



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, Ёсигугу (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. Mitrpant 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 антисмыслового 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 антисмысловой 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

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

RU 2724554 C2

RU 2724554 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(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)

(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:
15.09.2016

Registration 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)**

(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 Дюшенна (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 счете, человек умирает в возрасте двадцати лет от сердечной недостаточности или недостаточности дыхательных путей. Таким тяжелым заболеванием является МДД. В
15 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 интронов 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 мембраны 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 не могут сохранять свою структуру, и в эти мышечные клетки начинает поступать большое количество ионов кальция. В результате этого, происходит реакция, похожая
30 на реакцию воспаления, что приводит к стимуляции фиброза и тем самым затрудняет регенерацию мышечных клеток.

[0004] Мышечная дистрофия Беккера (МДБ) также вызывается мутациями 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 мышцах 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).

[0008] Однако до сих пор ничего не сообщалось о том, что связанные одноцепочечные
 30 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, приведенным выше, основной целью настоящего изобретения является получение нового антисмыслового олигомера сцепленного типа, который был сконструирован для индуцирования исключения экзона посредством нацеливания на отдельные две нуклеотидные последовательности в одном и том же экзоне гена дистрофина, и приготовление терапевтического средства для лечения мышечной дистрофии, содержащего такой олигомер.

Способы решения задачи

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

[0013] В частности, настоящее изобретение включает:

[1] Антисмысловой олигомер длиной 14-32 основания, включающий два связанных олигомерных звена, выбранных из группы, состоящей из (a)-(e), 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:

(a) 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;

(b) 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;

(c) 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;

(d) 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

(e) 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.

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

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

[6] Антисмысловой 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] Антисмысловой 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 -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 алкил или арил, а R' представляет собой алкилен).

[8] Антисмысловой 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, фосфордифитоатной связи, алкилфосфонатной связи, фосфорамидатной связи и боранофосфатной связи.

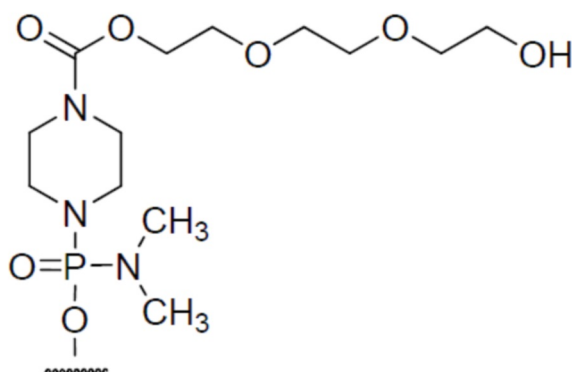
[9] Антисмысловой олигомер в соответствии с любым из вышеуказанных [1]-[4], который представляет собой морфолино-олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

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

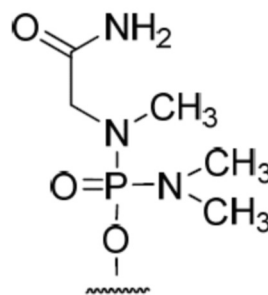
[11] Антисмысловой олигомер в соответствии с вышеуказанным [4], который представляет собой фосфордиамидатный морфолино-олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

[12] Антисмысловой 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]



(1)



(2)



(3)

[13] Фармацевтическую композицию для лечения мышечной дистрофии, которая содержит антисмысловой 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 антисмыслового 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 антисмыслового 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] Антисмысловый 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] Антисмысловый 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.

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

Эффекты настоящего изобретения

[0014] Антисмысловый 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 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 экзона 45 в человеческом гене дистрофина в человеческих клетках рабдомиосаркомы (RD-клетках)

45 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 No. 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 гене 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, транскрибируемая 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. No. 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 настоящее время был получен олигомер согласно изобретению, способствующий исключению экзона 45 в человеческом гене дистрофина, в целях 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 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

(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.

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,

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 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, 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 тиминном, между аденином и урацилом или между гуанином и цитозином, а неоднозначно спаривающаяся пара оснований означает пару оснований, которая образует водородную связь между 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 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 × SSC, 5 × 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 мМ Трис-НCl (рН 7,5), 50% формамида при 42°C. «Условия высокой жесткости» 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, 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.

[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 мембраны в течение ночи с меченным зондом с последующей промывкой первым промывочным буфером, содержащим 0,1% (масс./об.) ДСН при 55°C, может быть детектирован гибридизованный 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, 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).

[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 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.

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 87:2264-2268, 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 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 (a)-(e), или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат:

- 5 (a) 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;
- (b) олигомерное звено, состоящее из нуклеотидной последовательности,
10 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;
- (c) олигомерное звено, состоящее из нуклеотидной последовательности, комплементарной нуклеотидной последовательности, состоящей из смежных 7-16
15 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, комплементарной нуклеотидной последовательности, состоящей из смежных 7-16 оснований, выбранных из нуклеотидной последовательности, расположенной в
20 положениях от 15 до 40 от 5'-конца экзона 45 в человеческом гене дистрофина; и
- (e) 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 (a)-(e) (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.

- [0027] Кроме того, если два олигомерных звена выбраны из группы, состоящей из
30 (a)-(e), то эти два олигомерных звена могут представлять собой комбинацию из одинаковых звеньев (то есть, (a) и (a), (b) и (b), (c) и (c), (d) и (d), или (e) и (e)) 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 (a), то другим звеном, предпочтительно, является
35 любое звено из (b)-(e). Аналогичным образом, если в качестве одного звена выбрано (b), то другим звеном предпочтительно, является (a), (c), (d) или (e), а если в качестве одного звена выбрано (c), то другим звеном предпочтительно, является (a), (b), (d) или (e).

- [0028] Если два звена выбраны из (a)-(e), то любые из этих выбранных двух звеньев
40 могут быть локализованы со стороны 5'-конца. Если выбраны (a) и (b), то звено (a), предпочтительно, присоединено с 3'-концевой стороны. Если выбраны (b) и (c), то звено (b) предпочтительно, присоединено с 3'-концевой стороны. Если выбраны (a) и (c), то звено (a), предпочтительно, присоединено с 3'-концевой стороны. Если выбраны (a) и (d), то звено (a), предпочтительно, присоединено с 3'-концевой стороны. Если выбраны
45 (a) и (e), то звено (a), предпочтительно, присоединено с 3'-концевой стороны.

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

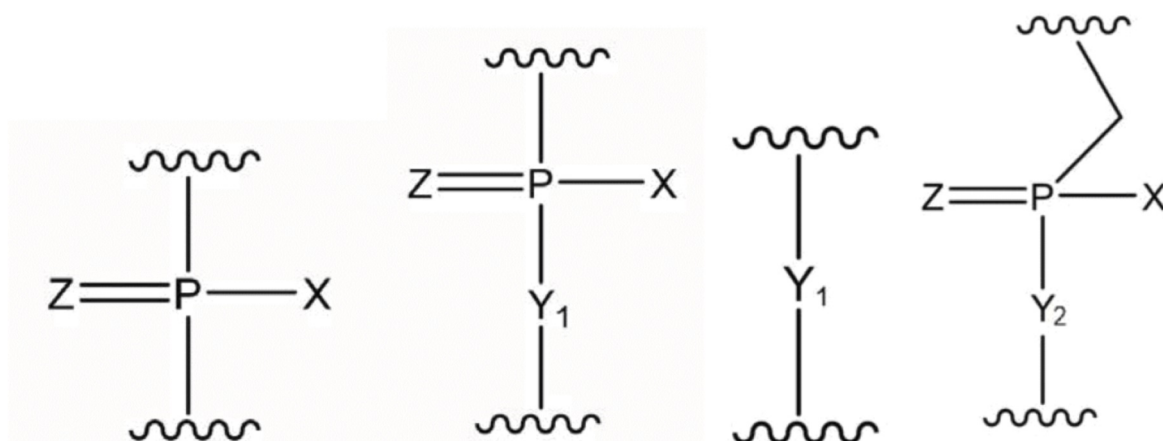
с 5'-концевой стороны, и 5'-конец звена, локализованного с 3'-концевой стороны, образуют фосфатную связь или любую из нижеследующих групп:

[Формула 2]

5

10

15



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

R^1 представляет собой H или алкил;

20

R^2 и R^3 , которые могут быть одинаковыми или различными, и каждый из них 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

25

Z представляет собой O или S).

30

[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.

35

[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 mM.

40

[0032] Для того, чтобы подтвердить, происходит ли исключение экзона 45 в человеческом гене дистрофина, олигомер согласно изобретению может быть трансфецирован 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

45

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 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, морфолино-олигомером или олигомером «пептид-нуклеиновая кислота» (PNA), каждый из которых имеет длину 14-32 оснований. 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-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.

[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 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-бромурасил), 6-азапиримидин, 6-алкилпиримидины (например, 6-метилурацил), 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксигидроксиметил)урацил, 5'-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-оксиуксусная 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 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.

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 фосфоритионатную связь, фосфордитионатную связь,

алкилфосфонатную связь, фосфорамидатную связь или боранофосфатную 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 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, алкокси, циано, нитро и т.п.

[0041] Циклоалкил, предпочтительно представляет собой циклоалкил, содержащий от 5 до 12 атомов углерода. Более конкретными примерами являются циклопентил, циклогексил, циклогептил, циклооктил, циклодецил и циклододецил.

Галогенами являются фтор, хлор, бром и йод.

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

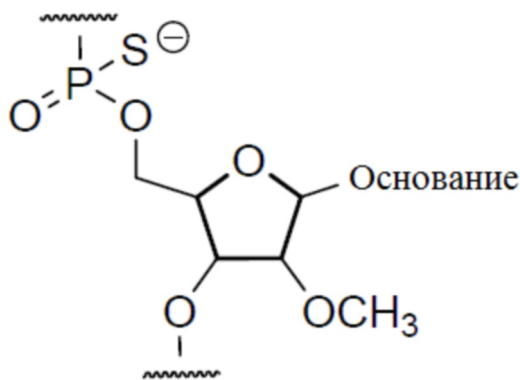
[0042] Арил, предпочтительно, представляет собой арил, содержащий от 6 до 10 атомов углерода. Более конкретными примерами являются фенил, α -нафтил и β -нафтил. Особенно предпочтительным является фенил. Такой арил может быть замещен 1-3 заместителями, включая алкил, галоген, алкокси, циано, нитро и т.п.

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)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] Олигонуклеотидом согласно изобретению, предпочтительно, является олигомер согласно изобретению, звеном которого является группа, представленная ниже следующей общей формулой, где группа -ОН в 2'-положении рибозы замещена метокси, а группа с фосфатной связью представляет собой фосфотиоатную связь:

[Формула 3]

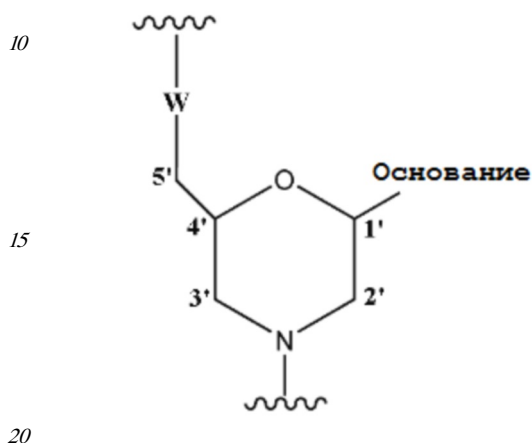


(где Основание представляет собой нуклеотидное основание).

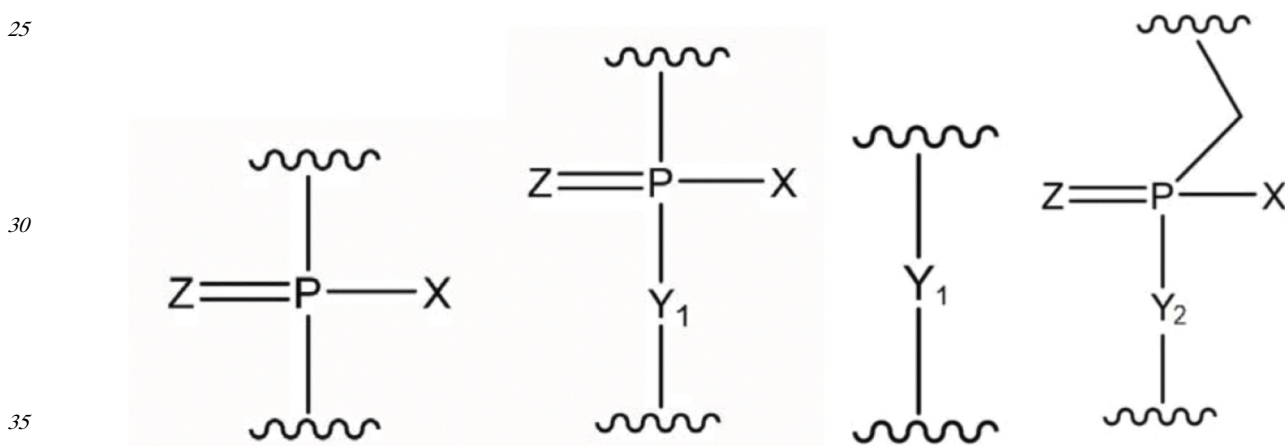
[0045] Олигонуклеотид согласно изобретению может быть легко синтезирован на различных автоматических синтезаторах (например, на АКТА oligopilot plus 10/100 (GE Healthcare)), или альтернативно, его синтез может быть осуществлен третьим лицом (например, Promega или Takara) и т.п.

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

[Формула 4]



(где «Основание» является таким, как оно было определено выше; и W представляет собой группу, представленную любой из нижеследующих формул: [Формула 5])



(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;

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

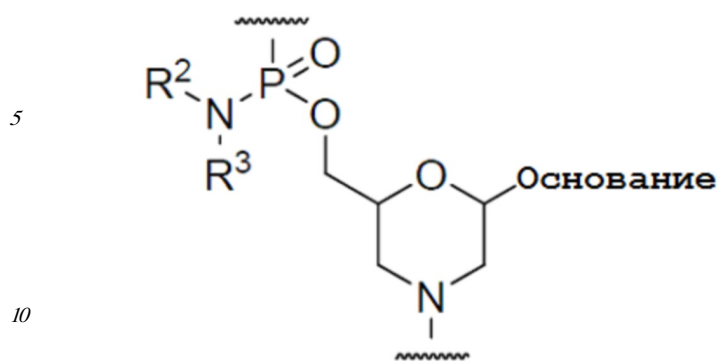
Y_1 представляет собой O, S, CH_2 или NR^1 ;

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

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]



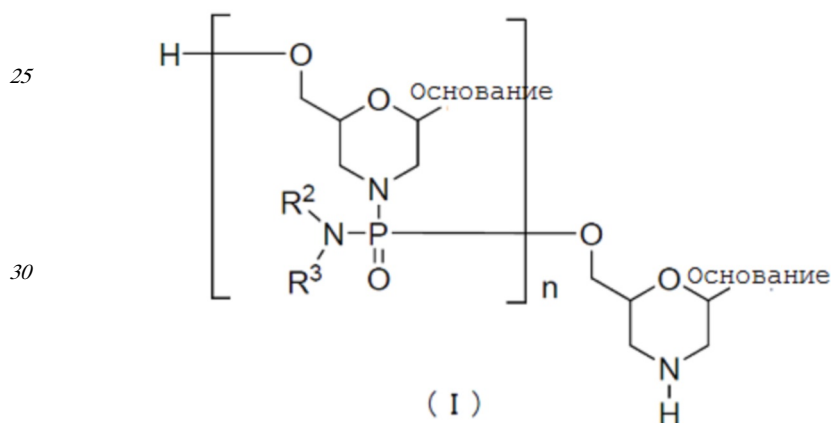
(где Основание, R^2 и R^3 являются такими, как они были определены выше).

[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.

[0049] [Способ получения РМО]

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

[Формула 7]



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

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

[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.

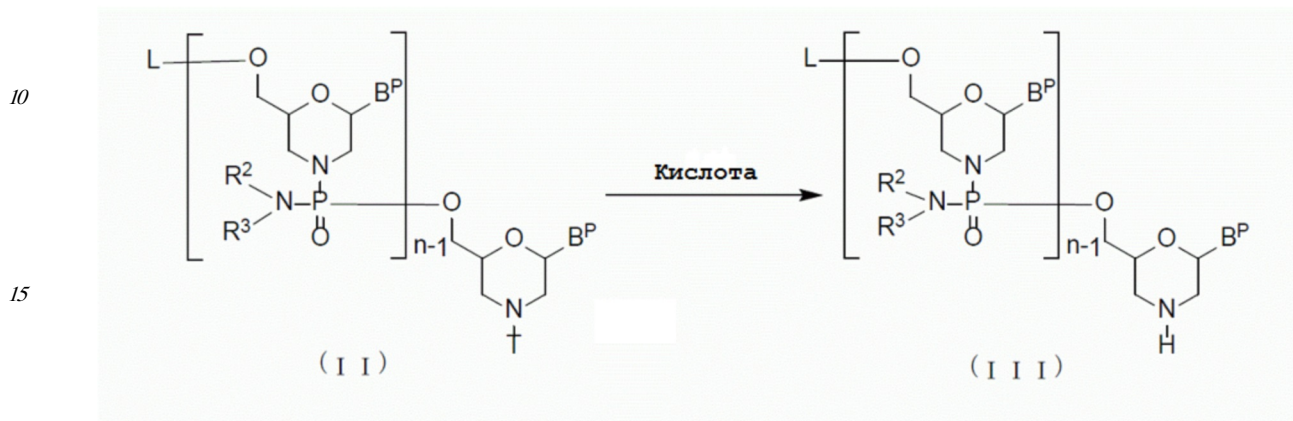
[0051] Кроме того, все нижеследующие стадии могут быть осуществлены жидкофазным или твердофазным методом (с повторением серийных реакций или с использованием коммерчески доступного автоматического синтезатора для твердофазного синтеза). Если РМО получают твердофазным методом, то для упрощения проведения 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 соединения, представленного нижеследующей общей формулой (III) (далее называемого соединением (III)):

[Формула 8]



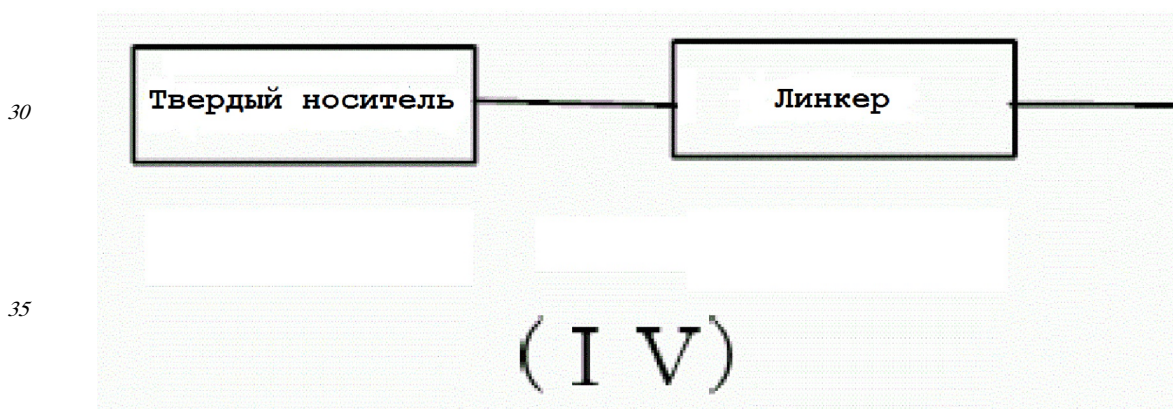
20 где n , R^2 и R^3 являются такими, как они были определены выше;

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

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

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

[Формула 9]



40 «Нуклеотидные основания», подходящие для B^P , могут представлять собой такие же «нуклеотидные основания», которые были перечислены для оснований, при условии, что аминогруппы или гидроксильные 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 нуклеиновых кислот. Более конкретными примерами являются бензоил, 4-метоксибензоил, ацетил, пропионил, бутирил, изобутирил, фенилацетил, феноксиацетил, 4-трет-бутилфеноксиацетил, 4-изопропилфеноксиацетил и (диметиламино)метилден. Защитными группами для гидроксильных групп являются, например, 2-цианоэтил, 4-

нитрофенетил, фенилсульфонилэтил, метилсульфонилэтил, триметилсилилэтил, фенил, который может быть замещен 1-5 электрон-акцептирующими группами в любом(ых) замещаемом(ых) положении(ях), дифенилкарбамоил, диметилкарбамоил, диэтилкарбамоил, метилфенилкарбамоил, 1-пирролидинилкарбамоил, 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 (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, трифторуксусной кислоте), (ii) является химически устойчивым к действию реагентов, подходящих для синтеза производных морфолино-нуклеиновой кислоты, (iii) 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 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 TentaGel), стекло с регулируемым размером пор (CPG) (например, CPG Inc.), оксалилированное 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 трифторуксусная кислота, дихлоруксусная кислота или трихлоруксусная кислота. Количество используемой кислоты обычно составляет, например, в пределах от 0,1 молярных эквивалентов до 1000 молярных эквивалентов, а предпочтительно в пределах 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

трифторуксусной кислоты и триэтиламина, а более конкретно, смесь, содержащая 2 эквивалента трифторуксусной 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, трифторэтанол), 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.

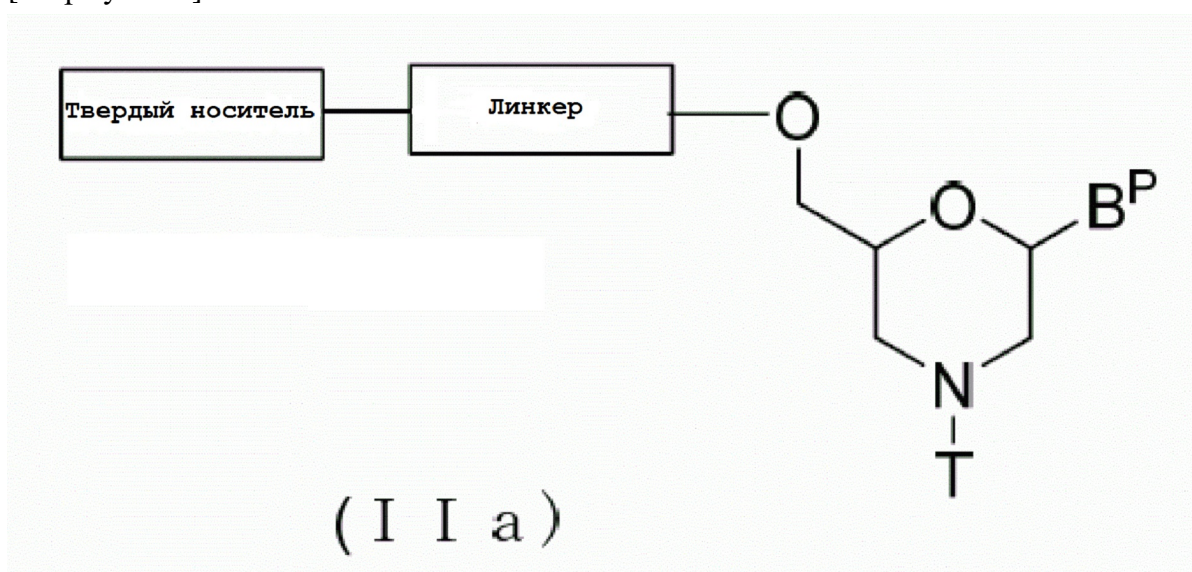
[0059] Кроме того, после завершения этой стадии, может быть добавлено, но необязательно, основание для нейтрализации кислоты, оставшейся в системе. Для этой цели может быть использовано любое «основание», и примером такого основания является диизопропилэтиламин. Такое основание может быть разбавлено 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, трифторэтанол), 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.

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 (IIa) (далее называемое соединением (IIa)), может быть получено нижеследующими способами:

[Формула 10]

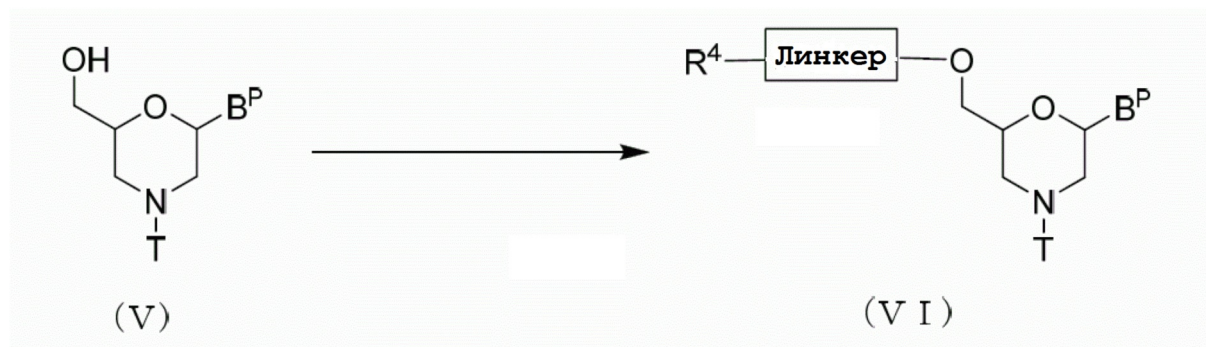


[где B^P , T, линкер и твердый носитель являются такими, как они были определены выше].

[0061] Стадия 1:

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

[Формула 11]

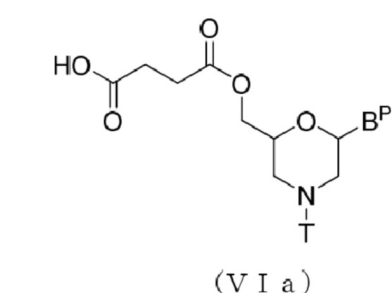


[где B^P , T и линкер являются такими, как они были определены выше; и R^4 представляет собой гидроксильную группу, галоген или amino].

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

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

[Формула 12]

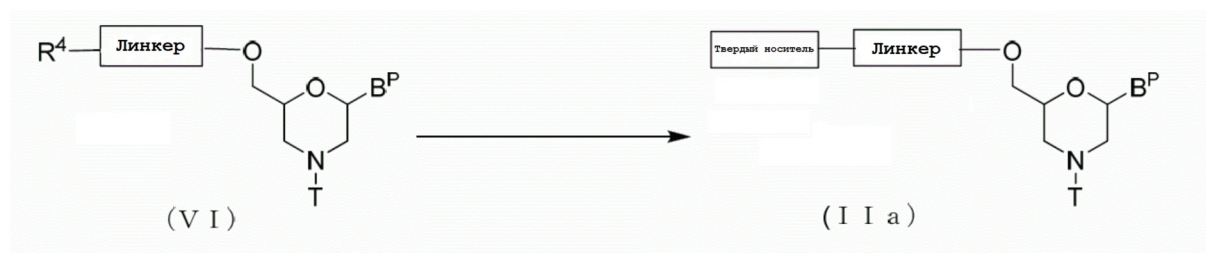


[где B^P и T являются такими, как они были определены выше].

[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):

[Формула 13]



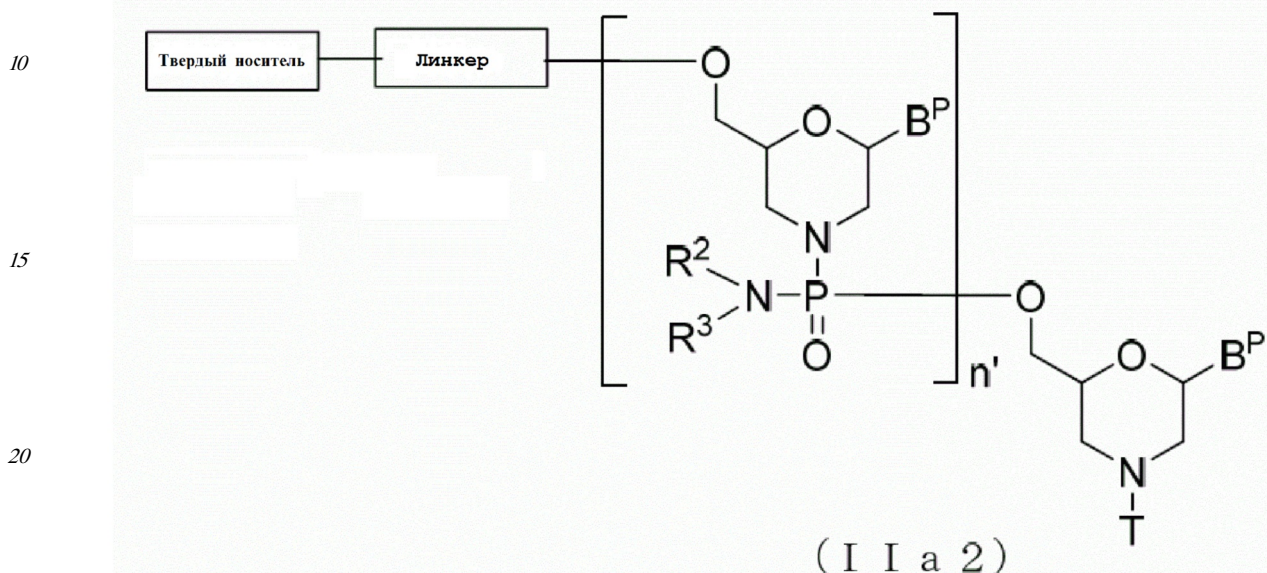
[где B^P , R^4 , T, линкер и твердый носитель являются такими, как они были определены выше].

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:

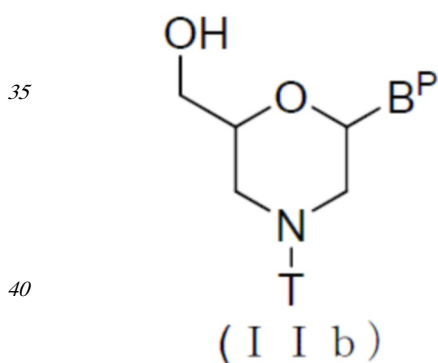
[Формула 14]



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

[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:

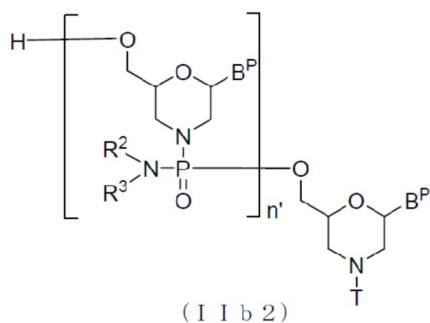
[Формула 15]



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

[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:

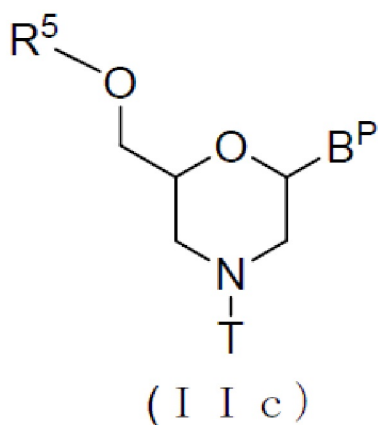
[Формула 16]



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

[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]

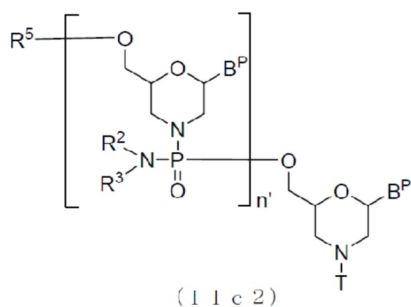


где B^P и T являются такими, как они были определены выше; и

R^5 представляет собой ацил].

[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 A и B способа получения РМО, описанного в настоящей заявке:

[Формула 18]

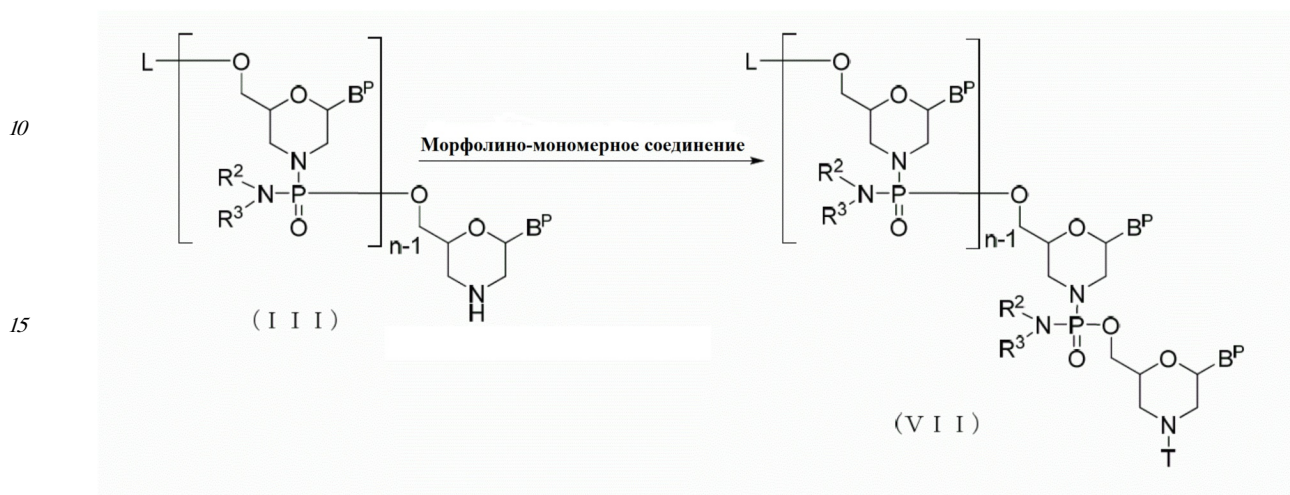


[где B^P , n' , R^2 , R^3 , R^5 и T являются такими, как они были определены выше].

[0069] (2) Стадия В:

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

[Формула 19]

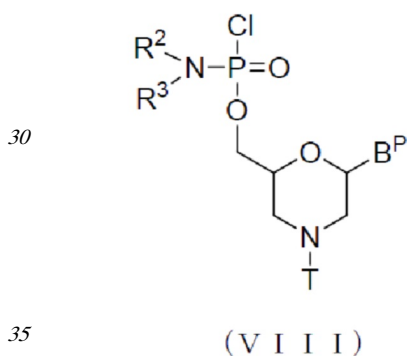


[где каждый из B^P , L , n , R^2 , R^3 и T является таким, как он был определен выше]].

[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 диизопропилэтиламин, 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 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 феноксиуксусной 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, трифторэтанол), вода или их смеси.

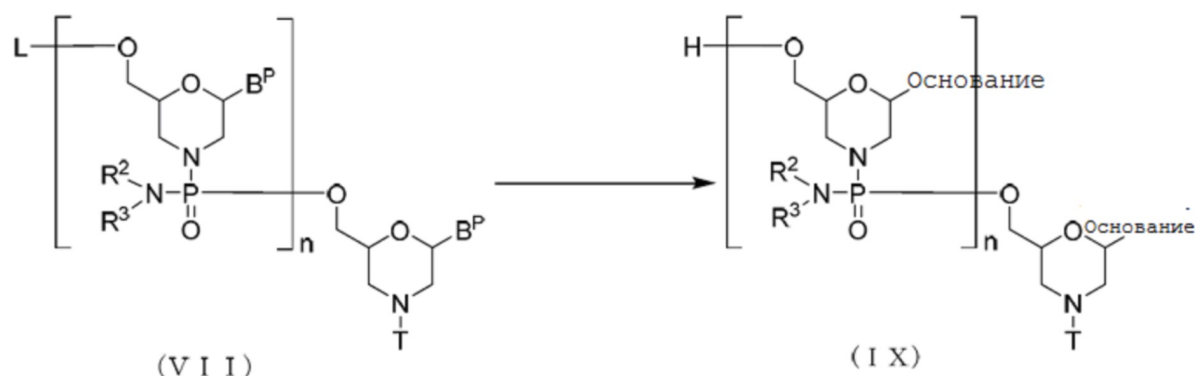
Если это необходимо, то вместе с ацилирующим агентом может быть использовано основание (например, пиридин, лутидин, коллидин, триэтиламин, диизопропилэтиламин, N-этилморфолин). Количество используемого ацилирующего агента предпочтительно составляет в пределах от 0,1 молярных эквивалентов до 10000 молярных 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 формулы (IX):

[Формула 21]



[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

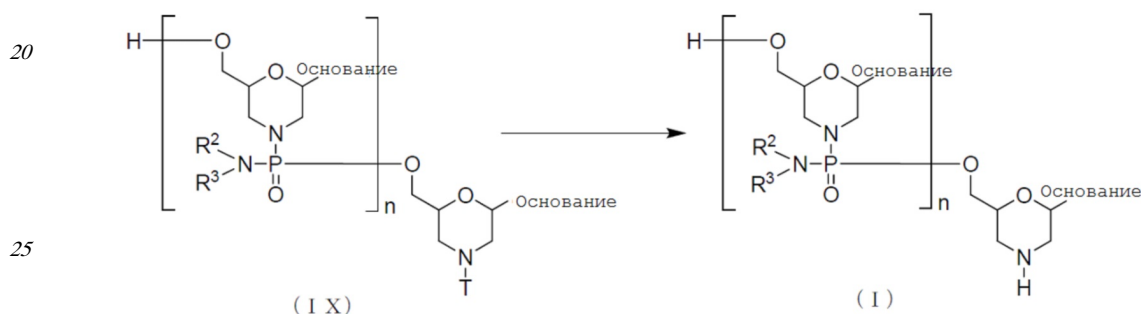
аммиак и метиламин. Такой «агент для снятия защиты», подходящий для его использования в этой стадии, может быть разбавлен водой, метанолом, этанолом, изопропиловым спиртом, ацетонитрилом, тетрагидрофураном, ДМФ, N,N-диметилимидазолидиноном, N-метилпиперидоном или их смесями. Из этих растворителей предпочтительным 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, 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.

[0079] (4) Стадия D:

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

[Формула 22]



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,

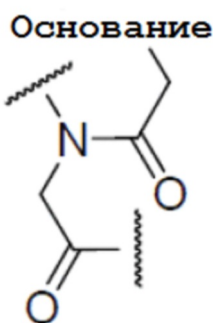
концентрирование, нейтрализацию, фильтрацию, центрифугирование, перекристаллизацию, обращенно-фазовую колоночную хроматографию на C₈-C₁₈, катионообменную колоночную хроматографию, анионообменную колоночную хроматографию, гель-фильтрационную колоночную хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию, 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, смешанный раствор 20 мМ триэтиламина/ацетатного 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.

[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.

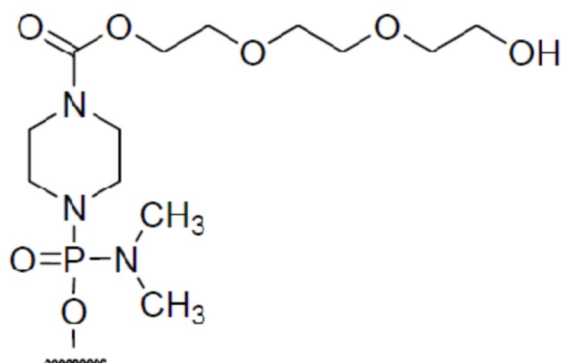
- 1) P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, Science, 254, 1497 (1991)
- 2) M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, JACS., 114, 1895 (1992)
- 3) K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpius, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, J. Org. Chem., 59, 5767 (1994)
- 4) L. Christensen, R. Fitzpatrick, B. Gildea, K. H. Petersen, H. F. Hansen, T. Koch, M. Egholm, 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)

[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 -ОН.

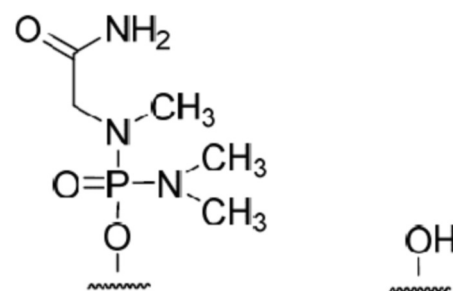
[Формула 24]

5

10



(1)



(2)



(3)

Группы, представленные вышеуказанными формулами (1), (2) и (3), далее будут
15 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
20 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
25 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
30 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
35 (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'-
40 дибензилэтилендиамина, соль хлорпрокаина, соль прокаина, соль диэтаноланамина, 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
45 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, fumarat, 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, 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, внутриаартериальное введение, 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, 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 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-диолеоилглицерина и фосфолипида, как основных их компонентов (в дальнейшем, эта липосома будет называться «липосомой А»), Олигофектамин® (Invitrogen), Липофектин® (Invitrogen), 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 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 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 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 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, декстран), 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 таких растворителей являются вода для инъекций, дистиллированная вода для инъекций,
15 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 лиофилизированный 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 лиофилизированный препарат, содержащий композицию согласно изобретению.

[0094] Такой лиофилизированный 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 в зависимости от типа олигомера согласно изобретению, содержащегося в этой
40 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 интервала. 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 является 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-триметилморфолин-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-триметилморфолин-2-ил]метокси}-4-оксобутановой кислоты

В атмосфере аргона, N-{1-[(2R,6S)-6-(гидроксиметил)-4-триметилморфолин-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 0,5М водным дигидрофосфатом калия. Полученный органический слой последовательно промывали 0,5М водным дигидрофосфатом калия, водой и насыщенным водным хлоридом натрия. Полученный органический слой сушили 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-триметилморфолин-2-ил]метокси}-4-оксобутановой кислоты, загруженной на аминополистироловую смолу

4-{[(2S,6R)-6-(4-бензамидо-2-оксопиримидин-1(2H)-ил)-4-триметилморфолин-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)карбодиимида (11,5 г). Затем к этой смеси добавляли

аминополистироловую смолу на amino-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(1H,3H)-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-цианоэтоксид)-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-тримитил-морфолин-2-ил]пурин-2-ил}-2-феноксиацетамид.

Для определения количества загруженного целевого продукта, молярное количество тримита 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 является группа (3)). Каждый из синтезированных таким образом РМО растворяли в воде для инъекций (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., Japan).

[0106] [Таблица 1-1]

РМО No.	Нуклеотидная последовательность	Название последовательности	SEQ ID NO:
1	TTGCCGCTGCCCCACATCCTGGAGTTC	H45_1-13_18-30	14
2	GTTTGCCGCTGCCTCCTGGAGTTCCT	H45_-2-11_20-32	7
3	GCCGCTGCCCCACATCCTGGAGTTCCT	H45_-2-13_18-28	15
4	CCGCTGCCCCAATGTCCTGGAGTTCCT	H45_-2-11_15-27	16
5	TTGCCGCTGCCCCATCCTGGAGTTCCT	H45_-2-11_18-30	17
6	TTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCCT	H45_-2-13_21-31	18
7	TTTGCCGCTGCCTCCTGGAGTTC	H45_-1-11_20-31	19
8	TGCCGCTGCCCCGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15_19-29	20
9	GTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCCT	H45_-2-10_21-32	8
10	CAGTTTGCCGCTGCCCCATCCTGGAGTTCCT	H45_-2-13_20-34	9
11	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCCT	H45_-2-8_19-34	10
12	GTTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-12_20-32	21
13	CAGTTTGCCGCTGCTGGAGTTCCT	H45_-2-8_21-34	22
14	ACAGTTTGCCGCTCTGGAGTTCCT	H45_-2-9_23-35	23
15	CAGTTTGCCGCTGCCGGAGTTCCT	H45_-2-7_20-34	24
16	GTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTC	H45_-1-8_19-32	25
17	CAGTTTGCCGCTGCCGGAGTTCCTG	H45_-3-7_20-34	26
18	CCGCTGCCCCAATGTGGAGTTCCTGT	H45_-4-8_15-27	27
19	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTC	H45_1-8_19-34	28
20	CCGCTGCCCCAATCTGGAGTTCCT	H45_-2-9_16-27	29
21	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTC	H45_-1-8_19-34	30
22	TTGCCGCTGCCCCACTGGAGTTCCT	H45_-2-9_18-30	31
23	TTGCCGCTGCCCCACTGGAGTTCCTGT	H45_-4-9_18-30	32
24	ACAGTTTGCCGCTGGAGTTC	H45_-1-10_25-35	33
25	GTTTGCCGCTGC	H45_21-32	34
26	CCTGGAGTTCCT	H45_-2-10	35
27	TGGAGTTCCT	H45_-2-8	36
28	CAGTTTGCCGCTGCCC	H45_19-34	37
29	TCTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTT	H45_2-14_53-65	38
30	AGACCTCCTGCCACCATCCTGGAGTT	H45_2-14_136-148	39
31	TTCTTCCCCAGTTGCGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15_52-66	11
32	CAGACCTCCTGCCACGCATCCTGGAGTTC	H45_1-15_135-149	12
33	GACCTCCTGCCACCATCCTGGAGTTC	H45_1-14_136-147	40

[0107] [Таблица 1-2]

34	TCCCCAGTTGCGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15_52-62	41
35	GACCTCCTGCCGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15_137-147	42
36	CTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-14_53-64	43
37	TTCCCCAGTTGCACATCCTGGAGTTC	H45_1-13_51-63	44
38	CCTCCTGCCACCGCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_133-145	45

39	ACCTCCTGCCACCCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_134-146	46
40	TTTCTTCCCCAGTCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_55-67	47
41	GCAGACCTCCTGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_138-150	48
42	TTCTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_52-66	49
43	CCCCAGTTGCATCTGGAGTTCCT	H45_-2-9_50-61	50
44	TTCTTCCCCAGTTGCCCTGGAGTTCC	H45_-1-10_52-66	51
45	CTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTTCCT	H45_-2-13_52-64	52
46	CAGACCTCCTGCCACTCCTGGAGTTC	H45_1-11_135-149	53
47	TGCAGACCTCCTGCCTCCTGGAGTTC	H45_1-11_137-151	54
48	CTGTTTGACAGACCCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_144-156	55
49	TTTGACAGACCTCCTGGAGTTCCTGTA	H45_-5-8_141-153	56
50	CCTGCCACCGCAGATGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15_128-142	57
51	ACCTCCTGCCACCGCTTGCCGCTGCCCAAT	H45_16-30_132-146	58
52	TCCTGTAGAATACCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_98-110	59
53	CTCCTGCCACCGCTGGCATCTGTTTT	H45_85-97_132-144	60
54	ACCTCCTGCCACCGCTCTTCCCCAGTTGCA	H45_51-65_132-146	61
55	TGGCATCTGTTTTTCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_85-97	62
56	TTATTTCTTCCCCAGTTCTGTAAGA	H45_-8-5_58-70	63
57	GCTTCCCAATGCCATCCTGGAGTTCC	H45_-1-15_114-123	64
58	GGCTTCCCAATGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15_114-124	65
59	TTTCTGTCTGACAGCTCCTGCCACCGCAGA	H45_129-143_156-170	66
60	TCCTGCCACCGCAGAGAGGATTGCTGAATT	H45_69-83_129-143	67
61	TCCTGCCACCGCAGACTGGCATCTGTTTTT	H45_84-98_129-143	68
62	TCCTGCCACCGCAGATTTTCTGTAGAATA	H45_99-113_129-143	69
63	GCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15	70
64	TTCTTCCCCAGTTGC	H45_52-66	71
65	CAGACCTCCTGCCAC	H45_135-149	72
66	TCCTGGAGTTCT	H45_-2-11	73
67	GTTTGCCGCTGCC	H45_20-32	74
68	CTCCTGCCACCGCGCCGCTGCCCAAT	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	TGGAGTTC	H45_1-8	78
72	CAGTTTGCCGCTGGAGTTCC	H45_-1-10_25-34	79
73	ACAGTTTGCCGCTGGAGTTCT	H45_-2-9_25-35	80
74	GTTTGCCGCTGCCTGGAGTTCC	H45_-1-8_20-32	81
75	AACAGTTTGCCCTGGAGTTCC	H45_-1-10_26-36	82
76	CAGTTTGCCGCTGGAGTTC	H45_1-10_25-34	83
77	CAGTTTGCCGCTCCTGGAGTTC	H45_1-11_24-34	84
78	AGTTTGCCGCTCCTGGAGTTC	H45_1-11_24-33	85
79	ACAGTTTGCCGCTGGAGTTCC	H45_-1-9_25-35	86
80	TGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCC	H45_-1-11_18-29	87
81	CTGCCACCGCAGCCGCTGCCCAATGC	H45_14-27_130-141	88
82	CCTGGAGTTCC	H45_-1-10	144
83	CAGTTTGCCG	H45_25-34	145
84	ACAGTTTGCCG	H45_25-35	146

[0109] [Пример 1]

4-{[(2S,6R)-6-(4-бензамидо-2-оксопиримидин-1(2H)-ил)-4-триморфолин-2-ил]метокси}-4-оксобутановую кислоту, загруженную на аминополитириловую смолу (Сравнительный пример 1), или 4-{[(2S,6R)-6-(5-метил-2,4-диоксопиримидин-1-ил)-4-триморфолин-2-ил]метокси}-4-оксобутановую кислоту, загруженную на аминополитириловую смолу (Сравнительный пример 2), или 4-{[(2S,6R)-6-(6-

бензамидопурин-9-ил)-4-триморфолин-2-ил]метокси}-4-оксобутановую кислоту, загруженную на аминополистироловую смолу (сравнительный пример 3), или 4-{{ (2S,6R)-6-{6-(2-цианоэтоксид)-2-[2-феноксиацетил]амино}пурин-9-ил}-4-триморфолин-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 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.) трифторуксусную кислоту. Используемый нейтрализующий/промывочный раствор получали путем растворения N,N-диизопропилэтиламина 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-диизопропилэтиламина 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. Осушенный 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 мМ буфера, состоящего из уксусной кислоты и триэтиламина (буфера ТЕАА), 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, $\varnothing 19 \times 50$ мм, 1 CV=14 мл)
Скорость потока	10 мл/минуту
Температура колонки	Комнатная температура
Раствор А	20 мМ буфера ТЕАА
Раствор В	CH ₃ CN
Градиент	(В) 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, $\varnothing 10 \times 108$ 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	(В) 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 (pH 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, $\varnothing 10 \times 50$ мм, 1 CV=4 мл)
Скорость потока	4 мл/минуту
Температура колонки	60°C
Раствор А	вода
Раствор В	CH ₃ CN
Градиент	(В) конц. 0% @ 50%/20 CV

[0118] Целевой продукт собирали и концентрировали при пониженном давлении. 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	TTGCCGCTGCCCACATCCTGGAGTTC	8520,95	8520,65
2	GTTTGCCGCTGCCCTCCTGGAGTTCCT	8542,94	8542,57
3	GCCGCTGCCCACATCCTGGAGTTCCT	8505,95	8506,57
4	CCGCTGCCCAATGTCCTGGAGTTCCT	8520,95	8521,37
5	TTGCCGCTGCCCACCTGGAGTTCCT	8511,94	8511,70
6	TTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCCT	8526,94	8527,07
7	TTTGCCGCTGCCCTCCTGGAGTTCCT	7857,71	7857,32
8	TGCCGCTGCCCGCCATCCTGGAGTTC	8521,95	8521,98
9	GTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCCT	7897,72	7897,71
10	CAGTTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCCT	9851,40	9851,60

5

10

15

20

11	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCCT	8551,95	8551,80
12	GTTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTC	8236,84	8236,69
13	CAGTTTGCCGCTGCTGGAGTTCCT	7921,73	7921,91
14	ACAGTTTGCCGCTCTGGAGTTCCT	7905,73	7905,53
15	CAGTTTGCCGCTGCCGGAGTTCCT	7906,73	7906,65
16	GTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTC	7567,61	7567,35
17	CAGTTTGCCGCTGCCGGAGTTCCTG	8261,85	8261,67
18	CCGCTGCCCAATGTGGAGTTCCTGT	8245,85	8245,68
19	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTC	7906,73	7906,70
20	CCGCTGCCCAATCTGGAGTTCCT	7520,61	7520,60
21	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTC	8221,84	8221,48
22	TTGCCGCTGCCCACTGGAGTTCCT	7866,72	7866,77
23	TTGCCGCTGCCCACTGGAGTTCCTGT	8551,95	8552,23
24	ACAGTTTGCCGCTGGAGTTC	7245,51	7245,48
25	GTTTGCCGCTGC	3912,36	3912,16
26	CCTGGAGTTCCT	3896,36	3896,12
27	TGGAGTTCCT	3266,14	3265,99
28	CAGTTTGCCGCTGCCC	5196,81	5196,30
29	TCTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTT	8510,93	8511,8
30	AGACCTCCTGCCACCATCCTGGAGTT	8513,95	8513,72
31	TTCTTCCCCAGTTGCGCCATCCTGGAGTTC	9826,39	9826,15
32	CAGACCTCCTGCCACGCATCCTGGAGTTC	9814,41	9813,82
33	GACCTCCTGCCACCATCCTGGAGTTC	8489,95	8490,01

[0120] [Таблица 6-2]

25

30

35

40

45

34	TCCCCAGTTGCGCCATCCTGGAGTTC	8520,95	8520,97
35	GACCTCCTGCCGCCATCCTGGAGTTC	8505,95	8506,48
36	CTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTTC	8495,94	8495,43
37	TTCCCCAGTTGCACATCCTGGAGTTC	8519,95	8520,35
38	CCTCCTGCCACCGCATCCTGGAGTTC	8465,94	8466,23
39	ACCTCCTGCCACCATCCTGGAGTTC	8449,94	8449,88
40	TTCTTCCCCAGTCATCCTGGAGTTC	8485,93	8486,01
41	GCAGACCTCCTGCCATCCTGGAGTTC	8529,96	8529,54
42	TTCTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTTC	9156,16	9156,62
43	CCCCAGTTGCATCTGGAGTTCCT	7535,61	7535,92
44	TTCTTCCCCAGTTGCCCTGGAGTTC	8486,93	8486,27
45	CTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTTCCT	9141,16	9141,18
46	CAGACCTCCTGCCACTCCTGGAGTTC	8489,95	8489,65
47	TGCAGACCTCCTGCCTCCTGGAGTTC	8520,95	8520,58
48	CTGTTTGCAGACCATCCTGGAGTTC	8559,96	8560,66
49	TTTGCAGACCTCCTGGAGTTCCTGTA	8574,96	8574,85
50	CCTGCCACCGCAGATGCCATCCTGGAGTTC	9854,42	9854,07
51	ACCTCCTGCCACCGCTTGCCGCTGCCCAAT	9750,39	9750,67
52	TCCTGTAGAATAACCATCCTGGAGTTC	8567,97	8567,11
53	CTCCTGCCACCGCTGGCATCTGTTTT	8486,93	8486,39
54	ACCTCCTGCCACCGCTTTCCCCAGTTGCA	9725,38	9725,57
55	TGGCATCTGTTTTTCATCCTGGAGTTC	8580,95	8580,81
56	TTATTCTTCCCCAGTTCTGTAAGA	8508,94	8508,7
57	GCTTCCCAATGCCATCCTGGAGTTC	8504,95	8504,88
58	GGCTTCCCAATGCCATCCTGGAGTTC	8544,96	8544,72
59	TTTCTGTCTGACAGCTCCTGCCACCGCAGA	9844,41	9844,1
60	TCCTGCCACCGCAGAGAGGATTGTGAATT	9957,45	9957,8
61	TCCTGCCACCGCAGACTGGCATCTGTTTT	9850,4	9850,45
62	TCCTGCCACCGCAGATTTCTGTAGAATA	9867,42	9867,85
63	GCCATCCTGGAGTTC	4905,71	4905,02
64	TTCTTCCCCAGTTGC	4831,68	4831,14

65	CAGACCTCCTGCCAC	4819,7	4819,64
66	TCCTGGAGTTCCT	4226,47	4226,03
67	GTTTGCCGCTGCC	4227,47	4227,48
68	CTCCTGCCACCGCGCCGCTGCCCAAT	8435,93	8436,58

5 [0121] [Таблица 6-3]

69	ATTCAGGCTTCCCTTCCCCAGTTGCA	8479,93	8479,03
70	TGGAGTTCC	2936,03	2936,07
71	TGGAGTTC	2620,92	2620,97
72	CAGTTTGCCGCTGGAGTTCC	6906,39	6906,44
73	ACAGTTTGCCGCTGGAGTTCCT	7260,51	7260,67
74	GTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCC	7252,5	7252,48
75	AACAGTTTGCCCTGGAGTTCC	7229,51	7229,07
76	CAGTTTGCCGCTGGAGTTC	6591,28	6591,07
77	CAGTTTGCCGCTCCTGGAGTTC	7236,5	7236,76
78	AGTTTGCCGCTCCTGGAGTTC	6921,39	6921,06
79	ACAGTTTGCCGCTGGAGTTCC	6930,4	6930,42
80	TGCCGCTGCCCATCCTGGAGTTCC	7851,72	7852,1
81	CTGCCACCGCAGCCGCTGCCCAATGC	8484,96	8484,68
82	CCTGGAGTTCC	3566,25	3566,51
83	CAGTTTGCCG	3251,14	3251,19
84	ACAGTTTGCCG	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 антисмысловые олигомеры, представленные в Таблице 1 в концентрации 1-10 мкМ 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 (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 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).

[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, инаktivация 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.

[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)

[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:

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

[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.

[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) трансфецировали олигомером согласно изобретению (РМО No. 11 или РМО 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 трансфецированных последовательностей представлены ниже.

[0128] [Таблица 7]

Комбинации трансфецированных последовательностей

Комбинация последовательностей	Концентрация для трансфекции (мкМ)
РМО No. 11 (РМО No. 27 и РМО No. 28, связанные друг с другом)	3 мкМ
РМО No. 27	3 мкМ
РМО No. 28	3 мкМ
РМО No. 27 и РМО No. 28	Каждый 3 мкМ
РМО No. 9 (РМО No. 25 и РМО No. 26, связанные друг с другом)	3 мкМ
РМО No. 25	3 мкМ
РМО No. 26	3 мкМ
РМО No. 25 и РМО No. 26	Каждый 3 мкМ
РМО No. 72 (РМО No. 82 и РМО No. 83, связанные друг с другом)	3 мкМ
РМО No. 82	3 мкМ
РМО No. 83	3 мкМ
РМО No. 82 и РМО 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, РМО No. 11 (SEQ ID NO: 10), РМО No.

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

[0130] [Пример испытания 3]

In vitro анализ

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

[0131] [Таблица 8-1]

Название последовательности	Нуклеотидная последовательность	SEQ ID NO:
H45_1-15_48-62	UCCCCAGUUGCAUUCGCCAUCCUGGAGUUC	89
H45_1-15_56-70	UUUUUUCUCCCCAGGCCAUCCUGGAGUUC	90
H45_1-15_131-145	CCUCCUGCCACCGCAGCCAUCCUGGAGUUC	91
H45_-2-13_131-145	CCUCCUGCCACCGCACAUCCUGGAGUCCU	92
H45_-2-13_135-149	CAGACCUCUGCCACCAUCCUGGAGUCCU	93
H45_-2-13_48-62	UCCCCAGUUGCAUCCAUCCUGGAGUCCU	94
H45_-2-13_52-66	UUCUCCCCAGUUGCCAUCCUGGAGUCCU	95
H45_-2-13_56-70	UUUUUUCUCCCCAGCAUCCUGGAGUCCU	96
H45_-2-13_18-32	GUUUGCCGCGUCCCAUCCUGGAGUCCU	97
H45_-2-13_139-153	UUUGCAGACCUCUGCAUCCUGGAGUCCU	98
H45_1-17_135-147	GACCUCUGGCCAUGCCAUCCUGGAGUUC	99
H45_1-17_52-64	CUUCCCCAGUUGCAUCCAUCCUGGAGUUC	100
H45_1-15_139-153	UUUGCAGACCUCUGGCCAUCCUGGAGUUC	101
H45_-2-13_99-113	UUUUCUGUAGAAUACAUCCUGGAGUCCU	102
H45_53-67_132-146	ACCUCUGCCACCGCUUUCUCCCCAGUUG	103
H45_16-30_99-113	UUUUCUGUAGAAUUGCCGUGCCCAAU	104
H45_1-15_153-167	CUGUCUGACAGCUGUGCCAUCCUGGAGUUC	105
H45_1-15_67-81	GGAUUGCUGAAUUAUGCCAUCCUGGAGUUC	106
H45_1-15_99-113	UUUUCUGUAGAAUAGCCAUCCUGGAGUUC	107
H45_1-13_46-58	CAGUUGCAUACAACAUCCUGGAGUUC	108
H45_1-13_54-66	UUCUCCCCAGUUAUCCUGGAGUUC	109
H45_1-13_62-74	UGAAUUAUUUCUUAUCCUGGAGUUC	110
H45_6-18_46-58	CAGUUGCAUCAAUAGCCAUCCUGG	111
H45_6-18_54-66	UUCUCCCCAGUUAUAGCCAUCCUGG	112
H45_6-18_62-74	UGAAUUAUUUCUUAUAGCCAUCCUGG	113
H45_1-13_121-133	GCAGAUUCAGGCUAUCCUGGAGUUC	114
H45_1-13_129-141	CUGCCACCGCAGACAUCCUGGAGUUC	115
H45_1-13_137-149	CAGACCUCUGCCCAUCCUGGAGUUC	116
H45_6-18_121-133	GCAGAUUCAGGCUAUAGCCAUCCUGG	117
H45_6-18_129-141	CUGCCACCGCAGAAUAGCCAUCCUGG	118
H45_6-18_137-149	CAGACCUCUGCCAUGCCAUCCUGG	142
H45_16-28_116-128	UUCAGGCUUCCAGCCGUGCCCAAU	119
H45_16-28_124-136	ACCGCAGAUUCAGGCCGUGCCCAAU	120

[0132] [Таблица 8-2]

	H45_16-28_132-144	CUCCUGCCACCGCGCCGUGCCCAAU	121
	H45_26-38_116-128	UUCAGGCUUCCCAACAACAGUUUGCC	122
	H45_26-38_124-136	ACCGCAGAUUCAGACAACAGUUUGCC	123
	H45_26-38_132-144	CUCCUGCCACCGCACAACAGUUUGCC	124
5	H45_51-63_110-122	CUUCCCAAUUUUUUUCCCCAGUUGCA	125
	H45_51-63_117-129	AUUCAGGCUUCCCUUCCCCAGUUGCA	126
	H45_51-63_124-136	ACCGCAGAUUCAGUUCCCCAGUUGCA	127
	H45_60-72_110-122	CUUCCCAAUUUUUAAUUAUUCUUCC	128
	H45_60-72_117-129	AUUCAGGCUUCCCAAUUAUUCUUCC	129
	H45_60-72_124-136	ACCGCAGAUUCAGAAUUAUUCUUCC	130
10	H45_68-80_110-122	CUUCCCAAUUUUUGAUUGCUGAAUUA	131
	H45_68-80_117-129	AUUCAGGCUUCCCGAUUGCUGAAUUA	132
	H45_68-80_124-136	ACCGCAGAUUCAGGAUUGCUGAAUUA	133
	H45_-10-5_52-66	UUCUCCCCAGUUGCAGUUCUGUAAGUA	134
	H45_-10-5_135-149	CAGACCUCUGCCACAGUUCUGUAAGUA	135
	H45_69-83_95-109	CCUGUAGAAUACUGGGAGGAUUGCUGAAUUA	136
15	H45_16-30_84-98	CUGGCAUCUGUUUUUUUGCCGUGCCCAAU	137
	H45_16-30_53-67	UUUCUCCCCAGUUGUUGCCGUGCCCAAU	138
	H45_1-15_84-98	CUGGCAUCUGUUUUUGCCAUCUGGAGUUC	139
	H45_84-98_132-146	ACCUCUGCCACCGCCUGGCAUCUGUUUUU	140
	H45_53-67_99-113	UUUUCUGUAGAAUUAUUCUCCCCAGUUG	141
	H45_1-15_52-66	UUCUCCCCAGUUGCGCAUCCUGGAGUUC	11
20	H45_1-15_135-149	CAGACCUCUGCCACGCCAUCCUGGAGUUC	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 антисмысловые олигомеры для исключения экзона 45 (Japan Bio Services Co., Ltd., Japan) (1 мкМ или 300 нМ) превращали в конъюгаты с липофектаминоом 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, инаktivация 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.

[0135] 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)

[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:

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

[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.

[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 (РМО No. 2, РМО No. 31 или РМО 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 Amaha Cell Line Nucleofector Kit L. Для этого использовали программу T-030. Комбинации трансфецированных последовательностей представлены ниже.

[0139] [Таблица 9]

Последовательность	Концентрация для трансфекции
РМО No. 2 (РМО No. 66 и РМО No. 67, связанные друг с другом)	3 мкМ или 10 мкМ
РМО No. 66	3 мкМ или 10 мкМ
РМО No. 67	3 мкМ или 10 мкМ
РМО No. 31 (РМО No. 63 и РМО No. 64, связанные друг с другом)	3 мкМ или 10 мкМ
РМО No. 63	3 мкМ или 10 мкМ
РМО No. 64	3 мкМ или 10 мкМ
РМО No. 32 (РМО No. 63 и РМО No. 65, связанные друг с другом)	3 мкМ или 10 мкМ
РМО 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, РМО No. 2 (SEQ ID NO: 7), РМО No. 31 (SEQ ID NO: 11) и РМО 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, РМО No. 66, РМО No. 63, РМО No. 64 или РМО No. 65).

Промышленное применение

[0141] Как можно видеть из результатов эксперимента, представленных в примерах испытаний, олигомер согласно изобретению, состоящий из коротких олигомеров, 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		NATIONAL CENTER OF NEUROLOGY AND PSYCHIATRY	
	<120>	Антисмысловая 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	
		gctcaggtcg 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 gcaggaggtc tgc	23
	<210>	6	
10	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400>	6	
		cattgggscag cggcaaaactg ttgtca	26
	<210>	7	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
20	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	7	
		gtttgccgct gccctctgga 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		cagtttgccg ctgcccatcc tggagttcct	30
	<210>	10	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
45	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	10	
		cagtttgccg ctgccctgga gttcct	26

	<210>	11		
	<211>	30		
	<212>	ДНК		
	<213>	Искусственная		
5	<220>			
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота		
	<400>	11		
		ttctttcccca gttgcgccat cctggagttc		30
	<210>	12		
10	<211>	30		
	<212>	ДНК		
	<213>	Искусственная		
	<220>			
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота		
15	<400>	12		
		cagacctcct gccacgccat cctggagttc		30
	<210>	13		
	<211>	176		
	<212>	ДНК		
20	<213>	Homo sapiens		
	<400>	13		
		gaactccagg atggcattgg gcagcggcaa actgttgtca gaacattgaa tgcaactggg		60
		gaagaaataa ttcagcaatc ctcaaaaaaca gatgccagta ttctacagga aaaattggga		120
		agcctgaatc tgcggtggca ggagggtctgc aaacagctgt cagacagaaa aaagag		176
25	<210>	14		
	<211>	26		
	<212>	ДНК		
	<213>	Искусственная		
	<220>			
30	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота		
	<400>	14		
		ttgccgctgc ccacatcctg gagttc		26
	<210>	15		
	<211>	26		
35	<212>	ДНК		
	<213>	Искусственная		
	<220>			
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота		
	<400>	15		
40		gccgctgccc acatcctgga gttcct		26
	<210>	16		
	<211>	26		
	<212>	ДНК		
	<213>	Искусственная		
45	<220>			
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота		
	<400>	16		
		ccgctgcccc 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		gtttgccgct gccatcctgg agttc	25
	<210>	22	
	<211>	24	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
45	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	22	
		cagtttgccg 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	
		cagtttgccg ctgccggagt tcct	24
	<210>	25	
	<211>	23	
	<212>	ДНК	
20	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	25	
		gtttgccgct gccctggagt tcc	23
25	<210>	26	
	<211>	25	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
30	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	26	
		cagtttgccg ctgccggagt tcctg	25
	<210>	27	
	<211>	25	
35	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	27	
40		ccgctgcccc atgtggagtt cctgt	25
	<210>	28	
	<211>	24	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
45	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	28	
		cagtttgccg ctgccctgga gttc	24

	<210>	29	
	<211>	23	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
5	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	29	
		ccgctgcccc atctggagtt cct	23
	<210>	30	
10	<211>	25	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400>	30	
		cagtttgccg ctgccctgga gttcc	25
	<210>	31	
	<211>	24	
	<212>	ДНК	
20	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	31	
		ttgccgctgc ccactggagt tcct	24
25	<210>	32	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
30	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	32	
		ttgccgctgc ccactggagt 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	
	cagtttgccg	ctgccc	16
25	<210>	38	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
30	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	38	
	tcttccccag	ttgccatcct ggagtt	26
	<210>	39	
	<211>	26	
35	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	39	
40	agacctcctg	ccaccatcct ggagtt	26
	<210>	40	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
45	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	40	
	gacctcctgc	caccatcctg gagttc	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 ccgcatcctg gagttc	26
	<210>	46	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
45	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	46	
		acctcctgcc acccatcctg gagttc	26

	<210>	47	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
5	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	47	
		tttcttcccc agtcacccctg gagttc	26
	<210>	48	
10	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400>	48	
		gcagacccccc tgccacccctg gagttc	26
	<210>	49	
	<211>	28	
	<212>	ДНК	
20	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	49	
		ttcttccccc gttgccatccc 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		ttcttccccc gttgccctgg agttcc	26
	<210>	52	
	<211>	28	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
45	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	52	
		cttccccagt tgccacccctg gagttcct	28

	<210>	53	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
5	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	53	
		cagacctsct gccactcctg gagttc	26
	<210>	54	
10	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400>	54	
		tgcagacstc ctgcctcctg gagttc	26
	<210>	55	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
20	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	55	
		ctgtttgcag acccatcctg 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	
		acctcctgcc accgcttgcc gctgccaat	30

	<210>	59	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
5	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	59	
		tcctgtagaa taccatcctg gagttc	26
	<210>	60	
10	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400>	60	
		ctcctgccac cgctggcatc tgtttt	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 ttatcatcctg 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 gcagagagga ttgctgaatt	30
25	<210>	68	
	<211>	30	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
30	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	68	
		tcctgccacc gcagactggc atctgttttt	30
	<210>	69	
	<211>	30	
35	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	69	
40		tcctgccacc gcagattttc 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	
		ttcttcccca gttgc	15
	<210>	72	
10	<211>	15	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400>	72	
		cagacctcct 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 cgcgccgctg cccaat	26
	<210>	76	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
45	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	76	
		attcaggctt cccttcccca 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	
		cagtttgccg 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		gtttgccgct 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	
		cagtttgccg cctggagttc	20
	<210>	84	
10	<211>	22	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400>	84	
		cagtttgccg ctccctggagt tc	22
	<210>	85	
	<211>	21	
	<212>	ДНК	
20	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	85	
		agtttgccgc 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		tgccgctgcc catcctggag ttcc	24
	<210>	88	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
45	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	88	
		ctgccaccgc agccgctgcc caatgc	26

	<210>	89	
	<211>	30	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
5	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	89	
		uссссaгуиg саииссgссaи ссигgагуиc	30
	<210>	90	
10	<211>	30	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400>	90	
		иiaииисиис сссaггссaи ссигgагуиc	30
	<210>	91	
	<211>	30	
	<212>	ДНК	
20	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	91	
		ссиссигссa ссгсагссaи ссигgагуиc	30
25	<210>	92	
	<211>	30	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
30	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	92	
		ссиссигссa ссгсасаиисс игgагуиисси	30
	<210>	93	
	<211>	30	
35	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	93	
40		саgассисси гссассаиисс игgагуиисси	30
	<210>	94	
	<211>	30	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
45	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	94	
		uссссaгуиg саииссаиисс игgагуиисси	30

	<210>	95	
	<211>	30	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
5	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	95	
		иисииисссса гиигсссаиисс иггагиуисси	30
	<210>	96	
10	<211>	30	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400>	96	
		ииаииисииис сссгагсаиисс иггагиуисси	30
	<210>	97	
	<211>	30	
	<212>	ДНК	
20	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	97	
		гиииигссгси гсссасаиисс иггагиуисси	30
25	<210>	98	
	<211>	30	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
30	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	98	
		ииигсагаисс иссигсаиисс иггагиуисси	30
	<210>	99	
	<211>	30	
35	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	99	
40		гассиссигс сасаигсссиу ссиггагиуисс	30
	<210>	100	
	<211>	30	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
45	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	100	
		сииссссаги игсаигсссиу ссиггагиуисс	30

	<210>	101	
	<211>	30	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
5	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	101	
		uuugcagacc uccuggcсаи ccuggaгуиc	30
	<210>	102	
10	<211>	30	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400>	102	
		uuuuccгуа гааиасаиcc uggaгуиccи	30
	<210>	103	
	<211>	30	
	<212>	ДНК	
20	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	103	
		accuccгсс accgcииccи ucccccагуиg	30
25	<210>	104	
	<211>	30	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
30	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	104	
		uuuuccгуа гааиаиugcc gcugccсаи	30
	<210>	105	
	<211>	30	
35	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	105	
40		сигусигаса gcugugccаи ccuggaгуиc	30
	<210>	106	
	<211>	30	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
45	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	106	
		ggaiugcга аииаиugccаи ccuggaгуиc	30

	<210>	107	
	<211>	30	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
5	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	107	
		uuuuuuccguu gaauagssau ccuggaguuc	30
	<210>	108	
10	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400>	108	
		сaguugcauu саасауссиг гагуиу	26
	<210>	109	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
20	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	109	
		uuuuuuuuuu guucauuccug гагуиу	26
25	<210>	110	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
30	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	110	
		угааиуаиуиуи суусауссиг гагуиу	26
	<210>	111	
	<211>	26	
35	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	111	
40		сaguugcauu сааааугсса уссигг	26
	<210>	112	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
45	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	112	
		uuuuuuuuuu гуаааугсса уссигг	26

	<210>	113	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
5	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	113	
		угааииаиии сииааиугсса иссигг	26
	<210>	114	
10	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400>	114	
		гсагаиисаг гсисаиуссиг гагиис	26
	<210>	115	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
20	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	115	
		сигссасссгс агасаиуссиг гагиис	26
25	<210>	116	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
30	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	116	
		сагаиссисси гсссаиуссиг гагиис	26
	<210>	117	
	<211>	26	
35	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	117	
40		гсагаиисаг гсиааиугсса иссигг	26
	<210>	118	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
45	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	118	
		сигссасссгс агаааиугсса иссигг	26

	<210>	119	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
5	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	119	
		uusagggcuuc ccaagccgcuu cccaau	26
	<210>	120	
10	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400>	120	
		accgagauu caggccgcuu cccaau	26
	<210>	121	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
20	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	121	
		cuccgcccac cgcgcccguu cccaau	26
25	<210>	122	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
30	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	122	
		uusagggcuuc ccaacaacag uuugcc	26
	<210>	123	
	<211>	26	
35	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	123	
40		accgagauu cagacaacag uuugcc	26
	<210>	124	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
45	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	124	
		cuccgcccac gcgacaacag uuugcc	26

	<210>	125	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
5	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	125	
		сииссссаиии ииииисссса гуигса	26
	<210>	126	
10	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400>	126	
		аиисаггсии ссссиисссса гуигса	26
	<210>	127	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
20	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	127	
		ассгсагаии сагиисссса гуигса	26
25	<210>	128	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
30	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	128	
		сииссссаиии иииаиииии исиисс	26
	<210>	129	
	<211>	26	
35	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	129	
40		аиисаггсии сссааиииии исиисс	26
	<210>	130	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
45	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	130	
		ассгсагаии сагааиииии исиисс	26

	<210>	131	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
5	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	131	
		сииссссаиии ииугаиуисси гааииа	26
	<210>	132	
10	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400>	132	
		аиисаггсиии сссгаиуисси гааииа	26
	<210>	133	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
20	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	133	
		ассгсагаиии саргаиуисси гааииа	26
25	<210>	134	
	<211>	30	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
30	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	134	
		иисиисссса гиугсагиис сигаагааа	30
	<210>	135	
	<211>	30	
35	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	135	
40		сарассисси гссасагиис сигаагааа	30
	<210>	136	
	<211>	30	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
45	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	136	
		ссигаагааи асигггагга иигсигааии	30

	<210>	137	
	<211>	30	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
5	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	137	
		cuggcaucug uuuuuuugcc gcugccsaau	30
	<210>	138	
10	<211>	30	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
15	<400>	138	
		uuuuiuuuuuu aguuuuuugcc gcugccsaau	30
	<210>	139	
	<211>	30	
	<212>	ДНК	
20	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	139	
		cuggcaucug uuuuuugccsaau ccuggauguu	30
25	<210>	140	
	<211>	30	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
30	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	140	
		accuucugcc accgscuggc aucuguuuuu	30
	<210>	141	
	<211>	30	
35	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	141	
40		uuuucugua gaauuuuuu ucccauguu	30
	<210>	142	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
45	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	142	
		cauaccissu gccaauugcc uccugg	26

	<210>	143	
	<211>	16	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная	
5	<220>		
	<223>	Синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	143	
		aaaaattggg aagcct	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	
		cagtttgccg	10
25	<210>	146	
	<211>	11	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
30	<223>	синтетическая нуклеиновая кислота	
	<400>	146	
		acagtttgcc g	11

(57) Формула изобретения

35 1. Антисмысловый 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;

45 (b) 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;

(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;

(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

(е) олигомерное звено, состоящее из нуклеотидной последовательности,

10 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.

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 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).

35 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 фосфориоатной связи, фосфордитиоатной связи, алкилфосфонатной связи, фосфорамидатной связи и боранофосфатной связи.

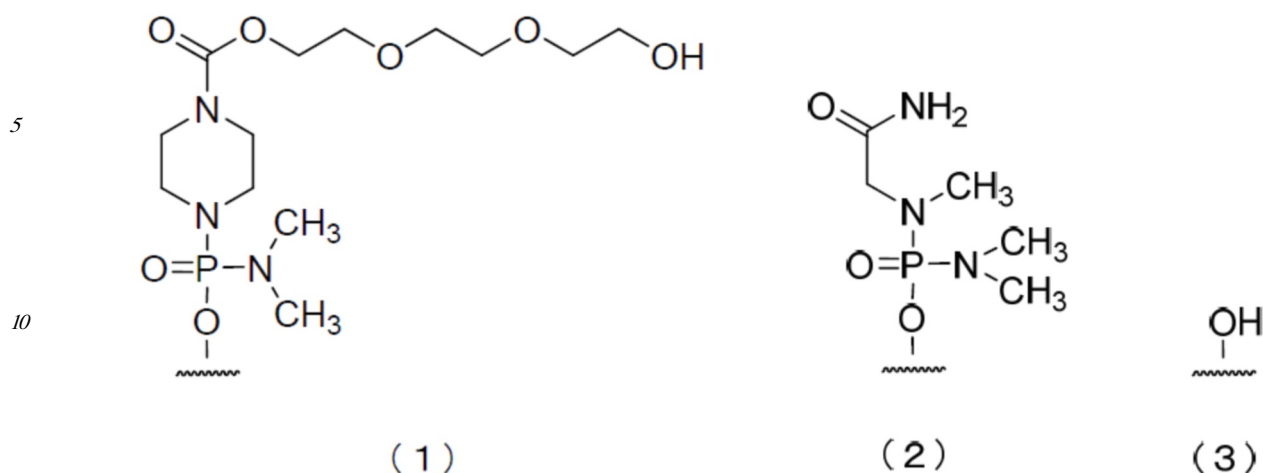
9. Антисмысловой олигомер по любому из пп. 1-4, который представляет собой морфолино-олигомер или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

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

11. Антисмысловой олигомер по п.4, который представляет собой фосфордиамидатный морфолино-олигомер или его фармацевтически приемлемую соль 45 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 антисмыслового 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 антисмыслового олигомера или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата по любому из пп. 1-12 для получения фармацевтической композиции для лечения мышечной дистрофии.

35 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;

45 (b) 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;

(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;

(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,

10 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.

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

20

25

30

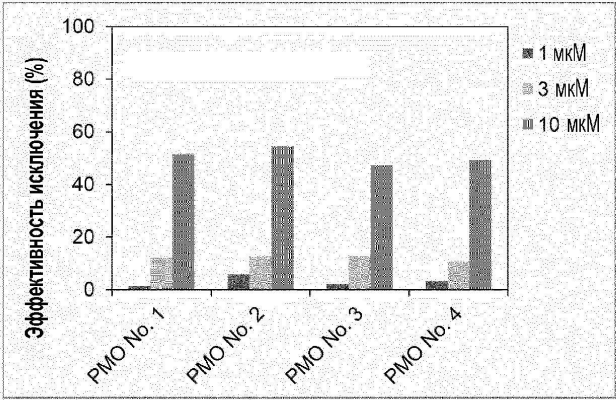
35

40

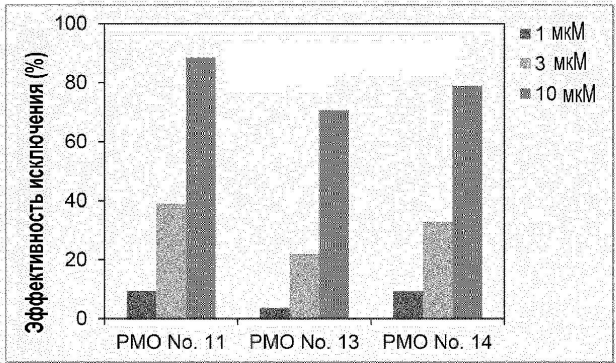
45

1

ФИГ. 1



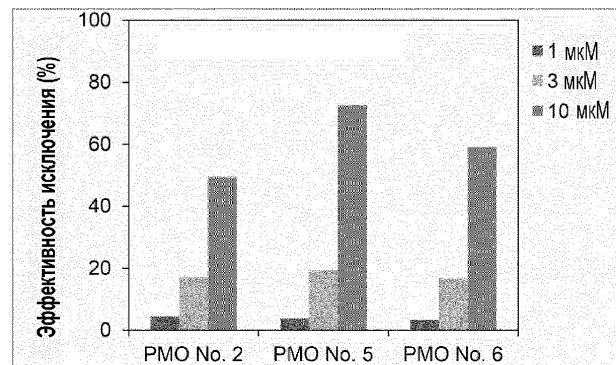
ФИГ. 2



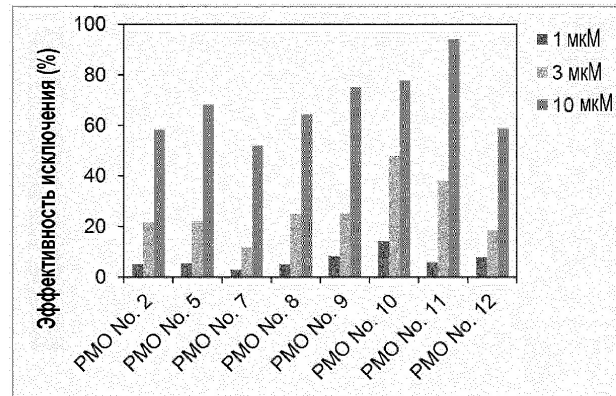
2

2/13

ФИГ. 3

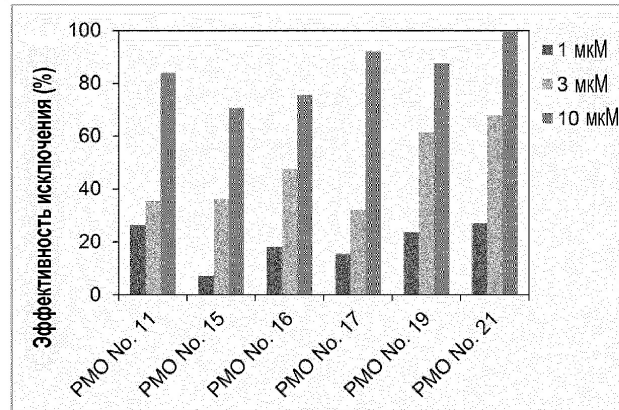


ФИГ. 4

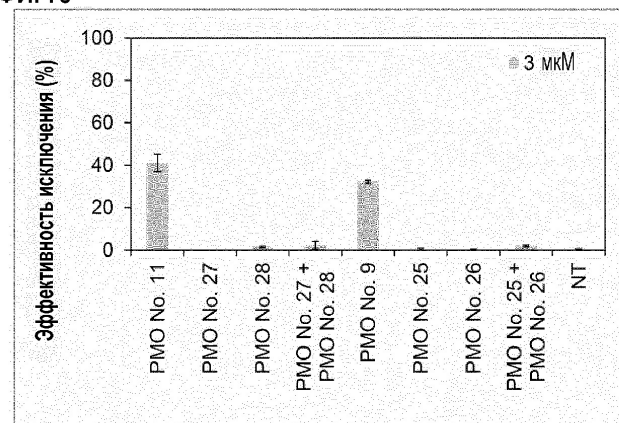


3/13

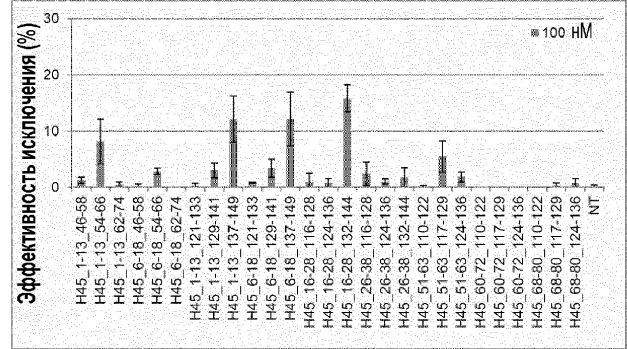
ФИГ. 5



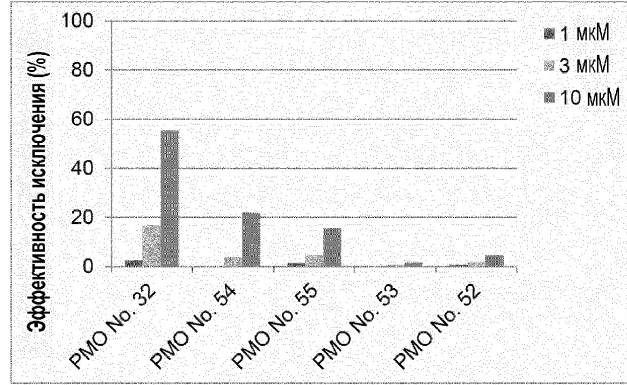
ФИГ. 6



ФИГ. 7

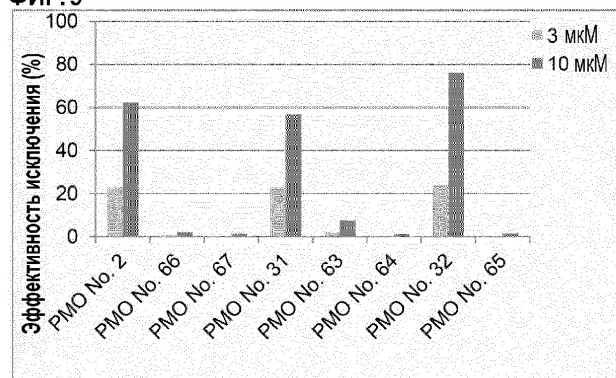


ФИГ. 8

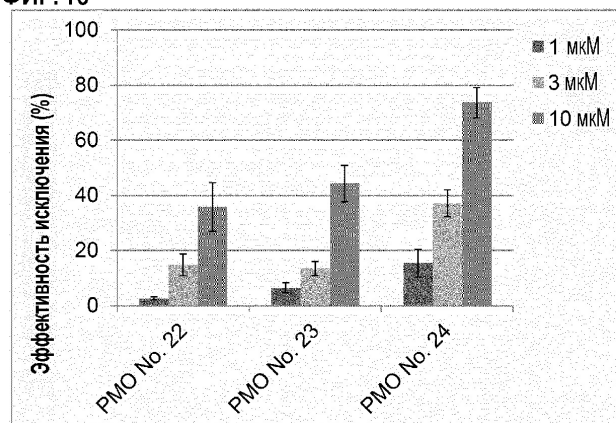


5/13

ФИГ. 9

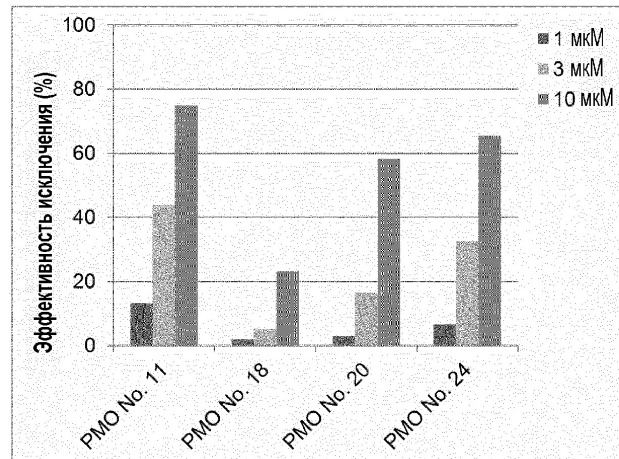


ФИГ. 10

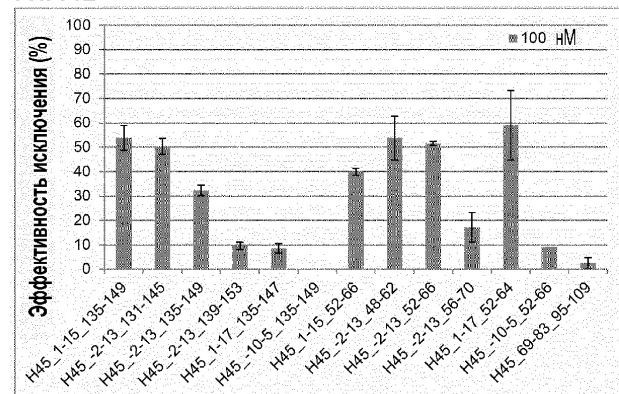


6/13

ФИГ. 11

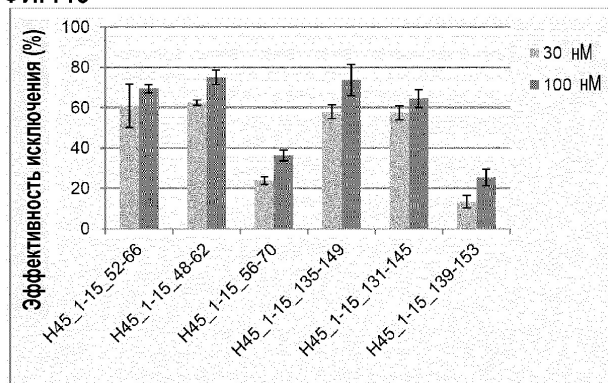


ФИГ. 12

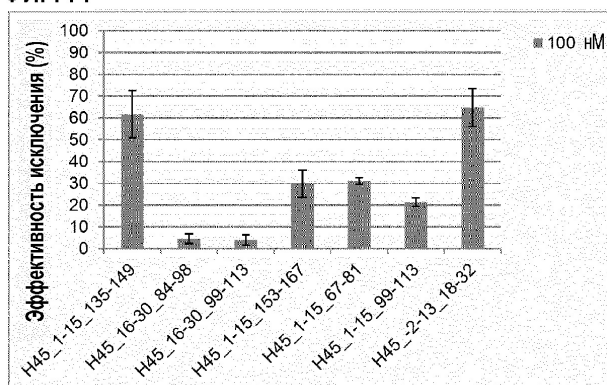


7/13

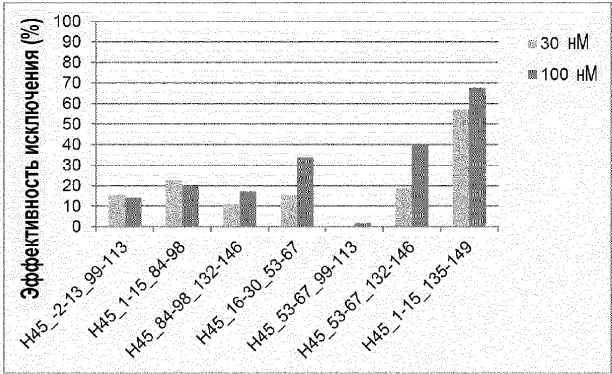
ФИГ. 13



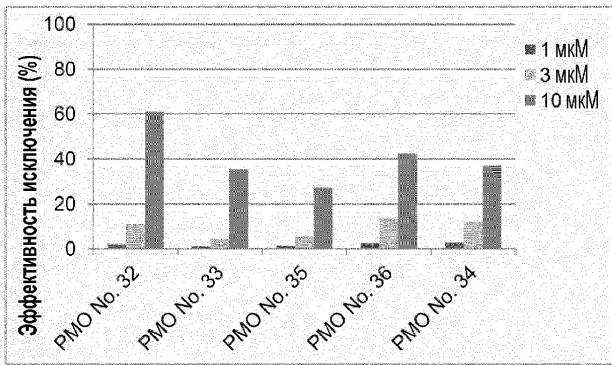
ФИГ. 14



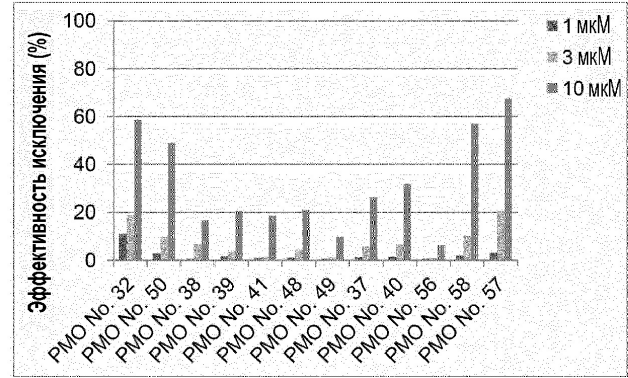
ФИГ. 15



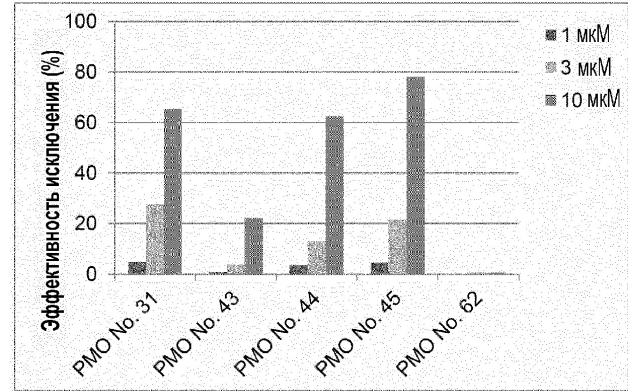
ФИГ. 16



ФИГ.17

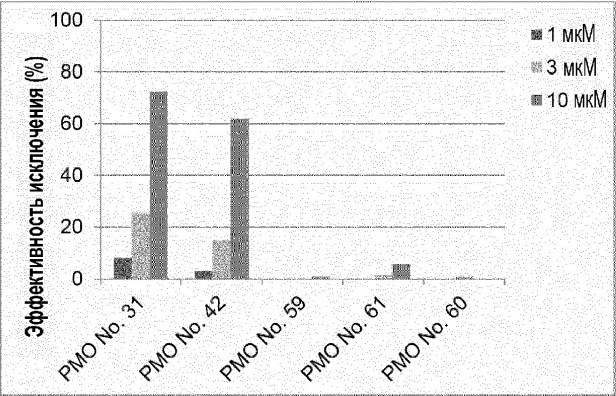


ФИГ.18

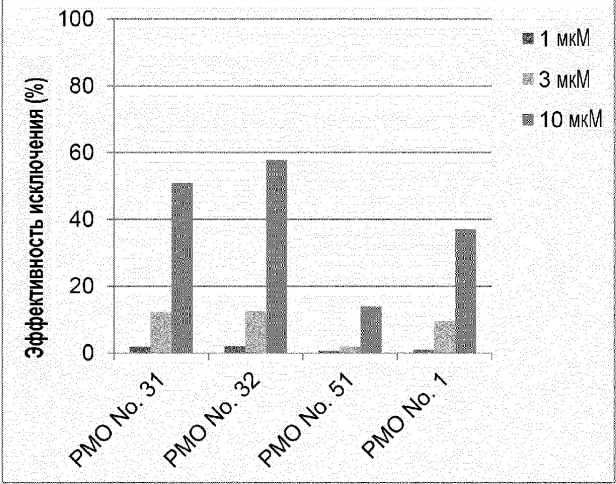


10/13

ФИГ. 19

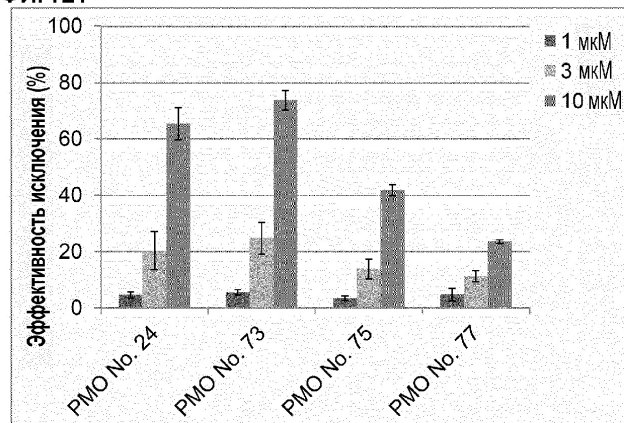


ФИГ. 20

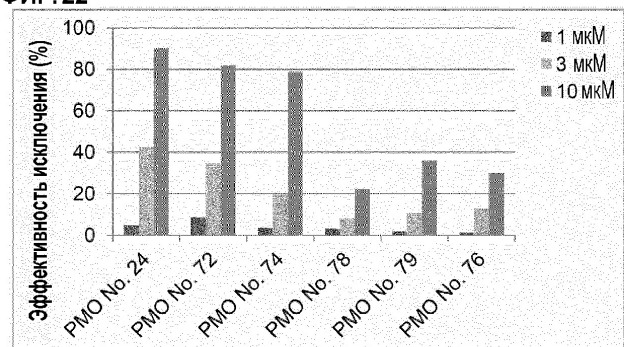


11/13

ФИГ. 21

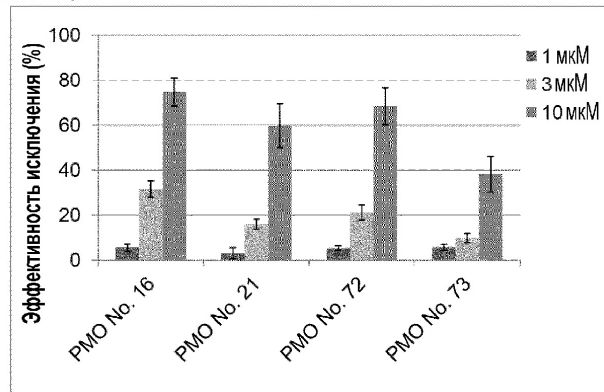


ФИГ. 22

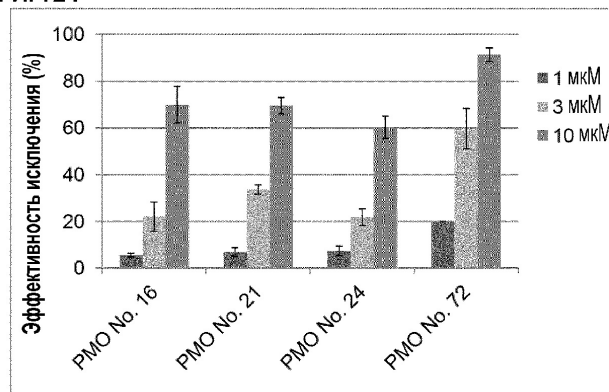


12/13

ФИГ. 23



ФИГ. 24



13/13

ФИГ. 25

