



(51) МПК
C12N 15/113 (2010.01)
C07H 21/02 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 15/113 (2020.02); *C12N 2310/11* (2020.02); *C12N 2310/313* (2020.02); *C12N 2310/314* (2020.02);
C12N 2310/321 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2018113276, 15.09.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.09.2016

Дата регистрации:
23.06.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
15.09.2015 JP 2015-182145

(43) Дата публикации заявки: 16.10.2019 Бюл. № 29

(45) Опубликовано: 23.06.2020 Бюл. № 18

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 16.04.2018

(86) Заявка РСТ:
JP 2016/077305 (15.09.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2017/047707 (23.03.2017)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ЭНЯ, Юкико (JP),
ТОНЭ, Юитиро (JP),
ТАКЕДА, Син'ити (JP),
АОКИ, Ёсицугу (JP)

(73) Патентообладатель(и):

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

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: CA 2861247 A1, 04.07.2013. RU
2567664 C2, 10.11.2015. Mitrpan C, Fletcher S,
Iversen PL, Wilton SD, "By-passing the nonsense
mutation in the 4 CV mouse model of muscular
dystrophy by induced exon skipping", J. Gene
Med. 2009 Jan;11(1):46-56. doi: 10.1002/jgm.1265.

(54) АНТИСМЫСЛОВАЯ НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области
биотехнологии. Описана группа изобретений,
включающая антисмысловой олигомер длиной
14-32 основания для исключения экзона 45 в
человеческом гене дистрофина, фармацевтическую композицию для лечения
мышечной дистрофии, способ лечения мышечной
дистрофии путем индукции исключения экзона
45 в человеческом гене дистрофина, применение
вышеуказанного антисмылового олигомера или
его фармацевтически приемлемой соли или для

получения фармацевтической композиции для
лечения мышечной дистрофии и антисмысловой
олигомер длиной 14-32 основания для исключения
экзона 45 в человеческом гене дистрофина для
применения в лечении мышечной дистрофии. В
одном из вариантов реализации антисмыловой
олигомер включает в себя два связанных
олигомерных звена, где два олигомерных звена
не являются смежными по отношению друг к
другу или не перекрываются друг с другом.
Изобретение расширяет арсенал средств для

RU 2724554 C2

RU 2724554 C2

Р У 2 7 2 4 5 5 4 C 2

исключения экзоны 45 в человеческом гене
дистрофина. 5 н. и 16 з.п. ф-лы, 14 табл., 9 пр., 25
ил.

R U 2 7 2 4 5 5 4 C 2



(51) Int. Cl.
C12N 15/113 (2010.01)
C07H 21/02 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C12N 15/113 (2020.02); *C12N 2310/11* (2020.02); *C12N 2310/313* (2020.02); *C12N 2310/314* (2020.02);
C12N 2310/321 (2020.02)

(21)(22) Application: 2018113276, 15.09.2016

(24) Effective date for property rights:
15.09.2016Registration date:
23.06.2020

Priority:

(30) Convention priority:
15.09.2015 JP 2015-182145

(43) Application published: 16.10.2019 Bull. № 29

(45) Date of publication: 23.06.2020 Bull. № 18

(85) Commencement of national phase: 16.04.2018

(86) PCT application:
JP 2016/077305 (15.09.2016)(87) PCT publication:
WO 2017/047707 (23.03.2017)Mail address:
129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

ENYA, Yukiko (JP),
TONE, Yuichiro (JP),
TAKEDA, Shin'ichi (JP),
AOKI, Yoshitsugu (JP)

(73) Proprietor(s):

NIPPON SHINYAKU CO., LTD. (JP),
NATIONAL CENTER OF NEUROLOGY
AND PSYCHIATRY (JP)

R U 2 7 2 4 5 5 4 C 2

(54) ANTISENSE NUCLEIC ACID

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: described is a group of inventions comprising an antisense oligomer with a base length of 14–32 to exclude exon 45 in the human dystrophin gene, a pharmaceutical composition for treating muscular dystrophy, method of treating muscular dystrophy by inducing exclusion of exon 45 in the human dystrophin gene, use of said antisense oligomer or its pharmaceutically acceptable salt or for preparing a pharmaceutical composition for treating muscular

dystrophy and an antisense oligomer of 14–32 bases in length to exclude exon 45 in the human dystrophin gene for use in treating muscular dystrophy. In one embodiment, the antisense oligomer includes two coupled oligomeric links, where two oligomeric links are not adjacent to each other or do not overlap with each other.

EFFECT: invention extends the range of products for eliminating exon 45 in the human dystrophin gene.

21 cl, 14 tbl, 9 ex, 25 dwg

Область, к которой относится изобретение

[0001] Настоящее изобретение относится к антисмысловому олигомеру, который способствует исключению экзона 45 в человеческом гене дистрофина, и к фармацевтической композиции, содержащей такой олигомер.

5 Предпосылки к созданию изобретения

[0002] Мышечная дистрофия Дюшена (МДД) представляет собой наследственную прогрессирующую миопатию, которая является очень распространенной и встречается приблизительно у одного из 3500 новорожденных мужского пола. Хотя в детстве у пациентов с МДД двигательная функция является почти такой же, как и у здоровых 10 людей, но уже в возрасте приблизительно от 4 до 5 лет, у них наблюдаются признаки мышечной слабости. Затем эта мышечная слабость прогрессирует и уже в возрасте приблизительно 12 лет наблюдается потеря двигательной активности, и в конечном 15 счете, человек умирает в возрасте двадцати лет от сердечной недостаточности или недостаточности дыхательных путей. Таким тяжелым заболеванием является МДД. В настоящее время не существует эффективного лечения МДД, а поэтому разработка нового терапевтического средства является особенно актуальной.

[0003] Известно, что МДД вызывается мутациями в гене дистрофина. Ген дистрофина локализуется в X-хромосоме и представляет собой гигантский ген, состоящий из 2,2 миллиона пар нуклеотидов ДНК. Эта ДНК транскрибируется в мРНК-предшественник, 20 а затем сплайсируется с удалением инtronов и с образованием мРНК, состоящей из 79 экзонов, сцепленных друг с другом, длина которых составляет 13993 оснований. Эта мРНК транслируется в последовательность из 3685 аминокислот с образованием белка дистрофина. Белок дистрофина участвует в поддержании стабильности мембранны мышечных клеток и необходим для приобретения мышечными клетками резистентности 25 к разрывам. У пациентов с МДД имеются мутации в гене дистрофина, а поэтому, в мышечных клетках у этих пациентов почти не экспрессируется функциональный белок дистрофин. По этой причине, в организме пациентов с МДД, мышечные клетки больше 30 не могут сохранять свою структуру, и в эти мышечные клетки начинает поступать большое количество ионов кальция. В результате этого, происходит реакция, похожая на реакцию воспаления, что приводит к стимуляции фиброза и тем самым затрудняет регенерацию мышечных клеток.

[0004] Мышечная дистрофия Беккера (МДБ) также вызывается мутациям в гене дистрофина. Ее симптомами также является мышечная слабость, но по сравнению с МДД, она проявляется в более легкой форме и прогрессирует медленнее, причем, в 35 большинстве случаев, МДБ развивается в зрелом возрасте. Различия клинических симптомов между МДД и МДБ зависят от того, разрушается или поддерживается рамка считывания аминокислот из-за мутаций в процессе трансляции мРНК дистрофина в белок дистрофин (Не-патентный документ 1). То есть, у пациентов с МДД почти не экспрессируется функциональный белок дистрофин из-за присутствия мутаций, 40 ответственных за сдвиг рамки считывания аминокислот, тогда как у пациентов с МДБ, мутации вызывают делецию некоторых экзонов, но с сохранением рамки считывания аминокислот, в результате чего продуцируется функциональный, хотя и не полноразмерный, белок дистрофин.

[0005] Перспективным способом терапии МДД является лечение посредством 45 исключения экзона. Этот способ терапии включает модификацию сплайсинга для восстановления рамки считывания аминокислот в мРНК дистрофина и индуцирование экспрессии белка дистрофина с частично восстановленной функцией (Не-патентный документ 2). При такой терапии, области аминокислотной последовательности, на

которые нацелено исключение экзона, делетируют. По этой причине, белок дистрофин, экспрессирующийся при такой терапии, становится короче, чем нормальный белок, но, при этом, частично сохраняет функцию стабилизации мышечных клеток, благодаря сохранению рамки считывания аминокислот. Следовательно, предполагается, что при

5 исключении экзона, МДД будет иметь такие же симптомы, которые наблюдаются при МДБ, то есть, в более легкой форме. Терапия посредством исключения экзона в настоящее время находится на стадии клинических испытаний с участием пациентов с МДД после проведения экспериментов на мышах и собаках.

[0006] Исключение экзонов может быть индуцировано посредством связывания

10 антисмысловых нуклеиновых кислот, направленных против любых или обоих 5'- и 3'- сайтов сплайсинга или против внутренних последовательностей экзона. Экзон присутствует только в мРНК, если оба сайта сплайсинга распознаются сплайсосомным комплексом. Таким образом, исключение экзона может быть индуцировано в том случае, когда антисмысловые нуклеиновые кислоты нацелены на сайты сплайсинга.

15 Кроме того, для индуцирования распознавания экзона по механизму сплайсинга необходимо, чтобы белки SR, богатые серином и аргинином, связывались с энхансерами сплайсинга экзона (ESE), а поэтому исключение экзона может быть также индуцировано после нацеливания на ESE.

[0007] У пациентов с МДД имеются различные мутации в гене дистрофина, а поэтому

20 необходимо вводить различные антисмысловые нуклеиновые кислоты в зависимости от положения и типа мутации гена. Существует несколько отчетов по конструированию антисмысловых нуклеиновых кислот для индуцирования исключения одного экзона в гене дистрофина путем нацеливания на одну непрерывную последовательность (Патентные документы 1-6, а также Не-патентные документы 1 и 2). Кроме того, имеется

25 сообщение о том, что если две различных антисмысловых нуклеиновых кислоты, направленных против одного и того же экзона в гене дистрофина, будут действовать в комбинации друг с другом (двойное нацеливание), то активность исключения может быть выше, чем в случае, когда антисмысловая нуклеиновая кислота используется отдельно (Патентный документ 7).

30 [0008] Однако до сих пор ничего не сообщалось о том, что связанные одноцепочечные антисмысловые нуклеиновые кислоты, направленные против двух или более сайтов в одном и том же экзоне (то есть, антисмысловая нуклеиновая кислота сцепленного типа), будут обладать активностью исключения.

Документы предшествующего уровня техники

35 Патентные документы

[0009] Патентный документ 1: WO2004/048570

Патентный документ 2: WO2009/139630

Патентный документ 3: WO2010/048586

Патентный документ 4: US2010/0168212

40 Патентный документ 5: WO2011/057350

Патентный документ 6: WO2006/000057

Патентный документ 7: WO2007/135105

[0010] Не-патентные документы

Не-патентный документ 1: Annemieke Aartsma-Rus et al., (2002) Neuromuscular Disorders 45 12: S71-S77.

Не-патентный документ 2: Wilton S. D., et al., Molecular Therapy 2007: 15: p. 1288-96.

Сущность изобретения

Задача, которая может быть решена с помощью настоящего изобретения

[0011] В соответствии с описанием, привиденным выше, основной целью настоящего изобретения является получение нового антисмылового олигомера сцепленного типа, который был сконструирован для индуцирования исключения экзона посредством нацеливания на отдельные две нуклеотидных последовательности в одном и том же 5 экзоне гена дистрофина, и приготовление терапевтического средства для лечения мышечной дистрофии, содержащего такой олигомер.

Способы решения задачи

[0012] В результате тщательного исследования технической информации, привиденной в вышеописанных документах, и структуры гена дистрофина и т.п., авторами настоящего 10 изобретения было обнаружено, что олигомеры, направленные против двух отдельных сайтов в экзоне 45 человеческого гена дистрофина, являются сцепленными, и полученный антисмыловой олигомер может индуцировать исключение этого экзона. На основе обнаружения этих фактов, авторами данной заявки было создано настоящее изобретение.

15 [0013] В частности, настоящее изобретение включает:

[1] Антисмыловой олигомер длиной 14-32 основания, включающий два связанных олигомерных звена, выбранных из группы, состоящей из (а)-(е), представленных ниже, или их фармацевтически приемлемую соль или гидрат, где два олигомерных звена не являются смежными по отношению друг к другу или не перекрываются друг с другом:

20 (а) олигомерное звено, состоящее из нуклеотидной последовательности, комплементарной нуклеотидной последовательности, состоящей из смежных 7-16 оснований, выбранных из нуклеотидной последовательности, расположенной в положениях от -5 до 15 от 5'-конца экзона 45 в человеческом гене дистрофина;

(б) олигомерное звено, состоящее из нуклеотидной последовательности,

25 комплементарной нуклеотидной последовательности, состоящей из смежных 7-16 оснований, выбранных из нуклеотидной последовательности, расположенной в положениях от 48 до 70 от 5'-конца экзона 45 в человеческом гене дистрофина;

(с) олигомерное звено, состоящее из нуклеотидной последовательности, комплементарной нуклеотидной последовательности, состоящей из смежных 7-16

30 оснований, выбранных из нуклеотидной последовательности, расположенной в положениях от 128 до 150 от 5'-конца экзона 45 в человеческом гене дистрофина;

(д) олигомерное звено, состоящее из нуклеотидной последовательности, комплементарной нуклеотидной последовательности, состоящей из смежных 7-16 оснований, выбранных из нуклеотидной последовательности, расположенной в положениях от 15 до 40 от 5'-конца экзона 45 в человеческом гене дистрофина; и

(е) олигомерное звено, состоящее из нуклеотидной последовательности, комплементарной нуклеотидной последовательности, состоящей из смежных 7-16 оснований, выбранных из нуклеотидной последовательности, расположенной в положениях от 110 до 125 от 5'-конца экзона 45 в человеческом гене дистрофина.

35 [2] Антисмыловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат в соответствии с вышеуказанным [1], где одно из двух олигомерных звеньев представлено в (а).

[3] Антисмыловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат в соответствии с вышеуказанными [1] или [2], которые состоят из любой нуклеотидной

40 последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NN: 7-12, 14-33, 40-52, 57, 64, 65 и 79-86.

[4] Антисмыловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат в соответствии с одним из вышеуказанных [1]-[3], которые состоят из любой

нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NN: 8, 10, 25, 30, 33, 79 и 80.

[5] Антисмыловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат в соответствии с любым из вышеуказанных [1]-[4], которые представляют собой олигонуклеотид.

[6] Антисмыловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат в соответствии с вышеуказанным [5], где по меньшей мере один нуклеотид, входящий в состав олигонуклеотида, модифицирован в сахарной группе и/или в группе фосфатной связи.

[7] Антисмыловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат в соответствии с вышеуказанными [5] или [6], где сахарной группой по меньшей мере одного нуклеотида, входящего в состав олигонуклеотида, является рибоза, в которой группа -OH в 2'-положении замещена любой группой, выбранной из группы, состоящей из OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br и I (где R представляет собой алкил или арил, а R' представляет собой алкилен).

[8] Антисмыловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат в соответствии с вышеуказанными [6] или [7], где группой фосфатной связи по меньшей мере одного нуклеотида, входящего в состав олигонуклеотида, является любая группа, выбранная из группы, состоящей из фосфортиоатной связи, фосфордитиоатной связи, алкилфосфонатной связи, фосфорамидатной связи и бораноfosфатной связи.

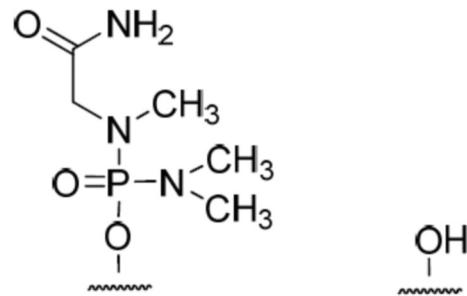
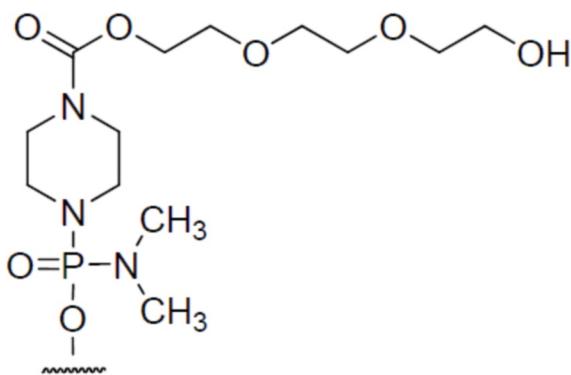
[9] Антисмыловой олигомер в соответствии с любым из вышеуказанных [1]-[4], который представляет собой морфолино-олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

[10] Антисмыловой олигомер в соответствии с вышеуказанным [9], который представляет собой фосфордиамидатный морфолино-олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

[11] Антисмыловой олигомер в соответствии с вышеуказанным [4], который представляет собой фосфордиамидатный морфолино-олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

[12] Антисмыловой олигомер в соответствии с любым из вышеуказанных [9]-[11], где 5'-концом является любая группа, представленная химическими формулами (1)-(3), указанными ниже, или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

[Формула 1]



[13] Фармацевтическую композицию для лечения мышечной дистрофии, которая

содержит антисмыловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или

гидрат в соответствии с любым из вышеуказанных [1]-[12] в качестве активного ингредиента.

[14] Фармацевтическую композицию в соответствии с вышеуказанным [13], которая также содержит фармацевтически приемлемый носитель.

5 [15] Способ лечения мышечной дистрофии, который включает стадию введения пациенту с мышечной дистрофией антисмылового олигомера или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата в соответствии с любым из вышеуказанных [1]-[12], или фармацевтической композиции в соответствии с вышеуказанным [13] или [14].

10 [16] Способ лечения в соответствии с вышеуказанным [15], где пациентом с мышечной дистрофией является пациент, имеющий мутацию, которая является мишенью для исключения экзона 45 в гене дистрофина.

[17] Способ лечения в соответствии с вышеуказанными [15] или [16], где пациентом является человек.

15 [18] Применение антисмылового олигомера или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата в соответствии с любым из вышеуказанных [1]-[12] в целях приготовления фармацевтической композиции для лечения мышечной дистрофии.

[19] Антисмыловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат в соответствии с любым из вышеуказанных [1]-[12] в целях его применения для лечения мышечной дистрофии.

20 [20] Антисмыловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат в соответствии с вышеуказанным [19], где лечению подвергается пациент с мышечной дистрофией, имеющий мутацию, которая является мишенью для исключения экзона 45 в гене дистрофина.

[21] Антисмыловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат 25 в соответствии с вышеуказанными [19] или [20], где пациентом является человек.

Эффекты настоящего изобретения

[0014] Антисмыловой олигомер согласно изобретению позволяет эффективно индуцировать исключение экзона 45 в человеческом гене дистрофина. Кроме того, фармацевтическая композиция согласно изобретению, при ее введении, способствует 30 эффективному ослаблению симптомов мышечной дистрофии Дюшенна.

Делетированными экзонами у пациентов, подвергаемых лечению, являются экзоны 18-44, 44, 46, 46-47, 46-48, 46-49, 46-51, 46-53 и т.п.

Краткое описание чертежей

[0015] На фигуре 1 представлен график, иллюстрирующий эффективность исключения 35 экзона 45 в человеческом гене дистрофина в человеческих клетках рабдомиосаркомы (RD-клетках).

На фигуре 2 представлен график, иллюстрирующий эффективность исключения экзона 45 в человеческом гене дистрофина в человеческих клетках рабдомиосаркомы (RD-клетках).

40 На фигуре 3 представлен график, иллюстрирующий эффективность исключения экзона 45 в человеческом гене дистрофина в человеческих клетках рабдомиосаркомы (RD-клетках)

На фигуре 4 представлен график, иллюстрирующий эффективность исключения 45 экзона 45 в человеческом гене дистрофина в человеческих клетках рабдомиосаркомы (RD-клетках)

На фигуре 5 представлен график, иллюстрирующий эффективность исключения экзона 45 в человеческом гене дистрофина в человеческих клетках рабдомиосаркомы (RD-клетках)

экзона 45 в человеческом гене дистрофина в человеческих клетках рабдомиосаркомы (RD-клетках).

На фигуре 23 представлен график, иллюстрирующий эффективность исключения экзона 45 в человеческом гене дистрофина в человеческих клетках рабдомиосаркомы (RD-клетках).

На фигуре 24 представлен график, иллюстрирующий эффективность исключения экзона 45 в человеческом гене дистрофина в человеческих клетках рабдомиосаркомы (RD-клетках).

На фигуре 25 представлен график, иллюстрирующий эффективность исключения

экзона 45 в человеческом гене дистрофина в человеческих клетках рабдомиосаркомы (RD-клетках).

Описание вариантов осуществления изобретения

[0016] Настоящее изобретение более подробно описано ниже. Настоящее изобретение описано на нижеследующих вариантах его осуществления, но эти варианты не должны рассматриваться как ограничение объема изобретения. В настоящее изобретение могут быть включены различные варианты, не ограничивающие сущности настоящего изобретения.

Следует отметить, что все цитируемые здесь публикации, включая документы, относящиеся к предшествующему уровню техники, патентные бюллетени и другие патентные документы вводятся в настоящее описание посредством ссылки. Кроме того, настоящее описание включает информацию, раскрытую в описании изобретения и описании чертежей Японской патентной заявки №. 2015-182145 (поданной 15 сентября 2015), в отношении которой испрашивается приоритет настоящей заявки.

[0017] 1. Антисмысловой олигомер

Настоящее изобретение относится к антисмысловому олигомеру, который способствует исключению экзона 45 в человеческом гене дистрофина, или к его фармацевтически приемлемой соли или гидрату (далее называемым общим термином «олигомер согласно изобретению»).

[0018] [Экзон 45 в человеческом гена дистрофина]

В контексте настоящего изобретения, термин «ген» означает не только геномный ген, но также и кДНК, мРНК-предшественник и мРНК. Предпочтительным геном является мРНК-предшественник, то есть, пре-мРНК.

В человеческом геноме, человеческий ген дистрофина локализован в локусе Xp21.2. Человеческий ген дистрофина имеет размер 3,0 миллионов пар оснований (м.п.о.) и является самым крупным геном из всех известных человеческих генов. Однако, кодирующие области в человеческом гене дистрофина составляют только 14 т.п.н. и распределены по всем 79 экзонам гена дистрофина (Roberts, RG., et al., Genomics, 16: 536-538 (1993)). Пре-мРНК, транскрибуемая из человеческого гена дистрофина, сплайсируется с образованием зрелой мРНК в 14 т.п.о. Нуклеотидная последовательность человеческого гена дистрофина дикого типа является известной (GenBank, рег. №. NM_004006).

Нуклеотидная последовательность экзона 45 в человеческом гене дистрофина дикого типа представлена в SEQ ID NO: 13. Кроме того, в нуклеотидной последовательности (SEQ ID NO: 13) экзона 45 в человеческом гене дистрофина дикого типа, последовательность, состоящая из оснований в положениях от -5 до 15, если считать от 5'-конца, представлена в SEQ ID NO: 3. Аналогичным образом, последовательность, состоящая из оснований в положениях 48-70, последовательность, состоящая из оснований в положениях 128-150, последовательность, состоящая из оснований в

положениях 15-40 и последовательность, состоящая из оснований в положениях 110-125, представлены в SEQ ID NN: 4-6 и 143, соответственно.

[0019] В настояще время был получен олигомер согласно изобретению, способствующий исключению экзона 45 в человеческом гене дистрофина, в целях

5 модификации белка, кодируемого геном дистрофина, вызывающим МДД, с образованием белка дистрофина, ответственного за МДБ. Таким образом, экзон 45 в гене дистрофина, который должен быть исключен посредством олигомера согласно изобретению, включает не только форму дикого типа, но также и мутированные формы.

Более конкретно, мутированный экзон 45 в человеческом гене дистрофина или его 10 часть представляют собой полинуклеотид, указанный ниже в (I) или (II):

(I) полинуклеотид, гибридизующийся в жестких условиях с полинуклеотидом, состоящим из нуклеотидной последовательности, комплементарной любой нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 143; или

15 (II) полинуклеотид, состоящий из нуклеотидной последовательности, которая на 90% или более идентична любой нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 143.

[0020] Используемый здесь термин «полинуклеотид» означает ДНК или РНК.

20 Используемый здесь термин «полинуклеотид, гибридизующийся в жестких условиях» означает, например, полинуклеотид, который может быть получен посредством гибридизации колоний, гибридизации бляшек, Саузерн-гибридизации или другими методами гибридизации с использованием в качестве зонда всего полинуклеотида или части полинуклеотида, состоящего из нуклеотидной последовательности,

25 комплементарной любой нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 143. Гибридизация может быть осуществлена с применением методов, описанных, например, в руководствах «Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 3, Cold Spring Harbor, Laboratory Press 2001» и «Ausubel, Current Protocols in

30 Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997».

[0021] Используемый здесь термин «комплементарная нуклеотидная последовательность» не ограничивается лишь нуклеотидной последовательностью, образующей пары Уотсона-Крика с нуклеотидной последовательностью-мишенью, и также включает нуклеотидные последовательности, образующие пары оснований, 35 которые неоднозначно спариваются с нуклеотидной последовательностью-мишенью. В этой связи следует отметить, что пара Уотсона-Крика означает пару оснований, которая образует водородную связь между аденином и тимином, между аденином и урацилом или между гуанином и цитозином, а неоднозначно спаривающаяся пара оснований означает пару оснований, которая образует водородную связь между

40 гуанином и урацилом, между инозином и урацилом, между инозином и аденином или между инозином и цитозином. Кроме того, такая «комплементарная нуклеотидная последовательность» необязательно должна быть на 100% комплементарна нуклеотидной последовательности-мишени и может содержать основания, которые не являются комплементарными (например, 1-3 основания, 1 или 2 основания или одно 45 основание) нуклеотидной последовательности-мишени.

[0022] Используемый здесь термин «жесткие условия» может означать условия низкой жесткости, условия умеренной жесткости и условия высокой жесткости. «Условия низкой жесткости» означают, например, условия в присутствии 5 x SSC, 5 x раствора

Денхардта, 0,5% ДСН, 50% формамида при 32°C. Аналогичным образом, «условия умеренной жесткости» означают, например, условия в присутствии 5 × SSC, 5 × раствора Денхардта, 0,5% ДСН, 50% формамида при 42°C или в присутствии 5 × SSC, 1% ДСН, 50 mM Трис-HCl (рН 7,5), 50% формамида при 42°C. «Условия высокой жесткости»

5 означают, например, условия в присутствии 5 × SSC, 5 × раствора Денхардта, 0,5% ДСН, 50% формамида при 50°C или в присутствии 0,2 × SSC, 0,1% ДСН при 65°C. Можно предположить, что в этих условиях, полинуклеотид, имеющий более высокую идентичность, может быть более эффективно получен при более высокой температуре. Однако, жесткость гибридизации зависит от множества факторов, включая температуру, 10 концентрацию зонда, длину зонда, ионную силу, время реакции, концентрацию соли и т.п. Специалист в данной области может создать нужные условия жесткости путем выбора соответствующих факторов.

15 [0023] Следует отметить, что если для гибридизации используется коммерчески доступный набор, то для этой цели может быть использован, например, набор для прямого мечения Alkphos и набор, включающий систему детектирования (GE Healthcare). В этом случае, гибридизация может быть осуществлена в соответствии с протоколом, прилагаемым к набору, то есть, после инкубирования мембранны в течение ночи с меченым зондом с последующей промывкой первым промывочным буфером, содержащим 0,1% (масс./об.) ДСН при 55°C, может быть детектирован гибридизованный 20 полинуклеотид. Альтернативно, если для мечения зонда дигоксигенином (DIG) в процессе получения зонда на основе всей нуклеотидной последовательности или части нуклеотидной последовательности, комплементарной любой нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 143 или выбранной из группы, 25 состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 143, используется коммерчески доступный реагент (например, смесь для ПЦР-мечения (Roche Diagnostics)), то для детектирования гибридизации может быть использован набор для детектирования нуклеиновой кислоты с использованием DIG (Roche Diagnostics).

30 [0024] Другими гибридизующимися полинуклеотидами, помимо перечисленных выше, являются полинуклеотиды, которые на 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более, 99,1% или более, 99,2% или более, 99,3% или более, 99,4% или более, 99,5% или более, 99,6% или более, 99,7% или более, 99,8% или более, или 35 99,9% или более идентичны последовательности, состоящей из любого полинуклеотида, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 143, как было определено с помощью компьютерной программы BLAST по поиску гомологии с использованием параметров по умолчанию.

40 Следует отметить, что идентичность нуклеотидных последовательностей может быть определена с использованием алгоритма Karlin и Altschul, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 872264-2268, 1990; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873, 1993). Исходя из алгоритма BLAST были разработаны программы, называемые BLASTN и BLASTX (Altschul SF, et al: J Mol Biol 215: 403, 1990). Если для 45 анализа нуклеотидных последовательностей используется BLASTN, то могут быть установлены следующие параметры, например, оценка=100 и длина слова=12. Если используются программы BLAST и BLAST с «пробелами», то в каждой программе могут быть использованы параметры по умолчанию.

[0025] В некоторых вариантах осуществления изобретения, олигомер согласно изобретению представляет собой антисмысловой олигомер длиной 14-32 оснований, содержащий два связанных олигомерных звена, выбранных из группы, состоящей из представленных ниже (а)-(е), или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат:

- 5 (а) олигомерное звено, состоящее из нуклеотидной последовательности, комплементарной нуклеотидной последовательности, состоящей из смежных 7-16 оснований, выбранных из нуклеотидной последовательности, расположенной в положениях от -5 до 15 от 5'-конца экзона 45 в человеческом гене дистрофина;
- 10 (б) олигомерное звено, состоящее из нуклеотидной последовательности, комплементарной нуклеотидной последовательности, состоящей из смежных 7-16 оснований, выбранных из нуклеотидной последовательности, расположенной в положениях от 48 до 70 от 5'-конца экзона 45 в человеческом гене дистрофина;
- 15 (с) олигомерное звено, состоящее из нуклеотидной последовательности, комплементарной нуклеотидной последовательности, состоящей из смежных 7-16 оснований, выбранных из нуклеотидной последовательности, расположенной в положениях от 128 до 150 от 5'-конца экзона 45 в человеческом гене дистрофина;
- 20 (д) олигомерное звено, состоящее из нуклеотидной последовательности, комплементарной нуклеотидной последовательности, состоящей из смежных 7-16 оснований, выбранных из нуклеотидной последовательности, расположенной в положениях от 15 до 40 от 5'-конца экзона 45 в человеческом гене дистрофина; и
- 25 (е) олигомерное звено, состоящее из нуклеотидной последовательности, комплементарной нуклеотидной последовательности, состоящей из смежных 7-16 оснований, выбранных из нуклеотидной последовательности, расположенной в положениях от 110 до 125 от 5'-конца экзона 45 в человеческом гене дистрофина.

25 [0026] Каждое из вышеупомянутых олигомерных звеньев (а)-(е) (далее называемых просто «звеньями») имеет длину 7-16 оснований, предпочтительно, 8-16 оснований, а более предпочтительно, 9-16 оснований. Соответствующие звенья могут иметь одинаковые или различные размеры.

30 [0027] Кроме того, если два олигомерных звена выбраны из группы, состоящей из (а)-(е), то эти два олигомерных звена могут представлять собой комбинацию из одинаковых звеньев (то есть, (а) и (а), (б) и (б), (с) и (с), (д) и (д), или (е) и (е)) или они могут представлять собой комбинацию из различных звеньев, но предпочтительно, чтобы они представляли собой комбинацию из различных звеньев. Так, например, если в качестве одного звена выбрано (а), то другим звеном, предпочтительно, является любое звено из (б)-(е). Аналогичным образом, если в качестве одного звена выбрано (б), то другим звеном предпочтительно, является (а), (с), (д) или (е), а если в качестве одного звена выбрано (с), то другим звеном предпочтительно, является (а), (б), (д) или (е).

35 [0028] Если два звена выбраны из (а)-(е), то любые из этих выбранных двух звеньев могут быть локализованы со стороны 5'-конца. Если выбраны (а) и (б), то звено (а), предпочтительно, присоединено с 3'-концевой стороны. Если выбраны (б) и (с), то звено (б) предпочтительно, присоединено с 3'-концевой стороны. Если выбраны (а) и (с), то звено (а), предпочтительно, присоединено с 3'-концевой стороны. Если выбраны (а) и (д), то звено (а), предпочтительно, присоединено с 3'-концевой стороны. Если выбраны (а) и (е), то звено (а), предпочтительно, присоединено с 3'-концевой стороны.

40 [0029] Используемый здесь термин «присоединенный» означает, что два звена, выбранные из (а)-(е), непосредственно присоединены друг к другу. То есть, если два звена являются присоединенными, то это означает, что 3'-конец звена, локализованного

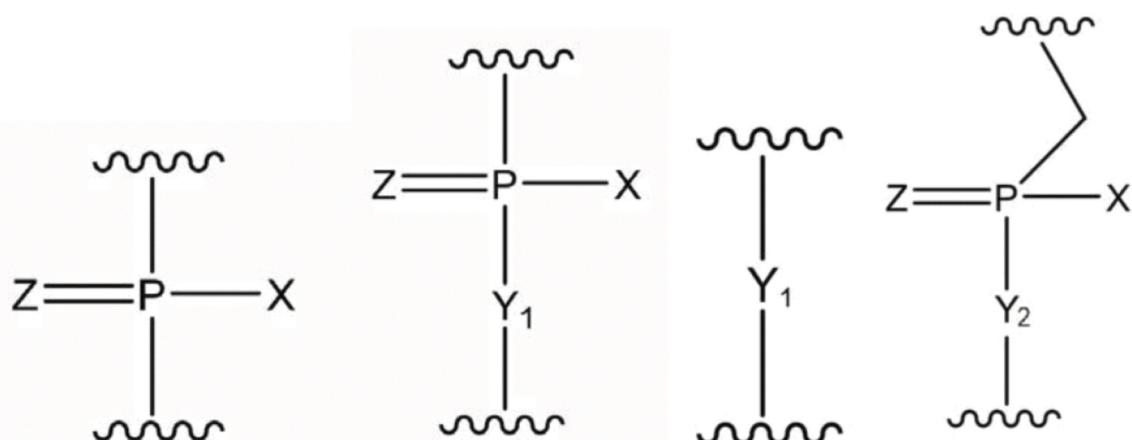
с 5'-концевой стороны, и 5'-конец звена, локализованного с 3'-концевой стороны, образуют фосфатную связь или любую из нижеследующих групп:

[Формула 2]

5

10

15



(где X представляет собой -OH, -CH₂R¹, -O-CH₂R¹, -S-CH₂R¹, -NR²R³ или F;

R¹ представляет собой H или алкил;

20 R² и R³, которые могут быть одинаковыми или различными, и каждый из них представляет собой H, алкил, циклоалкил или арил;

Y₁ представляет собой O, S, CH₂ или NR¹;

Y₂ представляет собой O, S или NR¹; и

25 Z представляет собой O или S).

[0030] Выражение «способствующий исключению экзона 45 в человеческом гене дистрофина» означает, что после связывания олигомера согласно изобретению с сайтом, соответствующим экзону 45 в транскрипте (например, пре-мРНК) человеческого гена дистрофина, транскрипт сплайсируется с образованием связи между основанием, соответствующим 3'-концу экзона 43, и основанием, соответствующим 5'-концу экзона 46, а в случае пациентов с МДД с делецией экзона 44, например, с образованием зрелой формы мРНК, не содержащей кодона со сдвигом рамки считывания.

[0031] Используемый здесь термин «связывание» означает, что после смешивания олигомера согласно изобретению с транскриптом человеческого гена дистрофина, оба они гибридизуются друг с другом в физиологических условиях с образованием дуплекса. Используемый здесь термин «в физиологических условиях» означает условия, скорректированные для имитации *in vivo* pH, состава соли и температуры, например, репрезентативными условиями являются: 25°C - 40°C, предпочтительно, 37°C, pH 5-8, предпочтительно, pH 7,4, и концентрация хлорида натрия 150 мМ.

[0032] Для того, чтобы подтвердить, происходит ли исключение экзона 45 в человеческом гене дистрофина, олигомер согласно изобретению может быть трансфектирован в дистрофин-экспрессирующие клетки (например, клетки человеческой рабдомиосаркомы), а область, находящаяся рядом с экзоном 45 в мРНК человеческого гена дистрофина, может быть амплифицирована с помощью ОТ-ПЦР из всей РНК вышеуказанных дистрофин-экспрессирующих клеток с последующим проведением гнездовой ПЦР или анализа по секвенированию продукта ПЦР-амплификации. Эффективность исключения может быть определена следующим образом: мРНК человеческого гена дистрофина выделяют из тестируемых клеток, и мРНК оценивают на уровень полинуклеотидов «А» в полосе с исключением экзона 45, и на уровень

полинуклеотида «В» в полосе без исключения экзона 45 с последующим вычислением исходя из измеренных величин «А» и «В» по следующей формуле.

Эффективность исключения (%)= $A/(A+B) \times 100$

[0033] Олигомер согласно изобретению, предпочтительно, способствует исключению

5 экзона 45 с эффективностью 10% или более, 20% или более, 30% или более, 40% или более, 50% или более, 60% или более, 70% или более, 80% или более, или 90% или более.

Вычисление эффективности исключения может быть сделано как описано в WO2012/029986.

[0034] Олигомер согласно изобретению может быть представлен олигонуклеотидом,

10 морфолино-олигомером или олигомером «пептид-нуклеиновая кислота» (PNA), каждый из которых имеет длину 14-32 основания. Олигомер согласно изобретению, предпочтительно, имеет длину 16-30 оснований, 17-30 оснований, 18-30 оснований, 19-30 оснований, 20-30 оснований, 20-29 оснований, 20-28 оснований, 20-27 оснований, 20-26 оснований или 21-26 оснований и предпочтительно, представляет собой морфолино-15 олигомер.

[0035] Вышеуказанный олигонуклеотид (далее называемый «олигонуклеотидом согласно изобретению») представляет собой олигомер согласно изобретению, состоящий из нуклеотидных звеньев, и такой нуклеотид может представлять собой рибонуклеотид, дезоксирибонуклеотид или модифицированный нуклеотид.

20 [0036] Модифицированный нуклеотид означает рибонуклеотид или дезоксирибонуклеотид, в которых группы нуклеотидных оснований, сахарные группы и группы с фосфатной связью являются полностью или частично модифицированными.

[0037] Примерами нуклеотидных оснований являются аденин, гуанин, гипоксантин, цитозин, тимин, урацил или их модифицированные основания. Такими 25 модифицированными основаниями могут быть, но не ограничиваются ими, псевдоурацил, 3-метилурацил, дигидроурацил, 5-алкилцитозины (например, 5-метилцитозин), 5-алкилурацилы (например, 5-этилурацил), 5-галогенурацилы (например, 5-бромурацил), 6-азапиримидин, 6-алкилпиримидины (например, 6-метилурацил), 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксигидроксиметил)урацил, 5'-30 карбоксиметиламинометил-2-тиоурацил, 5-карбоксиметиламинометилурацил, 1-метиладенин, 1-метилгипоксантин, 2,2-диметилгуанин, 3-метилцитозин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, N6-метиладенин, 7-метилгуанин, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, 5-метиламинометилурацил, 5-метилкарбонилметилурацил, 5-метилоксиурацил, 5-метил-2-тиоурацил, 2-метилтио-N6-изопентениладенин, урацил-5-оксикусусная кислота, 2-тиоцитозин, пурин, 2,6-диаминопурин, 2-аминопурин, изогуанин, индол, имидазол, ксантин и т.п.

[0038] Модификациями в сахарной группе могут быть модификации в 2'-положении 40 рибозы и модификации в других положениях сахара. Примерами модификаций в 2'-положении рибозы являются модификации, полученные путем замены группы OH в 2'-положении рибозы на OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br или I, где R представляет собой алкил или арил, а R' представляет собой алкилен.

45 Примерами модификаций в других положениях сахара являются, но не ограничиваются ими, замена O на S в 4'-положении рибозы или дезоксирибозы и создание мостиковой связи между 2'- и 4'-положениями сахара, представленной как LNA (блокированные нуклеиновые кислоты) или ENA (нуклеиновые кислоты, связанные мостиковой связью с 2'-O,4'-C-этиленом).

[0039] Модификации в группе с фосфатной связью могут быть получены путем замены фосфодиэфирной связи на фосфортиоатную связь, фосфордитиоатную связь,

алкилфосфонатную связь, фосфорамидную связь или бораноfosфатную связь (Enya et al: Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 18, 9154-9160) (см., например, JP WO2006/129594 и JP WO2006/038608).

[0040] Алкил, предпочтительно, представляет собой прямой или разветвленный

5 алкил, содержащий от 1 до 6 атомов углерода. Более конкретными примерами являются метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил, н-пентил, изопентил, неопентил, трет-пентил, н-гексил и изогексил. Такой алкил может быть замещен 1-3 заместителями, включая, галоген, алcoxси, циано, нитро и т.п.

[0041] Циклоалкил, предпочтительно представляет собой циклоалкил, содержащий

10 от 5 до 12 атомов углерода. Более конкретными примерами являются циклопентил, циклогексил, циклогептил, циклооктил, циклодецил и циклододецил.

Галогенами являются фтор, хлор, бром и йод.

Алcoxси может представлять собой прямой или разветвленный алcoxси, содержащий от 1 до 6 атомов углерода, и такой алcoxси представляет собой метокси, этокси, н-15 пропокси, изопропокси, н-бутокси, изобутокси, втор-бутокси, трет-бутокси, н-пентилокси, изопентилокси, н-гексилокси, изогексилокси и т.п. Особенно предпочтительным является алcoxси, имеющий от 1 до 3 атомов углерода.

[0042] Арил, предпочтительно, представляет собой арил, содержащий от 6 до 10 атомов углерода. Более конкретными примерами являются фенил, α -нафтил и β -нафтил.

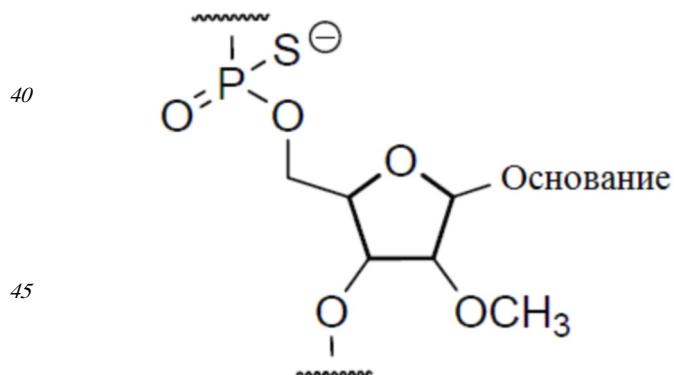
20 Особенно предпочтительным является фенил. Такой арил может быть замещен 1-3 заместителями, включая алкил, галоген, алcoxси, циано, нитро и т.п.

Алкилен, предпочтительно, представляет собой прямой или разветвленный алкилен, содержащий от 1 до 6 атомов углерода. Более конкретными примерами являются метилен, этилен, триметилен, тетраметилен, пентаметилен, гексаметилен, 2-(этил)25 триметилен и 1-(метил)тетраметилен.

[0043] Ацил может представлять собой прямой или разветвленный алканоил или ароил. Примерами таких алканоилов являются формил, ацетил, 2-метилацетил, 2,2-диметилацетил, пропионил, бутирил, изобутирил, пентаноил, 2,2-диметилпропионил, гексаноил и т.п. Примерами ароилов являются бензоил, толуоил и нафтоил. Такой ароил может быть замещен в любом замещаемом положении и может быть замещен алкилом(ами).

[0044] Олигонуклеотиом согласно изобретению, предпочтительно, является олигомер согласно изобретению, звеном которого является группа, представленная нижеследующей общей формулой, где группа -OH в 2'-положении рибозы замещена 35 метокси, а группа с фосфатной связью представляет собой фосфориоатную связь:

[Формула 3]

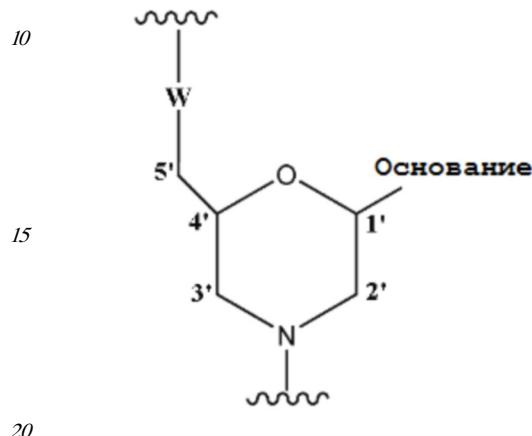


(где Основание представляет собой нуклеотидное основание).

[0045] Олигонуклеотид согласно изобретению может быть легко синтезирован на различных автоматических синтезаторах (например, на AKTA oligopilot plus 10/100 (GE Healthcare)), или альтернативно, его синтез может быть осуществлен третьим лицом (например, Promega или Takara) и т.п.

5 [0046] Вышеуказанным морфолино-олигомером является олигомер согласно изобретению, звеном которого является группа, представленная нижеследующей общей формулой:

[Формула 4]



20

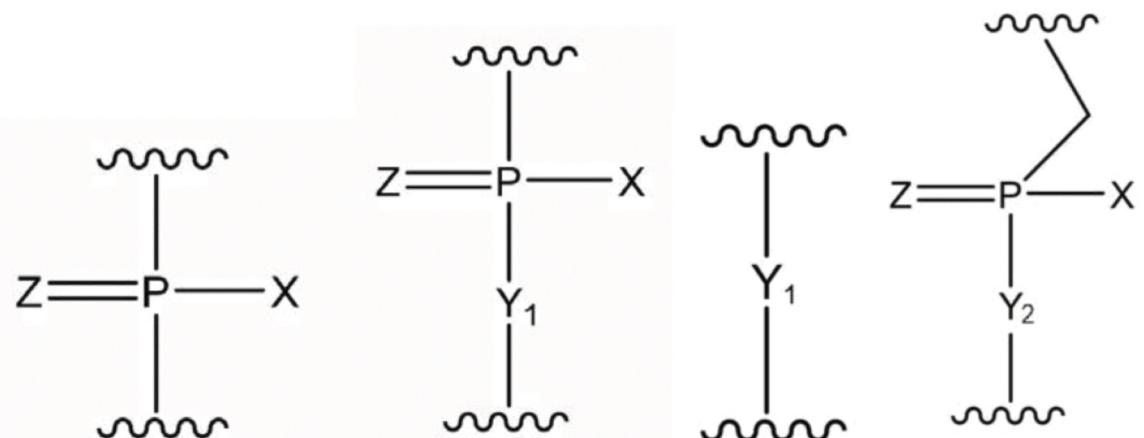
(где «Основание» является таким, как оно было определено выше; и W представляет собой группу, представленную любой из нижеследующих формул:

[Формула 5]

25

30

35



(где X представляет собой $-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{O}-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{S}-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{NR}^2\text{R}^3$ или F;

R^1 представляет собой H или алкил;

40 каждый из R^2 и R^3 , которые могут быть одинаковыми или различными, представляет собой H, алкил, циклоалкил или арил;

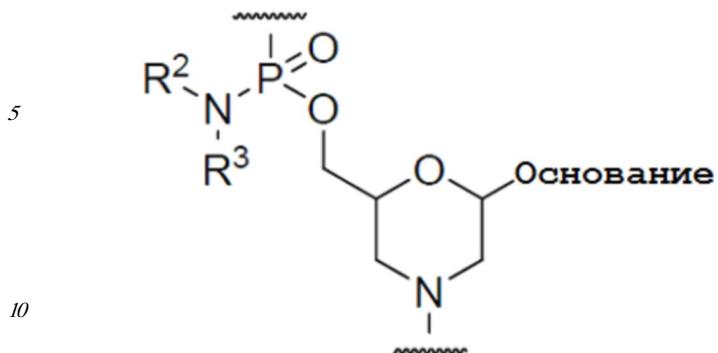
Y_1 представляет собой O, S, CH_2 или NR^1 ;

Y_2 представляет собой O, S или NR^1 ; и

45 Z представляет собой O или S).

[0047] Морфолино-олигомер, предпочтительно, представляет собой олигомер, звеном которого является группа, представленная нижеследующей общей формулой (то есть, фосфорамидатный морфолино-олигомер (далее обозначаемый «PMO»)):

[Формула 6]



(где Основание, R^2 и R^3 являются такими, как они были определены выше).

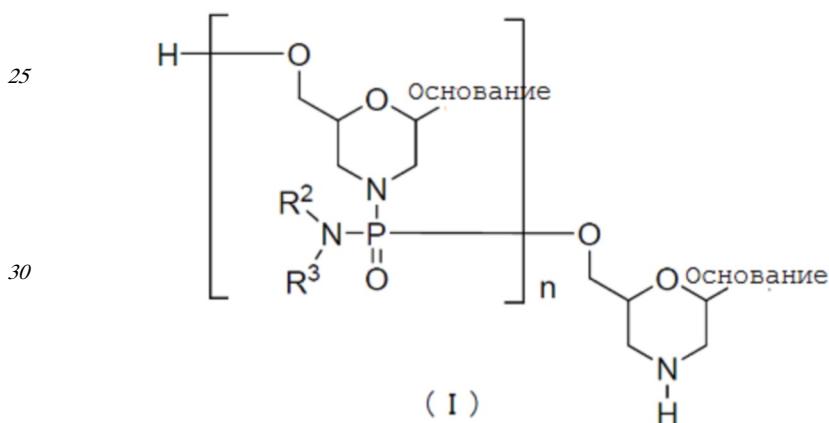
[0048] Так, например, морфолино-олигомер может быть получен как описано в WO1991/009033 или WO2009/064471. В частности, РМО может быть получен в соответствии с процедурами, описанными в WO2009/064471, или он может быть получен в соответствии с процедурами, описанными в WO2013/100190.

15

[0049] [Способ получения РМО]

В качестве одного из вариантов РМО может быть получено соединение, 20 представленное нижеследующей общей формулой (I) (далее обозначаемое РМО (I)), например:

[Формула 7]



35 [где каждое Основание, R^2 и R^3 являются такими, как они были определены выше; и

и n означает любое целое число в пределах от 1 до 99, а предпочтительно, любое целое число в пределах от 13 до 31].

40 [0050] РМО (I) может быть получен в соответствии с известными процедурами, например, путем проведения реакций, описанных в нижеследующих стадиях.

Соединения и реагенты, используемые в нижеследующих стадиях, представляют собой любые неограничивающие соединения и реагенты, при условии, что они могут быть использованы для получения РМО.

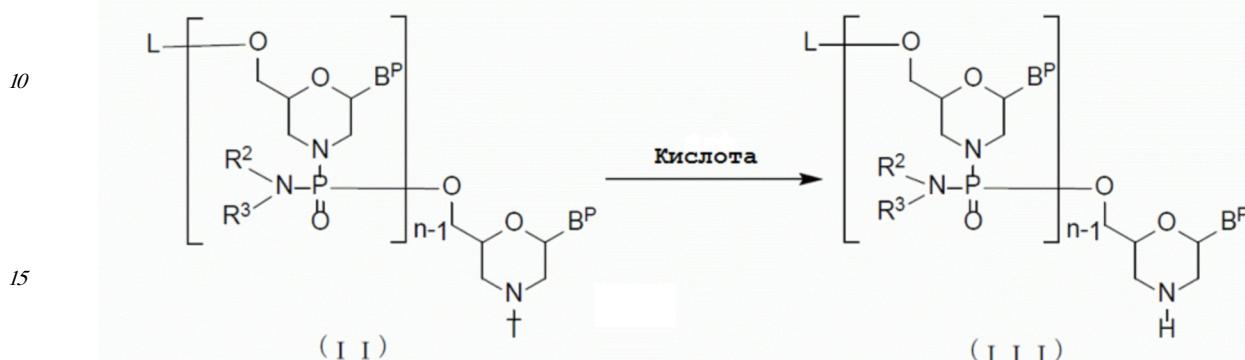
45 [0051] Кроме того, все нижеследующие стадии могут быть осуществлены жидкофазным или твердофазным методом (с повторением серийных реакций или с использованием коммерчески доступного автоматического синтезатора для твердофазного синтеза). Если РМО получают твердофазным методом, то для упрощения проведения реакции и для более тщательного синтеза желательно использовать

автоматический синтезатор.

[0052] (1) Стадия А:

Эта стадия представляет собой стадию, где соединение, представленное общей формулой (II) (далее называемое соединением (II)), обрабатывают кислотой с получением 5 соединения, представленного нижеследующей общей формулой (III) (далее называемого соединением (III)):

[Формула 8]



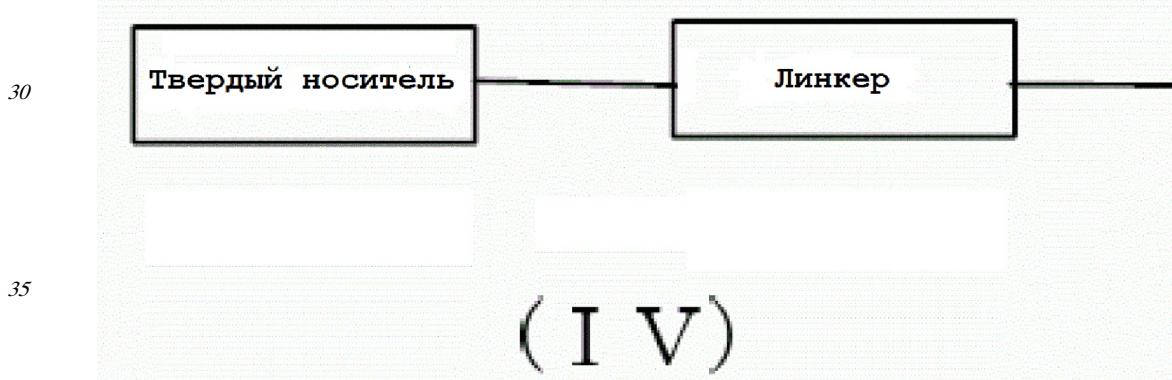
[где n , R^2 и R^3 являются такими, как они были определены выше;

каждый B^P независимо представляет собой нуклеотидное основание, которое может быть защищенным;

Т представляет собой тритильную группу, монометокситритильную группу или диметокситритильную группу; и

Л представляет собой водород, ацил или группу, представленную нижеследующей общей формулой (IV) (далее называемую группой (IV))]:

[Формула 9]



«Нуклеотидные основания», подходящие для B^P , могут представлять собой такие же «нуклеотидные основания», которые были перечислены для оснований, при условии, что аминогруппы или гидрокисильные группы в этих нуклеотидных основаниях для B^P могут быть защищенными.

Защитными группами для этих аминогрупп являются, но не ограничиваются ими, любые группы, при условии, что они используются в качестве защитных групп для 45 нуклеиновых кислот. Более конкретными примерами являются бензоил, 4-метоксибензоил, ацетил, пропионил, бутирил, изобутирил, фенилацетил, феноксиацетил, 4-трет-бутилфеноксиацетил, 4-изопропилфеноксиацетил и (диметиламино)метилен. Защитными группами для гидроксильных групп являются, например, 2-цианоэтил, 4-

нитрофенетил, фенилсульфонилэтил, метилсульфонилэтил, trimетилсилилэтил, фенил, который может быть замещен 1-5 электрон-акцептирующими группами в любом(ых) замещаемом(ых) положении(ях), дифенилкарбамоил, диметилкарбамоил, диэтилкарбамоил, метилфенилкарбамоил, 1-пирролидинилкарбамоил, 5 морфолинокарбамоил, 4-(трет-бутилкарбокси)бензил, 4- [(диметиламино)карбокси] бензил и 4-(фенилкарбокси)бензил (см., например, WO2009/064471).

[0053] «Твердым носителем» является любой носитель, при условии, что он представляет собой носитель, подходящий для его использования в твердофазной реакции нуклеиновых кислот, но желательно использовать, например, носитель, который 10 (i) является слаборастворимым в реагентах, подходящих для их использования в синтезе производных морфолино-нуклеиновой кислоты (например, в дихлорметане, ацетонитриле, тетразоле, N- метилимидазоле, пиридине, ангидриде уксусной кислоты, лутидине, трифтормукусной кислоте), (ii) является химически устойчивым к действию реагентов, подходящих для синтеза производных морфолино-нуклеиновой кислоты, (iii) 15 может быть химически модифицированным, (iv) может быть нагруженным нужными производными морфолино-нуклеиновой кислоты, (v) имеет силу, достаточную для поддержания высокого давления в процессе обработки и (vi) имеет определенный размер частиц и определенное распределение. Более конкретными примерами являются набухающий полистирол (например, аминометилполистироловая смола, связанная 20 поперечными связями с 1% дивинилбензолом (200-400 меш) (2,4~3,0 ммоль/г) (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Japan), аминометилированная полистироловая смола-HCl [с 1% дивинилбензолом, 100-200 меш] (Peptide Institute, Inc., Japan)), не-набухающий полистирол (например, Primer Support (GE Healthcare)), полистиролы, присоединенные к ПЭГ-цепи (например, NH₂-ПЭГ-смола (Watanabe Chemical Industries, Ltd., Japan), смола 25 TentaGel), стекло с регулируемым размером пор (CPG) (например, CPG Inc.), оксализированное стекло с регулируемым размером пор (см., например, Alul et al., Nucleic Acids Research, Vol. 19, 1527 (1991)), носитель, дериватизированный смолой TentaGel, связанной с аминополиэтиленгликолем (см., например, Wright et al., Tetrahedron Letters, Vol. 34, 3373 (1993)), и сополимер полистирола Poros/дивинилбензола.

[0054] В качестве «линкера» может быть использован любой известный линкер, подходящий для связывания с нуклеиновой кислотой или с производным морфолино-нуклеиновой кислоты, и примерами таких линкеров являются 3-аминопропил, сукцинил, 2,2'-диэтанолсульфонил и длинноцепочечный алкиламино (LCAA).

[0055] Эта стадия может быть осуществлена путем обработки соединения (II) кислотой.

[0056] Примерами «кислот», подходящих для использования в этой стадии, являются трифтормукусная кислота, дихлормукусная кислота или трихлормукусная кислота. Количество используемой кислоты обычно составляет, например, в пределах от 0,1 молярных эквивалентов до 1000 молярных эквивалентов, а предпочтительно в пределах 40 от 1 молярного эквивалента до 100 молярных эквивалентов на 1 моль соединения (II).

Кроме того, вместе с вышеописанной кислотой может быть использован органический амин. Для этой цели может быть использован любой органический амин, и примерами такого амина является триэтиламин. Количество используемого органического амина обычно составляет, например, в пределах от 0,01 молярных эквивалентов до 10 молярных эквивалентов, а предпочтительно в пределах от 0,1 молярных эквивалентов до 2 молярных эквивалентов на 1 моль кислоты.

[0057] В случае, если в этой стадии кислота и органический амин используются в виде соли или ее смеси, то примерами таких солей являются соль или смесь

трифтормукусной кислоты и триэтиламина, а более конкретно, смесь, содержащая 2 эквивалента трифтормукусной кислоты и 1 эквивалент триэтиламина.

Кислота, подходящая для ее использования в этой стадии, может быть разбавлена соответствующим растворителем до концентрации в пределах от 0,1% до 30%. Для этой цели может быть использован любой растворитель, при условии, что он будет инертным для этой реакции, и примерами таких растворителей являются дихлорметан, ацетонитрил, спирты (например, этанол, изопропанол, трифторметанол), вода или их смеси.

[0058] Температура вышеуказанной реакции, предпочтительно, составляет, например, в пределах от 10°C до 50°C, более предпочтительно, в пределах от 20°C до 40°C, а еще более предпочтительно, в пределах от 25°C до 35°C.

Время реакции варьируется в зависимости от типа используемой кислоты и/или температуры реакции, но обычно оно составляет в пределах от 0,1 минуты до 24 часов, а предпочтительно, в пределах от 1 минуты до 5 часов.

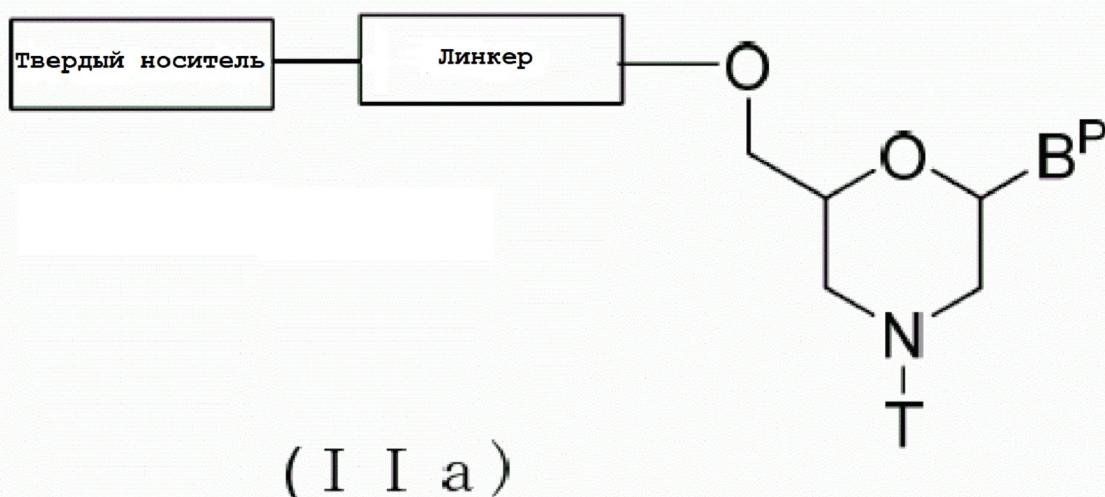
[0059] Кроме того, после завершения этой стадии, может быть добавлено, но необязательно, основание для нейтрализации кислоты, оставшейся в системе. Для этой цели может быть использовано любое «основание», и примером такого основания является диизопропилэтиламин. Такое основание может разбавлено соответствующим растворителем до концентрации в пределах от 0,1% (об./об.) до 30% (об./об.).

В этой стадии может быть использован любой растворитель, при условии, что он будет инертным для этой реакции, и примерами таких растворителей являются дихлорметан, ацетонитрил, спирты (например, этанол, изопропанол, трифторметанол), вода или их смеси. Температура реакции, предпочтительно, составляет, например, в пределах от 10°C до 50°C, более предпочтительно, в пределах от 20°C до 40°C, а еще более предпочтительно, в пределах от 25°C до 35°C.

[0060] Время реакции варьируется в зависимости от типа используемого основания и/или температуры реакции, но обычно оно составляет в пределах от 0,1 минуты до 24 часов, а предпочтительно, в пределах от 1 минуты до 5 часов.

[0060] Следует отметить, что соединение (II), в котором $n=1$ и L представляет собой группу (IV), то есть, соединение, представленное нижеследующей общей формулой (Pa) (далее называемое соединением (Pa)), может быть получено нижеследующими способами:

[Формула 10]



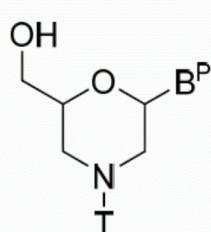
[где B^P , T , линкер и твердый носитель являются такими, как они были определены выше].

[0061] Стадия 1:

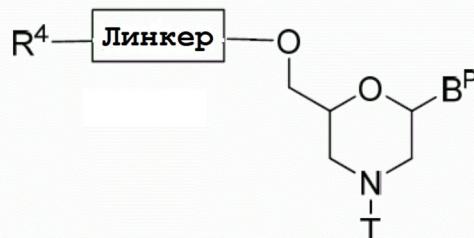
В этой стадии, соединение, представленное ниже следующей общей формулой (V), обрабатывают ацилирующим агентом с получением соединения, представленного ниже следующей общей формулой (VI) (далее называемого соединением (VI)):

5 [Формула 11]

10



(V)



(VI)

15

[где B^P , T и линкер являются такими, как они были определены выше; и R^4 представляет собой гидроксильную группу, галоген или амино].

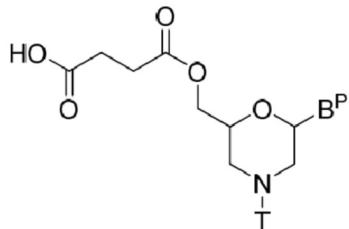
[0062] Эта стадия может быть осуществлена исходя из соединения (V) посредством любой известной реакции введения линкера.

20

В частности, соединение, представленное ниже следующей общей формулой (VIa), может быть получено любым способом, известным как реакция эстерификации, с использованием соединения (V) и ангидрида янтарной кислоты:

[Формула 12]

25



(VIa)

30

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

35

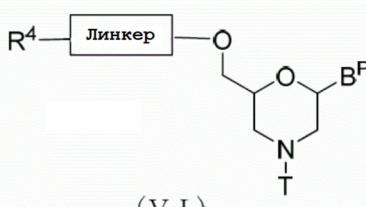
[0063] Стадия 2:

В этой стадии, соединение (VI) подвергают реакции взаимодействия с твердым носителем путем обработки конденсирующим агентом или т.п. с получением соединения (IIa):

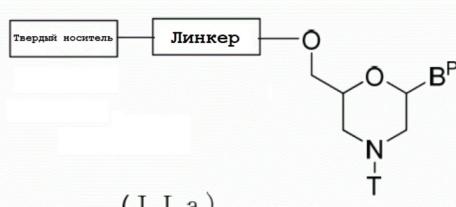
40

[Формула 13]

45



(VI)



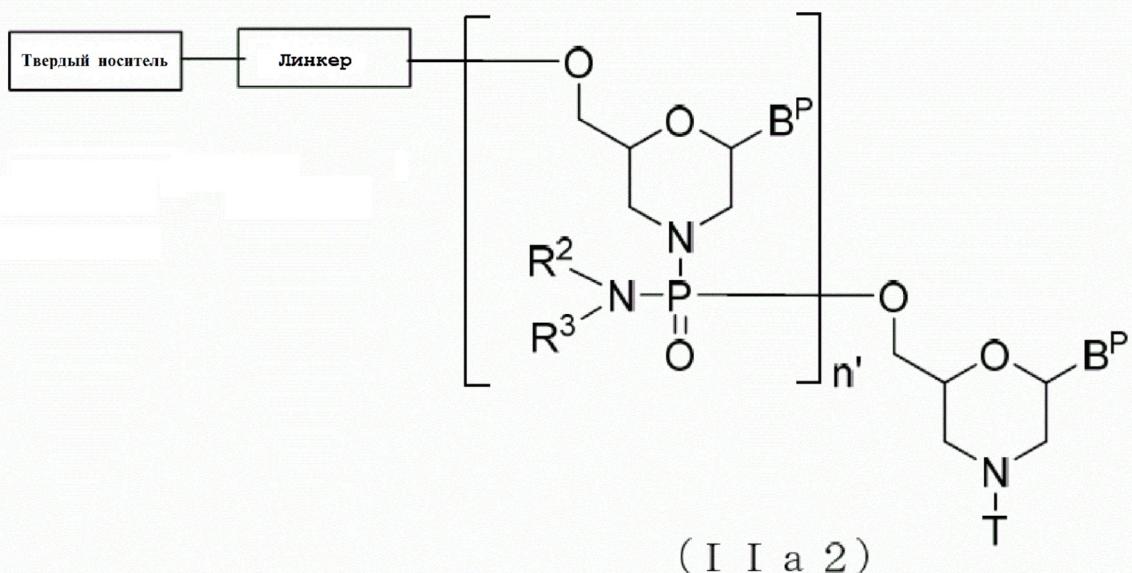
(IIa)

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

Эта стадия может быть осуществлена любым способом, известным как реакция конденсации с использованием соединения (VI) и твердого носителя.

[0064] Соединение (II), где $n=2-99$, а L представляет собой группу (IV), то есть, соединение, представленное нижеследующей общей формулой (IIa2), может быть получено из соединения (IIa) путем повторения нужного числа стадий А и В способа получения РМО, описанного в настоящей заявке:

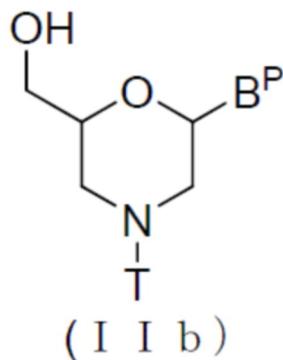
[Формула 14]



25 [где B^P , R^2 , R^3 , T, линкер и твердый носитель являются такими, как они были определены выше; и n' равно 1-98].

30 [0065] Аналогичным образом, соединение (II), в котором $n=1$, а L представляет собой водород, то есть, соединение, представленное нижеследующей общей формулой (IIb), может быть получено, например, способами, описанными в WO1991/009033:

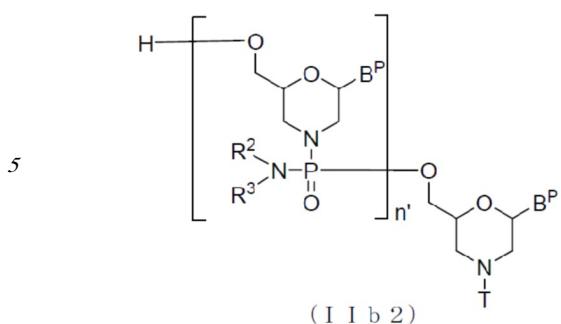
[Формула 15]



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

45 [0066] Соединение (II), в котором $n=2-99$, а L представляет собой водород, то есть, соединение, представленное нижеследующей общей формулой (IIb2), может быть получено исходя из соединения (IIb) путем повторения нужного числа стадий А и В способа получения РМО, описанного в настоящей заявке:

[Формула 16]

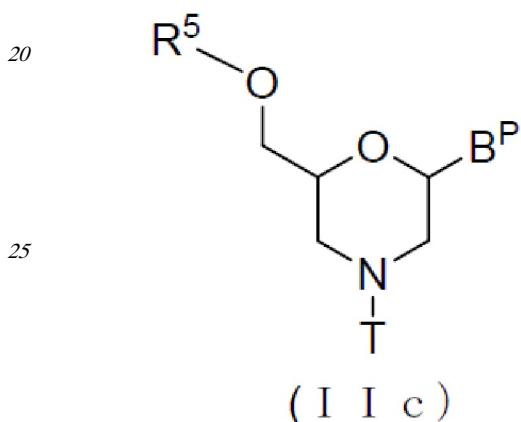


10

[где B^P , n' , R^2 , R^3 и T являются такими, как они были определены выше].

15 [0067] Аналогичным образом, соединение (II), в котором $n=1$, а L представляет собой ацил, то есть, соединение, представленное нижеследующей общей формулой (IIc), может быть получено из соединения (IIb) любым способом, известным как реакция ацилирования:

[Формула 17]



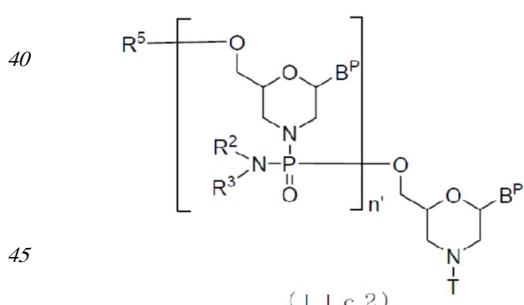
30

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

R^5 представляет собой ацил].

35 [0068] Соединение (II), в котором $n=2-99$, а L представляет собой ацил, то есть, соединение, представленное нижеследующей общей формулой (IIc2), может быть получено исходя из соединения (IIc) путем повторения нужного числа стадий А и В способа получения РМО, описанного в настоящей заявке:

[Формула 18]

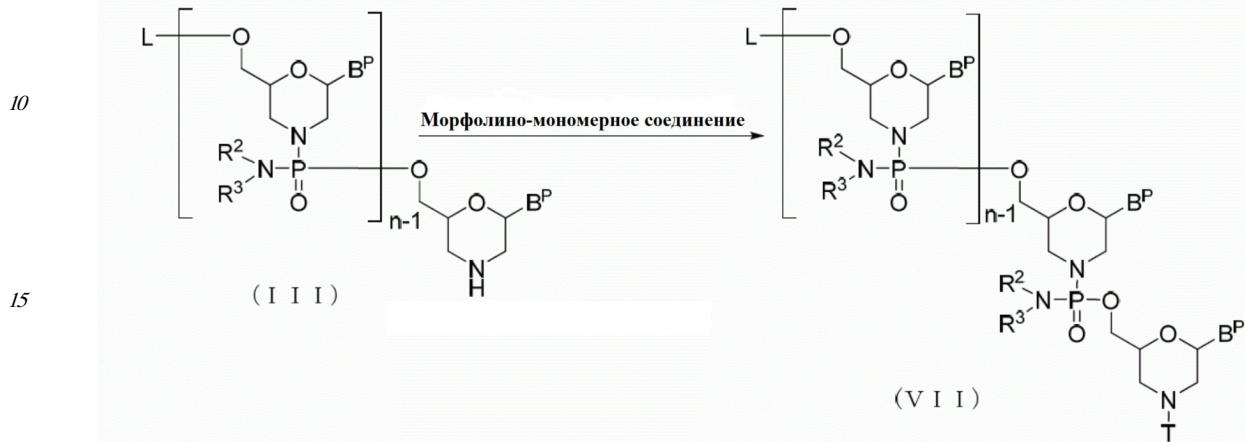


[где B^P , n' , R^2 , R^3 , R^5 и T являются такими, как они были определены выше].

[0069] (2) Стадия В:

В этой стадии, соединение (III) обрабатывают морфолино-мономерным соединением в присутствии основания с получением соединения, представленного ниже следующей общей формулой (VII) (далее называемого соединением (VII)):

[Формула 19]

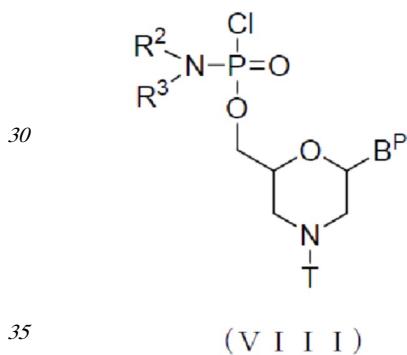


[где каждый из B^P , L , n , R^2 , R^3 и T является таким, как он был определен выше].

[0070] Эта стадия может быть осуществлена путем обработки соединения (III) морфолино-мономерным соединением в присутствии основания.

[0071] Такое морфолино-мономерное соединение может представлять собой соединение нижеследующей общей формулы (VIII):

[Формула 20]



[где B^P , R^2 , R^3 и T являются такими, как они были определены выше].

Примерами «основания», подходящего для использования в этой стадии, являются дизопропилэтамин, триэтиламин или N-этилморфолин. Количество используемого основания обычно составляет, например, в пределах от 1 молярного эквивалента до 1000 молярных эквивалентов, а предпочтительно в пределах от 10 молярных эквивалентов до 100 молярных эквивалентов на 1 моль соединения (III).

[0072] Такое морфолино-мономерное соединение и основание, подходящие для их 45 использования в этой стадии, могут быть разбавлены соответствующим растворителем до концентрации от 0,1% до 30%. Для этой цели может быть использован любой растворитель, при условии, что он будет инертным для этой реакции, и примерами таких растворителей являются N,N-диметилимидазолидинон, N-метилпиперидон, ДМФ, дихлорметан, ацетонитрил, тетрагидрофуран или их смеси.

[0073] Температура реакции составляет, например, предпочтительно, в пределах от 0°C до 100°C, а более предпочтительно, в пределах от 10°C до 50°C.

Время реакции варьируется в зависимости от типа используемого основания и/или температуры реакции, но обычно оно составляет в пределах от 1 минуты до 48 часов, а предпочтительно, в пределах от 30 минут до 24 часов.

[0074] Кроме того, после завершения этой стадии может быть добавлен, но необязательно, ацилирующий агент. Примерами «ацилирующего агента» являются ангидрид уксусной кислоты, ацетилхлорид и ангидрид феноксикусной кислоты. Такой ацилирующий агент может быть разбавлен соответствующим растворителем до концентрации, например, в пределах от 0,1% до 30%. Для этой цели может быть использован любой растворитель, при условии, что он будет инертным для этой реакции, и примерами таких растворителей являются дихлорметан, ацетонитрил, спирты (например, этанол, изопропанол, трифторметанол), вода или их смеси.

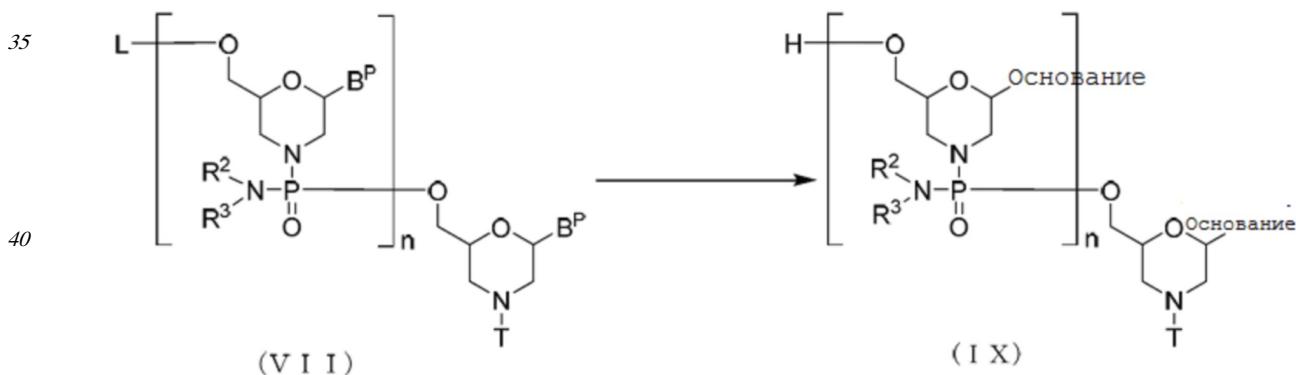
Если это необходимо, то вместе с ацилирующим агентом может быть использовано основание (например, пиридин, птицидин, коллидин, триэтиламин, диизопропилэтиламин, N-этилморфолин). Количество используемого ацилирующего агента предпочтительно составляет в пределах от 0,1 молярных эквивалентов до 10000 молярных эквивалентов, а более предпочтительно, в пределах от 1 молярного эквивалента до 1000 молярных эквивалентов. Количество используемого основания обычно составляет, например, в пределах от 0,1 молярных эквивалентов до 100 молярных эквивалентов, а предпочтительно в пределах от 1 молярного эквивалента до 10 молярных эквивалентов на 1 моль ацилирующего агента.

Температура этой реакции, предпочтительно, составляет в пределах от 10°C до 50°C, более предпочтительно, в пределах от 10°C до 50°C, еще более предпочтительно, в пределах от 20°C до 40°C, а наиболее предпочтительно, в пределах от 25°C до 35°C. Время реакции варьируется в зависимости от типа используемого ацилирующего агента и/или температуры реакции, но обычно оно составляет в пределах от 0,1 минуты до 24 часов, а предпочтительно, в пределах от 1 минуты до 5 часов.

[0075] (3) Стадия С:

В этой стадии используют агент для снятия защиты в целях удаления защитных групп из соединения (VII), полученного в стадии В, с получением соединения, представленного общей формулой (IX):

[Формула 21]



45 [где: основание, B^P, L, n, R², R³ и T являются такими, как они были определены выше].

[0076] Эта стадия может быть осуществлена путем обработки соединения (VII) агентом для снятия защиты.

[0077] Примерами «агента для снятия защиты» являются концентрированный водный

аммиак и метиламин. Такой «агент для снятия защиты», подходящий для его использования в этой стадии, может быть разбавлен водой, метанолом, этанолом, изопропиловым спиртом, ацетонитрилом, тетрагидрофураном, ДМФ, N,N-диметилимидазолидиноном, N-метилпиперидоном или их смесями. Из этих растворителей предпочтительным является этанол. Количество используемого агента для снятия защиты обычно составляет, например, в пределах от 1 молярного эквивалента до 100000 молярных эквивалентов, а предпочтительно в пределах от 10 молярных эквивалентов до 1000 молярных эквивалентов на 1 моль соединения (VII).

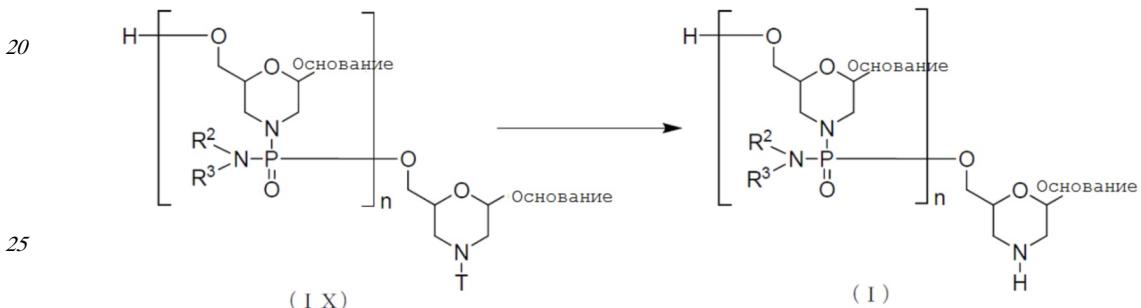
[0078] Температура реакции составляет, например, в пределах от 15°C до 75°C,

10 предпочтительно, в пределах от 40°C до 70°C, а более предпочтительно, в пределах от 50°C до 60°C. Время реакции снятия защиты варьируется в зависимости от типа используемого соединения (VII) и/или температуры реакции, но обычно оно составляет в пределах от 10 минут до 30 часов, предпочтительно, в пределах от 30 минут до 24 часов, а еще более предпочтительно, в пределах от 5 часов до 20 часов.

15 [0079] (4) Стадия D:

В этой стадии, соединение (IX), полученное в стадии С, обрабатывают кислотой с получением РМО (I):

[Формула 22]



³⁰ где: основание, n , R^2 , R^3 и T являются такими, как они были определены выше).

[0080] Эта стадия может быть осуществлена путем добавления кислоты к соединению (IX).

[0081] Примерами «кислоты», подходящей для ее использования в этой стадии, являются трихлоруксусная кислота, дихлоруксусная кислота, уксусная кислота, фосфорная кислота и соляная кислота и т.п. Что касается количества используемой кислоты, то желательно использовать кислоту в количестве, достаточном для доведения pH раствора, например, до 0,1-4,0, а более предпочтительно, до 1,0-3,0. В этой стадии может быть использован любой растворитель, при условии, что он будет инертным для этой реакции, и примерами таких растворителей являются ацетонитрил, вода или их смеси.

[0082] Температура реакции, предпочтительно, составляет в пределах от 10°C до 50°C, более предпочтительно, в пределах от 20°C до 40°C, а еще более предпочтительно, в пределах от 25°C до 35°C. Время реакции снятия защиты варьируется в зависимости от типа соединения (IX) и/или температуры реакции, но обычно оно составляет в пределах от 0,1 минуты до 5 часов, предпочтительно, в пределах от 1 минуты до 1 часа, а более предпочтительно, в пределах от 1 минуты до 30 минут.

[0083] РМО (I) может быть получен из реакционной смеси, выделенной в этой стадии, хорошо известными способами разделения и очистки, включая экстракцию,

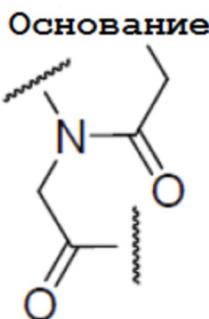
концентрирование, нейтрализацию, фильтрацию, центрифugирование, перекристаллизацию, обращенно-фазовую колоночную хроматографию на C₈-C₁₈, катионообменную колоночную хроматографию, анионообменную колоночную хроматографию, гель-фильтрационную колоночную хроматографию, 5 высокоэффективную жидкостную хроматографию, диализ, ультрафильтрацию и другие способы, которые могут быть применены отдельно или в комбинации, в результате чего может быть выделен и очищен целевой РМО (I) (см., например, WO1991/09033).

В случае использования обращенно-фазовой колоночной хроматографии для очистки РМО (I), в качестве элюирующего растворителя может быть использован, например, 10 смешанный раствор 20 мМ триэтиламина/ацетатоного буфера и ацетонитрила.

Аналогичным образом, в случае использования ионообменной хроматографии для очистки РМО (I) может быть использован, например, смешанный раствор 1 М водного хлорида натрия и 10 мМ водного гидроксида натрия.

15 [0084] Вышеописанным олигомером «пептид-нуклеиновая кислота» является олигомер согласно изобретению, в котором звено представляет собой группу нижеследующей общей формулы:

[Формула 23]



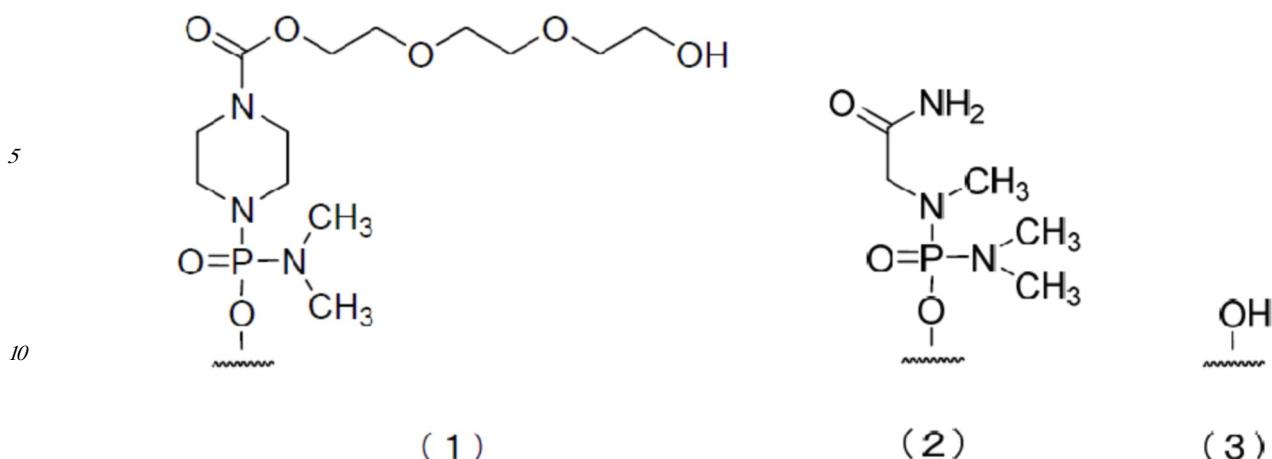
(где основание является таким, как оно было определено выше).

Пептид-нуклеиновые кислоты могут быть получены, например, как описано в документах, перечисленных ниже.

- 30 1) P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science*, 254, 1497 (1991)
 2) M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, *Jacs.*, 114, 1895 (1992)
 3) K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpius, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, *J. Org. Chem.*, 59, 5767 (1994)
 4) L. Christensen, R. Fitzpatrick, B. Gildea, K. H. Petersen, H. F. Hansen, T. Koch, M. Egholm,
 35 O. Buchardt, P. E. Nielsen, J. Coull, R. H. Berg, *J. Pept. Sci.*, 1, 175 (1995)
 5) T. Koch, H. F. Hansen, P. Andersen, T. Larsen, H. G. Batz, K. Otteson, H. Orum, *J. Pept. Res.*, 49, 80 (1997)

40 [0085] Кроме того, олигомер согласно изобретению может быть сконструирован так, чтобы у его 5'-конца присутствовали любые группы, представленные нижеследующими химическими формулами (1)-(3), причем предпочтительной группой (3) является -OH.

[Формула 24]



Группы, представленные вышеуказанными формулами (1), (2) и (3), далее будут называться «группой (1)», «группой (2)» и «группой (3)», соответственно.

[0086] 2. Фармацевтическая композиция

Олигомер согласно изобретению способствует исключению экзона 45 в гене дистрофина. Поэтому, предполагается, что симптомы мышечной дистрофии могут быть ослаблены при введении фармацевтической композиции, содержащей олигомер согласно изобретению, пациентам с МДД, имеющим мутацию, которая является мишенью для исключения экзона 45 (то есть, мутацию, которую превращают в открытую рамку считывания путем исключения экзона 45) в гене дистрофина у этих пациентов. Кроме того, поскольку олигомер согласно изобретению имеет небольшую длину цепи, то такой олигомер является предпочтительным, так как это упрощает стадии его получения, а также снижает стоимость проведения этих стадий.

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

[0087] Примерами фармацевтически приемлемой соли олигомера согласно изобретению, содержащегося в композиции согласно изобретению, являются соли щелочных металлов (например, соль натрия, соль калия, соль лития); соли щелочноземельных металлов (например, соль кальция, соль магния); соли металлов (например, соль алюминия, соль железа, соль цинка, соль меди, соль никеля, соль кобальта); соль аммония; соли органических аминов (например, соль трет-октиламина, соль дибензиламина, соль морфолина, соль глюкозамина, соль алкилового эфира фенилглицина, соль этилендиамина, соль N-метилглюкамина, соль гуанидина, соль диэтиламина, соль триэтиламина, соль дициклогексиламина, соль N,N'-дibenзилэтилендиамина, соль хлорпрокaina, соль прокaina, соль диэтаноламина, соль N-бензилфенетиламина, соль пиперазина, соль тетраметиламмония, соль трис (гидроксиметил)аминометана); соль галогенированных гидроксикислот (например, соль фтористоводородной кислоты, соль хлористоводородной кислоты, соль бромистоводородной кислоты, соль иодистоводородной кислоты); соли неорганических кислот (то есть, нитрат, перхлорат, сульфат, фосфат); соли низших алкансульфоновых кислот (например, метансульфонат, трифторметансульфонат, этансульфонат); соли арилсульфоновых кислот (например, бензолсульфонат, п-толуолсульфонат); соли органических кислот (например, ацетат, малат, фумарат, сукцинат, цитрат, тартрат,

оксалат, малеат); соли аминокислот (например, соль глицина, соль лизина, соль аргинина, соль орнитина, соль глутаминовой кислоты, соль аспарагиновой кислоты) и т.п. Эти соли могут быть получены любым известным способом. Альтернативно, олигомер согласно изобретению, содержащийся в композиции согласно изобретению, 5 может быть получен в форме гидрата.

[0088] Композиция согласно изобретению может быть введена в любой фармацевтически приемлемой форме, которая может быть выбрана в зависимости от применяемого метода терапии. Однако, для облегчения доставки в мышечную ткань, предпочтительными являются внутривенное введение, внутриартериальное введение, 10 внутримышечное введение, подкожное введение, пероральное введение, интерстициальное введение, чрескожное введение и т.п. Кроме того, композиция согласно изобретению может быть приготовлена в любой лекарственной форме, и примерами таких форм являются различные типы инъекций, пероральных препаратов, капель, ингаляторов, мазей, лосьонов и т.п.

[0089] В случае введения олигомера согласно изобретению пациентам с мышечной дистрофией, композиция согласно изобретению, предпочтительно, содержит носитель, 15 который стимулирует доставку олигомера в мышечную ткань. Такими носителями являются, но не ограничиваются ими, любые носители, при условии, что они являются фармацевтически приемлемыми, и примеры таких носителей включают катионные 20 носители (например, катионные липосомы, катионные полимеры) или носители на основе вирусной оболочки. Примерами катионных липосом являются липосомы, полученные из 2-О-(2-диэтиламиноэтил)карбамоил-1,3-О-диолеоглицерина и фосфолипида, как основных их компонентов (в дальнейшем, эта липосома будет называться «липосомой А»), Олиофектамин® (Invitrogen), Липофектин® (Invitrogen), 25 Липофектамин® (Invitrogen), Липофектамин 2000® (Invitrogen), DMRIE-C® (Invitrogen), GeneSilencer® (Gene Therapy Systems), TransMessenger® (QIAGEN), TransIT TKO® (Mirus) и Nucleofector II (Lonza). Из этих липосом, предпочтительной является липосома А. Примерами катионных полимеров являются JetSI® (Qbiogene) и Jet-PEI® (полиэтиленимин, Qbiogene). Примерами носителей на основе вирусной оболочки 30 являются GenomeOne® (липосомы HVJ-E, Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd., Japan). Альтернативно, может быть также использовано фармацевтическое устройство, описанное в патенте Японии No. 2924179, либо могут быть использованы катионные носители, описанные в JP WO2006/129594 и JP WO2008/096690.

[0090] Концентрация олигомера согласно изобретению, содержащегося в композиции 35 согласно изобретению, может варьироваться, например, в зависимости от типа носителя, но обычно она составляет в пределах от 0,1 нМ до 100 мкМ, предпочтительно, в пределах от 1 нМ до 10 мкМ, а более предпочтительно, в пределах от 10 нМ до 1 мкМ. Аналогичным образом, массовое отношение носителя к олигомеру согласно изобретению, содержащихся в композиции согласно изобретению (то есть, отношение 40 носитель/олигомер) может варьироваться, например, в зависимости от свойств олигомера и типа носителя, но обычно оно составляет в пределах от 0,1 до 100, предпочтительно, в пределах от 1 до 50, а более предпочтительно, в пределах от 10 до 20.

[0091] Композиция согласно изобретению, помимо олигомера согласно изобретению 45 и описанного выше носителя, может содержать, но необязательно, фармацевтически приемлемую добавку. Примерами таких добавок являются эмульгатор (например, жирная кислота, содержащая от 6 до 22 атомов углерода и ее фармацевтически приемлемая соль, альбумин, дексстран), стабилизатор (например, холестерин,

фосфатидиновая кислота), агент, придающий изотоничность (например, хлорид натрия, глюкоза, мальтоза, лактоза, сахароза, трегалоза) и агент, корректирующий pH (например, соляная кислота, серная кислота, фосфорная кислота, уксусная кислота, гидроксид натрия, гидроксид калия, триэтаноламин). Эти добавки могут быть

5 использованы отдельно или в комбинации. Содержание добавки(ок) в композиции согласно изобретению обычно составляет 90 масс.% или менее, предпочтительно, 70 масс.% или менее, а более предпочтительно, 50 масс.% или менее.

[0092] Композиция согласно изобретению может быть получена путем добавления олигомера согласно изобретению к дисперсии носителя с последующим адекватным 10 перемешиванием. Добавка(и) может (могут) быть добавлена(ы) в любой подходящей стадии, либо до, либо после добавления олигомера согласно изобретению. Для добавления олигомера согласно изобретению может быть использован любой водный растворитель, при условии, что он будет фармацевтически приемлемым, и примерами 15 таких растворителей являются вода для инъекций, дистиллированная вода для инъекций, растворы электролитов (например, физиологический раствор) и растворы сахаров (например, раствор глюкозы, раствор мальтозы). Кроме того, в этом случае, условия, включая pH и температуру, могут быть выбраны самим специалистом в данной области.

[0093] Композиция согласно изобретению может быть приготовлена, например, в виде раствора или лиофилизованного препарата. Такой лиофилизованный препарат 20 может быть получен стандартным способом путем лиофилизации композиции согласно изобретению в форме раствора. Так, например, композиция согласно изобретению в форме раствора может быть стерилизована, если это необходимо, а затем распределена в определенных количествах по сосудам с последующим предварительным замораживанием в условиях приблизительно при температуре от -40°C до -20°C в 25 течение приблизительно 2 часов, первичной сушкой приблизительно при 0°C-10°C при пониженном давлении и вторичной сушкой приблизительно при 15°C-25°C при пониженном давлении. Кроме того, в большинстве случаев, сосуды продувают газообразным азотом, а затем закрывают крышкой, в результате чего получают лиофилизованный препарат, содержащий композицию согласно изобретению.

[0094] Такой лиофилизованный препарат композиции согласно изобретению может 30 быть использован, в основном, после его разведения путем добавления любого соответствующего раствора (то есть, раствора для разведения). Примерами таких растворов для разведения являются вода для инъекции, физиологический раствор и другие обычно используемые растворы для вливания. Объем такого раствора для 35 разведения может варьироваться, например, в зависимости от цели его применения, и не имеет конкретных ограничений, но обычно, он в 0,5-2 раза превышает объем раствора до лиофилизации или составляет 500 мл или менее.

[0095] Дозу вводимой композиции согласно изобретению желательно скорректировать 40 в зависимости от типа олигомера согласно изобретению, содержащегося в этой композиции, от нужной лекарственной формы, от индивидуальных особенностей пациента, таких как возраст и масса тела, от способа введения и от природы и тяжести заболевания. Однако, суточная доза для взрослых обычно составляет в пределах от 0,1 мг до 10 г/человека, предпочтительно, в пределах от 1 мг до 1 г/человека, и такую дозу вычисляют как количество олигомера согласно изобретению. Этот численный 45 интервал может варьироваться в зависимости от типа заболевания, подвергаемого лечению, способа введения и/или типа молекулы-мишени. Таким образом, в некоторых случаях может оказаться достаточной доза, которая меньше нижней предельной дозы, входящей в этот интервал, или наоборот, в некоторых случаях может потребоваться

доза, которая превышает дозу верхнего предела данного интревала. Кроме того, композиция согласно изобретению может быть введена от 1 до нескольких раз в день или с интервалами в один или несколько дней.

[0096] В другом варианте осуществления изобретения, композицией согласно

- изобретению может быть фармацевтическая композиция, содержащая вектор, способный экспрессировать олигонуклеотид согласно изобретению, и носитель, описанный выше. Такой экспрессионный вектор может обладать способностью экспрессировать множество олигонуклеотидов согласно изобретению. Такая композиция может содержать, но необязательно, фармацевтически приемлемую добавку, как и в случае композиции согласно изобретению, содержащей олигомер согласно изобретению. Концентрация экспрессионного вектора, содержащегося в этой композиции, может варьироваться, например, в зависимости от типа носителя, но обычно она составляет в пределах от 0,1 нМ до 100 мкМ, предпочтительно, в пределах от 1 нМ до 10 мкМ, а более предпочтительно, в пределах от 10 нМ до 1 мкМ. Массовое отношение носителя к экспрессионному вектору, содержащемуся в композиции согласно изобретению (то есть, отношение носитель/экспрессионный вектор) может варьироваться, например, в зависимости от свойств экспрессионного вектора и типа носителя, но обычно оно составляет в пределах от 0,1 до 100, предпочтительно, в пределах от 1 до 50, а более предпочтительно, в пределах от 10 до 20. Кроме того, состав носителя, содержащегося в этой композиции, является таким же, как и в случае композиции согласно изобретению, содержащей олигомер согласно изобретению, и способы получения этой композиции являются такими же, как и в случае композиции согласно изобретению.

[0097] Настоящее изобретение более подробно описано на нижеследующих иллюстративных примерах и примерах испытаний, хотя настоящее изобретение не ограничивается этими примерами.

Примеры

[0098] [Сравнительный пример 1]

4-{[(2S,6R)-6-(4-бензамидо-2-оксопиримидин-1-ил)-4-тритилморфолин-2-ил]метокси}-4-оксобутановая кислота, загруженная на аминополистироловую смолу

- [0099] Стадия 1: Получение 4-{[(2S,6R)-6-(4-бензамидо-2-оксопиримидин-1(2H)-ил)-4-тритилморфолин-2-ил]метокси}-4-оксобутановой кислоты
В атмосфере аргона, N-{1-[(2R,6S)-6-(гидроксиметил)-4-тритилморфолин-2-ил]-2-оксо-1,2-дигидро-4-ил}бензамид (3,44 г) и 4-диметиламинопиридин (4-DMAP) суспендировали в дихлорметане (50 мл), а затем добавляли ангидрид янтарной кислоты (0,90 г) и перемешивали в течение 3 часов при комнатной температуре. Реакционный раствор смешивали с метанолом (10 мл) и концентрировали при пониженном давлении. Остаток экстрагировали этилацетатом и 0,5M водным дигидрофосфатом калия. Полученный органический слой последовательно промывали 0,5M водным дигидрофосфатом калия, водой и насыщенным водным хлоридом натрия. Полученный органический слой сушили над над сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении с получением 4,0 г целевого продукта.

[0100] Стадия 2: Получение 4-{[(2S,6R)-6-(4-бензамидо-2-оксопиримидин-1-ил)-4-тритилморфолин-2-ил]метокси}-4-оксобутановой кислоты, загруженной на аминополистироловую смолу

- 4-{[(2S,6R)-6-(4-бензамидо-2-оксопиримидин-1(2H)-ил)-4-тритилморфолин-2-ил]метокси}-4-оксобутановую кислоту (4,0 г) растворяли в пиридине (дегидратированном) (200 мл), а затем добавляли 4-DMAP (0,73 г) и гидрохлорид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодииамида (11,5 г). Затем к этой смеси добавляли

аминополистироловую смолу на амино-носителе Primer 200 (GE Healthcare Corporation Японии, 17-5214-97) (25,0 г) и триэтиламин (8,5 мл) и встряхивали при комнатной температуре в течение 4 дней. После завершения реакции, смолу собирали путем фильтрации. Полученную смолу последовательно промывали пиридином, метанолом и дихлорметаном, а затем сушили при пониженном давлении. К полученной смоле добавляли тетрагидрофуран (дегидратированный) (200 мл), ангидрид уксусной кислоты (15 мл), и 2,6-лутидин (15 мл), а затем встряхивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Смолу собирали путем фильтрации, последовательно промывали пиридином, метанолом и дихлорметаном, а затем сушили при пониженном давлении с получением 26,7 г целевого продукта.

[0101] Для определения количества загруженного целевого продукта, молярное количество тритила на 1 г смолы вычисляли известным способом как величину УФ-поглощения на 409 нм. Количество загруженного продукта на смоле составляло 129,2 мкмоль/г.

Условия измерения в УФ-диапазоне:

Прибор: U-2910 (Hitachi, Ltd., Japan)

Растворитель: метансульфоновая кислота

Длина волны: 409 нм

Величина ϵ : 45000

[0102] [Сравнительный пример 2]

4-{{(2S,6R)-6-(5-метил-2,4-диоксопиримидин-1-ил)-4-тритилморфолин-2-ил]метокси}-4-оксобутановая кислота, загруженная на аминополистироловую смолу}

Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как и в сравнительном примере 1, за исключением того, что в этой стадии, вместо N-{{1-[(2R,6S)-6-(гидроксиметил)-4-тритилморфолин-2-ил]-2-оксо-1,2-дигидропиримидин-4-ил}бензамида, используемого в стадии 1 Сравнительного примера 1, использовали 1-[(2R,6S)-6-(гидроксиметил)-4-тритилморфолин-2-ил]-5-метилпиримидин-2,4(1Н,3Н)-дион.

Для определения количества загруженного целевого продукта, молярное количество тритила на 1 г смолы вычисляли известным способом как величину УФ-поглощения на 409 нм. Количество загруженного продукта на смоле составляло 164,0 мкмоль/г.

[0103] [Сравнительный пример 3]

4-{{(2S,6R)-6-(6-бензамидопурин-9-ил)-4-тритилморфолин-2-ил]метокси}-4-оксобутановая кислота, загруженная на аминополистироловую смолу}

Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как и в

сравнительном примере 1, за исключением того, что в этой стадии, вместо N-{{1-[(2R,6S)-6-(гидроксиметил)-4-тритилморфолин-2-ил]-2-оксо-1,2-дигидропиримидин-4-ил}бензамида, используемого в стадии 1 Сравнительного примера 1, использовали N-{{9-[(2R,6S)-6-(гидроксиметил)-4-тритилморфолин-2-ил]пурин-6-ил}бензамид.

Для определения количества загруженного целевого продукта, молярное количество тритила на 1 г смолы вычисляли известным способом как величину УФ-поглощения на 409 нм. Количество загруженного продукта на смоле составляло 185,7 мкмоль/г.

[0104] [Сравнительный пример 4]

4-{{(2S,6R)-6-{6-(2-цианоэтокси)-2-[(2-феноксиацетил)амино]пурин-9-ил}-4-тритилморфолин-2-ил}метокси}-4-оксобутановая кислота, загруженная на аминополистироловую смолу}

Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как и в сравнительном примере 1, за исключением того, что в этой стадии, вместо N-{{1-[(2R,6S)-6-(гидроксиметил)-4-тритилморфолин-2-ил]-2-оксо-1,2-дигидропиримидин-4-ил}}

бензамида, используемого в стадии 1 Сравнительного примера 1, использовали N-{6-(2-цианоэтокси)-9-[(2R,6S)-6-(гидроксиметил)-4-тритил-морфолин-2-ил]пурин-2-ил}-2-феноксиацетамид.

Для определения количества загруженного целевого продукта, молярное количество тритила на 1 г смолы вычисляли известным способом как величину УФ-поглощения на 409 нм. Количество загруженного продукта на смоле составляло 164,8 мкмоль/г.

[0105] В соответствии с описанием, представленным ниже в примере 1, были синтезированы РМО, имеющие нуклеотидные последовательности РМО NN. 1-81, указанные в Таблице 1 (где каждый R² и R³ представляет собой метил, и 5'-концом 10 является группа (3)). Каждый из синтезированных таким образом РМО растворяли в воде для инъекций (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., Japan).

[0106] [Таблица 1-1]

PMO No.	Нуклеотидная последовательность	Название последовательности	SEQ ID NO:
15	TTGCCGCTGCCAACATCCTGGAGTTTC	H45_1-13_18-30	14
	GTTTGCCGCTGCCTCCTGGAGTTCC	H45_-2-11_20-32	7
	GCCGCTGCCAACATCCTGGAGTTCC	H45_-2-13_18-28	15
	CCGCTGCCAACATGCCTGGAGTTCC	H45_-2-11_15-27	16
	TTGCCGCTGCCAACATCCTGGAGTTCC	H45_-2-11_18-30	17
	TTGCCGCTGCCAACATCCTGGAGTTCC	H45_-2-13_21-31	18
20	TTGCCGCTGCCAACATCCTGGAGTTCC	H45_-1-11_20-31	19
	TGCCGCTGCCAACATCCTGGAGTTCC	H45_1-15_19-29	20
	GTTTGCCGCTGCCAACATCCTGGAGTTCC	H45_-2-10_21-32	8
	CAGTTTGCCGCTGCCAACATCCTGGAGTTCC	H45_-2-13_20-34	9
	CAGTTTGCCGCTGCCAACATCCTGGAGTTCC	H45_-2-8_19-34	10
	GTTTGCCGCTGCCAACATCCTGGAGTTCC	H45_1-12_20-32	21
25	CAGTTTGCCGCTGCCAACATCCTGGAGTTCC	H45_-2-8_21-34	22
	ACAGTTGCCGCTCTGGAGTTCC	H45_-2-9_23-35	23
	CAGTTTGCCGCTGCCAACATCCTGGAGTTCC	H45_-2-7_20-34	24
	GTTTGCCGCTGCCAACATCCTGGAGTTCC	H45_-1-8_19-32	25
	CAGTTTGCCGCTGCCAACATCCTGGAGTTCC	H45_-3-7_20-34	26
	CCGCTGCCAACATGCCTGGAGTTCC	H45_-4-8_15-27	27
30	CAGTTTGCCGCTGCCAACATCCTGGAGTTCC	H45_1-8_19-34	28
	CCGCTGCCAACATCCTGGAGTTCC	H45_-2-9_16-27	29
	CAGTTTGCCGCTGCCAACATCCTGGAGTTCC	H45_-1-8_19-34	30
	TTGCCGCTGCCAACATCCTGGAGTTCC	H45_-2-9_18-30	31
	TTGCCGCTGCCAACATCCTGGAGTTCC	H45_-4-9_18-30	32
	ACAGTTGCCGCTGCCAACATCCTGGAGTTCC	H45_-1-10_25-35	33
35	GTTTGCCGCTGC	H45_21-32	34
	CCTGGAGTTCC	H45_-2-10	35
	TGGAGTTCC	H45_-2-8	36
	CAGTTGCCGCTGCC	H45_19-34	37
	TCTTCCCCAGTTGCCAACATCCTGGAGTT	H45_2-14_53-65	38
	AGACCTCCTGCCAACATCCTGGAGTT	H45_2-14_136-148	39
40	TTCTTCCCCAGTTGCCAACATCCTGGAGTT	H45_1-15_52-66	11
	CAGACCTCCTGCCAACATCCTGGAGTT	H45_1-15_135-149	12
	GACCTCCTGCCAACATCCTGGAGTT	H45_1-14_136-147	40

[0107] [Таблица 1-2]

34	TCCCCAGTTGCCAACATCCTGGAGTT	H45_1-15_52-62	41
35	GACCTCCTGCCAACATCCTGGAGTT	H45_1-15_137-147	42
36	CTTCCCCAGTTGCCAACATCCTGGAGTT	H45_1-14_53-64	43
37	TTCCCCAGTTGCCAACATCCTGGAGTT	H45_1-13_51-63	44
38	CCTCCTGCCAACATCCTGGAGTT	H45_1-13_133-145	45

39	ACCTCCTGCCACCCATCCTGGAGTT	H45_1-13_134-146	46
40	TTCTTCCCCAGTCATCCTGGAGTT	H45_1-13_55-67	47
41	GCAGACCTCCTGCCATCCTGGAGTT	H45_1-13_138-150	48
42	TTCTTCCCCAGTGCCATCCTGGAGTT	H45_1-13_52-66	49
43	CCCCAGTTGCATCTGGAGTTCT	H45_-2-9_50-61	50
44	TTCTTCCCCAGTGCCATCCTGGAGTT	H45_-1-10_52-66	51
45	CTTCCCCAGTGCCATCCTGGAGTT	H45_-2-13_52-64	52
46	CAGACCTCCTGCCACTCCTGGAGTT	H45_1-11_135-149	53
47	TGCAGACCTCCTGCCTCCTGGAGTT	H45_1-11_137-151	54
48	CTGTTGCAGACCCATCCTGGAGTT	H45_1-13_144-156	55
49	TTTGCAGACCTCCTGGAGTTCTGT	H45_-5-8_141-153	56
50	CCTGCCACCGCAGATGCCATCCTGGAGTT	H45_1-15_128-142	57
51	ACCTCCTGCCACCGCTTGCCGCTGCCAAT	H45_16-30_132-146	58
52	TCCTGTAGAATACCATCCTGGAGTT	H45_1-13_98-110	59
53	CTCCTGCCACCGCTGGCATCTGTTT	H45_85-97_132-144	60
54	ACCTCCTGCCACCGCTCTTCCCAGTTGCA	H45_51-65_132-146	61
55	TGGCATCTGTTTCATCCTGGAGTT	H45_1-13_85-97	62
56	TTATTTCTTCCCAGTTCTGTAGA	H45_-8-5_58-70	63
57	GCTTCCCAATGCCATCCTGGAGTT	H45_-1-15_114-123	64
58	GGCTTCCCAATGCCATCCTGGAGTT	H45_1-15_114-124	65
59	TTCTGTCTGACAGCTCCTGCCACCGCAGA	H45_129-143_156-170	66
60	TCCTGCCACCGCAGAGAGGATTGCTGAATT	H45_69-83_129-143	67
61	TCCTGCCACCGCAGACTGGCATCTGTTT	H45_84-98_129-143	68
62	TCCTGCCACCGCAGATTTCTGTAGAATA	H45_99-113_129-143	69
63	GCCATCCTGGAGTT	H45_1-15	70
64	TTCTCCCCAGTTGC	H45_52-66	71
65	CAGACCTCCTGCCAC	H45_135-149	72
66	TCCTGGAGTTCT	H45_-2-11	73
67	GTTGCCGCTGCC	H45_20-32	74
68	CTCCTGCCACCGCGCCGCTGCCAAT	H45_16-28_132-144	75

[0108] [Таблица 1-3]

69	ATTCAGGCTTCCCTTCCCCAGTTGCA	H45_51-63_117-129	76
70	TGGAGTTCC	H45_-1-8	77
71	TGGAGTT	H45_1-8	78
72	CAGTTTGGCGCTGGAGTTCC	H45_-1-10_25-34	79
73	ACAGTTTGGCGCTGGAGTTCC	H45_-2-9_25-35	80
74	GTTTGGCGCTGCCTGGAGTTCC	H45_-1-8_20-32	81
75	AACAGTTTGGCCCTGGAGTTCC	H45_-1-10_26-36	82
76	CAGTTTGGCGCTGGAGTTCC	H45_1-10_25-34	83
77	CAGTTTGGCGCTCCTGGAGTTCC	H45_1-11_24-34	84
78	AGTTTGGCGCTCCTGGAGTTCC	H45_1-11_24-33	85
79	ACAGTTTGGCGCTGGAGTTCC	H45_-1-9_25-35	86
80	TGCCGCTGCCCATCCTGGAGTTCC	H45_-1-11_18-29	87
81	CTGCCACCGCAGCCGCTGCCAATGC	H45_14-27_130-141	88
82	CCTGGAGTTCC	H45_-1-10	144
83	CAGTTTGGCG	H45_25-34	145
84	ACAGTTTGGCG	H45_25-35	146

[0109] [Пример 1]

4-{[(2S,6R)-6-(4-бензамидо-2-оксопиrimидин-1(2H)-ил)-4-тритилморфолин-2-ил]

45 метокси}-4-оксобутановую кислоту, загруженную на аминополистироловую смолу (Сравнительный пример 1), или 4-{[(2S,6R)-6-(5-метил-2,4-диоксопиrimидин-1-ил)-4-тритилморфолин-2-ил]метокси}-4-оксобутановую кислоту, загруженную на аминополистироловую смолу (Сравнительный пример 2), или 4-{[(2S,6R)-6-(6-

бензамидопурин-9-ил)-4-тритилморфолин-2-ил]метокси}-4-оксобутановую кислоту, загруженную на аминополистироловую смолу (сравнительный пример 3), или 4-{ { (2S,6R)-6-{6-(2-цианоэтокси)-2-[2-феноксиацетил]амино}пурина-9-ил}-4-тритилморфолин-2-ил}метокси}-4-оксобутановую кислоту, загруженную на аминополистироловую смолу (сравнительный пример 4), каждая из которых соответствует 5'-концевому основанию, загружали в количестве 0,2 г в колонку, снабженную фильтром для инициации последующих циклов синтеза с использованием синтезатора нуклеиновых кислот (АКТА Oligopilot 10 plus). Для получения нуклеотидной последовательности каждого соединения, указанного в таблице 1, нужное морфолино-мономерное соединение добавляли в каждом 10 цикле реакции сочетания (см. таблицу 2, представленную ниже).

[0110] [Таблица 2]

Стадия	Реагент	Объем (мл)	Время (мин)
1	Раствор для снятия защиты	18-32	1,8-3,2
2	Нейтрализующий/промывочный раствор	30	1,5
3	Раствор для реакции сочетания В	5	0,5
4	Раствор для реакции сочетания А	1,3	0,25
5	Реакция сочетания с реагентами, загруженными на стадиях 3 и 4		120-300
6	Ацетонитрил	20	1,0
7	Раствор для кэпирования	9	2,0
8	Ацетонитрил	30	2,0

(Примечание) Стадии 1, 2, 7 и 8 повторяли после последнего цикла только в случае 3'-концевого ацетилирования.

[0111] Следует отметить, что используемым раствором для снятия защиты является раствор дихлорметана, содержащий 3% (масс./об.) трифтормукусную кислоту.

Используемый нейтрализующий/промывочный раствор получали путем растворения N,N-дизопропилэтиламина в концентрации 10% (об./об.) и тетрагидрофурана в концентрации 5% (об./об.) в растворе дихлорметана, содержащем 35% (об./об.) ацетонитрил. Используемый раствор для реакции сочетания А получали путем растворения морфолино-мономерного соединения в концентрации 0,10 М в тетрагидрофуране. Используемый раствор для реакции сочетания В получали путем растворения N,N-дизопропилэтиламина в концентрации 20% (об./об.) и тетрагидрофурана в концентрации 10% (об./об.) в ацетонитриле. Используемый раствор для кэпирования получали путем растворения ангидрида уксусной кислоты в концентрации 20% (об./об.) и 2,6-лутидина в концентрации 30% (об./об.) в ацетонитриле.

[0112] Аминополистироловую смолу, нагруженную РМО, синтезированным как описано выше, собирали из реакционного сосуда и сушили при комнатной температуре в течение 2 часов или более при пониженном давлении. Осущенный РМО, загруженный на аминополистироловую смолу, вводили в реакционный сосуд и добавляли 5 мл 28% водного аммиака-этанола (1/4), а затем перемешивали при 55°C в течение 15 часов.

Аминополистироловую смолу разделяли путем фильтрации и промывали 1 мл воды-этанола (1/4). Полученный фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток растворяли в 10 мл смешанного растворителя, содержащего 20 mM буфера, состоящего из уксусной кислоты и триэтиламина (буфера TEAA), и ацетонитрил (4/1), а затем фильтровали через мембранный фильтр. Полученный фильтрат очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Используемые условия приводятся ниже в таблице 3.

[0113] [Таблица 3]

Колонка	XBridge 5 мкм C18 (Waters, φ19 × 50 мм, 1 CV=14 мл)
Скорость потока	10 мл/минуту
Температура колонки	Комнатная температура
Раствор А	20 мМ буфера TEAA
Раствор В	CH ₃ CN
Градиент	(B) конц. 10% ® 70%/15 CV

CV: колоночный объем

[0114] Каждую фракцию анализировали для сбора целевого продукта, который затем концентрировали при пониженном давлении. Концентрированный остаток разбавляли 2М водной фосфорной кислотой (0,5 мл) и перемешивали в течение 15 минут. Затем, остаток подщелачивали 2 М водным гидроксидом натрия (2 мл) и фильтровали через мембранный фильтр (0,45 мкм).

Полученный водный раствор, содержащий целевой продукт, очищали на колонке с анионообменной смолой. Используемые условия приводятся ниже в таблице 4.

[0115] [Таблица 4]

Колонка	Source 15Q (GE Healthcare, φ10 × 108 мм, 1 CV=8,5 мл)
Скорость потока	8,5 мл/минуту
Температура колонки	Комнатная температура
Раствор А	10 мМ водного гидроксида натрия
Раствор В	10 мМ водного гидроксида натрия, 1 М водного хлорида натрия
Градиент	(B) конц. 1% ® 50%/40 CV

[0116] Каждую фракцию анализировали (с помощью ВЭЖХ) с получением целевого продукта в виде водного раствора. Полученный водный раствор нейтрализовали 0,1 М фосфатного буфера (рН 6,0), а затем обессоливали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ в условиях, приведенных ниже в Таблице 5.

[0117] [Таблица 5]

Колонка	XBridge 5 мкм C8 (Waters, φ10 × 50 мм, 1 CV=4 мл)
Скорость потока	4 мл/минуту
Температура колонки	60°С
Раствор А	вода
Раствор В	CH ₃ CN
Градиент	(B) конц. 0% ® 50%/20 CV

[0118] Целевой продукт собирали и концентрировали при пониженном давлении.

[0119] Полученный остаток растворяли в воде и лиофилизовали с получением целевого соединения в виде белого хлопьевидного твердого вещества. Вычисленные и измеренные величины ESI-TOF-MS указаны в Таблице 6.

[0119] [Таблица 6-1]

PMO No.	Нуклеотидная последовательность	Вычисленная величина	Измеренная величина
1	TTGCCGCTGCCACATCCTGGAGTTTC	8520,95	8520,65
2	GTTTGGCGCTGCCCTGGAGTTCCCT	8542,94	8542,57
3	GCCGCTGCCACATCCTGGAGTTCCCT	8505,95	8506,57
4	CCGCTGCCCAATGTCCTGGAGTTCCCT	8520,95	8521,37
5	TTGCCGCTGCCCATCCTGGAGTTCCCT	8511,94	8511,70
6	TTTGGCGCTGCCATCCTGGAGTTCCCT	8526,94	8527,07
7	TTTGGCGCTGCCCTGGAGTTCC	7857,71	7857,32
8	TGCCGCTGCCGCCATCCTGGAGTTCC	8521,95	8521,98
9	GTTTGGCGCTGCCCTGGAGTTCCCT	7897,72	7897,71
10	CAGTTTGGCGCTGCCCATCCTGGAGTTCCCT	9851,40	9851,60

11	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCCCT	8551,95	8551,80
12	GTTCGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCC	8236,84	8236,69
13	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCCCT	7921,73	7921,91
14	ACAGTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCCCT	7905,73	7905,53
15	CAGTTTGCCGCTGCCGGAGTTCCCT	7906,73	7906,65
16	GTTCGCCGCTGCCCTGGAGTTCC	7567,61	7567,35
17	CAGTTTGCCGCTGCCGGAGTTCC	8261,85	8261,67
18	CCGCTGCCAATGTGGAGTTCC	8245,85	8245,68
19	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCC	7906,73	7906,70
20	CCGCTGCCAATCTGGAGTTCC	7520,61	7520,60
21	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCC	8221,84	8221,48
22	TTGCCGCTGCCACTGGAGTTCC	7866,72	7866,77
23	TTGCCGCTGCCACTGGAGTTCC	8551,95	8552,23
24	ACAGTTGCCGCCCTGGAGTTCC	7245,51	7245,48
25	GTTCGCCGCTGC	3912,36	3912,16
26	CCTGGAGTTCC	3896,36	3896,12
27	TGGAGTTCC	3266,14	3265,99
28	CAGTTTGCCGCTGCC	5196,81	5196,30
29	TCTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTT	8510,93	8511,8
30	AGACCTCCTGCCACCACCTGGAGTT	8513,95	8513,72
31	TTCTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTT	9826,39	9826,15
32	CAGACCTCCTGCCACGCCATCCTGGAGTT	9814,41	9813,82
33	GACCTCCTGCCACCACCTGGAGTT	8489,95	8490,01

[0120] [Таблица 6-2]

34	TCCCCAGTTGCCCATCCTGGAGTT	8520,95	8520,97
35	GACCTCCTGCCGCCATCCTGGAGTT	8505,95	8506,48
36	CTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTT	8495,94	8495,43
37	TTCCCCAGTTGCACATCCTGGAGTT	8519,95	8520,35
38	CCTCCTGCCACCGCATTGGAGTT	8465,94	8466,23
39	ACCTCCTGCCACCCATCCTGGAGTT	8449,94	8449,88
40	TTTCTTCCCCAGTCATCCTGGAGTT	8485,93	8486,01
41	GCAGACCTCCTGCCATCCTGGAGTT	8529,96	8529,54
42	TTCTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTT	9156,16	9156,62
43	CCCCAGTTGCATCTGGAGTTCC	7535,61	7535,92
44	TTCTTCCCCAGTTGCCCTGGAGTTCC	8486,93	8486,27
45	CTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTTCC	9141,16	9141,18
46	CAGACCTCCTGCCACTCCTGGAGTT	8489,95	8489,65
47	TGCAGACCTCCTGCCCTGGAGTT	8520,95	8520,58
48	CTGTTTGCAGACCCATCCTGGAGTT	8559,96	8560,66
49	TTTGAGACCTCCTGGAGTTCTGTA	8574,96	8574,85
50	CCTGCCACCGCAGATGCCATCCTGGAGTT	9854,42	9854,07
51	ACCTCCTGCCACCGCTTGGCCTGCCAAT	9750,39	9750,67
52	TCCTGTAGAATACCATCCTGGAGTT	8567,97	8567,11
53	CTCCTGCCACCGCTGGCATCTGTTT	8486,93	8486,39
54	ACCTCCTGCCACCGCTTCCCCAGTTGCA	9725,38	9725,57
55	TGGCATCTGTTTCACTCCTGGAGTT	8580,95	8580,81
56	TTATTTCTTCCCCAGTCCTGTAGAAGA	8508,94	8508,7
57	GCTTCCCAATGCCATCCTGGAGTTCC	8504,95	8504,88
58	GGCTTCCCAATGCCATCCTGGAGTTCC	8544,96	8544,72
59	TTTCTGTCTGACAGCTCCTGCCACCGCAGA	9844,41	9844,1
60	TCCTGCCACCGCAGAGAGGATTGCTGAATT	9957,45	9957,8
61	TCCTGCCACCGCAGACTGGCATCTGTTTT	9850,4	9850,45
62	TCCTGCCACCGCAGATTTCCTGTAGAATA	9867,42	9867,85
63	GCCATCCTGGAGTTCC	4905,71	4905,02
64	TTCTTCCCCAGTTGC	4831,68	4831,14

65	CAGACCTCCTGCCAC	4819,7	4819,64
66	TCCTGGAGTTCCCT	4226,47	4226,03
67	GTTCGCCGCTGCC	4227,47	4227,48
68	CTCCTGCCACCGCGCCGCTGCCAAT	8435,93	8436,58

5 [0121] [Таблица 6-3]

69	ATTCAGGCTTCCCTTCCCCAGTTGCA	8479,93	8479,03
70	TGGAGTTCC	2936,03	2936,07
71	TGGAGTTTC	2620,92	2620,97
72	CAGTTGCCGCTGGAGTTCC	6906,39	6906,44
73	ACAGTTGCCGCTGGAGTTCC	7260,51	7260,67
74	GTTCGCCGCTGCCCTGGAGTTCC	7252,5	7252,48
75	AACAGTTGCCCTGGAGTTCC	7229,51	7229,07
76	CAGTTGCCGCTGGAGTTTC	6591,28	6591,07
77	CAGTTGCCGCTCTGGAGTTTC	7236,5	7236,76
78	AGTTTGCCGCTCTGGAGTTTC	6921,39	6921,06
79	ACAGTTGCCGCTGGAGTTCC	6930,4	6930,42
80	TGCCGCTGCCCATCCTGGAGTTCC	7851,72	7852,1
81	CTGCCACCGCAGCCGCTGCCAATGC	8484,96	8484,68
82	CCTGGAGTTCC	3566,25	3566,51
83	CAGTTGCCG	3251,14	3251,19
84	ACAGTTGCCG	3590,26	3590,04

20 [0122] [Пример испытаний 1]

In vitro анализ

В $3,5 \times 10^5$ клеток RD (человеческой клеточной линии рабдомиосаркомы) вводили антисмыловые олигомеры, представленные в Таблице 1 в концентрации 1-10 мкМ 25 посредством Nucleofector II (Lonza) с использованием набора Amaxa Cell Line Nucleofector L. Для этого использовали программу T-030.

После трансфекции, клетки культивировали в течение трех ночей при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в 2 мл минимальной поддерживающей среды Игла (EMEM) (SIGMA; это обозначение используется и далее), содержащей 10% фетальную бычью сыворотку 30 (FBS) (Invitrogen).

После этого, клетки один раз промывали PBS (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Japan; это обозначение используется и далее), а затем к клеткам добавляли 350 мкл буфера RLT (QIAGEN), содержащего 1% 2-меркаптоэтанол (Nacalai Tesque, Inc., Japan), и клетки подвергали лизису путем их выдерживания при комнатной температуре в течение 35 нескольких минут. Клеточный лизат собирали в гомогенизатор QIAshredder (QIAGEN) и центрифугировали при 15000 оборотов/минуту в течение 2 минут с получением гомогената. Общую РНК экстрагировали в соответствии с протоколом, прилагаемым к мини набору RNeasy (QIAGEN). Концентрацию общей экстрагированной РНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (LMS Co., Ltd., Japan).

40 [0123] Одностадийную ОТ-ПЦР проводили на 400 нг экстрагированной общей РНК с использованием набора для одностадийной ОТ-ПЦР QIAGEN OneStep (QIAGEN). Реакционный раствор получали в соответствии с протоколом, прилагаемым к набору. Для этого использовали термоячейку PTC-100 (MJ Research) или термоячейку для ПЦР TaKaRa Thermal Cycler Dice Touch (Takara Bio Inc., Japan). Программа, используемая для ОТ-ПЦР, указана ниже.

50°C в течение 30 минут: реакция обратной транскрипции

95°C в течение 15 минут: активация полимеразой, инактивация обратной транскриптазой, термоденатурация кДНК

[94°C в течение 30 секунд; 60°C в течение 30 секунд; 72°C в течение 1 минуты] × 35 циклов: ПЦР-амплификация

72°C в течение 10 минут: конечная реакция удлинения.

5 [0124] Ниже представлены нуклеотидные последовательности прямого и обратного праймеров, используемых для ОТ-ПЦР.

Прямой праймер: 5'-GCTCAGGTCGGATTGACATT-3' (SEQ ID NO: 1)

Обратный праймер: 5'-GGGCAACTCTTCCACCAGTA-3' (SEQ ID NO: 2)

10 [0125] Вышеописанный продукт ПЦР-реакции (1 мкл) анализировали с использованием биоанализатора (Agilent) и системы MultiNA (Shimadzu Corporation, Japan).

Был определен уровень полинуклеотида «А» в полосе с исключением экзона 45 и уровень полинуклеотида «В» в полосе без исключения экзона 45. Исходя из этих измеренных величин «А» и «В», эффективность исключения была определена по следующему уравнению:

15 Эффективность исключения (%) = A/(A+B) × 100

[0126] Результаты эксперимента

Полученные результаты представлены на фигурах 1-5, 8, 10, 11 и 16-24. Этот эксперимент показал, что олигомер согласно изобретению способствует эффективному исключению экзона 45.

20 [0127] [Пример испытания 2]

In vitro анализ

Для проведения этого эксперимента повторяли процедуры, описанные в Примере испытания 1, за исключением того, что $3,5 \times 10^5$ клеток RD (человеческой клеточной линии рабдомиосаркомы) трансфектировали олигомером согласно изобретению (PMO No. 11 или PMO No. 9), взятым отдельно, или либо олигомерами из двух звеньев, состоящих из олигомера согласно изобретению, либо их смесью в концентрации 3 мкМ посредством Nucleofector II (Lonza) с использованием набора Amaxa Cell Line Nucleofector Kit L. Для этого использовали программу T-030. Комбинации трансфектированных последовательностей представлены ниже.

30 [0128] [Таблица 7]

Комбинации трансфектированных последовательностей

Комбинация последовательностей	Концентрация для трансфекции (мкМ)
PMO No. 11 (PMO No. 27 и PMO No. 28, связанные друг с другом)	3 мкМ
PMO No. 27	3 мкМ
PMO No. 28	3 мкМ
PMO No. 27 и PMO No. 28	Каждый 3 мкМ
PMO No. 9 (PMO No. 25 и PMO No. 26, связанные друг с другом)	3 мкМ
PMO No. 25	3 мкМ
PMO No. 26	3 мкМ
PMO No. 25 и PMO No. 26	Каждый 3 мкМ
PMO No. 72 (PMO No. 82 и PMO No. 83, связанные друг с другом)	3 мкМ
PMO No. 82	3 мкМ
PMO No. 83	3 мкМ
PMO No. 82 и PMO No. 83	Каждый 3 мкМ

[0129] Результаты эксперимента

Полученные результаты представлены на фигурах 6 и 25. Этот эксперимент показал, что олигомеры согласно изобретению, то есть, PMO No. 11 (SEQ ID NO: 10), PMO No.

9 (SEQ ID NO: 8) или PMO No. 72 (SEQ ID NO: 79), каждый из которых состоит из двух связанных антисмыловых олигомеров, нацеленных на различные сайты в экзоне 45, способствуют исключению экзона 45 с более высокой эффективностью, чем соответствующие антисмыловые олигомеры, содержащие каждый олигомер по 5 отдельности (то есть, PMO No. 27 (SEQ ID NO: 36), PMO No. 28 (SEQ ID NO: 37), PMO No. 25 (SEQ ID NO: 34), PMO No. 26 (SEQ ID NO: 35), PMO No. 82 (SEQ ID NO: 144) или PMO No. 83 (SEQ ID NO: 145)) или их смесь (то есть, PMO No. 27 и PMO No. 28, PMO No. 25 и PMO No. 26 или PMO No. 82 и PMO No. 83).

[0130] [Пример испытания 3]

10 In vitro анализ

Этот эксперимент проводили с использованием антисмыловых олигомеров в 2'-О-метокси-фосфориоатной форме (2'-OMe-S-PHK), представленной в SEQ ID NN: 89-141, 11 и 12. Эти различные антисмыловые олигомеры, используемые для анализа, были закуплены у Japan Bio Services Co., Ltd. Последовательности этих различных 15 антисмыловых олигомеров представлены ниже.

[0131] [Таблица 8-1]

Название последовательности	Нуклеотидная последовательность	SEQ ID NO:
H45_1-15_48-62	UCCCCAGUUGCAUCGCCAUCCUGGAGUUC	89
20 H45_1-15_56-70	UUAUUCUUCUCCCCAGGCCAUCCUGGAGUUC	90
	CCUCUGCCACCGCAGCCAUCUCCUGGAGUUC	91
	CCUCUGCCACCGCACAUCCUGGAGUUCU	92
	CAGACCUCCUGCCACCAUCUCCUGGAGUUCU	93
	UCCCCAGUUGCAUCCAUCUCCUGGAGUUCU	94
	UUCUUCUCCCCAGUUGCCAUCCUGGAGUUCU	95
25 H45_-2-13_56-70	UUAUUCUUCUCCCCAGCAUCUCCUGGAGUUCU	96
	GUUUGCCGCUGCCCCACAUCUCCUGGAGUUCU	97
	UUUGCAGACCUCUCUGCAUCCUGGAGUUCU	98
	GACCUCCUGCCACAUUGCCAUCUCCUGGAGUUC	99
	CUUCCCCAGUUGCAUGCCAUCUCCUGGAGUUC	100
	UUUGCAGACCUCUCUGGCCAUCCUGGAGUUC	101
30 H45_-2-13_99-113	UUUUCUGUAGAAUACAUCCUGGAGUUCU	102
	ACCUCCUGCCACCGCUUUCUUCUCCCCAGUUG	103
	UUUUCCUGUAGAAUACAUCCUGGAGUUCU	104
	CUGUCUGACAGCUGUGCCAUCCUGGAGUUC	105
	GGAUUGCUGAAUUAUGCCAUCUCCUGGAGUUC	106
	UUUUCUGUAGAAUAGCCAUCUCCUGGAGUUC	107
35 H45_1-13_46-58	CAGUUGCAUUAACAUCUCCUGGAGUUC	108
	UUCUUCUCCCCAGUUCAUCCUGGAGUUC	109
	UGAAUUAUUUCUCAUCUCCUGGAGUUC	110
	CAGUUGCAUUAACAUCCUGGAGUUC	111
	UUCUUCUCCCCAGUUAUGCCAUCUCCUGG	112
	UGAAUUAUUUCUUAUGCCAUCUCCUGG	113
40 H45_1-13_121-133	GCAGAUUCAGGCUCAUCCUGGAGUUC	114
	CUGCCACCGCAGACAUCCUGGAGUUC	115
	CAGACCUCCUGCCCAUCUCCUGGAGUUC	116
	GCAGAUUCAGGCUAUGCCAUCUCCUGG	117
	CUGCCACCGCAGAAUGCCAUCUCCUGG	118
	CAGACCUCCUGCCAAUGCCAUCUCCUGG	142
45 H45_16-28_116-128	UUCAGGCUCUCCCCAGGCCUGCCCCAU	119
	ACCGCAGAUUCAGGCCUGCCCCAU	120
H45_16-28_124-136		

[0132] [Таблица 8-2]

5	H45_16-28_132-144	CUCCUGCCACCGCGCCGCUGCCCCAU	121
	H45_26-38_116-128	UUCAGGCUUCCCCAACAACAGUUUGCC	122
	H45_26-38_124-136	ACCGCAGAUUCAGACAAACAGUUUGCC	123
	H45_26-38_132-144	CUCCUGCCACCGCACAAACAGUUUGCC	124
	H45_51-63_110-122	CUUCCCAAUUUUUUUCCCCAGUUGCA	125
	H45_51-63_117-129	AUUCAGGCUUCCCCAUUCCCCAGUUGCA	126
	H45_51-63_124-136	ACCGCAGAUUCAGUCCCCAGUUGCA	127
	H45_60-72_110-122	CUUCCCAAUUUUUAAUUAUUCUUC	128
	H45_60-72_117-129	AUUCAGGCUUCCCCAUUAUUCUUC	129
	H45_60-72_124-136	ACCGCAGAUUCAGAAUUAUUCUUC	130
10	H45_68-80_110-122	CUUCCCAAUUUUUGAUUGCUGAAUUA	131
	H45_68-80_117-129	AUUCAGGCUUCCCCGAUUGCUGAAUUA	132
	H45_68-80_124-136	ACCGCAGAUUCAGGAUUGCUGAAUUA	133
	H45_-10-5_52-66	UUCUUCCCCAGUUGCAGUUCUGUAAGUA	134
	H45_-10-5_135-149	CAGACCUCCUGGCCACAGUUCUGUAAGUA	135
	H45_69-83_95-109	CCUGUAGAAUACUGGGAGGAUUGCUGAAU	136
15	H45_16-30_84-98	CUGGCAUCUGUUUUUUUGCCGCUGCCCCAU	137
	H45_16-30_53-67	UUUCUUCCCCAGUUGUUGCCGCUGCCCCAU	138
	H45_1-15_84-98	CUGGCAUCUGUUUUUGCCAUCUGGAGUUC	139
	H45_84-98_132-146	ACCUCCUGCCACCGCCUGGCAUCUGUUUU	140
	H45_53-67_99-113	UUUUCUGUAGAAUAUUCUUCAGUUG	141
	H45_1-15_52-66	UUCUUCCCCAGUUGCGCCAUCUGGAGUUC	11
20	H45_1-15_135-149	CAGACCUCCUGGCCACGCCAUUCUGGAGUUC	12

[0133] В 24-луночные планшеты высевали 5×10^4 клеток RD (человеческой клеточной линии рабдомиосаркомы) на лунку и культивировали в течение ночи при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в 0,5 мл минимальной поддерживающей среды Игла (EMEM) (SIGMA; это обозначение используется и далее), содержащей 10% фетальную телячью сыворотку (FCS) (Invitrogen). Вышеописанные различные антисмыловые олигомеры для исключения экзона 45 (Japan Bio Services Co., Ltd., Japan) (1 мкМ или 300 нМ) превращали в конъюгаты с липофектамином 2000 (Invitrogen), и каждый конъюгат добавляли к клеткам RD, после чего среду заменяли 0,45 мл свежей среды в объеме 50 мкл на лунку с получением конечной концентрации 100 нМ или 30 нМ.

После добавления, клетки культивировали в течение ночи. Затем клетки один раз промывали PBS (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Japan; это обозначение используется и далее), после чего к клеткам добавляли 350 мкл буфера RLT (QIAGEN), содержащего 1% 2-меркаптоэтанол (Nacalai Tesque, Inc., Japan), и клетки подвергали лизису путем их выдерживания при комнатной температуре в течение нескольких минут. Клеточный лизат собирали в гомогенизатор QIAshredder (QIAGEN) и центрифугировали при 15000 оборотов/минуту в течение 2 минут с получением гомогената. Общую РНК экстрагировали в соответствии с протоколом, прилагаемым к мининабору RNeasy (QIAGEN). Концентрацию общей экстрагированной РНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (LMS Co., Ltd., Japan).

[0134] Одностадийную ОТ-ПЦР проводили на 400 нг экстрагированной общей РНК с использованием набора для одностадийной ОТ-ПЦР QIAGEN OneStep (QIAGEN). Реакционный раствор получали в соответствии с протоколом, прилагаемым к набору. Для этого использовали термоячейку PTC-100 (MJ Research) или термоячейку для ПЦР TaKaRa Thermal Cycler Dice Touch (Takara Bio Inc., Japan). Программа, используемая для ОТ-ПЦР, указана ниже.

50°C в течение 30 минут: реакция обратной транскрипции

95°C в течение 15 минут: активация полимеразой, инактивация обратной транскриптазой, термоденатурация кДНК

[94°C в течение 30 секунд; 60°C в течение 30 секунд; 72°C в течение 1 минуты] × 35 циклов: ПЦР-амплификация

72°C в течение 10 минут: конечная реакция удлинения.

5 [0135] Ниже представлены нуклеотидные последовательности прямого и обратного праймеров, используемых для ОТ-ПЦР.

Прямой праймер: 5'-GCTCAGGTGCGGATTGACATT-3'(SEQ ID NO: 1)

Обратный праймер: 5'-GGGCAACTCTTCCACCAGTA-3'(SEQ ID NO: 2)

10 [0136] Вышеописанный продукт ПЦР-реакции (1 мкл) анализировали с использованием биоанализатора (Agilent) и системы MultiNA (Shimadzu Corporation, Japan).

Был определен уровень полинуклеотида «А» в полосе с исключением экзона 45 и уровень полинуклеотида «В» в полосе без исключения экзона 45. Исходя из этих измеренных величин «А» и «В», эффективность исключения была определена по следующему уравнению:

15 Эффективность исключения (%)=A/(A+B) × 100

[0137] Результаты эксперимента

Полученные результаты представлены на фигурах 7 и 12-15. Этот эксперимент показал, что антисмысловой олигомер согласно изобретению способствует эффективному исключению экзона 45.

20 [0127] [Пример испытания 4]

In vitro анализ

Для проведения этого эксперимента повторяли процедуры, описанные в Примере испытания 1, за исключением того, что $3,5 \times 10^5$ клеток RD (человеческой клеточной линии рабдомиосаркомы) трансфецировали только олигомером согласно изобретению (PMO No. 2, PMO No. 31 или PMO No. 32) или олигомерами из двух звеньев, состоящих из олигомера согласно изобретению в концентрации 3 мкМ или 10 мкм посредством Nucleofector II (Lonza) с использованием набора Amaxa Cell Line Nucleofector Kit L. Для этого использовали программу T-030. Комбинации трансфецированных последовательностей представлены ниже.

30 [0139] [Таблица 9]

Последовательность	Концентрация для трансфекции
PMO No. 2 (PMO No. 66 и PMO No. 67, связанные друг с другом)	3 мкМ или 10 мкм
PMO No. 66	3 мкМ или 10 мкм
PMO No. 67	3 мкМ или 10 мкм
PMO No. 31 (PMO No. 63 и PMO No. 64, связанные друг с другом)	3 мкМ или 10 мкм
PMO No. 63	3 мкМ или 10 мкм
PMO No. 64	3 мкМ или 10 мкм
PMO No. 32 (PMO No. 63 и PMO No. 65, связанные друг с другом)	3 мкМ или 10 мкм
PMO No. 65	3 мкМ или 10 мкм

[0140] Результаты эксперимента

Полученные результаты представлены на фигуре 9. Этот эксперимент показал, что олигомеры согласно изобретению, то есть, PMO No. 2 (SEQ ID NO: 7), PMO No. 31 (SEQ ID NO: 11) и PMO No. 32 (SEQ ID NO: 12), каждый из которых состоит из двух связанных антисмысловых нуклеиновых кислот, нацеленных на различные сайты в экзоне 45, способствуют исключению экзона 45 с более высокой эффективностью, чем соответствующие антисмысловые нуклеиновые кислоты, содержащие каждый олигомер

по отдельности (то есть, PMO No. 66, PMO No. 63, PMO No. 64 или PMO No. 65).

Промышленное применение

[0141] Как можно видеть из результатов эксперимента, представленных в примерах испытаний, олигомер согласно изобретению, состоящий из коротких олигомеров, 5 связанных друг с другом, способствует исключению экзона 45 в клетках RD. Таким образом, олигомер согласно изобретению является очень эффективным для лечения МДД.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> NIPPON SHINYAKU CO., LTD.

10 <120> NATIONAL CENTER OF NEUROLOGY AND PSYCHIATRY

<120> Антисмыловая нуклеиновая кислота

<130> P248158

<150> JP2015-182145

<151> 2015-09-15

15 <160> 146

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> ДНК

20 <213> Искусственная

<220>

<223> Синтетическая нуклеиновая кислота

<400> 1

gctcaggatcg gattgacatt

20

25 <210> 2

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

30 <223> Синтетическая нуклеиновая кислота

<400> 2

gggcaactct tccaccagta

20

<210> 3

<211> 20

35 <212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтетическая нуклеиновая кислота

<400> 3

40 tacaggaact ccaggatggc

20

<210> 4

<211> 23

<212> ДНК

<213> Искусственная

45 <220>

<223> Синтетическая нуклеиновая кислота

<400> 4

gaatgcaact ggggaagaaa taa

23

	<210> 5	
	<211> 23	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
5	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 5	
	atctgcggtg gcaggaggc tgc	23
	<210> 6	
10	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400> 6	
	cattggggcag cggcaaactg ttgtca	26
	<210> 7	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
20	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 7	
	gtttgccgct gcctcctgga gttcct	26
25	<210> 8	
	<211> 24	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
30	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 8	
	gtttgccgct gccctggagt tcct	24
	<210> 9	
	<211> 30	
35	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 9	
40	cagtttgcgg ctgccccatcc tggagttcct	30
	<210> 10	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
45	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 10	
	cagtttgcgg ctgccccatcc tggagttcct	26

<210>	11	
<211>	30	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<i>5</i>	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 11	
	ttcttccca gttgcgccat cctggagttc	30
	<210> 12	
<i>10</i>	<211> 30	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
<i>15</i>	<400> 12	
	cagacacctcct gccacgcccatt cctggagttc	30
	<210> 13	
	<211> 176	
	<212> ДНК	
<i>20</i>	<213> Homo sapiens	
	<400> 13	
	gaactccagg atggcattgg gcagcggcaa actgttgtca gaacattgaa tgcaactggg	60
	gaagaaaataa ttccagcaatc ctcaaaaaca gatgccagta ttctacagga aaaattggga	120
	agcctgaatc tgcggtggca ggaggtctgc aaacagctgt cagacagaaa aaagag	176
<i>25</i>	<210> 14	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
<i>30</i>	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 14	
	ttgccgctgc ccacatcctg gagttc	26
	<210> 15	
	<211> 26	
<i>35</i>	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 15	
<i>40</i>	gccgctgccc acatcctgga gttcct	26
	<210> 16	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
<i>45</i>	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 16	
	ccgctgccc atgtcctgga gttcct	26

	<210> 17	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
5	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 17	
	ttgccgctgc ccatcctgga gttcct	26
	<210> 18	
10	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400> 18	
	tttgccgctg ccatcctgga gttcct	26
	<210> 19	
	<211> 24	
	<212> ДНК	
20	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 19	
	tttgccgctg cctcctggag ttcc	24
25	<210> 20	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
30	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 20	
	tgccgctgcc cgccatcctg gagttc	26
	<210> 21	
	<211> 25	
35	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 21	
40	gttgccgct gccatcctgg agttc	25
	<210> 22	
	<211> 24	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
45	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 22	
	cagtttgcgc ctgctggagt tcct	24

	<210> 23	
	<211> 24	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
5	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 23	
	acagtttgcc gctctggagt tcct	24
	<210> 24	
10	<211> 24	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400> 24	
	cagtttgcgg ctgcccggagt tcct	24
	<210> 25	
	<211> 23	
	<212> ДНК	
20	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 25	
	gtttgcgcgt gccctggagt tcc	23
25	<210> 26	
	<211> 25	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
30	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 26	
	cagtttgcgg ctgcccggagt tcctg	25
	<210> 27	
	<211> 25	
35	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 27	
40	ccgctgccc aatgtggagtt cctgt	25
	<210> 28	
	<211> 24	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
45	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 28	
	cagtttgcgg ctgcccgtgg a gttc	24

	<210> 29	
	<211> 23	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
5	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 29	
	ccgctgccc atctggagtt cct	23
	<210> 30	
10	<211> 25	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400> 30	
	cagtttgcgg ctgcccctggaa gttcc	25
	<210> 31	
	<211> 24	
	<212> ДНК	
20	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 31	
	ttgccgctgc ccactggagg tcct	24
25	<210> 32	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
30	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 32	
	ttgccgctgc ccactggagg tcctgt	26
	<210> 33	
	<211> 22	
35	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 33	
40	acagtttgcc gcctggagtt cc	22
	<210> 34	
	<211> 12	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
45	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 34	
	gtttgccgct gc	12

	<210> 35	
	<211> 12	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
5	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 35	
	cctggagttc ct	12
	<210> 36	
10	<211> 10	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400> 36	
	tggagttcct	10
	<210> 37	
	<211> 16	
	<212> ДНК	
20	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 37	
	cagtttgcgg ctgcc	16
25	<210> 38	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
30	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 38	
	tcttcccccag ttgccatcct ggagt	26
	<210> 39	
	<211> 26	
35	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 39	
40	agacctcctg ccaccatcct ggagt	26
	<210> 40	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
45	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 40	
	gacctcctgc caccatcctg gagtt	26

	<210> 41	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
5	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 41	
	tccccagttg cgccatcctg gagttc	26
	<210> 42	
10	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400> 42	
	gacctcctgc cgccatcctg gagttc	26
	<210> 43	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
20	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 43	
	cttccccagt tgccatcctg gagttc	26
25	<210> 44	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
30	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 44	
	ttccccagtt gcacatcctg gagttc	26
	<210> 45	
	<211> 26	
35	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 45	
40	cctcctgcca ccgcacatcctg gagttc	26
	<210> 46	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
45	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 46	
	acctcctgccc acccatcctg gagttc	26

	<210> 47	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
5	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 47	
	tttcttcccc agtcatcctg gagttc	26
	<210> 48	
10	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400> 48	
	gcagacacctcc tgccatcctg gagttc	26
	<210> 49	
	<211> 28	
	<212> ДНК	
20	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 49	
	ttcttccccca gttgccatcc tggagttc	28
25	<210> 50	
	<211> 23	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
30	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 50	
	ccccagttgc atctggagtt cct	23
	<210> 51	
	<211> 26	
35	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 51	
40	ttcttccccca gttgccctgg agttcc	26
	<210> 52	
	<211> 28	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
45	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 52	
	cttccccagttgc atctggagtt cct	28

	<210> 53	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
5	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 53	
	cacacccctt gccactcctg gagttc	26
	<210> 54	
10	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400> 54	
	tgcagacccctc ctgcctcctg gagttc	26
	<210> 55	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
20	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 55	
	ctgtttgcag accccatcctg gagttc	26
25	<210> 56	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
30	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 56	
	tttgcagacc tcctggagtt cctgta	26
	<210> 57	
	<211> 30	
35	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 57	
40	cctgccaccg cagatgccat cctggagttc	30
	<210> 58	
	<211> 30	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
45	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 58	
	acccctgtcc accgcttgcg gctgcccatt	30

	<210> 59	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
5	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 59	
	tcctgttagaa taccatcctg gagttc	26
	<210> 60	
10	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400> 60	
	ctcctgccac cgctggcatc tggttt	26
	<210> 61	
	<211> 30	
	<212> ДНК	
20	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 61	
	acctcctgcc accgctcttc cccagttgca	30
25	<210> 62	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
30	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 62	
	tggcatctgt tttcatcctg gagttc	26
	<210> 63	
	<211> 26	
35	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 63	
40	ttatttcttc cccagttcct gtaaga	26
	<210> 64	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
45	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 64	
	gcttcccaat gccatcctgg agttcc	26

	<210> 65	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
5	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 65	
	ggcttcccaa tgccatcctg gagttc	26
	<210> 66	
10	<211> 30	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400> 66	
	tttctgtctg acagctcctg ccaccgcaga	30
	<210> 67	
	<211> 30	
	<212> ДНК	
20	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 67	
	tcctgccacc gcagagagaga ttgctgaatt	30
25	<210> 68	
	<211> 30	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
30	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 68	
	tcctgccacc gcagactggc atctgtttt	30
	<210> 69	
	<211> 30	
35	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 69	
40	tcctgccacc gcagatttc ctgtagaata	30
	<210> 70	
	<211> 15	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
45	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 70	
	gccatcctgg agttc	15

	<210> 71	
	<211> 15	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
5	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 71	
	ttcttccca gttgc	15
	<210> 72	
10	<211> 15	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400> 72	
	cagacacccct gccac	15
	<210> 73	
	<211> 13	
	<212> ДНК	
20	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 73	
	tcctggagtt cct	13
25	<210> 74	
	<211> 13	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
30	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 74	
	gtttgccgct gcc	13
	<210> 75	
	<211> 26	
35	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 75	
40	ctcctgccac cgcgcgcgtg cccaaat	26
	<210> 76	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
45	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 76	
	attcaggctt cccttccca gttgca	26

	<210> 77	
	<211> 9	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
5	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 77	
	tggagttcc	9
	<210> 78	
10	<211> 8	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400> 78	
	tggagttc	8
	<210> 79	
	<211> 21	
	<212> ДНК	
20	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 79	
	cagtttgcgcg cctggagttc c	21
25	<210> 80	
	<211> 22	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
30	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 80	
	acagtttgcc gctggagttc ct	22
	<210> 81	
	<211> 22	
35	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 81	
40	gtttgccgcgt gcctggagtt cc	22
	<210> 82	
	<211> 22	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
45	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 82	
	aacagtttgc ccctggagtt cc	22

	<210> 83	
	<211> 20	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
5	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 83	
	cagtttgcgg cctggagttc	20
	<210> 84	
10	<211> 22	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400> 84	
	cagtttgcgg ctccctggagt tc	22
	<210> 85	
	<211> 21	
	<212> ДНК	
20	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 85	
	agtttgcgc tcctggagtt c	21
25	<210> 86	
	<211> 21	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
30	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 86	
	acagtttgcc gctggagttc c	21
	<210> 87	
	<211> 24	
35	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 87	
40	tgcccgctgcc catcctggag ttcc	24
	<210> 88	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
45	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 88	
	ctgccacccgc agccgctgcc caatgc	26

	<210> 89	
	<211> 30	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
5	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 89	
	ccccccaguuu cauucggccau ccuggaguuu	30
	<210> 90	
10	<211> 30	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400> 90	
	uuauuuu cccaggccau ccuggaguuu	30
	<210> 91	
	<211> 30	
	<212> ДНК	
20	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 91	
	ccucccu ccgcagccau ccuggaguuu	30
25	<210> 92	
	<211> 30	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
30	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 92	
	ccucccu ccgcacaucc uggaguuucc	30
	<210> 93	
	<211> 30	
35	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 93	
40	cagaccuccu gccaccaucc uggaguuucc	30
	<210> 94	
	<211> 30	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
45	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 94	
	ccccccaguuu cauucccaucc uggaguuucc	30

	<210> 95	
	<211> 30	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
5	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 95	
	иисиисссса гииггссауцц уггагииссси	30
	<210> 96	
10	<211> 30	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400> 96	
	ииаиииссиисс сссаггссауцц уггагииссси	30
	<210> 97	
	<211> 30	
	<212> ДНК	
20	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 97	
	гиииггссси ггггасасауцц уггагииссси	30
25	<210> 98	
	<211> 30	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
30	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 98	
	иииуггсагацц уссуггссауцц уггагииссси	30
	<210> 99	
	<211> 30	
35	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 99	
40	ггссссссггс сасауггссаси ссуггагиисс	30
	<210> 100	
	<211> 30	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
45	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 100	
	сиисссссагу угсасауггссаси ссуггагиисс	30

	<210> 101	
	<211> 30	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
5	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 101	
	ишигсагасс уссиуггссай ссиггагиис	30
	<210> 102	
10	<211> 30	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400> 102	
	ишиицсигуа гаауасаусс уггагииссу	30
	<210> 103	
	<211> 30	
	<212> ДНК	
20	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 103	
	ассиссигс ассисиииси иссссагиис	30
25	<210> 104	
	<211> 30	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
30	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 104	
	ишиицсигуа гаауаиисс гсиггссай	30
	<210> 105	
	<211> 30	
35	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 105	
40	сигисигаса гсиггссай ссиггагиис	30
	<210> 106	
	<211> 30	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
45	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 106	
	ггайииссуга аиаиссай ссиггагиис	30

	<210> 107	
	<211> 30	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
5	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 107	
	ишиицциуга гаауаггссаи ссуггагиис	30
	<210> 108	
10	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400> 108	
	сагиигссаи саасаццииг гагиис	26
	<210> 109	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
20	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 109	
	иисицццца гиисаццииг гагиис	26
25	<210> 110	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
30	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 110	
	угааииаиии сиисаццииг гагиис	26
	<210> 111	
	<211> 26	
35	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 111	
40	сагиигссаи саааауггсса иссугг	26
	<210> 112	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
45	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 112	
	иисицццца гиисауггсса иссугг	26

	<210> 113	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
5	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 113	
	ugaauuaauuu cuuaauugccca uscuagg	26
	<210> 114	
10	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400> 114	
	gcagauuucag gcucauccuug gaguuuc	26
	<210> 115	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
20	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 115	
	cugccaccgc agacauccuug gaguuuc	26
25	<210> 116	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
30	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 116	
	cagaccuccu gcccauccuug gaguuuc	26
	<210> 117	
	<211> 26	
35	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 117	
40	gcagauuucag gcuuaugccca uscuagg	26
	<210> 118	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
45	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 118	
	cugccaccgc agaaaugccca uscuagg	26

	<210> 119	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
5	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 119	
	иисаггсиис ссаггссгсиг сссаяи	26
	<210> 120	
10	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400> 120	
	аасгсагаии сагггссгсиг сссаяи	26
	<210> 121	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
20	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 121	
	сиссиягссас сгггссгсиг сссаяи	26
25	<210> 122	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
30	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 122	
	иисаггсиис ссаасаасаг ииисгсс	26
	<210> 123	
	<211> 26	
35	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 123	
40	аасгсагаии сагасаасаг ииисгсс	26
	<210> 124	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
45	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 124	
	сиссиягссас сгггасаасаг ииисгсс	26

	<210> 125	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
5	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 125	
	сииссссааии ииииииссссса гиигса	26
	<210> 126	
10	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400> 126	
	аииисаггссии сссииисссса гиигса	26
	<210> 127	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
20	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 127	
	ассгсагаии сагиисссса гиигса	26
25	<210> 128	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
30	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 128	
	сииссссааии иииааииаии исииисс	26
	<210> 129	
	<211> 26	
35	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 129	
40	аииисаггссии сссииииаии исииисс	26
	<210> 130	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
45	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 130	
	ассгсагаии сагааииаии исииисс	26

	<210> 131	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
5	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 131	
	сиисссааии ииугаиигсии гааииа	26
	<210> 132	
10	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400> 132	
	аиисаггсии сссгаиигсии гааииа	26
	<210> 133	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
20	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 133	
	асссагаии саггаиигсии гааииа	26
25	<210> 134	
	<211> 30	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
30	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 134	
	иисиисссаа гиигсагиис сугаагаа	30
	<210> 135	
	<211> 30	
35	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 135	
40	сагаассисси гссасагиис сугаагаа	30
	<210> 136	
	<211> 30	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
45	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 136	
	сугаагааи асугггагга ииугсугааи	30

	<210> 137	
	<211> 30	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
5	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 137	
	сuggcausug ииииииugcc gcuugccaaу	30
	<210> 138	
10	<211> 30	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400> 138	
	ииисииcccc aguuuguugcc gcuugccaaу	30
	<210> 139	
	<211> 30	
	<212> ДНК	
20	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 139	
	сuggcausug ииииигccaaу ccuggaguuс	30
25	<210> 140	
	<211> 30	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
30	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 140	
	accuccusugcc accggccuggc aucsugииии	30
	<210> 141	
	<211> 30	
35	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 141	
40	ииииссuугua гаауаиииуci иccccагuuг	30
	<210> 142	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
45	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 142	
	сагаccusuccu gccaaugccu иссuагg	26

	<210> 143	
	<211> 16	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
5	<220>	
	<223> Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 143	
	aaaaaattgggg aaggcct	16
	<210> 144	
10	<211> 11	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400> 144	
	cctggagttc c	11
	<210> 145	
	<211> 10	
	<212> ДНК	
20	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 145	
	cagtttgcgg	10
25	<210> 146	
	<211> 11	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
30	<223> синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400> 146	
	acagtttgcgg g	11

(57) Формула изобретения

- 35 1. Антисмысловой олигомер длиной 14-32 основания для исключения экзона 45 в человеческом гене дистрофина, включающий два связанных олигомерных звена, выбранных из группы, состоящей из (а)-(е), представленных ниже, или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат, где два олигомерных звена не являются смежными по отношению друг к другу или не перекрываются друг с другом:
- 40 (а) олигомерное звено, состоящее из нуклеотидной последовательности, комплементарной нуклеотидной последовательности, состоящей из смежных 7-16 оснований, выбранных из нуклеотидной последовательности, расположенной в положениях от -5 до 15 от 5'-конца экзона 45 в человеческом гене дистрофина;
- (б) олигомерное звено, состоящее из нуклеотидной последовательности, комплементарной нуклеотидной последовательности, состоящей из смежных 7-16 оснований, выбранных из нуклеотидной последовательности, расположенной в положениях от 48 до 70 от 5'-конца экзона 45 в человеческом гене дистрофина;
- 45 (с) олигомерное звено, состоящее из нуклеотидной последовательности,

комплémentарной нуклеотидной последовательности, состоящей из смежных 7-16 оснований, выбранных из нуклеотидной последовательности, расположенной в положениях от 128 до 150 от 5'-конца экзона 45 в человеческом гене дистрофина;

(д) олигомерное звено, состоящее из нуклеотидной последовательности,

5 комплементарной нуклеотидной последовательности, состоящей из смежных 7-16 оснований, выбранных из нуклеотидной последовательности, расположенной в положениях от 15 до 40 от 5'-конца экзона 45 в человеческом гене дистрофина; и

(е) олигомерное звено, состоящее из нуклеотидной последовательности,

комплémentарной нуклеотидной последовательности, состоящей из смежных 7-16 10 оснований, выбранных из нуклеотидной последовательности, расположенной в положениях от 110 до 125 от 5'-конца экзона 45 в человеческом гене дистрофина.

2. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат по п.1, где одно из двух олигомерных звеньев представлено в (а).

3. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат

15 по п.1 или 2, которые состоят из любой нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NN: 7-12, 14-33, 40-52, 57, 64, 65 и 79-86.

4. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат по любому из пп. 1-3, которые состоят из любой нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NN: 8, 10, 25, 30, 33, 79 и 80.

20 5. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат по любому из пп. 1-4, которые представляют собой олигонуклеотид.

6. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат по п.5, где по меньшей мере один нуклеотид, входящий в состав олигонуклеотида, модифицирован в сахарной группе и/или в группе фосфатной связи.

25 7. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат по п.5 или 6, где сахарной группой по меньшей мере одного нуклеотида, входящего в состав олигонуклеотида, является рибоза, в которой группа -ОН в 2'-положении замещена любой группой, выбранной из группы, состоящей из OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br и I (где R представляет собой прямой или разветвленный

30 алкил, содержащий от 1 до 6 атомов углерода, или арил, содержащий от 6 до 10 атомов углерода, а R' представляет собой прямой или разветвленный алкилен, содержащий от 1 до 6 атомов углерода).

8. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат по п.6 или 7, где группой фосфатной связи по меньшей мере одного нуклеотида, входящего в состав олигонуклеотида, является любая группа, выбранная из группы, состоящей из фосфортиоатной связи, фосфордитиоатной связи, алкилфосфонатной связи, фосфорамидатной связи и боранофосфатной связи.

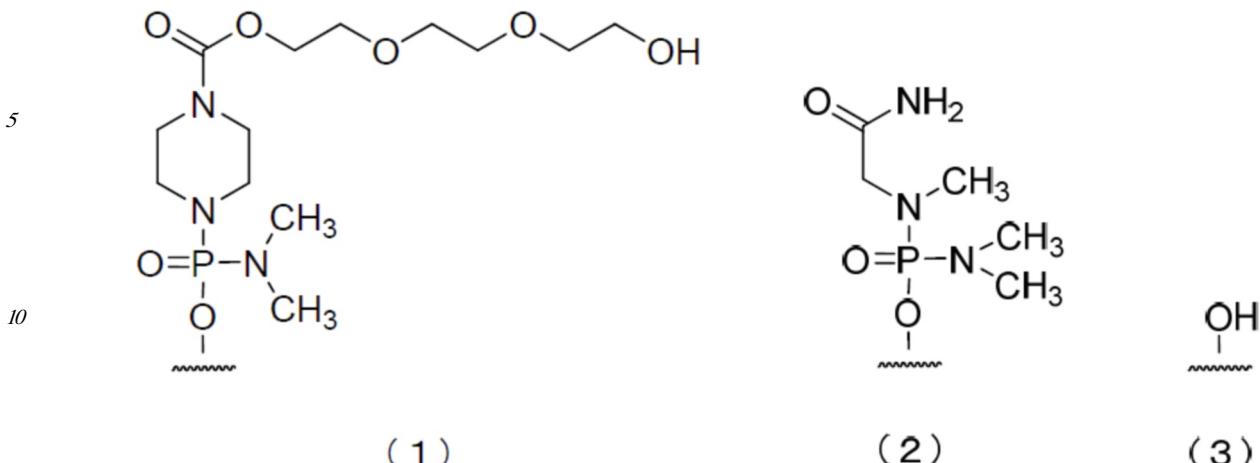
35 9. Антисмысловой олигомер по любому из пп. 1-4, который представляет собой морфолино-олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

40 10. Антисмысловой олигомер по п.9, который представляет собой фосфордиамидатный морфолино-олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

45 11. Антисмысловой олигомер по п.4, который представляет собой фосфордиамидатный морфолино-олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

12. Антисмысловой олигомер по любому из пп. 9-11, где 5'-концом является любая группа, представленная химическими формулами (1)-(3), указанными ниже, или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат.

[Формула 25]



15 13. Фармацевтическая композиция для лечения мышечной дистрофии, которая содержит антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат по любому из пп. 1-12 в качестве активного ингредиента в суточной дозе, выраженной в количестве антисмылового олигомера, составляющей от 0,1 мг до 10 г/человека.

20 14. Фармацевтическая композиция по п.13, которая дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

15. Способ лечения мышечной дистрофии путем индукции исключения экзона 45 в человеческом гене дистрофина, который включает стадию введения пациенту с мышечной дистрофией антисмыслового олигомера или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата по любому из пп. 1-12 или фармацевтической композиции по п.13 или 14.

16. Способ лечения по п.15, где пациентом с мышечной дистрофией является пациент, имеющий мутацию, которая является мишенью для исключения экзона 45 в гене дистрофина.

30 17. Способ лечения по п.15 или 16, где пациентом является человек.

18. Применение антисмылового олигомера или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата по любому из пп. 1-12 для получения фармацевтической композиции для лечения мышечной дистрофии.

19. Антисмысловой олигомер длиной 14-32 основания для исключения экзона 45 в
человеческом гене дистрофина, включающий два связанных олигомерных звена,
выбранных из группы, состоящей из (а)-(е), представленных ниже, или его
фармацевтически приемлемая соль или гидрат, где два олигомерных звена не являются
смежными по отношению друг к другу или не перекрываются друг с другом для
применения в лечении мышечной дистрофии:

40 (а) олигомерное звено, состоящее из нуклеотидной последовательности, комплементарной нуклеотидной последовательности, состоящей из смежных 7-16 оснований, выбранных из нуклеотидной последовательности, расположенной в положениях от -5 до 15 от 5'-конца экзона 45 в человеческом гене дистрофина;

(б) олигомерное звено, состоящее из нуклеотидной последовательности, комплементарной нуклеотидной последовательности, состоящей из смежных 7-16 оснований, выбранных из нуклеотидной последовательности, расположенной в положениях от 48 до 70 от 5'-конца экзона 45 в человеческом гене листрофина:

(с) олигомерное звено, состоящее из нуклеотидной последовательности

комплémentарной нуклеотидной последовательности, состоящей из смежных 7-16 оснований, выбранных из нуклеотидной последовательности, расположенной в положениях от 128 до 150 от 5'-конца экзона 45 в человеческом гене дистрофина;

(d) олигомерное звено, состоящее из нуклеотидной последовательности,

5 комплементарной нуклеотидной последовательности, состоящей из смежных 7-16 оснований, выбранных из нуклеотидной последовательности, расположенной в положениях от 15 до 40 от 5'-конца экзона 45 в человеческом гене дистрофина; и

(e) олигомерное звено, состоящее из нуклеотидной последовательности,

комплémentарной нуклеотидной последовательности, состоящей из смежных 7-16 10 оснований, выбранных из нуклеотидной последовательности, расположенной в положениях от 110 до 125 от 5'-конца экзона 45 в человеческом гене дистрофина.

20. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат по п.19, где лечению подвергается пациент с мышечной дистрофией, имеющий мутацию, которая является мишенью для исключения экзона 45 в гене дистрофина.

15 21. Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат по п.19 или 20, где пациентом является человек.

20

25

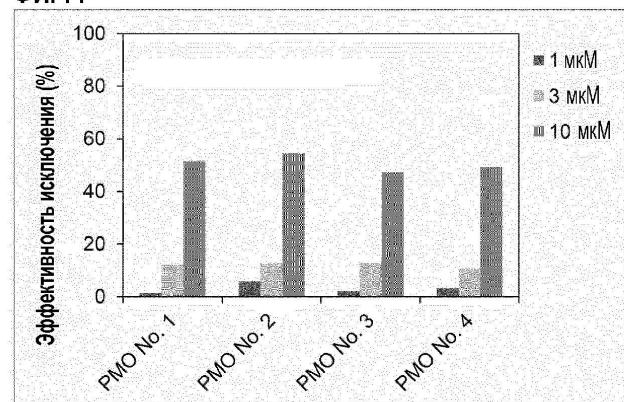
30

35

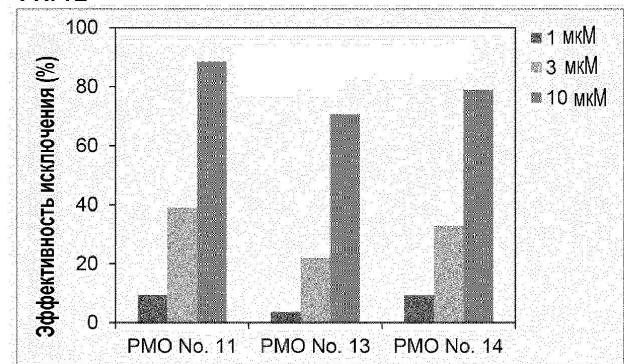
40

45

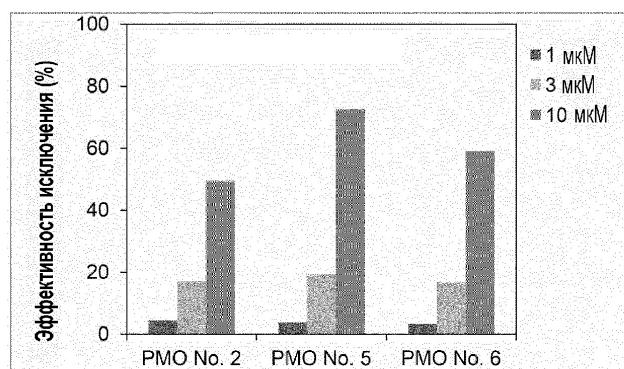
ФИГ. 1



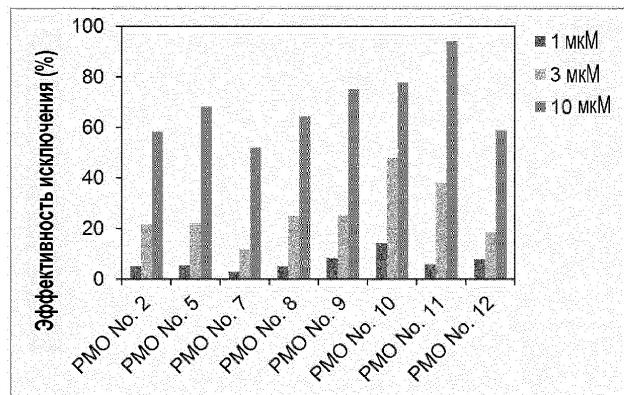
ФИГ. 2



ФИГ. 3

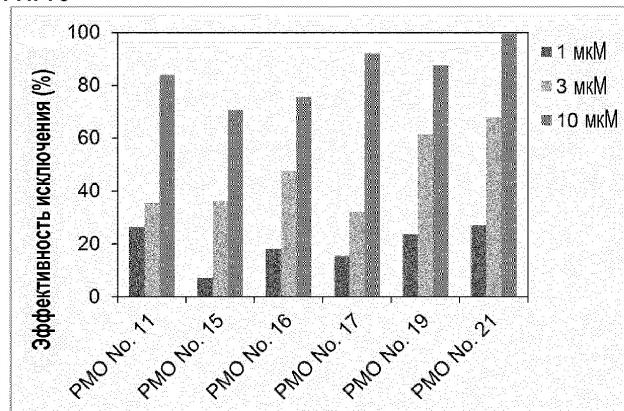


ФИГ. 4

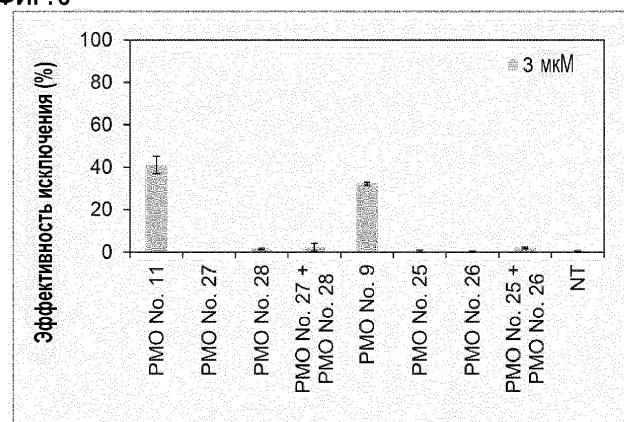


3/13

ФИГ. 5

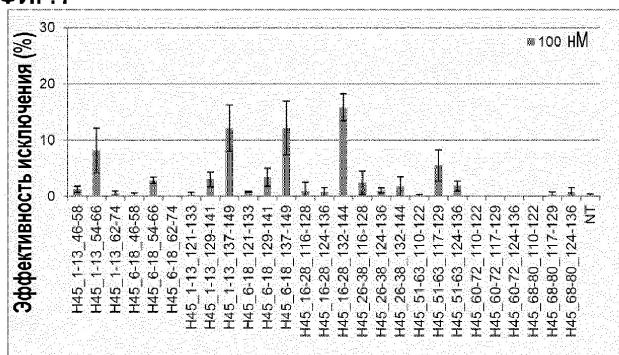


ФИГ. 6

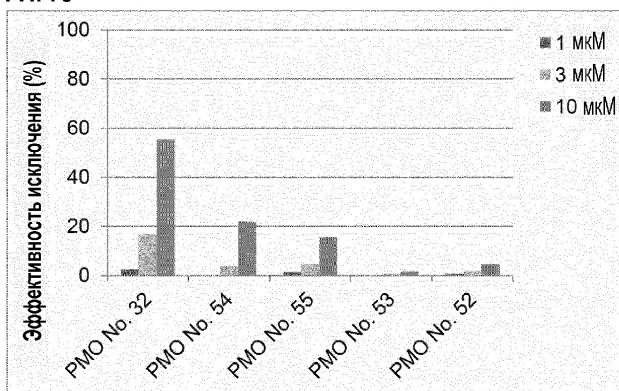


4/13

ФИГ. 7

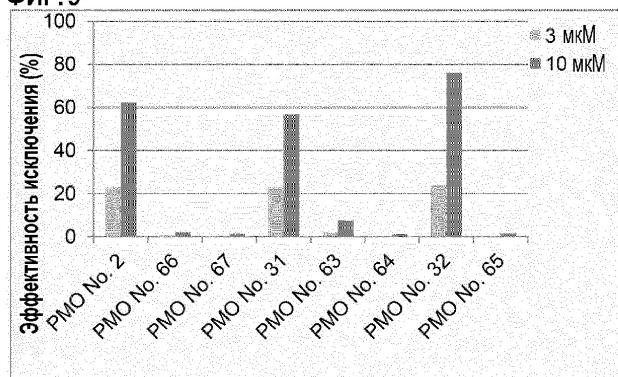


ФИГ. 8

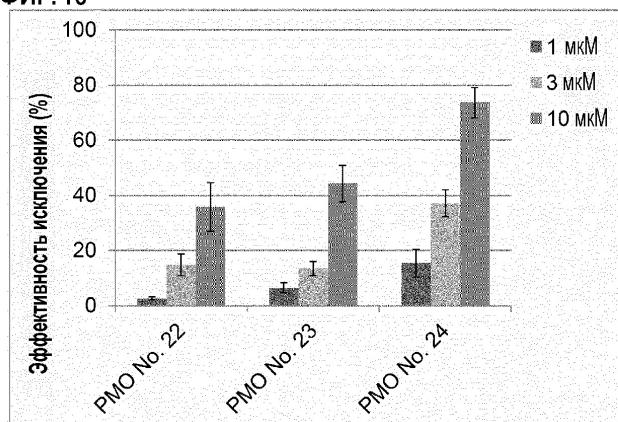


5/13

ФИГ. 9

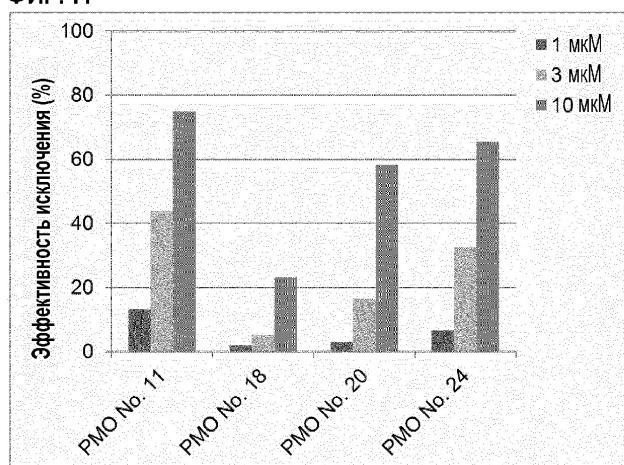


ФИГ. 10

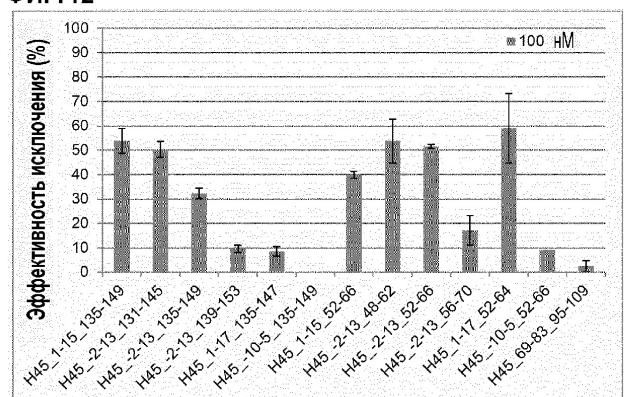


6/13

ФИГ. 11

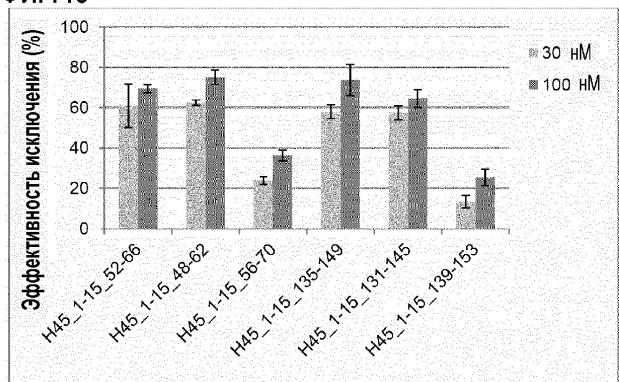


ФИГ. 12

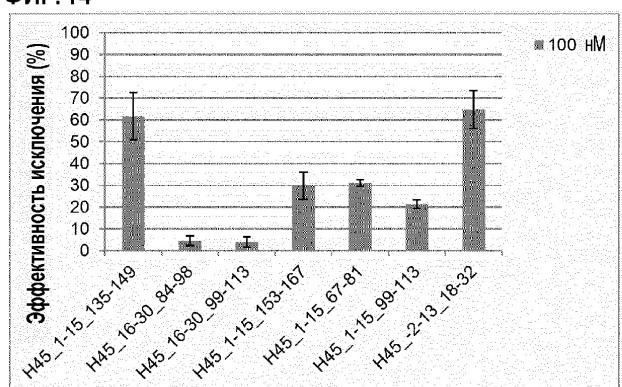


7/13

ФИГ. 13

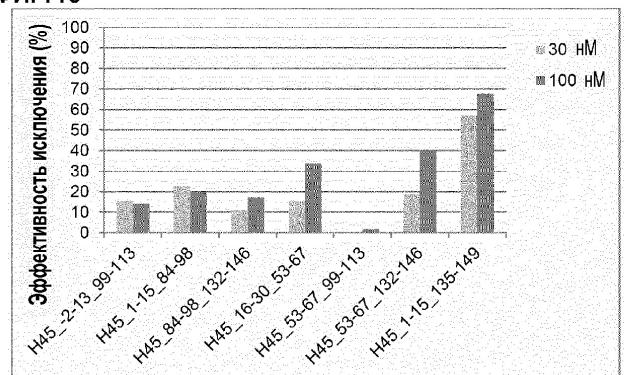


ФИГ. 14

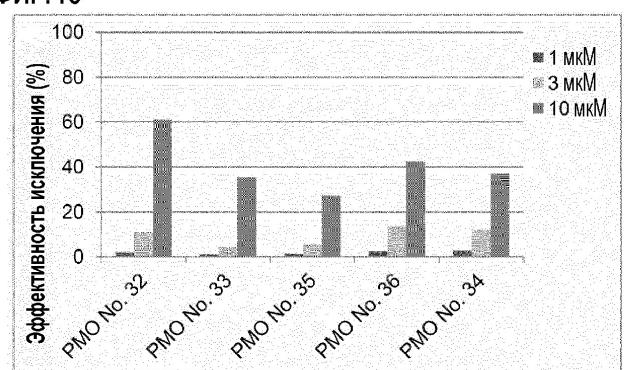


8/13

ФИГ. 15

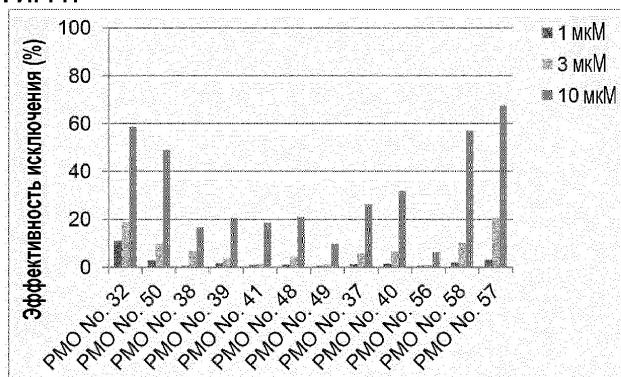


ФИГ. 16

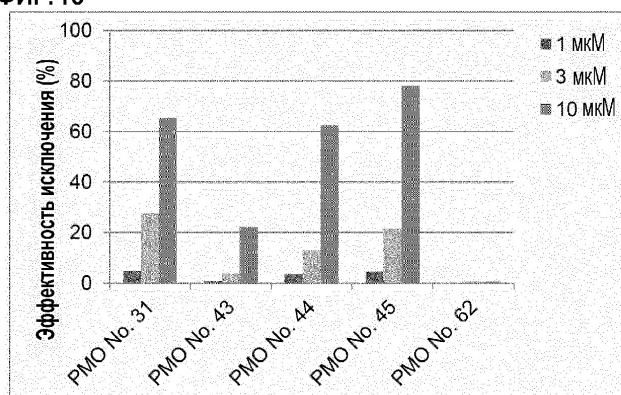


9/13

ФИГ. 17

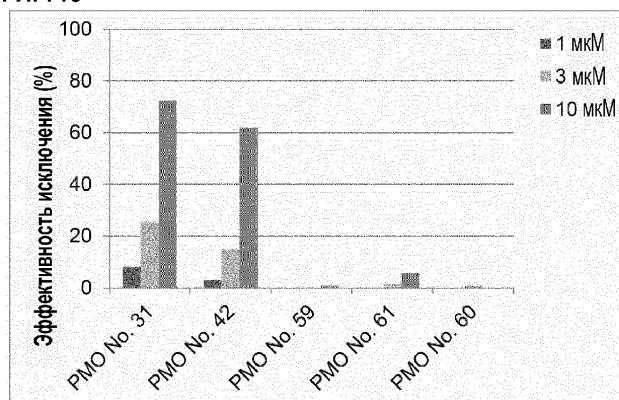


ФИГ. 18

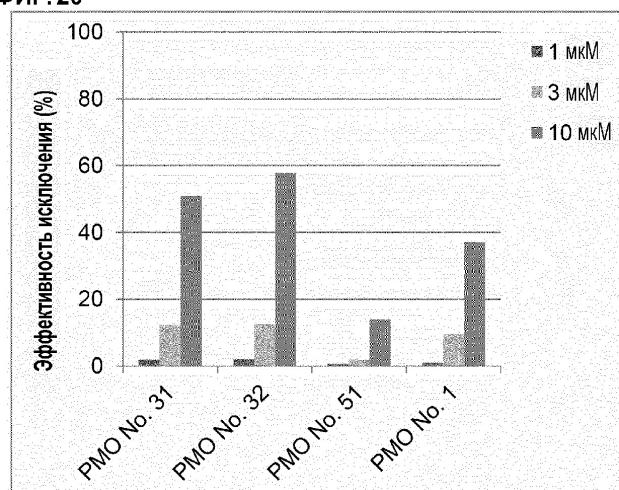


10/13

ФИГ. 19

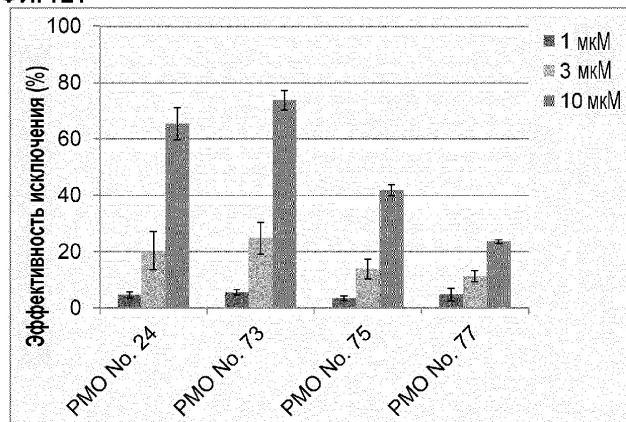


ФИГ. 20

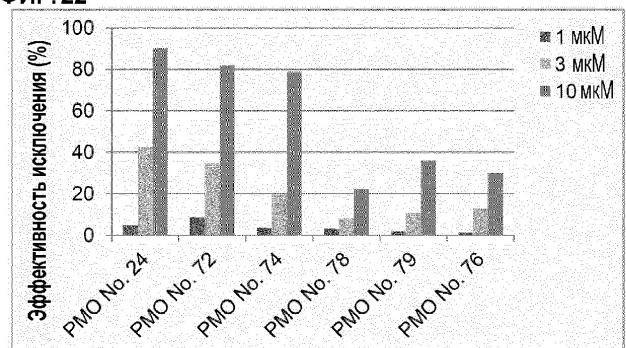


11/13

ФИГ. 21

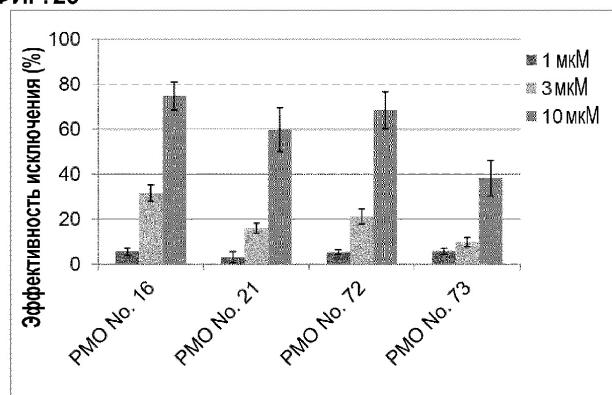


ФИГ. 22

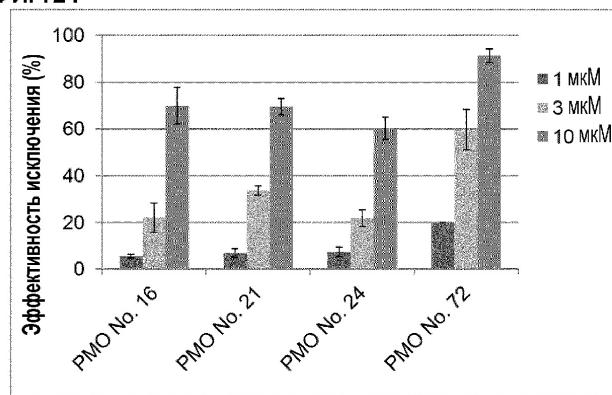


12/13

ФИГ. 23



ФИГ. 24



13/13

ФИГ. 25

