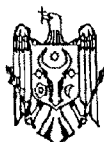




MD/EP 3554554 T2 2022.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3554554 (13) T2

(51) Int. Cl.: A61K 47/64 (2017.01.01)
A61P 21/00 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2019 1208 (22) Data de depozit: 2017.12.14 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 17832405.9, 2017.12.14 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3554554, 2019.10.23 (31) Numărul cererii prioritare: 201662436199 P; 201762443481 P; 201762479177 P; 201762562119 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.12.19; 2017.01.06; 2017.03.30; 2017.09.22 (33) Țara cererii prioritare: US; US; US; US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 12/2022, 2022.12.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 36/2022, 2022.09.07 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 12/2019, 2019.12.31
(71) Solicitant: SAREPTA THERAPEUTICS, INC., US (72) Inventatori: PASSINI Marco A., US; HANSON Gunnar J., US (73) Titular: SAREPTA THERAPEUTICS, INC., US (74) Mandatar autorizat: CORCODEL Angela	

(54) Conjuğați de oligomeri de omġtere a exonului, pentru distrofie musculară

(57) Rezumat:

1

Sunt descriși conjuğați de oligomeri antisens complementari unui situs țintă selectat în gena distrofinei umane pentru a induce omġterea exonului 45.

2

Secvențe: 8
Revendicări: 12
Figuri: 20

MD/EP 3554554 T2 2022.12.31

(54) Exon skipping oligomer conjugates for muscular dystrophy**(57) Abstract:**

1
Antisense oligomer conjugates
complementary to a selected target site in the
human dystrophin gene to induce exon 45
skipping are described.

2
Sequences: 8
Claims: 12
Fig.: 20

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****INFORMAȚII CONEXE**

5 Această cerere de brevet revendică beneficiul cererii de brevet provizorii U.S. Nr. 62/436.182, înregistrată la 19 decembrie 2016, cererii de brevet provizorii U.S. Nr. 62/443.476, înregistrată la 6 ianuarie 2017, cererii de brevet provizorii U.S. Nr. 62/479.173, înregistrată la 30 martie 2017 și al cererii de brevet provizorii U.S. Nr. 62/562.080, înregistrată la 22 septembrie 2017.

10 DOMENIUL DEZVĂLUIRII

Prezenta dezvoltare se referă la noi conjugați de oligomeri antisens adecvați pentru omiterea exonului 45 în gena distrofinei umane, și la compoziții farmaceutice ale acestora. Dezvăluirea furnizează, de asemenea, conjugați de oligomeri antisens și compoziții ale acestora pentru utilizare în inducerea omiterii exonului 45 care produce distrofina la un subiect care are o mutație a genei distrofinei care este
15 susceptibilă de omitere a exonului 45, și tratarea unui subiect care are o mutație a genei distrofinei care este susceptibilă de omitere a exonului 45.

CONTEXTUL DEZVĂLUIRII

20 Tehnologiile antisens sunt dezvoltate folosind o serie de reacții chimice pentru a afecta expresia genelor la o varietate de niveluri diferite (transcripție, îmbinare, stabilitate, traducere). O mare parte din aceste cercetări s-au concentrat pe utilizarea compușilor antisens pentru a corecta sau compensa genele anormale sau asociate bolii într-o gamă largă de indicații. Moleculele antisens sunt capabile să inhibe expresia genelor cu specificitate și, din această cauză, multe eforturi de cercetare privind oligomerii ca modulatori ai expresiei genelor s-au concentrat pe inhibarea expresiei genelor țintite sau a funcției
25 elementelor cu acțiune cis. Oligomerii antisens sunt în mod obișnuit îndreptați împotriva ARN-ului, fie a catenei sens (de exemplu, ARNm), fie a catenei minus în cazul unor ținte de ARN viral. Pentru a obține efectul dorit de reglare prin scădere a genei specifice, oligomerii, fie promovează dezintegrarea ARNm țintit, blochează traducerea ARNm, fie blochează funcția elementelor ARN cu acțiune cis, prevenind astfel eficient, fie sinteza proteinei țintă *de novo*, fie replicarea ARN-ului viral.

30 Cu toate acestea, astfel de tehnici nu sunt utile atunci când obiectivul este de a regla în sens crescător producția de proteină nativă, sau de a compensa mutațiile care induc terminarea prematură a traducerii, cum ar fi mutații nonsens sau de schimbare a cadrului. În aceste cazuri, transcriptul genei defecte nu trebuie supus degradării țintite sau inhibării sterice, astfel încât structura chimică a oligomerului antisens nu ar trebui să promoveze dezintegrarea ARNm-ului țintă sau să blocheze
35 traducerea.

Într-o varietate de boli genetice, efectele mutațiilor asupra exprimării eventuale a unei gene pot fi modulate printr-un proces de omitere a exonului țintit în timpul procesului de îmbinare. Procesul de îmbinare este condus de mecanisme complexe cu mai multe componente care aduc joncțiunile exon-intron adiacente din pre-ARNm în proximitate și realizează scindarea legăturilor fosfodiester la capetele
40 intronilor, cu formarea lor ulterioară din nou între exonii care urmează să fie îmbinați împreună. Acest proces complex și extrem de precis este mediat de motivele de secvență din pre-ARNm, care sunt segmente de ARN relativ scurte, semi-conservate, la care se leagă diverși factori nucleari de îmbinare care sunt apoi implicați în reacțiile de îmbinare. Prin schimbarea modului în care mecanismul de îmbinare citește sau recunoaște motivele implicate în procesarea pre-ARNm, este posibil să se creeze molecule de
45 ARNm îmbinate în mod diferențiat. S-a recunoscut acum că majoritatea genelor umane sunt îmbinate alternativ în timpul expresiei genice normale, deși mecanismele implicate nu au fost identificate. Bennett și colab. (Brevetul U.S. nr. 6,210,892) descriu modularea antisens a prelucrării ARNm celulare de tip sălbatic folosind analogi de oligomeri antisens care nu induc scindarea mediată de ARNaza H a ARN-ului țintă. Acest lucru își găsește utilitatea în a putea genera mARN-uri îmbinate alternativ care nu au exoni
50 specifici (vezi, de ex., așa cum este descris de Sazani, Kole și colab. 2007 pentru generarea de receptori solubili ai superfamiliei TNF care nu au exoni care codifică domeniile de acoperire a membranei).

În cazurile în care o proteină în mod normal funcțională este terminată prematur din cauza mutațiilor din aceasta, s-a dovedit că este posibil un mijloc de restabilire a producției de proteine funcționale prin tehnologia antisens prin intervenție în timpul proceselor de îmbinare și că, dacă exonii
55 asociați cu mutații care cauzează boli pot să fie șterși în mod specific din unele gene, se poate produce uneori un produs proteic scurtat care are proprietăți biologice similare cu proteina nativă sau care are o activitate biologică suficientă pentru a ameliora boala cauzată de mutațiile asociate cu exonul (vezi, de ex., Sierakowska, Sambade și colab. 1996; Wilton, Lloyd și colab. 1999; van Deutekom, Bremmer-Bout și colab. 2001; Lu, Mann și colab. 2003; Aartsma-Rus, Janson și colab. 2004). Kole și colab. (brevetele
60 U.S. numerele: 5,627,274; 5,916,808; 5,976,879; și 5,665,593) dezvoltă metode de combatere a

îmbinării aberante folosind analogi de oligomeri antisens modificați care nu promovează degradarea pre-ARNm țintă. Bennett și colab. (Brevetul U.S. nr. 6,210,892) descriu modularea antisens a prelucrării ARNm celulare de tip sălbatic folosind, de asemenea, analogi de oligomeri antisens care nu induc scindarea mediată de ARNază H a ARN-ului țintă.

Procesul de omitere a exonului țintit este probabil să fie deosebit de util în genele lungi în care există mulți exoni și introni, în care există redundanță în constituția genetică a exonilor sau în care o proteină este capabilă să funcționeze fără unu sau mai mulți anumiți exoni. Eforturile de redirecționare a prelucrării genelor pentru tratamentul bolilor genetice asociate cu trunchiere cauzată de mutații în diferite gene, s-au concentrat pe utilizarea oligomerilor antisens care fie: (1) se suprapun complet sau parțial cu elementele implicate în procesul de îmbinare; fie (2) se leagă de pre-ARNm într-o poziție suficient de apropiată de element pentru a perturba legarea și funcția factorilor de îmbinare care ar media în mod normal o anumită reacție de îmbinare care are loc la acel element.

Distrofia musculară Duchenne (DMD) este cauzată de un defect în exprimare a proteinei distrofina. Gena care codifică proteina conține 79 de exoni răspândiți pe peste 2 milioane de nucleotide de ADN. Orice mutație exonică care schimbă cadrul de citire al exonului, sau introduce un codon de oprire, sau este caracterizată prin îndepărtarea unui întreg exon sau de exoni din afara cadrului, sau dublează unu sau mai mulți exoni, are potențialul de a perturba producția de distrofina funcțională, rezultând DMD

O formă mai puțin severă de distrofie musculară, distrofia musculară Becker (DMO) s-a descoperit că apare atunci când o mutație, de obicei, o ștergere a unui sau mai multor exoni, are ca rezultat un cadru corect de citire de-a lungul întregului transcript al distrofinei, astfel încât traducerea ARNm în proteină nu este oprită prematur. Dacă îmbinarea exonilor din amonte și din aval în procesarea unui pre-ARNm de distrofina mutantă menține cadrul de citire corect al genei, rezultatul este un ARNm care codifică o proteină cu o ștergere scurtă internă care păstrează o anumită activitate, rezultând un fenotip Becker.

De mulți ani se știe că ștergerea unui exon sau a exonilor care nu modifică cadrul de citire al unei proteine distrofina ar da naștere unui fenotip BMD, în timp ce o ștergere a exonului care provoacă o schimbare a cadrului va da naștere la DMD (Monaco, Bertelson și colab. 1988). În general, mutațiile distrofinei, incluzând mutațiile punctiforme și ștergerile exonilor care schimbă cadrul de citire și astfel întrerup traducerea adecvată a proteinei, au ca rezultat DMD. De asemenea, trebuie remarcat faptul că unii pacienți cu DMO și DMD au ștergeri de exon care acoperă mai mulți exoni.

Modularea îmbinării pre-ARNm al distrofinei mutante cu oligoribonucleotide antisens a fost raportată, atât *in vitro* (vezi, *de ex.*, Matsuo, Masumura și colab. 1991; Takeshima, Nishio și colab. 1995; Pramono, Takeshima și colab. 1996; Dunckley, Eperon și colab. 1997; Dunckley, Manoharan și colab. 1998; Wilton, Lloyd și colab. 1999; Mann, Honeyman și colab. 2002; Errington, Mann și colab. 2003).

Oligomerii antisens au fost special concepuți pentru a ținti regiuni specifice ale pre-ARNm, de obicei, exoni pentru a induce omiterea unei mutații a genei DMD, restabilind astfel aceste mutații din afara cadrului în cadru pentru a permite producerea de proteine distrofina scurtate intern, dar totuși funcționale. Se știe că astfel de oligomeri antisens țintesc complet în interiorul exonului (așa numitele secvențe interne ale exonului) sau la o joncțiune donor de îmbinare sau acceptor de îmbinare care traversează de la exon într-o porțiune a intronului.

Descoperirea și dezvoltarea unor astfel de oligomeri antisens pentru DMD a fost un domeniu de cercetare anterioară. Aceste evoluții includ cele din: (1) University of Western Australia și Sarepta Therapeutics (cesionar al acestei cereri): WO 2006/000057; WO 2010/048586; WO 2011/057350; WO 2014/100714; WO 2014/153240; WO 2014/153220; (2) Academisch Ziekenhuis Leiden/Prosensa Technologies (acum BioMarin Pharmaceutical): WO 02/24906; WO 2004/083432; WO 2004/083446; WO 2006/112705; WO 2007/133105; WO 2009/139630; WO 2009/054725; WO 2010/050801; WO 2010/050802; WO 2010/123369; WO 2013/112053; WO 2014/007620; (3) Carolinas Medical Center: WO 2012/109296; (4) Royal Holloway: brevete și cereri care revendică beneficiul priorității, și includ, cererile US. Nr. 61/096.073 și 61/164.978; cum ar fi US 8.084.601 și US 2017-0204413 (4) JCR Pharmaceuticals and Matsuo: US 6,653,466; brevete și cereri care revendică beneficiul, și care includ, JP 2000-125448, cum ar fi US 6,653,467; brevete și cereri care revendică beneficiul și care includ, JP 2000-256547, cum ar fi US 6,727,355; WO 2004/048570; (5) Nippon Shinyaku: WO 2012/029986; WO 2013/100190; WO 2015/137409; WO 2015/194520; și (6) Association Institut de Myologie/Universite Pierre et Marie Curie/Universit t Bern/Centre national de la Recherche Scientifique/Synth na AG: WO 2010/115993; WO 2013/053928.

În plus, WO 2017/062835 A2 dezvăluie oligomeri antisens modificați pentru tratamentul distrofiei musculare Duchenne și al tulburărilor asociate. Oligomerii dezvăluiți aici cuprind o secvență de țintire complementară cu 12 sau mai multe nucleotide contigue dintr-o regiune țintă care cuprinde un exon de pre-ARNm de distrofina umană și cel puțin o subunitate care este un analog de nucleotide care

are (i) o legătură internucleozidă modificată, (ii) un fragment de zahăr modificat sau (iii) o combinație a celor de mai sus.

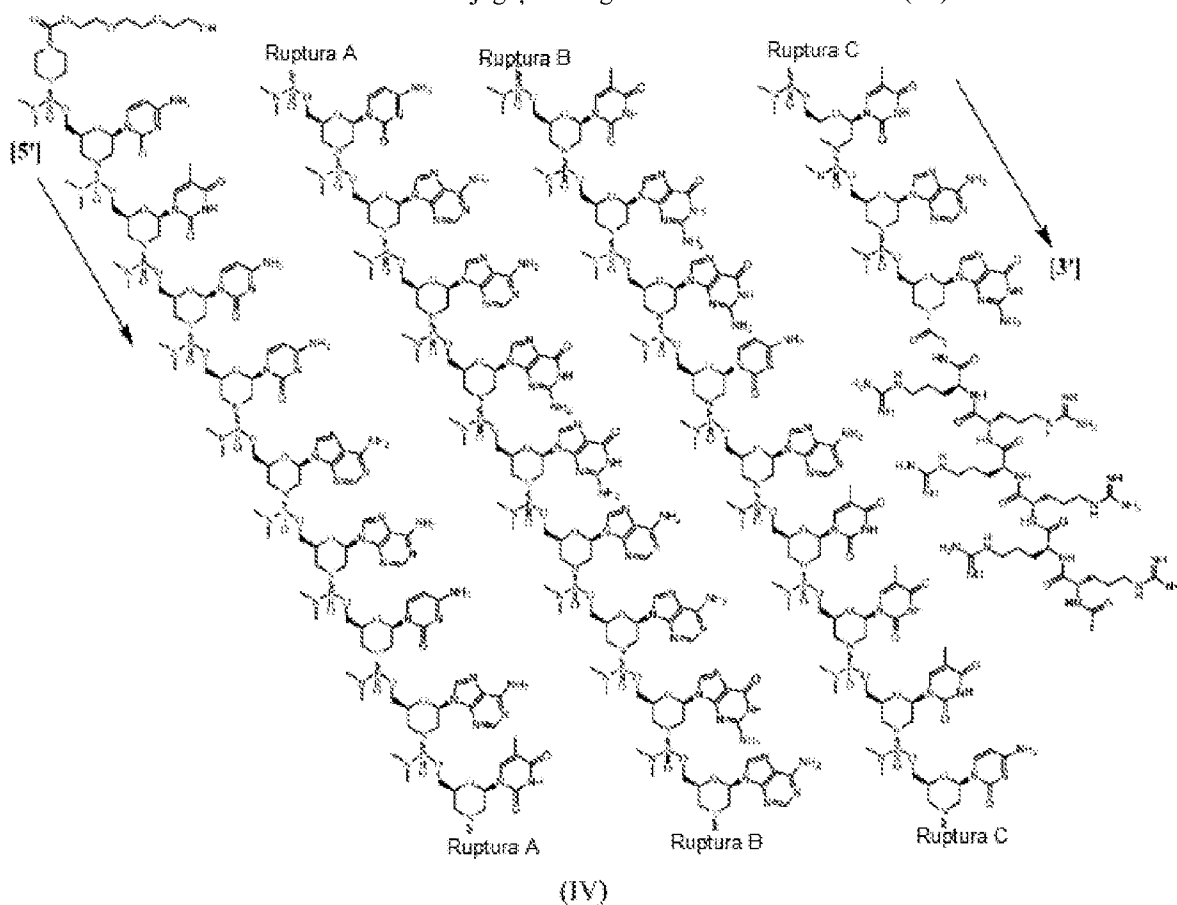
Descoperirea și dezvoltarea oligomerilor antisens conjugați cu peptide care pătrund celulele pentru DMD a fost, de asemenea, un domeniu de cercetare (vezi Publicația PCT Nr. WO 2010/048586; Wu, B. și colab., The American Journal of Pathology, vol. 181 (2): 392-400, 2012; Wu, R. și colab., Nucleic Acids Research, Vol. 35 (15): 5182-5191, 2007; Mulders, S. și colab., Al 19-lea Congres Internațional al World Muscle Society, Poster Presentation Berlin, octombrie 2014; Bestas, B. și colab., The Journal of Clinical Investigation, doi: 10.1172/JCI76175, 2014; Jearawiriyapaisarn, N. și colab., Molecular Therapy, Vol. 16(9): 1624-1629, 2008; Jearawiriyapaisarn, N. și colab., Cardiovascular Research, Vol. 85: 444-453, 2010; Moulton, H.M. și colab., Biochemical Society Transactions, Vol. 35 (4): 826-828, 2007; Yin, H. și colab., Molecular Therapy, Vol. 19 (7): 1295-1303, 2011; Abes, R. și colab., J. Pept. Sci., voi. 14: 455-460, 2008; Lebleu, B. și colab., Advanced Drug Delivery Reviews, Vol. 60: 517-529, 2008; McClorey, G. și colab., Gene Therapy, Vol. 13: 1373-1381, 2006; Alter, J. și colab., Nature Medicine, Voi. 12 (2): 175-177, 2006; și Youngblood, D. și colab., American Chemical Society, Bioconjugate Chem., 2007, 18 (1), pp. 50-60). Mai mult, WO 2012/150960 dezvăluie analogi de oligonucleotidă conjugați cu peptide purtătoare. Conjugații dezvăluite sunt descriși ca fiind utili pentru tratamentul diverselor boli, de exemplu boli în care inhibarea exprimării proteinei sau corectarea produselor aberante de îmbinare ARNm produce efecte terapeutice benefice.

Peptidele care pătrund în celule (CPP), de exemplu, un fragment de transport de peptidă bogată în arginină, pot fi eficiente pentru a îmbunătăți penetrarea într-o celulă, de exemplu, a unui oligomer antisens conjugat cu CPP.

În ciuda acestor eforturi, rămâne o nevoie de oligomeri antisens îmbunătățiți care țintesc exonul 45 și de compoziții farmaceutice corespunzătoare care sunt potențial utile pentru metodele terapeutice pentru producerea distrofiei și tratarea DMD.

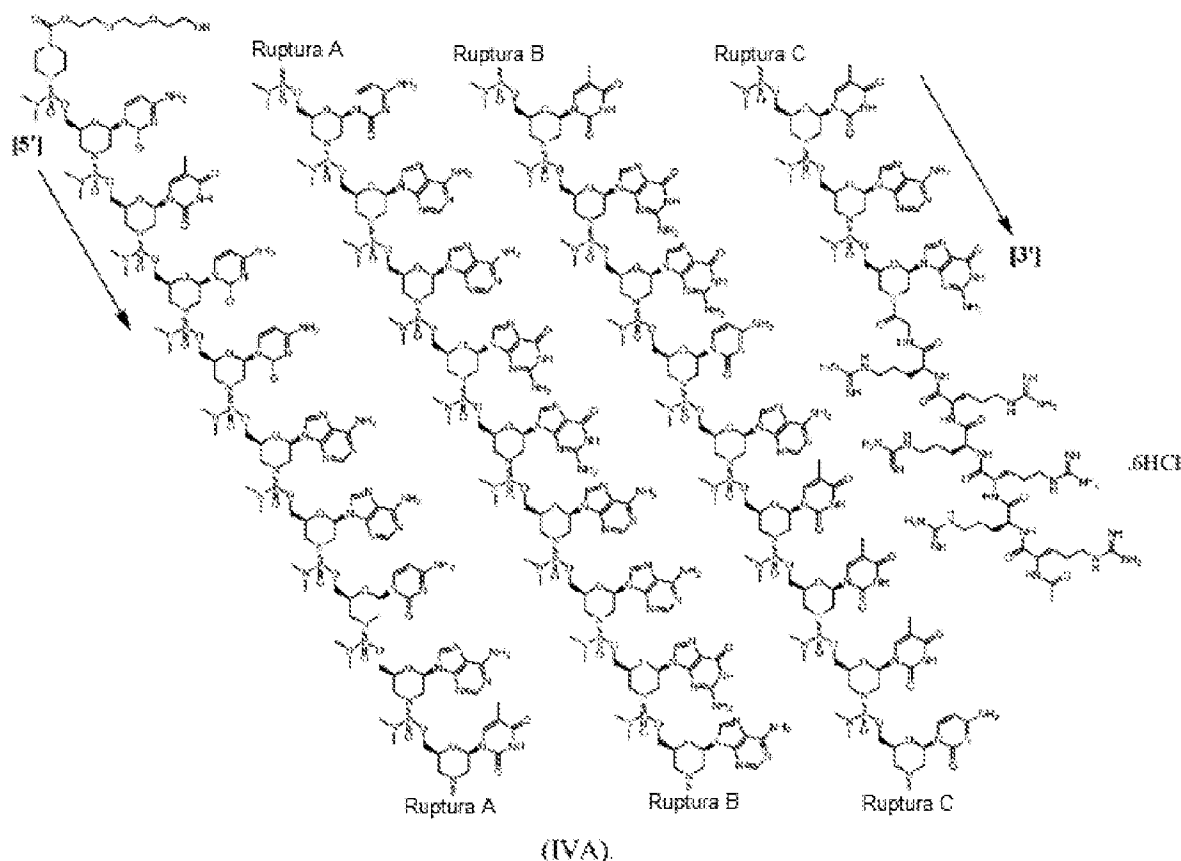
EXPUNEREA PE SCURT A DEZVĂLUIRII

Prezenta dezvăluire furnizează conjugați de oligomeri antisens cu Formula (IV):



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

Într-un alt aspect, dezvăluirea furnizează conjugați de oligomeri antisens cu Formula (IVA):



Într-un alt aspect, dezvăluirea furnizează compoziții farmaceutice care includ conjugații de oligomeri antisens din dezvăluire și un purtător acceptabil farmaceutic. În unele variante de realizare, purtătorul acceptabil farmaceutic este o soluție salină care include un tampon fosfat.

Într-un alt aspect, dezvăluirea furnizează conjugați de oligomeri antisens ca mai sus, și compoziții ale acestora pentru utilizare în tratarea distrofiei musculare Duchenne (DMD) la un subiect care are nevoie de aceasta, în care subiectul are o mutație a genei distrofinei care este susceptibilă de omitere a exonului 45.

Într-un alt aspect, dezvăluirea furnizează conjugați de oligomeri antisens ca mai sus, și compoziții ale acestora pentru utilizare în restabilirea unui cadru de citire a ARNm pentru a induce producția de distrofina la un subiect care are o mutație a genei distrofinei care este susceptibilă de omitere a exonului 45. Într-un alt aspect, dezvăluirea furnizează conjugați de oligomeri antisens ca mai sus, și compoziții ale acestora pentru utilizare în excluderea exonului 45 din pre-ARNm de distrofina în timpul prelucrării ARNm la un subiect care are o mutație a genei distrofinei care este susceptibilă de omitere a exonului 45. Într-un alt aspect, dezvăluirea furnizează conjugați de oligomeri antisens ca mai sus, și compoziții ale acestora pentru utilizare în legarea exonului 45 al pre-ARNm de distrofina la un subiect care are o mutație a genei distrofinei care este susceptibilă de omitere a exonului 45.

Într-un alt aspect, dezvăluirea furnizează un conjugat de oligomer antisens din dezvăluirea de aici pentru utilizare în terapie. Într-un alt aspect, dezvăluirea furnizează, de asemenea, kituri pentru tratarea distrofiei musculare Duchenne (DMD) la un subiect care are nevoie de aceasta, în care subiectul are o mutație a genei distrofinei care este susceptibilă de omitere a exonului 45, kituri care cuprind cel puțin un conjugat de oligomer antisens din prezenta dezvăluire, ambalat într-un recipient adecvat, și instrucțiuni pentru utilizarea acestuia.

Acestea și alte obiecte și caracteristici vor fi înțelese mai pe deplin atunci când următoarea descriere detaliată a dezvăluirii este citită împreună cu figurile.

SCURTĂ DESCRIERE A FIGURILOR

Figura 1 ilustrează o secțiune de pre-ARNm de distrofina normală și ARNm matur.

Figura 2 ilustrează o secțiune de pre-ARNm anormal de distrofina (exemplu de DMD) și distrofina nefuncțională, instabilă rezultată.

Figura 3 (nu face parte din prezenta invenție) ilustrează eteplirsen, conceput pentru a omite exonul 51, restabilirea citirii "în cadru" a pre-ARNm pentru a produce distrofina ștersă intern.

Figurile 4A-4D (nu fac parte din prezenta invenție) furnizează imagini reprezentative ale analizei Western Blot care măsoară proteina distrofină în cvadriiceps la șoareci mdx tratați cu PMO (PMO4225) sau PPMO (PPMO4225) pentru diferite momente de timp [7 zile (5A), 30 de zile (5B), 60 de zile (5C) și 90 de zile (5D)].

5 **Figura 5A** (nu face parte din prezenta invenție) furnizează un grafic cu linii care ilustrează procentul de distrofină de tip sălbatic indus de către PMO (PMO4225) sau PPMO (PPMO4225) în cvadriicepsul șoarecilor mdx pe parcursul a 90 de zile după injectare, așa cum este determinat prin analiza Western Blot.

10 **Figura 5B** (nu face parte din prezenta invenție) furnizează un grafic liniar care ilustrează procentul de omitere a exonului 23 indusă de PMO (PMO4225) sau PPMO (PPMO4225) în cvadriicepsul șoarecilor mdx pe parcursul a 90 de zile după injectare, așa cum este determinat prin RT-PCR.

Figurile 6A-6D (nu fac parte din prezenta invenție) furnizează imagini reprezentative ale analizei Western Blot care măsoară proteina distrofină în diafragma șoarecilor mdx tratați cu PMO (PMO4225) sau PPMO (PPMO4225) pentru diferite momente de timp [7 zile (7A), 30 de zile (7B), 60 de zile (7C) și 90 de zile (7D)].

15 **Figura 7A** (nu face parte din prezenta invenție) furnizează un grafic cu linii care ilustrează procentul de distrofină de tip sălbatic indus de PMO (PMO4225) sau PPMO (PPMO4225) în diafragma șoarecilor mdx la 90 de zile după injectare, așa cum este determinat prin analiza Western Blot.

20 **Figura 7B** (nu face parte din prezenta invenție) furnizează un grafic liniar care ilustrează procentul de omitere a exonului 23 indus de PMO (PMO4225) sau PPMO (PPMO4225) în diafragma șoarecilor mdx pe parcursul a 90 de zile după injectare, așa cum este determinat prin RT-PCR.

Figurile 8A-8D (nu fac parte din prezenta invenție) furnizează imagini reprezentative ale analizei Western Blot care măsoară proteina distrofină în inima șoarecilor mdx tratați cu PMO (PMO4225) sau PPMO (PPMO4225) pentru diferite momente de timp [7 zile (9A), 30 de zile (9B), 60 de zile (9C) și 90 de zile (9D)].

25 **Figura 9A** (nu face parte din prezenta invenție) furnizează un grafic cu linii care ilustrează procentul de distrofină de tip sălbatic indus de PMO (PMO4225) sau PPMO (PPMO4225) în inima șoarecilor mdx pe parcursul a 90 de zile după injectare, așa cum este determinat prin analiza Western Blot.

30 **Figura 9B** (nu face parte din prezenta invenție) furnizează un grafic liniar care ilustrează procentul de omitere a exonului 23 indusă de PMO (PMO4225) sau PPMO (PPMO4225) în inima șoarecilor mdx pe parcursul a 90 de zile după injectare, așa cum este determinat prin RT-PCR.

Figura 10 (nu face parte din prezenta invenție) furnizează o analiză imunohistochimică care arată distrofina indusă de către PMO (PMO4225) sau PPMO (PPMO4225) în cvadriicepsul stâng al șoarecelui mdx.

35 **Figurile 11A-B** (nu fac parte din prezenta invenție) furnizează imagini reprezentative ale analizei Western Blot care măsoară proteina distrofină în inima șoarecilor mdx tratați cu PMO (PMO4225) sau PPMO (PPMO4225), pentru diferite doze: 40 mg/kg, 80 mg/kg și 120 mg/kg.

40 **Figura 12** (nu face parte din prezenta invenție) furnizează un grafic cu bare care ilustrează procentul de distrofină de tip sălbatic indus de PMO (PMO4225) sau PPMO (PPMO4225) în inima șoarecilor mdx, așa cum este determinat prin analiza Western Blot la 30 de zile după injectare la diferite doze: 40 mg/kg, 80 mg/kg și 120 mg/kg.

Figurile 13A-B (nu fac parte din prezenta invenție) furnizează imagini reprezentative ale analizei Western Blot care măsoară proteina distrofină în diafragma șoarecilor mdx tratați cu PMO (PMO4225) sau PPMO (PPMO4225) pentru diferite doze de 40 mg/kg, 80 mg/kg și 120 mg/kg.

45 **Figura 14** (nu face parte din prezenta invenție) furnizează un grafic cu bare care ilustrează procentul de distrofină de tip sălbatic indus de PMO (PMO4225) sau PPMO (PPMO4225) în diafragma șoarecilor mdx, așa cum a fost determinat prin analiza Western Blot la 30 de zile după injectare la diferite doze: 40 mg/kg, 80 mg/kg și 120 mg/kg.

50 **Figurile 15A-B** (nu fac parte din prezenta invenție) furnizează imagini reprezentative ale analizei Western Blot care măsoară proteina distrofină în cvadriicepsul șoarecilor mdx tratați cu PMO (PMO4225) sau PPMO (PPMO4225) pentru doze diferite: 40 mg/kg, 80 mg/kg și 120 mg/kg.

55 **Figura 16** (nu face parte din prezenta invenție) furnizează un grafic cu bare care ilustrează procentul de distrofină de tip sălbatic indus de PMO (PMO4225) sau PPMO (PPMO4225) în cvadriicepsul șoarecilor mdx, așa cum este determinat prin analiza Western Blot, la 30 de zile după injectare la diferite doze: 40 mg/kg, 80 mg/kg și 120 mg/kg.

Figura 17 prezintă ciclurile de cuplare efectuate prin metoda B de sinteză a PMO.

Figura 18 (nu face parte din prezenta invenție) furnizează o analiză imunohistochimică care arată distrofina și laminina din diafragma și inima de șoarece mdx, induse de PPMO (PPMO4225), în comparație cu soluția salină, la șoarecii mdx și la șoarecii de tip sălbatic.

60 **Figura 19** furnizează un grafic cu bare al procentului de omitere a exonului 45 din mioblastele umane sănătoase, de către PMO#1 și PPMO#1 la diferite concentrații, la 96 de ore după tratament, așa cum este

măsurat prin RT-PCR. Barele de eroare ilustrează media $\pm$ SD. *Numărul x* denotă o modificare relativă a procentului de omitere a exonului de către PPMO#1 în comparație cu PMO#1 la fiecare concentrație. *, ** și *** indică o diferență semnificativă între PMO#1 și PPMO#1 cu valoarea $p < 0,05$, $0,005$ și, respectiv, $0,0005$.

Figura 20 furnizează un grafic cu bare al procentului de omitere a exonului 51 în miotuburi umane sănătoase, de către PMO#1 și PPMO#1 la diferite concentrații, la 96 de ore după tratament, așa cum a fost măsurat prin RT-PCR. Barele de eroare ilustrează media $\pm$ SD. *Numărul x* denotă o modificare relativă a procentului de omitere a exonului de către PPMO#1 în comparație cu PMO#1 la fiecare concentrație. ** și **** indică o diferență semnificativă între PMO#1 și PPMO#1 cu valoarea $p < 0,005$ și, respectiv, $0,0005$.

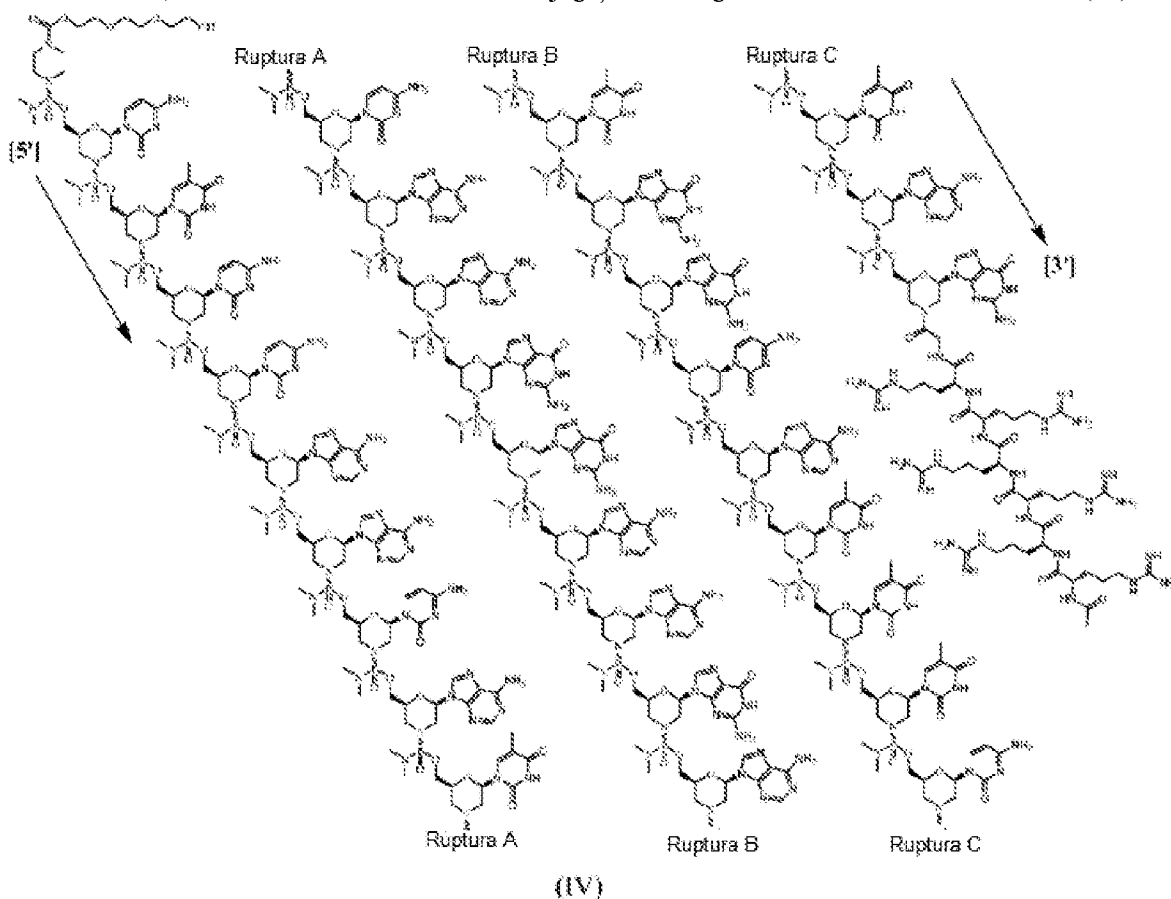
DESCRIEREA DETALIATĂ A DEZVĂLUIRII

Variantele de realizare a prezentei dezvoltări se referă, în general, la conjugații de oligomeri antisens îmbunătățiți și la utilizările acestora, care sunt special concepute pentru a induce omiterea exonilor în gena distrofinei umane. Distrofina joacă un rol vital în funcția musculară, și diferite boli legate de mușchi sunt caracterizate de forme mutante ale acestei gene. Prin urmare, în anumite variante de realizare, conjugații de oligomeri antisens îmbunătățiți descriși aici induc omiterea exonilor în formele mutante ale genei distrofinei umane, cum ar fi genele distrofinei mutante găsite în distrofia musculară Duchenne (DMD) și distrofia musculară Becker (BMD).

Din cauza evenimentelor aberante de îmbinare a ARNm cauzate de mutații, aceste gene mutante ale distrofinei umane, fie exprimă proteina distrofină defectuoasă, fie nu exprimă deloc distrofină măsurabilă, o afecțiune care conduce la diferite forme de distrofie musculară. Pentru a remedia această afecțiune, conjugații de oligomeri antisens din prezenta dezvoltare hibridizează cu regiuni selectate ale unui ARNm preprocesat al unei gene a distrofinei umane mutante, induc omiterea exonilor și îmbinarea diferențiată prin aceea că, altfel, ARNm-ul distrofinei este îmbinat în mod aberant și, prin urmare, permit celulelor musculare să producă o transcriere ARNm care codifică o proteină distrofină funcțională. În anumite variante de realizare, proteina distrofină rezultată nu este neapărat forma "de tip sălbatic" a distrofinei, ci este mai degrabă o formă trunchiată, dar funcțională, de distrofină.

Prin creșterea nivelurilor de proteină distrofină funcțională în celulele musculare, acestea și variantele de realizare înrudite sunt utile pentru profilaxia și tratamentul distrofiei musculare, în special, pentru acele forme de distrofie musculară, cum ar fi DMD și BMD, care sunt caracterizate prin exprimarea proteinelor distrofină defecte din cauza îmbinării aberante a ARNm-ului. Conjugații de oligomeri antisens specifici descriși aici asigură, în plus, o țintire specifică îmbunătățită a exonului distrofină față de alți oligomeri și, prin urmare, oferă avantaje semnificative și practice față de tratamente alternative ale formelor relevante de distrofie musculară.

Astfel, dezvăluirea se referă la conjugați de oligomeri antisens cu Formula (IV):



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

5 Situsul de aliniere este H45A(-03+19).

Cu excepția cazului în care sunt definiți altfel, toți termenii tehnici și științifici utilizați aici au aceeași semnificație pe care o înțeleg în mod obișnuit specialiștii cu calificare obișnuită în domeniul căruia îi aparține dezvăluirea. Deși orice metode și materiale similare sau echivalente cu cele descrise aici pot fi utilizate la punerea în practică sau la testarea prezentei dezvăluiri, sunt descrise metode și materiale preferate. În scopul prezentei dezvăluiri, următorii termeni sunt definiți mai jos.

I. Definiții

Prin "aproximativ" se înțelege o cantitate, nivel, valoare, număr, frecvență, procent, dimensiune, mărime, cantitate, greutate sau lungime, care variază cu până la 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 sau 1% față de o cantitate, nivel, valoare, număr, frecvență, procent, dimensiune, mărime, cantitate, greutate sau lungime de referință.

"Susceptibil de omitere a exonului 45", așa cum este utilizat aici cu privire la un subiect sau pacient, se intenționează să includă subiecți și pacienți care au una sau mai multe mutații ale genei distrofinei care, în absența omiterii exonului 45 al pre-ARNm de distrofina, provoacă cadrul de citire să fie în afara cadrului, perturbând astfel traducerea pre-ARNm ceea ce conduce la incapacitatea subiectului sau pacientului de a produce distrofina funcțională sau semi-funcțională. Exemple de mutații ale genei distrofinei care sunt susceptibile de omitere a exonului 45 includ, de exemplu, mutații în exonii 7-44, 12-44, 18-44, 44, 46, 46-47, 46-48, 46-49, 46-51, 46-53, 46-55, 46-57, 46-59, 46-60, 46-67, 46-69, 46-75, și 46-78 (baza de date cu mutații de distrofie musculară Leiden Duchenne, Centrul Medical al Universității din Leiden, Țările de Jos). Determinarea dacă un pacient are o mutație în gena distrofinei care este susceptibilă de omitere a exonilor este în domeniul de competență al unui specialist în domeniu (vezi, de exemplu, Aartsma-Rus și colab. (2009) Hum Mutat. 30:293-299; Gurvich și colab., Hum Mutat. 2009; 30(4) 633-640; și Fletcher și colab. (2010) Terapie moleculară 18(6) 1218-1223.).

Termenul "oligomer", așa cum este utilizat aici, se referă la o secvență de subunități conectate prin legături între subunități. În anumite cazuri, termenul "oligomer" este utilizat cu referire la un "oligomer antisens". Pentru "oligomeri antisens", fiecare subunitate constă din: (i) un zahăr riboză sau un derivat al acestuia; și (ii) o nucleobază legată de aceasta, astfel încât ordinea fragmentelor de împerechere

de baze să formeze o secvență de baze care este complementară cu o secvență țintă dintr-un acid nucleic (de obicei un ARN) prin împerecherea bazelor Watson-Crick, pentru a forma un heteroduplex acid nucleic: oligomer în cadrul secvenței țintă, cu condiția ca, fie subunitatea, legătura între subunități, fie ambele să nu apară în mod natural. Oligomerul antisens este un PMO. Variante de realizare suplimentare sunt descrise aici.

Termenii "complementar" și "complementaritate" se referă la doi sau mai mulți oligomeri (adică, fiecare cuprinzând o secvență de nucleobază) care sunt înrudiți unul cu celălalt prin regulile de împerechere a bazelor Watson-Crick. De exemplu, secvența de nucleobaze "T-G-A (5'→3')" este complementară cu secvența de nucleobază "A-C-T (3'→5')". Complementaritatea poate fi "parțială", în care mai puține decât toate nucleobazele unei anumite secvențe de nucleobaze sunt potrivite cu cealaltă secvență de nucleobaze conform regulilor de împerechere a bazelor. De exemplu, în unele variante de realizare, complementaritatea între o anumită secvență de nucleobaze și cealaltă secvență de nucleobază poate fi de aproximativ 70%, aproximativ 75%, aproximativ 80%, aproximativ 85%, aproximativ 90% sau aproximativ 95%. Sau, poate exista complementaritate "completă" sau "perfectă" (100%) între o anumită secvență de nucleobază și cealaltă secvență de nucleobază pentru a continua exemplul. Gradul de complementaritate între secvențele de nucleobaze are efecte semnificative asupra eficienței și puterii hibridizării dintre secvențe.

Termenii "cantitate eficientă" și "cantitate eficientă terapeutic" sunt utilizați în mod interschimbabil aici și se referă la o cantitate de compus terapeutic, cum ar fi un oligomer antisens, administrat unui subiect mamifer, fie sub forma unei singure doze, fie ca parte a unei serii de doze, care este eficientă pentru a produce efectul terapeutic dorit. Pentru un oligomer antisens, acest efect este produs, de obicei, prin inhibarea traducerii sau a prelucrării naturale prin îmbinare a unei secvențe țintă selectate, sau prin producerea unei cantități semnificative clinic de distrofină (semnificație statistică).

În unele variante de realizare, o cantitate eficientă este de cel puțin 10 mg/kg, sau cel puțin 20 mg/kg de o compoziție care include un oligomer antisens pentru o perioadă de timp pentru a trata subiectul. În unele variante de realizare, o cantitate eficientă este de cel puțin 20 mg/kg de o compoziție care include un oligomer antisens pentru a crește numărul de fibre pozitive pentru distrofină într-un subiect la cel puțin 20% din normal. În anumite variante de realizare, o cantitate eficientă este de 10 mg/kg, sau cel puțin 20 mg/kg de o compoziție care include un oligomer antisens pentru a stabili, menține sau îmbunătăți distanța de mers pe jos de la un deficit de 20%, de exemplu, într-un 6 MWT, la un pacient, în raport cu unul egal sănătos. În diverse variante de realizare, o cantitate eficientă este de la cel puțin 10 mg/kg până la aproximativ 30 mg/kg, cel puțin 20 mg/kg până la aproximativ 30 mg/kg, aproximativ 25 mg/kg până la aproximativ 30 mg/kg sau aproximativ 30 mg/kg până la aproximativ 50 mg/kg. În unele variante de realizare, o cantitate eficientă este de aproximativ 10 mg/kg, aproximativ 20 mg/kg, aproximativ 30 mg/kg sau aproximativ 50 mg/kg. Într-un alt aspect, o cantitate eficientă este de cel puțin aproximativ 10 mg/kg, aproximativ 20 mg/kg, aproximativ 25 mg/kg, aproximativ 30 mg/kg sau aproximativ 30 mg/kg până la aproximativ 50 mg/kg, pentru cel puțin 24 de săptămâni, cel puțin 36 de săptămâni sau cel puțin 48 de săptămâni, pentru a crește astfel numărul de fibre pozitive pentru distrofină la un subiect la cel puțin 20%, aproximativ 30%, aproximativ 40%, aproximativ 50%, aproximativ 60%, aproximativ 70%, aproximativ 80%, aproximativ 90%, aproximativ 95% din normal, și stabilizează sau îmbunătățește distanța de mers pe jos de la un deficit de 20%, de exemplu, într-un 6 MWT, la pacient în raport cu unul egal sănătos. În unele variante de realizare, tratamentul crește numărul de fibre pozitive pentru distrofină la 20-60% sau 30-50% din cel normal la pacient.

Prin "sporește" sau "sporirea", sau "crește" sau "creștere", sau "stimulează" sau "stimulare", se face referire, în general, la capacitatea unuia sau mai multor conjugați de oligomeri antisens sau compoziții farmaceutice de a produce sau de a provoca un răspuns fiziologic mai mare (adică, efecte în aval) într-o celulă sau într-un subiect, în comparație cu răspunsul provocat, fie de lipsa unui conjugat de oligomer antisens, fie de un compus de control. Un răspuns fiziologic mai mare poate include expresia crescută a unei forme funcționale a unei proteine distrofină, sau o activitate biologică crescută legată de distrofină în țesutul muscular, printre alte răspunsuri evidente din înțelegerea în domeniu și din descrierea de aici. Se poate măsura și creșterea funcției musculare, incluzând creșteri sau îmbunătățiri ale funcției musculare cu aproximativ 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, sau 100%. Se poate măsura și procentul de fibre musculare care exprimă o distrofină funcțională, incluzând creșterea expresiei distrofinei în aproximativ 1%, 2%, 5%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, sau 100% din fibrele musculare. De exemplu, a fost arătat că aproximativ 40% din îmbunătățirea funcției musculare poate avea loc dacă 25-30% din fibre exprimă distrofină (vezi, de ex., DelloRusso și colab., Proc Natl Acad Sci USA 99: 12979-12984, 2002). O cantitate "crescută" sau "sporită" este, de obicei, o cantitate "semnificativă din punct de vedere statistic" și poate include o creștere care este de 1,1, 1,2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 sau de mai multe ori (de ex., de 500, 1000 de ori, incluzând toate

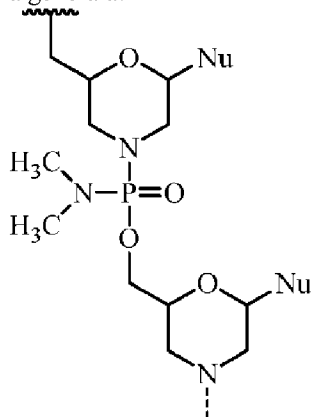
numerele întregi și zecimale dintre ele și peste 1, de ex., 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) cantitatea produsă în lipsa unui conjugat de oligomer antisens (absența unui agent) sau de un compus de control.

Așa cum este utilizat aici, termenii "funcție" și "funcțional" și alții asemenea se referă la o funcție biologică, enzimatică sau terapeutică.

O proteină distrofină "funcțională" se referă, în general, la o proteină distrofină care are o activitate biologică suficientă pentru a reduce degradarea progresivă a țesutului muscular, care este altfel caracteristică distrofiei musculare, de obicei, în comparație cu forma modificată sau "defectuoasă" a proteinei distrofină care este prezentă în anumiți subiecți cu DMD sau DMO. În anumite variante de realizare, o proteină funcțională distrofină poate avea aproximativ 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% sau 100% (incluzând toate numerele întregi dintre ele) din activitatea biologică in vitro sau in vivo a distrofinei de tip sălbatic, așa cum este măsurată conform tehnicilor de rutină din domeniu. Ca un exemplu, activitatea legată de distrofină în culturile musculare in vitro poate fi măsurată în funcție de dimensiunea miotubului, organizarea miofibrilei (sau dezorganizarea), activitatea contractilă și gruparea spontană a receptorilor de acetilcolină (vezi, de ex., Brown și colab., Journal of Cell Science. 112:209-216, 1999). Modelele animale sunt, de asemenea, resurse valoroase pentru studiul patogenezei bolii și furnizează un mijloc de testare a activității legate de distrofină. Două dintre cele mai utilizate modele animale pentru cercetarea DMD sunt șoarecele mdx și câinele cu distrofie musculară Golden Retriever (GRMD), ambele fiind negative la distrofină (vezi, de ex., Collins & Morgan, Int J Exp Pathol 84: 165-172, 2003). Acestea și alte modele animale pot fi utilizate pentru a măsura activitatea funcțională a diferitelor proteine distrofină. Sunt incluse formele trunchiate de distrofină, cum ar fi acele forme care sunt produse în urma administrării unora dintre conjugății de oligomeri antisens de omitere a exonului din prezenta dezvoltare.

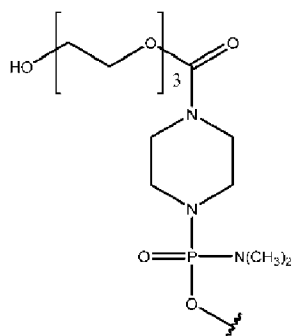
Termenii "nepotrivire" sau "nepotriviri" se referă la una sau mai multe nucleobaze (fie contigue, fie separate) dintr-o secvență de nucleobază de oligomer care nu sunt potrivite cu un pre-ARNm țintă conform regulilor de împerechere a bazelor. În timp ce complementaritatea perfectă este adesea dorită, unele variante de realizare pot include una sau mai multe, dar preferabil 6, 5, 4, 3, 2 sau 1 nepotriviri cu privire la pre-ARNm-ul țintă. Sunt incluse variații în orice locație din oligomer. În anumite variante de realizare, conjugății de oligomeri antisens din dezvoltare includ variații ale secvenței de nucleobaze în apropierea variațiilor terminale din interior și, dacă sunt prezente, sunt de obicei în aproximativ 6, 5, 4, 3, 2 sau 1 subunitate a capătului 5' și/sau 3'.

Termenii "morfolino", "oligomer morfolino" și "PMO" se referă la un oligomer morfolino fosforodiamidat cu următoarea structură generală:



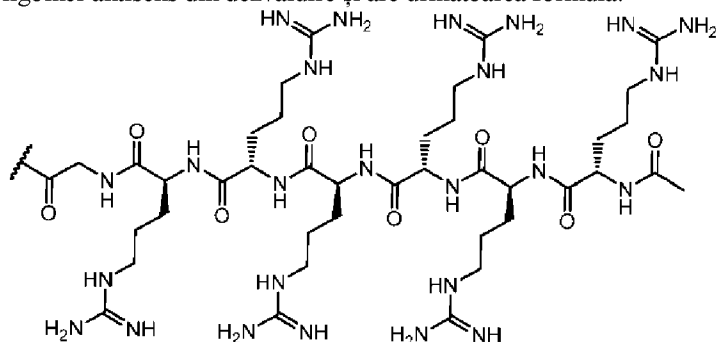
și așa cum este descris în Figura 2 din Summerton, J., și colab., Antisens & Nucleic Acid Drug Development, 7: 187-195 (1997). Morfolino, așa cum este descris aici include toți stereoizomerii și tautomerii cu structura generală de mai sus. Sinteza, structurile și caracteristicile de legare ale oligomerilor morfolino sunt detaliate în brevetele U.S. numerele: 5,698,685; 5,217,866; 5,142,047; 5,034,506; 5,166,315; 5,521,063; 5,506,337; 8,076,476; și 8,299,206.

Morfolino din prezenta invenție este conjugat la capătul 5' al oligomerului cu un fragment "tail" pentru a crește stabilitatea și/sau solubilitatea acestuia. Fragmentul tail are structura:

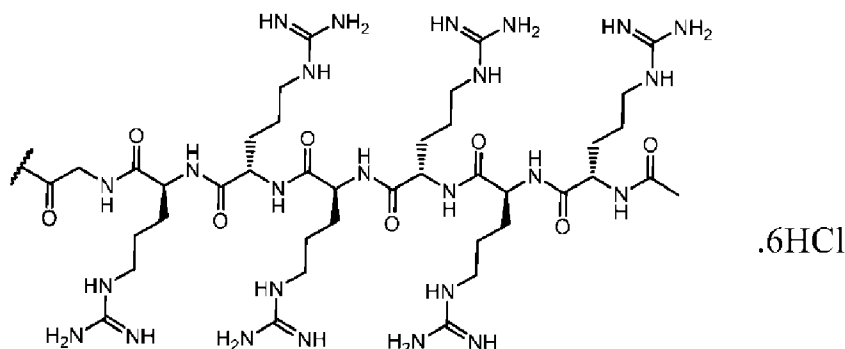


Fragmentul tail de mai sus este denumit aici "TEG" sau "EG3".

Așa cum este utilizat aici, termenii "-G-R₆" și "-G-R₆-Ac" sunt utilizați interschimbabil și se referă la un fragment peptidic conjugat cu un oligomer antisens din dezvăluire. În diverse variante de realizare, "G" reprezintă un reziduu de glicină conjugat cu "R₆" printr-o legătură amidă, și fiecare "R" reprezintă un reziduu de arginină conjugat împreună prin legături amidice, astfel încât "R₆" înseamnă șase (6) reziduuri de arginină conjugate împreună prin legături amidice. Reziduurile de arginină sunt reziduuri de L-arginină. "-G-R₆" sau "-G-R₆-Ac" este conjugat cu azotul din ciclul morfolină al subunității 3', cea mai morfolinică a unui oligomer antisens PMO din dezvăluire. "-G-R₆" sau "-G-R₆-Ac" este conjugat la capătul 3' al unui oligomer antisens din dezvăluire și are următoarea formulă:



sau



Termenii "nucleobază" (Nu), "fragment de împerechere a bazelor" sau "bază" sunt utilizați interschimbabil pentru a se referi la o bază purină sau pirimidină găsită în ADN sau ARN existent în mod natural sau "nativ" (de ex., uracil, timină, adenină, citozină și guanină), precum și la analogi ai acestor purine și pirimidine care există în mod natural. Acești analogi pot conferi proprietăți îmbunătățite pentru oligomer, cum ar fi afinitatea de legare. Analogi exemplificatori includ hipoxantină (componenta de bază a inozinei); 2,6-diaminopurină; 5-metil citozină; pirimidine modificate C5-propinil; și 10-(9-(aminoetoxi)fenoxazinil) (clemă G).

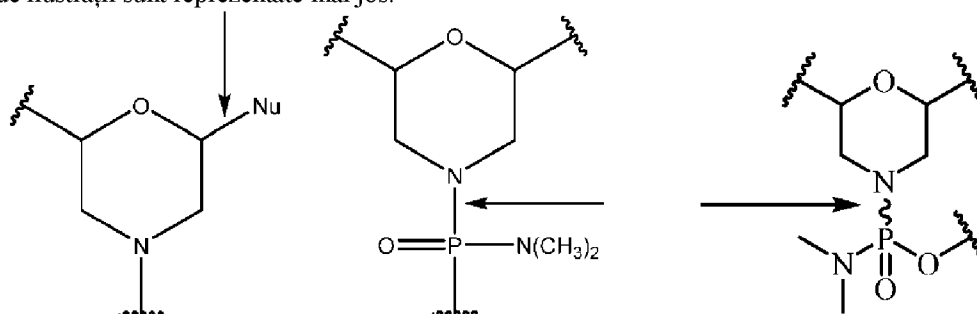
Expresiile "administrare parenterală" și "administrat parenteral", așa cum este utilizat aici, înseamnă alte moduri de administrare decât administrarea enterală și topică, de obicei, prin injectare, și includ, fără limitare, injectare sau perfuzie intravenoasă, intramusculară, intraarterială, intratecală, intracapsulară, intraorbitală, intracardiacă, intradermică, intraperitoneală, transtraheală, subcutanată, subcuticulară, intraarticulară, subcapsulară, subarahnoidiană, intraspinală și intrasternală.

Pentru claritate, structurile din dezvăluire, incluzând, de exemplu, Formula (IV), sunt continue de la 5' până la 3' și, pentru comoditatea descrierii întregii structuri într-o formă compactă, au fost incluse diverse întreruperi de ilustrare etichetate "RUPTURA A", "RUPTURA B" și "RUPTURA C". Așa cum ar fi înțeles de către specialistul în domeniu, de exemplu, fiecare menționare "RUPTURA A" arată o

continuare a ilustrării structurii în acele puncte. Specialistul în domeniu înțelege că același lucru este valabil pentru fiecare exemplu de "RUPTURA B" și pentru "RUPTURA C" din structurile de mai sus. Niciuna dintre rupturile ilustrației, totuși, nu este destinată să indice, și nici un specialist în domeniu nu le-ar înțelege, că înseamnă o întrerupere reală a structurii de mai sus.

Așa cum este utilizat aici, un set de paranteze utilizate într-o formulă structurală indică faptul că caracteristica structurală dintre paranteze este repetată. În unele variante de realizare, parantezele folosite pot fi "[" și "]", iar în anumite variante de realizare, parantezele folosite pentru a indica caracteristicile structurale repetate pot fi "(" and ")". În unele variante de realizare, numărul de iterații repetate ale caracteristicii structurale dintre paranteze este numărul indicat în afara parantezelor, cum ar fi 2, 3, 4, 5, 6, 7, și așa mai departe. În diverse variante de realizare, numărul de iterații repetate ale caracteristicii structurale dintre paranteze este indicat printr-o variabilă indicată în afara parantezei, cum ar fi "Z".

Așa cum este utilizat aici, o legătură dreaptă sau o legătură ondulată desenată la un atom de carbon sau fosforic chiral într-o formulă structurală indică faptul că stereochemia carbonului sau fosforului chiral este nedefinită și se intenționează să includă toate formele centrului chiral. Exemple de astfel de ilustrații sunt reprezentate mai jos.



Expresia "acceptabil farmaceutic" înseamnă că substanța sau compoziția trebuie să fie compatibilă, din punct de vedere chimic și/sau toxicologic, cu celelalte ingrediente care cuprind o formulare și/sau cu subiectul care este tratat cu aceasta.

Expresia "purător acceptabil farmaceutic", așa cum este utilizată aici, înseamnă un material de umplutură, diluant, material de încapsulare netoxic inert solid, semisolid sau lichid, sau o formulare de auxiliar de orice tip. Câteva exemple de materiale care pot servi ca purtători acceptabili farmaceutic sunt: zaharuri, cum ar fi lactoză, glucoză și zaharoză; amidon, cum ar fi amidon de porumb și amidon de cartofi; celuloză și derivații săi, cum ar fi carboximetil celuloza de sodiu, etilceluloza și acetat de celuloză; tragacant pulverulent; malț; gelatină; talc; excipienți, cum ar fi unt de cacao și ceruri pentru supozitoare; uleiuri, cum ar fi ulei de arahide, ulei de semințe de bumbac, ulei de sofrănel, ulei de susan, ulei de măsline, ulei de porumb și ulei de soia; glicoli, cum ar fi propilenglicol; esteri, cum ar fi oleatul de etil și laurat de etil; agar; agenți de tamponare, cum ar fi hidroxid de magneziu și hidroxid de aluminiu; acid alginic; apă apirogenă; soluție salină izotonică; soluție Ringer; alcool etilic; soluții de tampon fosfat; lubrifianți compatibili netoxici, cum ar fi lauril sulfat de sodiu și stearat de magneziu; agenți de colorare; agenți de eliberare; agenți de acoperire; agenți de îndulcire; agenți de aromatizare; agenți de parfumare; conservanți; și antioxidanți; în conformitate cu judecata persoanei care formulează.

Termenul "restabilire", cu privire la sinteza sau producerea distrofinei, se referă, în general, la producerea unei proteine distrofina, incluzând forme trunchiate de distrofina, într-un pacient cu distrofie musculară în urma tratamentului cu un conjugat de oligomer antisens descris aici. În unele variante de realizare, tratamentul are ca rezultat o creștere a producției noi de distrofina la un pacient cu 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, sau 100% (incluzând toate numerele întregi dintre acestea). În unele variante de realizare, tratamentul crește numărul de fibre pozitive pentru distrofina în subiect la cel puțin aproximativ 20%, aproximativ 30%, aproximativ 40%, aproximativ 50%, aproximativ 60%, aproximativ 70%, aproximativ 80%, aproximativ 90% sau aproximativ 95% până la 100% din normal. În alte variante de realizare, tratamentul crește numărul de fibre pozitive pentru distrofina în subiect la aproximativ 20% până la aproximativ 60%, sau aproximativ 30% până la aproximativ 50% din normal. Procentul de fibre pozitive pentru distrofina la un pacient după tratament poate fi determinat printr-o biopsie musculară folosind tehnici cunoscute. De exemplu, o biopsie musculară poate fi luată de la un mușchi adecvat, cum ar fi mușchiul biceps brahial al unui pacient.

Analiza procentului de fibre pozitive pentru distrofina poate fi efectuată înainte de tratament și/sau după tratament sau la momente de timp pe parcursul tratamentului. În unele variante de realizare, o biopsie după tratament este prelevată de la mușchiul contralateral din care a fost biopsia de înainte de tratament. Analiza expresiei distrofinei înainte și după tratament poate fi efectuată utilizând orice test adecvat pentru distrofina. În unele variante de realizare, detectarea imunohistochimică este efectuată pe secțiuni de țesut din biopsia musculară folosind un anticorp care este un marker pentru distrofina, cum ar

fi un anticorp monoclonal sau policlonal. De exemplu, poate fi utilizat anticorpul MANDYS106 care este un marker foarte sensibil pentru distrofină. Poate fi utilizat orice anticorp secundar adecvat.

În unele variante de realizare, procentul de fibre pozitive pentru distrofină este calculat prin împărțirea numărului de fibre pozitive la fibrele totale numărate. Probele normale de mușchi au fibre 100% pozitive pentru distrofină. Prin urmare, procentul de fibre pozitive pentru distrofină poate fi exprimat ca procent din normal. Pentru a controla prezența unor urme de distrofină în mușchiul de înainte de tratament, precum și a fibrelor revertante, se poate stabili o linie de referință folosind secțiuni de mușchi de înainte de tratament de la un pacient atunci când se numără fibrele pozitive pentru distrofină din mușchi după tratament. Aceasta poate fi folosită ca un prag pentru numărarea fibrelor pozitive pentru distrofină în secțiuni ale mușchilor după tratamentul celui pacient. În alte variante de realizare, secțiunile de țesut colorate cu anticorpi pot fi utilizate, de asemenea, pentru cuantificarea distrofinei folosind software-ul de analiză prin imagistică Bioquant (Bioquant Image Analysis Corporation, Nashville, TN). Intensitatea totală a semnalului de fluorescență a distrofinei poate fi raportată ca procent din normal. În plus, analiza Western blot cu anticorpi monoclonali sau policlonali anti-distrofină poate fi utilizată pentru a determina procentul de fibre pozitive pentru distrofină. De exemplu, poate fi utilizat anticorpul anti-distrofină NCL-Dys1 de la Leica Biosystems. Procentul de fibre pozitive pentru distrofină poate fi analizat, de asemenea, prin determinarea expresiei componentelor complexului sarcoglican (β , γ) și/sau NOS neuronal.

În unele variante de realizare, tratamentul cu un conjugat de oligomer antisens din dezvoltarea încetinește sau reduce disfuncția și/sau insuficiența progresivă a mușchilor respiratori la pacienții cu DMD care ar fi de așteptat fără tratament. În unele variante de realizare, tratamentul cu un conjugat de oligomer antisens din dezvoltarea poate reduce sau elimina nevoia de asistență de ventilație care ar fi de așteptat fără tratament. În unele variante de realizare, măsurătorile funcției respiratorii pentru urmărirea cursului bolii, precum și evaluarea potențialelor intervenții terapeutice includ presiunea inspiratorie maximă (MIP), presiunea expiratorie maximă (MEP) și capacitatea vitală forțată (FVC). MIP și MEP măsoară nivelul de presiune pe care o persoană îl poate genera în timpul inspirației și, respectiv, expirației, și sunt măsuri sensibile ale forței mușchilor respiratori. MIP este o măsură a slăbiciunii mușchilor diafragmei.

În unele variante de realizare, MEP poate scădea înainte de modificările din alte teste ale funcției pulmonare, incluzând MIP și FVC. În anumite variante de realizare, MEP poate fi un indicator precoce al disfuncției respiratorii. În anumite variante de realizare, FVC poate fi utilizată pentru a măsura volumul total de aer expulzat în timpul expirației forțate după inspirația maximă. La pacienții cu DMD, FVC crește concomitent cu creșterea fizică până la începutul adolescenței. Cu toate acestea, pe măsură ce creșterea încetinește sau este oprită de progresia bolii și slăbiciunea musculară progresează, capacitatea vitală intră într-o fază descendentă și scade cu o rată medie de aproximativ 8 până la 8,5% pe an după vârsta de 10 până la 12 ani. În anumite variante de realizare, procentul MIP preconizat (MIP ajustat pentru greutate), procentul MEP preconizat (MEP ajustat pentru vârstă) și procentul FVC preconizat (FVC ajustat pentru vârstă și înălțime) sunt analize de susținere.

Termenii "subiect" și "pacient", așa cum este utilizat aici, includ orice animal care prezintă un simptom sau care prezintă riscul de a prezenta un simptom, care poate fi tratat cu un conjugat de oligomer antisens din dezvoltarea, cum ar fi un subiect (sau pacient) care are sau prezintă risc de a avea DMD sau DMO sau oricare dintre simptomele asociate cu aceste afecțiuni (de ex., pierderea fibrei musculare). Subiecții adecvați (sau pacienții) includ animale de laborator (cum ar fi șoarece, șobolan, iepure sau porc de guineea), animale de fermă și animale domestice sau animale de companie (cum ar fi o pisică sau un câine). Sunt incluse primat non-umane și, de preferință, pacienți (sau subiecți) oameni. De asemenea, sunt incluse metode de producere a distrofinei într-un subiect (sau pacient) care are o mutație a genei distrofinei care este susceptibilă de omitere a exonului 45.

Expresiile "administrare sistemică", "administrat sistemic", "administrare periferică" și "administrat periferic", așa cum este utilizat aici, înseamnă administrarea unui compus, medicament sau alt material, în alt mod decât direct în sistemul nervos central, astfel încât acesta să intre în sistemul pacientului și, astfel, să fie supus metabolismului și altor procese similare, de exemplu, administrarea subcutanată.

Expresia "secvență de țintire" se referă la o secvență de nucleobaze ale unui oligomer care este complementară cu o secvență de nucleotide dintr-un pre-ARNm țintă. Secvența de nucleotide din pre-ARNm țintă este un situs de aliniere a exonului 45 în pre-ARNm de distrofină, denumit H45A(-03+19).

"Tratamentul" unui subiect (de ex., un mamifer, cum ar fi un om) sau al unei celule este orice tip de intervenție utilizată în încercarea de a modifica cursul natural al subiectului sau celulei. Tratamentul include, dar nu se limitează la, administrarea unui oligomer sau a unei compoziții farmaceutice a acestuia, și poate fi efectuat fie profilactic, fie ulterior inițierii unui eveniment patologic sau contactului cu un agent etiologic. Tratamentul include orice efect de dorit asupra simptomelor sau patologiei unei boli sau afecțiuni asociate cu proteina distrofină, cum ar fi în anumite forme de distrofie musculară, și poate

include, de exemplu, modificări sau îmbunătățiri minime ale unui sau mai multor markeri măsurabili ai bolii sau afecțiunii care este tratată. Sunt incluse, de asemenea, tratamentele "profilactice", care pot fi îndreptate către reducerea ratei de progresie a bolii sau afecțiunii care este tratată, întârzierea apariției acelei boli sau afecțiuni, sau reducerea severității debutului acesteia. "Tratamentul" sau "profilaxia" nu indică în mod necesar eradicarea completă, vindecarea sau prevenirea bolii sau afecțiunii sau a simptomelor asociate acestora.

În unele variante de realizare, tratamentul cu un conjugat de oligomer antisens din dezvoltare crește producția de distrofină nouă, întârzie progresia bolii, încetinește sau reduce pierderea deambulației, reduce inflamația musculară, reduce afectarea musculară, îmbunătățește funcția musculară, reduce pierderea funcției pulmonare și/sau îmbunătățește regenerarea musculară care ar fi de așteptat fără tratament. În unele variante de realizare, tratamentul menține, întârzie sau încetinește progresia bolii. În unele variante de realizare, tratamentul menține deambulația sau reduce pierderea deambulației. În unele variante de realizare, tratamentul menține funcția pulmonară sau reduce pierderea funcției pulmonare. În unele variante de realizare, tratamentul menține sau crește o distanță de mers pe jos stabil la un pacient, așa cum este măsurată, de exemplu, prin testul de mers pe jos 6 minute (6MWT). În unele variante de realizare, tratamentul menține sau reduce timpul de mers/alergare 10 metri (adică, testul de mers/alergare de 10 metri). În unele variante de realizare, tratamentul menține sau reduce timpul de ședere în decubit dorsal (adică, timpul de stat la test). În unele variante de realizare, tratamentul menține sau reduce timpul de urcare a patru scări standard (adică, testul de urcare pe patru scări). În unele variante de realizare, tratamentul menține sau reduce inflamația musculară la pacient, așa cum este măsurată, de exemplu, prin RMN (de ex., RMN al mușchilor picioarelor). În unele variante de realizare, RMN măsoară T2 și/sau fracția de grăsime pentru a identifica degenerarea musculară. RMN poate identifica modificări ale structurii și compoziției musculare cauzate de inflamație, edem, leziuni musculare și infiltrarea grăsimilor.

În unele variante de realizare, tratamentul cu un conjugat de oligomer antisens din dezvoltare mărește producția de distrofină nouă și încetinește sau reduce pierderea deambulației care ar fi de așteptat fără tratament. De exemplu, tratamentul poate stabiliza, menține, îmbunătăți sau crește deambulația (de ex., stabilizarea deambulației) la subiect. În unele variante de realizare, tratamentul menține sau crește o distanță de mers pe jos stabil la un pacient, așa cum este măsurată, de exemplu, prin testul de mers pe jos 6 minute (6MWT) descris de McDonald și colab. (Muscle Nerve, 2010; 42:966-74). O modificare a distanței parcurse mergând pe jos 6 minute (6MWD) poate fi exprimată ca o valoare absolută, o modificare procentuală sau o modificare a valorii procentuale preconizate. În unele variante de realizare, tratamentul menține sau îmbunătățește o distanță de mers pe jos stabil într-un 6MWT de la un deficit de 20% la subiect față de unul egal sănătos. Performanța unui pacient cu DMD în 6MWT în raport cu performanța tipică a unui egal sănătos poate fi determinată prin calcularea unei valori % preconizate. De exemplu, procentul 6MWD preconizat poate fi calculat folosind următoarea ecuație pentru bărbați: $196,72 + (39,81 \times \text{vârstă}) - (1,36 \times \text{vârstă}^2) + (132,28 \times \text{înălțimea în metri})$. Pentru femei, procentul 6MWD preconizat poate fi calculat folosind următoarea ecuație: $188,61 + (51,50 \times \text{vârstă}) - (1,86 \times \text{vârstă}^2) + (86,10 \times \text{înălțime în metri})$ (Henricson și colab. PLoS Curr., 2012, versiunea 2). În unele variante de realizare, tratamentul cu un oligomer antisens crește distanța de mers pe jos stabil la pacient de la valoarea inițială la mai mult decât 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30 sau 50 de metri (incluzând toate numerele întregi dintre ele).

Pierderea funcției musculare la pacienții cu DMD poate apărea pe fondul creșterii și dezvoltării normale a copilăriei. Într-adevăr, copiii mai mici cu DMD pot prezenta o creștere a distanței parcurse în timpul 6MWT pe parcursul a aproximativ 1 an, în ciuda deficienței musculare progresive. În unele variante de realizare, 6MWD la pacienții cu DMD este comparat cu subiecții de control în curs de dezvoltare în mod obișnuit și cu datele normative existente de la subiecții potriviți ca vârstă și sex. În unele variante de realizare, creșterea și dezvoltarea normală pot fi luate în considerare utilizând o ecuație bazată pe vârstă și înălțime, adaptată la datele normative. O astfel de ecuație poate fi utilizată pentru a converti 6MWD într-o valoare preconizată procentual (preconizată în %) la subiecții cu DMD. În anumite variante de realizare, analiza datelor 6MWD preconizate în % reprezintă o metodă de a ține cont de creșterea și dezvoltarea normală, și poate arăta că câștigurile de funcție la vârste fragede (de ex., mai mici sau egale cu vârsta de 7 ani) reprezintă mai degrabă stabilitatea decât îmbunătățirea abilităților la pacienții cu DMD (Henricson și colab. PLoS Curr., 2012, versiunea 2).

A fost propus și publicat un sistem de nomenclatură a moleculelor antisens pentru a face distincția între diferitele molecule antisens (vezi Mann și colab., (2002) J Gen Med 4, 644-654). Această nomenclatură a devenit deosebit de relevantă la testarea mai multor molecule antisens ușor diferite, toate îndreptate către aceeași regiune țintă, după cum se arată mai jos:
H#A/D(x;y).

Prima literă desemnează specia (de ex., H: om, M: murin, C: canin). "#" desemnează numărul exonului de distrofină țintă. "A/D" indică locul de îmbinare a acceptorului sau donorului la începutul și,

respectiv, la sfârșitul exonului. (x y) reprezintă coordonatele de aliniere în care "-" sau "+" indică secvențe intronice sau, respectiv, exonice. De exemplu, A(-6+18) ar indica ultimele 6 baze ale intronului care preced exonul țintă și primele 18 baze ale exonului țintă. Cel mai apropiat situs de îmbinare ar fi acceptorul, astfel încât aceste coordonate ar fi precedate de un "A". Descrierea coordonatelor de aliniere la situsul de îmbinare a donorului ar putea fi D(+2-18), în care ultimele 2 baze exonice și primele 18 baze intronice corespund situsului de aliniere al moleculei antisens. Coordonatele de aliniere în întregime exonice care ar fi reprezentate de A(+65+85), adică situsul dintre a 65-a și a 85-a nucleotidă de la începutul aceluși exon.

II. Oligomeri antisens

A. Conjuğați de oligomeri antisens concepuți pentru a induce omiterea exonului 45

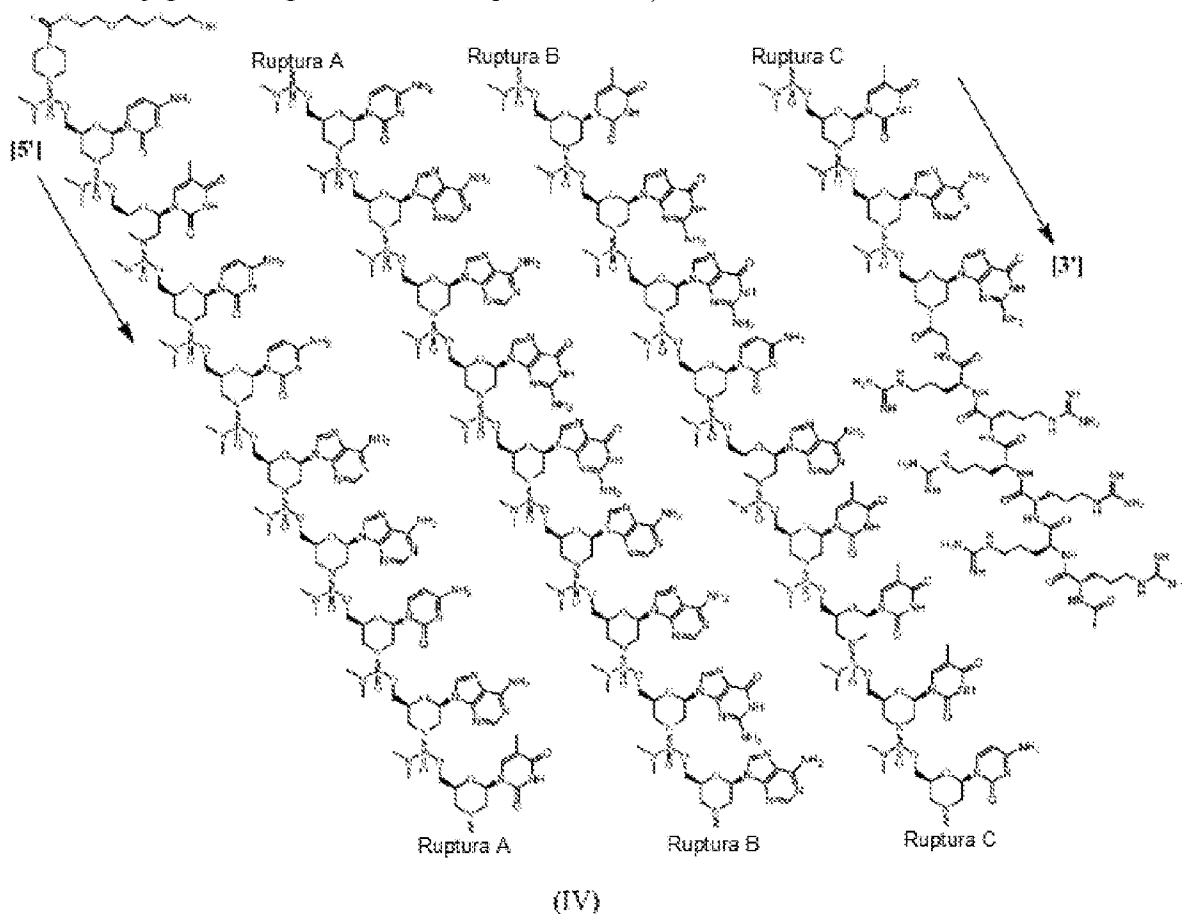
Conjuğații de oligomeri antisens din dezvoltare au Formula (IV) și sunt complementari unei regiuni țintă a exonului 45 a genei distrofinei, și induc omiterea exonului 45. În special, dezvoltarea se referă la conjuğați de oligomeri antisens complementari unei regiuni țintă a exonului 45 a pre-ARNm de distrofina desemnată ca un situs de aliniere. Situsul de aliniere este H45A(-03+19).

Oligomerii antisens conjuğați din dezvoltare țintesc pre-ARNm de distrofina și induc omiterea exonului 45, astfel încât acesta este exclus sau omis din transcriptul ARNm matur îmbinat. Prin omiterea exonului 45, cadrul de citire întrerupt este restabilit la o mutație în cadru. În timp ce DMD este compus din diferite subtipuri genetice, conjuğații de oligomeri antisens din dezvoltare au fost concepuți în mod deosebit pentru a omite exonul 45 al pre-ARNm de distrofina. Mutațiile DMD susceptibile de omitere a exonului 45 cuprind un subgrup de pacienți cu DMD (13%).

B. Caracteristici ale chimiei oligomerului

Oligomeri morfolino

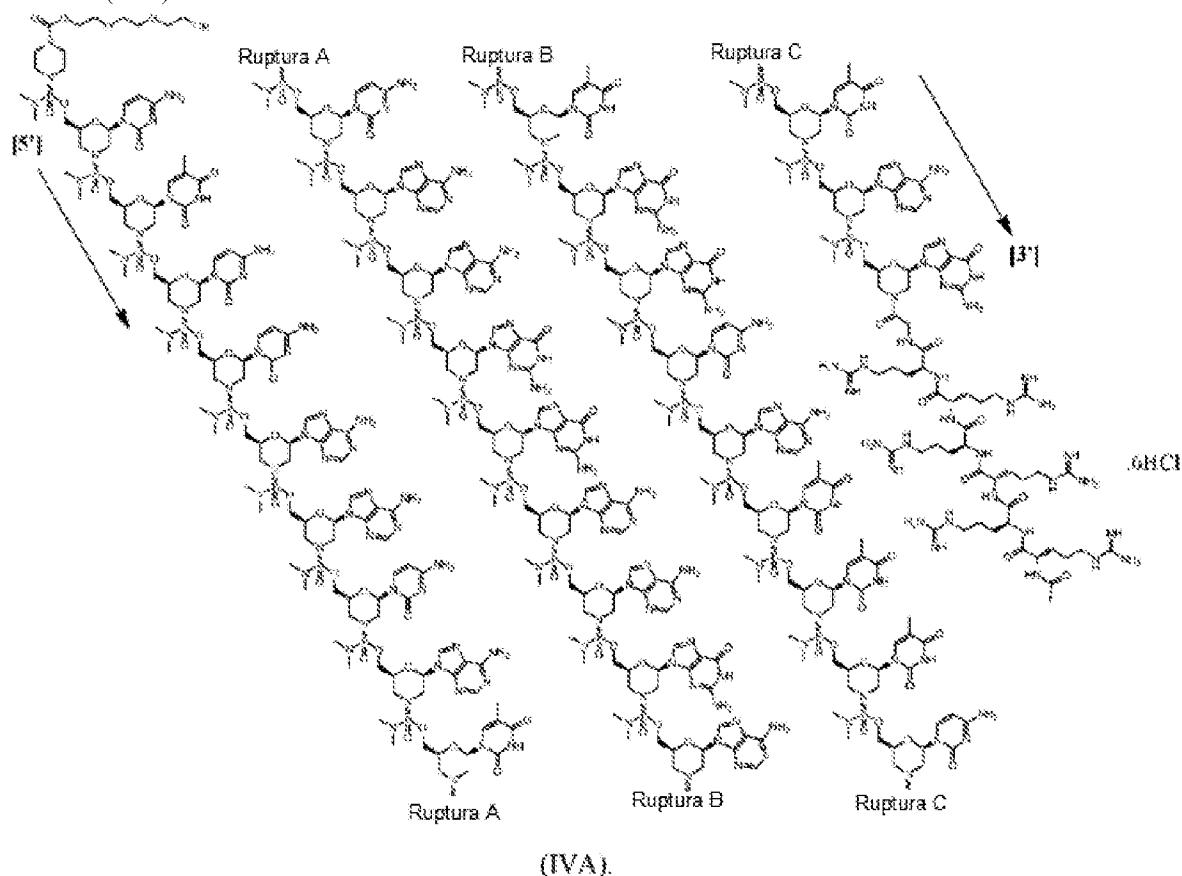
Conjugatul de oligomer antisens din prezenta invenție este conform formulei (IV):



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

În unele variante de realizare, un conjugat de oligomer antisens cu Formula (IV) este o sare de HCl (acid clorhidric) a acestuia. În anumite variante de realizare, sarea HCl este o sare de 6HCl.

În unele variante de realizare, incluzând, de exemplu, variante de realizare a conjugaților de oligomeri antisens cu Formula (IV), un conjugat de oligomer antisens din dezvăluire este conform Formulei (IVA):



Săruri acceptabile farmaceutic ale conjugaților de oligomeri antisens

Anumite variante de realizare a conjugaților de oligomeri antisens descrise aici pot să conțină o grupare funcțională bazică, cum ar fi amino sau alchilamino, și, astfel, sunt capabili să formeze săruri acceptabile farmaceutic cu acizi acceptabili farmaceutic. Termenul "săruri acceptabile farmaceutic" în aceste cazuri, se referă la sărurile de adiție cu acid anorganic și organic relativ netoxice ale conjugaților de oligomeri antisens din prezenta dezvăluire. Aceste săruri pot fi preparate in situ în vehiculul de administrare sau în procesul de fabricare a formei de dozare, sau prin reacția separată a unui conjugat de oligomer antisens purificat din dezvăluire în forma sa de bază liberă cu un acid organic sau anorganic adecvat, și izolarea sării astfel formate în timpul purificării ulterioare. Sărurile reprezentative includ sărurile bromhidrat, clorhidrat, sulfat, bisulfat, fosfat, azotat, acetat, valerat, oleat, palmitat, stearat, laurat, benzoat, lactat, tosilat, citrat, maleat, fumarat, succinat, tartrat, naftilat, mesilat, glucoheptonat, lactobionat și laurilsulfonat. (Vezi, de ex., Berge și colab. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66: 1-19).

Sărurile acceptabile farmaceutic ale conjugaților de oligomeri antisens includ sărurile convenționale netoxice sau sărurile de amoniu cuaternar ale conjugaților de oligomeri antisens, de ex., din acizi organici sau anorganici netoxici. De exemplu, astfel de săruri netoxice convenționale le includ pe cele derivate din acizi anorganici, cum ar fi clorhidric, bromhidric, sulfuric, sulfamic, fosforic și nitric; și sărurile preparate din acizi organici cum ar fi acetic, propionic, succinic, glicolic, stearic, lactic, malic, tartric, citric, ascorbic, palmitic, maleic, hidroximaleic, fenilacetic, glutamic, benzoic, salicilic, sulfanilic, 2-acetoxibenzoic, fumaric, toluensulfonic, metansulfonic, etan disulfonic, oxalic și izotonic.

În anumite variante de realizare, conjugații de oligomeri antisens din prezenta dezvăluire pot să conțină una sau mai multe grupări funcționale acide și, astfel, sunt capabili să formeze săruri acceptabile farmaceutic cu baze acceptabile farmaceutic. Termenul "săruri acceptabile farmaceutic" în aceste cazuri, se referă la sărurile de adiție a bazelor anorganice și organice relativ netoxice ale conjugaților de oligomeri antisens din prezenta dezvăluire. Aceste săruri pot fi, de asemenea, preparate in situ în vehiculul de administrare sau în procesul de fabricare a formei de dozare, sau prin reacția separată a conjugatului de oligomer antisens purificat în forma sa de acid liber cu o bază adecvată, cum ar fi hidroxidul, carbonatul sau bicarbonatul unui cation metalic acceptabil farmaceutic, cu amoniac sau cu o

amină organică primară, secundară sau terțiară acceptabilă farmaceutic. Sărurile alcaline sau alcalino-pământoase reprezentative includ sărurile de litiu, sodiu, potasiu, calciu, magneziu și aluminiu. Amine organice reprezentative utile pentru formarea sărurilor de adiție de bază includ etilamină, dietilamină, etilendiamină, etanolamină, dietanolamină și piperazină. (Vezi, de ex., Berge și colab., *de mai sus*).

III. Formulări și moduri de administrare

În anumite variante de realizare, prezenta dezvoltare furnizează formulări sau compoziții farmaceutice adecvate pentru furnizarea terapeutică a conjugărilor de oligomeri antisens, așa cum este descris aici. Prin urmare, în anumite variante de realizare, prezenta dezvoltare furnizează compoziții acceptabile farmaceutic care cuprind o cantitate eficientă terapeutic de unu sau mai mulți dintre conjugății de oligomeri antisens descriși aici, formulați împreună cu unu sau mai mulți purtători (aditivi) și/sau diluanți acceptabili farmaceutic. Deși este posibil ca un conjugat de oligomer antisens din prezenta dezvoltare să fie administrat singur, este de preferat ca conjugatul de oligomer antisens să se administreze sub forma unei formulări (compoziții) farmaceutice. Conjugatul de oligomer antisens al formulării este conform Formulei (IV) sau este o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

Metodele de furnizare a moleculelor de acid nucleic, care pot fi aplicabile la conjugății de oligomeri antisens din prezenta dezvoltare, sunt descrise, de exemplu, în: Akhtar și colab., 1992, Trends Cell Bio., 2:139; Delivery Strategies for Antisens Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995, CRC Press; și Sullivan și colab., PCT WO 94/02595. Acestea și alte protocoale pot fi utilizate practic pentru furnizarea oricărei molecule de acid nucleic, incluzând conjugății de oligomeri antisens din prezenta dezvoltare.

Compozițiile farmaceutice din prezenta dezvoltare pot fi formulate special pentru administrare în formă solidă sau lichidă, incluzând pe cele adaptate pentru următoarele: (1) administrare orală, de exemplu, băuturi (soluții sau suspensii apoase sau neapoase), tablete (țintite pentru absorbție bucală, sublinguală sau sistemică), bolusuri, pulberi, granule, paste pentru aplicare pe limbă; (2) administrare parenterală, de exemplu, prin injecție subcutanată, intramusculară, intravenoasă sau epidurală, sub formă de, de exemplu, o soluție sau suspensie sterilă sau o formulare cu eliberare susținută; (3) aplicare locală, de exemplu, sub formă de cremă, unguent sau platură cu eliberare controlată sau spray aplicat pe piele; (4) intravaginal sau intrarectal, de exemplu, sub formă de pesar, cremă sau spumă; (5) sublingual; (6) ocular; (7) transdermic; sau (8) nazal.

Câteva exemple de materiale care pot servi ca purtători acceptabili farmaceutic includ, fără limitare: (1) zaharuri, cum ar fi lactoză, glucoză și zaharoză; (2) amidon, cum ar fi amidon de porumb și amidon de cartofi; (3) celuloză și derivații săi, cum ar fi carboximetil celuloză de sodiu, etil celuloză și acetat de celuloză; (4) praf de tragacant; (5) malț; (6) gelatină; (7) talc; (8) excipienți, cum ar fi unt de cacao și ceară pentru supozitoare; (9) uleiuri, cum ar fi ulei de arahide, ulei de semințe de bumbac, ulei de sofrânel, ulei de susan, ulei de măsline, ulei de porumb și ulei de soia; (10) glicoli, cum ar fi propilenglicol; (11) polioli, cum ar fi glicerină, sorbitol, manitol și polietilen glicol; (12) esteri, cum ar fi oleat de etil și laurat de etil; (13) agar; (14) agenți de tamponare, cum ar fi hidroxid de magneziu și hidroxid de aluminiu; (15) acid alginic; (16) apă apirogenă; (17) ser fiziologic izotonic; (18) Soluție Ringer; (19) alcool etilic; (20) soluții tamponate pentru pH; (21) poliesteri, policarbonați și/sau polianhidride; și (22) alte substanțe compatibile netoxice utilizate în formulările farmaceutice.

Exemple suplimentare nelimitative de agenți adecvați pentru formulare cu conjugății de oligomeri antisens din prezenta dezvoltare includ: acizi nucleici conjugați cu PEG; acizi nucleici conjugați cu fosfolipide; acizi nucleici care conțin fragmente lipofile; fosforotioați; inhibitori ai glicoproteinei P (cum ar fi Pluronic P85) care pot îmbunătăți intrarea medicamentelor în diferite țesuturi; polimeri biodegradabili, cum ar fi microsfele de poli(D,L-lactidă-coglicolidă) pentru administrare cu eliberare susținută după implantare (Emerich, D F și colab., 1999, Cell Transplant, 8, 47-58) Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.; și nanoparticule încărcate, cum ar fi cele realizate din polibutylcianoacrilat, care pot elibera medicamente prin bariera hematoencefalică și pot modifica mecanismele de captare neuronală (Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999).

Dezvoltarea prezintă, de asemenea, utilizarea compoziției care cuprinde lipozomi modificați la suprafață care conțin lipide poli(etilen glicol) ("PEG") (PEG modificate, ramificate și neramificate sau combinații ale acestora, sau lipozomi de circulație lungă sau lipozomi ascunși). Aceste formulări oferă o metodă de creștere a acumulării de medicamente în țesuturile țintă. Această clasă de purtători de medicament rezistă la opsonizare și eliminare de către sistemul fagocitar mononuclear (MPS sau RES), permițând astfel timpi mai lungi de circulație în sânge și o expunere sporită a țesuturilor la medicamentul încapsulat (Lasic și colab. Chim. Rev. 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata și colab., Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 1005-1011). A fost arătat că astfel de lipozomi se acumulează selectiv în tumori, probabil prin extravazare și captare în țesuturile țintă neovascularizate (Lasic și colab., Science 1995, 267, 1275-1276; Oku și colab., 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1238, 86-90). Lipozomii de circulație lungă îmbunătățesc farmacocinetica și farmacodinamia ADN-ului și ARN-ului, în special, în comparație cu lipozomii

cationici convenționali despre care se știe că se acumulează în țesuturile MPS (Liu și colab., J. Biol. Chim. 1995, 42, 24864-24870; Choi și colab., Publicația internațională PCT Nr. WO 96/10391; Ansell și colab., Publicația internațională PCT Nr. WO 96/10390; Holland și colab., Publicația internațională PCT Nr. WO 96/10392). Este, de asemenea, probabil ca lipozomii de circulație lungă să protejeze medicamentele față de degradarea nucleazei într-o măsură mai mare în comparație cu lipozomii cationici, pe baza capacității lor de a evita acumularea în țesuturile MPS agresive din punct de vedere metabolic, cum ar fi ficatul și splina.

Într-o altă variantă de realizare, prezenta dezvoltare include compoziții farmaceutice cu conjugați de oligomeri antisens preparate pentru furnizare așa cum este descris în Brevetele U.S. numerele: 6,692,911; 7,163,695; și 7,070,807. În acest caz, într-o variantă de realizare, prezenta dezvoltare furnizează un conjugat de oligomer antisens din prezenta dezvoltare într-o compoziție care cuprinde copolimeri de lizină și histidină (HK) (așa cum este descris în brevetele U.S. numerele: 7,163,695; 7,070,807; și 6,692,911), fie singur, fie în combinație cu PEG (de ex., PEG ramificat sau neramificat sau un amestec al ambelor), în combinație cu PEG și un fragment de țintire, sau oricare dintre cele de mai sus în combinație cu un agent de reticulare. În anumite variante de realizare, prezenta dezvoltare furnizează conjugați de oligomeri antisens în compoziții farmaceutice care cuprind polihistidină modificată cu acid gluconic sau polihistidină gluconilată/transferină-polilizină. O persoană de specialitate în domeniu va recunoaște, de asemenea, că aminoacizii cu proprietăți similare cu His și Lys pot fi substituiți în compoziție.

În compoziții pot fi prezenți, de asemenea, agenți de umectare, emulgatori și lubrifianti (cum ar fi lauril sulfat de sodiu și stearat de magneziu), agenți de colorare, agenți de eliberare, agenți de acoperire, agenți de îndulcire, agenți de aromatizare, agenți de parfumare, conservanți și antioxidanți.

Exemple de antioxidanți acceptabili farmaceutic includ: (1) antioxidanți solubili în apă, cum ar fi acid ascorbic, clorhidrat de cisteină, bisulfat de sodiu, metabisulfat de sodiu și sulfat de sodiu; (2) antioxidanți solubili în ulei, cum ar fi palmitat de ascorbil, hidroxianisol butilat (BHA), hidroxitoluen butilat (BHT), lecitină, galat de propil, și alfa-tocoferol; și (3) agenți de chelatare a metalelor, cum ar fi acid citric, acid etilendiamin tetraacetic (EDTA), sorbitol, acid tartric și acid fosforic.

Formulările din prezenta dezvoltare le includ pe cele adecvate pentru administrare orală, nazală, topică (incluzând bucală și sublinguală), rectală, vaginală și/sau parenterală. Formulările pot fi prezentate în mod convenabil în formă de dozare unitară și pot fi preparate prin orice metode bine cunoscute în domeniul farmaciei. Cantitatea de ingredient activ care poate fi combinată cu un material purtător pentru a produce o formă de dozare unitară va varia în funcție de subiectul care este tratat și de modul particular de administrare. Cantitatea de ingredient activ care poate fi combinată cu un material purtător pentru a produce o formă de dozare unitară va fi în general acea cantitate de ingredient activ care produce un efect terapeutic. În general, această cantitate va varia de la aproximativ 0,1 procente până la aproximativ nouăzeci și nouă procente de ingredient activ, de preferință, de la aproximativ 5 procente până la aproximativ 70 procente, cel mai preferabil, de la aproximativ 10 procente până la aproximativ 30 procente.

În anumite variante de realizare, o formulare din prezenta dezvoltare cuprinde un excipient selectat dintre ciclodextrine, celuloze, lipozomi, agenți formatori de miceliu, de exemplu, acizi biliari, și purtători polimerici, de exemplu, poliesteri și polianhidride; și un conjugat de oligomer antisens din prezenta dezvoltare. Conjugatul de oligomer antisens din formulare este conform cu Formula (IV) sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia. În anumite variante de realizare, o formulare menționată mai sus face biodisponibil oral un conjugat de oligomer antisens din prezenta dezvoltare.

Metodele de preparare a acestor formulări sau compoziții farmaceutice includ etapa de asociere a unui conjugat de oligomer antisens din prezenta dezvoltare cu purtătorul și, opțional, cu unu sau mai multe ingrediente accesorii. În general, formulările sunt preparate prin asocierea uniformă și intimă a unui conjugat de oligomer antisens din prezenta dezvoltare cu purtători lichizi, sau purtători solizi fin divizați, sau cu ambii, și apoi, dacă este necesar, modelarea produsului.

Formulările din dezvoltare adecvate pentru administrare orală pot fi sub formă de capsule, cașete, pilule, tablete, pastile (folosind o bază aromatizată, de obicei, zaharoză și salcâm sau tragacant), pulberi, granule, sau sub formă de soluție sau suspensie într-un lichid apos sau neapos, sau sub formă de emulsie lichidă ulei-în-apă sau apă-în-ulei, sau sub formă de elixir sau sirop, sau sub formă de pastile (folosind o bază inertă, cum ar fi gelatină și glicerină, sau zaharoză și salcâm), și/sau sub formă de apă de gură, fiecare conținând o cantitate predeterminată de un conjugat de oligomer antisens din prezenta dezvoltare ca ingredient activ. Un conjugat de oligomer antisens din prezenta dezvoltare poate fi administrat, de asemenea, sub formă de bolus, lictar sau pastă.

În formele de dozare solide pentru administrare orală din dezvoltare (capsule, tablete, pilule, drajeuri, pulberi, granule, pastile), ingredientul activ poate fi amestecat cu unu sau mai mulți purtători acceptabili farmaceutic, cum ar fi citrat de sodiu sau fosfat dicalcic și/sau oricare dintre următoarele: (1) agenți de umplere sau diluanți, cum ar fi amidon, lactoză, zaharoză, glucoză, manitol și/sau acid silicic;

(2) lianți, cum ar fi, de exemplu, carboximetilceluloză, algiinați, gelatină, polivinil pirolidonă, zaharoză și/sau acacia; (3) umectanți, cum ar fi glicerol; (4) agenți de dezintegrare, cum ar fi agar-agar, carbonat de calciu, amidon de cartofi sau tapioca, acid alginic, anumiți silicați și carbonat de sodiu; (5) agenți de întârziere a soluției, cum ar fi parafină; (6) acceleratori de absorbție, cum ar fi compuși de amoniu cuaternar și surfactanți, cum ar fi poloxamer și lauril sulfat de sodiu; (7) agenți de umectare, cum ar fi, de exemplu, alcool cetilic, monostearat de glicerol și surfactanți neionici; (8) absorbanti, cum ar fi caolin și argilă bentonită; (9) lubrifianți, cum ar fi talc, stearat de calciu, stearat de magneziu, polietilen glicoli solizi, lauril sulfat de sodiu, stearat de zinc, stearat de sodiu, acid stearic, și amestecuri ale acestora; (10) agenți de colorare; și (11) agenți de eliberare controlată, cum ar fi crospovidonă sau etil celuloză. În cazul capsulelor, tabletelor și pilulelor, compozițiile farmaceutice pot să conțină, de asemenea, agenți de tamponare. Compozițiile farmaceutice solide de un tip similar pot fi, de asemenea, folosite ca umpluturi în capsule de gelatină moi și cu înveliș tare utilizând excipienți, cum ar fi lactoză sau zaharuri din lapte, precum și polietilenglicoli cu greutate moleculară mare.

O tabletă poate fi realizată prin comprimare sau turnare, opțional, cu unu sau mai multe ingrediente accesorii. Tabletele comprimate pot fi preparate folosind liant (de ex., gelatină sau hidroxipropilmetil celuloză), lubrifiant, diluant inert, conservant, dezintegrant (de ex., amidon glicolat de sodiu sau carboximetil celuloză de sodiu reticulat), agent activ de suprafață sau de dispersare. Tabletele turnate pot fi realizate prin turnare într-o mașină adecvată a unui amestec de compus sub formă de pulbere umezit cu un diluant lichid inert.

Tabletele și alte forme de dozare solide ale compozițiilor farmaceutice din prezenta dezvoltare, cum ar fi drajeurile, capsulele, pilulele și granulele, pot fi opțional marcate sau preparate cu acoperiri și învelișuri, cum ar fi acoperiri enterice și alte acoperiri bine cunoscute în domeniul formulărilor farmaceutice. Ele pot fi, de asemenea, formulate astfel încât să asigure eliberarea lentă sau controlată a ingredientului activ din acestea utilizând, de exemplu, hidroxipropilmetil celuloză în proporții variabile pentru a furniza profilul de eliberare dorit, alte matrice polimerice, lipozomi și/sau microsfele. Ele pot fi formulate pentru eliberare rapidă, de exemplu, liofilizate. Acestea pot fi sterilizate, de exemplu, prin filtrare printr-un filtru de reținere a bacteriilor sau prin încorporarea agenților de sterilizare sub formă de compoziții farmaceutice solide sterile care pot fi dizolvate în apă sterilă sau în alt mediu injectabil steril imediat înainte de utilizare. Aceste compoziții farmaceutice pot să conțină, de asemenea, opțional, agenți de opacizare și pot avea o compoziție care eliberează numai ingredientul (ingredientele) activ, sau preferențial, într-o anumită porțiune a tractului gastrointestinal, opțional, într-o manieră întârziată. Exemple de compoziții de înglobare care pot fi utilizate includ substanțe polimerice și ceruri. Ingredientul activ poate fi, de asemenea, sub formă micro-încapsulată, dacă este cazul, cu unu sau mai mulți dintre excipienții descriși mai sus.

Formele de dozare lichide pentru administrare orală a conjugatilor de oligomeri antisens din dezvoltare includ emulsii, microemulsii, soluții, suspensii, siropuri și elixiruri acceptabile farmaceutic. În plus față de ingredientul activ, formele de dozare lichide pot să conțină diluanți inerti utilizați în mod obișnuit în domeniu, cum ar fi, de exemplu, apă sau alți solvenți, agenți de solubilizare și emulgatori, cum ar fi alcool etilic, alcool izopropilic, carbonat de etil, acetat de etil, alcool benzilic, benzoat de benzil, propilen glicol, 1,3-butilen glicol, uleiuri (în special, uleiuri de semințe de bumbac, arahide, porumb, germen, măsline, ricin și susan), glicerol, alcool tetrahidrofurilic, polietilen glicoli și esteri ai acizilor grași ai sorbitanului, și amestecuri ale acestora.

Pe lângă diluanții inerti, compozițiile farmaceutice orale pot include, de asemenea, adjuvanți, cum ar fi agenți de umectare, agenți de emulsionare și de suspendare, agenți de îndulcire, aromatizare, colorare, parfumare și conservanți.

Suspensiile, în plus față de compuși activi, pot să conțină agenți de suspendare, cum ar fi, de exemplu, alcooli izostearilici etoxilați, polioxietilen sorbitol și esteri de sorbitan, celuloză microcristalină, metahidroxid de aluminiu, bentonită, agar-agar și tragacant, și amestecuri ale acestora.

Formulările pentru administrare rectală sau vaginală pot fi prezentate sub formă de supozitor, care poate fi preparat prin amestecarea unuia sau mai multor compuși din dezvoltare cu unu sau mai mulți excipienți sau purtători neiritanți adecvați, care cuprind, de exemplu, unt de cacao, polietilen glicol, o ceară pentru supozitoare sau un salicilat, și care este solid la temperatura camerei, dar lichid la temperatura corpului și, prin urmare, se va topi în rect sau în cavitatea vaginală și va elibera compusul activ.

Formulările sau formele de dozare pentru administrare topică sau transdermică a unui oligomer, așa cum este furnizat aici, includ pulberi, spray-uri, unguente, paste, creme, loțiuni, geluri, soluții, plasturi și inhalanți. Conjugatii de oligomeri activi pot fi amestecați în condiții sterile cu un purtător acceptabil farmaceutic și cu orice conservanți, soluții tampon sau propulsori care pot fi necesari. Unguentele, pastele, cremele și gelurile pot să conțină, în plus față de un compus activ din această dezvoltare, excipienți, cum ar fi grăsimi animale și vegetale, uleiuri, ceară, parafine, amidon, tragacant, derivați de celuloză, polietilen glicoli, siliconi, bentonite, acid silicic, talc și oxid de zinc, sau amestecuri ale acestora.

Pulberile și spray-urile pot să conțină, în plus față de un conjugat de oligomer antisens din prezenta dezvoltare, excipienți, cum ar fi lactoză, talc, acid silicic, hidroxid de aluminiu, silicați de calciu și pulbere de poliamidă, sau amestecuri ale acestor substanțe. Spray-urile pot să conțină suplimentar propulsori obișnuiți, cum ar fi clorofluorohidrocarburi și hidrocarburi volatile nesubstituie, cum ar fi butan și propan.

Plasturii transdermici au avantajul suplimentar de a asigura eliberarea controlată în organism a unui conjugat de oligomer antisens din prezenta dezvoltare. Astfel de forme de dozare pot fi realizate prin dizolvarea sau dispersarea oligomerului în mediul adecvat. Amplificatorii de absorbție pot fi, de asemenea, utilizați pentru a crește fluxul de agent prin piele. Viteza unui astfel de flux poate fi controlată, printre alte metode cunoscute în domeniu, fie prin furnizarea unei membrane de control al vitezei, fie prin dispersarea agentului într-o matrice polimerică sau gel.

Compozițiile farmaceutice adecvate pentru administrare parenterală pot cuprinde unu sau mai mulți oligomeri conjugați din dezvoltare în combinație cu una sau mai multe soluții, dispersii, suspensii sau emulsii apoase sau neapoase sterile izotonice acceptabile farmaceutic sau pulberi sterile care pot fi reconstituite în soluții injectabile sterile sau în dispersii chiar înainte de utilizare, care pot să conțină zaharuri, alcooli, antioxidanți, tamponi, bacteriostatice, substanțe dizolvate care fac formularea izotonică cu sângele beneficiarului, sau agenți de suspendare sau de îngroșare. Exemple de purtători apoși și neapoși adecvați care pot fi folosiți în compozițiile farmaceutice din dezvoltare includ apă, etanol, polioli (cum ar fi glicerol, propilen glicol și polietilen glicol) și amestecuri adecvate ale acestora, uleiuri vegetale, cum ar fi uleiul de măsline, și esteri organici injectabili, cum ar fi oleatul de etil. Fluiditatea adecvată poate fi menținută, de exemplu, prin utilizarea materialelor de acoperire, cum ar fi lecitina, prin menținerea dimensiunii necesare a particulelor în cazul dispersiilor și prin utilizarea surfactanților. Conjugatul de oligomer antisens din compoziția farmaceutică este conform cu Formula (IV) sau este o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

Aceste compoziții farmaceutice pot să conțină, de asemenea, adjuvanți, cum ar fi conservanți, agenți de umectare, agenți de emulsionare și agenți de dispersare. Prevenirea acțiunii microorganismelor asupra conjugatelor de oligomeri aflați în discuție poate fi asigurată prin includerea diversilor agenți antibacterieni și antifungici, de exemplu, paraben, clorbutanol și acid fenol sorbic. De asemenea, poate fi de dorit să se includă în compoziții agenți izotonici, cum ar fi zaharuri, și clorură de sodiu. În plus, absorbția prelungită a formei farmaceutice injectabile poate fi realizată prin includerea de agenți care întârzie absorbția, cum ar fi monostearat de aluminiu și gelatină.

În unele cazuri, pentru a prelungi efectul unui medicament, este de dorit să fie încetinită absorbția medicamentului injectat subcutanat sau intramuscular. Acest lucru poate fi realizat, printre alte metode cunoscute în domeniu, prin utilizarea unei suspensii lichide de material cristalin sau amorf care are o solubilitate slabă în apă. Viteza de absorbție a medicamentului depinde apoi de viteza sa de dizolvare care, la rândul său, poate depinde de dimensiunea cristalului și de forma cristalină. În mod alternativ, absorbția întârziată a unei forme de medicament administrate parenteral este realizată prin dizolvarea sau suspendarea medicamentului într-un vehicul uleios.

Formele de depozit injectabile pot fi realizate prin formarea matricelor de microcapsule ale conjugatelor de oligomeri aflați în discuție în polimeri biodegradabili, cum ar fi polilactidă-poliglicolidă. În funcție de raportul dintre oligomer și polimer și de natura polimerului particular utilizat, viteza de eliberare a oligomerului poate fi controlată. Exemple de alți polimeri biodegradabili includ poli(ortoesteri) și poli(anhidride). Formulările de depozit injectabile pot fi preparate, de asemenea, prin captarea medicamentului în lipozomi sau microemulsii care sunt compatibile cu țesuturile corpului.

Atunci când conjugatii de oligomeri antisens din prezenta dezvoltare sunt administrați sub formă de produse farmaceutice la oameni și animale, ei pot fi administrați per se sau sub forma unei compoziții farmaceutice care conține, de exemplu, 0,1 până la 99% (mai preferabil, 10 până la 30%) de conjugat de oligomer antisens în combinație cu un purtător acceptabil farmaceutic.

Formulările sau preparatele din prezenta dezvoltare pot fi administrate oral, parenteral, topic sau rectal. Ele sunt administrate, de obicei, în forme adecvate pentru fiecare cale de administrare. De exemplu, ele sunt administrate sub formă de tablete sau capsule, prin injecție, inhalare, loțiuni pentru ochi, unguent, supozitor sau perfuzie; topic prin loțiuni sau unguent; sau rectal prin supozitoare.

Indiferent de calea de administrare aleasă, conjugatii de oligomeri antisens din prezenta dezvoltare, care pot fi utilizați într-o formă hidratată adecvată, și/sau compozițiile farmaceutice din prezenta dezvoltare, pot fi formulate în forme de dozare acceptabile farmaceutic prin metode convenționale cunoscute specialiștilor în domeniu. Nivelurile reale de dozare ale ingredientelor active din compozițiile farmaceutice din această dezvoltare pot fi variate astfel încât să se obțină o cantitate de ingredient activ care este eficientă pentru a obține răspunsul terapeutic dorit pentru un anumit pacient, compoziție și mod de administrare, fără a fi inacceptabil de toxice pentru pacient.

Nivelul de dozare selectat va depinde de o varietate de factori, incluzând activitatea conjugatului de oligomer antisens particular din prezenta dezvoltare utilizat sau a esterului, a sării sau a amidei

acestuia, calea de administrare, timpul de administrare, viteza de excreție sau metabolismul oligomerului particular utilizat, viteza și gradul de absorbție, durata tratamentului, alte medicamente, compuși și/sau materiale utilizate în combinație cu oligomerul particular utilizat, vârsta, sexul, greutatea, afecțiunea, starea generală de sănătate și antecedentele medicale ale pacientului tratat, și factori similari bine cunoscuți în domeniul medical.

Un medic sau un medic veterinar cu o calificare obișnuită în domeniu poate determina și prescrie cu ușurință cantitatea eficientă de compoziție farmaceutică necesară. De exemplu, medicul sau medicul veterinar ar putea începe cu doze de conjugată de oligomeri antisens din dezvoltare folosiți în compoziția farmaceutică la niveluri mai mici decât cele necesare pentru a obține efectul terapeutic dorit, și să crească treptat doza până la obținerea efectului dorit. În general, o doză zilnică adecvată de conjugată de oligomer antisens din dezvoltare va fi acea cantitate de conjugată de oligomer antisens care este cea mai mică doză eficientă pentru a produce un efect terapeutic. O astfel de doză eficientă va depinde, în general, de factorii descriși aici. În general, dozele orale, intravenoase, intracerebroventriculare și subcutanate de conjugată de oligomeri antisens din această dezvoltare pentru un pacient, atunci când sunt utilizate pentru efectele indicate, vor varia de la aproximativ 0,0001 până la aproximativ 100 mg la fiecare kilogram de greutate corporală pe zi.

În unele variante de realizare, conjugată de oligomeri antisens din prezenta dezvoltare sunt administrați în doze, în general, de la aproximativ 10-160 mg/kg sau 20-160 mg/kg. În unele cazuri, pot fi necesare doze mai mari decât 160 mg/kg. În unele variante de realizare, dozele pentru administrare i.v. sunt de la aproximativ 0,5 mg până la 160 mg/kg. În unele variante de realizare, conjugată de oligomeri antisens sunt administrați în doze de aproximativ 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg sau 10 mg/kg. În unele variante de realizare, conjugată de oligomeri antisens sunt administrați în doze de aproximativ 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 15 mg/kg, 18 mg/kg, 20 mg/kg, 21 mg/kg, 25 mg/kg, 26 mg/kg, 27 mg/kg, 28 mg/kg, 29 mg/kg, 30 mg/kg, 31 mg/kg, 32 mg/kg, 33 mg/kg, 34 mg/kg, 35 mg/kg, 36 mg/kg, 37 mg/kg, 38 mg/kg, 39 mg/kg, 40 mg/kg, 41 mg/kg, 42 mg/kg, 43 mg/kg, 44 mg/kg, 45 mg/kg, 46 mg/kg, 47 mg/kg, 48 mg/kg, 49 mg/kg, 50 mg/kg, 51 mg/kg, 52 mg/kg, 53 mg/kg, 54 mg/kg, 55 mg/kg, 56 mg/kg, 57 mg/kg, 58 mg/kg, 59 mg/kg, 60 mg/kg, 65 mg/kg, 70 mg/kg, 75 mg/kg, 80 mg/kg, 85 mg/kg, 90 mg/kg, 95 mg/kg, 100 mg/kg, 105 mg/kg, 110 mg/kg, 115 mg/kg, 120 mg/kg, 125 mg/kg, 130 mg/kg, 135 mg/kg, 140 mg/kg, 145 mg/kg, 150 mg/kg, 155 mg/kg, 160 mg/kg, incluzând toate numerele întregi dintre ele. În unele variante de realizare, oligomerul este administrat la 10 mg/kg. În unele variante de realizare, oligomerul este administrat la 20 mg/kg. În unele variante de realizare, oligomerul este administrat la 30 mg/kg. În unele variante de realizare, oligomerul este administrat la 40 mg/kg. În unele variante de realizare, oligomerul este administrat la 60 mg/kg. În unele variante de realizare, oligomerul este administrat la 80 mg/kg. În unele variante de realizare, oligomerul este administrat la 160 mg/kg. În unele variante de realizare, oligomerul este administrat la 50 mg/kg.

În unele variante de realizare, conjugatul de oligomer antisens cu Formula (IV) sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia este administrat în doze, în general, de la aproximativ 10-160 mg/kg sau 20-160 mg/kg. În unele variante de realizare, dozele de conjugată de oligomer antisens cu Formula (IV) sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia pentru administrare i.v. sunt de la aproximativ 0,5 mg până la 160 mg/kg. În unele variante de realizare, conjugatul de oligomer antisens cu Formula (IV) sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia este administrat în doze de aproximativ 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg sau 10 mg/kg. În unele variante de realizare, conjugatul de oligomer antisens cu Formula (IV) sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia este administrat în doze de aproximativ 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 15 mg/kg, 18 mg/kg, 20 mg/kg, 21 mg/kg, 25 mg/kg, 26 mg/kg, 27 mg/kg, 28 mg/kg, 29 mg/kg, 30 mg/kg, 31 mg/kg, 32 mg/kg, 33 mg/kg, 34 mg/kg, 35 mg/kg, 36 mg/kg, 37 mg/kg, 38 mg/kg, 39 mg/kg, 40 mg/kg, 41 mg/kg, 42 mg/kg, 43 mg/kg, 44 mg/kg, 45 mg/kg, 46 mg/kg, 47 mg/kg, 48 mg/kg, 49 mg/kg, 50 mg/kg, 51 mg/kg, 52 mg/kg, 53 mg/kg, 54 mg/kg, 55 mg/kg, 56 mg/kg, 57 mg/kg, 58 mg/kg, 59 mg/kg, 60 mg/kg, 65 mg/kg, 70 mg/kg, 75 mg/kg, 80 mg/kg, 85 mg/kg, 90 mg/kg, 95 mg/kg, 100 mg/kg, 105 mg/kg, 110 mg/kg, 115 mg/kg, 120 mg/kg, 125 mg/kg, 130 mg/kg, 135 mg/kg, 140 mg/kg, 145 mg/kg, 150 mg/kg, 155 mg/kg, 160 mg/kg, incluzând toate numerele întregi dintre ele. În unele variante de realizare, conjugatul de oligomer antisens cu Formula (IV) sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia este administrat la 10 mg/kg. În unele variante de realizare, conjugatul de oligomer antisens cu Formula (IV) sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia este administrat la 20 mg/kg. În unele variante de realizare, conjugatul de oligomer antisens cu Formula (IV) sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia este administrat la 30 mg/kg. În unele variante de realizare, conjugatul de oligomer antisens cu Formula (IV) sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia este administrat la 40 mg/kg. În unele variante de realizare, conjugatul de oligomer antisens cu Formula (IV) sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia este administrat la 60 mg/kg. În unele variante de realizare, conjugatul de oligomer antisens cu Formula (IV) sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia este administrat la 80 mg/kg. În unele variante de realizare,

conjugatul de oligomer antisens cu Formula (IV) sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia este administrat la 160 mg/kg. În unele variante de realizare, conjugatul de oligomer antisens cu Formula (IV) sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia este administrat la 50 mg/kg.

Dacă se dorește, doza zilnică eficientă de compus activ poate fi administrată ca două, trei, patru, cinci, șase sau mai multe subdoze administrate separat la intervale adecvate pe parcursul zilei, opțional, în forme de dozare unitară. În anumite situații, doza este de o administrare pe zi. În anumite variante de realizare, dozarea este de una sau mai multe administrări la fiecare 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 zile sau la fiecare 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 săptămâni sau la fiecare 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 luni, după cum este necesar, pentru a menține expresia dorită a unei proteine distrofina funcțională. În anumite variante de realizare, dozarea este cu una sau mai multe administrări o dată la două săptămâni. În unele variante de realizare, dozarea este o administrare o dată la două săptămâni. În diverse variante de realizare, dozarea este una sau mai multe administrări în fiecare lună. În anumite variante de realizare, dozarea este o administrare în fiecare lună.

În diverse variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați săptămânal la 10 mg/kg. În diverse variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați săptămânal la 20 mg/kg. În diverse variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați săptămânal la 30 mg/kg. În diverse variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați săptămânal la 40 mg/kg. În unele variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați săptămânal la 60 mg/kg. În unele variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați săptămânal la 80 mg/kg. În unele variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați săptămânal la 100 mg/kg. În unele variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați săptămânal la 160 mg/kg. Așa cum este utilizat aici, săptămânal este înțeles ca care are semnificația acceptată în domeniu de fiecare săptămână.

În diverse variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați la două săptămâni la 10 mg/kg. În diverse variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați la două săptămâni la 20 mg/kg. În diverse variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați la două săptămâni la 30 mg/kg. În diverse variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați la două săptămâni la 40 mg/kg. În unele variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați la două săptămâni la 60 mg/kg. În unele variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați la două săptămâni la 80 mg/kg. În unele variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați la două săptămâni la 100 mg/kg. În unele variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați la două săptămâni la 160 mg/kg. Așa cum este utilizat aici, la două săptămâni este înțeles ca are semnificația acceptată în domeniu: la fiecare două săptămâni.

În diverse variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați la fiecare trei săptămâni la 10 mg/kg. În diverse variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați la fiecare trei săptămâni la 20 mg/kg. În diverse variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați la fiecare trei săptămâni la 30 mg/kg. În diverse variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați la fiecare trei săptămâni la 40 mg/kg. În unele variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați la fiecare trei săptămâni la 60 mg/kg. În unele variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați la fiecare trei săptămâni la 80 mg/kg. În unele variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați la fiecare trei săptămâni la 100 mg/kg. În unele variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați la fiecare trei săptămâni la 160 mg/kg. Așa cum este utilizat aici, se înțelege că fiecare trei săptămâni are semnificația acceptată în domeniu de o dată la trei săptămâni.

În diverse variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați lunar la 10 mg/kg. În diverse variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați lunar la 20 mg/kg. În diverse variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați lunar la 30 mg/kg. În diverse variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați lunar la 40 mg/kg. În unele variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați lunar la 60 mg/kg. În unele variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați lunar la 80 mg/kg. În unele variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați lunar la 100 mg/kg. În unele variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați lunar la 160 mg/kg. Așa cum este utilizat aici, lunar este înțeles ca care are semnificația acceptată în domeniu de în fiecare lună.

După cum s-ar înțelege în domeniu, administrările săptămânale, la două săptămâni, la fiecare a treia săptămână sau lunare pot fi în una sau mai multe administrări sau subdoze așa cum a fost discutat aici.

Moleculele de acid nucleic și conjugatii de oligomeri antisens descrise aici pot fi administrate la celule printr-o varietate de metode cunoscute celor familiari cu domeniul, incluzând, dar fără limitare la, încapsularea în lipozomi, prin iontoforeză sau prin încorporare în alte vehicule, cum ar fi hidrogeluri, ciclodextrine, nanocapsule biodegradabile și microsfele bioadezive, așa cum sunt descrise aici și

cunoscute în domeniu. În anumite variante de realizare, tehnologia de microemulsionare poate fi utilizată pentru a îmbunătăți biodisponibilitatea agenților farmaceutici lipofili (insolubili în apă). Exemplele includ trimetrină (Dordunoo, S. K., și colab., Drug Development and Industrial Pharmacy, 17(12), 1685-1713, 1991) și REV 5901 (Sheen, P. C., și colab., J Pharm Sci 80(7), 712-714, 1991). Printre alte beneficii, microemulsifierea asigură o biodisponibilitate îmbunătățită prin absorbția direcționată preferențial către sistemul limfatic în locul sistemului circulator, care ocolește astfel ficatul și previne distrugerea compuşilor în circulația hepatobiliară.

Într-un aspect al dezvoltării, formulările conțin miceli formati dintr-un oligomer așa cum este furnizat aici, și cel puțin un purtător amfifil, în care miceliile au un diametru mediu mai mic decât aproximativ 100 nm. Variantele de realizare mai preferate furnizează miceli care au un diametru mediu mai mic decât aproximativ 50 nm, și variantele de realizare chiar mai preferate furnizează miceli care au un diametru mediu mai mic decât aproximativ 30 nm, sau chiar mai mic decât aproximativ 20 nm.

Deși sunt luați în considerare toți purtătorii amfifilii adecvați, purtătorii preferați în prezent sunt, în general, cei care au statutul General Recunoscut ca Sigur (Generally-Recognized-as-Safe) (GRAS) și care pot, atât să solubilizeze un conjugat de oligomer antisens din prezenta dezvoltare, cât și să îl microemulsioneze într-o etapă ulterioară când soluția intră în contact cu o fază apoasă a complexului (cum ar fi cea găsită în tractul gastro-intestinal uman). De obicei, ingredientele amfifile care satisfac aceste cerințe au valori HLB (echilibru hidrofil până la lipofil) de 2-20, și structurile lor conțin radicali alifatici cu catenă liniară în intervalul C-6 până la C-20. Exemple sunt gliceridele grase polietilenglicolizate și polietilenglicolii.

Exemple de purtători amfifilii includ gliceridele acizilor grași polietilenglicolizați saturați și mononesaturați, cum ar fi cele obținute din diferite uleiuri vegetale complet sau parțial hidrogenate. Astfel de uleiuri pot consta în mod avantajos din acizi grași tri-, di- și mono-gliceride și esteri di- și mono-poli(etilen glicol) ai acizilor grași corespunzători, cu o compoziție de acizi grași preferată în mod deosebit incluzând acid capric 4-10%, acid capric 3-9%, acid lauric 40-50%, acid miristic 14-24%, acid palmitic 4-14% și acid stearic 5-15%. O altă clasă utilă de purtători amfifilii include sorbitanul și/sau sorbitolul parțial esterificat, cu acizi grași saturați sau mono-nesaturați (seria SPAN) sau analogii etoxilați corespunzători (seria TWEEN).

Purtătorii amfifili disponibili comercial pot fi deosebit de utili, incluzând seria Gelucire, Labrafil, Labrasol sau Lauroglicol (toate fabricate și distribuite de Gattefosse Corporation, Saint Priest, Franța), PEG-mono-oleat, PEG-di-oleat, PEG-mono-laurat și di-laurat, Lecitina, Polisorbat 80, etc. (produse și distribuite în SUA și în întreaga lume de către o serie de companii).

În anumite variante de realizare, furnizarea poate avea loc prin utilizarea de lipozomi, nanocapsule, microparticule, microsfele, particule lipidice și vezicule, pentru introducerea compozițiilor farmaceutice din prezenta dezvoltare în celule gazdă adecvate. În special, compozițiile farmaceutice din prezenta dezvoltare pot fi formulate pentru furnizare, fie încapsulate într-o particulă lipidică, un lipozom, o veziculă, o nanosferă, o nanoparticulă, fie prin altele asemenea. Formularea și utilizarea unor astfel de vehicule de furnizare pot fi efectuate folosind tehnici cunoscute și convenționale.

Polimerii hidrofilii adecvați pentru utilizare în prezenta dezvoltare sunt cei care sunt ușor solubili în apă, pot fi atașați covalent la o lipidă care formează vezicule, și cei care sunt tolerați in vivo fără efecte toxice (adică sunt biocompatibili). Polimerii adecvați includ poli(etilen glicol) (PEG), acid polilactic (denumit, de asemenea, polilactidă), acid poliglicolic (denumit, de asemenea, poliglicolidă), un copolimer acid polilactic-poliglicolic și alcool polivinilic. În anumite variante de realizare, polimerii au o greutate moleculară medie de la aproximativ 100 sau 120 daltoni până la aproximativ 5000 sau 10000 daltoni, sau de la aproximativ 300 daltoni până la aproximativ 5000 daltoni. În alte variante de realizare, polimerul este poli(etilen glicol) care are o greutate moleculară medie de la aproximativ 100 până la aproximativ 5000 daltoni sau care are o greutate moleculară medie de la aproximativ 300 până la aproximativ 5000 daltoni. În anumite variante de realizare, polimerul este un poli(etilen glicol) care are o greutate moleculară medie de aproximativ 750 daltoni, de exemplu, PEG(750). Polimerii pot fi definiți, de asemenea, prin numărul de monomeri din ei; o variantă de realizare preferată a prezentei dezvoltări utilizează polimeri care au cel puțin aproximativ trei monomeri, astfel de polimeri PEG constând din trei monomeri care au o greutate moleculară de aproximativ 132 daltoni.

Alți polimeri hidrofilii care pot fi adecvați pentru utilizare în prezenta dezvoltare includ polivinilpirolidonă, polimetoxazolină, polietiloxazolină, polihidroxipropil metacrilamidă, polimetacrilamidă, polidimetilacrilamidă, și celuloze derivatizate, cum ar fi hidroximetilceluloză sau hidroxietilceluloză.

În anumite variante de realizare, o formulare din prezenta dezvoltare cuprinde un polimer biocompatibil selectat din grupul constând din poliamide, policarbonați, polialchilene, polimeri de esteri acrilici și metacrilici, polimeri polivinilici, poliglicolide, polisiloxani, poliuretani și copolimeri ai acestora, celuloze, polipropilenă, polietilene, polistiren, polimeri de acid lactic și acid glicolic, polianhidride, poli(orto)esteri, poli(acid butic), poli(acid valeric), poli(lactidă-co-caprolactonă),

polizaharide, proteine, acizi polihialuronici, policianoacilați, și amestecuri intime, amestecuri sau copolimeri ai acestora.

Ciclodextrinele sunt oligozaharide ciclice, formate din 6, 7 sau 8 unități de glucoză, indicate prin litera greacă α , β , sau, respectiv, γ . Unitățile de glucoză sunt legate prin legături α -1,4-glucozidice. Ca o consecință a conformației în formă de scaun a unităților de zahar, toate grupările hidroxil secundare (la C-2, C-3) sunt situate pe o parte a ciclului, în timp ce toate grupările hidroxil primare la C-6 sunt situate pe cealaltă latură. Ca urmare, fețele externe sunt hidrofile, făcând ciclodextrinele solubile în apă. În schimb, cavitățile ciclodextrinelor sunt hidrofobe, deoarece sunt căptușite cu hidrogenul atomilor C-3 și C-5, și cu oxigenii asemănători cu eterul. Aceste matrice permit complexarea cu o varietate de compuși relativ hidrofobi, incluzând, de exemplu, compuși sterizi, cum ar fi 17 α -estradiol (vezi, de ex., van Uden și colab. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 38:1-3-113 (1994)). Complexarea are loc prin interacțiuni Van der Waals și prin formarea legăturilor de hidrogen. Pentru o revedere generală a chimiei ciclodextrinelor, vezi, Wenz, *Agnew. Chim. Int. Ed. Engl.*, 33:803-822 (1994).

Proprietățile fizico-chimice ale derivaților de ciclodextrină depind puternic de tipul și gradul de substituție. De exemplu, solubilitatea lor în apă variază de la insolubil (de ex., triacetil-beta-ciclodextrină) până la 147% solubil (g/v) (G-2-beta-ciclodextrină). În plus, sunt solubili în mulți solvenți organici. Proprietățile ciclodextrinelor permit controlul asupra solubilității diferitelor componente ale formulării prin creșterea sau scăderea solubilității acestora.

Au fost descrise numeroase ciclodextrine și metode de preparare a acestora. De exemplu, Parmeter (I), și colab. (brevetul U.S. Nr. 3,453,259) și Gramera și colab. (Brevetul U.S. Nr. 3,459,731) au descris ciclodextrine electroneutre. Alți derivați includ ciclodextrine cu proprietăți cationice [Parmeter (II), Brevetul U.S. Nr. 3,453,257], ciclodextrine reticulate insolubile (Solms, Brevetul U.S. Nr. 3,420,788), și ciclodextrine cu proprietăți anionice [Parmeter (III), Brevetul U.S. Nr. 3,426,011]. Dintre derivații de ciclodextrină cu proprietăți anionice, acizii carboxilici, acizii fosforici, acizii fosfinoși, acizii fosfonici, acizii fosforici, acizii tiofosfonici, acizii tiosulfonici și acizii sulfonici au fost atașați la ciclodextrina părinte [vezi, Parmetru (III), supra]. Mai mult, derivații de ciclodextrină sulfoalchil eter au fost descriși de Stella, și colab. (Brevetul U.S. Nr. 5,134,127).

Lipozomii constau din cel puțin o membrană cu două straturi lipidice care cuprinde un compartiment intern apos. Lipozomii pot fi caracterizați prin tipul membranei și prin dimensiune. Veziculele mici unilamelare (SUV) au o singură membrană și, de obicei, variază între 0,02 și 0,05 μ m în diametru; veziculele mari unilamelare (LUVS) sunt de obicei mai mari decât 0,05 μ m. Veziculele mari oligolamelare și veziculele multilamelare au straturi de membrană multiple, de obicei, concentrice, și sunt de obicei mai mari de 0,1 μ m. Lipozomii cu mai multe membrane neconcentrice, adică câteva vezicule mai mici conținute într-o veziculă mai mare, sunt denumiți vezicule multiveziculare.

Un aspect al prezentei dezvoltări se referă la formulări care cuprind lipozomi care conțin un conjugat de oligomer antisens din prezenta dezvoltării, în care membrana lipozomului este formulată pentru a furniza un lipozom cu capacitate de transport crescută. În mod alternativ sau suplimentar, conjugatul de oligomer antisens din prezenta dezvoltării poate fi conținut în, sau adsorbit pe, stratul dublu de lipozom al lipozomului. Un conjugat de oligomer antisens din prezenta dezvoltării poate fi agregat cu un surfactant lipidic și este transportat în spațiul intern al lipozomului; în aceste cazuri, membrana lipozomală este formulată pentru a rezista la efectele perturbatoare ale agregatului agent activ-surfactant.

Conform unei variante de realizare a prezentei dezvoltării, stratul dublu lipidic al unui lipozom conține lipide derivate cu poli(etilen glicol) (PEG), astfel încât lanțurile PEG se extind de la suprafața interioară a stratului dublu lipidic în spațiul interior încapsulat de lipozom și se extind din exteriorul stratului dublu lipidic în mediul înconjurător.

Agenții activi conținuți în lipozomii din prezenta dezvoltării sunt sub formă solubilizată. Agregatele de surfactant și agent activ (cum ar fi emulsii sau miceli care conțin agentul activ de interes) pot fi prinse în spațiul interior al lipozomilor conform prezentei dezvoltării. Un surfactant acționează pentru a dispersa și solubiliza agentul activ și poate fi selectat dintre orice surfactant alifatic, cicloalifatic sau aromatic adecvat, incluzând, dar fără limitare la, lizofosfatidilcoline (LPG-uri) biocompatibile cu lungimi de lanț variabile (de ex., de la aproximativ C14 până la aproximativ C20). Lipidele derivate din polimer, cum ar fi lipidele PEG, pot fi, de asemenea, utilizate pentru formarea miceliilor, deoarece acestea vor acționa pentru a inhiba fuziunea miceliu/membrană, și deoarece adăugarea unui polimer la moleculele de surfactant scade CMC a surfactantului și ajută la formarea miceliilor. Sunt preferați surfactanții cu CMO în intervalul micromolar; surfactanții cu CMC mai mare pot fi utilizați pentru a prepara miceli prinși în lipozomii din prezenta dezvoltării.

Lipozomii conform prezentei dezvoltării pot fi preparați prin oricare dintre o varietate de tehnici care sunt cunoscute în domeniu. Vezi, de ex., brevetul U.S. Nr. 4,235,871; cererea PCT publicată WO 96/14057; New RRC, *Lipozomi: O abordare practică*, IRL Press, Oxford (1990), paginile 33-104; și Lasic DD, *Liposomes from physics to applications*, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1993. De exemplu, lipozomii din prezenta dezvoltării pot fi preparați prin difuzarea unei lipide derivatizate cu un

polimer hidrofil în lipozomi preformați, cum ar fi prin expunerea lipozomilor preformați la micelii formați din polimeri grefați cu lipide, la concentrații de lipide corespunzătoare procentului molar final al lipidei derivatizate care este dorită în lipozom. Lipozomii care conțin un polimer hidrofil pot fi formați, de asemenea, prin tehnici de omogenizare, hidratare în câmp lipidic sau extrudare, așa cum este cunoscut în domeniu.

Într-o altă procedură exemplificatoare de formulare, agentul activ este mai întâi dispersat prin sonicare într-o lizofosfatidilcolină sau într-un alt surfactant cu CMC scăzut (incluzând lipide grefate cu polimer) care solubilizează ușor moleculele hidrofobe. Suspensia micelară de agent activ rezultată este apoi utilizată pentru a rehidrata o probă de lipide uscată care conține un procent molar adecvat de lipide grefate cu polimer sau de colesterol. Suspensia de lipide și agent activ este apoi transformată în lipozomi utilizând tehnici de extrudare, așa cum este cunoscut în domeniu, și lipozomii rezultați sunt separați din soluția neîncapsulată prin separare pe coloană standard.

Într-un aspect al prezentei dezvoltări, lipozomii sunt preparați astfel încât să aibă dimensiuni substanțial omogene într-un interval de dimensiuni selectat. O metodă eficientă de dimensionare implică extrudarea unei suspensii apoase de lipozomi printr-o serie de membrane de polycarbonat care au o dimensiune a porilor uniformă selectată; dimensiunea porilor membranei va corespunde aproximativ cu cele mai mari dimensiuni ale lipozomilor produși prin extrudare prin acea membrană. Vezi, de ex., brevetul U.S. Nr. 4,737,323 (Apr. 12, 1988). În anumite variante de realizare, reactivi, cum ar fi DharmaFECT® și Lipofectamine® pot fi utilizați pentru a introduce polinucleotide sau proteine în celule.

Caracteristicile de eliberare ale unei formulări din prezenta dezvoltare depind de materialul de încapsulare, de concentrația medicamentului încapsulat și de prezența modificatorilor de eliberare. De exemplu, eliberarea poate fi manipulată pentru a fi dependentă de pH, de exemplu, folosind o acoperire sensibilă la pH care eliberează numai la un pH scăzut, cum ar fi în stomac, sau la un pH mai mare, cum ar fi în intestin. Un înveliș enteric poate fi utilizat pentru a preveni eliberarea până după trecerea prin stomac. Mai multe acoperiri sau amestecuri de cianamidă încapsulate în diferite materiale pot fi utilizate pentru a obține o eliberare inițială în stomac, urmată de o eliberare ulterioară în intestin. Eliberarea poate fi, de asemenea, manipulată prin includerea de săruri sau agenți de formare a porilor, care pot crește absorbția de apă sau eliberarea medicamentului prin difuzie din capsulă. Excipienții care modifică solubilitatea medicamentului pot fi, de asemenea, utilizați pentru a controla viteza de eliberare. Agenții care sporesc degradarea matricei sau eliberarea din matrice pot fi de asemenea încorporați. Aceștia pot fi adăugați la medicament, pot fi adăugați ca o fază separată (adică, sub formă de particule) sau pot fi dizolvați împreună în faza de polimer în funcție de compus. În cele mai multe cazuri, cantitatea ar trebui să fie între 0,1 și 30 procente (g/g de polimer). Tipurile de amplificatori de degradare includ săruri anorganice, cum ar fi sulfatul de amoniu și clorura de amoniu, acizi organici, cum ar fi acidul citric, acidul benzoic și acidul ascorbic, baze anorganice, cum ar fi carbonatul de sodiu, carbonatul de potasiu, carbonatul de calciu, carbonatul de zinc și hidroxidul de zinc, și baze organice, cum ar fi sulfatul de protamină, spermina, colina, etanolamina, dietanolamina și trietanolamina, și surfactanți, cum ar fi Tween® și Pluronic®. Agenții de formare a porilor care adaugă microstructură matricelor (adică compuși solubili în apă, cum ar fi săruri anorganice și zaharuri) sunt adăugați sub formă de particule. Intervalul este de obicei între unu și treizeci procente (g/g de polimer).

Absorbția poate fi, de asemenea, manipulată prin modificarea timpului de rezidență a particulelor în intestin. Acest lucru poate fi realizat, de exemplu, prin acoperirea particulei cu, sau selectând ca material de încapsulare, un polimer adeziv pentru mucoase. Exemplele includ majoritatea polimerilor cu grupări carboxil libere, cum ar fi chitosan, celuloze și, în special, poliacrilati (așa cum este utilizat aici, poliacrilati se referă la polimeri care includ grupări acrilat și grupări acrilat modificate, cum ar fi cianoacrilati și metacrilati).

Un conjugat de oligomer antisens poate fi formulat astfel încât să fie conținut în, sau, să fie adaptat pentru eliberare printr-un dispozitiv sau implant chirurgical sau medical. În anumite aspecte, un implant poate fi acoperit sau tratat în alt mod cu un conjugat de oligomer antisens. De exemplu, hidrogelurile sau alți polimeri, cum ar fi polimerii biocompatibili și/sau biodegradabili, pot fi utilizate pentru a acoperi un implant cu compozițiile farmaceutice din prezenta dezvoltare (adică, compoziția poate fi adaptată pentru utilizare cu un dispozitiv medical prin utilizarea unui hidrogel sau alt polimer). Polimerii și copolimerii pentru acoperirea dispozitivelor medicale cu un agent sunt bine cunoscuți în domeniu. Exemple de implanturi includ, dar nu se limitează la, stenturi, stenturi cu eliberare de medicamente, suturi, proteze, catetere vasculare, catetere de dializă, grefe vasculare, valve cardiace protetice, stimulatoare cardiace, defibrilatoare cardioverter implantabile, ace IV, dispozitive pentru fixarea și formarea oaselor, cum ar fi știfturi, șuruburi, plăci și alte dispozitive și matrice de țesut artificial pentru vindecarea rănilor.

În plus față de metodele furnizate aici, conjugatii de oligomeri antisens pentru utilizare conform dezvoltării pot fi formulați pentru administrare în orice mod convenabil pentru utilizare în medicina umană sau veterinară, prin analogie cu alte produse farmaceutice. Conjugatii de oligomeri antisens și

formulările lor corespunzătoare pot fi administrate singure sau în combinație cu alte strategii terapeutice, pentru tratamentul distrofiei musculare, cum ar fi transplantul de mioblast, terapiile cu celule stem, administrarea de antibiotice aminoglicozide, inhibitori de proteazom și terapii de reglare în sens crescător (de ex., reglarea în sens crescător a utrofinei, un paralog autozomal al distrofinei).

În unele variante de realizare, agentul terapeutic suplimentar poate fi administrat înainte, concomitent sau ulterior administrării conjugatului de oligomer antisens din prezenta dezvoltare. De exemplu, conjugatii de oligomeri antisens pot fi administrați în combinație cu un steroid și/sau antibiotic. În anumite variante de realizare, conjugatii de oligomeri antisens sunt administrați unui pacient care se află în terapie de fond cu steroizi (de ex., terapie de fond intermitentă sau cronică/continuă cu steroizi). De exemplu, în unele variante de realizare pacientul a fost tratat cu un corticosteroid înainte de administrarea unui oligomer antisens și continuă să primească terapia cu steroizi. În unele variante de realizare, steroidul este glucocorticoid sau prednison.

Căile de administrare descrise sunt destinate doar ca un ghid, deoarece un medic calificat va fi capabil să determine cu ușurință calea optimă de administrare și orice doză pentru orice animal și afecțiune particulare. Au fost încercate abordări multiple pentru introducerea de material genetic funcțional nou în celule, atât in vitro, cât și in vivo (Friedmann (1989) Science, 244:1275-1280). Aceste abordări includ integrarea genei care urmează să fie exprimată în retrovirusuri modificate (Friedmann (1989) de mai sus; Rosenberg (1991) Cancer Research 51(18), suppl.: 5074S-5079S); integrarea în vectori non-retrovirusi (de ex., vectori virali adeno-asociați) (Rosenfeld și colab. (1992) Cell, 68:143-155; Rosenfeld și colab. (1991) Science, 252:431-434); sau furnizarea unei transgene legată la un element promotor-amplificator heterolog prin lipozomi (Friedmann (1989), de mai sus; Brigham și colab. (1989) Am. J. Med. Sci., 298:278-281; Nabel și colab. (1990) Science, 249:1285-1288; Hazinski, și colab. (1991) Am. J. Resp. Cell Molec. Biol., 4:206-209; și Wang și Huang (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. (SUA), 84:7851-7855); cuplați la sisteme de transport bazate pe cationi specifice ligandului (Wu și Wu (1988) J. Biol. Chem., 263:14621-14624) sau utilizarea vectorilor de expresie a ADN-ului liber (Nabel și colab. (1990), de mai sus; Wolff și colab. (1990) Science, 247:1465-1468). Injectarea directă a transgenelor în țesut produce doar expresie localizată (Rosenfeld (1992) de mai sus; Rosenfeld și colab. (1991) de mai sus; Brigham și colab. (1989) de mai sus; Nabel (1990) de mai sus; și Hazinski și colab. (1991) de mai sus). Grupul Brigham și colab. (Am. J. Med. Sci. (1989) 298:278-281 și Clinical Research (1991) 39 (rezumat)) a raportat transfecția in vivo numai a plămânilor de șoareci după administrarea, fie intravenoasă, fie intratraheală a unui complex de lipozomi ADN. Un exemplu de articol de revizuire a procedurilor de terapie genică umană este: Anderson, Science (1992) 256:808-813.

Într-o altă variantă de realizare, compozițiile farmaceutice din dezvoltare pot cuprinde suplimentar un carbohidrat așa cum este prevăzut în Han și colab., Nat. Comms. 7, 10981 (2016). În unele variante de realizare, compozițiile farmaceutice din dezvoltare pot cuprinde 5% de un carbohidrat de hexoză. De exemplu, compoziția farmaceutică din dezvoltare poate cuprinde 5% glucoză, 5% fructoză sau 5% manoză. În anumite variante de realizare, compozițiile farmaceutice din dezvoltare pot să conțină 2,5% glucoză și 2,5% fructoză. În unele variante de realizare, compozițiile farmaceutice din dezvoltare pot cuprinde un carbohidrat selectat dintre: arabinoză prezentă într-o cantitate de 5% din volum, glucoză prezentă într-o cantitate de 5% din volum, sorbitol prezent într-o cantitate de 5% din volum, galactoză prezentă în cantitate de 5% din volum, fructoză prezentă în cantitate de 5% din volum, xilitol prezent în cantitate de 5% din volum, manoză prezentă în cantitate de 5% din volum, o combinație de glucoză și fructoză, fiecare prezentă într-o cantitate de 2,5% din volum, și o combinație de glucoză prezentă în cantitate de 5,7% din volum, fructoză prezentă în cantitate de 2,86% din volum, și xilitol prezent într-o cantitate de 1,4% din volum.

IV. Utilizări

Restabilirea cadrului de citire a distrofinei folosind omiterea exonului

O abordare potențial terapeutică a tratamentului DMD cauzat de mutații în afara cadrului genei distrofinei este sugerată de forma mai ușoară de distrofinopatie cunoscută cu denumirea de BMD, care este cauzată de mutații în cadru. Capacitatea de a transforma o mutație din afara cadrului într-o mutație în cadru ar păstra, ipotetic, cadrul de citire a ARNm-ului și ar produce o proteină distrofină scurtată intern, dar funcțională. Conjugatii de oligomeri antisens din dezvoltare au fost concepuți pentru a realiza acest lucru.

Hibridizarea PMO cu secvența pre-ARNm țintită interferează cu formarea complexului de îmbinare pre-ARNm și șterge exonul 45 din ARNm matur. Structura și conformația conjugatilor de oligomeri antisens din dezvoltare permit împerecherea bazelor specifice secvenței cu secvența complementară. Prin mecanism similar, eteplirsenu, de exemplu, care este un PMO care a fost conceput pentru a omite exonul 51 al pre-ARNm de distrofină, permite împerecherea bazelor specifice secvenței cu secvența complementară conținută în exonul 51 al pre-ARNm de distrofină.

ARNm de distrofină normală care conține toți cei 79 de exoni va produce proteina normală de distrofină. Graficul din Fig. 1 ilustrează o mică secțiune a pre-ARNm de distrofină și ARNm matur, de la exonul 47 până la exonul 53. Forma fiecărui exon ilustrează modul în care codonii sunt împărțiți între exoni; este de remarcat că un codon este format din trei nucleotide. Exonii de formă dreptunghiulară încep și se termină cu codoni compleți. Exonii în formă de săgeată încep cu un codon complet, dar se termină cu un codon divizat, care conține doar nucleotida #1 a codonului. Nucleotidele #2 și #3 ale acestui codon sunt conținute în exonul următor, care va începe cu o formă de zig-zag.

ARNm de distrofină cu lipsă de exoni întregi din gena distrofinei conduce, în mod obișnuit, la DMD. Graficul din Fig. 2 ilustrează un tip de mutație genetică (ștergerea exonului 50) despre care se știe că are ca rezultat DMD. Deoarece exonul 49 se termină într-un codon complet și exonul 45 începe cu a doua nucleotidă a unui codon, cadrul de citire după exonul 49 este deplasat, rezultând un cadru de citire ARNm în afara cadrului și încorporarea de aminoacizi incorecți în aval de mutație. Absența ulterioară a unui domeniu funcțional de legare a distroglicanului C-terminal are ca rezultat producerea unei proteine distrofină instabilă.

Eteplirsens omite exonul 51 pentru a restabili cadrul de citire a ARNm. Deoarece exonul 49 se termină într-un codon complet, iar exonul 52 începe cu prima nucleotidă a unui codon, ștergerea exonului 45 restabilește cadrul de citire, ducând la producerea unei proteine distrofină scurtată intern cu un situs de legare a distroglicanului intact, similar cu o mutația BMD "în cadru" (Fig. 3).

Fezabilitatea ameliorării fenotipului DMD utilizând omiterea exonului pentru a restabili cadrul deschis de citire a ARNm al distrofinei este susținută de cercetările nonclinice. Numeroase studii pe modele animale distrofice cu DMD au arătat că restabilirea distrofinei prin omiterea exonului conduce la îmbunătățiri fiabile ale forței și funcției musculare (Sharp 2011; Yokota 2009; Wu 2008; Wu 2011; Barton-Davis 1999; Goyenvalle 2004; Gregore 2004; Yue 2006; Welch 2007; Kawano 2008; Reay 2008; van Putten 2012). Un exemplu convingător în acest sens vine dintr-un studiu în care nivelurile de distrofină în urma terapiei cu omiterea exonilor (folosind o PMO) au fost comparate cu funcția musculară din același țesut. La șoarecii mdx distrofici, mușchii tibial anterior (TA) tratați cu un PMO specific pentru șoarece și-au menținut ~ 75% din capacitatea lor maximă de forță după contracțiile care induc stres, în timp ce mușchii TA contralaterali netratați au menținut doar ~ 25% din capacitatea lor maximă de forță ($p < 0,05$) (Sharp 2011). Într-un alt studiu, 3 câini CXMD distrofici au primit, la vârsta de 2-5 luni, terapie de excludere a exonului folosind un PMO specific pentru mutația lor genetică, o dată pe săptămână timp de 5 până la 7 săptămâni sau la două săptămâni timp de 22 de săptămâni. În urma terapiei cu omiterea exonilor, toți cei 3 câini au demonstrat o expresie extinsă, la nivelul întregului corp, a distrofinei în mușchii scheletici, precum și o ambulație menținută sau îmbunătățită (test de alergare de 15 m), față de valoarea inițială. Spre deosebire de aceasta, câini CXMD netratați potriviți ca vârstă au prezentat o scădere marcată a deplasării pe parcursul studiului (Yokota 2009).

A fost arătat că PMO-urile au mai multă activitate de omitere a exonului la concentrații echimolare decât fosforotioații, atât la șoarecii mdx, cât și la modelul de șoarece DMD umanizat (hDMD), care exprimă întreaga transcriere a DMD umană (Heemskirk 2009). Experimente *in vitro* care utilizează reacția în lanț a polimerazei cu transcripție inversă (RT-PCR) și Western blot (WB) în celule musculare scheletice umane normale sau celule musculare de la pacienți cu DMD cu diferite mutații susceptibile de omitere a exonului 51, au identificat că eteplirsens (un PMO) este un inductor puternic al omiterii exonului 51. Omiterea exonului 51 indusă de eteplirsens a fost confirmată *in vivo* în modelul de șoarece hDMD (Arechavala-Gomez 2007).

Rezultatele clinice pentru analiza efectului unui conjugat de oligomer antisens care este complementar unei regiuni țintă a exonului 45 a pre-ARNm de distrofină umană și induce omiterea exonului 45, includ procente de fibre pozitive pentru distrofină (PDPF), test de mers pe jos șase minute (6MWT), pierderea ambulației (LOA), Evaluarea Ambulatorie North Star (NSAA), teste ale funcției pulmonare (PFT), capacitatea de a se ridica (din decubit dorsal) fără sprijin din exterior, producția de distrofină *de novo*, și alte măsuri funcționale.

În unele variante de realizare, prezenta dezvoltare furnizează conjugăți de oligomeri antisens ca mai sus, și compoziții ale acestora pentru utilizare în producerea distrofinei la un subiect care are o mutație a genei distrofinei care este susceptibilă de omitere a exonului 45. În anumite variante de realizare, prezenta dezvoltare furnizează conjugăți de oligomeri antisens ca mai sus, și compoziții ale acestora pentru utilizare în restabilirea unui cadru de citire a ARNm pentru a induce producția de proteine distrofină la un subiect cu distrofie musculară Duchenne (DMD) care are o mutație a genei distrofinei care este susceptibilă de omitere a exonului 45. Producția de proteine poate fi măsurată prin reacția în lanț a polimerazei cu transcripție inversă (RT-PCR), analiză Western blot sau imunohistochimie (IHC).

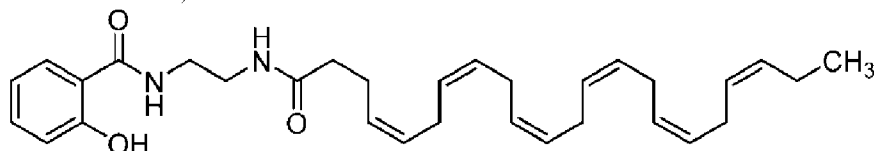
În unele variante de realizare, prezenta dezvoltare furnizează conjugăți de oligomeri antisens ca mai sus, și compoziții ale acestora pentru utilizare în tratarea DMD la un subiect care are nevoie de aceasta, în care subiectul are o mutație a genei distrofinei care este susceptibilă de omitere a exonului 45. În diverse variante de realizare, tratamentul subiectului este măsurat prin întârzierea progresiei bolii. În

unele variante de realizare, tratamentul subiectului este măsurat prin menținerea deambulației la subiect sau prin reducerea pierderii deambulației la subiect. În unele variante de realizare, deambulația este măsurată utilizând testul de mers pe jos 6 minute (6MWT). În anumite variante de realizare, deambulația este măsurată utilizând Evaluarea Ambulatorie North Start (NSAA).

În diverse variante de realizare, prezenta dezvoltare furnizează conjugați de oligomeri antisens ca mai sus, și compoziții ale acestora pentru utilizare în menținerea funcției pulmonare sau reducerea pierderii funcției pulmonare la un subiect cu DMD, în care subiectul are o mutație a genei DMD care este susceptibilă de omitere a exonului 45. În unele variante de realizare, funcția pulmonară este măsurată ca presiune maximă expiratorie (MEP). În anumite variante de realizare, funcția pulmonară este măsurată ca presiune maximă inspiratorie (MIP). În unele variante de realizare, funcția pulmonară este măsurată ca Capacitate Vitală Forțată (FVC).

Într-o altă variantă de realizare, compozițiile farmaceutice din dezvoltare pot fi administrate concomitent cu un carbohidrat în metodele din dezvoltare, fie în aceeași formulare, fie este o formulare separată, așa cum este prevăzut în Han și colab., Nat. Comms. 7, 10981 (2016). În unele variante de realizare, compozițiile farmaceutice din dezvoltare pot fi administrate concomitent cu 5% de un carbohidrat de hexoză. De exemplu, compozițiile farmaceutice din dezvoltare pot fi administrate concomitent cu 5% glucoză, 5% fructoză sau 5% manoză. În anumite variante de realizare, compozițiile farmaceutice din dezvoltare pot fi administrate concomitent cu 2,5% glucoză și 2,5% fructoză. În unele variante de realizare, compoziția farmaceutică din dezvoltare poate fi administrată concomitent cu un carbohidrat selectat dintre: arabinoză prezentă într-o cantitate de 5% din volum, glucoză prezentă într-o cantitate de 5% din volum, sorbitol prezent într-o cantitate de 5% din volum, galactoză prezentă în cantitate de 5% din volum, fructoză prezentă în cantitate de 5% din volum, xilitol prezent în cantitate de 5% din volum, manoză prezentă în cantitate de 5% din volum, o combinație de glucoză și fructoză prezente fiecare într-o cantitate de 2,5% din volum, și o combinație de glucoză prezentă în cantitate de 5,7% din volum, fructoză prezentă într-o cantitate de 2,86% din volum și xilitol prezent într-o cantitate de 1,4% din volum.

În diverse variante de realizare, un conjugat de oligomer antisens din dezvoltare este administrat concomitent cu o cantitate eficientă terapeutic de un compus antiinflamator nesteroidian. În unele variante de realizare, compusul antiinflamator nesteroidian este un inhibitor de NF-κB. De exemplu, în unele variante de realizare, inhibitorul de NF-κB poate fi CAT-1004 sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia. În diverse variante de realizare, inhibitorul de NF-κB poate fi un conjugat de salicilat și DHA. În unele variante de realizare, inhibitorul de NF-κB este CAT-1041 sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia. În anumite variante de realizare, inhibitorul de NF-κB este un conjugat de salicilat și EPA. În diverse variante de realizare, inhibitorul de NF-κB este



sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia.

În unele variante de realizare, compusul antiinflamator nesteroidian este un inhibitor de TGF-β. De exemplu, în anumite variante de realizare, inhibitorul de TGF-β este HT-100.

În anumite variante de realizare, este descris un conjugat de oligomer antisens așa cum este descris aici, pentru utilizare în terapie.

V. Kituri

Dezvoltarea furnizează, de asemenea, kituri pentru tratamentul unui pacient cu o boală genetică, kit care cuprinde cel puțin un conjugat de oligomer antisens ca mai sus, ambalat într-un recipient adecvat împreună cu instrucțiuni de utilizare. Kiturile pot să conțină, de asemenea, reactivi externi, cum ar fi tamponi, stabilizatori, etc. Persoanele cu calificare obișnuită în domeniu ar trebui să înțeleagă că aplicările metodei de mai sus au o largă aplicație pentru identificarea moleculelor antisens adecvate pentru utilizare în tratamentul multor alte boli. Kitul cuprinde un conjugat de oligomer antisens conform cu Formula (IV) sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia.

Exemple

Materiale și metode

Condiții de tratament pentru culturi de celule și țesuturi

Miocitele umane diferențiate (ZenBio, Inc.) au fost utilizate pentru a măsura omiterea exonilor. Mai exact, mioblaste (ZenBio, Inc., SKB-F) au fost crescute la confluință de 80-90%, la 37 °C și 5% CO₂ în medii de creștere (SKB-M; ZenBio, Inc.). Diferențierea a fost inițiată prin înlocuirea mediului de

creștere cu medii de diferențiere (SKM-D; ZenBio, Inc.). Pentru a analiza omiterea exonului 51, 1×10^4 celule diferențiate au fost placcate pe o placă cu 24 de godeuri și 1 mL de mediu de diferențiere (SKM-D; ZenBio, Inc.) care conține diferite concentrații de PMO, sau a fost adăugat PPMO la fiecare godeu, și au fost incubate timp de 96 de ore.

5

Analiza Western Blot

Pentru analiza Western blot, țesutul a fost omogenizat cu tampon de omogenizare (4% SDS, 4M uree, 125 mM tris-HCl (pH 6,8)) într-un raport de 9 la 18 x 20 μ m de secțiuni de țesut la aproximativ 5 mm în diametru, în 133 μ L de tampon. Lizatul corespunzător a fost colectat și supus cuantificării proteinei utilizând kitul de testare a proteinelor RC DC conform instrucțiunilor producătorului (BioRad Cat. 500-0122). Probele de extract de țesut au fost diluate 1:10 folosind tampon de omogenizare pentru a se încadra în intervalul curbei standard BSA. Probele au fost preparate astfel încât 35 μ L de probă să conțină cantitatea dorită de proteină, folosind 25 μ L de lizat de proteine, 7 μ L tampon de probă NuPAGE LDS (Life Technologies Cat. NP0008, Carlsbad, California, SUA) și 3 μ L de agent de reducere NuPAGE (10x) (Life Technologies Cat. NP0004). După încălzirea probelor de proteine timp de 5 minute la 95 °C, probele au fost centrifugate, și supernatantul a fost încărcat pe un gel de tris-acetat de poliacrilamidă mini 3-8% NuPAGE Novex cu 10 godeuri de 1 mm (Life Technologies Cat. EA0375) la maximum de 50 μ g încărcătură proteică totală pe bandă. Gelul a fost prelucrat la 150 volți la temperatura camerei până când partea frontală a colorantului s-a îndepărtat de gel. Gelurile proteice rezultate au fost transferate pe membrane PVDF (Life Technologies Cat. LC2007) timp de 75 de minute la temperatura camerei cu 30 volți folosind tampon de transfer NuPAGE (Life Technologies NP006-1), 10% metanol și 0,1% antioxidant NuPAGE (Life Technologies NP0005).

După transferul proteinei, membranele PVDF au fost scufundate în tampon TTBS (IX TBS (Amresco Cat. J640-4L), 0,1% (v/v) tween-20). Membranele au fost transferate în tampon de blocare (5% (g/v) lapte praf fără grăsimi (Lab Scientific Cat. M0841) în TTBS) și au fost înmuiate peste noapte la 4 °C cu balansare ușoară. După blocare, membranele au fost incubate, fie timp de 60 de minute la temperatura camerei în DYS1 (Leica Cat. NCL-DYS1) diluat 1:20 folosind tampon de blocare, fie timp de 20 de minute la temperatura camerei în anticorp anti- α -actinină (Sigma-Aldrich Cat. NA931V) diluat 1:100000 cu tampon de blocare, urmată de șase spălări (cinci minute fiecare cu TTBS). IgG anti-șoarece conjugată cu peroxidază de hrean (GE Healthcare Cat. NA931V) a fost diluată 1:40000 folosind tampon de blocare și a fost adăugată la membrane timp de 45 de minute (DYS1) sau timp de 15 minute (α -actinină), urmată din nou de șase spălări. Folosind kitul ECL Prime Western Detection (GE Healthcare Cat. RPN2232), filmul a fost expus la gel și a fost dezvoltat în consecință. Filmul dezvoltat a fost scanat și analizat folosind software-ul ImageQuant TL Plus (versiunea 8.1) și analiza de regresie liniară a fost efectuată folosind software-ul Graphpad.

Fiecare gel Western blot include o curbă standard de distrofină cu 4 puncte, preparată folosind proteina totală extrasă din țesut normal (de exemplu, cvadriiceps, diafragmă sau inimă de șoarece, sau extract de cvadriiceps, diafragmă sau mușchi neted (GI) NHP) diluată la 64%, 16%, 4%, 1% și 0,25% și au fost prevăzute în țesutul DMD (de ex., cvadriiceps, diafragmă sau inimă de șoarece MDX). Probele cu curbă standard au fost prelucrate așa cum este descris mai sus. Nivelurile de proteină distrofină ca procente din nivelurile de distrofină de tip sălbatic (%WT) au fost determinate prin compararea intensităților benzii de distrofină cu curba standard de gel.

Analiza RT-PCR

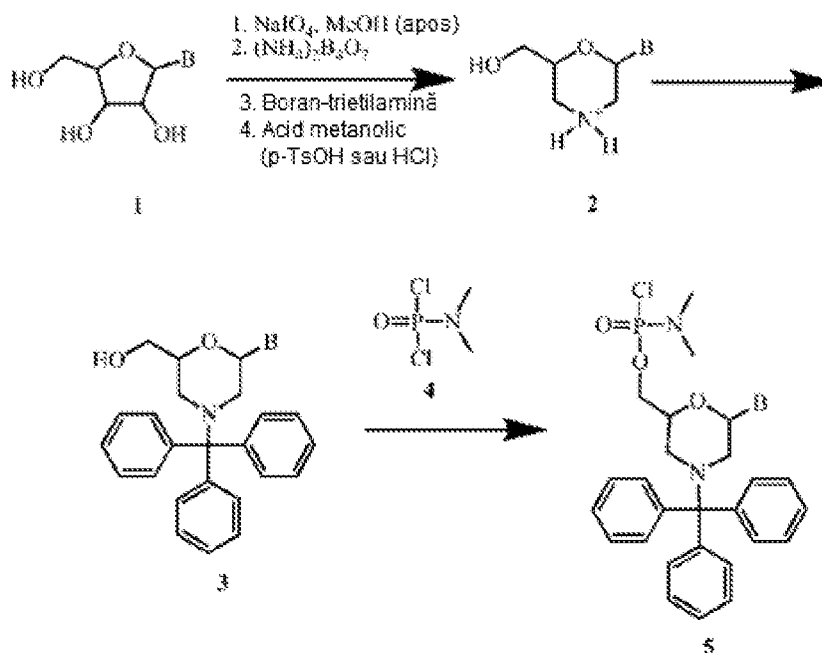
Pentru analiza RT-PCR, ARN-ul a fost izolat din celule folosind kitul de spin Illustra GE urmând protocolul producătorului. Concentrația și puritatea ARN-ului au fost determinate folosind un NanoDrop.

După ce ARN-ul a fost supus la RT-PCR, probele au fost analizate folosind o mașină Caliper, care utilizează electroforeză capilară pe gel. Procentul de omitere a exonului a fost calculat folosind următoarea ecuație: (aria de sub curbă pentru benzile omise)/(suma ariei de sub curbă pentru benzile omise și pentru cele care nu au fost omise) x100.

Imunohistochimie: colorarea distrofinei:

Secțiuni de 10 microni de țesut congelat de cvadriiceps de șoarece au fost utilizate pentru a detecta distrofină cu anticorp primar de distrofină (diluție 1:250, iepure, Abcam, pisica #ab15277) în ser de capră 10% + BSA 1% în PBS și anticorp secundar Alexa-Fluoro 488 de capră anti-iepure (diluție de 1:1000) în ser de capră 10% + BSA 1%.

Prepararea subunităților Morfolino



Schema 1: Calea de sinteză generală pentru subunități PMO

Referitor la Schema 1, în care B reprezintă un fragment de împerechere a bazelor, subunitățile morfolino pot fi preparate din ribinucleozida (1) corespunzătoare, așa cum este arătat. Subunitatea morfolino (2) poate fi opțional protejată prin reacția cu un precursor de grupare protectoare adecvată, de exemplu, clorură de tritil. Gruparea protectoare 3' este în general îndepărtată în timpul sintezei oligomerului în stare solidă, așa cum este descris mai detaliat mai jos. Fragmentul de împerechere a bazelor poate fi protejat în mod adecvat pentru sinteza oligomerului în fază solidă. Grupările protectoare adecvate includ benzoil pentru adenină și citozină, fenilacetil pentru guanină, și pivaloiloximetil pentru hipoxantină (I). Gruparea pivaloiloximetil poate fi introdusă în poziția N1 a bazei heterociclice hipoxantină. Deși poate fi utilizată o subunitate de hipoxantină neprotejată, randamentele în reacțiile de activare sunt cu mult superioare atunci când baza este protejată. Alte grupări protectoare adecvate le includ pe cele descrise în brevetul U.S. nr. 8,076,476.

Reacția lui 3 cu compusul de fosfor activat 4 are ca rezultat subunități morfolino care au fragmentul 5 de legătură dorit.

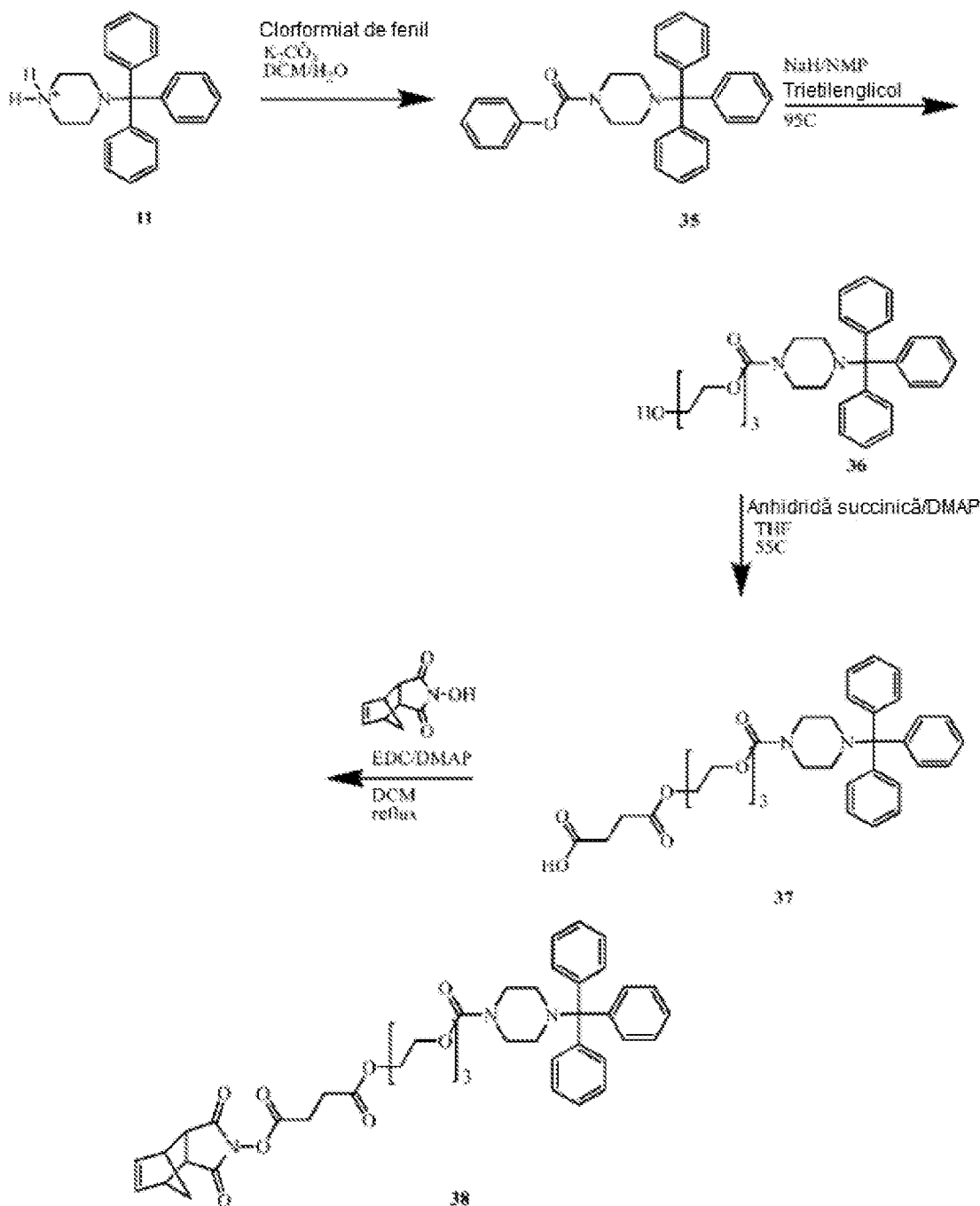
Compușii cu structura 4 pot fi preparați utilizând orice număr de metode cunoscute specialiștilor în domeniu. Cuplarea cu fragmentul morfolino este realizată apoi așa cum a fost evidențiat mai sus.

Compușii cu structura 5 pot fi utilizați în sinteza oligomerilor în fază solidă pentru prepararea oligomerilor care cuprind legăturile între subunități. Astfel de metode sunt bine cunoscute în domeniu. Pe scurt, un compus cu structura 5 poate fi modificat la capătul 5' pentru a conține un linker la un suport solid. Odată susținută, gruparea protectoare a lui 5 (de ex., tritil la capătul 3') este îndepărtată, și amina liberă reacționează cu un fragment de fosfor activat al unui al doilea compus cu structura 5. Această secvență se repetă până când este obținută lungimea dorită pentru oligo. Gruparea protectoare din capătul terminal 3' poate fi, fie îndepărtată, fie lăsată activă dacă se dorește o modificare 3'. Oligo poate fi îndepărtat de pe suportul solid folosind orice număr de metode, sau exemplu de tratament cu o bază pentru a scinda legătura la suportul solid.

Prepararea oligomerilor morfolino, în general, și a oligomerilor morfolino specifici din dezvoltare sunt descrise mai detaliat în Exemple.

Prepararea oligomerilor Morfolino

Prepararea compușilor din dezvoltare este realizată utilizând următorul protocol, în conformitate cu Schema 2:



Schema 2: Prepararea acidului Tail activat

Prepararea de tritol piperazină fenil carbamat **35**: La o suspensie răcită de compus **11** în diclorometan (6 ml/g **11**) a fost adăugată o soluție de carbonat de potasiu (3,2 echiv.) în apă (4 mL/g de carbonat de potasiu). La acest amestec în două faze a fost adăugată încet o soluție de cloroformiat de fenil (1,03 echiv.) în diclorometan (2 g/g cloroformiat de fenil). Amestecul de reacție a fost încălzit la 20°C . După terminarea reacției (1-2 ore), straturile au fost separate. Stratul organic a fost spălat cu apă și a fost uscat pe carbonat de potasiu anhidru. Produsul **35** a fost izolat prin cristalizare din acetonitril.

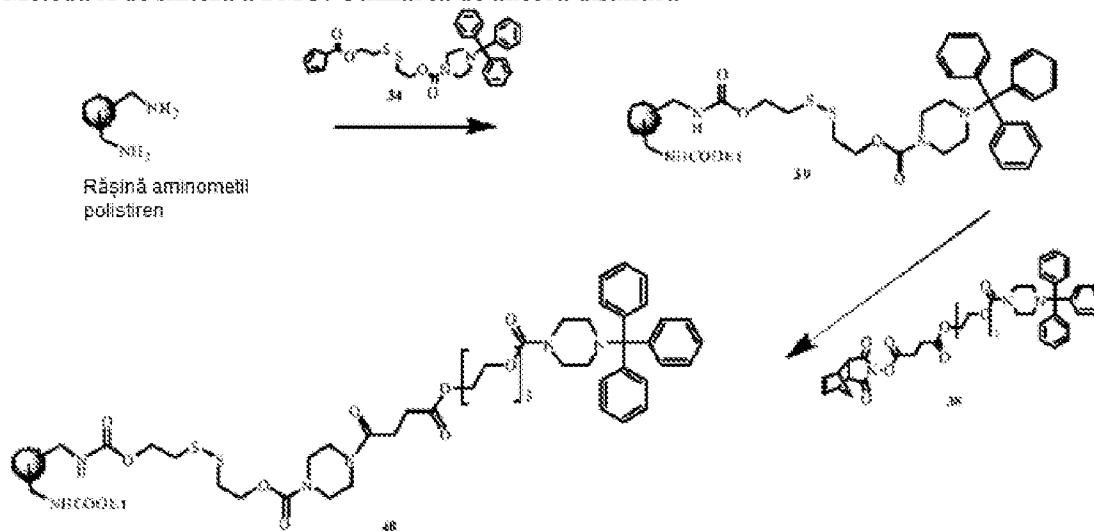
Prepararea alcoolului carbamat **36**: Hidruță de sodiu (1,2 echiv.) a fost suspendată în 1-metil-2-pirolidinonă (32 mL/g de hidruță de sodiu). La această suspensie au fost adăugate trieten glicol (10,0 echiv.) și compus **35** (1,0 echiv.). Suspensia rezultată a fost încălzită la 95°C . La terminarea reacției (1-2 ore), amestecul a fost răcit la 20°C . La acest amestec au fost adăugate 30% diclorometan/metil terț-butil eter (v:v) și apă. Stratul organic care conține produsul a fost spălat succesiv cu NaOH apos, acid succinic apos și clorură de sodiu apoasă saturată. Produsul **36** a fost izolat prin cristalizare din diclorometan/metil terț-butil eter/heptan.

Prepararea acidului Tail **37**: La o soluție de compus **36** în tetrahidrofuran (7 ml/g **36**) au fost adăugate anhidridă succinică (2,0 echiv.) și DMAP (0,5 echiv.). Amestecul a fost încălzit la 50°C. După terminarea reacției (5 ore), amestecul a fost răcit la 20°C și a fost ajustat la pH 8,5 cu NaHCO₃ apos. A fost adăugat metil terț-butil eter, și produsul a fost extras în stratul apos. A fost adăugat diclormetan, și amestecul a fost ajustat la pH 3 cu acid citric apos. Stratul organic care conține produsul a fost spălat cu un amestec de tampon citrat pH=3 și soluție apoasă saturată de clorură de sodiu. Această soluție de diclormetan de **37** a fost utilizat fără izolare la prepararea compusului **38**.

Prepararea lui **38**: La soluția de compus **37** au fost adăugate imida acidului N-hidroxi-5-norbornen-2,3-dicarboxilic (HONB) (1,02 echiv.), 4-dimetilaminopiridină (DMAP) (0,34 echiv.) și apoi clorhidrat de 1-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimidă (EDC) (1,1 echiv.). Amestecul a fost încălzit la 55°C. După terminarea reacției (4-5 ore), amestecul a fost răcit la 20°C și a fost spălat succesiv cu acid citric/saramură 1:1 0,2 M și saramură. Soluția de diclormetan a suferit un schimb de solvent cu acetonă și apoi cu N,N-dimetilformamidă și produsul a fost izolat prin precipitare din acetonă/N,N-dimetilformamidă în clorură de sodiu apoasă saturată. Produsul brut a fost resuspendat de câteva ori în apă pentru a îndepărta N,N-dimetilformamida reziduală și sărurile.

Introducerea "Tail" activat pe rășina încărcată cu ancoră a fost efectuată în dimetilimidazolidinonă (DMI) prin procedura utilizată pentru încorporarea subunităților în timpul sintezei în fază solidă.

Metoda A de sinteză a PMO: Utilizarea de ancoră disulfură



Schema 3: Prepararea suportului solid pentru sinteza oligomerilor morfolino

Această procedură a fost efectuată într-un vas silanizat, cu manta, pentru peptide, (ChemGlass, NJ, SUA) cu o frită din sticlă cu porozitate grosieră (40-60 μm), agitator superior, și robinet de închidere din teflon cu 3 căi pentru a permite N₂ să barboteze prin frită sau o extracție în vid.

Etapele de tratare/spălare a rășinii din următoarea procedură constau în două operații de bază: fluidizarea rășinii sau a patului agitator din reactor și extracția cu solvent/soluție. Pentru fluidizarea rășinii, robinetul de închidere a fost poziționat pentru a permite curgerea N₂ prin frită și rășina specificată pentru tratament/spălare a fost adăugată în reactor și rășina a fost lăsată să se impregneze și să se umezească complet. Amestecarea a fost apoi începută, și suspensia de rășină a fost amestecată pe parcursul timpului specificat. Pentru extracția cu solvent/soluție, amestecarea și fluxul de N₂ au fost oprite și pompa de vid a fost pornită și apoi robinetul de închidere a fost poziționat pentru a permite evacuarea tratamentului/spălăturii rășinii către deșeuri. Toate volumele de tratament/spălare a rășinii au fost de 15 mL/g de rășină, dacă nu este menționat altfel.

La rășina aminometil polistiren (100-200 ochiuri; ~1,0 mmoli/g de încărcătură pe baza substituției de azot; 75 g, 1 echiv., Polymer Labs, Marea Britanie, partea #1464-X799), într-un vas silanizat, cu manta, pentru peptide, a fost adăugată 1-metil-2-pirolidinonă (NMP; 20 ml/g de rășină), și rășina a fost lăsată să se umfle cu amestecare timp de 1-2 ore. După evacuarea solventului de umflare, rășina a fost spălată cu diclormetan (2 x 1-2 min), 5% diizopropiletilamină în 25% izopropanol/diclormetan (2 x 3-4 min) și diclormetan (2 x 1-2 min). După evacuarea spălăturii finale, rășina a fost tratată cu o soluție de disulfură ancoră **34** în 1-metil-2-pirolidinonă (0,17 M; 15 ml/g de rășină, ~2,5 echiv.), și amestecul de rășină/reactiv a fost încălzit la 45 °C timp de 60 de ore. La terminarea reacției, încălzirea a fost întreruptă, și soluția de ancoră a fost evacuată și rășina a fost spălată cu 1-metil-

2-pirolidinonă (4 x 3-4 min) și diclormetan (6 x 1-2 min). Rășina a fost tratată cu o soluție de 10% (v/v) dicarbonat de dietil în diclormetan (16 mL/g; 2 x 5-6 min) și apoi a fost spălată cu diclormetan (6 x 1-2 min). Rășina 39 a fost uscată în flux de N₂ timp de 1-3 ore și apoi în vid până la greutate constantă ($\pm$ 2%). Răndament: 110-150% din greutatea rășinii inițiale.

Determinarea încărcării rășinii aminometil polistiren-disulfură: încărcarea rășinii (numărul de situsuri reactive potențial disponibile) este determinată printr-un test spectrometric pentru numărul de grupări trifenilmetil (tritol) la fiecare gram de rășină.

O greutate cunoscută de rășină uscată (25 ± 3 mg) este transferată într-un balon volumetric silanizat de 25 mL și se adaugă ~5 mL de acid trifluoracetic 2% (v/v) în diclormetan. Conținutul este amestecat prin agitare ușoară și apoi este lăsat să stea timp de 30 de minute. Volumul este adus la 25 mL cu acid trifluoracetic 2% (v/v) suplimentar în diclormetan și conținutul este amestecat bine. Folosind o pipetă cu deplasare pozitivă, o alicotă din soluția care conține tritol (500 μ L) este transferată într-un balon volumetric de 10 mL, și volumul este adus la 10 mL cu acid metansulfonic.

Conținutul de cationi tritol din soluția finală este măsurat prin absorbanta UV la 431,7 nm, și încărcarea cu rășină este calculată în grupări tritol la fiecare gram de rășină (μ mol/g) utilizând volumele, diluțiile, coeficientul de extincție adecvate (ϵ : 41 μ mol $\cdot$ cm⁻¹) și greutatea rășinii. Analiza este efectuată în trei exemplare și se calculează o încărcare medie.

Procedura de încărcare a rășinii din acest exemplu va furniza rășină cu o încărcare de aproximativ 500 μ mol/g. A fost obținută o încărcare de 300-400 în μ mol/g dacă etapa de incorporare a ancorei disulfură este efectuată timp de 24 de ore la temperatura camerei.

Încărcarea cu Tail: Folosind aceeași configurație și volume ca pentru prepararea rășinii aminometil polistiren-disulfură, Tail poate fi introdus în suport solid. Rășina încărcată cu ancora a fost mai întâi deprotejată în condiții acide, și materialul rezultat a fost neutralizat înainte de cuplare. Pentru etapa de cuplare, o soluție de 38 (0,2 M) în DMI care conține 4-etilmorfolină (NEM, 0,4 M) a fost utilizată în locul soluției de ancoră disulfură. După 2 ore la 45 °C, rășina 39 a fost spălată de două ori cu 5% diizopropiletilamină în 25% izopropanol/diclormetan, și o dată cu DCM. La rășină au fost adăugate o soluție de anhidridă benzoică (0,4 M) și NEM (0,4 M). După 25 de minute, mantaua reactorului a fost răcită la temperatura camerei, și rășina a fost spălată de două ori cu 5% diizopropiletilamină în 25% izopropanol/diclormetan, și de opt ori cu DCM. Rășina 40 a fost filtrată și a fost uscată în vid înalt. Încărcarea pentru rășină 40 este definită a fi încărcarea rășinii inițiale aminometil polistiren-disulfură 39 folosit la încărcarea cu Tail.

Sinteza în fază solidă: Oligomerii morfolino au fost preparați pe un sintetizator automat de peptide Gilson AMS-422 în coloane de reacție de polipropilenă Gilson de 2 mL (Parte # 3980270). Un bloc de aluminiu cu canale pentru curgerea apei a fost plasat în jurul coloanelor în timp ce acestea au fost așezate pe sintetizator. AMS-422 va adăuga în mod alternativ soluții de reactiv/spălare, vor fi menținute pentru un timp specificat și coloanele vor fi evacuate folosind vid.

Pentru oligomerii cu lungime în intervalul de până la aproximativ 25 de subunități este preferată rășina aminometil polistiren-disulfură cu încărcare de aproape 500 μ mol/g de rășină. Pentru oligomerii mai mari, este preferată rășina aminometil polistiren-disulfură cu încărcare de 300-400 μ mol/g de rășină. Dacă se dorește o moleculă cu Tail 5', rășina care a fost încărcată cu Tail este aleasă cu aceleași ghiduri de încărcare.

Au fost preparate următoarele soluții de reactivi:

Soluție de detritilare: 10% acid cianoacetic (g/v) în diclormetan/acetonitril 4:1;

Soluție de neutralizare: 5% diizopropiletilamină în diclormetan/izopropanol 3:1; și

Soluție de cuplare: 0,18 M (sau 0,24 M pentru oligomerii care au crescut mai lungi decât 20 de subunități) subunitate Morfolino activată de tipul de bază și de legătură dorit, și etilmorfolină 0,4 M N, în 1,3-dimetilimidazolidinonă.

Diclormetan (DCM) a fost utilizat ca o spălare de tranziție care separă diferitele soluții de spălături de reactiv.

Pe sintetizator, cu blocul reglat la 42 °C, la fiecare coloană care conține 30 mg de rășină aminometil polistiren-disulfură (sau rășină cu Tail) au fost adăugați 2 mL de 1-metil-2-pirolidinonă și au fost lăsate să stea la temperatura camerei timp de 30 min. După spălarea de 2 ori cu 2 mL de diclormetan, a fost folosit următorul ciclu de sinteză:

Etapă	Volum	Furnizare	Timp de menținere
Detritilare	1,5 mL	Manifold	15 secunde
Detritilare	1,5 mL	Manifold	15 secunde
Detritilare	1,5 mL	Manifold	15 secunde
Detritilare	1,5 mL	Manifold	15 secunde

Etapă	Volum	Furnizare	Timp de menținere
Detritilare	1,5 mL	Manifold	15 secunde
Detritilare	1,5 mL	Manifold	15 secunde
Detritilare	1,5 mL	Manifold	15 secunde
DCM	1,5 mL	Manifold	30 secunde
Neutralizare	1,5 mL	Manifold	30 secunde
Neutralizare	1,5 mL	Manifold	30 secunde
Neutralizare	1,5 mL	Manifold	30 secunde
Neutralizare	1,5 mL	Manifold	30 secunde
Neutralizare	1,5 mL	Manifold	30 secunde
Neutralizare	1,5 mL	Manifold	30 secunde
DCM	1,5 mL	Manifold	30 secunde
Cuplare	350-500µL	Seringă	40 minute
DCM	1,5 mL	Manifold	30 secunde
Neutralizare	1,5 mL	Manifold	30 secunde
Neutralizare	1,5 mL	Manifold	30 secunde
DCM	1,5 mL	Manifold	30 secunde
DCM	1,5 mL	Manifold	30 secunde
DCM	1,5 mL	Manifold	30 secunde

Secvențele oligomerilor individuali au fost programate în sintetizator, astfel încât fiecare coloană să primească soluția de cuplare adecvată (A,C,G,T,I) în secvența corespunzătoare. Atunci când oligomerul dintr-o coloană a finalizat incorporarea subunității sale finale, coloana a fost îndepărtată din bloc și a fost efectuat un ciclu final manual cu o soluție de cuplare compusă din clorură de 4-metoxitriphenilmetil (0,32 M în DMI) care conține 0,89 M 4-etilmorfolină.

Scindarea din rășină și îndepărtarea grupărilor de protecție a bazelor și a structurii principale: După metoxitritilare, rășina a fost spălată de 8 ori cu 2 mL de 1-metil-2-pirolidinonă. A fost adăugat un mL de o soluție de scindare constând din 0,1 M 1,4-ditiotreitol (DTT) și 0,73 M trietilamină în 1-metil-2-pirolidinonă, coloana a fost acoperită și a fost lăsată să stea la temperatura camerei timp de 30 de minute. După acest timp, soluția a fost drenată într-un flacon Wheaton de 12 mL. Rășina foarte restrânsă a fost spălată de două ori cu 300 µL de soluție de scindare. La soluție au fost adăugați 4,0 mL de amoniac apos concentrat (depozitat la -20 °C), flaconul a fost închis etanș (cu capac filetat captușit cu teflon) și amestecul a fost agitat pentru a amesteca soluția. Flaconul a fost plasat într-un cuptor la 45 °C timp de 16-24 ore pentru a efectua scindarea grupărilor de protecție a bazei și a structurii principale.

Purificarea produsului brut: Soluția de amonoliză ambalată în flacon a fost îndepărtată din cuptor și a fost lăsată să se răcească la temperatura camerei. Soluția a fost diluată cu 20 mL de amoniac apos 0,28% și a fost trecută printr-o coloană de 2,5 x 10 cm care conține rășină Macroprep HQ (BioRad). Un gradient de sare (A: 0,28% amoniac cu B: 1 M clorură de sodiu în 0,28% amoniac; 0-100% B în 60 de minute) a fost utilizat pentru a elua vârful care conține metoxitritil. Frațiunile combinate au fost reunite și prelucrate suplimentar în funcție de produsul dorit.

Demetoxitritilarea oligomerilor Morfolino: fracțiunile reunite din purificarea Macroprep au fost tratate cu 1 M H₃PO₄ pentru a reduce pH-ul la 2,5. După amestecarea inițială, probele au stat la temperatura camerei timp de 4 minute, moment în care sunt neutralizate la pH 10-11 cu 2,8% amoniac/apă. Produsele au fost purificate prin extracție în fază solidă (SPE).

Umplerea și condiționarea coloanei SPE: Amberchrome CG-300M (Rohm și Haas; Philadelphia, PA) (3 mL) este umplut în coloane frite de 20 mL (Coloane cromatografice BioRad Econo-Pac (732-1011)) și rășina a fost clătită cu 3 mL dintre următoarele: 0,5 M NaOH / 20% etanol; apă; 50 mM H₃PO₄ / 80% acetonitril; apă; 0,5 NaOH / 20% etanol; apă; 0,28% NH₄OH.

Purificarea SPE: Soluția din demetoxitritilare a fost încărcată pe coloană și rășina a fost clătită de trei ori cu 3-6 mL 0,28% amoniac apos. Un flacon Wheaton (12 mL) a fost plasat sub coloană, și produsul a fost eluat prin două spălări cu 2 mL de acetonitril 45% în amoniac apos 0,28%.

Izolarea produsului: Soluțiile au fost congelate în gheață carbonică și flacoanele au fost plasate într-un uscător prin congelare pentru a se obține o pulbere albă pufoasă. Probele au fost dizolvate în apă, au fost filtrate printr-un filtru de 0,22 micrometri (Pall Life Sciences, filtru de seringă Acrodisc 25 mm, cu o membrană HT Tuffryn de 0,2 micrometri) folosind o seringă, și densitatea optică (OD) a fost măsurată pe un

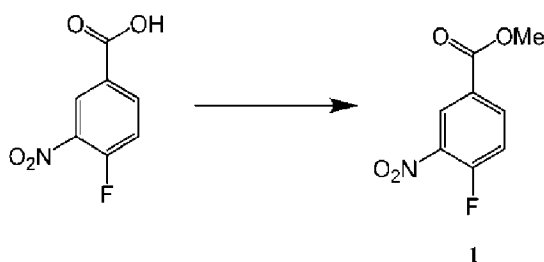
spectrofotometru UV pentru a determina unitățile OD de oligomer prezente, precum și proba distribuită pentru analiză. Soluțiile au fost apoi plasate înapoi în flacoane Wheaton pentru liofilizare.

Analiza oligomerilor Morfolino cu MALDI: spectrometria de masă MALDI-TOF a fost utilizată pentru a determina compoziția fracțiunilor la purificări, precum și pentru a furniza dovezi pentru identitatea (greutatea moleculară) a oligomerilor. Probele au fost analizate după diluare cu soluție de acid 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinamic (acid sinapinic), 3,4,5-trihidroxiacetofenonă (THAP) sau acid alfa-ciano-4-hidroxicinamic (HCCA), ca matrice.

Metoda B de sinteză a PMO: Utilizarea ancorei NCP2

Sinteza ancorei NCP2:

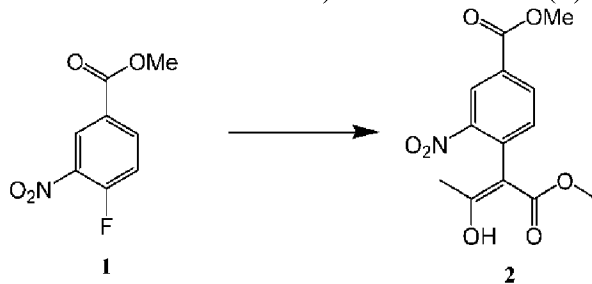
1. Prepararea 4-fluor-3-nitrobenzoatului de metil (1)



Într-un balon de 100 L au fost încărcate 12,7 kg de acid 4-fluor-3-nitrobenzoic, au fost adăugate 40 kg de metanol și 2,82 kg de acid sulfuric concentrat. Amestecul a fost agitat la reflux (65°C) timp de 36 de ore. Amestecul de reacție a fost răcit la 0°C. Cristalele s-au format la 38 °C. Amestecul a fost menținut la 0°C timp de 4 ore apoi a fost filtrat în atmosferă de azot. Balonul de 100 L a fost spălat, și turta de filtrare a fost spălată cu 10 kg de metanol care fusese răcit la 0 °C. Turta solidă de filtrare a fost uscată pe pânză timp de 1 oră, a fost transferată în tăvi și a fost uscată într-un cuptor cu vid la temperatura camerei până la o greutate constantă de 13,695 kg de 4-fluor-3-nitrobenzoat de metil (randament 100%; HPLC 99%).

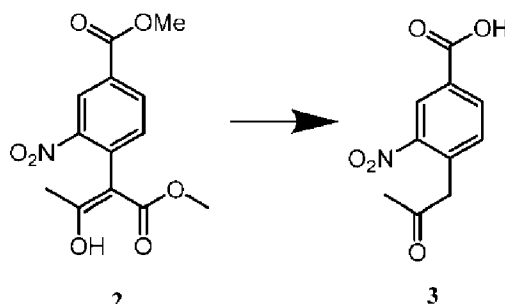
2. Prepararea acidului 3-nitro-4-(2-oxopropil)benzoic

A. 4-(3-hidroxi-1-metoxi-1-oxobut-2-en-2-il)-3-nitrobenzoat de (Z)-metil (2)



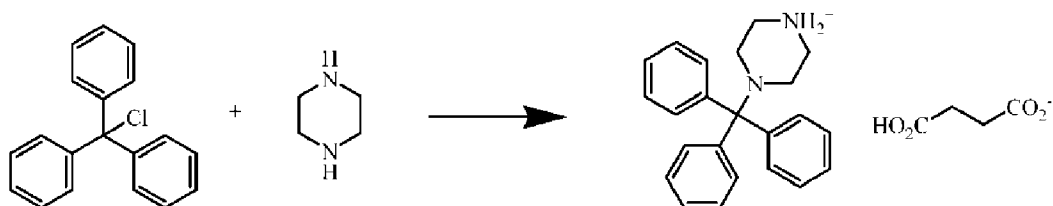
Într-un balon de 100 L au fost încărcate 3,98 kg de 4-fluor-3-nitrobenzoat de metil (1) din etapa anterioară, 9,8 kg DMF, 2,81 kg de acetoacetat de metil. Amestecul a fost agitat și răcit la 0°C. La acesta au fost adăugate 3,66 kg de DBU timp de aproximativ 4 ore în timp ce temperatura a fost menținută la sau sub 5 °C. Amestecul a fost agitat încă 1 oră. La balonul de reacție a fost adăugată o soluție de 8,15 kg de acid citric în 37,5 kg de apă purificată în timp ce temperatura de reacție a fost menținută la sau sub 15 °C. După adăugare, amestecul de reacție a fost agitat suplimentar 30 de minute, apoi a fost filtrat în atmosferă de azot. Turta de filtrare umedă a fost returnată în balonul de 100 L împreună cu 14,8 kg de apă purificată. Suspensia a fost agitată timp de 10 minute apoi a fost filtrată. Turta umedă a fost returnată din nou în balonul de 100 L, a fost suspendată cu 14,8 kg de apă purificată timp de 10 minute și a fost filtrată până la (Z)-metil 4-(3-hidroxi-1-metoxi-1-oxobut-2-en-2-il)-3-nitrobenzoat brut.

B. Acid 3-nitro-4-(2-oxopropil)benzoic



4-(3-hidroxi-1-metoxi-1-oxobut-2-en-2-il)-3-nitrobenzoatul de (Z)-metil brut a fost încărcat într-un balon de reacție de 100 L în atmosferă de azot. La acesta au fost adăugate 14,2 kg de 1,4-dioxan și au fost agitate. La amestec a fost adăugată o soluție de 16,655 kg de HCl concentrat și 13,33 kg de apă purificată (6 M HCl) timp de 2 ore, în timp ce temperatura amestecului de reacție a fost menținută sub 15°C. Atunci când adăugarea a fost terminată, amestecul de reacție a fost încălzit la reflux (80°C) timp de 24 de ore, a fost răcit la temperatura camerei și a fost filtrat în atmosferă de azot. Turta solidă de filtrare a fost triturată cu 14,8 kg de apă purificată, a fost filtrată, triturată din nou cu 14,8 kg apă purificată și filtrată. Solidul a fost returnat în balonul de 100 L cu 39,9 kg de DCM și au fost refluxate cu agitare timp de 1 oră. Au fost adăugate 1,5 kg de apă purificată pentru a dizolva solidele rămase. Stratul organic inferior a fost împărțit într-un balon preîncălzit de 72 L, apoi a fost returnat într-un balon curat uscat de 100 L. Soluția a fost răcită la 0°C, a fost menținută timp de 1 oră, apoi a fost filtrată. Turta solidă de filtrare a fost spălată de două ori, de fiecare dată cu o soluție de 9,8 kg de DCM și 5 kg de heptan, apoi a fost uscată pe pânză. Solidul a fost transferat pe tăvi și a fost uscat până la o greutate constantă de 1,855 kg de acid 3-nitro-4-(2-oxopropil)benzoic. Randament total a fost de 42% din compusul 1. HPLC 99,45%.

3. Prepararea succinatului de N-tritilpiperazină (NTP)

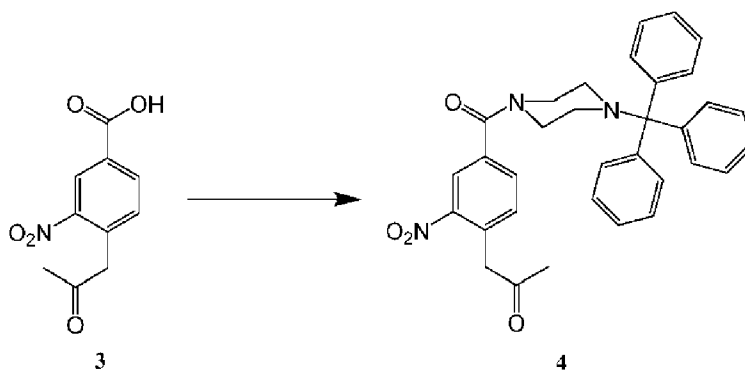


Într-un balon cu manta de 72 L au fost încărcate în atmosferă de azot 1,805 kg de clorură de trifenilmetil și 8,3 kg de toluen (soluție TPC). Amestecul a fost agitat până când solidele s-au dizolvat. Într-un balon de reacție cu manta de 100 L au fost adăugate în atmosferă de azot 5,61 kg de piperazină, 19,9 kg de toluen și 3,72 kg de metanol. Amestecul a fost agitat și răcit la 0°C. La acestea a fost adăugată încet, în porții, soluția de TPC timp de 4 ore, în timp ce temperatura de reacție a fost menținută la sau sub 10 °C. Amestecul a fost agitat timp de 1,5 ore la 10°C, apoi a fost lăsat să se încălzească la 14°C. 32,6 kg de apă purificată au fost încărcate în balonul de 72 L, apoi au fost transferate în balonul de 100 L, în timp ce temperatura internă a lotului a fost menținută la 20°C +/- 5 °C. Straturile au fost lăsate să se despartă și stratul apos inferior a fost separat și depozitat. Stratul organic a fost extras de trei ori, de fiecare dată, cu 32 kg de apă purificată, și straturile apoase au fost separate și combinate cu soluția apoasă depozitată.

Stratul organic rămas a fost răcit la 18°C și a fost adăugat încet, în porții, la stratul organic o soluție de 847 g de acid succinic în 10,87 kg apă purificată. Amestecul a fost agitat timp de 1,75 ore la 20 +/- 5°C. Amestecul a fost filtrat, și solidele au fost spălate cu 2 kg de TBME și 2 kg de acetonă, apoi a fost uscat pe pânză. Turta de filtrare a fost triturată de două ori, de fiecare dată, cu 5,7 kg de acetonă și, între trituri, a fost filtrată și spălată cu 1 kg de acetonă. Solidul a fost uscat pe pânză, apoi a fost transferat în tăvi și a fost uscat într-un cuptor cu vid la temperatura camerei până la o greutate constantă de 2,32 kg de NTP. Randament 80%.

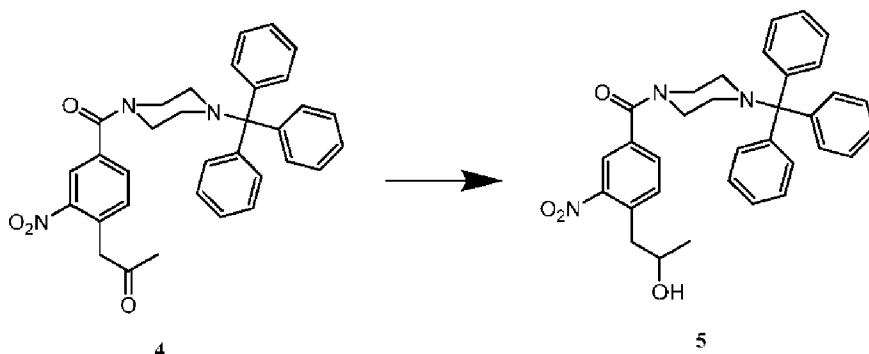
4. Prepararea (4-(2-hidroxiopropil)-3-nitrofenil)(4-tritilpiperazin-1-il)metanonei

A. Prepararea 1-(2-nitro-4(4-tritilpiperazin-1-carbonil)fenil)propan- 2-unei



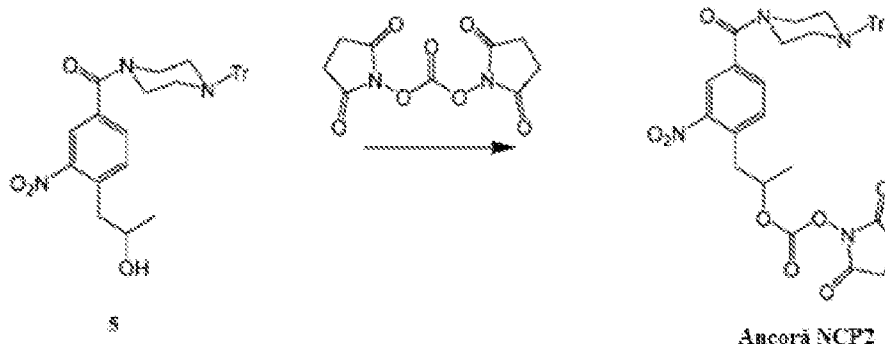
Într-un balon cu manta de 100 L au fost încărcate în atmosferă de azot 2 kg de acid 3-nitro-4-(2-oxopropil)benzoic (3), 18,3 kg de DCM, 1,845 kg de clorhidrat de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimidă (EDC.HCl). Soluția a fost agitată până când s-a format un amestec omogen. Au fost adăugate 3,048 kg de NTP timp de 30 de minute la temperatura camerei, și au fost agitate timp de 8 ore. La amestecul de reacție au fost adăugate 5,44 kg de apă purificată și au fost agitate timp de 30 de minute. Straturile au fost lăsate să se separe, și stratul organic inferior care conține produsul a fost drenat și depozitat. Stratul apos a fost extras de două ori cu 5,65 kg de DCM. Straturile organice combinate au fost spălate cu o soluție de 1,08 kg de clorură de sodiu în 4,08 kg apă purificată. Straturile organice au fost uscate pe 1,068 kg de sulfat de sodiu și au fost filtrate. Sulfatul de sodiu a fost spălat cu 1,3 kg de DCM. Straturile organice combinate au fost suspendate cu 252 g de silicagel și au fost filtrate printr-o pâlnie de filtrare care conține un pat de 252 g de silicagel. Patul de silicagel a fost spălat cu 2 kg de DCM. Straturile organice combinate au fost evaporate pe un evaporator rotativ. La reziduu au fost adăugate 4,8 kg de THF și apoi au fost evaporate pe evaporator rotativ până când s-a ajuns la 2,5 volume de 1-(2-nitro-4(4-tritilpiperazin-1-carbonil)fenil)propan-2-onă brută în THF.

B. Prepararea (4-(2-hidroxipropil)-3-nitrofenil)(4-tritilpiperazin-1-il)metanonei (5)



Într-un balon cu manta de 100 L au fost încărcate în atmosferă de azot 3600 g de 4 din etapa anterioară și 9800 g de THF. Soluția agitată a fost răcită la $\leq 5^{\circ}\text{C}$. Soluția a fost diluată cu 11525 g de etanol și au fost adăugate 194 g de borohidru de sodiu timp de aproximativ 2 ore la $\leq 5^{\circ}\text{C}$. Amestecul de reacție a fost agitat încă 2 ore la $\leq 5^{\circ}\text{C}$. Reacția a fost stinsă cu o soluție de aproximativ 1,1 kg de clorură de amoniu în aproximativ 3 kg apă prin adăugare lentă pentru a menține temperatura la $\leq 10^{\circ}\text{C}$. Amestecul de reacție a fost agitat încă 30 de minute, a fost filtrat pentru a îndepărta substanțele anorganice și a fost încărcat din nou într-un balon cu manta de 100 L și a fost extras cu 23 kg de DCM. Stratul organic a fost separat și soluția apoasă a fost extrasă încă de două ori, de fiecare dată, cu 4,7 kg de DCM. Straturile organice combinate au fost spălate cu o soluție de aproximativ 800 g de clorură de sodiu în aproximativ 3 kg de apă, apoi au fost uscate pe 2,7 kg de sulfat de sodiu. Suspensia a fost filtrată și turta de filtrare a fost spălată cu 2 kg de DCM. Filtratele combinate au fost concentrate până la 2,0 volume, au fost diluate cu aproximativ 360 g de acetat de etil și au fost evaporate. Produsul brut a fost încărcat pe o coloană de silicagel de 4 kg de silice umplută cu DCM în atmosferă de azot, și a fost eluat cu 2,3 kg de acetat de etil în 7,2 kg de DCM. Frațiunile combinate au fost evaporate și reziduu a fost preluat în 11,7 kg de toluen. Soluția de toluen a fost filtrată, și turta de filtrare a fost spălată de două ori, de fiecare dată, cu 2 kg de toluen. Turta de filtrare a fost uscată până la o greutate constantă de 2,275 kg de compus 5 (randament 46% din compusul 3) HPLC 96,99%.

5. Prepararea carbonatului de 2,5-dioxopirolidin-1-il(1-(2-nitro-4-(4-trifenilmetilpiperazin-1-carbonil)fenil)propan-2-il) (ancoră NCP2)



Într-un balon cu manta de 100 L au fost încărcate în atmosferă de azot 4,3 kg de compus 5 (greutate ajustată, pe baza toluenului rezidual, prin ^1H RMN; toți reactivii de aici după ce au fost scalați corespunzător) și 12,7 kg de piridină. Pentru aceasta au fost încărcate 3,160 kg de DSC (78,91 % în greutate prin ^1H RMN), în timp ce temperatura internă a fost menținută la $\leq 35^\circ\text{C}$. Amestecul de reacție a fost învechit timp de aproximativ 22 de ore în mediul ambiant, apoi a fost filtrat. Turta de filtrare a fost spălată cu 200 g de piridină. În două loturi, fiecare cuprinzând jumătate din volumul de filtrat, filtratul a fost încărcat lent într-un balon cu manta de 100 L care conține o soluție de aproximativ 11 kg de acid citric în aproximativ 50 kg de apă, și a fost agitat timp de 30 de minute pentru a permite precipitarea solidului. Solidul a fost colectat cu o pâlnie de filtrare, a fost spălat de două ori, de fiecare dată, cu 4,3 kg de apă spălare, și a fost uscat în vid pe pâlnia de filtrare.

Solidele combinate au fost încărcate într-un balon cu manta de 100 L și au fost dizolvate în 28 kg de DCM și au fost spălate cu o soluție de 900 g de carbonat de potasiu în 4,3 kg apă. După 1 oră, straturile au fost lăsate să se separe, și stratul apos a fost îndepărtat. Stratul organic a fost spălat cu 10 kg de apă, a fost separat și a fost uscat pe 3,5 kg de sulfat de sodiu. DCM a fost filtrat, evaporat și a fost uscat în vid până la 6,16 kg de **Ancoră NCP2** (Randament 114%).

Sinteza rășinii încărcată cu ancoră NCP2

Într-un reactor de 75 L de sinteză în fază solidă cu un robinet de închidere din teflon au fost încărcate aproximativ 52 L de NMP și 2300 g de rășină aminometil polistiren. Rășina a fost agitată în NMP pentru a se umfla timp de aproximativ 2 ore, apoi a fost drenată. Rășina a fost spălată de două ori cu aproximativ 4 L de DCM la fiecare spălare, apoi de două ori cu 39 L de soluție de neutralizare la fiecare spălare, apoi de două ori cu 39 L de DCM la fiecare spălare. Soluția de ancoră NCP2 a fost adăugată lent la soluția de rășină, cu agitare, a fost agitată timp de 24 de ore la temperatura camerei și a fost drenată. Rășina a fost spălată de patru ori cu 39 L de NMP la fiecare spălare și de șase ori cu 39 L de DCM la fiecare spălare. Rășina a fost tratată și agitată cu jumătate din soluția de acoperire DEDC, timp de 30 de minute, a fost drenată și a fost tratată și agitată cu cealaltă jumătate din soluția de acoperire DEDC timp de 30 de minute, și a fost drenată. Rășina a fost spălată de șase ori cu 39 L de DCM la fiecare spălare, apoi a fost uscată într-un cuptor până la o greutate constantă de 3573,71 g de rășină încărcată cu ancoră.

Sinteza de referință a 50L în fază solidă de substanță medicamentoasă brută Casimersen (PMO#1)

1. Materiale

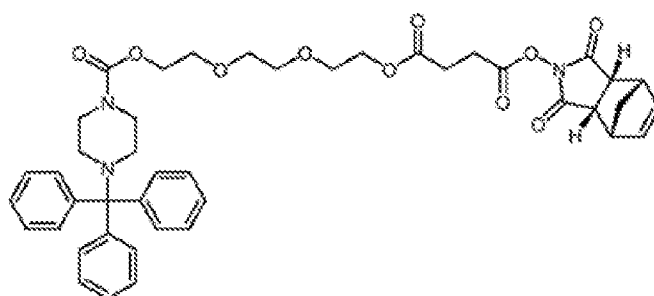
Masa 2: Materii prime

Denumire material	Denumire chimică	Număr CAS	Formulă chimică	Greutate moleculară
Subunitate A activată	Ester N,N-dimetil-, [6-[6-(benzoylamino)-9H-purin-9-yl]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]metilic al acidului fosforamidocloridic	1155373-30-0	$\text{C}_{38}\text{H}_{37}\text{ClN}_7\text{O}_4\text{P}$	722,2
Subunitate C activată	Ester N,N-dimetil-, [6-[4-(benzoylamino)-2-oxo-1(2H)-pirimidinil]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]metilic al acidului fosforamidocloridic	1155373-31-1	$\text{C}_{37}\text{H}_{37}\text{ClN}_5\text{O}_5\text{P}$	698,2
Subunitate DPG activată	Ester 2,2-dimetil-, 4-[[[9-[6-[[[clor(dimetilamino)fosfinil]oxi]metil]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]-2-[(2-	1155309-89-9	$\text{C}_{51}\text{H}_{53}\text{ClN}_7\text{O}_7\text{P}$	942,2

Denumire material	Denumire chimică	Număr CAS	Formulă chimică	Greutate moleculară
	fenilacetil)amino]-9H-purin-6-il]oxi]metil]fenil al acidului propanoic			
Subunitate T activată	Ester N,N-dimetil-, [6-(3,4-dihidro-5-metil-2,4-dioxo-1(2H)-pirimidinil)-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]metil al acidului fosforamidocloridic	1155373-34-4	$C_{31}H_{34}ClN_4O_5P$	609,1
Coadă EG3 activată	Ester 1-[3aR,4S,7R,7aS)-1,3,3a,4,7,7a-hexahidro-1,3-dioxo-4,7-metan-2H-izoindol-2-il]4-[2-[2-[2-[[4-(trifenilmetil)-1-piperazinil]carbonil]oxi]etoxi]etoxi]etil al acidului butandioic	1380600-06-5	$C_{43}H_{47}N_3O_{10}$	765,9

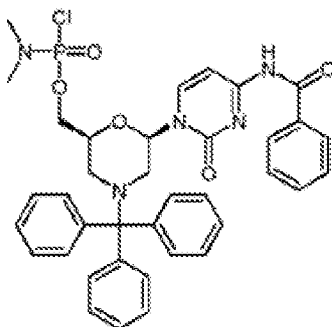
Structurile chimice ale materiilor prime:

A. Tail EG3 activat



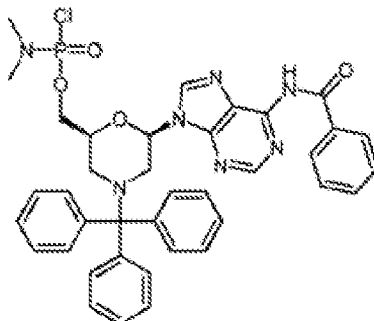
Compus (B)

5 B. Subunitatea C activată (Pentru preparare, vezi brevetul U.S. nr. 8.067.571)



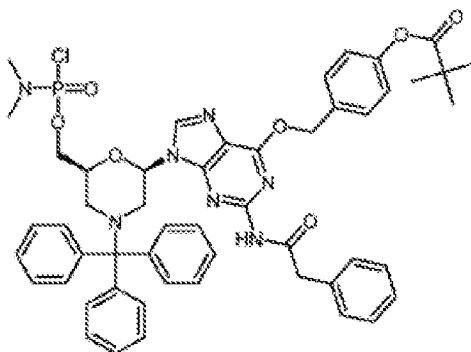
Compus cu Formula (D1)

C. Subunitatea A activată (Pentru preparare, vezi brevetul U.S. nr. 8.067.571)



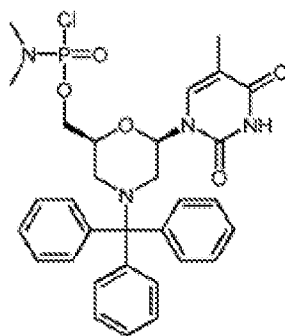
Compus cu Formula (F1)

D. Subunitatea DPG activată (Pentru preparare, vezi WO 2009/064471)



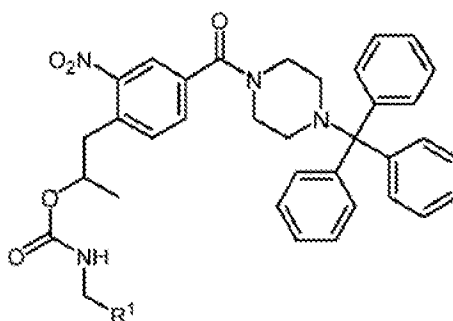
Compus (E1)

E. Subunitatea T activată (Pentru preparare, vezi WO 2013/082551)



Compus (G1)

F. Rășină încărcată cu ancoră



Formula (I)

5

în care R¹ este un mediu suport.

Tabelul 3: Descrierea soluțiilor pentru sinteza oligomerului în fază solidă al substanței medicamentoase brute Casimersen

Denumirea soluției	Compoziția soluției
Soluție de ancoră NCP2	37,5 L de NMP și 1292 g de ancoră NCP2
Soluție de acoperire DEDC	4,16 L de dicarbonat de dietil (DEDC), 3,64 L de NEM și 33,8 L de DCM
Soluție CYTFA	2,02 kg de 4-cianopiridină, 158 L de DCM, 1,42 L de TFA, 39 L de TFE și 2 L de apă purificată
Soluție de neutralizare	35,3 L de IPA, 7,5 L de DIPEA și 106,5 L de DCM
Soluție de scindare	1530,04 g de DTT, 6,96 L de NMP și 2,98 L de DBU

10

2. Sinteza de referință a substanței medicamentoase brute Casimersen

A. Umflarea rășinii

750 g de rășină încărcată cu ancoră și 10,5 L de NMP au fost încărcate într-un reactor silanizat de 50 l și au fost agitate timp de 3 ore. NMP a fost drenat și rășina încărcată cu ancoră a fost spălată de două ori, de fiecare dată, cu 5,5 L de DCM și de două ori, de fiecare dată, cu 5,5 L de 30% TFE/DCM.

5 B. Ciclu 0: Cuplarea Tail EG3

Rășina încărcată cu ancoră a fost spălată de trei ori, de fiecare dată, cu 5,5 L de 30% TFE/DCM, și a fost drenată, spălată cu 5,5 L de soluție CYTFA timp de 15 minute și drenată și a fost spălată din nou cu 5,5 L de soluție CYTFA timp de 15 minute fără drenare, la care au fost încărcăți 122 mL de NEM/DCM 1:1, și suspensia a fost agitată timp de 2 minute și a fost drenată. Rășina a fost spălată de două ori cu 5,5 L de soluție de neutralizare timp de 5 minute și a fost drenată, apoi de două ori, de fiecare dată, cu 5,5 L de DCM și a fost drenată. O soluție de 706,2 g de Tail EG3 activat (MW 765,85) și 234 mL de NEM în 3 L de DMI a fost încărcată în rășină și a fost agitată timp de 3 ore la temperatura camerei, și a fost drenată. Rășina a fost spălată de două ori, de fiecare dată, cu 5,5 L de soluție de neutralizare timp de 5 minute pentru fiecare spălare și o dată cu 5,5 L de DCM și a fost drenată. O soluție de 374,8 g de anhidridă benzoică și 195 mL de NEM în 2680 mL de NMP a fost încărcată și agitată timp de 15 minute și a fost drenată. Rășina a fost agitată cu 5,5 l de soluție de neutralizare timp de 5 minute, apoi a fost spălată o dată cu 5,5 l de DCM și de două ori de fiecare dată cu 5,5 l de 30% TFE/DCM. Rășina a fost suspendată în 5,5 L de 30% TFE/DCM și a fost menținută timp de 14 ore.

20 C. Cicluri 1-22 de cuplare a subunității

i. Tratamente înainte de cuplare

Înainte de fiecare ciclu de cuplare, așa cum este descris în Figura 17, rășina a fost: 1) spălată cu 30% TFE/DCM; 2) a) tratată cu soluție de CYTFA timp de 15 minute și a fost drenată, și b) tratată cu soluție de CYTFA timp de 15 minute, la care a fost adăugat 1:1 NEM/DCM, a fost agitată și a fost drenată; 3) agitată de trei ori cu soluție de neutralizare; și 4) spălată de două ori cu DCM. Vezi Figura 17.

ii. Tratamente după cuplare

După ce fiecare soluție de subunitate a fost drenată așa cum este descris în Figura 17, rășina a fost: 1) spălată cu DCM; și 2) spălată de două ori cu 30% TFE/DCM. Dacă rășina a fost menținută pentru o perioadă de timp înainte de următorul ciclu de cuplare, a doua spălare cu TFE/DCM nu a fost drenată și rășina a fost reținută în respectiva soluție de spălare cu TFE/DCM. Vezi Figura 17.

iii. Cicluri de cuplare a subunității activate

Ciclurile de cuplare au fost efectuate așa cum este descris în Figura 17.

iv. Spălare finală cu IPA

După ce etapa finală de cuplare a fost efectuată așa cum este descris în Figura 17, rășina a fost spălată de 8 ori, de fiecare dată, cu 19,5 L de IPA și a fost uscată în vid la temperatura camerei timp de aproximativ 63,5 ore până la o greutate uscată de 4523 g.

C. Scindarea

Substanța medicamentoasă brută Casimersen legată de rășina de mai sus a fost împărțită în două loturi, fiecare lot a fost tratat după cum urmează. Două loturi de 2261,5 g de rășină au fost fiecare: 1) agitat cu 10 L de NMP timp de 2 ore, apoi NMP a fost drenat; 2) spălat de 3 ori, de fiecare dată, cu 10 L de 30% TFE/DCM; 3) tratat cu 10 L de soluție de CYTFA timp de 15 minute; și 4) 10 L de soluție de CYTFA timp de 15 minute la care au fost adăugați apoi 130 ml de 1:1 NEM/DCM și au fost agitate timp de 2 minute și au fost drenate. Rășina a fost tratată de trei ori, de fiecare dată, cu 10 l de soluție de neutralizare, a fost spălată de șase ori cu 10 l de DCM și de opt ori, de fiecare dată, cu 10 l de NMP. Rășina a fost tratată cu o soluție de scindare de 1530,4 g DTT și 2980 DBU în 6,96 L de NMP timp de 2 ore pentru a detașa substanța medicamentoasă brută Casimersen din rășină. Soluția de scindare a fost drenată și reținută într-un vas separat. Reactorul și rășina au fost spălate cu 4,97 L de NMP care a fost combinat cu soluția de scindare.

D. Deprotejarea

Soluția de scindare combinată și spălătura de NMP au fost transferate într-un vas sub presiune la care au fost adăugați 39,8 L de NH_4OH ($\text{NH}_3 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) care a fost răcit la o temperatură de -10°C până la -25°C într-un congelator. Vasul sub presiune a fost sigilat și încălzit la 45°C timp de 16 ore, apoi a fost lăsat să se răcească la 25°C . Această soluție de deprotejare, care conține substanța medicamentoasă brută Casimersen, a fost diluată 3:1 cu apă purificată, și pH-ul a fost ajustat la 3,0 cu acid fosforic 2 M, apoi la pH 8,03 cu NH_4OH . HPLC: C18 80,93% și SCX-10 84,4%.

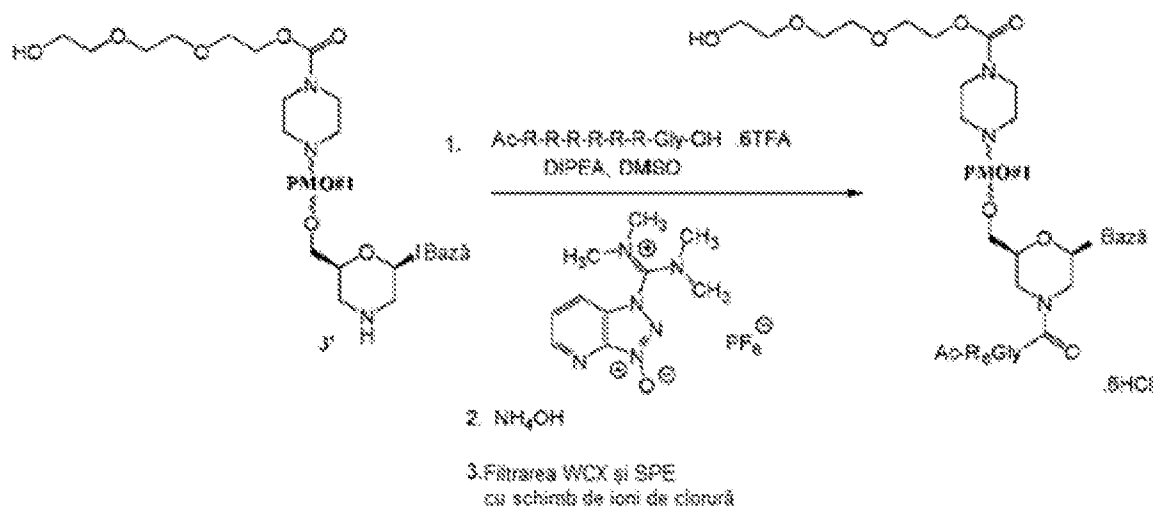
Purificarea de referință a substanței medicamentoase brute Eteplirsen (PMO#1).

Partea D din soluția de deprotezare de mai sus, care conține substanța medicamentoasă brută Casimersen, a fost încărcată pe o coloană de rășină schimbătoare de anioni ToyoPearl Super-Q 650S (Tosoh Bioscience) și a fost eluată cu un gradient de 0-35% B pe 17 volume de coloană (tampon A: 10 mM hidroxid de sodiu; Tampon B: 1 M clorură de sodiu în 10 mM hidroxid de sodiu) și fracțiunile de puritate acceptabilă (C18 și SCX HPLC) au fost reunite cu o soluție purificată de produs medicamentos. HPLC: 97,74% (C18) 94,58% (SCX).

Soluția purificată de substanță medicamentoasă a fost desărată și liofilizată la 1477,82 g de substanță medicamentoasă purificată Casimersen. Randament 63,37%; HPLC: 96,045% (C18) 96,346% (SCX).

Tabelul 5. Acronime

Acronim	Denumire
DBU	1,8-Diazabicycloundec-7-enă
DCM	Diclorometan
DIPEA	N,N-diizopropiletilamină
DMI	1,3-Dimetil-2-imidazolidinonă
TDT	Ditiotritol
IPA	Alcool izopropilic
MW	Greutate moleculară
NEM	N-etilmorfolină
NMP	N-metil-2-pirolidonă
RT	Temperatura camerei
TFA	Acid 2,2,2-trifluoracetic
TFE	2,2,2-Trifluoretanol

Conjugarea CPP

Proceduri analitice: Spectrele de masă în timpul de zbor la ionizare cu desorbție laser asistată de matrice (MALDI-TOF-MS) au fost înregistrate pe un Bruker AutoflexTM Speed, utilizând o matrice de acid sinapinic (SA). SCX-HPLC a fost efectuată pe un sistem Thermo Dionex UltiMate 3000 echipat cu un detector cu matrice de diode 3000 și o coloană ProPacTM SCX-20 (250 x 4 mm) folosind un debit de 1,0 mL/min (pH = 2; coloană cu temperatura de 30 °C). Fazele mobile au fost A (25% acetonitril în apă care conține 24 mM H_3PO_4) și B (25% acetonitril în apă care conține 1 M KCl și 24 mM H_3PO_4). A fost folosită eluarea cu gradient: 0 min, 35% B; 2 min, 35% B; 22 min, 80% B; 25 min, 80% B; 25,1 min, 35% B; 30 min, 35% B.

La un amestec de PMO#1 (1,82 g, 0,177 mmol, proaspăt uscat prin liofilizare timp de două zile), Ac-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-Gly-OH hexatrifluoracetat (614,7 mg, 0,354 mmol) și 1-

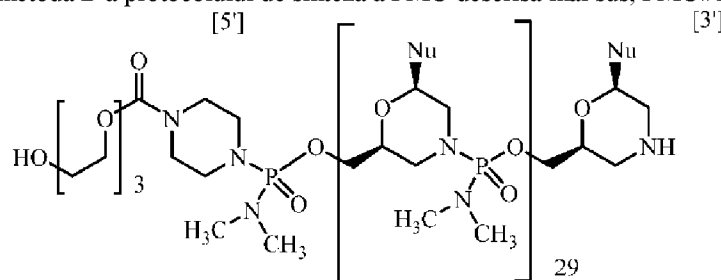
[Bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridiniu 3-oxid hexafluorofosfat (HATU, 134,4 mg, 0,354 mmol) a fost adăugat dimetil sulfoxid (DMSO, 20 mL). Amestecul a fost agitat la temperatura camerei timp de 3 minute, apoi a fost adăugată N,N-diizopropiletilamină (DIPEA, 68,5 mg, 0,530 mmol). După 5 minute, amestecul turbure a devenit o soluție limpede. Reacția a fost monitorizată prin SCX-HPLC. După 2 ore, au fost adăugați 20 ml de soluție de hidroxid de amoniu 10% (2,8% NH₃). Amestecul a fost agitat la temperatura camerei timp de încă 2 ore. Reacția a fost încheiată prin adăugarea a 400 ml de apă. La soluție a fost adăugat trifluoretanol (2,0 mL).

Soluția a fost împărțită în două porții, și fiecare porție a fost purificată printr-o coloană WCX (10 g rășină la fiecare coloană). Fiecare coloană WCX a fost mai întâi spălată cu acetonitril 20% în apă (v/v) pentru a îndepărta materia primă PMO#1. Spălările (225 ml pentru fiecare coloană) au fost oprite când analiza spectrului de masă MALDI-TOF a arătat absența semnalului PMO#1. Fiecare coloană a fost apoi spălată cu apă (100 mL la fiecare coloană). Produsul dorit, PPMO#1, a fost eluat cu 2,0 M guanidină HCl (140 mL pentru fiecare coloană). Soluțiile de PPMO#1 purificate au fost reunite împreună și apoi au fost împărțite în două porțiuni și fiecare a fost desărată printr-o coloană SPE (10 g de rășină pentru fiecare coloană).

Coloana SPE a fost mai întâi spălată cu soluție apoasă de NaCl 1,0 M (100 mL pentru fiecare coloană) pentru a genera sarea hexaclorhidrat a PPMO#1. Fiecare coloană SPE a fost apoi spălată cu apă (200 mL pentru fiecare coloană). PPMO#1 desărat final a fost eluat cu acetonitril 50% în apă (v/v, 150 ml pentru fiecare coloană). Acetonitrilul a fost îndepărtat prin evacuare la presiune redusă. Soluția apoasă rezultată a fost liofilizată pentru a se obține clorhidratul hexaclorhidrat PPMO#1 dorit (1,93 g, randament 94,5%).

Exemplu de referință 1: PMO#1

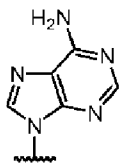
Folosind metoda B a protocolului de sinteză a PMO descrisă mai sus, PMO#1 a fost sintetizat:



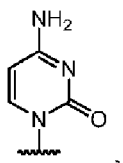
PMO#1
în care fiecare Nu de la 1 până la 22 și de la 5' până la 3' este (SECV ID NR: 1):

Poziția nr. 5' până la 3'	Nu	Poziția nr. 5' până la 3'	Nu	Poziția nr. 5' până la 3'	Nu	Poziția nr. 5' până la 3'	Nu	Poziția nr. 5' până la 3'	Nu
1	C	6	C	11	c	16	G	21	T
2	A	7	C	12	T	17	T	22	G
3	A	8	A	13	G	18	T		
4	T	9	T	14	G	19	C		
5	G	10	c	15	A	20	C		

în care A este

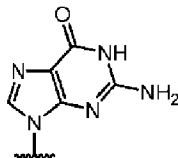


Cis

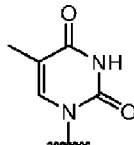


Gis

45



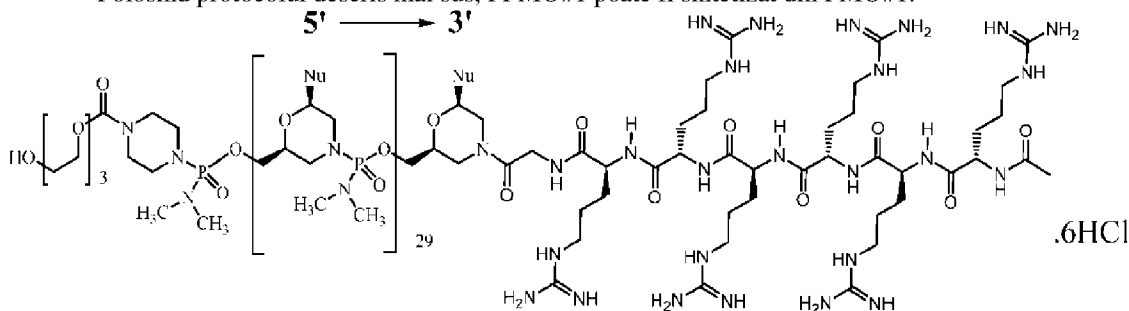
și T este



HPLC: 71,85%; Condiții: Dionex DNAPac (DNX#97) Gradient: 75%A + 20%B + 5%C la 0 min; 50%A la 20 min; 25%A + 75%C at 21 min; Faza mobilă A: 10mM NaOH/20mM NaCl; C: 10mM NaOH/0,5 M NaCL. Temp Coloană: 45C; Debit 1,0 mL/min.

Exemplul 2: PPMO#1

Folosind protocolul descris mai sus, PPMO#1 poate fi sintetizat din PMO#1.

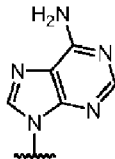


PPMO#1

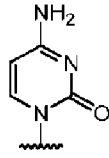
în care fiecare Nu de la 1 până la 22 și de la 5' până la 3' este (SECV ID NR: 1):

Poziția nr. 5' până la 3'	Nu	Poziția nr. 5' până la 3'	Nu	Poziția nr. 5' până la 3'	Nu	Poziția nr. 5' până la 3'	Nu	Poziția nr. 5' până la 3'	Nu
1	C	6	C	11	c	16	G	21	T
2	A	7	C	12	T	17	T	22	G
3	A	8	A	13	G	18	T		
4	T	9	T	14	G	19	C		
5	G	10	c	15	A	20	C		

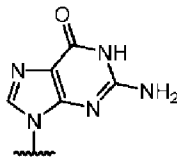
în care A este



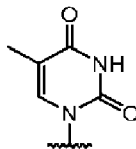
Cis



Gis



și T este

**Exemplul 3: Omiterea exonului 45 *in vitro***

Doi compuși care țintesc exonul 45 de distrofina umană, așa cum este descris în tabelul de mai jos, PMO#1 și PPMO#1, din care ambii sunt asamblați în aceeași secvență, sunt evaluați pentru capacitatea de a induce omiterea exonului 45.

Denumire	Secvență de țintire (TS)	TS SECV ID NR.	5'	3'
PMO#1	CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG	1	EG3	H
PPMO# 1	CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG	1	EG3	-G-R ₆

În mod specific, sunt utilizate miocite umane diferențiate pentru a determina capacitatea compușilor de mai sus de a induce omiterea exonului 45 la diferite concentrații (adică, 40 μM, 20 μM, 10 μM, 5 μM, 2,5 μM și 1,25 μM). După diferențiere, celulele sunt incubate cu compuși timp de nouăzeci și șase de ore, urmată de izolarea ARN, și este măsurată omiterea exonului 45 prin RT-PCR așa cum este descris mai sus.

Exemplul de referință 4: Studiu pe șoarece MDX

Șoarecele MDX este un model animal acceptat și bine caracterizat pentru distrofia musculară Duchene (DMD) care conține o mutație în exonul 23 al genei distrofinei. Secvența antisens M23D (SECV ID NR: 2) este cunoscută că induce omiterea exonului 23 și restabilirea expresiei funcționale a distrofinei. Șoarecii MDX la vârsta de 6-7 săptămâni au primit o singură injecție în vena cozii, fie cu un PPMO4225, fie cu un PMO4225 din tabelul de mai jos, la o doză de 40 mg/kg, sau cu ser fiziologic.

Denumire	Secvență de țintire (TS)	TS SECV ID NR.	5'	3'
PMO4225	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	2	EG3	H
PPMO4225	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	2	EG3	-G-R ₆

Fiecare dintre PMO4225 și PPMO4225 a fost preparat prin metoda PMO A și metodele de conjugare CPP descrise mai sus.

Șoarecii tratați au fost sacrificați la 7, 30, 60 și 90 de zile după injectarea cu doză unică (n=6 în fiecare grup). Diafragma, inima și cvadriicepsul drept au fost prelucrate pentru analiza Western blot pentru a măsura producția de proteină distrofină, și pentru analiza RT-PCR pentru a măsura procentul de omitere a exonilor, iar cvadriicepsul stâng a fost prelucrat pentru imunohistochimie și colorare H/E, așa cum este descris mai sus.

Restabilirea proteinei distrofină a fost cuantificată prin Western blot, și procentul de omitere a exonului 23 a fost măsurat prin RT-PCR, fiecare, așa cum este descris mai sus cu un primer sens SECV ID NR: 5 (5'-CACATCTTTGATGGTGTGAGG-3') și un primer antisens SECV ID NR: 6 (5'-CAACTTCAGCCATCCATTCTG-3').

Rezultatele RT-PCR sunt prezentate în figurile 4A-9B și în tabelele de mai jos. În mod surprinzător, PPMO4225 a indus niveluri semnificativ mai mari și susținute de restabilire a distrofinei și de omitere a exonului 23, în comparație cu PMO4225, cele mai ridicate niveluri apar la 30 de zile după injecție. Și mai surprinzător, PPMO4225 a crescut nivelurile de distrofină în inimă atunci când PMO4225 nu a făcut-o; distrofină și omiterea exonilor nu au fost observate în inimă în toate momentele cu PMO4225.

Cuantificarea proteinei distrofină ca procent de proteină de tip sălbatic (%WT) prin Western Blot								
Compus	PMO4225				PPMO4225			
Zi	7	30	60	90	7	30	60	90
Tesut								
Cvadriiceps	1,1	2,3	1,6	0,7	20,7	28,1	20,8	8,2
Diafragmă	1,4	1,9	1,3	0,6	14,5	15,2	9,8	2,3

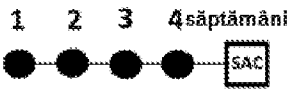
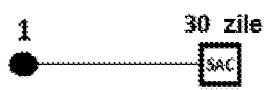
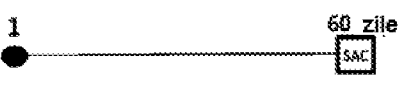
Cuantificarea proteinei distrofină ca procent de proteină de tip sălbatic (%WT) prin Western Blot								
Compus	PMO4225				PPMO4225			
Zi	7	30	60	90	7	30	60	90
Tesut								
Inimă	0	0	0	0	2,0	1,0	0,9	0,1
Procentul de omitere a exonului măsurat prin RT-PCR								
Compus	PMO4225				PPMO4225			
Zi	7	30	60	90	7	30	60	90
Tesut								
Cvadriceps	21,2	5,5	7,9	2,8	61,5	42,02	28,8	6,9
Diafragmă	29,9	2,6	0,5	0	51,6	36,76	3,05	0
Inimă	0	0	0	0	13,15	2,64	0	0

Rezultatele imunohistochemiei sunt prezentate în Figura 10. Aici, PPMO4225 restabilește distrofina în întregul cvadriceps, în timp ce 4225 produce un model de expresie 'de tip petice'. Distribuția uniformă a distrofinei cu tratamentul PPMO4225 indică faptul că țintirea pe scară largă a mușchilor scheletici este realizabilă. PPMO4225 a îmbunătățit semnificativ *in vivo* furnizarea față de PMO4225.

Exemplul 5: Omiterea exonului 45 în NHP

Maimuțele cynomolgus sunt injectate intravenos cu PPMO#1, PMO#1, sau cu soluție salină conform programului de dozare din tabelul de mai jos:

Programul de dozare pentru Cynomolgus

Grup	Compus	Doză (mg/kg)	Număr în fiecare grup	Strategia de furnizare
1	PPMO#1	20	3	 O dată pe săptămână, în total 4 doze. Animalele au fost sacrificate la 48 de ore după ultima doză, în ziua 22.
2	PPMO#1	40	3	
3	PPMO#1	80	3	
4	PPMO#1	160	3	
5	PMO#1	40	3	 Doză unică în ziua 1 cu recuperare de 4 săptămâni
6	Salină	0	2	
7	PPMO#1	40	2	 Doză unică în ziua 1 cu recuperare de 8 săptămâni
8	PPMO#1	40	2	

Animalele vor fi ținute sub observație pe tot parcursul studiului, incluzând observații clinice (de ex., evaluarea pielii și a blănii, efectele respiratorii) și măsurătorile greutatei corporale. Probele de sânge și urină vor fi prelevate cel puțin înainte de începerea testării și la 24 de ore după prima doză și ultima doză (dacă este cazul). La fiecare necropsie programată sau eutanasiată *in extremis*, se vor colecta secțiuni de biceps, deltoid, diafragmă, rinichi, mușchi netezi ai esofagului, duoden, cvadriiceps, aortă, creier (lobul față stânga), inimă și anus și vor fi înghețate. În plus, secțiuni de cvadriiceps, deltoid, diafragmă și inimă vor fi încorporate în OCT și congelate pe gheață carbonică.

Exemplul de referință 6: Studiu de răspuns la doză la șoarece MDX

Șoareci MDX cu vârsta de 6-7 săptămâni au primit o singură injecție în vena cozii, fie cu un PPMO4225, fie cu PMO4225 descris mai sus, la o doză de 40 mg/kg, 80 mg/kg sau 120 mg/kg (n=6 în fiecare grup).

Șoarecii tratați au fost sacrificați la 30 de zile după injectare. Diafragma, cvadriicepsul și inima au fost prelucrate pentru analiza western blot pentru a măsura producția de proteină distrofină pe baza protocolului western blot descris mai sus (utilizat, de exemplu, în Exemplul 4) cu următoarele modificări:

Parametru	Protocolul Western Blot din exemplul 4	Modificări ale protocolului Western Blot
Cuantificarea proteinelor	Kit de testare a proteinelor RC DC	Metoda BCA
Etapa de blocare	Peste noapte la 4°C	1 Ora la RT
Incubare cu anticorpi primari	1 oră la RT	Peste noapte la 4°C
Concentrația de anticorpi primari	1:20	1:500

Restabilirea proteinei distrofină ca % de tip sălbatic este prezentată în tabelul de mai jos și în figurile 11-14.

Cuantificarea prin Western Blot a proteinei distrofină ca procent de proteină de tip sălbatic (%WT)						
Compus	PMO4225			PPMO4225		
Doză (mg/kg)	40	80	120	40	80	120
Tesut						
Diafragmă	0,80	0,97	1,83	8,02	26,03	42,77
Inimă	0,13	0,24	0,34	0,61	6,34	19,48
Cvadriiceps	3,5	2,6	3,0	43	90	144

În mod surprinzător, datele arată că o singură doză de PPMO4225 crește nivelurile de distrofină într-o manieră dependentă de doză la șoarecii mdx într-o măsură semnificativ și substanțial mai mare decât cea de PMO4225.

Exemplul de referință 7: Studiu IHC al diafragmei și inimii șoarecilor MDX

Șoareci MDX cu vârsta de 6-7 săptămâni au primit o singură injecție în vena cozii de PPMO4225 la o doză de 80 mg/kg sau de soluție salină, și șoareci de tip sălbatic cu vârsta de 6-7 săptămâni au primit o singură injecție de soluție salină. Șoarecii mdx tratați, șoarecii mdx cu soluție salină, și șoarecii de tip sălbatic au fost sacrificați la 30 de zile după injectarea cu doză unică (n=4 în fiecare grup). Rezultatele de imunohistochimie sunt prezentate în Figura 18. Aici, rezultatele arată o creștere uniformă a distrofinei în țesuturi asociată cu morbiditatea și mortalitatea la șoarecii Mdx cu DMD tratați cu PPMO4225.

Exemplul 8: Omiterea exonului 45 *in vitro* (Mioblaste)

Doi compuși care ținesc exonul 45 de distrofină umană (DMD), așa cum este descris în tabelul de mai jos, PMO#1 și PPMO#1, ambii conținând aceeași secvență, au fost evaluați pentru omiterea exonului 45 în DMD în mioblaste umane sănătoase.

Secvențe de PMO#1 și PPMO#1 pentru exonul 45 uman în DMD.

Denumire	Secvență de țintire (TS)	TS SECV ID NR.	5'	3'
PMO#1	CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG	1	EG3	H
PPMO# 1	CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG	1	EG3	-G-R ₆

În mod specific, mioblastele umane sănătoase (pasajul 5-6, SKB-F-SL achiziționat de la Zen-Bio, Inc.) au fost placate la confluență de ~40% atunci când au fost tratate cu PMO#1 sau PPMO#1 la diferite concentrații (adică, 40 μ m, 20 μ m, 10 μ m, 5 μ m, 2,5 μ m și 1,25 μ m) în mediu SKM-M (Zen-Bio, Inc.). După nouăzeci și șase de ore de incubare, mioblastele au fost spălate cu PBS și au fost lizate cu tampon de liză RA1 în kitul Illustra GE RNAspin 96 (Cat#25-055-75, GE Healthcare Bio-Sciences). ARN-ul total a fost izolat conform recomandării producătorului, cu excepția faptului că au fost folosiți 40 μ L de apă fără RNază pentru eluarea ARN-ului.

Pentru a determina omiterea exonului 45 cu ambii compuși, a fost efectuată RT-PCR finală în două etape. În mod specific, unsprezece microlitri de ARN total au fost mai întâi transcriși invers la ADNc prin kitul de sinteză SuperScript IV First-strand (Cat#18091200, Invitrogen) folosind hexameri aleatori conform instrucțiunilor producătorului. PCR a fost efectuată prin adăugarea a 9 μ L de ADNc în Platinum Taq DNA polymerase PCR Supermix High Fidelity (Cat#12532024, Invitrogen) cu primeri care țintesc exonii 43 și 46 în *DMD* umană [primer direct: CTACAGGAAGCTCTCTCCCAG (SECV ID NR: 7); primer invers (SECV ID NR: 8): GTTATCTGCTTCCTCCAACCA]. Amplificarea PCR a fost efectuată utilizând termociclorul în timp real BioRad CFX96 utilizând programul prezentat în tabelul de mai jos. Expresia produselor PCR ignorate sau omise a fost evaluată prin încărcarea a 32 μ L de produs PCR în sistemul LabChip GX utilizând kitul de reactiv de înaltă sensibilitate ADN (CLS760672, Perkin Elmer). Procentul de omitere a exonului 45 în *DMD* a fost calculat ca procent de molaritate (nmol/l) pentru banda omisă a exonului 45 (301 bp) în comparație cu suma molarității pentru benzile omise (301 bp) și pentru cele care nu sunt omise (477 bp).

Testul t Student nepereche cu două cozi (homoscedastic) a fost utilizat pentru a evalua dacă mediile celor 2 grupuri sunt diferite statistic una de cealaltă la fiecare doză. Valoarea $p < 0,05$ a fost considerată semnificativă statistic.

Programul termociclor folosit pentru amplificarea ampliconilor în *DMD*, cu sau fără omiterea exonului 45.

Etapă	Temperatură	Timp
1. Denaturare	94 °C	2 min
2. Denaturare	94 °C	30 sec
3. Aliniere	55 °C	30 sec
4. Prelungire	68 °C	1 min
5. Repetarea etapelor 2-4	34 cicluri	
6. Prelungire finală	68 °C	5 min
7. Depozitare	4 °C	∞

Rezultatele, care arată că PPMO#1 crește semnificativ omiterea exonului 45 în *DMD* în comparație cu PMO#1 în mioblaste umane sunt prezentate în tabelul de mai jos și în Figura 19.

Procent de omitere a exonului 45 în *DMD*, cu PMO#1 și PPMO#1 în mioblastele umane.

Compus/ Doză (μ m)	Procent de omitere a exonului (medie $\pm$ SD)					
	1,25	2,5	5	10	20	40
PMO#1	0,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,90	1,40 $\pm$ 1,22	3,39 $\pm$ 1,13	6,83 $\pm$ 1,06	11,98 $\pm$ 1,58
PPMO#1	2,64 $\pm$ 0,41	4,69 $\pm$ 0,77	8,43 $\pm$ 0,81	14,00 $\pm$ 2,93	24,71 $\pm$ 3,41	40,46 $\pm$ 4,44

Exemplul 9: Omiterea exonului 45 *in vitro* (Miotuburi)

Doi compuși care țintesc exonul 45 în distrofina umană (*DMD*) așa cum este descris în tabelul de mai jos, PMO#1 și PPMO#1, ambele conținând aceeași secvență, au fost evaluate pentru omiterea exonului 45 în *DMD*, în miotuburi umane sănătoase.

5 **Secvențe ale PMO#1 și PPMO#1 pentru exonul 45 în *DMD* uman [0263]**

Denumire	Secvență de țintire (TS)	TS SECV ID NR.	5'	3'
PMO#1	CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG	1	EG3	H
PPMO# 1	CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG	1	EG3	-G-R ₆

În mod specific, mioblastele umane sănătoase (etapele 5-6, SKB-F-SL achiziționat de la Zen-Bio, Inc.) au fost cultivate pentru a atinge o confluență de 80-90% în mediul SKM-M înainte de inițierea diferențierii prin incubare în medii cu ser puțin. (SKM-D, Zen-Bio, Inc.). La cinci zile după diferențiere, miotuburile mature au fost incubate cu compuși de mai sus la diferite concentrații (adică, 40 μ m, 20 μ m, 10 μ m, 5 μ m, 2,5 μ m și 1,25 μ m). După nouăzeci și șase de ore de incubare, miotuburile au fost spălate cu PBS și au fost lizate cu tampon de liză RA1 în kit-ul Illustra GE RNAspin 96 (Cat#25-055-75, GE Healthcare Bio-Sciences). ARN-ul total a fost izolat conform recomandării producătorului, cu excepția faptului că au fost folosiți 40 μ L de apă fără RNază pentru eluarea ARN.

Pentru a determina omiterea exonului 51 cu ambii compuși, a fost efectuată RT-PCR finală în două etape. În mod specific, unsprezece microlitri de ARN total au fost mai întâi transcriși invers la cADN prin kitul de sinteză SuperScript IV First-strand (Cat#18091200, Invitrogen) folosind hexameri aleatori conform instrucțiunilor producătorului. PCR a fost efectuată prin adăugarea a 9 μ L de ADNc în Platinum Taq DNA polymerase PCR Supermix High Fidelity (Cat#12532024, Invitrogen) cu primeri care țintesc exonii 43 și 46 în *DMD* umană [primer direct (SECV ID NR: 7): CTACAGGAAGCTCTCTCCCAG; primer invers (SECV ID NR: 8): GTTATCTGCTTCCTCCAACCA]. Amplificarea PCR a fost efectuată utilizând un termociclor BioRad CFX96 în timp real utilizând programul prezentat în tabelul de mai jos. Expresia produselor PCR omise sau care nu au fost omise a fost evaluată prin încărcarea a 32 μ L de produs PCR pe sistemul LabChip GX utilizând kitul de reactiv de înaltă sensibilitate ADN (CLS760672, Perkin Elmer). Procent de omitere a exonului 45 în *DMD* a fost calculată ca procent de molaritate (nmol/l) pentru banda omisă a exonului 45 (301 bp) în comparație cu suma molarității pentru benzile omise (301 bp) și care nu au fost omise (477 bp).

Testul t Student nepereche cu două cozi (homoscedastic) a fost utilizat pentru a evalua dacă mediile celor 2 grupuri sunt diferite statistic una de cealaltă la fiecare doză. Valoarea $p < 0,05$ a fost considerată semnificativă statistic.

35 **Programul termociclor folosit pentru amplificarea ampliconilor în *DMD*, cu sau fără omiterea exonului 45.**

Etapă	Temperatura	Timp
1. Denaturare	94 °C	2 min
2. Denaturare	94 °C	30 sec
3. Aliniere	59,3 °C	30 sec
4. Prelungire	68 °C	1 min
5. Repetarea pașilor 2-4	34 cicluri	
6. Prelungire finală	68 °C	5 min
7. Depozitare	4 °C	∞

Rezultatele, care arată că PPMO#1 crește semnificativ omiterea exonului 45 în *DMD*, în comparație cu PMO#1, sunt prezentate în tabelul de mai jos și în Figura 20.

40 **Procent de omitere a exonului 45 în *DMD*, cu PMO#1 și PPMO#1, în miotuburi umane.**

Compus/ Doză (μ m)	Procent de omitere a exonului (medie $\pm$ SD)					
	1,25	2,5	5	10	20	40

Compus/ Doză (μm)	Procent de omitere a exonului (medie ± SD)					
	1,25	2,5	5	10	20	40
PMO#1	0,90±0,57	1,08±0,30	1,69±0,53	3,10±0,77	4,64±3,10	10,02±6,83
PPMO# 1	4,54±1,06	12,79±3,23	25,65±8,42	37,17±5,74	58,29±17,16	73,51±3,82

REFERINȚE

- Aartsma-Rus, A., A. A. Janson, și colab. (2004). "Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense." *Am J Hum Genet* 74(1): 83-92.
- Abes, R., și colab. (2008). "Arginine-rich cell penetrating peptides: design, structure-activity, and applications to alter pre-mRNA splicing by steric-block oligonucleotides." *J Pept. Sci.* 14: 455-460.
- Alter, J., și colab. (2006). "Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology." *Nat. Med.* 12(2): 175-177.
- Bestas, B., și colab. (2014). "Splice-correcting ligonucleotides restore BTK function in X-linked agammaglobulinemia model." *J. Clin. Invest.*
- Cirak, S., V. Arechavala-Gomez, și colab. (2011). "Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study." *Lancet* 378(9791): 595-605.
- Dunckley, M. G., I. C. Eperon, și colab. (1997). "Modulation of splicing in the DMD gene by antisense oligoribonucleotides." *Nucleosides & Nucleotides* 16(7-9): 1665-1668.
- Dunckley, M. G., M. Manoharan, și colab. (1998). "Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured Mdx muscle cells by antisense oligoribonucleotides." *Hum Mol Genet* 7(7): 1083-90.
- Errington, S. J., C. J. Mann, și colab. (2003). "Target selection for antisense oligonucleotide induced exon skipping in the dystrophin gene." *J Gene Med* 5(6): 518-27.
- Goemans, N. M., M. Tulinius, și colab. (2011). "Systemic Administration of PR0051 in Duchenne's Muscular Dystrophy." *N Engl J Med*.
- Jearawiriyapaisarn, N., H. M. Moulton, și colab. (2008). "Sustained Dystrophin Expression Induced by Peptide-conjugated Morpholino Oligomers in the Muscles of mdx Mice." *Mol Ther*.
- Jearawiriyapaisarn, N., și colab. (2010). "Long-term improvement in mdx cardiomyopathy after therapy with peptide-conjugated morpholino oligomers." *Cardiovascular Research* 85: 444-453.
- Kinali, M., V. Arechavala-Gomez, și colab. (2009). "Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study." *Lancet Neurol* 8(10): 918-28.
- Lebluc, B., și colab. (2008). "Cell penetrating peptide conjugates of steric block oligonucleotides." *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60: 517-529.
- Lu, Q. L., C. J. Mann, și colab. (2003). "Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse." *Nat Med* 9(8): 1009-14.
- Mann, C. J., K. Honeyman, și colab. (2002). "Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy." *J Gene Med* 4(6): 644-54.
- Marshall, N. B., S. K. Oda, și colab. (2007). "Arginine-rich cell-penetrating peptides facilitate delivery of antisense oligomers into murine leukocytes and alter pre-mRNA splicing." *Journal of Immunological Methods* 325(1-2): 114-126.
- Matsuo, M., T. Masumura, și colab. (1991). "Exon skipping during splicing of dystrophin mRNA precursor due to an intraexon deletion in the dystrophin gene of Duchenne muscular dystrophy kobe." *J Clin Invest* 87(6): 2127-31.
- McClory, G., și colab. (2006). "Antisense oligonucleotide-induced exon skipping restored dystrophin expression in vitro in a canine model of DMD." *Gene Therapy* 13: 1373-1381.
- Monaco, A. P., C. J. Bertelson, și colab. (1988). "An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus." *Genomics* 2(1): 90-5.
- Moulton, H.M., (2007). "Cell-penetrating peptide-morpholino conjugates alter pre-mRNA splicing of DMD (Duchenne muscular dystrophy) and inhibit murine coronavirus replication in vivo." *Biochem. Society Trans* 35(4): 826-828.
- Pramono, Z. A., Y. Takeshima, și colab. (1996). "Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence." *Biochem Biophys Res Commun* 226(2): 445-9.
- Sazani, P., R. Kole, și colab. (2007). Splice switching oligomers for the TNF superfamily receptors and their use in treatment of disease. PCT WO2007058894, University of North Carolina
- Sierakowska, H., M. J. Sambade, și colab. (1996). "Repair of thalassemic human beta-globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(23): 12840-4.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

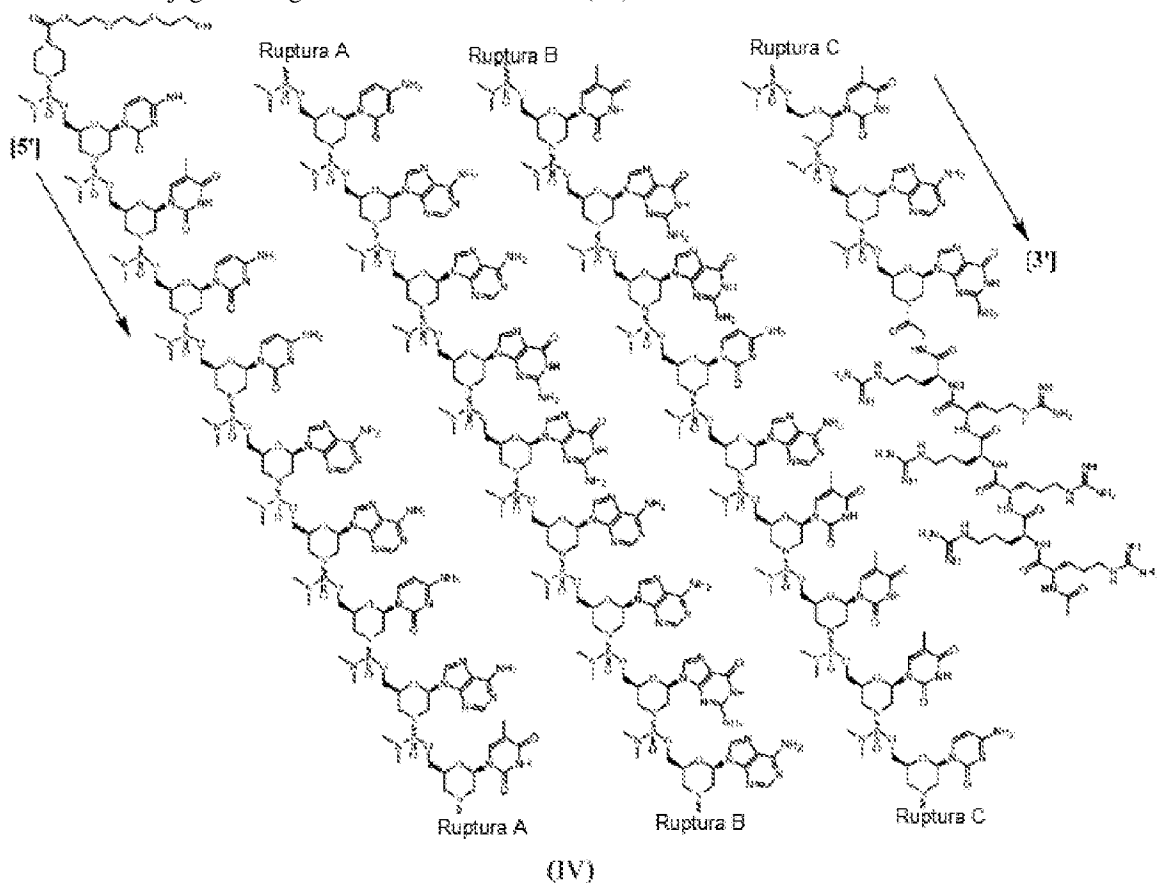
Youngblood, D., și colab. (2006). "Stability of cell-penetrating peptide- morpholino oligomer conjugates in human serum and in cells." *Am. Chem. Soc.*

LISTA DE SECVENȚE

Descriere	Secvența 5' până la 3' sau capătul N până la capătul C	SECV ID NR
H45A(-03+19)	CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG	1
Mdx4225	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	2
R6	RRRRRR	3
R ₆ -G	RRRRRRG	4
Primer direct de legare a exonului 23 de șoarece	CACA TCTTTGA TGGTGTGAGG	5
Primer invers de legare a exonului 23 de șoarece	CAACTTCAGCCATCCATTTCTG	6
Primer direct de legare a exonului 45 uman	CTACAGGAAGCTCTCTCCCAG	7
Primer invers de legare a exonului 45 uman	GTTATCTGCTTCCTCCAACCA	8

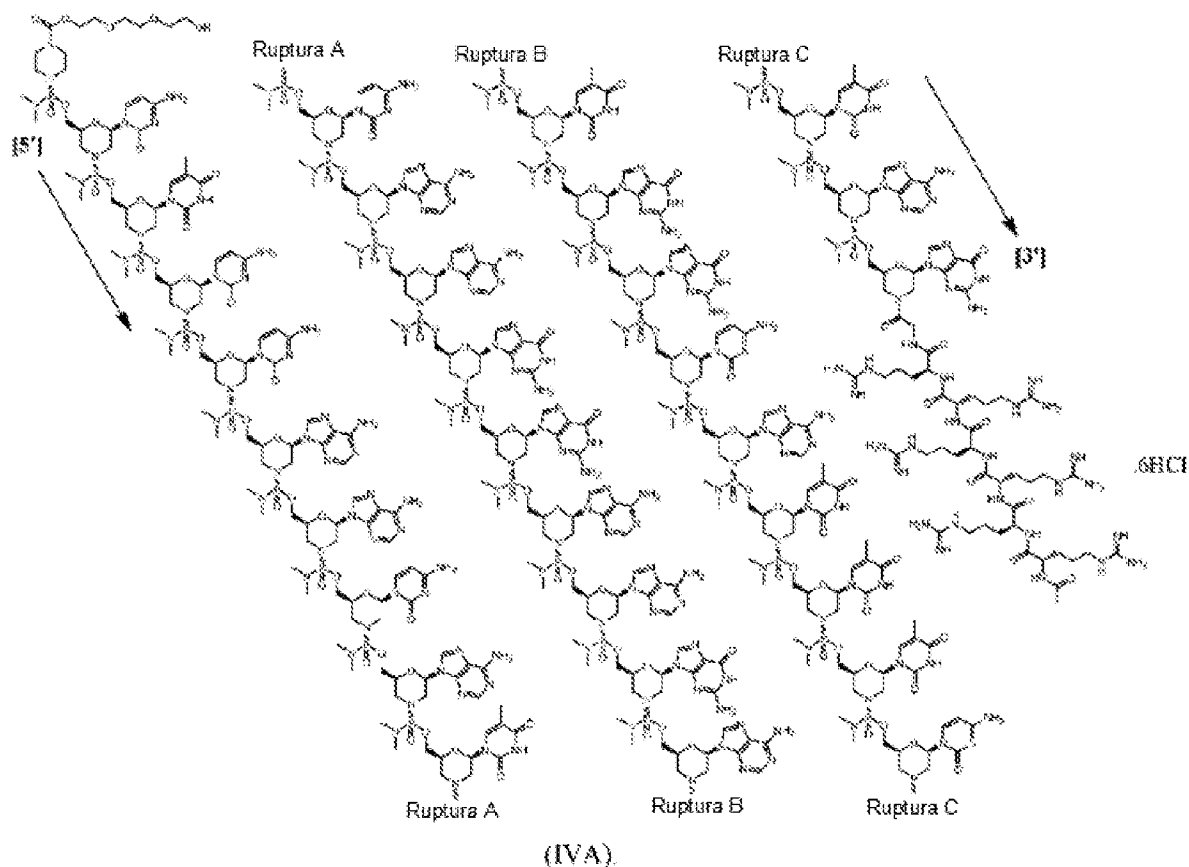
(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- WO-A1-2010/048586
- WO-A1-2012/150960
- WO-A2-2014/153220
- WO-A2-2017/062835

(57) Revendicări:**1. Conjugat de oligomer antisens cu Formula (IV):**

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

2. Conjugat de oligomer antisens din revendicarea 1, în care oligomerul antisens are Formula (IVA):



3. Compoziție farmaceutică, care cuprinde un conjugat de oligomer antisens din revendicarea 1 sau 2, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia și un purtător acceptabil farmaceutic.

4. Conjugat de oligomer antisens sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia din revendicarea 1 sau 2, pentru utilizare în terapie.

5. Conjugat de oligomer antisens sau sare acceptabilă farmaceutic a acestuia din revendicarea 1 sau 2, sau compoziția farmaceutică din revendicarea 3, pentru utilizare în tratarea distrofiei musculare Duchenne (DMD) la un subiect care are nevoie de aceasta, în care subiectul are o mutație a genei distrofinei care este susceptibilă de omitere a exonului 45.

6. Conjugat de oligomer antisens sau sare acceptabilă farmaceutic a acestuia din revendicarea 1 sau 2, sau compoziția farmaceutică din revendicarea 3, pentru utilizare în restabilirea unui cadru de citire a ARNm pentru a induce producția de distrofină la un subiect care are o mutație a genei distrofinei care este susceptibilă de omitere a exonului 45.

7. Conjugat de oligomer antisens sau compoziția farmaceutică, pentru utilizare conform revendicării 5 sau revendicării 6, în care utilizarea cuprinde administrarea conjugatului de oligomer antisens săptămânal.

8. Conjugat de oligomer antisens sau compoziția farmaceutică, pentru utilizare conform revendicării 5 sau revendicării 6, în care utilizarea cuprinde administrarea conjugatului de oligomer antisens la două săptămâni.

9. Conjugat de oligomer antisens sau compoziția farmaceutică, pentru utilizare conform revendicării 5 sau revendicării 6, în care utilizarea cuprinde administrarea conjugatului de oligomer antisens la fiecare trei săptămâni.

10. Conjugat de oligomer antisens sau compoziția farmaceutică, pentru utilizare conform revendicării 5 sau revendicării 6, în care utilizarea cuprinde administrarea lunară a conjugatului de oligomer antisens.

11. Compoziția farmaceutică din revendicarea 3, pentru utilizare în excluderea exonului 45 din pre-ARNm de distrofina în timpul prelucrării ARNm-ului la un subiect care are o mutație a genei distrofinei care este susceptibilă de omitere a exonului 45.

12. Compoziția farmaceutică din revendicarea 3, pentru utilizare în legarea exonului 45 al pre-ARNm de distrofina la un subiect care are o mutație a genei distrofinei care este susceptibilă de omitere a exonului 45.

Figura 1

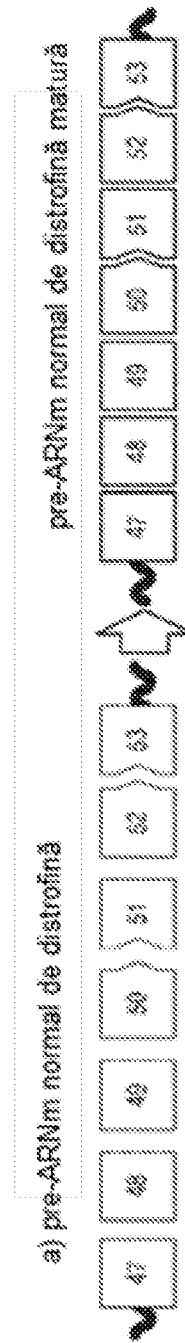
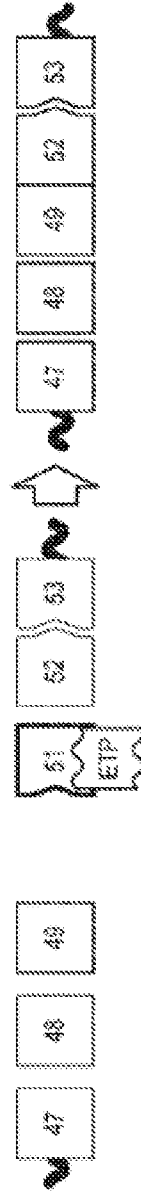


Figura 2



Figura 3

c) Omiterea exonului 51 restabilește cadrul de citire



Sursă: adaptat după Kole 2012

Figura 4B

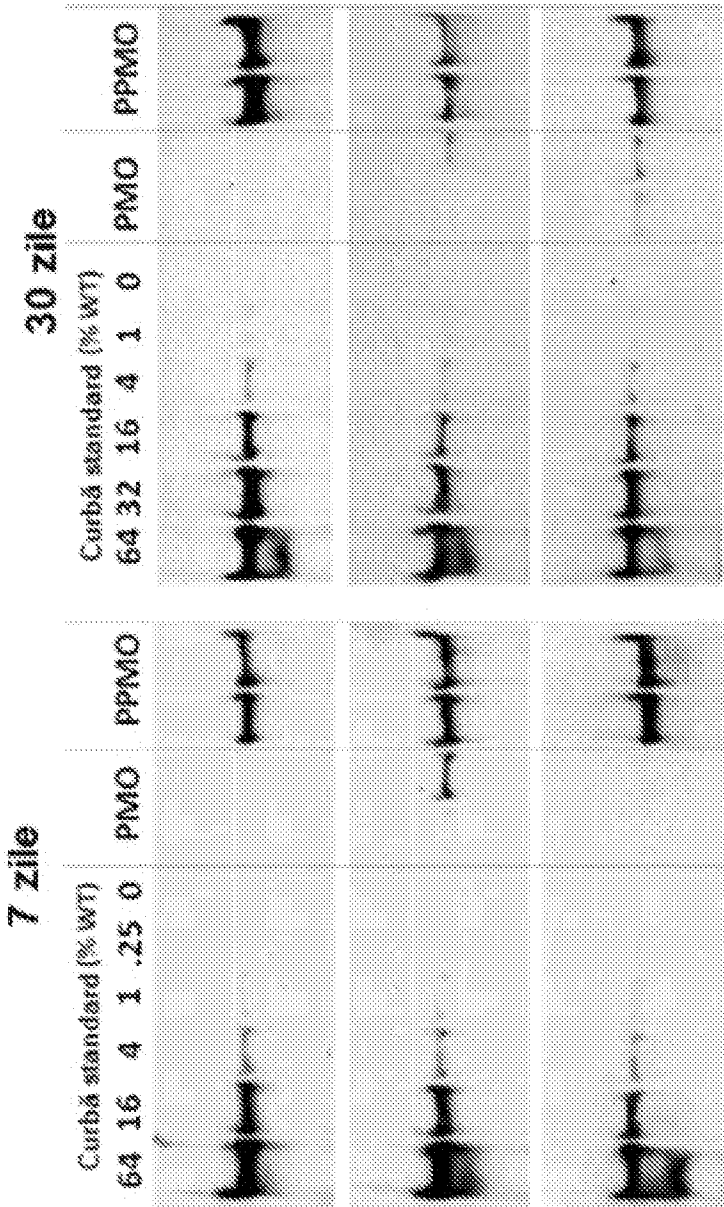


Figura 4D

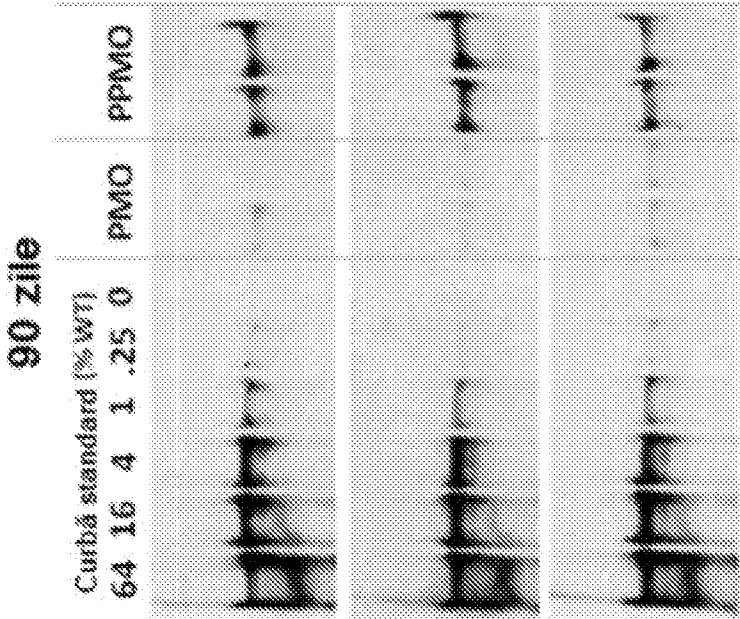


Figura 4C

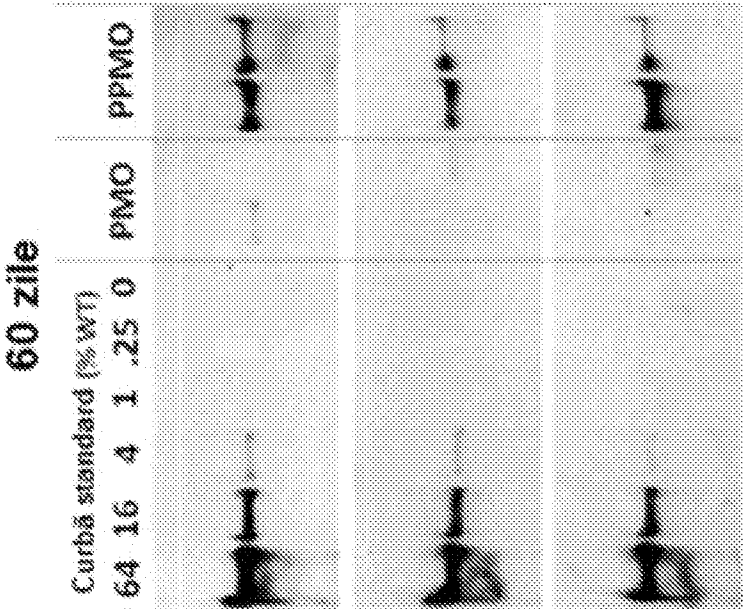


Figura 5A

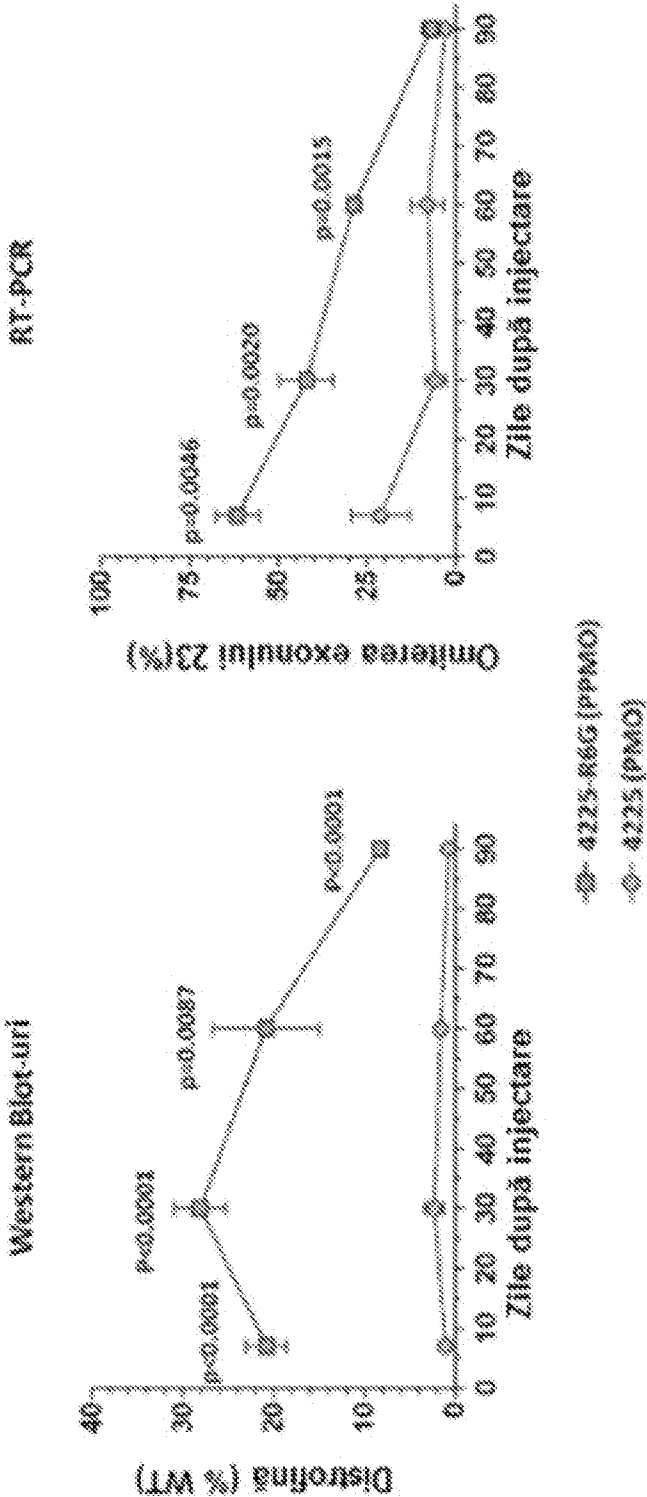


Figura 5B

Figure 6A

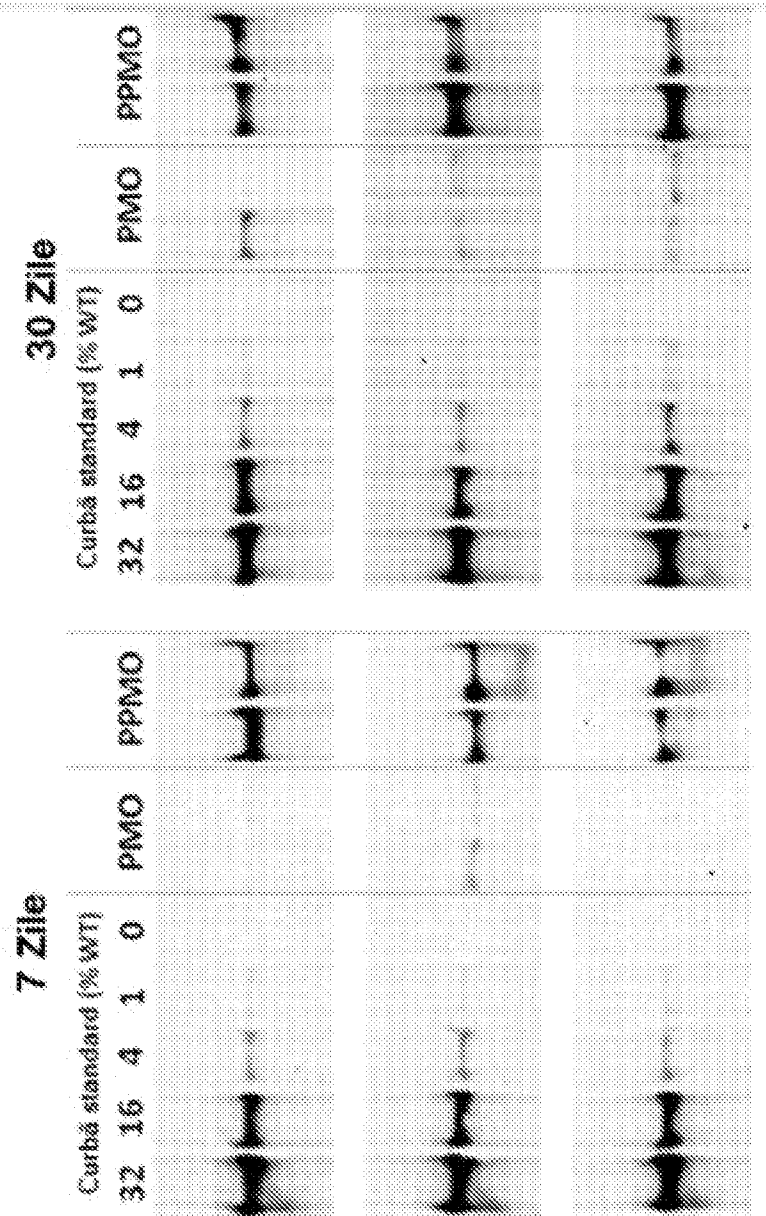


Figura 6D

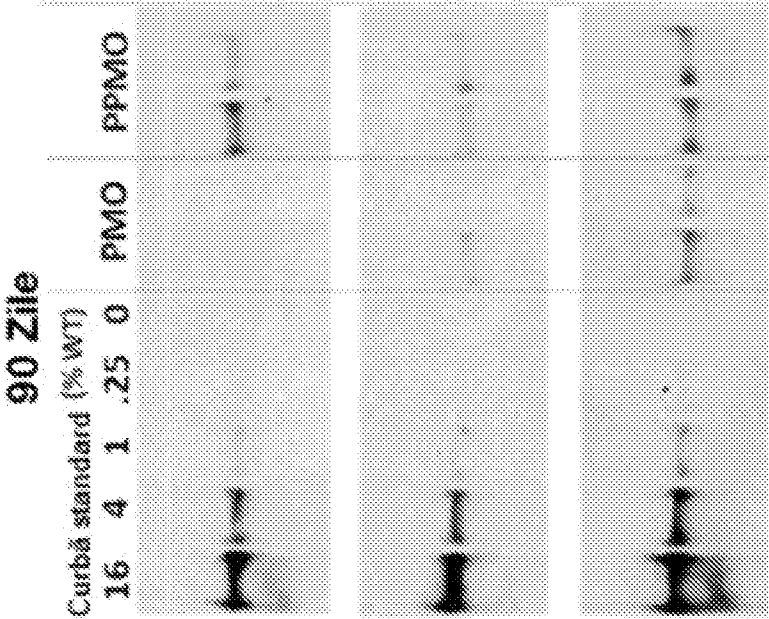


Figura 6C

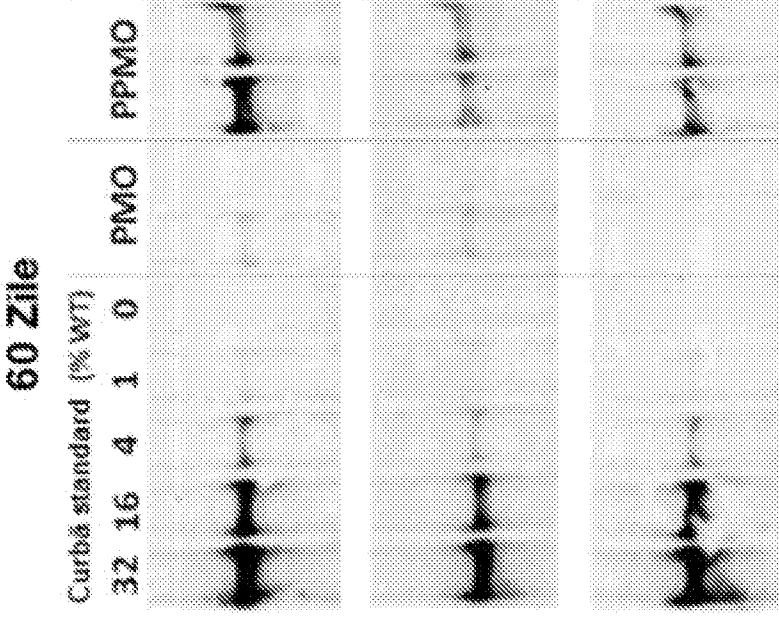


Figura 7A

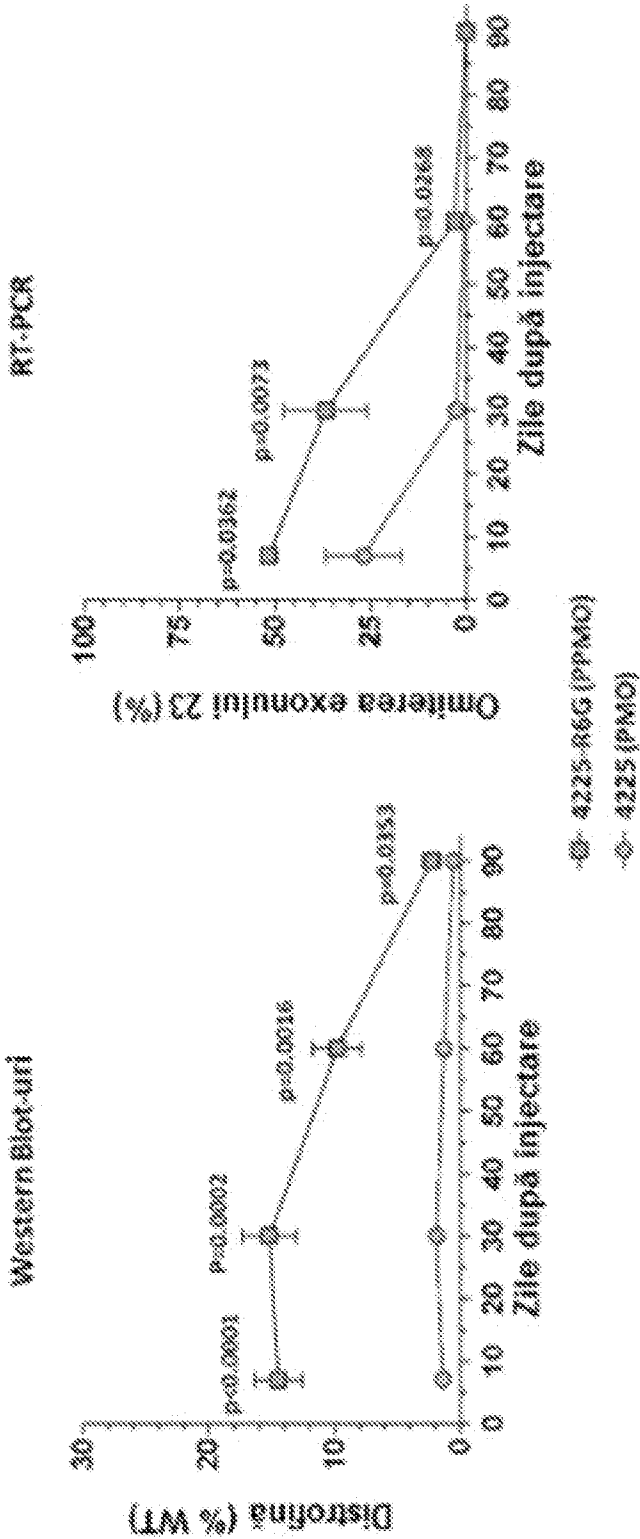


Figura 7B

Figura 8B

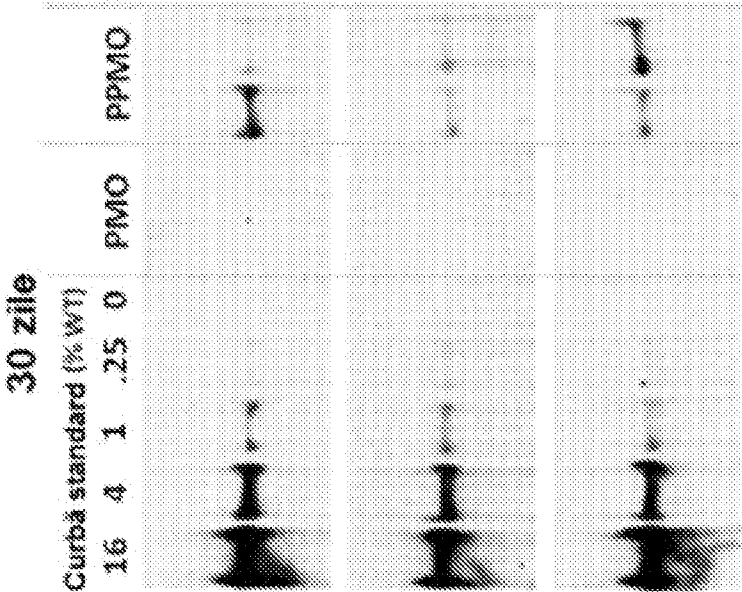
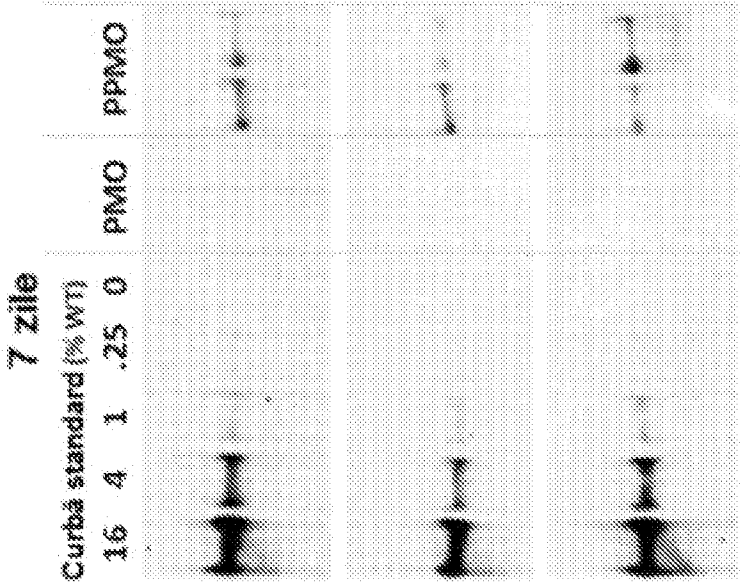


Figura 8A



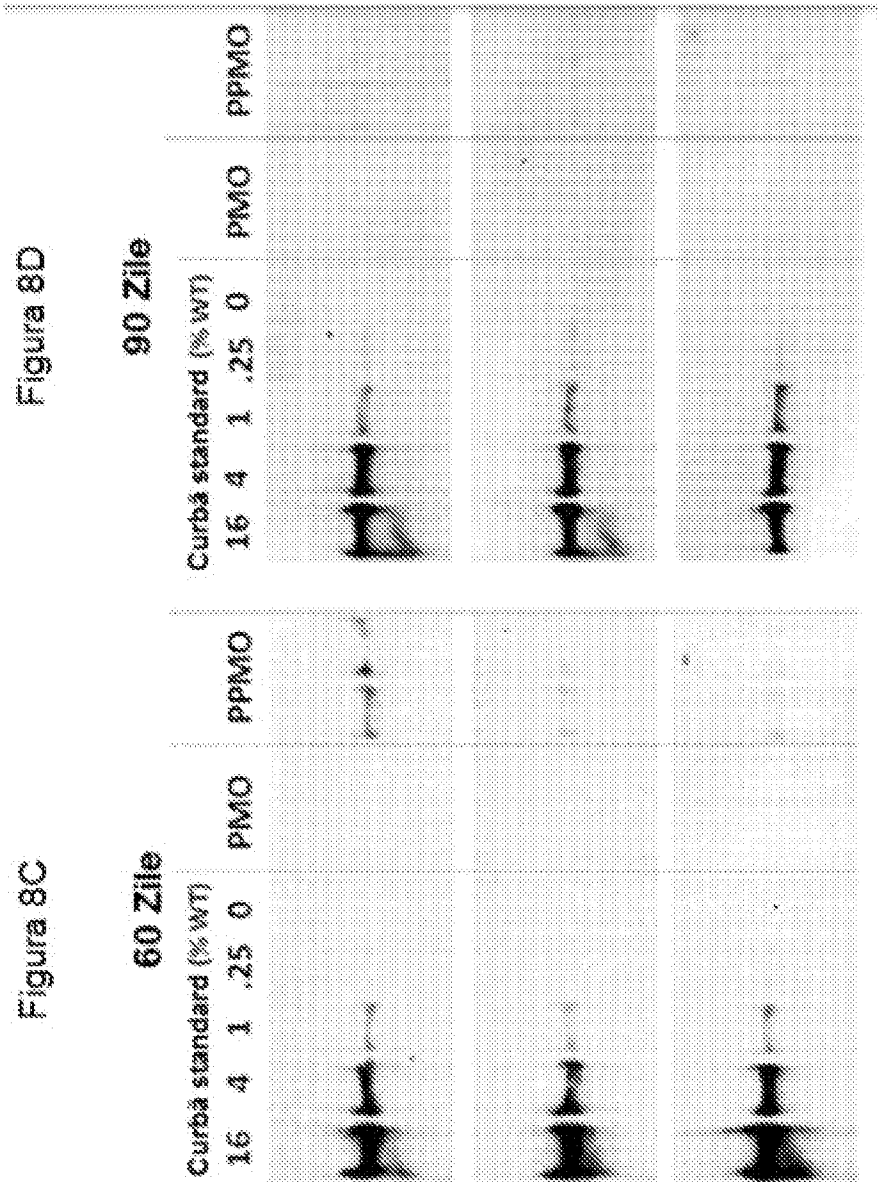


Figura 9A

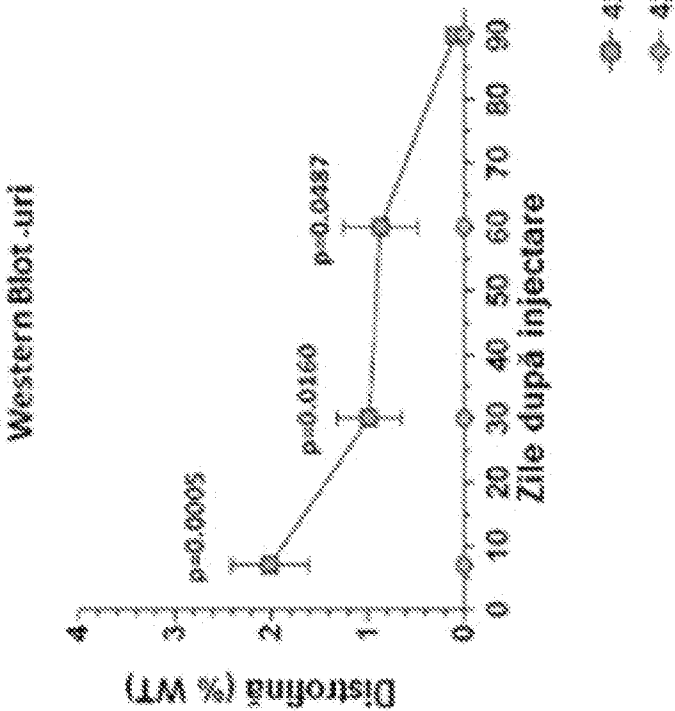


Figura 9B

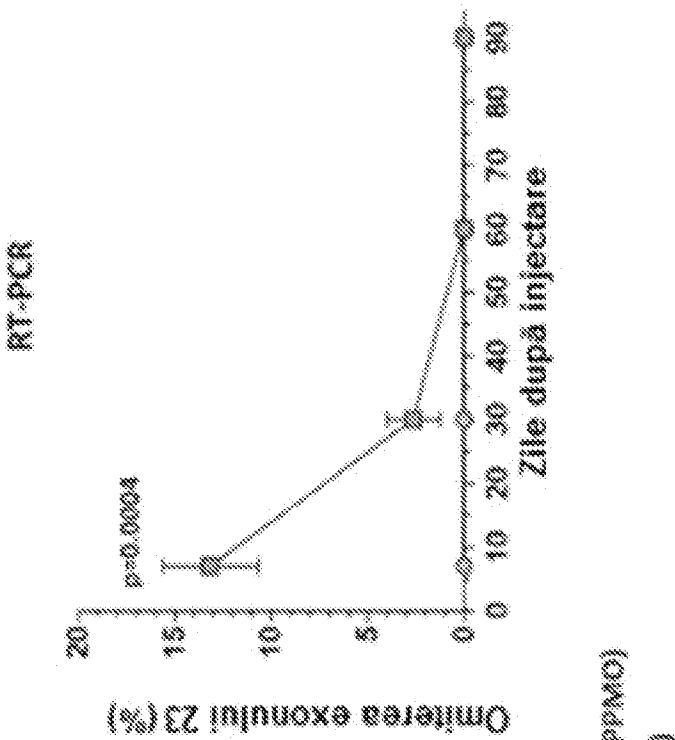


Figura 10

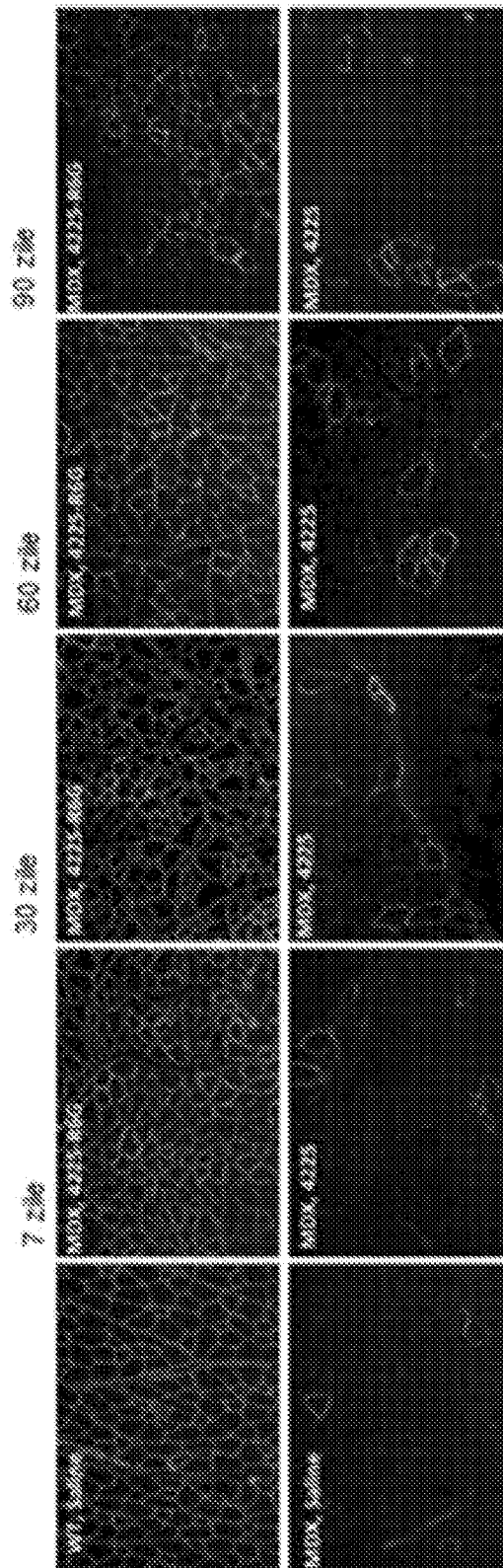


Figura 11B

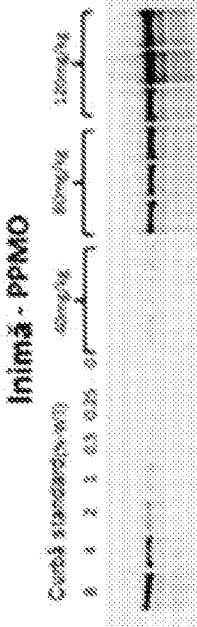


Figura 11A

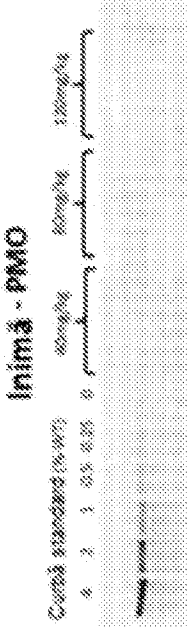


Figure 12

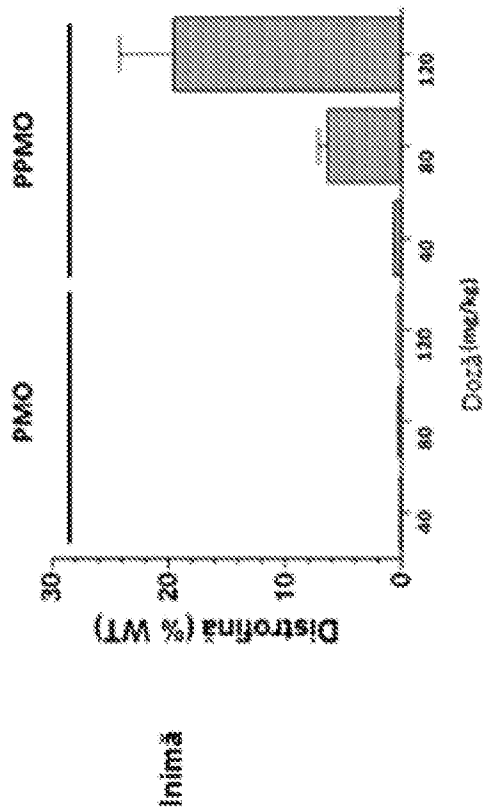


Figura 13A

Diafragmă - PMO



Figura 13B

Diafragmă - PMO



Figura 14

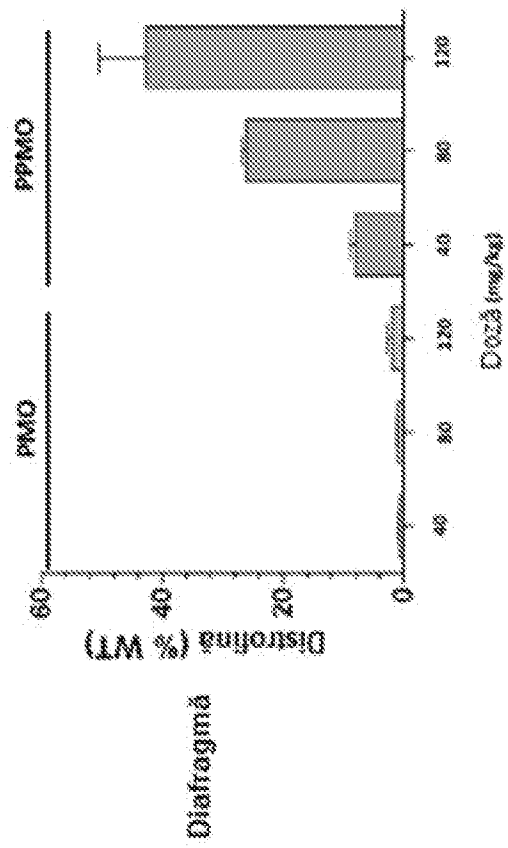


Figura 15A

Cvadriiceps - pPMO



Figura 15B

Cvadriiceps - pMO

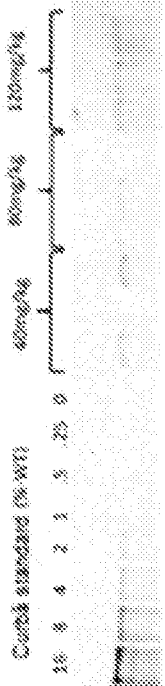
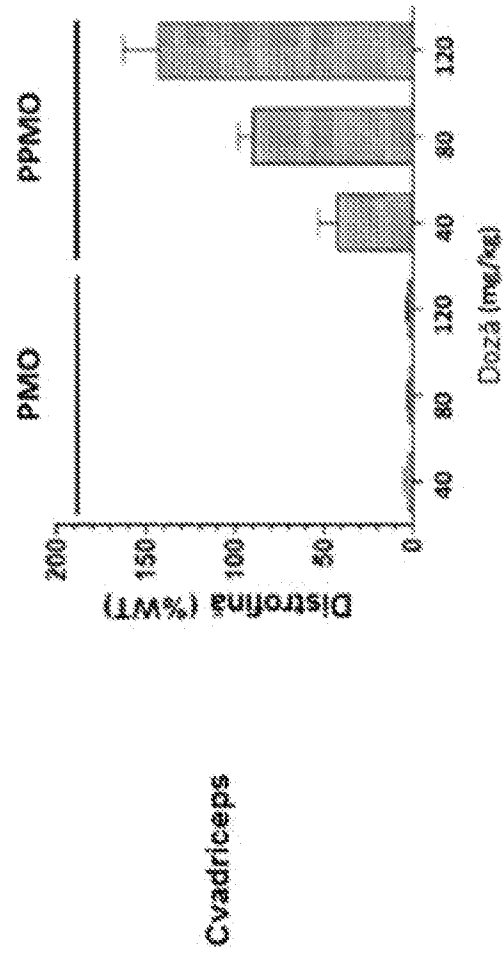


Figura 16



Ciclu Nr.: Sub- unitate (SU)	Tratament înainte de cuplare				Ciclu de cuplare		Tratament după cuplare	
	1	2	3	4			1	2
	Spălare cu 30% TFE/DCM	Soluție ¹ CYFTA	Soluție de neutralizare	Spă- lare cu DCM	Cantitate SU (g) NEM (L) DMI (L)	Timp de cuplare la RT (ore)	Spă- lare cu DCM	Spălare cu 30% TFE/DCM
1:C	5.5L	a) 5.5L b) 5.5L, 122ml	3x5.5L	5.5L	584g; 195 ml NEM; 3.2L DMI	5	5.5L	2x5.5L
2:A	7.0L	a) 7L b) 7L, 158ml	3x7L	2x7L	592.2g și 195ml NEM 3.2L DMI	4.25	7L	2x7L
3:A	8L	a) 8L b) 8L, 182ml	3x8L	2x8L	592.2g; 195ml NEM; 3.4L DMI	4.25	8L	2x8L
4:T	9L	a) 9L b) 9L, 206ml	3x9L	2x9L	514.2g; 195ml NEM; 3.6L DMI	4.25	9L	2x9L
5:G	9.5L	a) 9.5L b) 9.5L, 220ml	3x9.5L	2x9.5L	755.5g; 195ml NEM; 3.4L DMI	4.25	9.5L	2x9.5L
6:C	10L	a) 10L b) 10L, 232ml	3x10L	2x10L	584.4g; 195ml NEM; 3.45L DMI	4.25	10L	2x10L
7:C	11L	a) 11L b) 11L, 256ml	3x11L	2x11L	584.5g; 195ml NEM; 3.57L DMI	4.25	11L	2x11L
8:A	11L	a) 11L b) 11L, 256ml	3x11L	2x11L	592.5g; 195ml NEM; 3.64L DMI	4.25	11L	2x11L
9:T	11.5L	a) 11.5L b) 11.5L, 268ml	3x11.5L	2x 11.5L	514.5g; 195ml NEM;	4.25	11.5L	2x11.5L

Figura 17

¹ml indică cantitatea de NEM/DCM 1:1

Cich Nr.: Sub- unitate (SU)	Tratament înainte de cuplare				Cich de cuplare		Tratament după cuplare	
	1	2	3	4	Cantitate SU (g) NEM (L) DMI (L)	Timp de cuplare la RT (ore)	1	2
	Spălare cu 30% TFE/DCM	Soluție ¹ CYFTA	Soluție de neutralizare	Spă- lare cu DCM			Spă- lare cu DCM	Spălare cu 30% TFE/DCM
					3.72L DMI			
10:C	12L	a) 12L b) 12L, 280ml	3x12L	2x12L	338.5g; 195ml NEM; 3.96L DMI	4.25	12L	2x12L
11:C	13.5L	a) 13.5L b) 13.5L, 204ml	3x13.5L	2x 13.5L	770.4g; 253ml NEM; 4.02L DMI	4.25	13.5L	2x13.5L
12:T	13.5L	a) 13.5L b) 13.5L, 204ml	3x13.5L	2x 13.5L	668.7g; 253ml NEM; 4.02L DMI	4.25	13.5L	2x13.5L
13:DPG	14L	a) 14L b) 14L, 216ml	3x14L	2x14L	982.3g; 253ml NEM; 4.02L DMI	4.25	14L	2x14L
14:DPG	14.5L	a) 14.5L b) 14.5L, 228ml	3x14.5L	2x 14.5L	982.3g; 253ml NEM; 4.1L DMI	4.25	14.5L	2x14.5L
15:A	15.5L	a) 15.5L b) 15.5L, 254ml	3x15.5L	2x 15.5L	770.1g; 253ml NEM; 4.26L DMI	4.25	15.5L	2x15.5L
16:DPG	15.5L	a) 15.5L b) 15.5L, 254ml	3x15.5L	2x 15.5L	982.4g; 253ml NEM; 4.26L DMI	4.25	15.5L	2x15.5L
17:T	16L	a) 16L b) 16L, 366ml	3x16L	2x16L	549.6g; 253ml NEM;	4.75	16L	2x16L

Figura 17 (continuare)

Cichu Nr.: Sub- unitate (SU)	Tratament înainte de cuplare				Cichu de cuplare		Tratament după cuplare	
	1	2	3	4	Cantitate SU (g) NEM (L) DMI (L)	Timp de cuplare la RT (ore)	1	2
	Spălare cu 30% TFE/DCM	Soluție ¹ CYFTA	Soluție de neutralizare	Spă- lare cu DCM			Spă- lare cu DCM	Spălare cu 30% TFE/DCM
					4,4L DMI			
18:T	16.5L	a) 16.5L b) 16.5L, 378ml	3x16.5L	2x 16.5L	630.7g; 253ml NEM; 4,4L DMI	4.25	16.5L	2x16.5L
19:C	16.5L	a) 16.5L b) 16.5L, 378ml	3x16.5L	2x 16.5L	770.4g; 253ml NEM; 4,57L DMI	4.25	16.5L	2x16.5L
20:C	17L	a) 17L b) 17L, 390ml	3x17L	2x17L	770.4g; 253ml NEM; 4,57L DMI	4.75	17L	2x17L
21:T	17L	a) 17L b) 17L, 390ml	3x17L	2x17L	776.4g; 311ml NEM; 4,72L DMI	4.25	17L	2x17L
22:DPG	17.5L	a) 17.5L b) 17.5L, 402ml	3x17.5L	2x 17.5L	1208.7g; 311ml NEM; 4,72L DMI	4.75	17.5L	2x17.5L

Figura 17 (continuare)

Figura 18

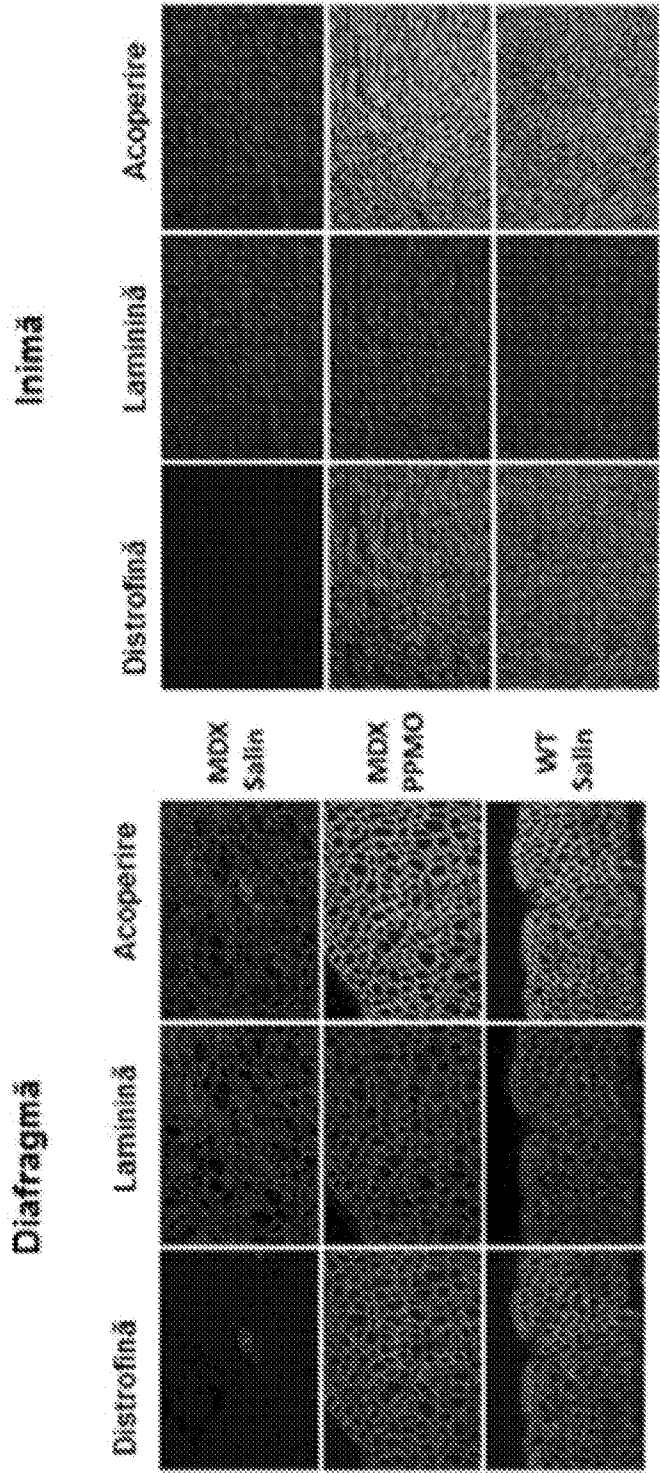


Figura 19

