütül, n-pentil ve n-heksil içerir. "Düşük alkil" terimi, 1 ila 8 karbon içeren, burada tanımlandığı gibi bir alkil grubunu ifade eder.

"Alkenil", 2 ila 18 karbon içeren ve en az bir karbon-karbon çift bağ içeren bir doymamış düz veya dallanmış zincirli hidrokarbon radikali anlamına gelir. Örnekler, sınırlama olmaksızın etenil, propenil, izo-propenil, bütenil, izo-bütenil, tert-bütenil, n-pentenil ve n-heksenildir. "Düşük alkenil" terimi, burada tanımlandığı gibi 2 ila 8 karbon içeren bir alkenil grubunu ifade eder.

"Alkinil", en az bir karbon-karbon üçlü bağı içeren 2 ila 18 karbon içeren bir doymamış düz veya dallanmış zincirli hidrokarbon radikali anlamına gelir. Örnekler, sınırlama olmaksızın etinil, propinil, izo-propinil, butinil, izo-butinil, tert-butinil, pentinil ve heksinili içerir. "Düşük alkinil" terimi, burada tanımlandığı gibi 2 ila 8 karbon içeren bir alkinil grubunu ifade eder.

"Sikloalkil", bir mono- veya poli-siklik alkil radikalini ifade eder. Örnekler bunlarla sınırlı olmamak üzere siklobütil, siklopentil, sikloheksil, sikloheptil ve sikloositildir.

"Aril", bir veya daha fazla kapalı halkayı/halkaları olan 5 ila 18 karbon içeren bir siklik aromatik hidrokarbon molekül bölümünü ifade eder. Örnekler sınırlama olmaksızın fenil, benzil, naftil, antrasenil, fenantrasenil ve bifenili içerir.

"Aralkil", R_aR_b formülünün bir radikalini belirtir, burada R_a yukarıda tanımlandığı gibi bir alkilen zinciridir ve R_b yukarıda tanımlandığı gibi bir veya daha fazla aril radikalidir, örneğin benzil, difenilmetil ve benzeridir.

"Tiyoalkoksi", $-SR_c$ formülünün bir radikalini ifade eder; buradaki R_c , burada tanımlandığı gibi bir alkil radikalidir. "Düşük tiyoalkoksi" terimi, 1 ila 8 karbon içeren, burada tanımlandığı gibi bir alkoksi grubunu ifade eder.

"Alkoksi", $-OR_d$ formülünün bir radikalini ifade eder; burada R_d , burada tanımlandığı gibi bir alkil radikalidir. "Düşük alkoksi" terimi, 1 ila 8 karbon içeren, burada tanımlandığı gibi bir alkoksi grubunu ifade eder. Alkoksi gruplarının örnekleri arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, metoksi ve etoksi bulunur.

"Alkoksialkil", bir alkoksi grubu ile sübstitüe edilmiş bir alkil grubunu ifade eder.

"Karbonil", $-C(=O)-$ radikalini ifade eder.

"Guanidinil", $H_2N(C=NH_2)-NH-$ radikalini ifade eder.

"Amidinil", $H_2N(C=NH_2)CH-$ radikalini ifade eder.

5

"Amino", $-NH_2$ radikalini ifade eder.

"Alkilamino", $-NHRd$ veya $-NRdRd$ formülüne sahip bir radikali ifade eder; burada her Rd , bağımsız olarak, burada tanımlandığı gibi bir alkil radikalidir. "Düşük alkilamino" terimi, 1 ila 8 karbon içeren, burada tanımlandığı gibi bir alkilamino grubuna karşılık gelir.

10

"Heterosikl", doymuş, doymamış veya aromatik olan ve bağımsız olarak nitrojen, oksijen ve sülfür arasından seçilen 1 ila 4 heteroatom içeren 5- ila 7 üyeli monosiklik veya 7- ila 10 üyeli bisiklik, heterosiklik bir halka anlamına gelir ve burada nitrojen ve sülfür heteroatomları isteğe bağlı olarak oksitlenebilir ve yukarıda belirtilen heterosiklilerin herhangi birinin bir benzen halkasına kaynaşmış olduğu bisiklik halkalar dahil olmak üzere nitrojen heteroatomu isteğe bağlı olarak kuaternize edilebilir. Heterosikl, herhangi bir heteroatom veya karbon atomu yoluyla bağlanabilir. Heterosikller aşağıda tanımlandığı gibi heteroariller içerir. Dolayısıyla, aşağıda listelenen heteroarillere ilaveten, heterosikller ayrıca morfolinil, pirrolidinonil, pirrolidinil, piperidinil, piperizinil, hidatoinil, valerolaktamil, oksiranil, oksetanil, tetrahidrofuranil, tetrahidroiluranil ve benzerlerini içerir.

15

20

"Heteroaril", 5-10 üyeli ve nitrojen, oksijen ve sülfür arasından seçilen ve hem mono hem de bisiklik halka sistemleri de dahil olmak üzere en az 1 karbon atomu içeren en az bir heteroatom içeren bir aromatik heterosikl halkası anlamına gelir. Temsilci heteroariller, piridil, furil, benzofuranil, tiyofenil, benzotiofenil, kinolinil, pirrolil, indolil, oksazolil, benzoksazolil, imidazolil, benzimidazolil, tiyazolil, benzotiyazolil, tiazolil kinazolinil.

25

30

"İsteğe bağlı olarak sübstitüe edilmiş alkil", "isteğe bağlı olarak sübstitüe edilmiş alkenil", "isteğe bağlı olarak sübstitüe edilmiş alkoksi", "isteğe bağlı olarak sübstitüe edilmiş tioalkoksi", "isteğe bağlı olarak sübstitüe edilmiş alkil amino", "isteğe bağlı olarak sübstitüe edilmiş alt alkil", "isteğe bağlı olarak sübstitüe edilmiş alt alkenil", "isteğe bağlı olarak sübstitüe edilmiş düşük alkoksi", "isteğe bağlı olarak sübstitüe

35

edilmiş düşük tioalkoksi", "isteğe bağlı olarak sübstitüe edilmiş düşük alkil amino" ve "isteğe bağlı olarak sübstitüe edilmiş heterosiklil" terimleri, sübstitüe edildiğinde en az bir hidrojen atomunun bir sübstitüent ile sübstitüe edildiği anlamına gelir. Bir okso sübstitüentinde (=O) iki hidrojen atomu yer değiştirilir. Bu bağlamda, sübstitüentler; 5 döteryum, isteğe bağlı olarak sübstitüe edilmiş alkil, isteğe bağlı olarak sübstitüe edilmiş alkenil, isteğe bağlı olarak sübstitüe edilmiş alkinil, isteğe bağlı olarak sübstitüe edilmiş aril, isteğe bağlı olarak sübstitüe edilmiş heterosikl, isteğe bağlı olarak sübstitüe edilmiş sikloalkil, okso, halojen, --CN, -ORx, NRxRy, NRxC(=O)Ry, NRxSO2Ry, -NRxC(=O)NRxRy, C(=O)Rx, C(=O)ORx, C(=O)NRxRy, -SOMRx ve -SOMNRxRy 10 içerir, burada m 0, 1 veya 2'dir, Rx ve Ry aynı veya farklıdır ve bağımsız olarak hidrojen, isteğe bağlı olarak sübstitüe edilmiş alkil, isteğe bağlı olarak sübstitüe edilmiş alkenil, isteğe bağlı olarak sübstitüe edilmiş alkinil, isteğe bağlı olarak sübstitüe edilmiş aril, isteğe bağlı olarak sübstitüe edilmiş heterosikl veya isteğe bağlı olarak sübstitüe edilmiş sikloalkil ve bahsedilen isteğe bağlı olarak sübstitüe edilmiş alkil, isteğe bağlı 15 olarak sübstitüe edilmiş alkenil, isteğe bağlı olarak sübstitüe edilmiş alkinil, isteğe bağlı olarak sübstitüe edilmiş aril, isteğe bağlı olarak sübstitüe edilmiş heteroarildir ve isteğe bağlı olarak sübstitüe edilmiş sikloalkil sübstitüentleri ayrıca bir veya daha fazla okso, halojen, -CN, -ORx, NRxRy, NRxC(=O)Ry, NRxSO2Ry, -NRxC(=O)NRxRy, C(=O)Rx, C(=O)ORx, C(=O)NRxRy, -SOMRx and -SOMNRxRy ile de sübstitüe edilebilir.

20

Farklı antisens moleküller arasında ayırım yapılması amacıyla bir antisens molekülü isimlendirme sistemi önerilmiştir ve yayınlanmıştır (bakınız Mann et al., (2002) J Gen Med 4, 644-654). Bu isimlendirme özellikle, aşağıda gösterildiği üzere tamamının aynı hedef bölgeye yönlendirildiği çok az farklı birkaç antisens molekül test edilirken söz 25 konusu olmuştur:

H#A/D(x:y).

İlk harf, türü (örneğin H: insan, M, mürin, C: köpek) belirtir. "#", hedef distrofin ekson 30 numarasını belirtir. "A/D", sırasıyla eksonun başlangıcındaki ve bitişindeki akseptör veya donör birleştirme bölgesini gösterir. (x y), tavlama koordinatlarını temsil eder, burada "-" veya "+", sırasıyla intronik veya eksonik dizileri gösterir. Örneğin A(-6+18), hedef eksondan önce gelen intronun son 6 bazını ve hedef eksonun ilk 18 bazını gösterecektir. En yakın birleştirme bölgesi, akseptör olacaktır, böylece bu koordinatlar, 35 "A'dan" önce gelecektir. Donör birleştirme bölgesindeki tavlama koordinatlarının

açıklaması D(+2-18) olabilir, burada son iki 2 eksonik baz ve ilk 18 intronik baz, antisens molekülünün tavlama bölgesine karşılık gelir. Tamamen eksonik tavlama koordinatları, A(+65+85), yani eksonun başlangıcından 65. ve 85. nükleotid arasındaki bölge ile temsil edilecektir.

5

II. Antisens Oligonükleotidler

Antisens molekül(ler), pre-mRNA dizileri içindeki eksonların birleştirilmesinde yer alan nükleotid dizilerine hedeflendiğinde eksonun normal birleşmesi inhibe edilebilir, bu da birleştirme mekanizmasının, olgun mRNA'dan hedeflenen tüm eksonu baypas etmesine neden olur. Birçok gende tüm eksonun silinmesi, önemli fonksiyonel domenlerin kaybı veya okuma çerçevesinin bozulması yoluyla fonksiyonel olmayan proteinin üretilmesine neden olacaktır. Ancak bazı proteinlerde okuma çerçevesi bozulmadan ve proteinin biyolojik aktivitesi ciddi ölçüde değiştirilmeden protein içinden bir veya birkaç eksonun silinmesi yoluyla proteinin kısaltılması mümkündür. Tipik olarak bu tür proteinler, yapısal bir role sahiptir ve/veya uçlarında fonksiyonel domenlere sahiptir. Duchenne musküler distrofisi, tipik olarak okuma çerçevesinin bozulması yoluyla fonksiyonel distrofin gen ürününün sentezini engelleyen mutasyonlardan kaynaklanır. Mutasyonu içeren distrofin geni bölgesinde ekson atlamasını indükleyen antisens oligonükleotidler kas hücrelerinin, fonksiyonel bir distrofin genini kodlayan olgun bir mRNA transkriptini üretmesini sağlayabilir. Elde edilen distrofin proteininin distrofinin “doğal suş” formu olmasına gerek yoktur ancak bunun yerine distrofinin kırpılmış, hala fonksiyonel veya yarı-fonksiyonel bir formudur. Mevcut buluş, ekson 53'te belirtilen distrofin pre-mRNA hedeflerine bağlanabilen ve bu genin işlenmesini yeniden yönlendirebilen antisens moleülleri açıklar.

Antisens oligonükleotidi ve hedef RNA, her moleküldeki ilgili pozisyonların yeterli sayısı, birbiri ile hidrojen bağı oluşturabilen nükleotidler tarafından doldurulduğunda birbirine tamamlayıcıdır, böylece oligonükleotid ile hedef arasında stabil bağlanma meydana gelir. Dolayısıyla “spesifik olarak hibritleşebilen” ve “tamamlayıcı”, oligonükleotid ile hedef arasında stabil ve spesifik bağlanma meydana gelecek şekilde yeterli tamamlayıcılık veya tam eşleşme derecesini belirtmek amacıyla kullanılan terimlerdir. Teknikte bir antisens molekülü dizisinin, spesifik olarak hibritleşebilecek hedef dizisinininki ile %100 tamamlayıcı olmasına gerek olmadığı anlaşılar. Bir antisens molekülü, oligonükleotidin hedef moleküle bağlanmasının, hedef RNA'nın normal

fonksiyonunu engellemesi ve spesifik bağlanmanın istendiği koşullar, yani in vivo analizler veya terapötik tedavi durumundaki fizyolojik koşullar altında ve in vitro analizler durumunda analizlerin gerçekleştirildiği koşullar altında antisens oligonükleotidinin hedef dışı dizilere spesifik olmayan bağlanmasını engellemek üzere

5 yeterli tamamlayıcılık derecesinin olması durumunda spesifik olarak hibritleşebilir.

Ekson silinmesi, kısaltılmış transkribe edilmiş mRNA'daki okuma çerçevesi kaymasına yol açmamalıdır. Dolayısıyla üç eksonun lineer dizisinde birinci ekson ucunun bir kodondaki üç nükleotidden ikisini kodlaması ve sonraki eksonun silinmesi halinde lineer

10 dizideki üçüncü ekson, bir kodona yönelik nükleotid üçlüsünü tamamlayabilen tek bir nükleotid ile başlamalıdır. Üçüncü eksonun, tek bir nükleotid ile başlamaması halinde kırılmış veya fonksiyonel olmayan protein üretimine neden olacak olan okuma çerçevesi kayması olacaktır.

15 Yapısal proteinlerde eksonların ucundaki kodon düzenlemelerinin, her zaman kodonun ucunda bitmeyeceği, sonuç olarak mRNA'nın çerçeve içi okumasını sağlamak üzere pre-mRNA'dan birden fazla eksonun silinmesinin gerekli olabileceği anlaşılabilecektir. Bu tür durumlarda buluşun yöntemi ile birçok antisens oligonükleotidinin seçilmesi gerekebilir, bunlardan her biri, silinecek eksonlarda birleştirme işleminin

20 indüklenmesinden sorumlu farklı bir bölgeye yönlendirilir.

Antisens moleküller ile dupeks oluşumu esnasında pre-mRNA'nın parçalanmasını önlemek amacıyla antisens molekülleri, endojen RNase H ile klevajı minimize edecek veya önleyecek şekilde adapte edilebilir. Bu özellik, RNA'nın metillenmemiş

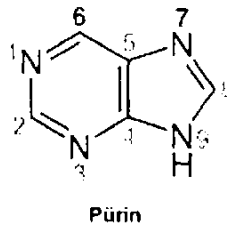
25 oligonükleotidler ile hücre içinde veya RNase içeren ham ekstraktlarda muamelesinin, pre-mRNA: antisens oligonükleotidi dupekslerinin parçalanmasına yol açması nedeniyle yüksek oranda tercih edilir. RNA ile dupeks oluşturduğunda hücresel RNase H ile klevaj edilmeyen antisens moleküllerinin bir örneği, 2'-O-metil türevleridir. 2'-O-metil-oligoribonükleotidler, hücresel ortamda ve hayvan dokularında oldukça stabildir

30 ve RNA ile olan dupeksleri, ribo- veya deoksiribo-muadillerinden daha yüksek Tm değerlerine sahiptir. 2' hidroksiriboz pozisyonunun metilasyonu ve bir fosforotiyoat omurgasının eklenmesi, yüzeysel olarak RNA'yı taklit eden ancak nükleaz ile parçalanmaya çok daha dirençli olan moleküllerin üretilmesindeki ortak stratejidir.

RNase H'yi aktive etmeyen antisens molekülüleri, bilinen tekniklere göre yapılabilir (bakınız örneğin U.S. Pat. No. 5,149,797). Deoksiribonükleotid veya ribonükleotid dizileri olabilen bu tür antisens molekülüleri basit olarak, RNase H'nin bir üyesi olarak oligonükleotidi içeren dupleks moleküle bağlanmasını sterik olarak engelleyen veya önleyen herhangi bir yapısal modifikasyonu içerir, bu yapısal modifikasyon, dupleks oluşumunu büyük ölçüde engellemez veya bozmaz. Dupleks oluşumunda yer alan oligonükleotid parçalarının, RNase H bağlanmasında yer alan parçalarından büyük ölçüde farklı olması nedeniyle RNase H'yi aktive etmeyen birkaç antisens molekülü mevcuttur. Örneğin bu tür antisens molekülüleri oligonükleotidler olabilir, burada nükleotidler arası köprüleyici fosfat kalıntılarından en az biri veya tamamı, modifiye fosfatlar, örneğin metil fosfonatlar, metil fosforotiyoatlar, fosforomorfolidatlar, fosforopiperazidatlar ve fosforamidatlardır. Örneğin nükleotidler arası köprüleyici fosfat kalıntılarından ikisinden biri açıklanan şekilde modifiye edilebilir. Sınırlayıcı olmayan bir başka örnekte bu tür antisens molekülüleri, nükleotidlerin en az birinin veya tamamının, 2' düşük alkil bölümü (örneğin, C₁-C₄, lineer veya dallanmış, doymuş veya doymamış alkil, örneğin metil, etil, etenil, propil, 1-propenil, 2-propenil ve izopropil) içerdiği molekülüdür. Örneğin nükleotidlerin ikisinden biri, açıklanan şekilde modifiye edilebilir.

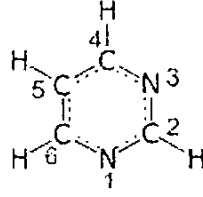
Oligonükleotidler aynı zamanda nükleobaz (teknikte genellikle basit olarak "baz" olarak refere edilir) modifikasyonlarını veya süstitüsyonlarını içerebilir.

Pürin bazları, genel formül ile açıklandığı üzere bir imidazol halkasına kaynaşık bir pirimidin halkasını içerir:



Adenin ve guanin, nükleik asitlerde en yaygın olarak bulunan iki pürin nükleobazıdır.

Pirimidin bazları, genel formül ile açıklandığı üzere altı üyeli bir pirimidin halkasını içerir:



Pirimidin

Sitozin, urasil ve timin, nükleik asitlerde en yaygın olarak bulunan pirimidin bazlarıdır.

- 5 Antisens oligonükleotidi, oligonükleotidin aktivitesini, hücresel dağılımını veya hücresel alımını arttıran bir bölüme kovalent olarak bağlanır. Bu bölüm, bir polietilen glikol zinciridir.

- 10 Bu buluşa göre kullanılan antisens molekülleri, katı faz sentezinin iyi bilinen tekniği ile uygun şekilde ve rutin olarak yapılabilir. Bu senteze yönelik ekipman, örneğin Applied Biosystems (Foster City, Calif.) da dahil birkaç tedarikçi tarafından satılır. Oligonükleotidlerin modifiye katı destek üzerinde sentezlenmesine yönelik bir yöntem U.S. Pat. No. 4,458,066'da açıklanır.

- 15 Teknikte bilinen bu tür senteze yönelik bir başka yöntem ek veya alternatif olarak kullanılabilir. Fosforotiyoatlar ve alkilenmiş türevler gibi oligonükleotidlerin hazırlanması amacıyla benzer tekniklerin kullanılacağı iyi bilinmektedir. Bu tür otomatik bir uygulamada dietil-fosforamiditler başlangıç materyalleri olarak kullanılır ve Beaucage, et al., (1981) Tetrahedron Letters, 22:1859-1862 tarafından açıklanan şekilde
20 sentezlenebilir.

- Buluşun antisens molekülleri, in vitro olarak sentezlenir ve biyolojik kökenli antisens bileşimleri içermez. Buluşun molekülleri aynı zamanda, diğer moleküller, molekül yapıları veya alım, dağılım ve/veya absorpsiyona yardım edilmesi amacıyla örneğin
25 lipozomlar, reseptör hedefli moleküller, oral, rektal, topikal veya diğer formülasyonlar gibi bileşiklerin karışımları ile karıştırılabilir, kapsüllenebilir, konjuge edilebilir veya başka şekilde birleştirilebilir.

A. Morfolino Oligomerleri

Fosfor içeren omurga bağlarına sahip morfolino oligomerleri Şekiller 1A-1C'de gösterilir. Şekil 1C'de gösterilen gibi bir fosforodiamidat bağlı morfolino oligomeri, omurga bağlarının tercihen %10-%50'sinde pozitif yüklü grupları içerecek şekilde modifiye edilir. Antisens oligonükleotidler de dahil yüksüz omurga bağlarına sahip morfolino oligomerleri örneğin (Summerton and Weller 1997) ve müşterek sahip olunan U.S. Patent No. 5,698,685, 5,217,866, 5,142,047, 5,034,506, 5,166,315, 5,185, 444, 5,521,063, 5,506,337, 8,076,476, 8,299,206 ve 7,943,762'de detaylı olarak açıklanır. Yüklü bağlar da dahil modifiye bağları olan morfolino oligomerleri, US Patent Başvurusu Yayın No: 2012/0065169'da bulunabilir.

10

Morfolino bazlı alt birimlerin önemli özellikleri şunlardır: 1) bir oligomerik formda stabil, yüksüz veya pozitif yüklü omurga bağlantıları ile bağlanma kabiliyeti; 2) oluşturulan polimerin tamamlayıcı bir baz hedef nükleik asit ile hibritleşebilmesi için bir nükleotit bazını (örneğin adenin, sitozin, guanin, timidin, urasil ve inosin) destekleme yeteneği, hedef RNA dahil, nispeten kısa oligonükleotitlerde (örneğin 10-15 bazlar) yaklaşık 45 °C'nin üzerindeki Tm değerleri; 3) oligonükleotidin, memeli hücrelerine aktif veya pasif olarak taşınması; ve 4) antisens oligonükleotit: RNA heterodupleksinin sırasıyla RNase ve RNase H bozunmasına karşı direnç gösterme kabiliyeti.

20

Talep edilen konunun antisens oligonükleotidleri için örnek teşkil eden omurga yapıları, Şekil 1D-G'de gösterilen morfolino altbirim tiplerini içerir, her biri yüksüz veya pozitif yüklü, fosfor içeren bir alt birim bağlantısıyla bağlanmıştır. Şekil 1D, beş atom tekrar eden birim omurgasını oluşturan fosfor içeren bir bağı göstermektedir, burada morfolino halkaları, 1 atomlu bir fosfoamid bağı ile bağlanır. Şekil 1E, 6 atomlu bir tekrarlayan birim omurgası üreten bir bağlantıyı göstermektedir. Bu yapıda, 5' morfolino karbonu fosfor grubuna bağlayan Y atomu sülfür, nitrojen, karbon veya tercihen oksijen olabilir. Fosfordan X molekül bölümü, florin, bir alkil veya sübstitüe edilmiş alkil, bir alkoksi veya sübstitüe edilmiş alkoksi, bir tiyoalkoksi veya sübstitüe edilmiş tioalkoksi veya morfolinler veya piperidinler gibi siklik yapılar da dahil olmak üzere sübstitüe edilmemiş, monosübstitüe edilmiş veya sübstitüe edilmiş nitrojen olabilir. Alkil, alkoksi ve tioalkoksi, tercihen 1-6 karbon atomu içerir. Z molekül bölümleri sülfür veya oksijendir ve tercihen oksijendir.

30

35

Şekil 1F ve 1G'de gösterilen bağlantılar, 7 atomluk birim uzunluktaki omurgalar için tasarlanmıştır. Yapı 1F'de, X molekül bölümü, Yapı 1E'deki gibidir ve Y molekül bölümü

metilen, sülfür veya tercihen oksijen olabilir. Yapı 1G'de, X ve Y molekül bölümleri Yapı 1E'deki gibidir. Özellikle tercih edilen morfolino oligonükleotidler, Şekil 1E'de gösterilen formun morfolino alt birim yapılarından oluşmaları içerir; burada $X=NH_2$, $N(CH_3)_2$ veya 1-piperazinil veya diğer yüklü gruptur, $Y=O$ ve $Z=O$ 'dur.

5

Büyük ölçüde yüksüz bir oligonükleotid, buluşun bir yönüne göre, *örneğin* her 2-5 yüksüz bağ başına yaklaşık 1, *örneğin* her 10 yüksüz bağ başına yaklaşık 4-5 olmak üzere yüklü bağlar içerecek şekilde modifiye edilebilir. Bazı uygulamalarda antisens aktivitesinde optimal artış, omurga bağlarının yaklaşık %25'inin katyonik olması durumunda görülebilir. Bazı uygulamalarda artış, az sayıda, *örneğin* %10-20 katyonik bağ ile veya katyonik bağların sayısının yaklaşık %60 gibi %50-80 aralığında olması durumunda görülebilir.

10

15

Tamamen katyonik bağlı oligomerler dahil olmak üzere herhangi bir sayıda katyonik bağlantıya sahip oligomerler sağlanır. Bununla birlikte, tercihen, oligomerler, *örneğin*, %10 ila %80'e sahip ve kısmen yüklenmiştir. Tercih edilen uygulamalarda, bağlantıların yaklaşık %10 ila %60'ı ve tercihen %20 ila %50'si katyoniktir.

20

Bir uygulamada, katyonik bağlantılar omurga boyunca serpiştirilir. Kısmen yüklü oligomerler tercihen en az iki ardışık yüksüz bağlantı içerir; diğer bir deyişle, oligomer tercihen tüm uzunluğu boyunca kesin olarak değişen bir modele sahip değildir.

25

Ayrıca, katyonik bağlantı bloklarına ve yüksüz bağlantı bloklarına sahip oligomerler; *örneğin*, yüksüz bağlantıların merkezi bir bloğu, katyonik bağlantıların bloklarıyla veya tam tersi ile çevrilebilir. Bir uygulamada oligomer, yaklaşık olarak eşit uzunlukta 5', 3' ve merkez bölgelere sahiptir ve merkez bölgedeki katyonik bağların yüzdesi, yaklaşık %50'den, tercihen %70'ten büyüktür.

30

Bazı uygulamalarda antisens bileşikler, yukarıda alıntı yapılan referanslarda ve aşağıda bir karışıma veya yüksüz ve katyonik omurga bağlarına sahip oligonükleotidlerin sentezine ilişkin olarak detaylı bir şekilde açıklanan yöntemler kullanılarak aşamalı katı faz sentezi ile hazırlanabilir. Bazı durumlarda *örneğin* farmakokinetikleri arttırmak veya bileşiğin yakalanmasını veya saptanmasını kolaylaştırmak üzere antisens bileşiğe ek kimyasal bölümlerin eklenmesi istenebilir. Bu tür bir bölüm, standart sentetik yöntemlere göre kovalent olarak bağlanabilir. *Örneğin*,

35

bir polietilen glikol kısmının veya başka bir hidrofilik polimerin, örneğin 1-100 monomerik alt birime sahip olan polimerin eklenmesi çözünürlüğün artırılmasında faydalı olabilir.

- 5 Floresin veya radyoaktif etiketli bir grup gibi raporör bir bölüm saptama amaçları için bağlanabilir. Alternatif olarak oligomere bağlanan raporör etiket, etiketli bir antikor veya streptavidini bağlayabilen, antijen veya biyotin gibi bir ligand olabilir. Antisens bir bileşiğin bağlanmasına veya modifikasyonuna yönelik bir bölümün seçilmesinde genellikle, biyo-uyumlu olan ve istenmeyen yan etkiler olmadan bir denek tarafından
- 10 tolere edilebilecek grupların kimyasal bileşiklerinin seçilmesi istenir.

- Her bir morfolino halkası yapısı, tipik olarak bir hücrede veya tedavi edilen bir denekte seçilen bir antisens hedefini hibridize etmek için tasarlanmış bir baz eşleştirme molekül bölümleri dizisi oluşturmak için bir baz eşleştirme molekül bölümünü destekler. Baz
- 15 eşleştirme molekül bölümü, natif DNA veya RNA'da (örneğin, A, G, C, T veya U) bulunan bir purin veya pirimidin veya hipoksantin (nükleosid inosinin baz bileşeni) veya 5-metil sitozin gibi bir analog olabilir.

III. Formülasyonlar ve Uygulama Yolları

20

- Bazı uygulamalarda mevcut buluş, mevcut buluşa göre antisens oligomerlerinin terapötik uygulanması için uygun farmasötik bileşimleri sunar. Bu nedenle, bazı uygulamalarda, mevcut buluş, bir veya daha fazla farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı (katkı maddesi) ve/veya seyreltici ile birlikte formüle edilmiş, mevcut buluşa
- 25 göre oligomerlerin bir veya birkaçının terapötik olarak etkili bir miktarını içeren farmasötik olarak kabul edilebilir bileşimler sunar. Mevcut buluşun bir oligomerinin tek başına uygulanması mümkün olsa da, bileşiğin farmasötik bir formülasyon (bileşim) olarak uygulanması tercih edilir.

- 30 Nükleik asit moleküllerinin uygulanması için yöntemler, örneğin Akhtar et al., 1992, Trends Cell Bio., 2:139; ve Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar; Sullivan et al., PCT WO 94/02595'de açıklanmıştır. Bu ve diğer protokoller, mevcut buluşun izole edilmiş oligomerleri de dahil olmak üzere hemen hemen her türlü nükleik asit molekülünün uygulanması için kullanılabilir.

35

Aşağıda detaylandırıldığı gibi, mevcut buluşun farmasötik bileşimleri, aşağıdakiler için uyarlanmış olanlar dahil, katı veya sıvı halde uygulanmak için özel olarak formüle edilebilir: (1) oral uygulama, örneğin, püskürtmeler (sulu veya sulu olmayan çözeltiler veya süspansiyonlar), tabletler, örneğin, dilde uygulama için bukkal, dil altı ve sistemik absorpsiyon, bolus, tozlar, granüller, macunlar için hedeflenenler; (2) örneğin steril bir çözelti veya süspansiyon halinde subkütan, intramuskuler intravenöz veya epidural enjeksiyon yoluyla parenteral uygulama veya sürekli salımlı formülasyon; (3) örneğin bir krem, merhem veya cilde uygulanan bir kontrollü salımlı yama veya sprej olarak topikal uygulama; (4) intravajinal veya intrarektal olarak, örneğin bir ovül, krem veya köpük olarak; (5) dilaltı olarak; (6) oküler olarak; (7) transdermal olarak; veya (8) nazal olarak.

Burada "farmasötik olarak kabul edilebilir" ifadesi, insanların ve hayvanlar tıbbi dokuları ile temas halinde kullanım için uygun olan ve aşırı toksisite, tahriş, alerjik cevap veya diğer problem veya komplikasyonları olmaksızın, makul bir fayda/risk oranı ile orantılı olarak tıbbi değerlendirme kapsamında, bu bileşiklere, materyallere, bileşimlere ve/veya dozaj formlarını ifade etmek için kullanılır.

Burada kullanıldığı haliyle "farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı" ifadesi, sıvı veya katı bir dolgu maddesi, seyreltici, eksipiyan, imalat yardımcısı (örneğin, kayganlaştırıcı, talk magnezyum, kalsiyum veya çinko stearat veya sterik asit) gibi farmasötik olarak kabul edilebilir bir madde, bileşim veya vehikül veya bahsedilen bileşiğin bir organdan veya vücudun bir kısmından başka bir organa veya vücudun bir kısmına taşınması veya iletilmesinde rol alan veya çözücü kapsülleyici malzeme anlamına gelir. Her taşıyıcı, formülasyonun diğer bileşenleriyle uyumlu olması ve hastaya zarar vermemesi anlamında "kabul edilebilir" olmalıdır.

Farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcılar olarak hizmet edebilecek bazı madde örnekleri, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte şunları içerir: (1) laktoz, glikoz ve sukroz gibi şekerler; (2) mısır nişastası ve patates nişastası gibi nişastalar; (3) selüloz ve sodyum karboksimetil selüloz, etil selüloz ve selüloz asetat gibi türevleri; (4) toz haline getirilmiş kitre; (5) malt; (6) jelatin; (7) talk; (8) kakao yağı ve fitil balmumu gibi ekspisiyanlar; (9) yerfistiği yağı, pamuk tohumu yağı, aspir yağı, susam yağı, zeytin yağı, mısır yağı ve soya yağı gibi yağlar; (10) propilen glikol gibi glikoller; (11) gliserin, sorbitol, manitol ve polietilen glikol gibi polioller; (12) etil oleat ve etil lorat gibi esterler;

(13) agar; (14) magnezyum hidroksit ve alüminyum hidroksit gibi tamponlama maddeleri; (15) aljinik asit; (16) pirojen içermeyen su; (17) izotonik salin; (18) Ringer çözeltisi; (19) etil alkol; (20) pH tamponlu çözeltiler; (21) polyesterler, polikarbonatlar ve/veya polianhidritler; ve (22) farmasötik formülasyonlarda kullanılan diğer toksik olmayan uyumlu maddeler.

Mevcut buluşun antisens oligomerleri ile formülasyon için uygun olan maddelerin sınırlayıcı olmayan ilave örnekleri şunları içerir: PEG konjuge nükleik asitler, fosfolipid konjuge nükleik asitler, lipofilik molekül bölümleri içeren nükleik asitler, fosforotiyoatlar, ilaçların çeşitli dokulara girişini artırabilir P-glikoprotein inhibitörleri (örneğin Pluronic P85); implantasyondan sonra sürekli salımlı uygulama için poli (DL-laktid-coglikolid) mikrosferleri gibi biyobozunur polimerler (Emerich, D F et al., 1999, Cell Transplant, 8, 47-58) Alkermes, Inc. Cambridge, Mass; ve kan beyin bariyeri boyunca ilaçları uygulayabilen ve nöronal alım mekanizmalarını değiştirebilen polibütilsiyanoakrilattan yapılmış olanlar gibi yüklü nanoparçacıklar (Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999).

Buluş ayrıca poli (etilen glikol) lipidleri içeren (PEG ile modifiye edilmiş, dallanmış ve dallanmamış veya bunların kombinasyonları veya uzun süre dolaşım halindeki lipozomlar veya gizli lipozomlar) yüzey modifiye lipozomları içeren farmasötik bileşimin kullanımını da sunmaktadır. Buluşta kullanılmaya yönelik oligomerler ayrıca çeşitli moleküler ağırlıklarda kovalent olarak eklenmiş PEG moleküllerini içerebilir. Bu formülasyonlar, ilaçların hedef dokularda birikmesini arttırmak için bir yöntem sunar. Bu ilaç taşıyıcı sınıfı, mononükleer fagositik sistemin (MPS veya RES) opsonizasyonuna ve ortadan kaldırılmasına, böylece daha uzun kan dolaşım süreleri ve enkapsüle edilmiş ilaç için doku maruziyetinin arttırılmasını mümkün kılar (Lasic et al., Chem. Rev. 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata ve et al., Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 1005-1011). Bu tür lipozomların, muhtemelen neovaskülarize hedef dokularda ekstravazasyon ve yakalama yoluyla tümörlerde seçici olarak biriktiği gösterilmiştir (Lasic ve et al., Science 1995, 267, 1275-1276; Oku ve et al., 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1238, 86-90). Uzun dolaşım halindeki lipozomlar, özellikle MPS'nin dokularında biriktiği bilinen geleneksel katyonik lipozomlara kıyasla, DNA ve RNA'nın farmakokinetiğini ve farmakodinamiğini arttırır (Liu ve et al., J. Biol. Chem. 1995, 270, 24864-24870; Choi et al., Uluslararası PCT Yayın No. WO 96/10391; Ansell et al., Uluslararası PCT Yayın No. WO 96/10390; Holland et al., Uluslararası PCT Yayın No. WO 96/10392); Uzun dolaşım halindeki

lipozomların, karaciğer ve dalak gibi metabolik olarak agresif MPS dokularında birikmeyi önleme yeteneklerine bağlı olarak, ilaçları katıksız lipozomlara kıyasla daha büyük oranda nükleaz bozulmasından korumaktadır.

- 5 Başka bir uygulamada mevcut buluş, U.S. Pat. No. 6,692,911, 7,163,695 ve 7,070,807'de tarif edildiği gibi uygulama için hazırlanan farmasötik oligomer bileşimlerini içerir. Bu bağlamda, bir uygulamada mevcut buluş, tek başına veya PEG ile kombinasyon halinde (örneğin, dallanmış veya dallanmamış PEG veya her ikisinin bir karışımı), PEG ile kombinasyon halinde ve bir hedefleyici molekül bölümü veya
- 10 herhangi birinin bir çapraz bağlama maddesi ile kombinasyon halinde lizin ve histidin (HK) kopolimerlerini içeren bir bileşimde (U.S. Pat. No. 7,163,695, 7,070,807 ve 6,692,911'de tarif edildiği üzere) mevcut buluşun bir oligomerini sağlar. Bazı uygulamalarda mevcut buluş, glukonik asit ile modifiye edilmiş polihistidin veya glukonlanmış-polihistidin/transferrin-polilislin içeren bileşimlerde antisens oligomerleri
- 15 sağlar. Teknikte uzman bir kişi, His ve Lys'e benzer özelliklere sahip amino asitlerin, bileşim içerisinde süstitüe edilebileceğini de bilecektir.

- Mevcut buluşa göre oligomerlerin bazı uygulamaları, amino veya alkilamino gibi bazik bir fonksiyonel grup içerebilir ve bu nedenle farmasötik olarak kabul edilebilir asitlerle
- 20 farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlar oluşturabilirler. Bu bağlamda "farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlar" terimi, mevcut buluşa ait bileşiklerin nispeten toksik olmayan, inorganik ve organik asit ilave tuzlarını ifade eder. Bu tuzlar, uygulama vehikülünde veya dozaj formu imalat prosesinde yerinde veya buluşa ait bir saflaştırılmış bileşiğin serbest baz formunda uygun bir organik veya inorganik asit ile ayrı ayrı reaksiyona
- 25 sokulması ve daha sonra saflaştırma sırasında oluşan tuzun izole edilmesi suretiyle hazırlanabilir. Temsilci tuzlar arasında hidrobromid, hidroklorid, sülfat, bisülfat, fosfat, nitrat, asetat, valerat, oleat, palmitat, stearat, laurat, benzoat, laktat, fosfat, tosilat, sitrat, maleat, fumerat, süksinat, tartrat, naftilat, mesitalat, glukheptonat, laktobiyonat ve laurilsülfonat tuzları ve benzerleri bulunur. (Bakınız örneğin, Berge et al., (1977)
- 30 "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66: 1-19).

- Mevcut buluşa göre oligomerlerin farmasötik olarak kabul edilebilir tuzları, örneğin, toksik olmayan organik veya inorganik asitlerden, bileşiklerin konvansiyonel toksik olmayan tuzlarını veya kuaterner amonyum tuzlarını içerir. Örneğin, bu tür geleneksel
- 35 toksik olmayan tuzlar, hidroklorid, hidrobromik, sülfürik, sülfamik, fosforik, nitrik ve

benzeri gibi inorganik asitlerden türetilenleri; ve asetik, propiyonik, süksinik, glikolik, stearik, laktik, malik, tartarik, sitrik, askorbik, palmitik, maleik, hidroksimaleik, fenilasetik, glutamik, benzoik, salisiklik, sülfanilik, 2-asetoksibenzoik, fumarik, tolüensülfonik, metansülfonik, etan disülfonik, oksalik, izotiyonik ve benzerleri gibi organik asitlerden hazırlanan tuzları içerir.

Bazı uygulamalarda, mevcut buluşa göre oligomerler bir veya daha fazla asidik fonksiyonel grup içerebilir ve bu nedenle farmasötik olarak kabul edilebilir bazlarla farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlar oluşturabilirler. Bu durumlarda "farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlar" terimi, mevcut buluşa ait bileşiklerin nispeten toksik olmayan, inorganik ve organik baz ilave tuzlarını ifade eder. Bu tuzlar da aynı şekilde uygulama vehikülünde veya dozaj formu üretim prosesinde yerinde hazırlanabilir veya saflaştırılmış bileşiğin serbest asit formunda farmasötik olarak kabul edilebilir bir metal katyonun hidroksit, karbonat veya bikarbonat gibi uygun bir bazla, amonyakla veya farmasötik olarak kabul edilebilir organik primer, sekonder veya tersiyer amin ile ayrı ayrı reaksiyona sokulmasıyla hazırlanabilir. Temsilci alkali veya alkalın toprak tuzları, lityum, sodyum, potasyum, kalsiyum, magnezyum ve alüminyum tuzlarını ve benzerlerini içerir. Baz ilaveli tuzların oluşumu için yararlı olan temsili organik aminler arasında etilamin, dietilamin, etilendiamin, etanolamin, dietanolamin, piperazin ve benzerleri yer alır (Bakınız, örneğin, Berge ve et al., yukarıda).

Sodyum lauril sülfat ve magnezyum stearat gibi ıslatıcı maddeler, emülgatörler ve kayganlaştırıcılar, ayrıca renklendirici maddeler, salım maddeleri, kaplama maddeleri, tatlandırıcı, lezzetlendiriciler ve koku verici maddeler, koruyucular ve antioksidanlar da bileşimlerde mevcut olabilir.

Farmasötik olarak kabul edilebilir antioksidanların örnekleri aşağıdakileri içerir: (1) askorbik asit, sistein hidroklorid, sodyum bisülfat, sodyum metabisülfid, sodyum sülfid ve benzeri gibi suda çözünür antioksidanlar; (2) askorbil palmitat, bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitolüen (BHT), lesitin, propil gallat, alfa-tokoferol ve benzerleri gibi yağda çözünen antioksidanlar; ve (3) sitrik asit, etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), sorbitol, tartarik asit, fosforik asit ve benzeri gibi metal şelatlama maddeleri.

Mevcut buluşun farmasötik bileşimleri oral, nazal, topikal (bukkal ve dilaltı dahil), rektal, vajinal ve/veya parenteral uygulama için uygun olanları içerir. Formülasyonlar uygun bir şekilde birim dozaj formunda sunulabilir ve eczacılık alanında iyi bilinen herhangi bir yöntemle hazırlanabilir. Tek bir dozaj formu üretmek için bir taşıyıcı malzeme ile

5 birleştirilebilen aktif içerik miktarı, tedavi edilen konakçıya, özel uygulama şekline bağlı olarak değişecektir. Tek bir dozaj formu üretmek için bir taşıyıcı madde ile birleştirilebilecek aktif içerik miktarı, genellikle terapötik bir etki üreten bileşik miktarı olacaktır. Genel olarak, yüzde yüz üzerinden, bu miktar aktif bileşenin yaklaşık yüzde 0.1 ila yaklaşık yüzde doksan dokuzu, tercihen yüzde 5 ila yaklaşık yüzde 70'i, en çok

10 tercihen yüzde 10 ila yaklaşık yüzde 30 arasında değişecektir.

Bazı uygulamalarda mevcut buluşun farmasötik bir bileşimi, siklodekstrinler, selülozlar, lipozomlar, misel oluşturucu ajanlar, örneğin safra asitleri ve polimerik taşıyıcılar, örneğin, polyesterler ve polianhidritler; ve mevcut buluşun bir oligomerini içerir. Bazı

15 uygulamalarda, yukarıda bahsedilen formülasyon, bahsedilen buluşun bir oligomerini oral olarak biyolojik olarak kullanılabilir hale getirir.

Bu farmasötik bileşimleri hazırlama yöntemleri, mevcut buluşun bir oligomerini taşıyıcı ve isteğe bağlı olarak bir veya daha fazla yardımcı içerikle bir araya getirme adımını

20 içerir. Genel olarak, farmasötik bileşimler, mevcut buluşun bir bileşiğinin sıvı taşıyıcılar veya ince bölünmüş katı taşıyıcılar veya her ikisi ile birlikte birleştirilmesi ve gerektiğinde ürünün şekillendirilmesiyle eşit ve yakın bir şekilde bir araya getirilmesiyle hazırlanır.

Ağızdan uygulamaya uygun buluşa ait farmasötik bileşimler, kapsüller, şaseler, haplar, tabletler, pastiller (aromalı bir baz, genellikle sakaroz ve akasya veya kitre olarak kullanılır), tozlar, granüller veya sulu veya susuz bir sıvı içinde bir çözelti veya süspansiyon formunda veya suda yağ veya suda yağ içinde sıvı emülsiyon olarak veya bir iksir veya şurup olarak veya pastil olarak (jelatin ve gliserin gibi inert bir baz veya

25 sakaroz ve akasya kullanılarak) ve/veya ağızda yılanır ve benzerleri şeklinde olabilir, her biri bir aktif içerik olarak mevcut buluşun antisens oligonükleotidinin önceden belirlenmiş bir miktarını içerir. Mevcut buluşun antisens oligonükleotidi, bir bolus, elektuar veya macun halinde de verilebilir.

35 Oral uygulama için buluşun katı dozaj formlarında (kapsüller, tabletler, haplar, drajeler,

tozlar, granüller, yassı hap ve benzerleri), aktif içerik, sodyum sitrat veya dikalsiyum fosfat gibi bir veya daha fazla farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı ile ve/veya aşağıdakilerden herhangi biri ile karıştırılabilir: (1) nişastalar, laktoz, sukroz, glikoz, manitol ve/veya silisik asit gibi dolgu maddeleri veya genişleticiler; (2) örneğin 5 karboksimetil selüloz, aljinatlar, jelatin, polivinil piroldon, sukroz ve/veya akasya gibi bağlayıcılar; (3) gliserol gibi nemlendiriciler; (4) agar-agar, kalsiyum karbonat, patates veya tapyoka nişastası, aljinik asit, bazı silikatlar ve sodyum karbonat gibi parçalayıcı maddeler; (5) parafin gibi çözelti geciktirici maddeler; (6) dördüncül amonyum bileşikler ve poloksamer ve sodyum loril sülfat gibi surfaktanlar gibi emilim hızlandırıcıları; (7) 10 örneğin setil alkol, gliserol monostearat ve iyonik olmayan surfaktanlar gibi ıslatıcı maddeler; (8) kaolin ve bentonit kili gibi emiciler; (9) talk, kalsiyum stearat, magnezyum stearat, katı polietilen glikoller, sodyum loril sülfat, çinko stearat, sodyum stearat, stearik asit ve bunların karışımları gibi yağlayıcılar; (10) renklendirici maddeler; ve (11) krospovidon veya etil selüloz gibi kontrollü salım maddeleri. Kapsüller, tabletler ve 15 haplar durumunda, farmasötik bileşimler ayrıca tamponlayıcı maddeler içerebilir. Benzer tipteki katı bileşimler, laktoz veya süt şekeri gibi ekspiyanların yanı sıra yüksek moleküler ağırlıklı polietilen glikoller ve benzerleri kullanılarak yumuşak ve sert kabuklu jelatin kapsüllerdeki dolgu maddeleri olarak da kullanılabilir.

20 Bir tablet, isteğe bağlı olarak bir veya daha fazla yardımcı içerikle birlikte, sıkıştırma veya kalıplama yoluyla hazırlanabilir. Sıkıştırılmış tabletler, bağlayıcı (örneğin jelatin veya hidroksipropilmetil selüloz), kayganlaştırıcı, inert seyreltici, koruyucu, parçalayıcı (örneğin, sodyum nişasta glikolat veya çapraz bağlı sodyum karboksimetil selüloz), yüzey aktif veya dağıtıcı ajan kullanılarak hazırlanabilir. Kalıplanmış tabletler, inert bir 25 sıvı seyreltici ile nemlendirilmiş toz halindeki bir bileşimin bir karışımının uygun bir makinede kalıplanmasıyla hazırlanabilir.

Mevcut buluşun farmasötik bileşimlerinin tabletler ve diğer katı dozaj formları, drajeler, kapsüller, haplar ve granüller gibi isteğe bağlı olarak, enterik kaplamalar ve farmasötik 30 formülasyon tekniğinde iyi bilinen diğer kaplamalar gibi kaplamalar ve kabuklar ile skorlanabilir veya hazırlanabilir. Arzu edilen salım profilini, diğer polimer matrisleri, lipozomları ve/veya mikroküreleri temin etmek için, örneğin, çeşitli oranlarda hidroksipropilmetil selüloz kullanılarak, aktif içeriğin yavaş veya kontrollü salımını sağlayacak şekilde formüle edilebilirler. Bunlar hızlı salım için, örneğin dondurularak 35 kurutulmuş olarak formüle edilebilirler. Örneğin, bakteri tutucu bir filtreden süzülerek

veya steril su içinde kullanımdan hemen önce steril su içinde veya başka bir steril enjekte edilebilir ortam içinde çözülebilen steril katı bileşimler şeklinde sterilize edilebilirler. Bu bileşimler isteğe bağlı olarak opaklaştırıcı maddeler de içerebilir ve isteğe bağlı olarak, gecikmeli bir şekilde, gastrointestinal sistemin belirli bir bölümünde,

5 aktif içerik(ler)in salımını sağladıkları bir bileşime sahip olabilirler. Kullanılabilecek gömme bileşimlerin örnekleri arasında polimerik maddeler ve mumlar bulunur. Aktif içerik ayrıca yukarıda açıklanan ekspiyanlardan biri veya daha fazlasıyla uygun olduğunda mikro kapsüllenmiş formda da olabilir.

- 10 Buluşun antisens oligonükleotidlerinin oral uygulaması için sıvı dozaj formları, farmasötik olarak kabul edilebilir emülsiyonları, mikroemülsiyonları, çözeltileri, süspansiyonları, şurupları ve iksirleri içerir. Aktif içeriğe ek olarak, sıvı dozaj formları, teknikte yaygın olarak kullanılan, örneğin su veya diğer çözücüler gibi inert seyrelticiler, etil alkol, izopropil alkol, etil karbonat, etil asetat, benzil alkol, benzil benzoat, propilen
- 15 glikol, 1,3-butilen glikol gibi çözüldürücü maddeler ve emülsiyonlaştırıcılar, yağlar (özellikle pamuk tohumu, yer fıstığı, mısır, tohum, zeytin, hint ve susam yağları), gliserol, tetrahidrofuril alkol, polietilen glikoller ve yağ asidi esterleri sorbitan ve bunların karışımlarını içerebilir.
- 20 İnert seyrelticilerin yanı sıra, oral bileşimler ayrıca ıslatıcı maddeler, emülsifiye edici ve süspanse edici maddeler, tatlandırıcı, lezzet verici, renklendirici, koku verici ve koruyucu maddeler gibi adjuvanları içerebilir.

- Süspansiyonlar, aktif bileşiklere ek olarak, örneğin etoksilatlı izostearil alkoller,
- 25 polioksietilen sorbitol ve sorbitan esterler, mikrokristalli selüloz, alüminyum metahidroksit, bentonit, agar-agar ve kitre ve bunların karışımları gibi süspanse edici maddeler içerebilir.

- Rektal veya vajinal uygulama için formülasyonlar, bir veya daha fazla uygun bileşiği,
- 30 örneğin kakao yağı, polietilen glikol, bir fitil balmumu veya oda sıcaklığında katı olan, ancak vücut sıcaklığında sıvı olan ve bu nedenle rektumda veya vajinal boşlukta eriyecek ve aktif bileşiği serbest bırakacak bir salisilat içeren tahriş edici olmayan ekspiyanlar veya taşıyıcılar ile karıştırmak suretiyle hazırlanabilen bir fitil olarak sunulabilir.

Burada sağlanan bir oligomerin topikal veya transdermal uygulaması için formülasyonlar veya dozaj formları arasında tozlar, spreyler, merhemler, macunlar, kremler, losyonlar, jeller, çözeltiler, yamalar ve inhalanlar bulunur. Aktif oligomerler, steril koşullar altında, farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı ile ve gerekli

5 olabilecek herhangi bir koruyucu, tampon veya itici ile karıştırılabilir. Merhemler, macunlar, kremler ve jeller, mevcut buluşun aktif bir bileşiğine ek olarak, hayvansal ve bitkisel yağlar, yağlar, balmumları, parafinler, nişasta, kitre, selüloz türevleri, polietilen glikoller, silikonlar, bentonitler, silisik asit, talk ve çinko oksit veya bunların karışımları gibi ekspisiyanları içerebilir.

10

Tozlar ve spreyler, mevcut buluşun bir oligomerine ek olarak, laktoz, talk, silisik asit, alüminyum hidroksit, kalsiyum silikatlar ve poliamid tozu gibi ekspisiyanları veya bu maddelerin karışımlarını içerebilir. Spreyler ayrıca kloroflorohidrokarbonlar ve bütan ve propan gibi uçucu süstitüe edilmemiş hidrokarbonlar gibi geleneksel iticileri içerebilir.

15

Transdermal yamalar, mevcut buluşun bir oligomerinin vücuda kontrollü bir şekilde verilmesini sağlama avantajına sahiptir. Bu dozaj formları, oligomeri uygun ortamda çözündürerek veya dağıtarak yapılabilir. Absorpsiyon arttırıcılar, ajanın cilt boyunca akışını arttırmak için de kullanılabilir. Böyle bir akışın hızı, teknikte bilinen diğer

20 yöntemlerin yanı sıra, hızı kontrol eden bir membranın sağlanması veya ajanın bir polimer matrisinde veya jelinde dağılmasıyla kontrol edilebilir.

Parenteral uygulamaya uygun farmasötik kompozisyonlar, bir veya daha fazla farmasötik olarak kabul edilebilir steril izotonik sulu veya susuz çözeltiler,

25 dispersiyonlar, süspansiyonlar veya emülsiyonlar veya kullanımdan hemen önce steril enjekte edilebilir solüsyonlar veya dispersiyonlar halinde yeniden oluşturulabilen ve formülasyonu, hedeflenen alıcının kanı ile izotonik yapan veya süspanse eden veya kalınlaştırıcı maddelerle izotonik yapan şekerler, alkoller, antioksidanlar, tamponlar, bakteriyostatlar içerebilir steril tozlar ile kombinasyon halinde buluşa ait bir veya daha

30 fazla oligomer içerebilir. Buluşun farmasötik bileşimlerinde kullanılacak uygun sulu ve susuz taşıyıcıların örnekleri arasında su, etanol, polioller (örneğin gliserol, propilen glikol, polietilen glikol ve benzeri) ve bunların uygun karışımları, örneğin bitkisel yağlar, zeytinyağı ve etil oleat gibi enjekte edilebilir organik esterler bulunur. Uygun akışkanlık, örneğin lesitin gibi kaplama malzemelerinin kullanılması, dispersiyonlar halinde gerekli

35 parçacık boyutunun korunması ve surfaktanların kullanılmasıyla sağlanabilir.

Bu bileşimler ayrıca koruyucu maddeler, ıslatıcı maddeler, emülgatörler ve dağıtıcı maddeler gibi adjuvanlar da içerebilir. Mikroorganizmaların bahsedilen oligomerler üzerindeki etkisinin önlenmesi, örneğin paraben, klorobutanol, fenol sorbik asit ve benzerleri gibi çeşitli antibakteriyel ve antifungal ajanların dahil edilmesiyle sağlanabilir.

- 5 Ayrıca, şekerler, sodyum klorid ve benzerleri gibi izotonik ajanların bileşimlere dahil edilmesi de arzu edilebilir. Ek olarak, enjekte edilebilir farmasötik formun uzun süreli Emilimi, alüminyum monostearat ve jelatin gibi Emilimi geciktiren ajanların dahil edilmesiyle sağlanabilir.
- 10 Bazı durumlarda, bir ilacın etkisini uzatmak için ilacın deri altından veya kas içi enjeksiyondan emiliminin yavaşlatılması arzu edilir. Bu, teknikte bilinen diğer yöntemler arasında, suda çözünürlüğü zayıf olan bir kristalimsi veya amorf malzeme sıvı süspansiyonunun kullanılmasıyla gerçekleştirilebilir. İlacın emilim hızı, daha sonra, kristal boyutuna ve kristal formuna bağlı olabilen çözünme hızına bağlıdır. Alternatif
- 15 olarak, parenteral olarak uygulanan bir ilaç formunun gecikmeli olarak emilmesi ilacı bir yağ aracında eriterek veya süspansiyon halinde tutularak gerçekleştirilir.

Enjekte edilebilir depo formları, polilaktid-poligliserin gibi biyobozunur polimerlerde bahsedilen oligomerlerin mikrokapsül matrislerinin oluşturulmasıyla yapılabilir.

20 Oligomerin polimere oranına ve kullanılan belirli polimerin yapısına bağlı olarak, oligomer salım hızı kontrol edilebilir. Diğer biyobozunur polimerlerin örnekleri arasında poli(ortoesterler) ve poli(anhidritler) bulunur. Depo enjekte edilebilir formülasyonlar ilacı, vücut dokularıyla uyumlu olan lipozomlara veya mikroemülsiyonlara hapsedmek suretiyle de hazırlanabilir.

- 25 Mevcut buluşun oligomerleri, farmasötik olarak, insanlara ve hayvanlara uygulandığında, kendi başına veya örneğin farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı ile kombinasyon halinde aktif içeriğin %0.1 ila 99'unu (daha tercihen %10 ila 30) içeren farmasötik bir bileşim halinde verilebilir.

- 30 Yukarıda belirtildiği gibi, mevcut buluşun farmasötik bileşimleri oral, parenteral, topikal veya rektal olarak verilebilir. Genellikle her uygulama yoluna uygun formlarda verilirler. Örneğin, tabletler veya kapsül formunda, enjeksiyon, inhalasyon, göz losyonu, merhem, fitil vb. enjeksiyon, infüzyon veya inhalasyon; losyon veya merhem ile topikal; ve fitiller ile rektal yolla uygulanır.
- 35

Burada kullanıldığı şekliyle "parenteral uygulama" ve "parenteral olarak uygulanan" ifadeleri, genellikle enjeksiyon yoluyla enteral ve topikal uygulama dışındaki uygulama modları anlamına gelir ve bunlarla sınırlı olmaksızın intravenöz, intramüsküler, intraarteriyel, intratekal, intrakapsüler, intraorbital, intrakardiyak, intradermal, intraperitoneal, transtraşéal, subkütan, subkutiküler, intraartiküler, subkapsüler, subaraknoid, intraspinal ve intrasternal enjeksiyon ve infüzyonu içerir.

Burada kullanılan "sistemik uygulama", "sistemik olarak uygulanan", "periferik uygulama" ve "periferik olarak uygulanan" ifadeleri, bir bileşiğin, ilacın veya doğrudan merkezi sinir sistemine olmayan başka bir maddenin uygulanması anlamına gelir, şöyle ki hastanın sistemine girer ve bu nedenle, örneğin subkütan uygulama gibi metabolizmaya ve diğer benzer proseslere tabi tutulur.

Seçilen uygulama yolundan bağımsız olarak, uygun bir hidrat formunda kullanılabilen mevcut buluşun antisens oligonükleotidi ve/veya mevcut buluşa ait farmasötik bileşimler, teknikte uzman kişilerce bilinen yöntemlerle geleneksel olarak farmasötik olarak kabul edilebilir dozaj formlarında formüle edilebilir. Mevcut buluşun farmasötik bileşimlerindeki aktif içeriklerin fiili dozaj seviyeleri, belirli bir hasta, bileşim ve uygulama şekli için arzu edilen tedavi edici yanıtı elde etmek üzere hasta için kabul edilemez toksik olmaksızın etkili olan bir miktarda aktif içerik elde edecek şekilde değiştirilebilir.

Seçilen dozaj seviyesi, mevcut buluşun özel oligomerinin aktivitesi veya bunun ester, tuzu veya amidi uygulama yolu, uygulama süresi, atılma oranı veya kullanılan belirli oligomerin metabolizması, absorpsiyon oranı ve kapsamı, tedavi süresi, diğer ilaçlar, bileşikler ve/veya kullanılan belirli oligomer ile kombinasyon halinde kullanılan maddeler, yaş, cinsiyet, ağırlık, durum, genel sağlık ve tedavi edilmekte olan hastanın önceki tıbbi öyküsü ve tıp alanında iyi bilinen benzer faktörler içeren çeşitli faktörlere bağlı olacaktır.

Teknikte sıradan uzmanlığa sahip olan bir hekim veya veteriner, gerekli farmasötik bileşimin etkili miktarını kolayca belirleyebilir ve reçete edebilir. Örneğin, hekim veya veteriner, arzu edilen terapötik etkiyi elde etmek ve arzu edilen etki elde edilinceye kadar dozu kademeli olarak arttırmak için farmasötik bileşimde kullanılan buluşa ait bileşiklerin dozlarını, gerekenden daha düşük seviyelerde başlatabilir. Genel olarak,

buluşun bir bileşiğinin uygun bir günlük dozu, terapötik bir etki üretmek için etkili olan en düşük doz olan bileşik miktarı olacaktır. Böyle etkili bir doz genellikle yukarıda tarif edilen faktörlere bağlı olacaktır. Genellikle, bir hasta için mevcut buluşa ait bileşiklerin oral, intravenöz, intraserebroventriküler ve subkütan dozları, belirtilen etkiler için

5 kullanıldığında, günlük vücut ağırlığının kilogramı başına yaklaşık 0.0001 ila yaklaşık 100 mg arasında değişecektir.

Arzu edilirse, aktif bileşiğin günlük etkin dozu, isteğe bağlı olarak birim dozaj formlarında, gün boyunca uygun aralıklarla ayrı ayrı olarak uygulanan iki, üç, dört, beş,

10 altı veya daha fazla alt doz halinde uygulanabilir. Bazı durumlarda, dozlama günde bir defa uygulanır. Bazı uygulamalarda, işlevsel bir distrofin proteininin ekspresyonunu arzu edilen şekilde sürdürmek için dozlama her 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 gün veya her 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 hafta veya her 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ayda bir veya daha fazla uygulamadır.

15 Nükleik asit molekülleri, lipozomlar içinde kapsüllenme, iyontoforez veya hidrojel, siklodekstrinler, biyobozunur nanokapsüller ve biyo-yapışkan mikrosferleri gibi diğer vehiküllere dahil etme, ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere, teknikte uzman kişilerce bilinen çeşitli yöntemlerle uygulanabilir. Bazı uygulamalarda, lipofilik (suda

20 çözünmeyen) farmasötik ajanların biyoyararlanımını arttırmak için mikroemülsifikasyon teknolojisi kullanılabilir. Örnekler arasında Trimetrin (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). Diğer faydaların yanı sıra, mikroemülsifikasyon, karaciğeri bypass eden ve hepatobiliyer dolaşımdaki bileşiklerin

25 tahrip edilmesini önleyen dolaşım sistemi yerine lenfatik sisteme absorpsiyonu yönlendirerek tercihen biyoyararlanımı sağlar.

Buluşun bir yönünde, farmasötik bileşimler burada sağlanan bir oligomerden oluşturulmuş miseller ve misellerin yaklaşık 100 nm'den daha düşük bir ortalama çapa

30 sahip olduğu en az bir amfifilik taşıyıcı içerir. Daha fazla tercih edilen uygulamalar, yaklaşık 50 nm'den daha küçük bir ortalama çapa sahip miseller sağlar ve daha da çok tercih edilen uygulamalar, yaklaşık 30 nm'den daha az veya hatta yaklaşık 20 nm'den daha düşük bir ortalama çapa sahip miseller sağlar.

- Bütün uygun amfifilik taşıyıcılar tasarlanırken, halihazırda tercih edilen taşıyıcılar genellikle Genel Olarak Güvenli Olarak Tanınan (GRAS) statüsünde olan ve çözelti karmaşık bir su fazıyla temas ettiğinde (insan gastrointestinal kanalında bulunanlar gibi), hem mevcut buluşun bileşiğini çözebilen hem de daha sonraki bir aşamada
- 5 mikroemülsifiye edebilen taşıyıcılardır. Genellikle, bu gereksinimleri karşılayan amfifilik bileşenler, 2-20 HLB (hidrofilik ile lipofilik denge) değerlerine sahiptir ve yapıları, C-6 ile C-20 aralığında düz zincirli alifatik radikalleri içerir. Örnekler polietilen-glikolize yağlı gliseritler ve polietilen glikollerdir.
- 10 Amfifilik taşıyıcıların örnekleri arasında, tamamen veya kısmen hidrojenlenmiş çeşitli bitkisel yağlardan elde edilenler gibi doymuş ve tekli doymamış polietilenglikolize edilmiş yağ asidi gliseritleri bulunur. Bu tür yağlar avantajlı bir şekilde karşılık gelen yağ asitlerinin tri-, di- ve mono-yag asidi gliseritleri ve di- ve mono-polietilenglikol esterlerini,
- 15 kaprik asit 4-10, kaprik asit 3-9, lorik asit 40-50, miristik asit 14-24, palmitik asit 4-14 ve stearik asit %5-15 içeren özellikle tercih edilen bir yağ asidi bileşimini içerebilir. Bir başka faydalı amfifilik taşıyıcı sınıfı, kısmen esterlenmiş sorbitan ve/veya sorbitol, doymuş veya tekli doymamış yağ asitleri (SPAN serisi) veya karşılık gelen etoksile edilmiş analogları (TWEEN serisi) içerir.
- 20 Ticari olarak temin edilebilen amfifilik taşıyıcılar özellikle faydalı olabilirler, bunlara Gelucire serisi, Labrafil, Labrasol veya Lauroglikol (tümü Gattefosse Corporation, Saint Priest, Fransa tarafından üretilen ve dağıtılan), PEG-mono-oleat, PEG-di-oleat, PEG-mono-laurat ve dilaurat, Lecithin, Polysorbate 80, vb (USA ve dünya çapında bir çok şirket tarafından üretilmiş ve dağıtılmıştır) dahildir.
- 25 Bazı uygulamalarda uygulama, mevcut buluşa ait bileşimlerin uygun konakçı hücrelere dahil edilmesi için lipozomlar, nanokapsüller, mikropartiküller, mikroküreler, lipid partiküller, veziküller ve benzerleri kullanılarak gerçekleştirilebilir. Özellikle, mevcut buluşun farmasötik bileşimleri, bir lipid parçacığı, bir lipozom, bir vezikül, bir nanosfer,
- 30 bir nanopartikül veya benzerinde kapsüllenmiş olarak uygulama için formüle edilebilir. Bu tür uygulama vehiküllerinin formülasyonu ve kullanımı bilinen ve geleneksel teknikler kullanılarak gerçekleştirilebilir.
- Mevcut buluşta kullanım için uygun hidrofilik polimerler, hali hazırda suda çözünür,
- 35 vezikül oluşturunucu bir lipide kovalent olarak tutturulabilen ve toksik etkiler olmadan in

vivo olarak tolere edilebilen (diğer bir deyişle biyo-uyumlu) olanlardır. Uygun polimerler arasında polietilen glikol (PEG), polilaktik (polilaktid olarak da adlandırılır), poliglikolik asit (ayrıca poliglikolit olarak adlandırılır), bir polilaktik-poliglikolik asit kopolimeri ve polivinil alkol bulunur. Bazı uygulamalarda, polimerler yaklaşık 100 veya 120 dalton ile yaklaşık 5.000 veya 10.000 dalton veya yaklaşık 300 dalton ile yaklaşık 5.000 dalton moleküler ağırlığa sahiptir. Diğer uygulamalarda polimer, molekül ağırlığı yaklaşık 100 ile yaklaşık 5.000 dalton olan veya molekül ağırlığı yaklaşık 300 ile yaklaşık 5.000 dalton olan polietilenglikoldür. Bazı uygulamalarda, polimer 750 daltonluk polietilenglikoldür (PEG (750)). Polimerler ayrıca, içindeki monomerlerin sayısı ile de tanımlanabilir; mevcut buluşun tercih edilen bir uygulamasında, en az yaklaşık üç monomerden oluşan polimerler, örneğin üç monomerden (yaklaşık 150 dalton) oluşan PEG polimerleri kullanılır.

Mevcut buluşta kullanım için uygun olabilecek diğer hidrofilik polimerler arasında polivinilpirrolidon, polimetoksazolin, polietilokzazolin, polihidroksipropil metakrilamid, polimetakrilamid, polidimilasillamid ve hidroksimetilselüloz veya hidroksietilselüloz gibi türetilmiş selülozlar bulunur.

Bazı uygulamalarda mevcut buluşa ait bir farmasötik bileşim, poliamitler, polikarbonatlar, polialkilenler, akrilik ve metakrilik esterler, polivinil polimerler, poliglikoller, polisiloksanlar, poliüretanlar ve bunların ko-polimerleri, selülozlar, polipropilen, polietilenler, polistiren, laktik asit ve glikolik asit polimerleri, polianhidritler, poli(orto)esterler, poli(butik asit), poli(valerik asit), poli(laktid-ko-kaprolakton), polisakaritler, proteinler, polihitalüronik asit, polycyanoacrylates ve bunların harmanları, karışımları veya kopolimerlerinden oluşam gruptan seçilen biyouyumlu bir polimer içerir.

Siklodekstrinler, sırasıyla Yunan harfleri α , β veya γ ile belirtilen 6, 7 veya 8 glikoz biriminden oluşan siklik oligosakaritlerdir. Glikoz birimleri α -1,4-glukosidik bağlarla bağlanır. Şeker birimlerinin destek konformasyonunun bir sonucu olarak, tüm sekonder hidroksil grupları (C-2, C-3'te) halkanın bir tarafına yerleştirilirken, C-6'daki tüm primer hidroksil grupları diğer tarafa yerleştirilir. Sonuç olarak, dış yüzler hidrofiliktir ve siklodekstrinleri suda çözünür hale getirir. Buna karşılık, siklodekstrinlerin boşlukları hidrofobiktir, çünkü bunlar C-3 ve C-5 atomlarının hidrojeni ve eter benzeri oksijenler tarafından kaplanmıştır. Bu matrisler, örneğin, 17α -estradiol gibi steroid bileşikler dahil

olmak üzere çeşitli nispeten hidrofobik bileşiklerle komplekslemeye izin verir (bakınız örneğin, Van Uden ve et al., *Plant Cell Tiss. Org.* 38: 1-3-113 (1994)). Kompleksleme Van der Waals etkileşimleri ve hidrojen bağı oluşumu ile gerçekleşir. Siklodekstrinlerin kimyasına genel bir bakış için, bakınız, Wenz, *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33: 803-822 (1994).

Siklodekstrin türevlerinin fiziko-kimyasal özellikleri, kuvvetle türüne ve süstitüe derecesine bağlıdır. Örneğin, suda çözünürlüğü, çözünmeyen (örneğin, triasetil-beta-siklodekstrin) ile %147 çözünür (w/v) (G-2-beta-siklodekstrin) arasında değişir. Ek olarak, birçok organik çözücü içinde çözünürler. Siklodekstrinlerin özellikleri, çözünürlüklerini artırıp azaltarak çeşitli formülasyon bileşenlerinin çözünürlüğü üzerinde kontrol sağlar.

Çok sayıda siklodekstrin ve bunların hazırlanmasına yönelik yöntemler tarif edilmiştir. Örneğin, Parmeter (I) et al., (U.S. Patenti 3,453,259) ve Gramera, et al., (US Patenti 3,459,731), elektroneutral siklodekstrinleri tarif etmiştir. Diğer türevler, katyonik özelliklere sahip siklodekstrinleri [Parmeter (II), U.S. Pat. 3,453,257], çözünmez çapraz bağlı siklodekstrinleri (Solms, U.S. 3,420,788) ve anyonik özelliklere sahip siklodekstrinleri [Parmeter (III), ABD Pat. 3,426,011] içerir. Anyonik özelliklere sahip siklodekstrin türevleri arasında karboksilik asitler, fosfor asitleri, fosfin asitleri, fosfonik asitler, fosforik asitler, tiyofosfonik asitler, tiyosülfonik asitler ve sülfonik asitler ana siklodekstrine eklenmiştir [bakınız, Parmeter (III), yukarıda]. Ayrıca, sülfalkil eter siklodekstrin türevleri Stella et al., (U.S. Patenti No. 5,134,127)'de açıklanmaktadır.

Lipozomlar, sulu bir iç bölmeyi çevreleyen en az bir lipid iki katmanlı membrandan oluşur. Lipozomlar, membran tipi ve büyüklüğü ile karakterize edilebilir. Küçük unilamellar veziküller (SUV'ler) tek bir membrana sahiptir ve tipik olarak çapı 0.02 ile 0.05 µm arasında değişmektedir; büyük unilamel veziküller (LUVS) tipik olarak 0,05 µm'den daha büyüktür. Oligolamellar büyük veziküller ve çok hücreli veziküller çoklu, genellikle eşmerkezli membran katmanlarına sahiptir ve tipik olarak 0.1 µm'den daha büyüktür. Konsantrik olmayan birkaç membran içeren lipozomlar, diğer bir deyişle daha büyük bir vezikül içinde bulunan birkaç küçük vezikül, multivesiküler vezikül olarak adlandırılır.

- Mevcut buluşun bir yönü, mevcut buluşun bir oligomerini içeren lipozomları içeren farmasötik bileşimler ilgilidir, burada lipozom membranı, artan taşıma kapasitesine sahip bir lipozom sağlamak üzere formüle edilir. Alternatif olarak veya ek olarak, mevcut buluşa ait antisens oligonükleotidi, lipozomun lipozomun ikili tabakası içinde bulunabilir veya adsorbe edilebilir. Mevcut buluşun antisens oligonükleotidi bir lipid surfaktan ile kümelenebilir ve lipozomun iç alanı içinde taşınabilir; bu durumlarda, lipozom membranı, aktif madde-surfaktan agregasının yıkıcı etkilerine dayanacak şekilde formüle edilir.
- 10 Mevcut buluşun bir uygulamasına göre, bir lipozomun lipid ikili tabakası, polietilen glikol (PEG) ile türetilmiş lipidler içerir, şöyle ki PEG zincirleri lipid ikili tabakanın iç yüzeyinden, lipozom tarafından kapsanan iç alana uzanır ve lipid çift katmanının dışından çevre ortama uzanır.
- 15 Mevcut buluşun lipozomları içinde bulunan aktif maddeler çözündürülmüş formdadır. Surfaktan ve aktif maddenin (emülsiyonlar veya ilgili aktif maddeyi içeren miseller gibi) agregaları, mevcut buluşa göre lipozomların iç alanı içine sıkışabilir. Bir surfaktan, aktif maddeyi dağıtmak ve çözündürmek için etki eder ve değişen zincir uzunluklarında (örneğin yaklaşık C14 ile yaklaşık C20) biyolojik olarak uyumlu lisofosfatidilkolinleri (LPG'ler) içeren fakat bunlarla sınırlı olmayan herhangi bir uygun alifatik, sikloalifatik veya aromatik sürfaktan arasından seçilebilir. PEG-lipidler gibi polimerden türetilmiş lipidler, misel/membran füzyonunu inhibe etmeye etki edecekleri için ve misel oluşturucu moleküllere bir polimer eklenmesi surfaktan molekülünün CMC'sini düşürdüğü ve misel oluşumunda yardımcı olduğu için misel oluşumunda da kullanılabilir. Tercih edilen mikromolar aralıkta CMO'lara sahip surfaktanlar; mevcut buluşun lipozomları içine sıkışmış miselleri hazırlamak için daha yüksek CMC surfaktanları kullanılabilir.
- 30 Mevcut buluşa göre lipozomlar, teknikte bilinen çeşitli tekniklerden herhangi biriyle hazırlanabilir. Bakınız, örneğin, U.S. Pat. 4,235,871; Yayınlanmış PCT başvuruları 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. Örneğin, mevcut buluşun lipozomları, bir hidrofilik polimer ile türetilmiş bir lipidin önceden oluşturulmuş lipozomların lipozomda arzu edilen türevlendirilmiş lipidin nihai mol yüzdesine karşılık gelen lipid
- 35

konsantrasyonlarında lipid aşılınmış polimerlerden oluşan misellere maruz bırakılması gibi önceden oluşturulmuş lipozomlara dağıtılmasıyla hazırlanabilir. Bir hidrofilik polimer içeren lipozomlar, teknikte bilindiği gibi homojenleştirme, lipid-alan hidrasyonu veya ekstrüzyon teknikleriyle de oluşturulabilir.

5

Örnek niteliğindeki başka bir formülasyon prosedüründe, aktif madde önce hidrofobik molekülleri kolayca çözen bir lisofosfatidilkolin veya başka düşük CMC surfaktanda (polimer aşılınmış lipidler dahil) sonikasyon ile dağıtılır. Elde edilen misel aktif madde süspansiyonu daha sonra uygun bir mol polimer aşılınmış lipid veya kolesterol içeren kurutulmuş bir lipid numunesinin rehidratı için kullanılır. Lipid ve aktif madde süspansiyonu daha sonra, teknikte bilindiği gibi ekstrüzyon teknikleri kullanılarak lipozomlar halinde oluşturulur ve elde edilen lipozomlar, standart kolon ayrımı ile kapsüllenmemiş çözeltiden ayrılır.

10

15

Mevcut buluşun bir yönünde, lipozomlar, seçilen bir boyut aralığında büyük ölçüde homojen boyutlara sahip olacak şekilde hazırlanır. Etkili bir boyutlandırma yöntemi, lipozomların sulu bir süspansiyonunun, seçilen bir tek biçimli gözenek boyutuna sahip bir dizi polikarbonat membrandan geçirilmesini içerir; membranın gözenek büyüklüğü kabaca ilgili membranın içinden ekstrüzyonla üretilen en büyük lipozom büyüklüğüne karşılık gelecektir. Bakınız, örneğin, U.S.Pat. 4,737,323 (12 Nisan 1988). Bazı uygulamalarda DharmaFECT® ve Lipofectamine® gibi reaktifler, polinükleotidler veya proteinleri hücrelere dahil etmek için kullanılabilir.

20

25

Mevcut buluşun bir farmasötik bileşiminin salım özellikleri, kapsülleme malzemesine, kapsüllenmiş ilacın konsantrasyonuna ve salım değiştiricilerin varlığına bağlıdır. Örneğin, salım, örneğin midede olduğu gibi sadece düşük bir pH'ta veya bağırsakta olduğu gibi daha yüksek bir pH'ta salınan bir pH'a duyarlı kaplama kullanılarak pH'a bağımlı olacak şekilde manipüle edilebilir. Midenin içinden geçtikten sonra salınımı önlemek için enterik bir kaplama kullanılabilir. Midede bir başlangıç salımı, ardından bağırsakta salım elde etmek için farklı malzemelerle kaplanmış siyanamid çoklu kaplamaları veya karışımları kullanılabilir. Salım ayrıca, su alımını artırabilen veya ilacın kapsülden difüzyonla salınmasını artırabilen tuzların veya gözenek oluşturucu ajanların dahil edilmesiyle de manipüle edilebilir. İlacın çözünürlüğünü değiştiren ekspiyanlar ayrıca salım oranını kontrol etmek için kullanılabilir. Matrisin bozulmasını artıran veya matrinden salınan ajanlar da dahil edilebilir. İlacı ilave edilebilirler, ayrı bir

30

35

faz olarak (diğer bir deyişle parçacıklar halinde) ilave edilebilirler veya bileşiğe bağlı olarak polimer fazda birlikte çözülebilirler. Çoğu durumda, miktar yüzde 0.1 ila yüzde otuz (w/w polimer) arasında olmalıdır. Bozunma artırıcı tipleri arasında amonyum sülfat ve amonyum klorid gibi inorganik tuzlar, sitrik asit, benzoik asit ve askorbik asit gibi organik asitler, sodyum karbonat, potasyum karbonat, kalsiyum karbonat, çinko karbonat ve inorganik bazlar ve protamin sülfat, spermin, kolin, etanolamin, dietanolamin ve trietanolamin gibi organik bazlar ve Tween® ve Pluronic® gibi surfaktanlar bulunur. Matrislere mikroyapı ekleyen gözenek oluşturuucu maddeler (diğer bir deyişle inorganik tuzlar ve şekerler gibi suda çözünür bileşikler) partikül halinde eklenir. Aralık tipik olarak yüzde bir ila otuz (w/w polimer) arasındadır.

Alım, taneciklerin bağırsakta kalma sürelerini değiştirerek de manipüle edilebilir. Bu, örneğin, parçacığı kapsülleyici malzeme olarak bir mukozal yapışkan polimeri ile kaplayarak veya seçerek sağlanabilir. Örnekler, kitosan, selülozlar ve özellikle poliakrilatlar gibi serbest karboksil grupları olan çoğu polimeri (burada kullanıldığı gibi, poliakrilatlar, akrilat grupları ve siyanoakrilatlar ve metakrilatlar gibi modifiye akrilat grupları içeren polimerleri ifade eder) içerir.

Bir oligomer, bir cerrahi veya tıbbi cihaz veya implant tarafından salınacak veya kapsanacak şekilde formüle edilebilir. Bazı yönlerde, bir implant bir oligomer ile kaplanabilir veya başka türlü işleminden geçirilebilir. Örneğin, hidrojeller veya biyouyumlu ve/veya biyobozunur polimerler gibi diğer polimerler, bir implantı mevcut buluşun bileşimleri ile kaplamak için kullanılabilir (diğer bir deyişle bileşim bir hidrojel veya başka bir polimer kullanılarak tıbbi bir cihazla kullanım için uyarlanabilir). Tıbbi cihazların bir maddeyle kaplanması için polimerler ve kopolimerler teknikte iyi bilinmektedir. İmplant örnekleri arasında bunlarla sınırlı olmamakla birlikte, stentler, ilaç salgılayan stentler, sütürler, protezler, vasküler kateterler, diyaliz kateterleri, vasküler greftler, protez kalp kapakçıkları, kalp pilleri, implante edilebilir kardiyoverter defibrilatörler, IV iğneler, kemik ayarı ve pimler, vidalar, plakalar ve diğer cihazlar gibi oluşumlar ve yara iyileşmesi için yapay doku matrisleri bulunur.

Burada sağlanan yöntemlere ek olarak, buluşa göre kullanım için oligomerler, diğer farmasötiklere benzer şekilde, insan veya veteriner tıbbında kullanım için herhangi bir uygun şekilde uygulama için formüle edilebilir. Antisens oligomerleri ve bunlara karşılık gelen farmasötik bileşimler, tek başına veya miyoblast transplantasyonu, kök hücre

terapileri, aminoglikozid antibiyotiklerinin verilmesi, proteazom inhibitörleri ve yukarı yönde regülasyon terapileri (örneğin utrofinin yukarı yönde regülasyonu, distrofinin otozomal bir paraloğu) ile kombinasyon halinde uygulanabilir.

- 5 Açıklanan uygulama yollarının, teknikte uzman bir kişinin, belirli bir hayvana ve duruma yönelik optimum uygulama yolunu ve herhangi bir dozajı kolay bir şekilde belirleyebilecek olması nedeniyle sadece örnek olması amaçlanır. Fonksiyonel yeni genetik materyalin in vitro ve in vivo olarak hücrelere eklenmesine yönelik birçok yaklaşım denenmiştir (Friedmann (1989) Science, 244:1275-1280). Bu yaklaşımlar,
- 10 eksprese edilecek genin modifiye edilmiş retrovirüslere entegrasyonu (Friedmann (1989) yukarıda; Rosenberg (1991) Cancer Research 51(18), suppl.: 5074S-5079S); retrovirüs dışı vektörlere (örneğin adeno-ilişkili viral vektörler) entegrasyon (Rosenfeld, et al. (1992) Cell, 68:143-155; Rosenfeld, et al. (1991) Science, 252:431-434) veya heterolog promotör-hızlandırıcı elemana bağlı bir transgenin lipozomlar ile uygulanması
- 15 (Friedmann (1989), yukarıda; Brigham, et al. (1989) Am. J. Med. Sci., 298:278-281; Nabel, et al. (1990) Science, 249:1285-1288; Hazinski, et al. (1991) Am. J. Resp. Cell Molec. Biol., 4:206-209; and Wang and Huang (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 84:7851-7855); ligand-spesifik, katyon bazlı transport sistemleri ile birleşme (Wu and Wu (1988) J. Biol. Chem., 263:14621-14624) veya çıplak DNA, ekspresyon
- 20 vektörlerinin kullanımını (Nabel et al. (1990), yukarıda); Wolff et al. (1990) Science, 247:1465-1468) içerir. Transgenlerin dokuya direkt enjeksiyonu sadece lokalize ekspresyon oluşturur (Rosenfeld (1992) yukarıda); Rosenfeld et al. (1991) yukarıda; Brigham et al. (1989) yukarıda; Nabel (1990) yukarıda; and Hazinski et al. (1991) yukarıda). Brigham et al. grubu (Am. J. Med. Sci. (1989) 298:278-281 ve Clinical
- 25 Research (1991) 39 (abstract)), DNA lipozom kompleksinin intravenöz veya intratekal uygulamasını takiben farelerin sadece akciğerlerinin in vivo transfeksiyonunu bildirmiştir. İnsan gen terapisi prosedürlerinin inceleme makalesinin bir örneği: Anderson, Science (1992) 256:808-813'tür.

30 **IV. Örnekler**

Materyaller ve Yöntemler

Hücreler ve Doku Kültürü Muamele Koşulları

İnsan Rabdomiyosarkom hücreleri (ATCC, CCL-136; RD hücreleri), L-Glutamin (HyClone), %10 fetal bovin serumu ve %1 Penisilin-Streptomisin antibiyotik solüsyonu (CelGro) içeren 24 mL ısıtılmış DMEM içinde 1.5×10^6 hücre/balonda doku kültürü ile muamele edilmiş T75 balonlarına (Nunc) tohumlanmıştır; 24 saat sonra ortam aspire edilmiştir, hücreler ısıtılmış PBS içinde bir kez yıkanmıştır ve taze ortam eklenmiştir. Hücreler, %5.0 CO₂'de 37°C'lik bir inkübatörde %80 konflüansa kadar büyütülmüştür ve tripsin kullanılarak hasat edilmiştir. Liyofilize fosfordiamidat morfolino oligomerleri (PMO'lar), nükleaz içermeyen su içinde yaklaşık 0.5 ila 2.0 mM'de yeniden süspansiyon edilmiştir; molariteyi doğrulamak üzere PMO solüsyonları, NanoDrop 2000 spektrofotometresi (Thermo Scientific) kullanılarak ölçülmüştür. PMO'lar, üretici talimatlarına göre nükleoporasyon ve SG kiti (Lonza) kullanılarak RD hücrelerine uygulanmıştır. PMO'lar, belirtilen çeşitli konsantrasyonlarda (örneğin, 2.5, 5, 10, 12.5, 20 ve 25 mikromolar) test edilmiştir. Hücreler, 12 veya 24 gözlü plakanın (n=2 veya 3) her gözü için yaklaşık $2 - 3 \times 10^5$ hücrede nükleoporasyon sonrasında 24 saat inkübe edilmiştir ve akabinde aşağıda açıklanan şekilde RNA ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur.

Primer insan miyoblastları, standart teknikler kullanılarak İskelet Kası Hücresi Büyüme Ortamı (PromoCell) içinde kültürlenmiştir. PMO'ların çeşitli konsantrasyonlarda nükleoporasyonu, yukarıda RD hücreleri için açıklanan şekilde yapılmıştır. Hücreler akabinde PromoCell büyüme ortamı içinde 12 gözlü bir plakanın üç kopya halindeki gözlerine yerleştirilmiştir ve aşağıda açıklanan RNA ekstraksiyonu öncesinde 24 saat inkübe edilmiştir.

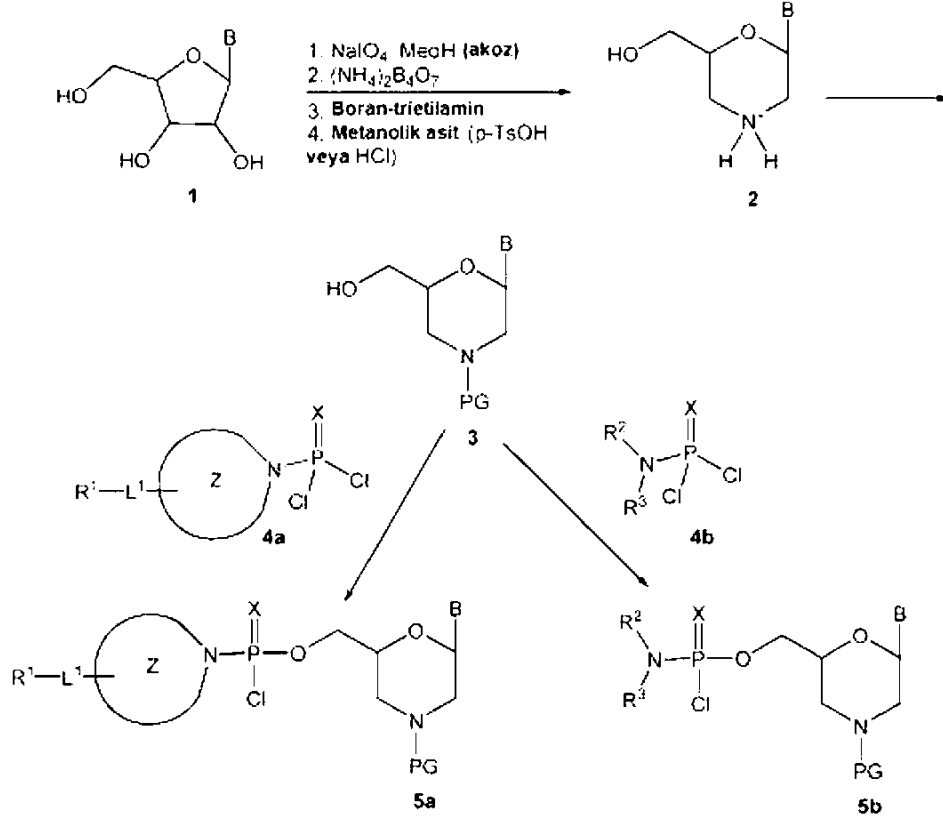
25 **RNA Ekstraksiyonu ve PCR Amplifikasyonu**

RNA, GE Healthcare'den elde edilen RNeasy 96 gözlü RNA izolasyon kiti kullanılarak PMO ile muamele edilmiş hücrelerden (RD hücreleri veya primer insan miyoblastları) ekstrakte edilmiştir ve standart teknikler ve aşağıdaki primer çiftleri kullanılarak yuvalanmış RT-PCR işlemine tabi tutulmuştur. Dış primerler: ileri 5'-CTTGGACAGAACTTACCGACTGG-3' (SEQ ID NO: 22), geri 5'-GTTTCTTCAAAGCAGCCTCTCG -3'(SEQ ID NO: 23); iç primerler: ileri 5'-GCAGGATTTGGAACAGAGGCG-3'(SEQ ID NO: 25), geri 5'-CATCTACATTTGTCTGCCACTGG-3'(SEQ ID NO: 25). Ekson atlaması, jel elektroforezi ile veya Caliper LabChip biyoanaliz cihazı kullanılarak ölçülmüştür ve

ekson atlama %'si (yani, tam uzunluktaki PCR ürününe göre eksonu atlanmış ürünün bant şiddeti), **ŞEKİLLER 3-5**'te gösterilen şekilde grafiklenmiştir.

Morfolino Alt Birimleri, PMO ve Modifiye Alt Birimler Arası Bağları olan PMO

5 Hazırlanışı



Şema 1: PMO ve modifiye PMO Alt Birimlerine yönelik genel sentetik yol

- B'nin, baz eşleşme bölümünü temsil ettiği ve PG'nin koruma grubunu temsil ettiği
- 10 Reaksiyon Şeması 1'e referans olarak morfolino alt birimleri, gösterilen şekilde ilgili ribonükleozidden (1) hazırlanabilir. Morfolino alt birimi (2) isteğe bağlı olarak, uygun bir koruma grubu prekürsörü örneğin tritil klorid ile reaksiyon yoluyla korunabilir. 3' koruma grubu genellikle, aşağıda daha detaylı olarak açıklandığı üzere katı hal oligomer sentezi esnasında uzaklaştırılır. Baz eşleşme bölümü, katı faz oligomer sentezi için
- 15 uygun şekilde korunabilir. Uygun koruma grupları, adenin ve sitozin için benzoil, guanin için fenilasetil ve hipoksantin (I) için pivaloiloksimetili içerir. Pivaloiloksimetil grubu, hipoksantin heterosiklik bazının N1 pozisyonu üzerine eklenebilir. Korunmamış bir hipoksantin alt biriminin kullanılabilmesine rağmen aktivasyon reaksiyonlarındaki

verimler, bazı korunması durumunda çok daha üstündür. Diğer uygun koruma grupları, buraya tamamıyla referans olarak eklenen U.S. Patent No. 8,076,476'da açıklananları içerir.

- 5 **3'**ün aktive fosfor bileşiği (**4a** veya **4b**) ile reaksiyonu, istenen bağ bölümüne (**5a** veya **5b**) sahip morfolino alt birimleri ile sonuçlanır. R^1 ve/veya L^1 bölümlerinin de, P-O bağı oluşumu sonrasında veya alt birimin oligomere eklenmesinden sonra heterosiklik halkaya Z yerleştirilebileceği bilinmelidir.
- 10 Yapının (**4a** veya **4b**) bileşikleri, örneklerde açıklananlar da dahil teknikte uzman kişilerce bilinen birkaç yöntem kullanılarak hazırlanabilir. Morfolino bölümü ile birleşme, yukarıda açıklanan şekilde ilerler.

- Yapının (**5a** veya **5b**) bileşikleri, alt birimler arası bağları içeren oligomerlerin hazırlanışına yönelik katı faz oligomer sentezinde kullanılabilir. bu tür yöntemler teknikte iyi bilinir. Kısaca, yapının (**5a** veya **5b**) bir bileşiği, 5' uçta katı desteğe yönelik bir bağlayıcı içerecek şekilde modifiye edilebilir. Desteklendiğinde **5a** veya **5b**'nin koruma grubu (örneğin 3'-uçta tritil) uzaklaştırılır ve serbest amin, yapının (**5**) (veya analogunun) ikinci bileşiğinin aktive fosfor bölümü ile reakte edilir. Bu dizi, istenen
- 15 uzunluktaki oligo elde edilene kadar tekrarlanır. terminal 3' uçtaki koruma grubu uzaklaştırılabilir veya 3' modifikasyonunun istenmesi halinde burada bırakılabilir. Oligo, birkaç yöntem veya katı desteğe yönelik bağı klevaj etmek üzere bir baz ile örnek muamele kullanılarak katı destekten uzaklaştırılır.

- 25 Buluşun genel ve spesifik morfolino oligomerlerindeki morfolino oligomerlerinin hazırlanışı Örneklerde daha detaylı olarak açıklanır.

Örnek 1

30 **Morfolino Oligomerlerinin Hazırlanışı**

Buluş bileşiklerini hazırlama işlemi, aşağıdaki protokol kullanılarak gerçekleştirilir:

- 35 Tritil piperazin fenil karbamat (35) hazırlanışı (**Şekil 2**): Diklorometan (6 mL/g 11) içindeki soğutulmuş bileşik (11) süspansiyonuna, su (4 mL/g potasyum

- karbonat) içindeki potasyum karbonat (3.2 eşdeğer) solüsyonu eklenmiştir. Bu iki fazlı karışıma diklorometan (2 g/g fenil kloroformat) içindeki fenil kloroformat (1.03 eşdeğer) solüsyonu yavaşça eklenmiştir. Reaksiyon karışımı 20°C'ye ilitilmiştir. Reaksiyonun tamamlanması üzerine (1-2 saat) katmanlar ayrılmıştır.
- 5 Organik katman su ile yıkanmıştır ve anhidroz potasyum karbonat üzerinde kurutulmuştur. Ürün (35), asetonitrilden kristalizasyon ile izole edilmiştir.
- Karbamat alkol (36) hazırlanışı: Sodyum hidrit (1.2 eşdeğer), 1-metil-2-pirolidinon (32 mL/g sodyum hidrit) içinde süspanse edilmiştir. Bu süspansiyona trietilen glikol (10.0 eşdeğer) ve bileşik (35) (1.0 eşdeğer) eklenmiştir. Ortaya
- 10 çıkan sulu karışım 90°C'ye ısıtılmıştır. Reaksiyonun tamamlanması üzerine (1-2 saat) karışım 20°C'ye soğutulmuştur. Bu karışıma %30 diklorometan/metil tert-bütül eter (v:v) ve su eklenmiştir. Ürün içeren organik katman, sırasıyla aköz NaOH, aköz süksinik asit ve doymuş aköz sodyum klorid ile yıkanmıştır. Ürün (36), diklorometan/metil tert-bütül eter/heptandan kristalizasyon ile izole
- 15 edilmiştir.
- Tail asidinin (37) hazırlanışı: Tetrahidrofuran (7 mL/g 36) içindeki bileşik (36) solüsyonuna süksinik anhidriti (2.0 eşdeğer) ve DMAP (0.5 eşdeğer) eklenmiştir. Karışım 50°C'ye ısıtılmıştır. Reaksiyonun tamamlanması üzerine (5 saat) karışım 20°C'ye soğutulmuştur ve aköz NaHCO₃ ile pH 8.5'e
- 20 ayarlanmıştır. Metil tert-bütül eter eklenmiştir ve ürün, aköz katmana ekstrakte edilmiştir. Diklorometan eklenmiştir ve karışım aköz sitrik asit ile pH 3'e ayarlanmıştır. Ürün içeren organik katman, pH=3 sitrat tamponu ve doymuş aköz sodyum klorid karışımı ile yıkanmıştır. 37'nin bu diklorometan solüsyonu, bileşik (38) hazırlanışında izolasyon yapılmadan kullanılmıştır.
- 25 38 Hazırlanışı: Bileşik (37) solüsyonuna N-hidroksi-5-norbornen-2,3-dikarboksilik asit imid (HONB) (1.02 eşdeğer), 4-dimetilaminopiridin (DMAP) (0.34 eşdeğer) ve akabinde 1-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorid (EDC) (1.1 eşdeğer) eklenmiştir. Karışım 55°C'ye ısıtılmıştır. Reaksiyonun tamamlanması üzerine (4-5 saat) karışım 20°C'ye soğutulmuştur ve sırasıyla 1:1 0.2 M sitrik asit/tuzlu su ve tuzlu su ile yıkanmıştır. Diklorometan solüsyonu, aseton ve akabinde N,N-dimetilformamid olarak solvent değişimine uğramıştır ve ürün, doymuş aköz sodyum kloride aseton/N,N-
- 30 dimetilformamiddan çöktürme yoluyla izole edilmiştir. Ham ürün, geri kalan N,N-dimetilformamid ve tuzları uzaklaştırmak üzere su içinde birkaç kez yeniden sulu karışım haline getirilmiştir.
- 35

Aktive edilmiş "Tail" kısmının bağlayıcı yüklü reçine üzerine eklenmesi, katı faz sentezi esnasında alt birimlerin eklenmesi amacıyla kullanılan prosedür ile dimetil imidazolidinon (DMI) içinde gerçekleştirilmiştir.

- 5 Morfolino Oligomerlerinin Sentezine yönelik Katı Desteğin Hazırlanışı: Bu prosedür, iri gözenekli (40-60 μm) cam firit, yukarıdan asılı karıştırıcı ve N_2 'nin firitten püskürtülmesine veya vakumlu ekstraksiyona izin veren 3 yönlü Teflon musluğu olan silanlanmış, ceketli bir peptit kabında (ChemGlass, NJ, USA) gerçekleştirilmiştir.
- 10 Aşağıdaki prosedürdeki reçine muamelesi/yıkama adımları, iki temel işlemden oluşur: reçine sıvılaştırma veya karıştırıcı yataklı reaktör ve solvent/solüsyon ekstraksiyonu. Reçine sıvılaştırma için üç yönlü musluk, N_2 'nin firitten akmasına olanak sağlayacak şekilde konumlandırılmıştır ve belirlenen reçine muamele/yıkama maddesi reaktöre eklenmiştir ve nüfuz etmesi ve reçineyi tamamen ıslatması sağlanmıştır. Akabinde
- 15 karıştırma işlemi başlatılmıştır ve reçine sulu karışımı belirlenen süre boyunca karıştırılmıştır. Solvent/solüsyon ekstraksiyonu için karıştırma ve N_2 akışı durdurulmuştur ve vakumlu pompa başlatılmıştır ve akabinde üç yönlü musluk, reçine muamele/yıkama maddesinin atık olarak boşaltılmasına izin verecek şekilde konumlandırılmıştır. Tüm reçine muamele/yıkama hacimleri, aksi belirtilmedikçe 15
- 20 mL/g'dir.

- Silanlanmış, ceketli bir peptit kabı içindeki aminometilpolistiren reçinesine (100-200 göz boyutu; nitrojen süstitüsyonuna bağlı olarak ~ 1.0 mmol/g yük; 75 g, 1 eşdeğer, Polymer Labs, UK, part #1464-X799), 1-metil-2-pirolidinon (NMP; 20 mL/g reçine)
- 25 eklenmiştir ve reçinenin, 1-2 saat karıştırılarak şişmesine olanak sağlanmıştır. Şişirme solventinin boşaltılmasından sonra reçine diklorometan (2 x 1-2 dakika), %25 izopropanol/diklorometan (2 x 3-4 dakika) içindeki %5 diizopropiletilamin ve diklorometan (2 x 1-2 dakika) ile yıkanmıştır. Nihai yıkamanın boşaltılmasından sonra reçine, 1-metil-2-pirolidinon (0.17 M; 15 mL/g reçine, -2.5 eşdeğer) içindeki disülfid
 - 30 bağlayıcı (34) solüsyonu ile muamele edilmiştir ve reçine/reaktif karışımı 45°C 'de 60 saat ısıtılmıştır. Reaksiyonun tamamlanması üzerine ısıtma işlemi durdurulmuştur ve bağlayıcı solüsyonu boşaltılmıştır ve reçine, 1-metil-2-pirolidinon (4 x 3-4 dakika) ve diklorometan (6 x 1-2 dakika) ile yıkanmıştır. Reçine, diklorometan içindeki %10 (v/v) dietil dikarbonat solüsyonu ile muamele edilmiştir (16 mL/g; 2 x 5-6 dakika) ve
 - 35 akabinde diklorometan (6 x 1-2 dakika) ile yıkanmıştır. Reçine (39) (bakınız Şekil 4), 1-

3 saat boyunca N₂ akışı altında ve akabinde vakum altında sabit ağırlığa ($\pm$ %2) kurutulmuştur. Verim: orijinal reçine ağırlığının %110-150'si.

5 Aminometilpolistiren-disülfid reçine Yükleme Belirlenmesi: Reçine yükleme (potansiyel olarak mevcut olan reaktif bölgelerin sayısı), reçine gramı başına düşen trifenilmetil (tritol) gruplarının sayısına yönelik spektrometrik bir analiz ile belirlenir.

10 Bilinen ağırlıktaki kurutulmuş reçine (25 ± 3 mg), silanlanmış 25 ml'lik volumetrik bir balona transfer edilir ve diklorometan içindeki ~ 5 mL %2 (v/v) trifloroasetik asit eklenir. İçerikler, hafifçe döndürülerek karıştırılır ve akabinde 30 dakika bekletilir. Hacim, diklorometan içindeki ek %2 (v/v) trifloroasetik asit ile 25 mL'ye getirilir ve içerikler iyice karıştırılır. Pozitif deplasmanlı bir pipet kullanılarak tritol içeren solüsyondan bir alikot (500 μ L), 10 mL'lik volumetrik balona transfer edilir ve hacim, metansülfonik asit ile 10 mL'ye getirilir.

15 Nihai solüsyondaki tritol katyon içeriği, 431.7 nm'de UV absorbanı ile ölçülür ve reçine yükleme, uygun hacimler, dilüzyonlar, sönmeme katsayısı (ϵ : 41 μ mol⁻¹cm⁻¹) ve reçine ağırlığı kullanılarak reçine gramı başına düşen (μ mol/g) tritol gruplarında hesaplanır. Analiz, üç kopya halinde gerçekleştirilir ve ortalama yükleme hesaplanır.

20 Bu örnekteki reçine yükleme prosedürü, yaklaşık 500 μ mol/g'lik bir yükleme olan reçineyi sağlayacaktır. μ mol/g olarak 300-400 olan bir yükleme, disülfid bağlayıcı ekleme adımının oda sıcaklığında 24 saatte gerçekleştirilmesi halinde elde edilmiştir.

25 Tail yükleme: Aminometilpolistiren-disülfid reçinesinin hazırlanışı ile aynı düzenek ve hacimler kullanılarak Tail katı desteğe eklenebilir. Bağlayıcı yüklü reçine ilk olarak asidik koşul altında korumasız bırakılır ve elde edilen materyal bağlama öncesinde nötrale edilir. Bağlama adımı için 4-etilmorfolin (NEM, 0.4 M) içeren DMI içindeki 38 (0.2 M) solüsyonu, disülfid bağlayıcı solüsyonu yerine kullanılmıştır. 45°C'de 2 saat bekletildikten sonra reçine (39), %25 izopropanol/diklorometan içindeki %5 diizopropiletilamin ile iki kez ve DCM ile bir kez yıkanmıştır. Bu reçineye benzoik anhidrit (0.4 M) ve NEM (0.4 M) solüsyonu eklenmiştir. 25 dakika sonra reaktör ceketini oda sıcaklığına soğutulmuştur ve reçine %25 izopropanol/diklorometan içindeki %5 diizopropiletilamin ile iki kez ve DCM ile sekiz kez yıkanmıştır. Reçine (40) filtrelenmiştir ve yüksek vakum altında kurutulmuştur. Reçineye (40) yönelik yüklemenin, Tail

35

yüklemesinde kullanılan orijinal aminometilpolistiren-disülfid reçinesinin yüklemesi olduğu tanımlanır.

Katı Faz Sentezi: Morfolino Oligomerleri, 2 mL Gilson polipropilen reaksiyon kolonlarında (Part # 3980270) Gilson AMS-422 Otomatik Peptid Sentezleme Cihazında hazırlanmıştır. Su akışına yönelik kanalları olan bir alüminyum blok, sentezleme cihazına yerleştirilmeleri nedeniyle kolonlar etrafına yerleştirilmiştir. AMS-422 dönüşümlü olarak reaktif/yıkama solüsyonlarını ekleyecektir, belirlenen bir süre boyunca bekleyecektir ve vakum kullanarak kolonları boşaltacaktır.

10

Uzunluk olarak yaklaşık 25 alt birime kadar çıkabilen aralıkta olan oligomerler için yaklaşık 500 µmol/g reçine yüklemesi olan aminometilpolistiren-disülfid reçine tercih edilir. Daha büyük oligomerler için 300-400 µmol/g reçine yüklemesi olan aminometilpolistiren-disülfid reçine tercih edilir. 5'-Tail içeren bir molekülün istenmesi halinde aynı yükleme kılavuzları ile Tail yüklenmiş olan reçine seçilir.

15

Aşağıdaki reaktif solüsyonları hazırlanmıştır:

Detritilasyon Solüsyonu: 4:1 diklorometan/asetonitril içinde %10 Siyanoasetik Asit (w/v); Netralizasyon Solüsyonu: 3:1 diklorometan/izopropanol içinde 55 Diizopropiletilamin; Bağlama Solüsyonu: istenen baz ve bağ türüne sahip 0.18 M (veya 20 alt birimden daha uzun olan oligomerler için 0.24 M) aktive Morfolino Alt Birimi ve 1,3-dimetilimidazolidinon içindeki 0.4 M N etilmorfolin. Diklorometan (DCM), farklı reaktif solüsyonu yıkamalarını ayıran geleneksel yıkama maddesi olarak kullanılmıştır.

20

Sentezleme cihazında 42°C'ye ayarlanan blok ile 30 mg aminometilpolistiren-disülfid reçinesi (veya Tail reçinesi) içeren her kolona 2 mL 1-metil-2-pirolidinon eklenmiştir ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. 2 mL diklorometan ile 2 kez yıkandıktan sonra aşağıdaki sentez döngüsü kullanılmıştır:

25

Adım	Hacim	Uygulama	Bekleme süresi
Detritilasyon	1.5 mL	Manifold	15 saniye
Detritilasyon	1.5 mL	Manifold	15 saniye
Detritilasyon	1.5 mL	Manifold	15 saniye

Adım	Hacim	Uygulama	Bekleme süresi
Detritilasyon	1.5 mL	Manifold	15 saniye
Detritilasyon	1.5 mL	Manifold	15 saniye
Detritilasyon	1.5 mL	Manifold	15 saniye
Detritilasyon	1.5 mL	Manifold	15 saniye
DCM	1.5 mL	Manifold	30 saniye
Nötralizasyon	1.5 mL	Manifold	30 saniye
Nötralizasyon	1.5 mL	Manifold	30 saniye
Nötralizasyon	1.5 mL	Manifold	30 saniye
Nötralizasyon	1.5 mL	Manifold	30 saniye
Nötralizasyon	1.5 mL	Manifold	30 saniye
Nötralizasyon	1.5 mL	Manifold	30 saniye
DCM	1.5 mL	Manifold	30 saniye
Bağlama	350-500µL	Şırınga	40 dakika
DCM	1.5 mL	Manifold	30 saniye
Nötralizasyon	1.5 mL	Manifold	30 saniye
Nötralizasyon	1.5 mL	Manifold	30 saniye
DCM	1.5 mL	Manifold	30 saniye
DCM	1.5 mL	Manifold	30 saniye
DCM	1.5 mL	Manifold	30 saniye

Tekli oligomerlerin sıralar, her kolon uygun bağlama solüsyonunu (A,C,G,T,I) uygun sırada alacak şekilde sentezleme cihazına programlanmıştır. Bir kolondaki oligomer nihai alt biriminin eklenmesini tamamladığında kolon bloktan çıkarılmıştır ve nihai 5 döngü, 0.89 M 4-etilmorfolin içeren 4-metoksitriphenilmetil klorid (DMI içinde 0.32 M) içeren bağlama solüsyonu ile manüel olarak gerçekleştirilmiştir.

Reçineden klevaj ve bazların ve omurga koruma gruplarının uzaklaştırılması: Metoksitritilasyon sonrasında reçine 2 mL 1-metil-2-pirolidinon ile 8 kez yıkanmıştır. 1-

- metil-pirolidinon içindeki 0.73 M trietilamin ve 0.1 M 1,4-ditiyotreitöl (DTT) içeren bir mL klevaj solüsyonu eklenmiştir, kolon kapatılmıştır ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonrasında solüsyon, 12 mL'lik Wheaton şişesine boşaltılmıştır. Büyük ölçüde çekmiş olan reçine, 300 µL klevaj solüsyonu ile iki kez yıkanmıştır. Bu
- 5 solüsyona 4.0 mL konsantre aköz amonyak (-20°C'de saklanmıştır) eklenmiştir, şişe sıkıca kapatılmıştır (Teflon kaplı vidalı kapak ile) ve karışım solüsyonu karıştırmak üzere döndürülmüştür. Şişe, baz ve omurga koruma gruplarının klevajını gerçekleştirmek üzere 16-24 saat 45°C'lik etüve yerleştirilmiştir.
- 10 Ham ürün saflaştırması: Şişelere konulan amonoliz solüsyonu etüvden çıkarılmıştır ve oda sıcaklığına soğutulmuştur. Solüsyon, 20 mL %0.28 aköz amonyak ile seyreltilmiştir ve Macroprep HQ reçine (BioRad) içeren 2.5x10 cm kolondan geçirilmiştir. Tuz gradyanı (A: %0.28 amonyak ile B: %0.28 amonyak içindeki 1 M sodyum klorid; 60 dakikada %0-100 B), metoksitritil içeren piki ayırştırmak amacıyla kullanılmıştır.
- 15 Kombine fraksiyonlar toplanmıştır ve istenen ürüne bağlı olarak ileri işleme tabi tutulmuştur.
- Morfolino Oligomerlerinin Demetoksitritilasyonu: Macroprep saflaştırmasından toplanan fraksiyonlar, pH değerini 2.5'e düşürmek amacıyla 1 M H₃PO₄ ile muamele edilmiştir.
- 20 İlk karıştırma sonrasında numuneler oda sıcaklığında 4 dakika bekletilmiştir, bu sürede %2.8 amonyak/su ile pH 10-11'e nötralize edilir. Ürünler, katı faz ekstraksiyonu (SPE) ile saflaştırılmıştır.
- SPE kolon paketlemesi ve koşullandırması: Amberchrome CG-300M (Rohm and Haas; Philadelphia, PA) (3 mL), 20 mL firitli kolonlara (BioRad Econo-Pac Kromatografi Kolonları (732-1011)) paketlenmiştir ve reçine, 3 mL miktarında aşağıdaki maddeler ile durulanmıştır: %0.28 NH₄OH/%80 asetronitril; 0.5M NaOH/%20etanol; su; 50 mM H₃PO₄/%80 asetronitril; su; 0.5 NaOH/%20 etanol; su; %0.28 NH₄OH.
- 25 SPE saflaştırması: Demetoksitritilasyondan elde edilen solüsyon, kolona yüklenmiştir ve reçine, 3-6 mL %0.28 aköz amonyak ile üç kez durulanmıştır. Bir Wheaton şişesi (12 mL), kolon altına yerleştirilmiştir ve ürün, %0.28 aköz amonyak içindeki 2 mL %45 asetronitril ile iki kez yıkanarak ayırştırılmıştır.
- 30

Ürün izolasyonu: Solüsyonlar kuru buzda dondurulmuştur ve şişeler, yumuşak, beyaz bir toz oluşturmak üzere dondurarak kurutma cihazına yerleştirilmiştir. Numuneler su içinde çözülmüştür, şırınga kullanılarak 0.22 mikronluk filtreden (Pall Life Sciences, Acrodisc 25 mm şırınga filtresi, 0.2 mikron HT Tuffryn membran ile) filtrelenmiştir ve

5 Optik Yoğunluk (OD), analize yönelik dağıtım numunesinin yanı sıra mevcut oligomerin OD birimlerini belirlemek üzere UV spektrofotometresinde ölçülmüştür. Solüsyonlar akabinde liyofilizasyon için tekrar Wheaton şişelerine yerleştirilmiştir.

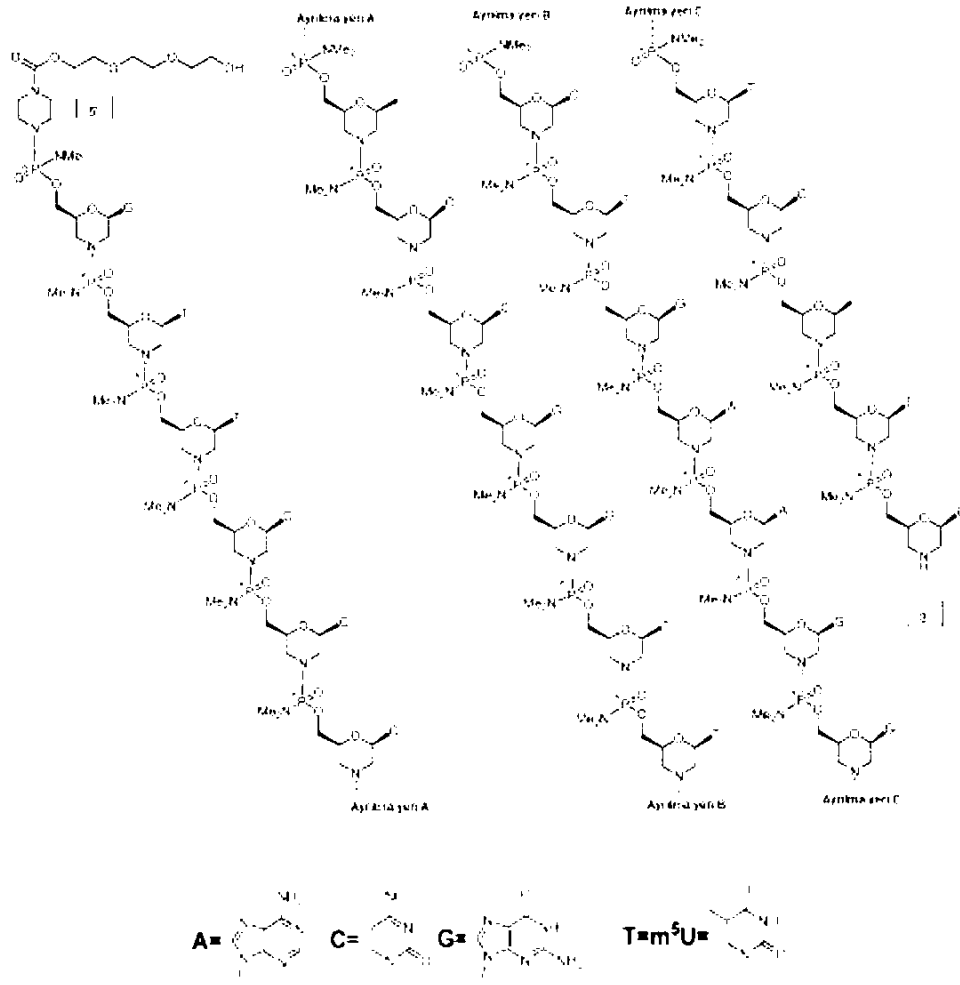
MALDI ile Morfolino Oligomerlerinin Analizi: MALDI-TOF kütle spektrometrisi, saflaştırmalardaki fraksiyonların bileşimini belirlemek ve oligomerlerin kimliğine (molekül ağırlığı) yönelik kanıt sağlamak amacıyla kullanılmıştır. Numuneler, matriksler olarak 3,5-dimetoksi-4-hidroksisinnamik asit (sinapinik asit), 3,4,5-trihidoksiasetofenon (THAP) veya alfa-siyano-4-hidroksisinnamik asit (HCCA) solüsyonu ile dilüzyon sonrasında işleme tabi tutulmuştur.

15

Örnek 2

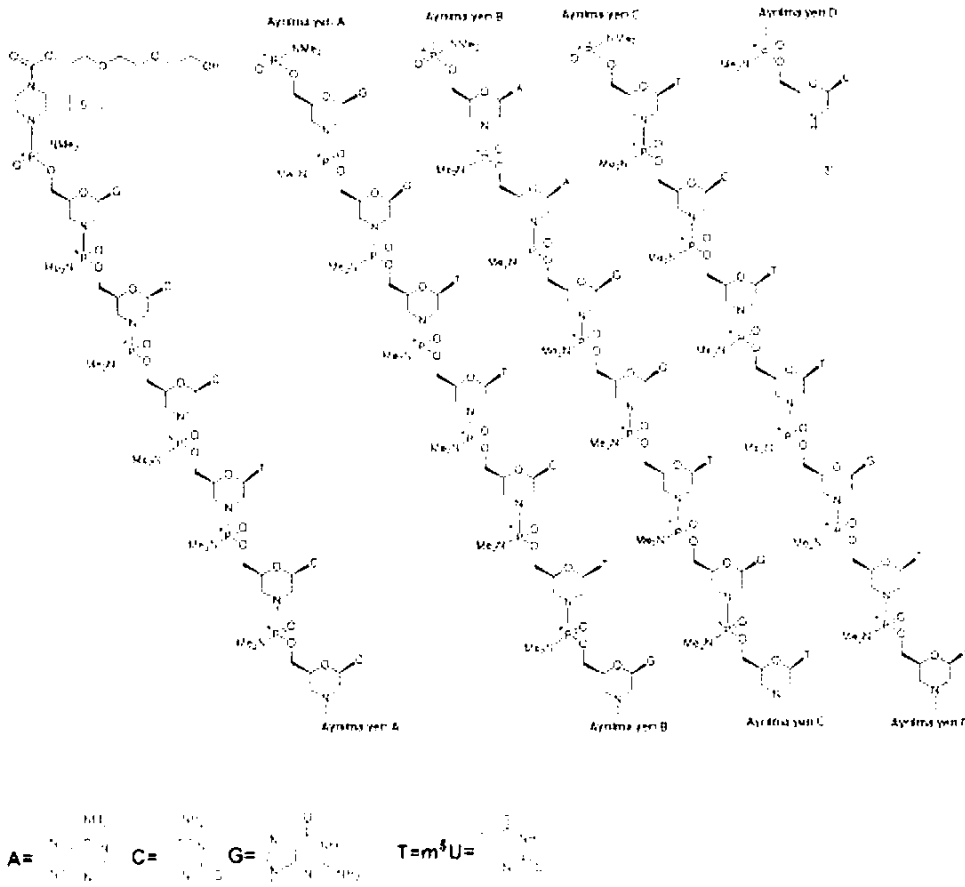
Örnek 1'de açıklanan protokol kullanılarak aşağıdaki PMO sentezlenmiştir, H53A(+36+60), SEQ ID NO: 1 (5'- GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC -3') ve

20 Örneklerde kullanılmıştır.



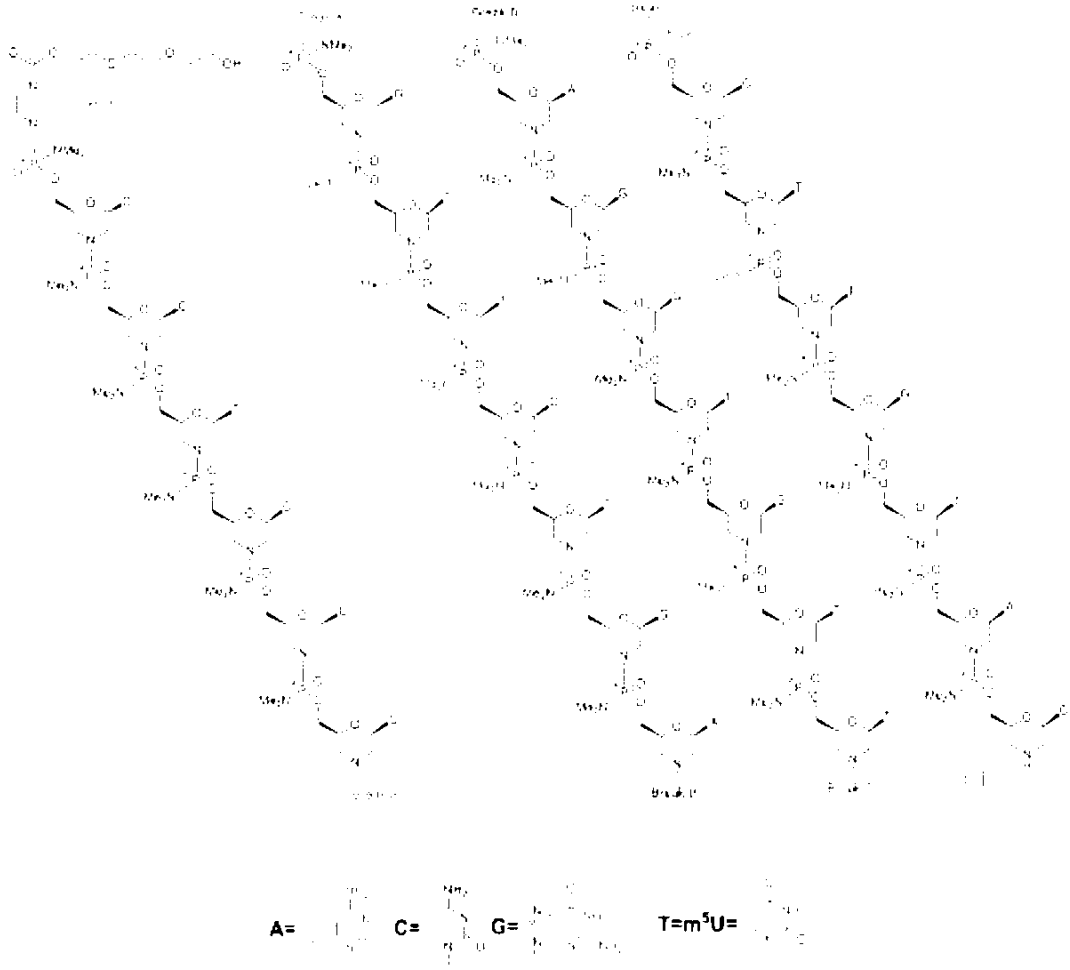
5 Referans Örnek 3

Örnek 1'de açıklanan protokol kullanılarak aşağıdaki PMO sentezlenmiştir H53A(+30+57), SEQ ID NO: 2 (5'- GCC TCC GGT TCT GAA GGT GTT CTT GTA C-3') ve Örneklerde kullanılmıştır.



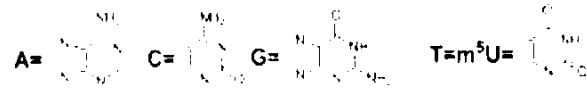
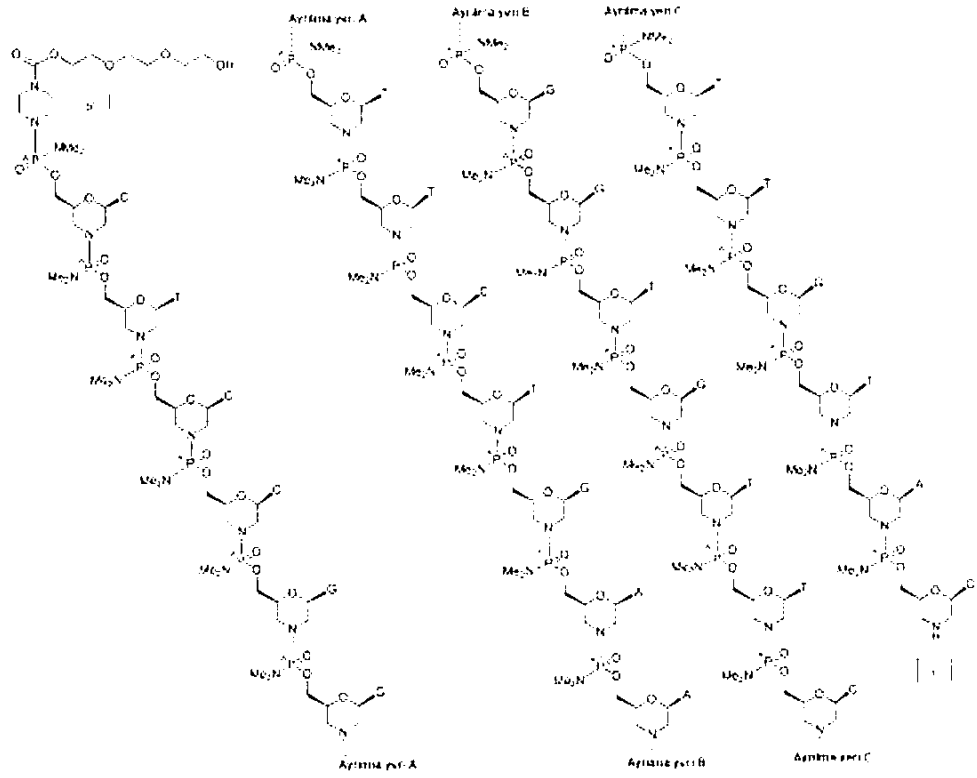
5 Referans Örnek 4

Örnek 1'de açıklanan protokol kullanılarak aşağıdaki PMO sentezlenmiştir H53A(+30+56), SEQ ID NO: 3 (5'- CCT CCG GTT CTG AAG GTG TTC TTG TAC-3') ve Örneklerde kullanılmıştır.



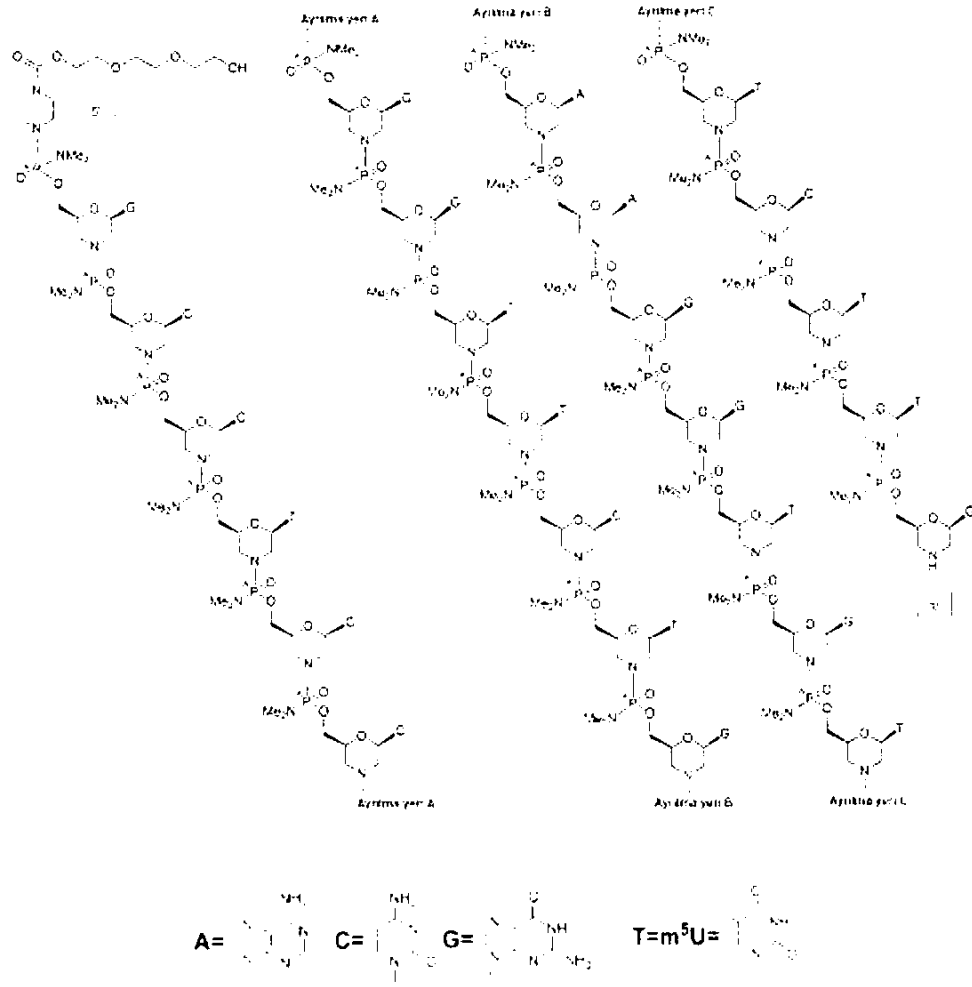
5 Referans Örnek 5

Örnek 1'de açıklanan protokol kullanılarak aşağıdaki PMO sentezlenmiştir H53A(+30+55), SEQ ID NO: 4 (5'- CTC CGG TTC TGA AGG TGT TCT TGT AC-3') ve Örneklerde kullanılmıştır.



5 Referans Örnek 6

Örnek 1'de açıklanan protokol kullanılarak aşağıdaki PMO sentezlenmiştir H53A(+33+57), SEQ ID NO: 5 (5'- GCC TCC GGT TCT GAA GGT GTT CTT G-3') ve Örneklerde kullanılmıştır.



5 Örnek 7

Ekson 53 atlaması

İnsan distrofin ekson 53'ü hedefleyen bir dizi antisens oligomeri aşağıdaki şekilde tasarlanmıştır ve sentezlenmiştir:

10

Açıklama	Dizi	SEQ ID NO
H53A(+36+60)	GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC	1
H53A(+30+57)	GCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTAC	2
H53A(+30+56)	CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTAC	3
H53A(+30+55)	CTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTAC	4

<u>Açıklama</u>	<u>Dizi</u>	<u>SEQ ID NO</u>
H53A(+33+57)	GCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTG	5
H53A(+33+60)	GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTG	6
H53A(+31+55)	CTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTA	7
H53A(+22+46)	TGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCCC	8
H53A(+23+47)	CTGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCC	9

(SEQ ID NO: 2 ila 9 buluşa göre değildir)

Yukarıdaki antisens oligomerleri, belirlenen çeşitli konsantrasyonlarda primer insan miyoblastlarının işlenmesi yoluyla ekson atlama etkinliği yönünden değerlendirilmiştir.

- 5 Bu deneylerde H53A(+33+60) ve H53A(+31+55)'e karşılık gelen antisens oligomerleri karşılaştırma oligomerleri olarak kullanılmıştır. **Şekiller 3 ve 4**'te gösterildiği üzere oligomer H53A(+36+60) (SEQ ID NO: 1), primer insan miyoblast hücrelerinde ekson 53 atlamasının indüklenmesinde oldukça etkili olmuştur. H53A(+31+55) (SEQ ID NO: 7) ve H53A(+22+46) (SEQ ID NO: 8) de ekson atlamasını H53A(+33+60) (SEQ ID NO: 6) ve H53A(+36+60) (SEQ ID NO: 1)'den daha az derecede indüklemiştir. **Şekil 3**'te gösterildiği üzere H53A(+33+60) ve H53A(+36+60) (sırasıyla SEQ ID NO: 6 ve SEQ ID NO: 1), kültürlenmiş miyoblastlarda ekson 53 atlamasının indüklenmesinde yüksek oranda aktif diğer antisens oligonükleotidlerine göre oldukça etkili olmuştur.

- 15 Yukarıdaki ek antisens oligomerleri, belirlenen çeşitli konsantrasyonlarda RD hücrelerinin işlenmesi yoluyla ekson atlaması etkinliği yönünden değerlendirilmiştir. Bu deneylerde H53A(+33+60) (SEQ ID NO: 6)'ya karşılık gelen antisens oligomeri, karşılaştırma oligomeri olarak kullanılmıştır. **Şekil 4**'te gösterildiği üzere oligomerler H53A(+30+57), H53A(+30+56), H53A(+30+55) ve H53A(+33+57) (sırasıyla SEQ ID NO: 2-5), aktivite bakımından H53A(+33+60) (SEQ ID NO: 6) oligomeri ile karşılaştırılabilir olmuştur.

- 25 Bir başka deneyde buluşun antisens oligomeri, yayınlanmış antisens oligonükleotidlerine göre primer insan miyoblastlarında ekson 53 atlaması yönünden test edilmiştir. Yukarıda açıklanan H53A(+23+47) (SEQ ID NO: 9)'a ek olarak US 8,232,384'ten elde edilen H53A(+39+69), H53A(+39+62) ve H53A(+45+69) (sırasıyla SEQ ID NO: 10, 11 ve 12); WO2004/083446'dan elde edilen h53AON1 (+45+62) (SEQ

ID NO: 13) ve WO2012/029986'dan elde edilen PMO3(+32+56) ve PMO8(+36+56) (sırasıyla SEQ ID NO: 14 ve 15), buluşun örnek niteliğindeki bir oligomeri H53A(+36+60) (SEQ ID NO:1) ile karşılaştırılmıştır. Şekil 5A ve 5B'de gösterildiği üzere en düşük EC50 değeri sergileyen oligomerin H53A(+36+60) SEQ ID NO: 1 olduğu belirlenmiştir. Bu, aşağıdaki tabloda gösterilen EC50 değerlerini oluşturmak üzere sonuçların GraphPad Prism programı içinde üç parametrelili regresyon analizine tabi tutulması yoluyla doğrulanmıştır.

	EC50
SEQIDNO:10 H53A(+39+69)	6.482
SEQIDNO:9 H53A(+23+47)	9.135
SEQIDNO:1 H53A(+36+60)	3.910
SEQIDNO:13 H53A(+45+62)	17.13
SEQIDNO:11 H53A(+39+62)	6.061
SEQIDNO:12 H53A(+45+69)	13.11
SEQIDNO:14 PMO3+32+56	11.80
SEQIDNO:15 PMO8(+36+56)	15.81

10 REFERANSLAR

- 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.
- 15 Cirak, S., V. Arechavala-Gomez, et al. (2011). "Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study." Lancet **378**(9791): 595-605.
- Dunckley, M. G., I. C. Eperon, et al. (1997). "Modulation of splicing in the DMD gene by antisense oligoribonucleotides." Nucleosides & Nucleotides **16**(7-9): 1665-1668.
- 20

- Dunckley, M. G., M. Manoharan, et al. (1998). "Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured Mdx muscle cells by antisense oligoribonucleotides." Hum Mol Genet **7**(7): 1083-90.
- Errington, S. J., C. J. Mann, et al. (2003). "Target selection for antisense oligonucleotide induced exon skipping in the dystrophin gene." J Gene Med **5**(6): 518-27.
- Goemans, N. M., M. Tulinius, et al. (2011). "Systemic Administration of PRO051 in Duchenne's Muscular Dystrophy." N Engl J Med.
- Jearawiriyapaisarn, N., H. M. Moulton, et al. (2008). "Sustained Dystrophin Expression Induced by Peptide-conjugated Morpholino Oligomers in the Muscles of mdx Mice." Mol Ther.
- Kinali, M., V. Arechavala-Gomez, et al. (2009). "Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study." Lancet Neurol **8**(10): 918-28.
- Lu, Q. L., C. J. Mann, et al. (2003). "Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse." Nat Med **9**(8): 1009-14.
- Mann, C. J., K. Honeyman, et al. (2002). "Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy." J Gene Med **4**(6): 644-54.
- Marshall, N. B., S. K. Oda, et al. (2007). "Arginine-rich cell-penetrating peptides facilitate delivery of antisense oligomers into murine leukocytes and alter pre-mRNA splicing." Journal of Immunological Methods **325**(1-2): 114-126.
- Matsuo, M., T. Masumura, et al. (1991). "Exon skipping during splicing of dystrophin mRNA precursor due to an intraexon deletion in the dystrophin gene of Duchenne muscular dystrophy kobe." J Clin Invest **87**(6): 2127-31.
- Monaco, A. P., C. J. Bertelson, et al. (1988). "An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus." Genomics **2**(1): 90-5.
- Pramono, Z. A., Y. Takeshima, et al. (1996). "Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence." Biochem Biophys Res Commun **226**(2): 445-9.

- Sazani, P., R. Kole, et al. (2007). Splice switching oligomers for the TNF superfamily receptors and their use in treatment of disease. PCT WO2007058894, University of North Carolina
- 5 Sierakowska, H., M. J. Sambade, et al. (1996). "Repair of thalassemic human beta-globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(23): 12840-4.
- Summerton, J. and D. Weller (1997). "Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties." Antisense Nucleic Acid Drug Dev **7**(3): 187-95.
- 10 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.
- 15 van Deutekom, J. C., A. A. Janson, et al. (2007). "Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051." N Engl J Med **357**(26): 2677-86.
- Wilton, S. D., A. M. Fall, et al. (2007). "Antisense oligonucleotide-induced exon skipping across the human dystrophin gene transcript." Mol Ther **15**(7): 1288-96.
- 20 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.
- 25 Yin, H., H. M. Moulton, et al. (2008). "Cell-penetrating peptide-conjugated antisense oligonucleotides restore systemic muscle and cardiac dystrophin expression and function." Hum Mol Genet **17**(24): 3909-18.

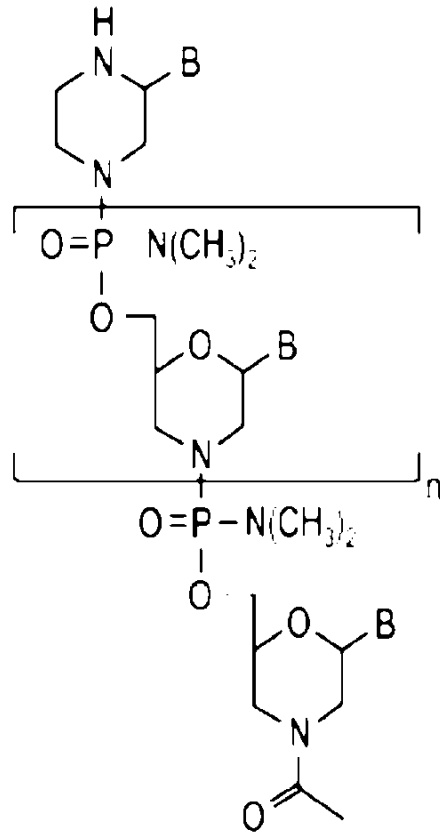
30 DİZİ LİSTESİ

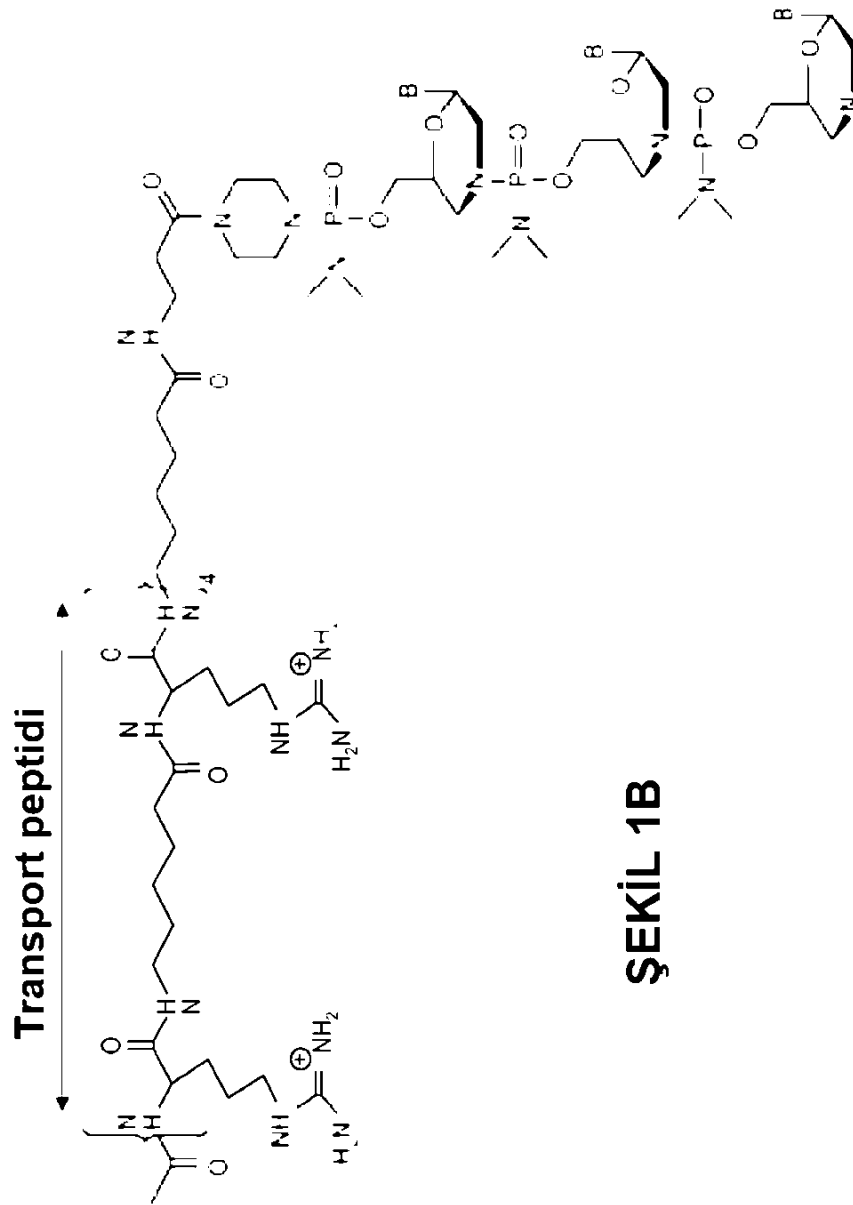
<u>Açıklama</u>	<u>Dizi</u>	<u>SEQ</u>	<u>ID</u>
		<u>NO</u>	
H53A(+36+60)	GTTGCCTCCGTTCTGAAGGTGTTC	1	
H53A(+30+57)	GCCTCCGTTCTGAAGGTGTTCTTGTAC	2	

<u>Açıklama</u>	<u>Dizi</u>	<u>SEQ</u> <u>ID</u> <u>NO</u>
H53A(+30+56)	CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGAC	3
H53A(+30+55)	CTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGAC	4
H53A(+33+57)	GCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTG	5
H53A(+33+60)	GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTG	6
h53A(+31+55)	CTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTA	7
H53A(+22+46)	TGAAGGTGTTCTTGACTTCATCCC	8
H53A(+23+47)	CTGAAGGTGTTCTTGACTTCATCC	9
H53 (+39+69)	CATTCAACTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTG	10
H53(+39+62)	CTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTG	11
H53 (+45+69)	CATTCAACTGTTGCCTCCGGTTCTG	12
H53 (+45+62)	CTGTTGCCTCCGGTTCTG	13
PM03(+32+56)	CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGT	14
PM08(+36+56)	CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC	15
rTAT	RRRQRRKKR	16
Tat	RKKRRQRRR	17
R ₉ F ₂	RRRRRRRRRFF	18
R ₅ F ₂ R ₄	RRRRRFFRRRR	19
R ₄	RRRR	20
R ₅	RRRRR	21
R ₆	RRRRRR	22
R ₇	RRRRRRR	23
R ₈	RRRRRRRR	24
R ₉	RRRRRRRRR	25
(RX) ₈	RXRXRXRXRXRXRXR	26
(RAhxR) _{4i} (P007)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	27

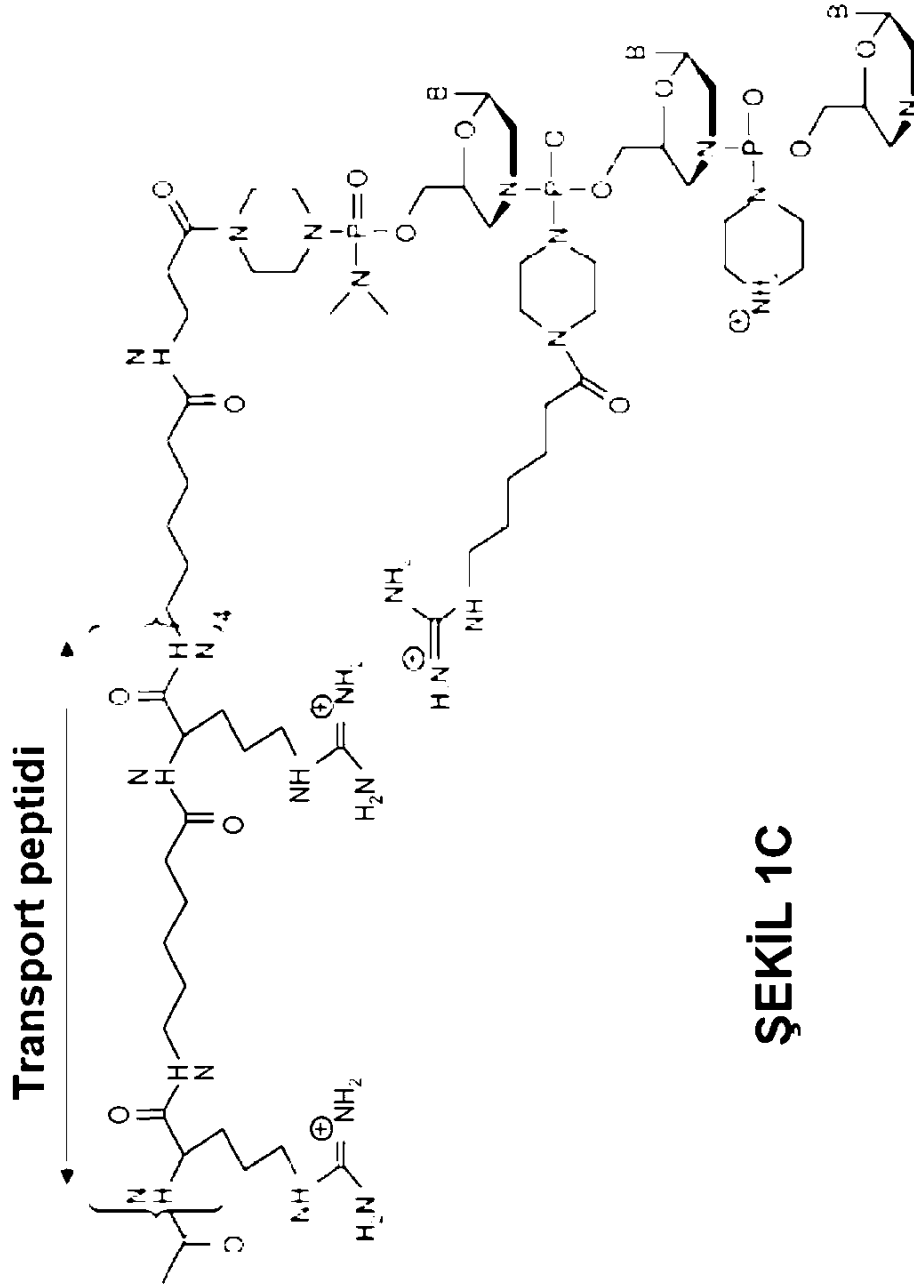
<u>Açıklama</u>	<u>Dizi</u>	<u>SEQ</u>	<u>ID</u>
		<u>NO</u>	
(RAhxR) ₅ ; (CP04057)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	28	
(RAhxRRBR) ₂ ; (CP06062)	RAhxRRBRRAhxRRBR	29	
(RAR) ₄ F ₂	RARRARRARRARFF	30	
(RGR) ₄ F ₂	RGRRGRRGRRGRFF	31	
Primer	CTTGGACAGAACTTACCGACTGG	32	
Primer	GTTTCTTCCAAAGCAGCCTCTCG	33	
Primer	GCAGGATTTGGAACAGAGGCG	34	
Primer	CATCTACATTTGTCTGCCACTGG	35	

ŞEKİL 1A



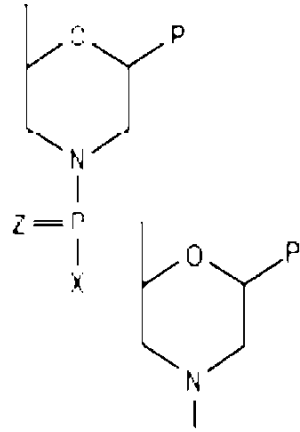


ŞEKİL 1B

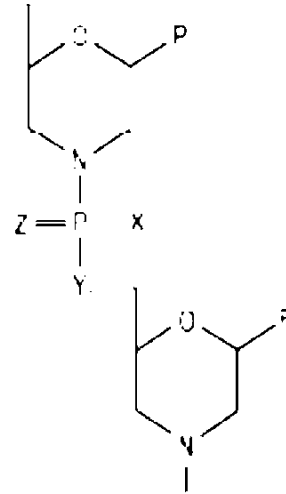


ŞEKİL 1C

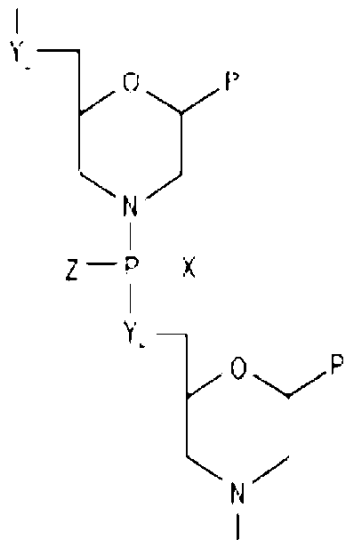
ŞEKİL 1D



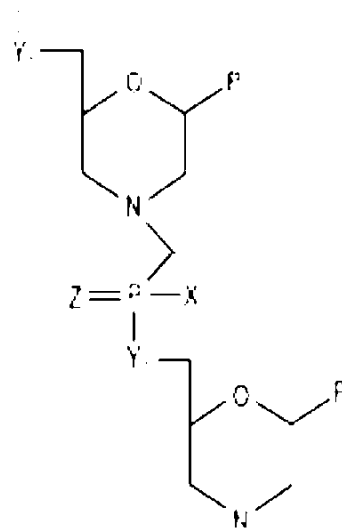
ŞEKİL 1E

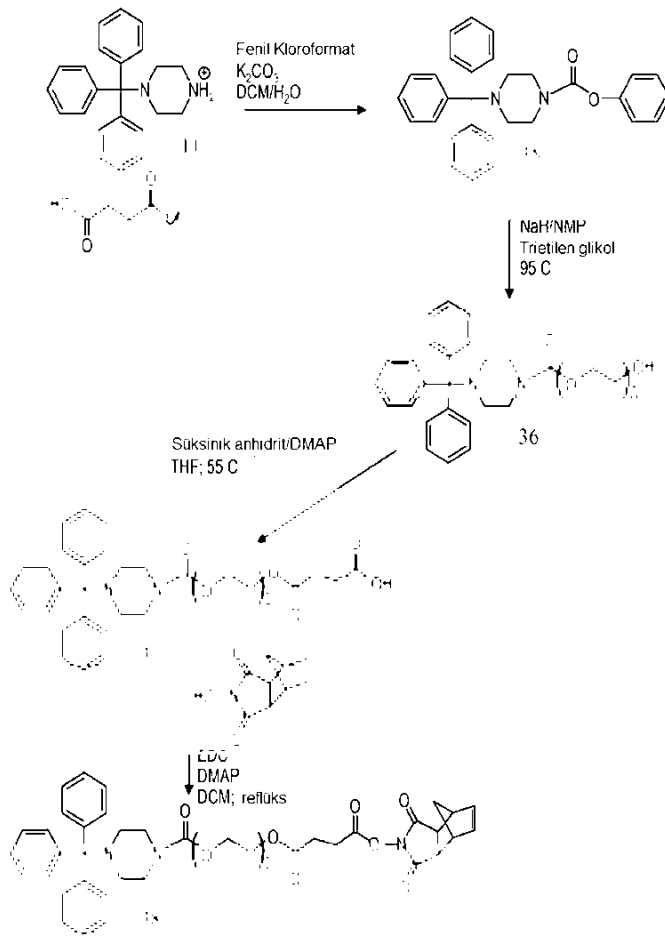


ŞEKİL 1F

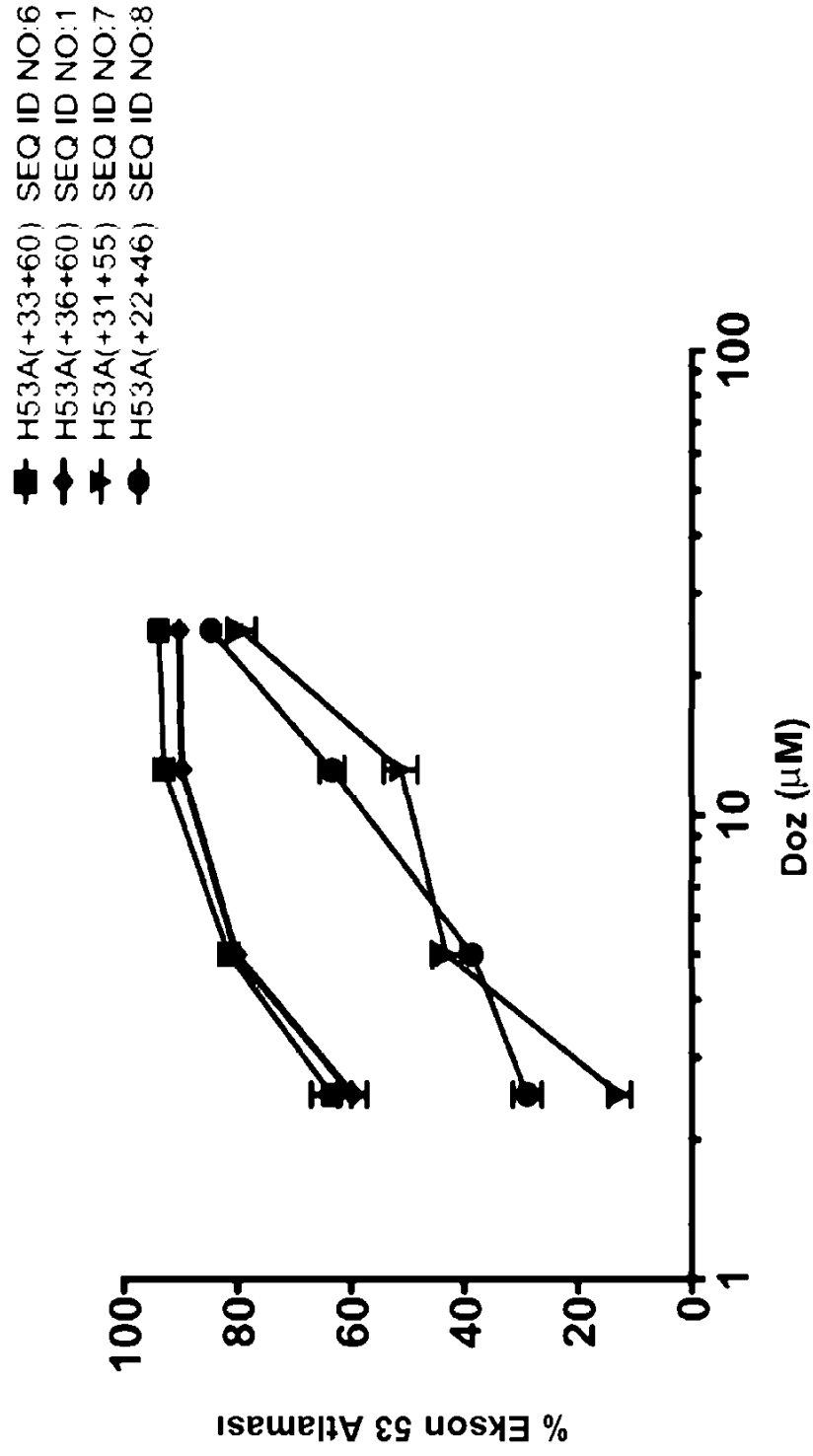


ŞEKİL 1G

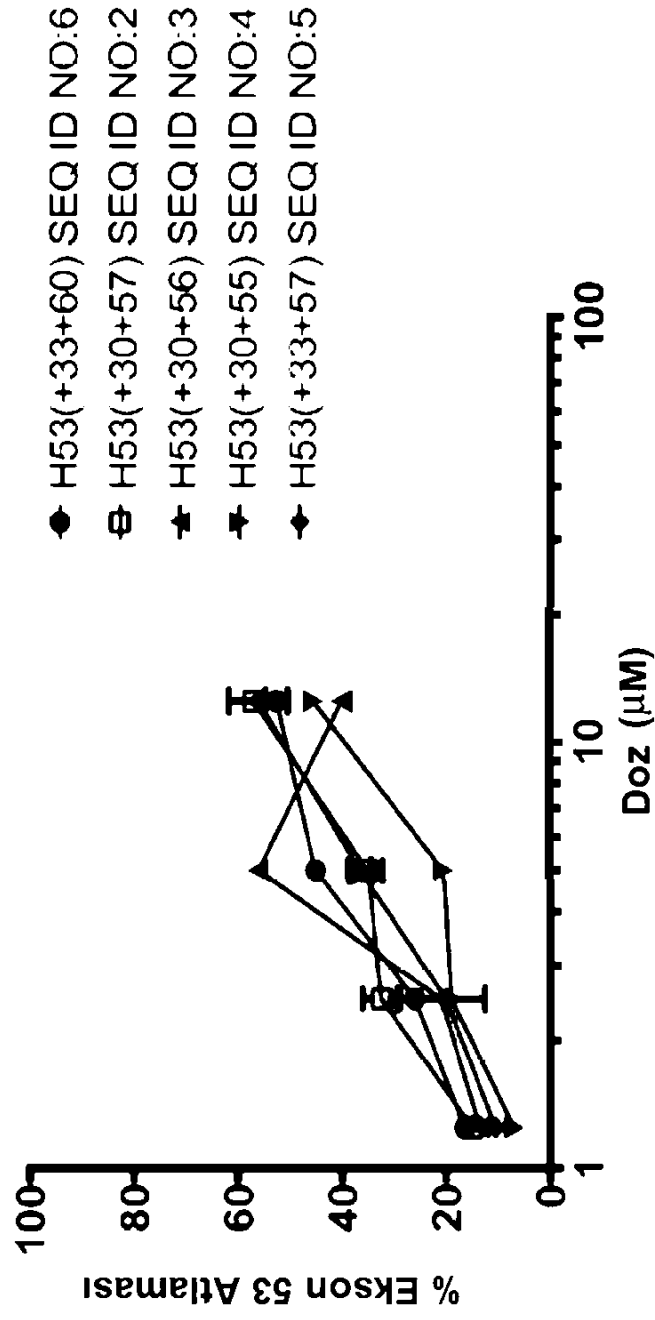




ŞEKİL 2A



ŞEKİL 3



ŞEKİL 4

