



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120849** (13) **C2**  
(51) МПК

**C12N 15/113** (2010.01)  
**A61K 31/711** (2006.01)  
**A61K 31/712** (2006.01)  
**A61K 31/7125** (2006.01)  
**A61P 21/04** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ  
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА  
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: <b>а 2016 10167</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>11.03.2015</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>25.02.2020</b></p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>2014-048897</b></p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>12.03.2014</b></p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>JP</b></p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: <b>12.12.2016, Бюл.№ 23</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.02.2020, Бюл.№ 4</b></p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>PCT/JP2015/057180, 11.03.2015</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Вакаяма Татсуші (JP),</b> <b>Сео Харуна (JP),</b> <b>Сатоу Юхеї (JP),</b> <b>Такеда Сініті (JP),</b> <b>Нагата Тетсуя (JP)</b></p> <p>(73) Власник(и): <b>НІППОН ШИН'ЯКУ КО., ЛТД.,</b> 14, Kisshoin Nishinosho Monguchicho, Minami-ku, Kyoto-shi, Kyoto 601-8550, Japan (JP), <b>НЕШЕНЕЛ СЕНТЕР ОФ НЬЮРОЛЕДЖІ ЕНД</b> <b>САЙКАІЕТРІ,</b> 1-1, Ogawahigashi-cho 4-chome, Kodaira-shi, Tokyo 187-8551, Japan (JP)</p> <p>(74) Представник: <b>Шамріна Олена Олексіївна, реєстр. №141</b></p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: De Angelis F. G. et al. Chimeric snRNA molecules carrying antisense sequences against the splice junctions of exon 51 of the dystrophin pre-mRNA induce exon skipping and restoration of a dystrophin synthesis in delta 48-50 DMD cells. Proceedings of the national academy of science, 2002, vol. 99, no. 14, p. 9456-9461 JP 2012506703 A, 22.03.2012 WO 2012029986 A1, 08.03.2012 Takashi Saito et al. Development of exon skipping therapy for duchenne muscular dystrophy using patient-derived cells. Japanese Journal of clinical pharmacology and therapeutics, 2012, vol. 43, no. 2, p. 91-92 WO 2004048570 A1, 10.06.2004 JP 2004509622 A, 02.04.2004 JP 2012506697 A, 22.03.2012 US 20100168212 A1, 01.07.2010 JP 2013530154 A, 25.07.2013 WO 2012150960 A1, 08.11.2012 Cirak S. et al. Exon skipping and dystrophin restoration in patients with duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatments: an open-label, phase 2, dose-escalation study. Lancet, 2011, vol. 378, no. 9791, p. 595-605 WO 2010048586 A1, 29.04.2010 WO 2011154427 A1, 15.12.2011 Incitti T. et al. Exon skipping and duchenne muscular dystrophy therapy: selection of the most active U1 snRNA antisense able to induce dystrophin exon 51 skipping. Molecular therapy, 2010, vol. 18, no. 9, p. 1675-1682 Arechavala-Gomez V. et al. Comparative analysis of antisense oligonucleotide sequences for targeted skipping of exon 51 during dystrophin pre-mRNA splicing in human muscle. Human gene therapy, 2007, vol. 18, no. 9, p. 798-810 Aoki Y. et al. In-frame dystrophin following exon 51-skipping improves muscle pathology and function in the exon 52-deficient mdx mouse. Molecular therapy, 2010, vol. 18, no. 11, p. 1995-2005</p>
--	--

## (54) АНТИСЕНСОВИЙ ОЛІГОМЕР

UA 120849 C2

---

**(57) Реферат:**

Винахід стосується антисенсового олігонуклеотиду або його фармацевтично прийнятної солі або гідрату, який має активність, щоб викликати пропуск 51-ого екзону в гені дистрофіну людини. Винахід також стосується фармацевтичної композиції, що містить як активний інгредієнт даний антисенсовий олігомер, способу лікування м'язової дистрофії та застосування антисенсового олігомера у виробництві фармацевтичної композиції для лікування м'язової дистрофії.

Галузь техніки

Представлений винахід стосується антисенсового олігомери, який викликає пропуск екзона 51 в гені дистрофіна людини, та фармацевтичної композиції, яка містить олігомер.

#### ПЕРЕДУМОВИ СТВОРЕННЯ ВИНАХОДУ

М'язова дистрофія Дюшенна (DMD) є найбільш частою формою спадкової прогресуючої м'язової дистрофії, яка вражає одного з приблизно 3 500 новонароджених хлопчиків. Хоча моторні функції в них рідко відрізняються від здорових людей в немовлячтві та дитинстві, м'язова слабкість спостерігається у таких дітей в віці від близько 4 до 5 років. Потім м'язова слабкість прогресує та призводить до втрати здатності пересуватися у віці приблизно 12 років та смерті через серцеву або дихальну недостатність у віці двадцяти років та старше. DMD є таке важке захворювання. На даний час, не існує ефективної терапії щодо існуючого DMD, тому дуже необхідним є розробити новий терапевтичний агент.

DMD як відомо, є обумовленою мутацією в гені дистрофіна. Ген дистрофіна знаходиться на Х-хромосомі та представляє собою величезний ген, що складається з 2,2 мільйона пар нуклеотидів ДНК. ДНК транскрибується в попередники мРНК, та інтрони видаляються шляхом сплайсингу, щоб синтезувати мРНК з 11 058 основ, в яких 79 екзонів з'єднуються один з одним. Дана мРНК транслюється в 3 685 амінокислот, продукуючи протеїн дистрофіну. Протеїн дистрофіну пов'язують зі збереженням стабільності мембран в м'язових клітинах та з необхідністю робити м'язові клітини менш ламкими. Ген дистрофіна у пацієнтів з DMD містить мутацію та, таким чином, протеїн дистрофіну, який є функціональним в клітинах м'язів, рідко експресується. Таким чином, структура м'язових клітин не може підтримуватися в організмі пацієнтів, які страждають на DMD, що призводить до великого надходження іонів кальцію в м'язові клітини. Внаслідок цього, відбувається реакція подібна до запалення, що сприяє фіброзу таким чином, що м'язові клітини можуть регенеруватися тільки з великими труднощами.

М'язова дистрофія Беккера (BMD) також спричиняється мутацією в гені дистрофіна. Симптоми включають слабкість м'язів, яка супроводжується атрофією м'язів, але, як правило, з помірним та повільним прогресуванням м'язової слабкості, в порівнянні з DMD. В багатьох випадках, його початок припадає на зрілий вік. Вважається, що відмінності в клінічних симптомах між DMD та BMD, які є властивими або рамці зчитування для амінокислот при трансляції мРНК дистрофіна в протеїн дистрофіну, перериваються мутацією або ні (не патентний документ 1). Більш конкретно, в DMD, наявність мутації зміщує рамку зчитування амінокислот таким чином, що експресія функціонального протеїну дистрофіну усувається, в той час як при BMD протеїн дистрофіну, який функціонує, хоча недосконало, продукується, оскільки зберігається амінокислотна рамка зчитування в той час як частина екзонів є видаленою мутацією.

Пропуск екзонів, як очікується, служить як спосіб лікування DMD. Даний спосіб включає модифікацію сплайсингу для відновлення амінокислотної рамки зчитування мРНК дистрофіну та індукування експресії протеїну дистрофіну, який має функцію частково відновленого (не патентний документ 2). Частина амінокислотної послідовності, яка є мішенню для пропуску екзона, буде втраченою. З цієї причини, протеїн дистрофіну, який експресується шляхом такої обробки стає коротшим, ніж звичайним протеїном, але оскільки амінокислотна рамка зчитування зберігається, функція стабілізації м'язових клітин частково зберігається. Внаслідок цього, очікується, що пропуск екзонів призводитиме DMD до симптомів, аналогічних до тих, що при BMD, яке є більш м'яким. Підхід щодо пропуску екзону пройшов дослідження на тваринах з використанням мишей або собак, та на даний момент поточно оцінюється в клінічних випробуваннях на пацієнтах-людях з DMD.

Пропуск екзону може бути індукованим шляхом зв'язування антисенсових нуклеїнових кислот, які націлені або на 5', або на 3' сплайс-сайт, або на обидва сайти, або на внутрішні сайти екзону. Екзон буде включеним тільки в мРНК, коли обидва їх сайти сплайсингу розпізнаються сплайсосомним комплексом. Таким чином, пропуск екзону може бути індукований націлюванням сайтів сплайсингу з антисенсовими нуклеїновими кислотами. Крім того, зв'язування протеїну SR з екзонним енхансером сплайсингу (ESE) вважається необхідним для того, щоб екзон розпізнавався механізмом сплайсингу. Відповідно, пропуск екзону також може бути індукований націлюванням ESE.

Оскільки мутація гена дистрофіна може варіюватися в залежності від пацієнтів з DMD, антисенсові нуклеїнові кислоти повинні бути розроблені на основі сайту або типу відповідної генетичної мутації. У минулому, антисенсові нуклеїнові кислоти, які індукують пропуск екзону для всіх 79 екзонів, були отримані Steve Wilton, et al., University of Western Australia (не патентний документ 3), та антисенсові нуклеїнові кислоти, які індукують пропуск екзону для 39 екзонів, були отримані Annemieke Aartsma-Rus, et al., Netherlands (не патентний документ 4).

Вважається, що приблизно 13 % всіх пацієнтів з DMD можуть лікуватися пропуском екзону 51 (далі в даному документі зазначається як "екзон 51"). В останні роки, безліч науково-дослідних організацій повідомляли про дослідження, в яких екзон 51 в гені дистрофіна був націлений на пропуск екзону (патентні документи 1-6; не патентні документи 5-6). Проте, методика пропуску екзона 51 з високою ефективністю до сих пір не встановлена.

#### ДОКУМЕНТ ПОПЕРЕДНЬОГО РІВНЯ ТЕХНІКИ

Патентний документ

Патентний документ 1: Міжнародна публікація WO 2004/048570

Патентний документ 2: Міжнародна публікація WO 2002/024906

Патентний документ 3: Міжнародна публікація WO 2010/048586

Патентний документ 4: Міжнародна публікація WO 2010/050801

Патентний документ 5: US 2010/0168212

Не патентний документ 1: Monaco A. P. et al., Genomics 1988; 2: p. 90-95

Не патентний документ 2: Matsuo M., Brain Dev 1996; 18: p. 167-172

Не патентний документ 3: Wilton S. D., et al., Molecular Therapy 2007: 15: p. 1288-96

Не патентний документ 4: Annemieke Aartsma-Rus et al., (2002) Neuromuscular Disorders 12: S71-S77

Не патентний документ 5: Aoki Y., et al., Molecular therapy 2010: 18: p.1995-2005

Не патентний документ 6: Nakano S., et al., Pediatr Int. 2011: 53: 524-429

#### РОЗКРИТТЯ ВІНАХОДУ

Проблеми, які вирішуються за допомогою винаходу

За зазначених вище обставин, потрібними є антисенсовий олігомери, які індукують пропуск екзону 51 в гені дистрофіна з високою ефективністю, та терапевтичні засоби для лікування м'язової дистрофії, які містять їх олігомери.

#### СПОСОБИ ВИРІШЕННЯ ПРОБЛЕМИ

В результаті детальних досліджень технічного змісту зазначених вище документів та структури гена дистрофіну, автори представленого винаходу виявили, що пропуск екзону 51 може бути індукованим з високою ефективністю шляхом введення антисенсового олігомеру, який має нуклеотидні послідовності, представлені SEQ ID NO: 1 та 2. На основі даного відкриття, автори представленого винаходу здійснили представлений винахід.

Тобто, представлений винахід полягає в наступному.

[1] Антисенсовий олігомер, який вибирають з групи, що складається з (a)-(d), зазначених нижче:

(a) антисенсовий олігомер, який містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1 або 2;

(b) антисенсовий олігомер, який містить нуклеотидну послідовність, яка має делецію, заміщення, вставку та/або додавання від 1 до 5 нуклеотидів в нуклеотидній послідовності SEQ ID NO: 1 або 2, та має активність, щоб викликати пропуск 51-ого екзону в гені дистрофіна людини;

(c) антисенсовий олігомер, який має нуклеотидну послідовність, яка має щонайменше 80 % ідентичність з нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO: 1 або 2 та має активність, щоб викликати пропуск 51-ого екзону в гені дистрофіна людини; та

(d) антисенсовий олігомер, який гібридується в жорстких умовах до олігонуклеотиду, який складається з нуклеотидної послідовності, комплементарної до нуклеотидної послідовності SEQ ID NO: 1 або 2 та має активність, щоб викликати пропуск 51-ого екзону в гені дистрофіна людини.

[2] Антисенсовий олігомер, який вибирають з групи, яка складається з (e)-(h), зазначених нижче:

(e) антисенсовий олігомер, який містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1 або 2;

(f) антисенсовий олігомер, який містить нуклеотидну послідовність, яка має делецію, заміщення, вставку та/або додавання від 1 до 3 нуклеотидів в нуклеотидній послідовності SEQ ID NO: 1 або 2, та має активність, щоб викликати пропуск 51-ого екзону в гені дистрофіна людини;

(g) антисенсовий олігомер, який містить нуклеотидну послідовність, яка має щонайменше 80 % ідентичність з нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO: 1 або 2 та має активність, щоб викликати пропуск 51-ого екзону в гені дистрофіна людини; та

(h) антисенсовий олігомер, який гібридується в дуже жорстких умовах до олігонуклеотиду, який складається з нуклеотидної послідовності, комплементарної до нуклеотидної послідовності SEQ ID NO: 1 або 2 та має активність, щоб викликати пропуск 51-ого екзону в гені дистрофіна людини.

[3] Антисенсовий олігомер, який вибирають з групи, яка складається з (i)-(j), зазначених нижче:

(i) антисенсовий олігомер, який містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1 або 2; та

(i) антисенсовий олігомер, який має нуклеотидну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність з нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO: 1 або 2 та має активність, щоб викликати пропуск 51-ого екзону в гені дистрофіна людини.

[4] Антисенсовий олігомер відповідно до будь-якого одного з [1]-[3], зазначених вище, який представляє собою олігонуклеотид.

[5] Антисенсовий олігомер відповідно до [4], зазначеного вище, в якому цукровий фрагмент та/або зв'язуюча фосфат ділянка, щонайменше, одного нуклеотиду, з якого складається олігонуклеотид, є модифікованим.

[6] Антисенсовий олігомер відповідно до [4] або [5], зазначених вище, в якому цукровий фрагмент, щонайменше, одного нуклеотиду, з якого складається олігонуклеотид, представляє собою рибозу, в якому 2'-ОН група заміщується на будь-яку групу, вибрану з групи, яка складається з OR, R, R'OR, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NR<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, CN, F, Cl, Br та I (в якому R представляє собою алкіл або арил, та R' представляє собою алкілен).

[7] Антисенсовий олігомер відповідно до будь-якого одного з [4]-[6], зазначених вище, в якому зв'язуюча фосфат ділянка, щонайменше, одного нуклеотидна, з якого складається олігонуклеотид, представляє собою будь-яку ділянку, вибрану з групи яка складається з фосфоротіоатного зв'язку, фосфородітіоатного зв'язку, алкілфосфонатного зв'язку, фосфорамідатного зв'язку та боранофосфатного зв'язку.

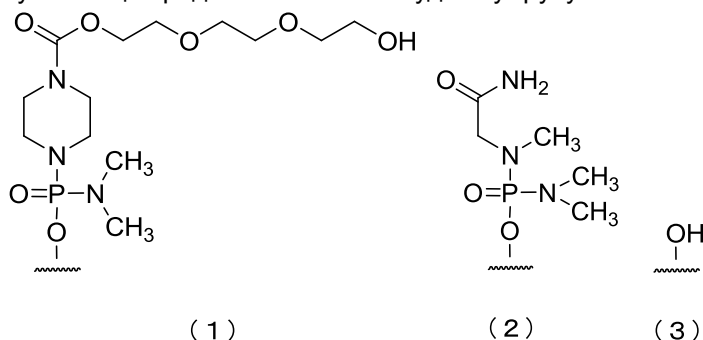
[8] Антисенсовий олігомер відповідно до будь-якого одного з [1]-[3], зазначених вище, який представляє собою морфоліноолігомер.

[9] Антисенсовий олігомер відповідно до [8], зазначеного вище, в якому морфоліновий кільцевий фрагмент, зв'язуюча фосфат ділянка, 3'-кінець та/або 5'-кінець, щонайменше одного морфоліну, з якого складається морфоліноолігомер, є модифікованим.

[10] Антисенсовий олігомер відповідно до [9] або [10], зазначених вище, в якому зв'язуюча фосфат ділянка, щонайменше, одного морфоліно, з якого складається морфоліноолігомер, представляє собою будь-яку ділянку, вибрану з фосфородіамідатного зв'язку, фосфоротіоатного зв'язку, фосфородітіоатного зв'язку, алкілфосфонатного зв'язку, фосфорамідатного зв'язку та боранофосфатного зв'язку.

[11] Антисенсовий олігомер відповідно до [10], зазначеного вище, який представляє собою фосфородіамідатний морфоліноолігомер.

[12] Антисенсовий олігомер відповідно до будь-якого одного з [9]-[11], зазначених вище, в якому 5' кінець представляє собою будь-яку групу з хімічних формул (1)-(3), зазначених нижче:



[13] Фармацевтична композиція для лікування м'язової дистрофії, яка містить, як активний інгредієнт, антисенсовий олігомер відповідно до будь-якого одного з [1]-[12], зазначених вище, або його фармацевтично прийнятну сіль або гідрат.

[14] Фармацевтична композиція відповідно до [13], зазначеного вище, що містить фармацевтично прийнятний носій.

[15] Спосіб лікування м'язової дистрофії, який включає введення пацієнту з м'язовою дистрофією антисенсового олігомеру відповідно до будь-якого одного з [1]-[12], зазначених вище, або фармацевтичної композиції відповідно до [13] або [14], зазначених вище.

[16] Спосіб лікування відповідно до [15], зазначеного вище, в якому пацієнт з м'язовою дистрофією є пацієнтом з делеціями нуклеотидів в межах екзонів 29-50, 50, 45-50, 48-50, 49-50, 52, 52-63, 13-50, 19-50, 43-50 або 47-50.

[17] Спосіб лікування відповідно до [15] або [16], зазначених вище, в якому пацієнтом є людина.

[18] Застосування антисенсового олігомера відповідно до будь-якого одного з [1]-[12], зазначених вище, у виробництві фармацевтичної композиції для лікування м'язової дистрофії.

[19] Антисенсовий олігомер відповідно до будь-якого одного з [1]-[12], зазначених вище, для застосування в лікуванні м'язової дистрофії.

5 [20] Антисенсовий олігомер відповідно до [19], зазначеного вище, в якому пацієнт з м'язовою дистрофією в зазначеному лікуванні представляє собою пацієнта з делеціями нуклеотидів в межах екзонів 29-50, 50, 45-50, 48-50, 49-50, 52, 52-63, 13-50, 19-50, 43-50 або 47-50.

[21] Антисенсовий олігомер відповідно до [19] або [20], зазначених вище, в якому пацієнтом є людина.

#### 10 ЕФЕКТ ВІНАХОДУ

Антисенсовий олігомер за представленим винаходом може індукувати пропуск екзона 51 в гені дистрофіна людини з високою ефективністю. Крім того, симптоми м'язової дистрофії Дюшенна можуть бути ефективно частково зняті шляхом введення фармацевтичної композиції за представленим винаходом.

#### 15 Короткий опис креслень

ФІГ. 1 показує ефективність пропуску екзона 51 в гені дистрофіна людини в клітинній лінії рабдоміосаркомки людини (RD клітини).

#### СПОСІБ ЗДІЙСНЕННЯ ВІНАХОДУ

20 Далі в даному документі, представлений винахід описується детально. Варіанти здійснення, описані нижче, призначені для того, щоб бути представленими як приклад лише для того, щоб описати винахід, але при цьому не обмежуючись тільки наступними варіантами здійснення. Представлений винахід може бути здійснено різними способами, не виходячи за межі суті винаходу.

#### 25 1. Антисенсовий олігомер

Представлений винахід передбачає антисенсовий олігомер (далі в даному документі зазначається як "антисенсовий олігомер за представленим винаходом"), який викликає пропуск екзона 51 в гені дистрофіна людини з високою ефективністю.

[Екзон 51 в гені дистрофіна людини]

30 В представленому винаході, термін "ген" є призначеним для позначення геномного гена та також включає попередник кДНК, мРНК та пре-мРНК. Переважно, ген представляє собою попередник мРНК, тобто пре-мРНК.

В геномі людини ген дистрофіна людини знаходиться в локус Хр21.2. Ген дистрофіна людини має розмір 2,2 мільйона пар нуклеотидів та є найбільшим геном серед відомих генів людини. Однак, кодуючі ділянки гена дистрофіна людини становлять лише 14 тисяч пар основ, розподілених як 79 екзонів по всьому гену дистрофіна людини (Roberts, RG, et al., Genomics, 16: 536-538 (1993)). Пре-мРНК, яка є транскриптом гена дистрофіна людини, піддається сплайсингу для формування зрілої мРНК з 14 тисяч пар основ. Нуклеотидну послідовність немутантного гена дистрофіна людини є відомою (GeneBank Номер доступу № NM\_004006).

40 Нуклеотидна послідовність екзона 51 в немутантному гені дистрофіна людини є представленою SEQ ID NO: 3.

[антисенсовий олігомер]

45 Антисенсовий олігомер за представленим винаходом є призначеним, щоб викликати пропуск екзона 51 в гені дистрофіна людини, тим самим, модифікуючи протеїн, кодований типом DMD гена дистрофіна в типі BMD протеїну дистрофіна. Відповідно, екзон 51 в гені дистрофіна, який є мішенню пропуску екзону антисенсовим олігомером, включає як немутантний так і мутантний типи.

Антисенсовий олігомер за представленим винаходом представляє собою виключно антисенсовий олігомер, який вибирають з групи, яка складається з (a)-(d), зазначених нижче.

(a) антисенсовий олігомер, який містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1 або 2;

50 (b) антисенсовий олігомер, який містить нуклеотидну послідовність, яка має делецію, заміщення, вставку та/або додавання від 1 до 5 нуклеотидів в нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1 або 2, та має активність, щоб викликати пропуск 51-ого екзону в гені дистрофіна людини;

55 (c) антисенсовий олігомер, який має нуклеотидну послідовність, яка має щонайменше 80 % ідентичність з нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO: 1 або 2, та має активність, щоб викликати пропуск екзона 51 в гені дистрофіна людини; та

(d) антисенсовий олігомер, який гібридує в жорстких умовах до олігонуклеотида, який складається з нуклеотидної послідовності, комплементарної до нуклеотидної послідовності SEQ ID NO: 1 або 2, та має активність, щоб викликати пропуск екзона 51 в гені дистрофіна людини.

Антисенсові олігомери від (b) до (d), зокрема, представляють собою мутантів антисенсового олігомеру (a), та є призначеними відповідати мутаціям гена дистрофіна у пацієнтів, наприклад, поліморфізм.

5 Як інший варіант здійснення, антисенсовий олігомер за представленим винаходом представляє собою виключно антисенсовий олігомер, який вибирають з групи, яка складається з (k)-(n), зазначених нижче.

(k) Антисенсовий олігомер, який містить нуклеотидну послідовність, показану будь-якою однією з SEQ ID NOS: 6-33;

10 (l) Антисенсовий олігомер, який містить нуклеотидну послідовність, яка має делецію, заміщення, вставку та/або додавання від 1 до 5 нуклеотидів в нуклеотидну послідовність, показану будь-якою однією з SEQ ID NO: 6-33, та має активність, щоб викликати пропуск екзона 51 в гені дистрофіна людини;

15 (m) Антисенсовий олігомер, який має нуклеотидну послідовність, яка має щонайменше 80 % ідентичність з нуклеотидною послідовністю будь-якої одної з SEQ ID NO: 6-33, та має активність, щоб викликати пропуск екзона 51 в гені дистрофіна людини; та

(n) Антисенсовий олігомер, який гібридує в жорстких умовах до олігонуклеотида, який складається з нуклеотидної послідовності, комплементарної до нуклеотидної послідовності, показаної будь-яким одним з SEQ ID NO: 6-33, та має активність, щоб викликати пропуск екзона 51 в гені дистрофіна людини.

20 Антисенсові олігомери від (l) до (n) зокрема, представляють собою мутантів антисенсового олігомеру (k), та є призначеними відповідати мутаціям гена дистрофіна у пацієнтів, наприклад, поліморфізм.

Крім того, антисенсовий олігомер за представленим винаходом представляє собою антисенсовий олігомер, який вибирають з групи, яка складається з (o)-(r), зазначених нижче.

25 (o) Антисенсовий олігомер, який складається з нуклеотидної послідовності, показаної будь-якою однією з SEQ ID NO: 6-33;

30 (p) Антисенсовий олігомер, який містить нуклеотидну послідовність, яка має делецію, заміщення, вставку та/або додавання від 1 до 3 нуклеотидів в нуклеотидній послідовності, показаної будь-якою однією з SEQ ID NO: 6-33, та має активність, щоб викликати пропуск екзона 51 в гені дистрофіна людини;

(q) Антисенсовий олігомер, який має нуклеотидну послідовність, яка має щонайменше 80 % ідентичність з нуклеотидною послідовністю будь-якої одної з SEQ ID NO: 6-33, та має активність, щоб викликати пропуск екзона 51 в гені дистрофіна людини; та

35 (r) Антисенсовий олігомер, який гібридує в дуже жорстких умовах до олігонуклеотида, яка складається з нуклеотидної послідовності, комплементарної до нуклеотидної послідовності, показаної будь-якою однією з SEQ ID NO: 6-33, та має активність, щоб викликати пропуск екзона 51 в гені дистрофіна людини.

Крім того, антисенсовий олігомер за представленим винаходом представляє собою антисенсовий олігомер, який вибирають з групи, яка складається з (i)-(j), зазначених нижче:

40 (i) антисенсовий олігомери, який складається з нуклеотидної послідовності будь-якої одної з SEQ ID NO: 6-33; або

(j) антисенсовий олігомер, який містить нуклеотидну послідовність, яка має щонайменше 90 % ідентичність з нуклеотидною послідовністю будь-якої одної з SEQ ID NO: 6-33, та має активність, щоб викликати пропуск екзона 51 в гені дистрофіна людини.

45 Як використовується в даному документі, термін "антисенсовий олігомер який гібридує в жорстких умовах" стосується, наприклад, антисенсовий олігомер, отриманий за методикою гібридизації колоній, гібридизації бляшок, саузерн-гібридизації або аналогічною, з використанням як зонда всього або частини олігонуклеотида, що складається з нуклеотидної послідовності, комплементарної до нуклеотидної послідовності, наприклад, SEQ ID NO: 1. Спосіб гібридизації, який може бути використаний, включає способи, описані в, наприклад, "Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 3, Cold Spring Harbor, Laboratory Press 2001," "Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997," тощо.

50 Як використовується в даному документі, термін "жорсткі умови" може означати будь-які з мінімальних жорстких умов, помірних жорстких умов або дуже жорстких умов. Термін "мінімальні жорсткі умови" означає, наприклад, 5x SSC (стандартний сольовий розчин), 5x розчин Денхардта, 0,5 % SDS (додецилсульфат натрію), 50 % формамід при 32 °C. Термін "помірні жорсткі умови" означає, наприклад, 5 x SSC, 5 x розчин Денхардта, 0,5 % SDS, 50 % формамід при 42 °C, або 5 x SSC, 1 % SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 % формамід при 42 °C. Термін "дуже жорсткі умови" означає, наприклад, (1) 5 x SSC, 5 x розчин Денхардта, 0,5 % SDS, 60 50 % формамід при 50 °C, (2) 0,2 x SSC, 0,1 % SDS при 60 °C, (3) 0,2 x SSC, 0,1 % SDS при

62 °C, (4) 0,2x SSC, 0,1 % SDS при 65 °C, або (5) 0,1 x SSC, 0,1 % SDS при 65 °C, але не обмежується цим. За даних умов, очікується, що антисенсовий олігомер з більш високою гомологічністю ефективно будуть отримувати при більш високих температурах, хоча декілька чинників беруть участь в жорсткості гібридизації, включаючи температуру, концентрацію зонда, довжину зонда, іонну силу, час, концентрацію солі та інші, та кваліфіковані фахівці в даній галузі можуть приблизно вибирати дані чинники, щоб досягти аналогічну жорсткість.

Коли комерційно доступні набори використовують для гібридизації, використаною може бути, наприклад, система прямого мічення Alkphos та детектування (GE Healthcare). В даному випадку, відповідно до приведенного протоколу, після культивування з міченим зондом протягом ночі, мембрану промивають первинним буфером для промивання, який містить 0,1 % (мас./об.) SDS при 55 °C, тим самим, детектуючи гібридизований антисенсовий олігомер. Альтернативно, коли зонд є міченим дігексигеніном (DIG) з використанням комерційно доступного реагенту (наприклад, ПЛР мічена суміш (Roche Diagnostics), тощо) в продукуванні зонду, що ґрунтується на всій або частині комплементарної послідовності до нуклеотидної послідовності SEQ ID NO: 3, гібридизація може бути детектованою з використанням набору для детектування нуклеїнової кислоти DIG (Roche Diagnostics).

На додаток до антисенсового олігомера, описаного вище, інший антисенсовий олігомери, який може бути гібридизованим, включає антисенсові олігомери, які мають 90 % або більш високу, 91 % або більш високу, 92 % або більш високу, 93 % або більш високу, 94 % або більш високу, 95 % або більш високу, 96 % або більш високу, 97 % або більш високу, 98 % або більш високу, 99 % або більш високу, 99,1 % або більш високу, 99,2 % або більш високу, 99,3 % або більш високу, 99,4 % або більш високу, 99,5 % або більш високу, 99,6 % або більш високу, 99,7 % або більш високу, 99,8 % або більш високу, та 99,9 % або більш високу ідентичність з нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO: 1 або 2, як розраховано з використанням програмного забезпечення щодо пошуку гомологічності, такого як FASTA та BLAST, використовуючи за замовченням значення параметрів.

Ідентичність між нуклеотидними послідовностями може бути визначена з використанням FASTA (Science 227 (4693): 1435-1441, (1985)) або алгоритму BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Karlin та Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873, 1993). Програми, названі blastn, blastx, tblastn та tblastx, які ґрунтуються на алгоритмі BLAST, були розроблені (Altschul SF, et al.: J. Mol. Biol. 215: 403, 1990). Коли нуклеотидну послідовність секвенують, використовуючи blastn, параметри є, наприклад, бал=100 та довжина слова=12. Коли використовують програми BLAST та Gapped BLAST, для кожної програми використовуються параметри за замовчуванням.

Термін "викликати пропуск екзона 51 в гені дистрофіна людини" призначений означати, що шляхом зв'язування антисенсового олігомера за представленим винаходом із сайтом, що відповідає екзону 51 транскрипта (наприклад, пре-мРНК) гена дистрофіна людини, наприклад, нуклеотидна послідовність, яка відповідає 5' кінцю екзона 53 сплайсується в нуклеотидну послідовність, яка відповідає 3' кінцю екзона 50 у пацієнтів з DMD з делецією екзона 52, коли транскрипт піддається сплайсингу, таким чином, призводячи в результаті до формування зрілої мРНК, яка є вільною від зсуву кодону рамки.

В даному документі, термін "зв'язування", описаний вище, є призначеним означати, що коли антисенсовий олігомер за представленим винаходом змішують з транскриптом гена дистрофіна людини, обидва є гібридизованими в фізіологічних умовах з утворенням подвійного ланцюга нуклеїнової кислоти. Термін "в фізіологічних умовах" стосується умов, встановлених для імітації навколишнього середовища *in vivo* з точки зору pH, сольового складу та температури. Умови, наприклад, представляють собою від 25 до 40 °C, переважно 37 °C, pH від 5 до 8, переважно pH 7,4 та 150 mM концентрація хлориду натрію.

Чи викликається пропуск екзона 51 в гені дистрофіна людини, чи ні, може бути підтверджено шляхом введення антисенсового олігомера за представленим винаходом в клітину експресії дистрофіну (наприклад, в клітини рабдоміосаркоми людини), ампліфікуючи ділянку, яка оточує екзон 51 мРНК гена дистрофіна людини, із загальної РНК клітини експресії дистрофіну за допомогою ОТ-ПЛР, та виконуючи гніздовий ПЛР або аналіз послідовності на ПЛР ампліфікованому продукті.

Ефективність пропуску може бути визначена наступним чином. мРНК для гена дистрофіна людини збирають з досліджуваних клітин; в мРНК вимірюють рівень полінуклеотиду "А" групи, де пропуск екзона 51 пропускається, та рівень полінуклеотиду "В" групи, де екзон 51 не пропускається. За допомогою даних вимірюваних значень "А" та "В," ефективність обчислюється за наступним рівнянням:

$$\text{Ефективність пропуску (\%)} = A/(A+B) \times 100$$



Переважно, антисенсовий олігомер за представленим винаходом спричиняє пропуск екзона 51 з ефективністю 10 % або вище, 20 % або вище, 30 % або вище, 40 % або вище, 50 % або вище, 60 % або вище, 70 % або вище, 80 % або вище, та 90 % або вище.

Для розрахунку ефективності пропуску можна послатись на Міжнародну публікацію WO 2012/029986.

Антисенсовий олігомер за представленим винаходом включає, наприклад, олігонуклеотид, морфоліноолігомер або пептидну нуклеїнову кислоту (PNA), яка має довжину від 16 до 35 нуклеотидів. Довжина переважно становить від 19 до 32, від 20 до 31, 21 або 30 нуклеотидів, та морфоліноолігомери є переважними.

Олігонуклеотид, описаний вище (далі в даному документі зазначається як "олігонуклеотид за представленим винаходом") представляє собою антисенсовий олігомер за представленим винаходом, який складається з нуклеотидів, як складових одиниць. Такі нуклеотиди можуть представляти собою будь-які з рибонуклеотидів, дезоксирибонуклеотидів та модифікованих нуклеотидів.

Модифікований нуклеотид стосується нуклеотиду, який має повністю або частково модифіковані нуклеїнові основи, цукрові фрагменти та/або зв'язуючі фосфат ділянки, які складають рибонуклеотид або дезоксирибонуклеотид.

В представленому винаході, нуклеїнова основа включає, наприклад, аденін, гуанін, гіпоксантин, цитозин, тимін, урацил та їх модифіковані основи. Приклади таких модифікованих основ включають, але не обмежуються цим, псевдоурацил, 3-метилурацил, дигідроурацил, 5-алкілцитозини (наприклад, 5-метилцитозин), 5-алкілурацили (наприклад, 5-етилурацил), 5-галогенурацили (5-бромурацил), 6-азапіримідин, 6-алкілпіримідини (6-метилурацил), 2-тіоурацил, 4-тіоурацил, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксигідроксиметил)урацил, 5'-карбоксиметиламінометил-2-тіоурацил, 5-карбоксиметиламінометилурацил, 1-метиладенін, 1-метилгіпоксантин, 2,2-диметилгуанін, 3-метилцитозин, 2-метиладенін, 2-метилгуанін, N6-метиладенін, 7-метилгуанін, 5-метоксіамінометил-2-тіоурацил, 5-метиламінометилурацил, 5-метилкарбонілметилурацил, 5-метилоксіурацил, 5-метил-2-тіоурацил, 2-метилтіо-N6-ізопентеніладенін, урацил-5-оксіоцтову кислоту, 2-тіоцитозин, пурин, 2,6-діамінопурин, 2-амінопурин, ізогуанін, індол, імідазол, ксантин, тощо.

Модифікація цукрового фрагмента може включати, наприклад, модифікації в 2'-положенні рибози та модифікації в інших положеннях цукру. Модифікація в 2'-положенні рибози включає заміщення 2'-ОН рибози на OR, R, R'OR, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NR<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, CN, F, Cl, Br або I, де R представляє собою алкіл або арил, та R' представляє собою алкілен.

Модифікація в інших положеннях цукру включає, наприклад, заміщення O в 4' положенні рибози або дезоксирибози на S, зв'язування між 2' та 4' положеннями цукру, наприклад, LNA (з'єднана нуклеїнова кислота) або ENA (2'-O, 4'-C-етилен-місткові нуклеїнові кислоти), але не обмежується цим.

Модифікація зв'язуючої фосфат ділянки включає, наприклад, модифікацію заміщення фосфодискладноефірного зв'язку на фосфоротіоатний зв'язок, фосфородитіоатний зв'язок, алкілфосфонатний зв'язок, фосфорамідатний зв'язок або боранофосфатний зв'язок (Enya et al.: Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 18, 9154-9160) (дивіться, наприклад, Japan Domestic Re-Publications of PCT Application №№ 2006/129594 та 2006/038608).

В даному винаході, алкіл переважно представляє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю. Конкретні приклади включають метил, етил, н-пропіл, ізопропіл, н-бутил, ізобутил, втор-бутил, трет-бутил, н-пентил, ізопентил, неопентил, трет-пентил, н-гексил та ізогексил. Алкіл необов'язково може бути заміщеним. Приклади таких замісників включають галоген, алкокси, ціано та нітро. Алкіл може бути заміщеним від 1 до 3 замісниками.

В даному винаході, циклоалкіл переважно представляє собою циклоалкіл, який має від 5 до 12 атомів вуглецю. Конкретні приклади включають циклопентил, циклогексил, циклогептил, циклооктил, циклодецил та циклододецил.

В даному винаході, галоген включає фтор, хлор, бром та йод.

Алкокси представляє собою лінійний або розгалужений алкокси, який має від 1 до 6 атомів вуглецю, такі як метокси, етокси, н-пропокси, ізопропокси, н-бутокси, ізобутокси, втор-бутокси, трет-бутокси, н-пентилокси, ізопентилокси, н-гексилокси, ізогексилокси, тощо. Серед інших, переважним є алкокси, який має від 1 до 3 атомів вуглецю.

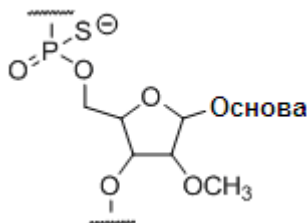
В даному винаході, арил переважно представляє собою арил, який має від 6 до 10 атомів вуглецю. Конкретні приклади включають феніл, α-нафтил та β-нафтил. Серед іншого, переважним є феніл. Арил може бути необов'язково заміщеним. Приклади таких замісників

включають алкіл, галоген, алкокси, ціано та нітро. Арил може бути заміщеним від одного до трьох таких замісників.

В даному винаході, алкілен переважно представляє собою лінійний або розгалужений алкілен, який має від 1 до 6 атомів вуглецю. Конкретні приклади включають метилен, етилен, триметилен, тетраметилен, пентаметилен, гексаметилен, 2-(етил)триметилен та 1-(метил)тетраметилен.

В даному винаході, ацил включає лінійний або розгалужений алканойл або ароїл. Приклади алканойла включає форміл, ацетил, 2-метилацетил, 2,2-диметилацетил, пропіоніл, бутирил, ізобутирил, пентанойл, 2,2-диметилпропіоніл, гексанойл, тощо. Приклади ароїла включають бензойл, толуойл та нафтойл. Ароїл може бути необов'язково заміщеним в положеннях, які здатні для заміщення, та може бути заміщеним алкілом(ами).

Переважно, олігонуклеотид за представленим винаходом представляє собою антисенсовий олігомер за представленим винаходом, який містить складову одиницю, представлену загальною формулою, зазначеною нижче, в якій -ОН група в положенні 2' рибози є заміщеною метокси, та зв'язуюча фосфат ділянка представляє собою фосфоротіоатний зв'язок:

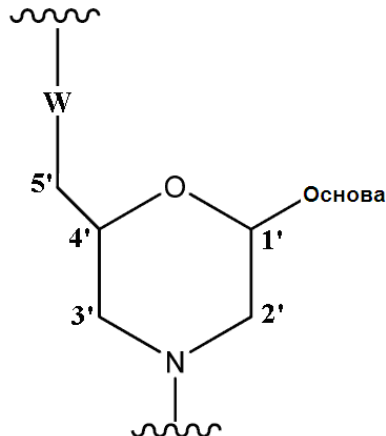


в якій основа представляє собою нуклеїнову основу.

+

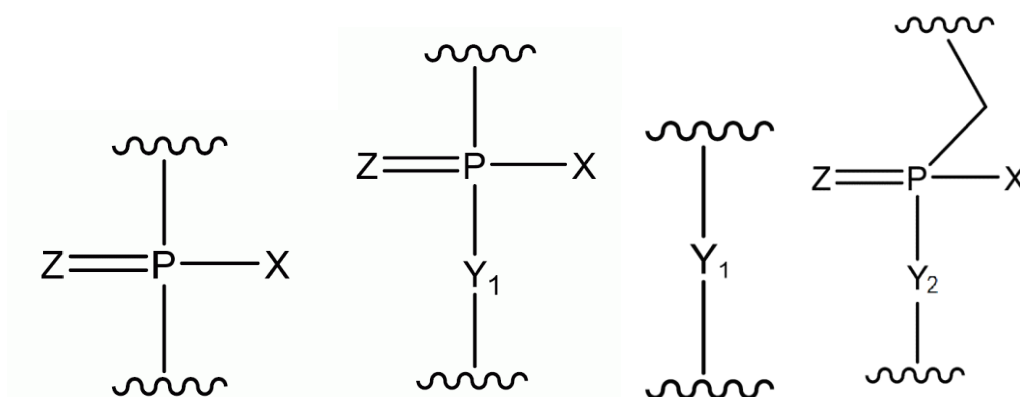
Олігонуклеотид за представленим винаходом може бути легко синтезований з використанням різних автоматизованих синтезаторів (наприклад, АКТА oligopilot plus 10/100 (GE Healthcare)). Альтернативно, синтез може бути також покладено на організацію третьої сторони (наприклад, Promega Inc., Takara Co., або Japan Bio Service Co.), тощо.

Морфоліноолігомер за представленим винаходом представляє собою антисенсовий олігомер за представленим винаходом, який містить складову одиницю, представлену загальною формулою, зазначеною нижче:



де основа таке саме значення, як визначено вище, та,

W представляє собою групу, показану за допомогою будь-якої з наступних груп:



де X представляє собою  $-\text{CH}_2\text{R}^1$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_2\text{R}^1$ ,  $-\text{S}-\text{CH}_2\text{R}^1$ ,  $-\text{NR}^2\text{R}^3$  або F;

$\text{R}^1$  представляє собою H або алкіл;

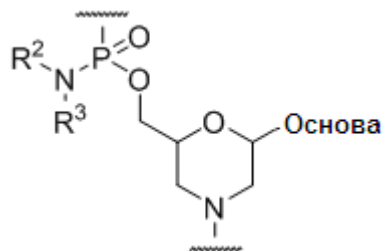
$\text{R}^2$  та  $\text{R}^3$ , які можуть бути однаковими або різними, кожен представляє собою H, алкіл, циклоалкіл або арил;

$\text{Y}_1$  представляє собою O, S,  $\text{CH}_2$  або  $\text{NR}^1$ ;

$\text{Y}_2$  представляє собою O, S або  $\text{NR}^1$ ;

Z представляє собою O або S.

Переважно, морфоліноолігомер представляє собою олігомер, який містить складову одиницю, представлену загальною формулою, зазначеною нижче (фосфородіамідатний морфоліноолігомер (далі в даному документі зазначається як "PMO")).



де,  $\text{R}^2$  та  $\text{R}^3$  мають такі самі значення, як визначено вище.

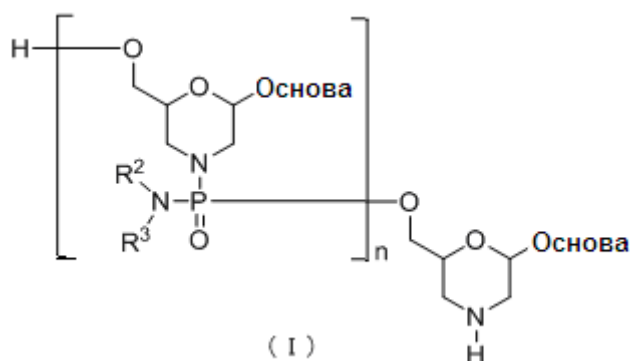
Морфоліноолігомер за представленим винаходом включає морфоліноолігомер, який містить повністю або частково модифіковані нуклеїнові основи, морфолінові кільцеві фрагменти, зв'язуючі фосфат ділянки, 3'-кінець та/або 5'-кінець, які складають морфоліноолігомер.

Модифікація зв'язуючої фосфат ділянки включає, наприклад, модифікацію заміщення з фосфородіамідатним зв'язком, фосфоротіоатним зв'язком, фосфородитіоатним зв'язком, алкілфосфонатним зв'язком, фосфорамідатним зв'язком та боранофосфонатним зв'язком (Eryu et al.: Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 18, 9154-9160) (дивись, наприклад, місцева японська перепублікація заявок РСТ №№ 2006/129594 та 2006/038608).

Морфоліноолігомер може бути отриманий відповідно до, наприклад, WO 1991/009033 або WO 2009/064471. Зокрема, PMO може бути отриманий відповідно до процедури, описаної в WO 2009/064471 та отриманий за способом, показаним нижче.

[Спосіб отримання PMO]

Варіант здійснення PMO представляє собою, наприклад, сполуку, представлену загальною формулою (I), зазначеною нижче (далі в даному документі PMO (I)).



де основа,  $\text{R}^2$  та  $\text{R}^3$  мають такі самі значення, як визначено вище; та,

п дорівнює цілому числу від 1 до 99, переважно цілому числу від 24 до 34, від 27 до 31 або від 28 до 30, переважно 29.

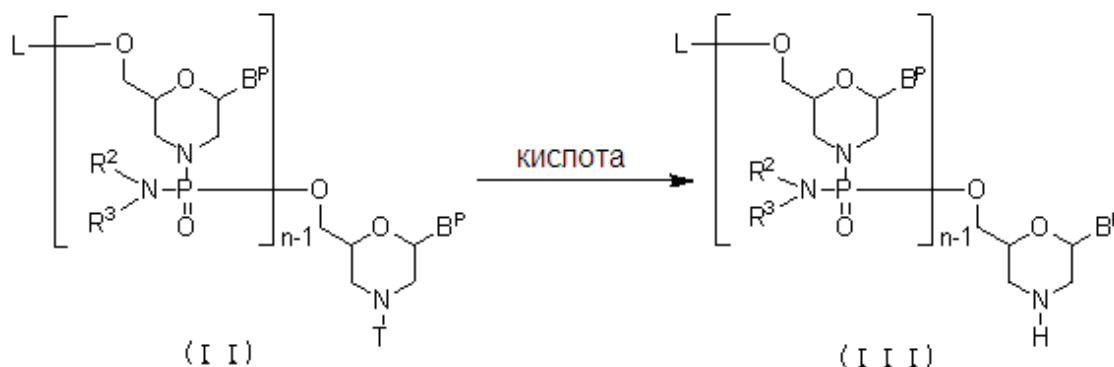
РМО (I) можуть отримувати відповідно до відомого способу, наприклад, можуть отримувати шляхом виконання процедур, описаних в наступних стадіях.

5 Сполуки та реагенти, використовувані в описаних нижче стадіях, не мають особливих обмежень, оскільки вони загальноприйнято використовуються для отримання РМО.

Крім того, всі наступні стадії можуть бути виконані, застосовуючи рідинофазний спосіб або твердофазний спосіб (з використанням посібників або комерційно доступних твердофазних автоматичних синтезаторів). При отриманні РМО застосовуючи твердофазний спосіб, бажаним  
10 є використовувати автоматизовані синтезатори, приймаючи до уваги прості процедури роботи та точність синтезу.

(1) Стадія А:

Сполуку, представлена загальною формулою (II), зазначеною нижче, (далі в даному документі зазначається, як сполука (II)) піддають взаємодії з кислотою з утворенням сполуки,  
15 представлена загальною формулою (III), зазначеною нижче (далі в даному документі зазначається, як сполука (III)):

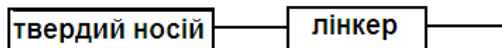


в якому n, R<sup>2</sup> та R<sup>3</sup> мають такі самі значення, як визначено вище;

кожен B<sup>p</sup> незалежно представляє собою нуклеїнову основу, який може бути необов'язково  
20 захищеним;

T представляє собою тритил, монометокситритил або диметокситритил; та,

L представляє собою водень, ацил або групу, представлену загальною формулою (IV), зазначеною нижче (далі в даному документі зазначається як група (IV)).



25 "Нуклеїнова основа" для B<sup>p</sup> включає таку саму "нуклеїнову основу" як в основі, за умови, що аміно або гідрокси група в нуклеїновій основі, показаний як B<sup>p</sup>, можуть бути захищеними.

Така захисна група для аміно не обмежується конкретними представниками, оскільки вона використовується як захисна група для нуклеїнової кислоти. Конкретні приклади включають бензоїл, 4-метоксибензоїл, ацетил, пропіоніл, бутирил, ізобутирил, фенілацетил,  
30 феноксиацетил, 4-трет-бутилфеноксиацетил, 4-ізопропілфеноксиацетил та (диметиламіно)метилен. Конкретні приклади захисних груп для гідрокси групи включають 2-ціаноетил, 4-нітрофенетил, фенілсульфонілетил, метилсульфонілетил та триметилсилілетил, та феніл, які можуть бути заміщеним від 1 до 5 електронакцепторними групами в необов'язково прийнятних для заміщення положеннях, дифенілкарбамоїл, диметилкарбамоїл,  
35 діетилкарбамоїл, метилфенілкарбамоїл, 1-піролідінілкарбамоїл, морфолінокарбамоїл, 4-(трет-бутилкарбокси)бензил, 4-[(диметиламіно)карбокси]бензил та 4-(фенілкарбокси)бензил, (дивись, наприклад, WO 2009/064471).

"Твердий носій" не обмежується конкретними представниками, оскільки він представляє собою носій прийнятний для реакції в твердій фазі нуклеїнових кислот. Бажаним для твердих носіїв є мати наступні властивості: наприклад, (i) є помірно розчинними в реагентах, які можуть  
40 бути використані для синтезу морфолінових похідних нуклеїнових кислот (наприклад, дихлорметан, ацетонітріл, тетразол, N-метилімідазол, піридин, оцтовий ангідрид, лютинин, трифтороцтова кислота); (ii) є хімічно стабільними до реагентів, прийнятних для синтезу морфолінових похідних нуклеїнової кислоти; (iii) може бути хімічно модифікованими; (iv) може  
45 бути наповненим бажаними морфоліновими похідними нуклеїнової кислоти; (v) має міцність, достатню, щоб витримувати високий тиск через обробки; та (vi) має однаковий діапазон та

розподіл діаметра частинок. Зокрема, здатний до розбухання полістирол (наприклад, амінометилполістирольна смола 1 % дивінілбензол перехресно зшиті (200-400 меш) (2,4-3,0 ммоль/г) (виробництва компанії Tokyo Chemical Industry), амінометильована полістирольна смола·HCl [дивінілбензол 1 %, 100-200 меш] (виробництва компанії Peptide Institute, Inc.)), не

5 здатний до розбухання полістирол (наприклад, Primer Support (виробництва компанії GE Healthcare)), полістирол з приєднаним ПЕГ ланцюгом (наприклад, NH<sub>2</sub>-ПЕТ смола (виробництва компанії Watanabe Chemical Co.), TentaGel смола), скло з контрольованим розміром пор (скло з контрольованими порами; CPG) (виробництва компанії, наприклад, CPG), скло з оксаліл-

10 контрольованим розміром пор (дивись, наприклад, Alul et al., Nucleic Acids Research, Vol. 19, 1527 (1991)), TentaGel підложка-амінополіетиленгліколь-дериватизована підложка (наприклад, Wright et al., cf., Tetrahedron Letters, Vol. 34, 3373 (1993)), та співполімер Poros - полістирол/дивінілбензол.

"Лінкер", який може бути використаний, представляє собою відомий лінкер, який широко використовується для з'єднання нуклеїнові кислоти або морфолінових похідних нуклеїнової

15 кислоти. Приклади включають 3-амінопропіл, сукциніл, 2,2'-діетанолсульфоніл та довголанцюговий алкіламіно (LCAA).

Дана стадія може виконуватись шляхом взаємодії сполуки (II) з кислотою.

"Кислота", яка може бути використана на даній стадії включає, наприклад, трифтороцтову кислоту, дихлороцтову кислоту та трихлороцтову кислоту. Кислота, яка використовується,

20 знаходиться, відповідним чином, в діапазоні, наприклад, від 0,1 молярного еквівалента до 1000 молярних еквівалентів, в розрахунку на 1 моль сполуки (II), переважно в діапазоні від 1 молярного еквівалента до 100 молярних еквівалентів в розрахунку на 1 моль сполуки (II).

Органічний амін може використовуватись в комбінації з кислотою, описаною вище. Органічний амін не обмежується конкретними представниками та включає, наприклад,

25 триетиламін. Кількість органічного аміну, який використовується, знаходиться, відповідним чином, в діапазоні від, наприклад, 0,01 молярного еквівалента до 10 молярних еквівалентів, та переважно в діапазоні від 0,1 молярного еквівалента до 2 молярних еквівалентів, в розрахунку на 1 моль кислоти.

Коли на даній стадії використовують сіль або суміш кислоти та органічного аміну, сіль або

30 суміш включає, наприклад, сіль або суміш трифтороцтової кислоти та триетиламіну, та більш конкретно, суміш з 1 еквівалента триетиламіну та 2 еквівалентів трифтороцтової кислоти.

Кислота, яка може бути використана на даній стадії, крім того, може бути використаною у вигляді розбавлення відповідним розчинником в концентрації від 0,1 % до 30 %. Розчинник не

35 обмежується конкретними представниками, оскільки він є інертним щодо реакції, та включає, наприклад, дихлорметан, ацетонітрил, та спирт (етанол, ізопропанол, трифторетанол, тощо), воду, або їх суміш.

Температура реакції в реакції, описаній вище, знаходиться, переважно, в діапазоні від, наприклад, 10 °C до 50 °C, більш переважно, в діапазоні від 20 °C до 40 °C, та найбільш

40 переважно, в діапазоні від 25 °C до 35 °C.

Час реакції може варіювати в залежності від виду кислоти, яку використовують, та температури реакції, та знаходиться, відповідним чином, в діапазоні від 0,1 хвилини до 24 годин в цілому, та переважно в діапазоні від 1 хвилини до 5 годин.

Після завершення даної стадії, можуть додавати основу, за необхідністю, щоб нейтралізувати залишкову кислоту в системі. "Основа" не обмежується конкретними

45 представниками та включає, наприклад, діізопропіламін. Основа, крім того, може бути використаною у вигляді розбавлення відповідним розчинником в концентрації від 0,1 % (об./об.) до 30 % (об./об.).

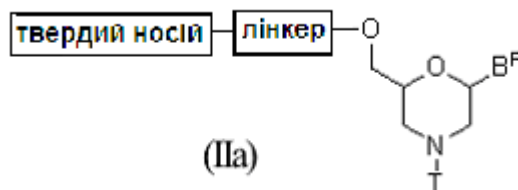
Розчинник, який використовується на даній стадії, не обмежується конкретними представниками, оскільки він є інертним по відношенню до реакції, та включає дихлорметан,

50 ацетонітрил, спирт (етанол, ізопропанол, трифторетанол, тощо), воду, та їх суміш. Температура реакції переважно знаходиться в діапазоні від, наприклад, 10 °C до 50 °C, більш переважно, в діапазоні від 20 °C до 40 °C, та найбільш переважно, в діапазоні від 25 °C до 35 °C.

Час реакції може варіювати в залежності від виду основи, яку використовують, та температури реакції, та знаходиться, відповідним чином, в діапазоні від 0,1 хвилини до 24 годин

55 в цілому, та переважно в діапазоні від 1 хвилини до 5 годин.

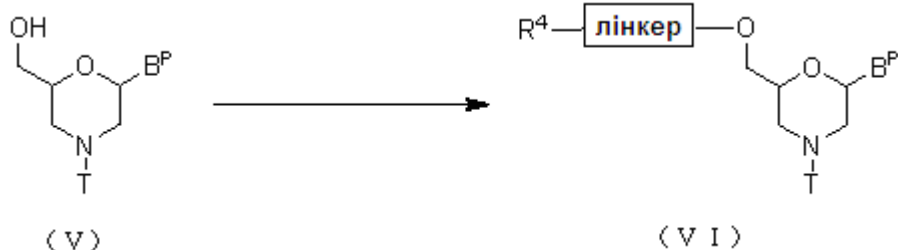
В сполуці (II), сполуку загальної формули (IIa), зазначеної нижче (далі в даному документі сполука (IIa)), в якій n дорівнює 1 та L представляє собою групу (IV), можуть отримувати за наступною процедурою.



де  $B^P$ , T, лінкер та твердий носій мають такі самі значення, як визначено вище.

Стадія 1:

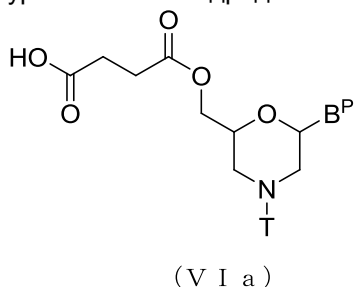
5 Сполуку, представлену загальною формулою (V), зазначеною нижче, піддають взаємодії з ацилюючим агентом, отримуючи сполуку, представлену загальною формулою (VI), зазначеною нижче (далі в даному документі зазначається як сполука (VI)).



де  $B^P$ , T та лінкер мають такі самі значення, як визначено вище; та,  $R^4$  представляє собою гідрокси, галоген, карбоксильну групу або аміно.

10 Дана стадія може бути здійснена за відомими способами введення лінкерів, з використанням сполуки (V), як вихідного матеріалу.

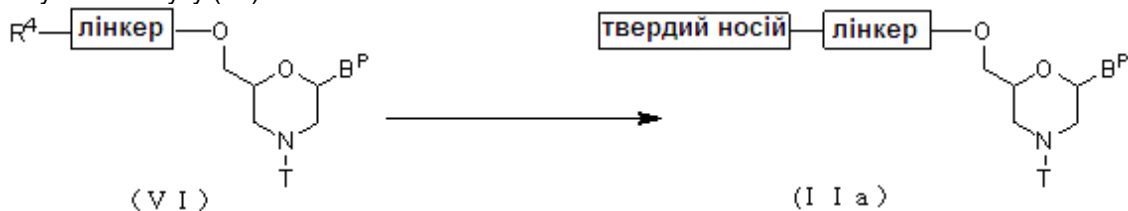
Зокрема, сполука, представлена загальною формулою (VIa), зазначеною нижче, можуть отримувати шляхом здійснення способу, відомого як етерифікація, використовуючи сполуку (V) та бурштиновий ангідрид.



15 де  $B^P$  та T мають такі самі значення, як визначено вище.

Стадія 2:

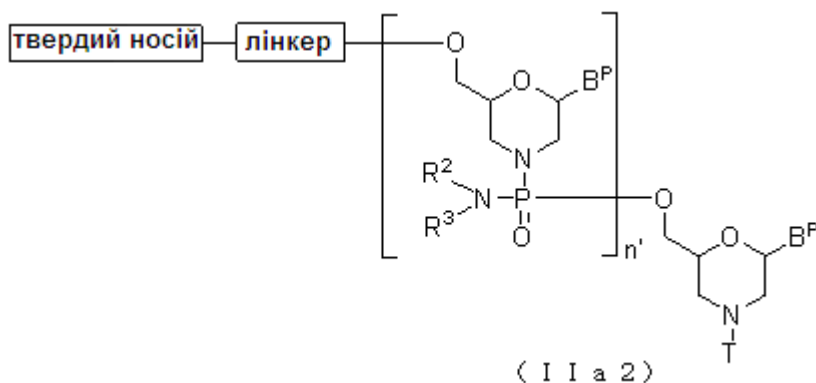
Сполуку (VI) піддають взаємодії з твердим носієм з використанням конденсуючого агента, отримуючи сполуку (IIa).



20 де  $B^P$ ,  $R^4$ , T, лінкер та твердий носій мають такі самі значення, як визначено вище.

Дана стадія може виконуватись з використанням сполуки (VI) та твердого носія відповідно до способу, відомого як реакції конденсації.

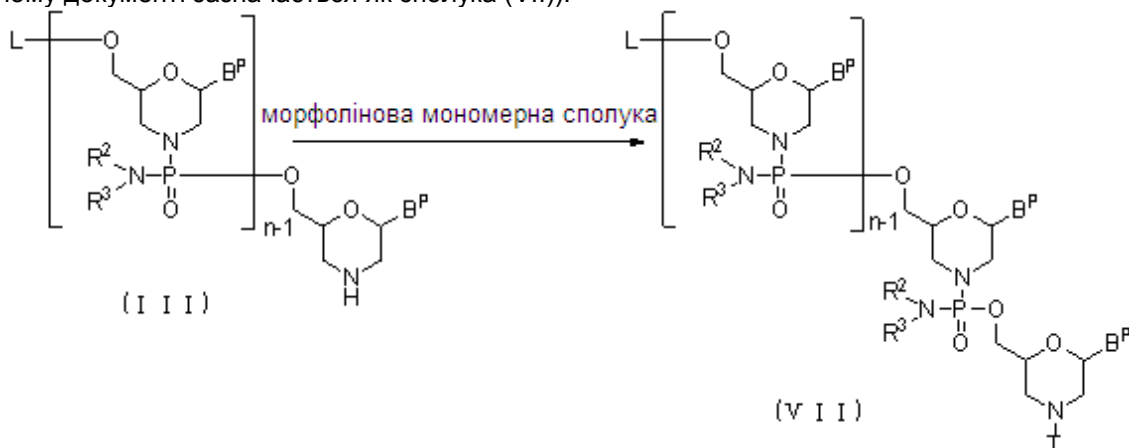
25 В сполуці (II), сполуку, представлену загальною формулою (IIa2), зазначеною нижче, в якій n дорівнює від 2 до 99 (переважно надане ціле число від 25 до 35, від 28 до 32, або від 29 до 31, переважно 30) та L являє собою групу, представлену загальною формулою (IV), можуть отримувати шляхом використання сполуки (IIa), як вихідного матеріалу, та повторення стадії A та стадії B способу отримання РМО, описаного в описі, потрібної кількості разів.



де  $B^P$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $T$ , лінкер та твердий носій мають такі самі значення, як визначено вище; та,  $n'$  представляє собою від 1 до 98 (в конкретному варіанті здійснення,  $n'$  дорівнює від 1 до 34, від 1 до 33, від 1 до 32, від 1 до 31, від 1 до 30, від 1 до 29, від 1 до 28, від 1 до 27, від 1 до 26, від 1 до 25, від 1 до 24).

(2) Стадія В

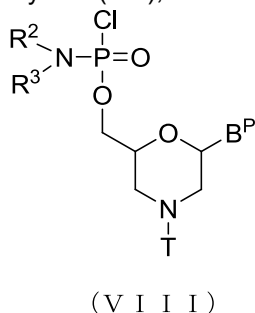
Сполуку (III) піддають взаємодії з морфоліновою мономерною сполукою в присутності основи, отримуючи сполуку, представлену загальною формулою (VII), зазначеною нижче (далі в даному документі зазначається як сполука (VII)):



де  $B^P$ ,  $L$ ,  $n$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  та  $T$  мають такі самі значення, як визначено вище.

Дана стадія може виконуватись шляхом взаємодії сполуки (III) з морфоліновою мономерною сполукою в присутності основи.

Морфолінова мономерна сполука включає, наприклад, сполуки, представлені загальною формулою (VIII), зазначеною нижче:



де  $B^P$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  та  $T$  мають такі самі значення, як визначено вище.

"Основа", яка може бути використана на даній стадії, включає, наприклад, діізопропіламін, триетиламін та N-етилморфолін. Кількість основи, яку використовують, знаходиться, відповідним чином, в діапазоні від 1 молярного еквівалента до 1000 молярних еквівалентів в розрахунку на 1 моль сполуки (III), переважно, від 10 молярних еквівалентів до 100 молярних еквівалентів в розрахунку на 1 моль сполуки (III).

Морфолінова мономерна сполука та основа, які можуть бути використані на даній стадії, крім того, можуть бути використані у вигляді розбавлення відповідним розчинником в концентрації від 0,1 % до 30 %. Розчинник не обмежується конкретними представниками,

оскільки він є інертним по відношенню до реакції, та включає, наприклад, N, N-диметилімідазолідон, N-метилпіперидон, ДМФ, дихлорметан, ацетонітрил, тетрагідрофуран, або їх суміш.

Температура реакції переважно знаходиться в діапазоні від, наприклад, 0 °C до 100 °C, та більш переважно, в діапазоні від 10 °C до 50 °C.

Час реакції може варіювати в залежності від виду основи, яку використовують, та температури реакції, та знаходиться, відповідним чином, в діапазоні від 1 хвилини до 48 годин, в цілому, та переважно в діапазоні від 30 хвилин до 24 годин.

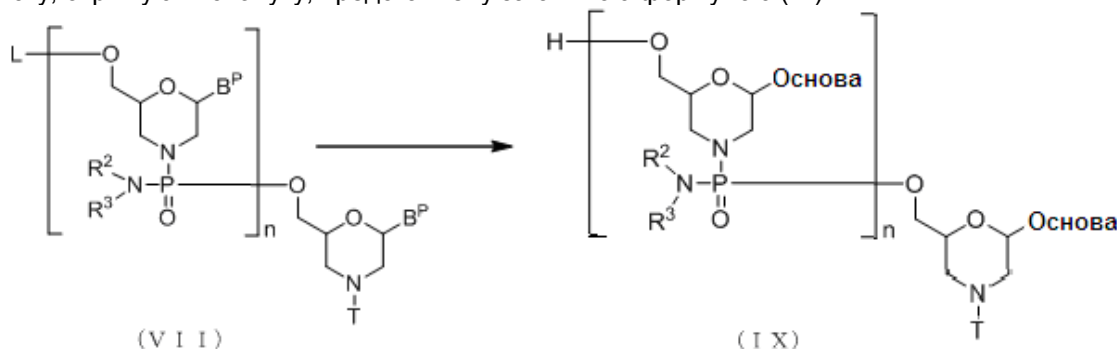
Крім того, після завершення даної стадії, можуть додавати ацилюючий агент, якщо це необхідно. "Ацилюючий агент" включає, наприклад, оцтовий ангідрид, ацетилхлорид та феноксіоцтовий ангідрид. Ацилюючий агент, крім того, може використовуватись у вигляді розбавлення відповідним розчинником в концентрації від 0,1 % до 30 %. Розчинник не обмежується конкретними представниками, оскільки він є інертним по відношенню до реакції, та включає, наприклад, дихлорметан, ацетонітрил, тетрагідрофуран та спирт(и) (етанол, ізопропанол, трифторетанол, тощо), воду, або їх суміш.

За необхідності, основа, така як піридин, лютидин, коллідін, триетиламін, діізопропілетиламін, N-етилморфолін, тощо, крім того, можуть використовуватись в комбінації з ацилюючим агентом. Кількість ацилюючого агента знаходиться, відповідним чином, в діапазоні від 0,1 молярного еквівалента до 10000 молярних еквівалентів, та переважно в діапазоні від 1 молярного еквівалента до 1000 молярних еквівалентів. Кількість основи знаходиться, відповідним чином, в діапазоні від, наприклад, 0,1 молярного еквівалента до 100 молярних еквівалентів, та переважно в діапазоні від 1 молярного еквівалента до 10 молярних еквівалентів, в розрахунку на 1 моль ацилюючого агента.

Температура реакції в даній реакції переважно знаходиться в діапазоні від 10 °C до 50 °C, більш переважно, в діапазоні від 10 °C до 50 °C, ще більш переважно, в діапазоні від 20 °C до 40 °C, та найбільш переважно, в діапазоні від 25 °C до 35 °C. Час реакції може варіювати в залежності від виду ацилюючого агента, який використовують, та температури реакції, та знаходиться, відповідним чином, в діапазоні від 0,1 хвилини до 24 годин в цілому, та переважно в діапазоні від 1 хвилини до 5 годин.

(3) Стадія С:

В сполуці (VII), отриманій на стадії В, захисну групу видаляють використовуючи агент зняття захисту, отримуючи сполуку, представлену загальною формулою (IX).



де основа, B<sup>p</sup>, L, n, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> та T мають такі самі значення, як визначено вище.

Дана стадія може виконуватись шляхом взаємодії сполуки (VII) з агентом зняття захисту.

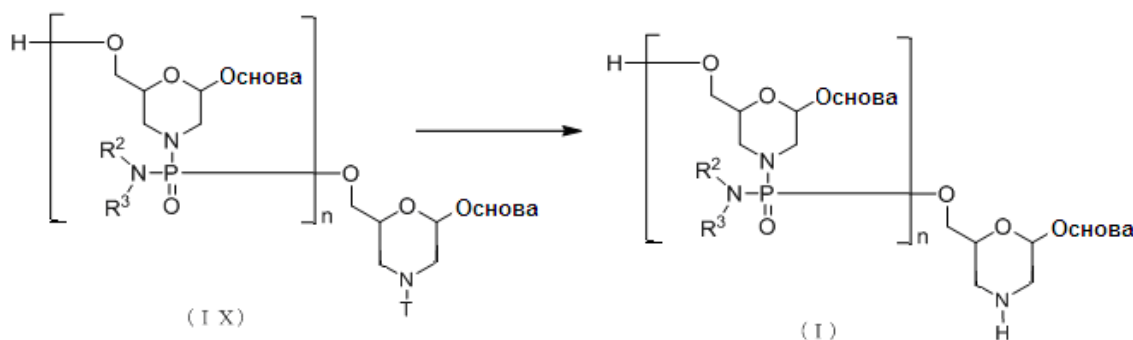
"Агент зняття захисту" включає, наприклад, конц. водний розчин аміаку та метиламін. "Агент зняття захисту", який використовують, на даній стадії, крім того, можуть використовуватись як розбавлення, наприклад, водою, метанолом, етанолом, ізопропіловим спиртом, ацетонітрилом, тетрагідрофураном, ДМФ, N, N-диметилімідазолідон, N-метилпіперидоном, або сумішшю даних розчинників. Серед них, переважним є етанол. Кількість агента зняття захисту, який використовують, знаходиться, відповідним чином, в діапазоні від, 1 молярного еквівалента до 100000 молярних еквівалентів, та переважно в діапазоні від 10 молярних еквівалентів до 1000 молярних еквівалентів, в розрахунку на 1 моль сполуки (VII).

Температура реакції знаходиться, відповідним чином, в діапазоні від 15 °C до 75 °C, переважно, в діапазоні від 40 °C до 70 °C, та більш переважно, в діапазоні від 50 °C до 60 °C. Час реакції зняття захисту може варіювати в залежності від виду сполуки (VII), температури реакції, тощо, та знаходиться, відповідним чином, в діапазоні від 10 хвилин до 30 годин, переважно від 30 хвилин до 24 годин, та більш переважно в діапазоні від 5 годин до 20 годин.

(4) Стадія D:



РМО (I) може бути отриманий шляхом взаємодії Сполуки (IX) отриманої на стадії С з кислотою:



де основа,  $n$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  та  $T$  мають такі самі значення, як визначено вище.

Дана стадія може виконуватись шляхом додавання кислоти до сполуки (IX).

"Кислота", яка може бути використана на даній стадії включає, наприклад, трихлороцтову кислоту, дихлороцтову кислоту, оцтову кислоту, фосфорну кислоту, соляну кислоту, тощо. Кислота, яку використовують, відповідним чином, використовують для того, щоб розчин міг мати рН в діапазоні від 0,1 до 4,0, та більш переважно, в діапазоні від рН 1,0 до 3,0. Розчинник не обмежується конкретними представниками, оскільки він є інертним по відношенню до реакції, та включає, наприклад, ацетонітрил, воду, або суміш даних розчинників.

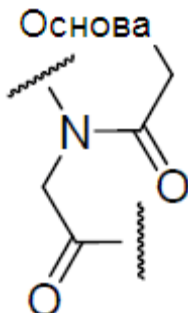
Температура реакції знаходиться, відповідним чином, в діапазоні від 10 °С до 50 °С, переважно, в діапазоні від 20 °С до 40 °С, та більш переважно, в діапазоні від 25 °С до 35 °С. Час реакції зняття захисту може варіювати в залежності від виду сполуки (IX), температури реакції, тощо, та знаходиться, відповідним чином, в діапазоні від 0,1 хвилини до 5 годин, переважно від 1 хвилини до 1 години, та більш переважно в діапазоні від 1 хвилини до 30 хвилин.

РМО (I) може бути отриманим шляхом обробки реакційної суміші, отриманої на даній стадії, загальноприйнятими способами розділення та очищення, такими як екстракція, концентрування, нейтралізація, фільтрування, центрифужне розділення, перекристалізація, хроматографія з оберненою фазою на колонці від  $C_8$  до  $C_{18}$ , катіонообмінна колонкова хроматографія, аніонообмінна колонкова хроматографія, гель-фільтраційна колоночна хроматографія, високоефективна рідинна хроматографія, діаліз, ультрафільтрація, тощо, самостійно або їх комбінацією. Таким чином, потрібний РМО (I) може бути виділений та очищений (дивись, наприклад, WO 1991/09033).

В процесі очищення РМО (I) з використанням хроматографії з оберненою фазою, наприклад, суміш розчинів 20 мМ триетиламін/ацетатного буфера та ацетонітрилу може використовуватись як розчинник для елюювання.

В процесі очищення РМО (I) з використанням іонообмінної хроматографії, наприклад, суміш розчинів 1 М сольового розчину та 10 мМ водного розчину гідроксиду натрію може використовуватись як розчинник для елюювання.

Пептидна нуклеїнова кислота представляє собою олігомер за представленим винаходом, який має групу, представлену наступною загальною формулою, як складову одиницю:



де основа має таке саме значення, як визначено вище.

Пептидну нуклеїнову кислоту можуть отримувати за посиланням, наприклад, наступні літературні джерела.

1) P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, Science, 254, 1497 (1991)

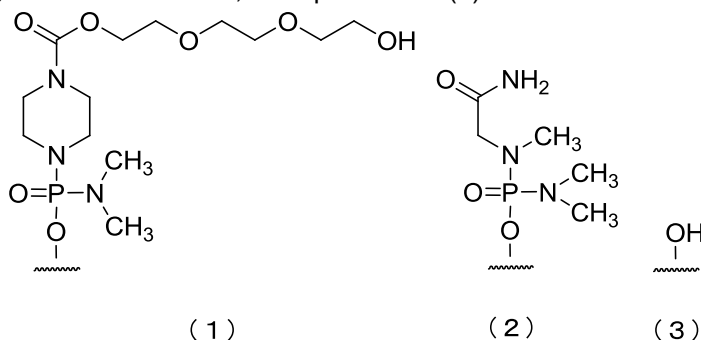
2) M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, JACS., 114, 1895 (1992)

3) K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpius, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, J. Org. Chem., 59, 5767 (1994)

4) L. Christensen, R. Fitzpatrick, B. Gildea, K. H. Petersen, H. F. Hansen, T. Koch, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, J. Coull, R. H. Berg, J. Pept. Sci., 1, 175 (1995)

5) T. Koch, H. F. Hansen, P. Andersen, T. Larsen, H. G. Batz, K. Otteson, H. Orum, J. Pept. Res., 49, 80 (1997)

В олігомері за представленим винаходом, 5' кінець може бути будь-якою з хімічних структур (1)-(3), зазначених нижче, та переважно є (3)-ОН.



Далі в даному документі групи, показані в (1), (2) та (3) вище зазначаються як "Група (1)," "Група (2)" та "Група (3)," відповідно.

## 2. Фармацевтичної композиція

Олігомер за представленим винаходом спричиняє пропуск екзона 51 з більш високою ефективністю в порівнянні з антисенсовими олігомерами з попереднього рівня техніки. Таким чином, очікується, що стани м'язової дистрофії можуть бути полегшені з високою ефективністю шляхом введення фармацевтичної композиції, яка містить олігомер за представленим винаходом, пацієнтам з DMD, які мають мутацією перетворення в рамках зчитування шляхом пропуску екзона 51, наприклад, пацієнтів з делецією екзона 29-50, пацієнтів з делецією екзона 50, пацієнтів з делецією екзона 45-50, пацієнтів з делецією екзона 48-50, пацієнтів з делецією екзона 49-50, пацієнтів з делецією екзона 52, пацієнтів з делецією екзона 52-63, пацієнтів з делецією екзона 13-50, пацієнтів з делецією екзона 19-50, пацієнтів з делецією екзона 43-50, або пацієнтів з делецією екзона 47-50. Наприклад, коли використовують фармацевтичну композицію, яка містить олігомер за представленим винаходом, то такі самі терапевтичні ефекти можуть бути досягнуті навіть при дозах менших, ніж ті, що для олігомерів з попереднього рівня техніки. Відповідно, побічні ефекти можуть бути зниженими, та таке є економічним.

В іншому варіанті здійснення, представлений винахід передбачає фармацевтичну композицію для лікування м'язової дистрофії, яка містить як активний інгредієнт олігомер за представленим винаходом, його фармацевтично прийнятну сіль або гідрат (далі в даному документі зазначається як "композиція за представленим винаходом").

Крім того, представлений винахід передбачає спосіб лікування м'язової дистрофії, який включає введення пацієнту з DMD олігомера за представленим винаходом.

У зазначеному способі лікування, олігомер за представленим винаходом можуть вводити у вигляді фармацевтичної композиції для лікування м'язової дистрофії.

Крім того, представлений винахід передбачає застосування олігомера за представленим винаходом у виробництві фармацевтичної композиції для лікування м'язової дистрофії та застосування олігомер за представленим винаходом для лікування м'язової дистрофії.

Приклади фармацевтично прийнятної солі олігомера за представленим винаходом, що міститься в композиції за представленим винаходом, включають солі лужних металів, такі як солі натрію, калію та літію; солі лужноземельних металів, такі як солі кальцію та магнію; солі металів, такі як солі алюмінію, заліза, цинку, міді, нікелю, кобальту тощо; солі амонію; солі органічних амінів, такі як солі трет-октиламіну, дибензиламіну, морфоліну, глюкозаміну, алкілового складного ефіру фенілгліцину, етилендіаміну, N-метилглюкаміну, гуанідину, діетиламіну, триетиламіну, дициклогексиламіну, N, N'-добензилетилендіаміну, хлорпрокаїну, прокаїну, діетаноламіну, N-бензилфенетиламіну, піперазину, тетраметиламонію, три(гідроксиметил)амінометану; гідрогалогенні солі, такі як солі гідрофторидів, гідрохлоридів, гідробромідів та гідройодидів; солі неорганічної кислоти, такі як нітрати, перхлорати, сульфати, фосфати, тощо; нижчі алкансульфонати, такі як метансульфонати, трифторметансульфонати та етансульфонати; арилсульфонати, такі як бензолсульфонати та п-толуолсульфонати; солі органічної кислоти, такі як ацетати, малати, фумарати, сукцинати, цитрати, тартрати, оксалати,

малеати, тощо; та солі амінокислоти, такі як солі гліцину, лізину, аргініну, орнітину, глутамінової кислоти та аспарагінової кислоти. Дані солі можуть бути одержані за відомими способами. Альтернативно, олігомер за представленим винаходом, який міститься в композиції за представленим винаходом може бути у вигляді свого гідрату.

Шляхи введення композиції за представленим винаходом не обмежується конкретними способами, оскільки вони є фармацевтично прийнятними шляхами введення, та можуть бути вибраними в залежності від способу лікування. З огляду на легкість доставки в м'язові тканини, переважним є внутрішньовенне введення, внутрішньоартеріального введення, внутрішньом'язове введення, підшкірне введення, пероральне введення, введення в тканини, трансдермальне введення, тощо. Крім того, дозовані форми, які є доступними для композиції за представленим винаходом, не обмежується конкретними представниками, та включають, наприклад, різні ін'єкції, пероральні агенти, крапельні внутрішньовенні вливання, інгаляції, мазі, лосьйони, тощо.

При введенні олігомера за представленим винаходом пацієнтам з м'язовою дистрофією, композиція за представленим винаходом може містити носій, який сприяє доставці олігомера до м'язових тканин. Такий носій не обмежується конкретними представниками, оскільки він є фармацевтично прийнятним, та приклади включають катіонні носії, такі як катіонні ліпосоми, катіонні полімери, тощо, або носії, що використовують вірусну оболонку. Катіонні ліпосоми представляють собою, наприклад, ліпосоми, які складаються з 2-O-(2-діетиламіноетил)карабамоїл-1,3-O-діолеїлгліцерину, та фосфоліпіди як основних компонентів (далі в даному документі зазначається як "ліпосома А"), олігофектамін (zareєстрована торгова марка) (виробництва компанії Invitrogen Corp.), ліпофектин (zareєстрована торгова марка) (виробництва компанії Invitrogen Corp.), ліпофектамін (zareєстрована торгова марка) (виробництва компанії Invitrogen Corp.), ліпофектамін 2000 (zareєстрована торгова марка) (виробництва компанії Invitrogen Corp.), DMR1E-C (zareєстрована торгова марка) (виробництва компанії Invitrogen Corp.), GeneSilencer (zareєстрована торгова марка) (виробництва компанії Gene Therapy Systems), TransMessenger (zareєстрована торгова марка) (виробництва компанії QIAGEN, Inc.), TransIT TCO (zareєстрована торгова марка) (виробництва компанії Mirus) та Nucleofector II (Lonza). Серед іншого, переважним є ліпосома А. Приклади катіонних полімерів включають JetSI (zareєстрована торгова марка) (виробництва компанії Qbiogene, Inc.) та Jet-PEI (zareєстрована торгова марка) (поліетиленамін, виробництва компанії Qbiogene, Inc.). Прикладом носія з використанням вірусної оболонки є GenomeOne (zareєстрована торгова марка) (HVJ-E ліпосома, виробництва компанії Ishihara Sangyo). Альтернативно, медичні пристрої, описані в патенті Японії № 2924179 та катіонні носії, описані в японській місцевій перепублікації заявок РСТ №№ 2006/129594 та 2008/096690, також можуть використовуватись.

Для отримання більш детальної інформації можна послатись на патент США № 4,235,871, патент США № 4,737,323, WO 96/14057, "New RRC, Liposomes: A practical approach, IRL Press, Oxford (1990) pages 33-104", тощо.

Концентрація олігомера за представленим винаходом, який міститься в композиції за представленим винаходом, може варіювати в залежності від виду носія, тощо, та знаходиться, відповідним чином, в діапазоні від 0,1 нМ до 100 мкМ, переважно в діапазоні від 100 нМ до 10 мкМ. Масове співвідношення олігомера за представленим винаходом, який міститься в композиції за представленим винаходом, та носія (носій/антисенсовий олігомер за представленим винаходом) може варіювати в залежності від властивості олігомеру, типу носія, тощо, та знаходиться, відповідним чином, в діапазоні від 0,1 до 100, переважно в діапазоні від 0,1 до 10.

На додаток до олігомер за представленим винаходом та носія, описаного вище, фармацевтично прийнятні добавки також можуть бути необов'язково включені в композицію за представленим винаходом. Приклади таких добавки включають емульгуючі допоміжні речовини (наприклад, жирні кислоти, які мають від 6 до 22 атомів вуглецю та їх фармацевтично прийнятні солі, альбумін та декстран), стабілізатори (наприклад, холестерин та фосфатидну кислоту), ізотонічні агенти (наприклад, хлориду натрію, глюкозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, трегалозу), та рН контролюючі агенти (наприклад, соляну кислоту, сірчану кислоту, фосфорну кислоту, оцтову кислоту, гідроксид натрію, гідроксид калію та триетаноламін). Одна або більше з даних добавок може використовуватись. Вміст добавок в композиції за представленим винаходом становить, відповідним чином, 90 мас. % або менше, переважно 70 мас. % або менше та більш переважно, 50 мас. % або менше.

Композиція за представленим винаходом може бути отримана шляхом додавання олігомера за представленим винаходом до дисперсії носія та достатнього перемішування суміші. Добавки можуть бути додані на відповідній стадії або перед або після додавання олігомера за

представленим винаходом. Водний розчинник, який може використовуватись в додаванні олігомера за представленим винаходом, не обмежується конкретними представниками, оскільки він є фармацевтично прийнятним, та приклади включають воду для ін'єкцій або дистильовану воду для ін'єкцій, електролітні рідини, такі як фізіологічний сольовий розчин, тощо, та рідини, які містять цукри, такі як глюкозна рідина, мальтозна рідина, тощо. Кваліфікований фахівець в даній галузі може, відповідним чином, вибрати умови щодо pH та температури для такої речовини.

Композицію за представленим винаходом можуть отримувати, наприклад, в рідкій формі та як її ліофілізований препарат. Ліофілізований препарат можуть отримувати за рахунок ліофілізації композиції за представленим винаходом в рідкій формі за загальноприйнятим способом. Ліофілізація може виконуватись, наприклад, шляхом відповідної стерилізації композиції за представленим винаходом в рідкій формі, розливу аліквоти в ємність контейнера, здійснення попереднього заморожування протягом 2 годин за умов приблизно від -40 до -20 °C, здійснення первинного висушування при приблизно від 0 до 10 °C при зниженому тиску, та потім здійснення вторинного висушування при приблизно від 15 до 25 °C при зниженому тиску. Загалом, ліофілізований препарат композиції за представленим винаходом може бути отриманим шляхом заміщення вмісту флакона на газоподібний азот та закупорювання.

Ліофілізований препарат композиції за представленим винаходом може використовуватись в цілому з моменту відновленні шляхом додавання необов'язкового прийнятного розчину (рідина для відновлення) та повторного розчинення препарату. Така рідина для відновлення включає воду для ін'єкції, фізіологічний сольовий розчин та інші інфузійні рідини. Об'єм рідини для відновлення може варіювати в залежності від призначеного застосування, тощо, не обмежується конкретними об'ємами, та становить відповідно від 0,5 до 2 рази більше, ніж об'єм перед ліофілізацією або не більше 500 мл.

Бажаним є контролювати дозу композиції за представленим винаходом, яка вводиться, шляхом прийняття до уваги наступних чинників: тип та дозована форма, що містить олігомер за представленим винаходом; стан пацієнтів, включаючи вік, масу тіла, тощо; шлях введення; та характеристики та ступінь захворювання. Добова доза розраховується як кількість антисенсового олігомера за представленим винаходом, яка, як правило, знаходиться в діапазоні від 0,1 мг до 10 г/людина, та переважно від 1 мг до 1 г/людина. Даний числовий діапазон може варіювати в деяких випадках в залежності від типу цільового захворювання, способу введення та цільової молекули. Таким чином, доза нижче, ніж діапазон, може бути достатньою в деяких випадках та навпаки в деяких випадках необхідною може бути доза вища, ніж діапазон. Композиція може вводиться від одного до декількох разів на день або з інтервалом від одного дня до декількох днів.

В ще одному варіанті варіант здійснення композиції за представленим винаходом, передбачається фармацевтична композиція, яка містить вектор, здатний експресувати олігонуклеотид за представленим винаходом та носій, описаний вище. Такий вектор експресії може представляти собою вектор здатний експресувати безліч олігонуклеотидів за представленим винаходом. Композиція може бути сформульованою з фармацевтично прийнятними добавками як у випадку композиції за представленим винаходом, яка містить олігомер за представленим винаходом. Концентрація вектора експресії, який міститься в композиції, може варіювати в залежності від типу носія, тощо, та знаходиться, відповідним чином, в діапазоні від 0,1 нМ до 100 мкМ, переважно в діапазоні від 100 нМ до 10 мкМ. Масове співвідношення вектора експресії, який міститься в композиції, та носія (носій/вектор експресії) може варіювати в залежності від властивості вектора експресії, типу носія, тощо, та знаходиться, відповідним чином, в діапазоні від 0,1 до 100, переважно в діапазоні від 0,1 до 10. Вміст носія, який міститься в композиції, є таким самим як у випадку з композицією за представленим винаходом, яка містить олігомер за представленим винаходом, та спосіб її отримання також є таким самим, як у випадку з композицією за представленим винаходом.

Далі в даному документі, представлений винахід буде описаний більш детально з посиланням на приклади та приклади дослідження, зазначені нижче, але не слід вважати, що винахід обмежується ними.

#### ПРИКЛАДИ

##### [ПРИКЛАД ПОРІВНЯННЯ 1]

4-{[(2S,6R)-6-(4-Бензамідо-2-оксопіримідин-1-іл)-4-триморфолін-2-іл]метокси}-4-оксобутанова кислота завантажена на амінополістирольну смолу

Стадія 1: Отримання 4-{[(2S,6R)-6-(4-бензамідо-2-оксопіримідин-1(2H)-іл)-4-триморфолін-2-іл]метокси}-4-оксобутанової кислоти

В атмосфері аргону, 3,44 г N-{1-[(2R,6S)-6-(гідроксиметил)-4- тритилморфолін-2-іл]-2-оксо-1,2-дигідропіримідин-4-іл}бензамід та 1,1 г 4-диметиламінопіридину (4-DMAP) суспендували в 50 мл дихлорметану, та 0,90 г бурштинового ангідриду додавали до суспензії з наступним перемішуванням при кімнатній температурі протягом 3 годин. До реакційної суміші додавали 10 мл метанолу, та суміш концентрували при зниженому тиску. Залишок екстрагували, використовуючи етилацетат та 0,5 М водний розчин дигідрофосфату калію. Отриманий в результаті органічний шар промивали послідовно 0,5 М водним розчином дигідрофосфату калію, водою та насиченим сольовим розчином в зазначеному порядку. Отриманий в результаті органічний шар сушили над сульфатом натрію та концентрували при зниженому тиску, отримуючи 4,0 г продукту.

Стадія 2: Отримання 4-[[{(2S,6R)-6-(4-бензамідо-2-оксопіримідин-1-іл)-4- тритилморфолін-2-іл]метокси]-4-оксобутанової кислоти, завантаженої на амінополістирольну смолу.

Після того, як 4,0 г 4-[[{(2S,6R)-6-(4-бензамідо-2-оксопіримідин-1(2H)-іл)-4- тритилморфолін-2-іл]метокси]-4-оксобутанової кислоти розчиняли в 200 мл піридину (безводного), 0,73 г 4-DMAP та 11,5 г 1-етил-3-(3-диметиламінопро- піл)карбодіїміді гідрохлориду додавали до розчину. Потім, 25,0 г амінополістирольної смоли первинної підложки 200 аміно (виробництва GE Healthcare Japan Co., Ltd., 17-5214-97) та 8,5 мл триетиламіну додавали до суміші, з наступним перемішуванням при кімнатній температурі протягом 4-х днів. Після завершення реакції, смолу виймали застосовуючи фільтрацію. Отриману в результаті смолу промивали послідовно піридином, метанолом та дихлорметаном в зазначеному порядку, та сушили при зниженому тиску. До отриманої в результаті смоли додавали 200 мл тетрагідрофурану (безводного), 15 мл оцтового ангідриду та 15 мл 2,6-лутидину, та суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 2 годин. Смолу виймали застосовуючи фільтрацію, промивали послідовно піридином, метанолом та дихлорметаном в зазначеному порядку та сушили при зниженому тиску, отримуючи 26,7 г продукту.

Кількість завантаження продукту визначали з молярної кількості тритилу на г смоли шляхом вимірювання УФ-поглинання на 409 нм з використанням відомого способу. Кількість завантаження смоли становила 192,2 мкмоль/г.

Умови УФ вимірювання

Пристрій: U-2910 (Hitachi, Ltd.)

Розчинник: метансульфонова кислота

Довжина хвилі: 265 нм

ε значення: 45000

Відповідно до опису в прикладах 1, 2 та прикладі порівняння 1, зазначених нижче, були синтезовані РМО, показані як РМО №№ 1-3 в таблиці 1. Синтезовані РМО розчиняли у воді для ін'єкції (виробництва компанії Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.).

Таблиця 1

№ РМО	Зазначення	SEQ ID NO:
1	5' кінець: група (3)	1
2	5' кінець: група (3)	2
3	Послідовність, яка відповідає SEQ ID NO; 588 в патентному документі 3, 5' кінець: група (3)	4

[Приклад 1]

РМО № 1

0,2 г 4-[[{(2S,6R)-6-(4-бензамідо-2-оксопіримідин-1(2H)-іл)-4- тритилморфолін-2-іл]метокси]-4-оксобутанової кислоти, нанесеної на амінополістирольну смолу (Приклад порівняння 1) (26 мкмоль) завантажували в колонку з фільтруючим мундштуком. Потім синтетичний цикл, зображений нижче починали, використовуючи установку з синтезу нуклеїнової кислоти (АКТА Oligoripilot 10 plus). Потрібну морфолінову мономерну сполуку додавали в кожному циклі сполучення, отримуючи нуклеотидну послідовність названої сполуки (дивись таблицю 2, наведену нижче).

Таблиця 2

Стадія	Реагент	Об'єм (мл)	Час (хв.)
1	деблокуючий розчин	18-32	1,8-3,2
2	розчин для нейтралізації та промивання	30	1,5
3	розчин для сполучення В	5	0,5
4	розчин для сполучення А	1,3	0,25
5	реакція сполучення застосовуючи реагенти, які додавали на стадіях 3 та 4		120-300
6	ацетонітрил	20	1,0
7	розчин для кепірування	9	2,0
8	ацетонітрил	30	2,0

Деблокуючий розчин, який використовували, представляв собою розчин дихлорметану, який містив 3 % (мас./об.) трифтороцтової кислоти. Розчин для нейтралізації та промивання, який використовували, представляв собою розчин, отриманий шляхом розчинення N, N-діізопропілетиламіну, щоб становити 10 % (об./об.) та тетрагідрофурану, щоб становити 5 % (об./об.) в дихлорметані, який містив 35 % (об./об.) ацетонітрилу. Розчин для сполучення А, який використовували, представляв собою розчин, отриманий шляхом розчинення морфолінової мономерної сполуки в тетрагідрофурані, щоб становити 0,10 М. Розчин для сполучення В, який використовували, представляв собою розчин, отриманий шляхом розчинення N, N-діізопропілетиламіну, щоб становити 20 % (об./об.) та тетрагідрофурану, щоб становити 10 % (об./об.) в ацетонітрилі. Розчин для кепірування, який використовували, представляв собою розчин, отриманий шляхом розчинення 20 % (об./об.) оцтового ангідриду та 30 % (об./об.) 2,6-лутидину в ацетонітрилі.

Амінополістирольну смолу, завантажену з РМО, синтезованим вище, виділяли з реакційної ємності та сушили при кімнатній температурі протягом щонайменше 2 годин при зниженому тиску. Висушений РМО, нанесений на амінополістирольну смолу, завантажували в реакційну ємність, та 5 мл суміші 28 % водний аміак-етанол (1/4) додавали туди. Суміш перемішували при 55 °С протягом 15 годин. Амінополістирольну смолу відокремлювали фільтрацією та промивали 1 мл суміші вода-етанол (1/4). Отриманий в результаті фільтрат концентрували при зниженому тиску. Отриманий в результаті залишок розчиняли в 10 мл суміші розчинників з 20 мМ оцтової кислоти - триетиламінового буфера (TEAA буфер) та 10 мл ацетонітрилу (4/1) та фільтрували через мембранний фільтр. Отриманий фільтрат чистили, використовуючи ВЕРХ з оберненою фазою. Умови, які використовували, є такими, як показано в таблиці 3 нижче.

Таблиця 3

Колонка	XBridge 5 мкм C18 (Waters, ф19×50 мм, 1 CV=14 мл)
Швидкість потоку	10 мл/хв.
Температура колонки	кімнатна температура
Розчин А	20 мМ TEAA буфер
Розчин В	CH <sub>3</sub> CN
Градiєнт	(В) конц. 10→70 % /15 CV

CV: об'єм колонки

Кожну фракцію аналізували, та виділяли цільовий продукт та концентрували при зниженому тиску. До концентрованого залишку додавали 0,5 мл 2 М водного розчину фосфорної кислоти, та суміш перемішували протягом 15 хвилин. Крім того, додавали 2 мл 2 М водного розчину натрію гідроксиду, суміш стала лужної з подальшим фільтруванням через мембранний фільтр (0,45 мкм).

Отриманий в результаті водний розчин, який містить цільовий продукт чистили, використовуючи колонку з аніоннообмінною смолою. Умови, які використовують, є такими, як показано в таблиці 4 нижче.

Таблиця 4

Колонка	Source 15Q (GE Healthcare, $\phi 10 \times 108$ мм, 1 CV=8,5 мл)
Швидкість потоку	8,5 мл/хв.
Температура колонки	кімнатна температура
Розчин А	10 мМ водний розчин натрію гідроксиду
Розчин В	10 мМ водний розчин натрію гідроксиду, 1 М водний розчин хлориду натрію
Гradient	(В) конц. 1→50 % / 40CV

- 5 Кожну фракцію аналізували (за ВЕРХ) та отримували цільовий продукт у вигляді водного розчину. До отриманого в результаті водного розчину додавали 0,1 М фосфатний буфер (pH 6,0) для нейтралізації. Далі, отриману суміш де мінералізували, використовуючи ВЕРХ з оберненою фазою в умовах, описаних в таблиці 5 нижче.

Таблиця 5

Колонка	XBridge 5 мкм C8 (Waters, $\phi 10 \times 50$ мм, 1 CV=4 мл)
Швидкість потоку	4 мл/хв.
Температура колонки	60 °C
Розчин А	воду
Розчин В	CH <sub>3</sub> CN
Гradient	(В) конц. 0→50 % / 20CV

- 10 Цільовий продукт виділяли та суміш концентрували при зниженому тиску. Отриманий в результаті залишок розчиняли у воді. Отриманий водний розчин сушили при замороженні, отримуючи цільову сполуку у вигляді білої бавовноподібної твердої речовини.

ESI-TOF-MS Розраховано: 10021,46

Знайдено: 10021,91

[Приклад 2]

- 15 РМО № 2

Названу сполуку отримували відповідно до процедури з прикладу 1.

ESI-TOF-MS Розраховано: 9916,71

Знайдено: 9916,43

[ПРИКЛАД ПОРІВНЯННЯ 1]

- 20 РМО No. 3

Названу сполуку отримували відповідно до процедури з прикладу 1.

ESI-TOF-MS Розраховано: 9949,46

Знайдено: 9949,41

[Приклад дослідження 1]

- 25 In vitro аналіз

Експерименти проводили, використовуючи антисенсові олігомери РМО №№ 1 та 2 за представленим винаходом та антисенсовий олігомер РМО № 3. Послідовності різних антисенсових олігомерів наведені в таблиці 6 нижче.

Таблиця 6

Нуклеотидна послідовність	РМО №
CGGTAAGTTCTGTCTCAAGGAAGATGGCA	1
CTCATACSTTCTGCTTCAAGGAAGATGGCA	2
CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	3

- 30

Використовуючи Amaha Cell Line Nucleofector Kit L на Nucleofector II (Lonza), 0,3, 1, 3, 10 мкМ олігомерів РМО №№ 1 та 2 за представленим винаходом та антисенсовий олігомер РМО № 3 були трансфіковані з  $3,5 \times 10^5$  RD клітин (клітинна лінія рабдоміосаркоми людини). Використовували програму T-030.

Після трансфекції клітини культивували протягом трьох днів в 2 мл мінімального есенціального середовища Ігла (ЕМЕМ) (виробництва компанії Sigma, далі в даному документі те ж саме), яке містить 10 % фетальної телячої сироватки (FCS) (виробництва компанії Invitrogen) в умовах 37 °C та 5 % CO<sub>2</sub>. клітини промивали PBS (виробництва компанії Nissui, далі в даному документі те ж саме) та 500 мкл ISOGEN II (виробництва компанії Nippon Gene) додавали до клітин. Після того, як клітинам давали постояти при кімнатній температурі протягом декількох хвилин, щоб лізувати клітини, лізат збирали в пробірку Еппендорфа. Загальну РНК екстрагували відповідно до протоколу, що додається до ISOGEN. Концентрацію екстрагованої загальної РНК визначали з використанням NanoDrop ND-1000 (виробництва компанії LMS).

Одностадійний ОТ-ПЛР проводили з 400 нг екстрагованої загальної RNA, використовуючи набір Qiagen для одностадійної ОТ-ПЛР (виробництва компанії Qiagen). Реакційний розчин отримували відповідно до протоколу, що додається до набору. PTC-100 (виробництва компанії MJ Research) використовували як термічний пристрій для керування циклами. ОТ-ПЛР програма, яку використовують, є такою, як наведено далі.

50 °C, 30 хвилин: реакція зворотної транскрипції

95 °C, 15 хвилин: теплова денатурація

[94 °C, 30 секунд; 60 °C, 30 секунд; 72 °C, 60 секунд] x 35 циклів: ПЛР ампліфікація

72 °C, 10 хвилин: кінцева елонгація.

Нуклеотидні послідовності прямого праймера та зворотного праймера, які використовують для ОТ-ПЛР наведені нижче.

Прямий праймер: 5'- CTGAGTGGAAGGCGGTAAAC-3' (SEQ ID NO: 5)

Зворотний праймер: 5'- GAAGTTTCAGGGCCAAGTCA-3' (SEQ ID NO: 6)

Продукт реакції, 1 мкл ОТ-ПЛР, зазначеної вище, аналізували з використанням Bioanalyzer (виробництва компанії Agilent Technologies, Inc.). Вимірювали рівень полінуклеотиду "А" смуги з пропуском екзона 51 та рівень полінуклеотиду "В" смуги без пропуску екзона 51. На основі даних значень вимірювання "А" та "В", ефективність пропуску визначали за наступним рівнянням:

Ефективність пропуску (%) = A / (A+B) × 100

Експериментальні результати

Результати показані на ФІГ. 1. Даний експеримент показав, що антисенсові олігомери за представленим винаходом можуть спричиняти пропуск екзона 51 з помітно більшою ефективністю, ніж антисенсовий олігомер РМО № 3.

[Приклад 3]

РМО №№ 4-6

Названу сполуку отримували відповідно до методики з прикладу 1. Послідовності різних антисенсових олігомерів наведені нижче.

Таблиця 7

№ РМО	Послідовності	ESI-TOF-MS		Зазначення	SEQ ID NO
		М.М.	Знайдено		
4	AACATCAAGGAAGATGGCATT	7007.96	7007.97	5' кінець: група (3)	7
5	TCCAACATCAAGGAAGATGGC	6968.97	6968.42	5' кінець: група (3)	8
6	ACCTCCAACATCAAGGAAGAT	6912.91	6912.85	5' кінець: група (3)	9

[Приклад 4]

2'-О-метокси- фосфоротіоати, показані в SEQ ID NO: з 9 до 33

Різні антисенсові олігомери з назви отримували шляхом аутсорсингу від Japan Bio Service Co. Послідовності різних антисенсових олігомерів наведені в таблиці 8.



Таблиця 8

№ послідовності	Послідовність	ESI-TOF-MS	
		М.М.	Знайдено
10	GAGU AACAGUCUGAGUAGGAG	7453	7452,876
11	UGUGUACCCAGAGU AACAGUC	7310	7313,793
12	AACCACAGGUUGUGUACCCAG	7309	7311,199
13	UUUCCUUAGU AACCCAGGUU	7209	7211,436
14	GAGAUUGCAGUUUCCUUAGUA	7328	7331,388
15	UUCUAGUUUGGAGAUUGCAGU	7345	7347,440
16	AAGAUUGC AUUUUCUAGUUUGG	7329	7329,982
17	AACAUCAAGGAAGAUUGC AUU	7381	7381,059
18	AGGUACCUCCAACAUCAAGGA	7316	7318,395
19	CUGCCAGAGCAGGUACCUCCA	7284	7286,932
20	CGGUUGAAAUUCUGCCAGAGCA	7349	7351,895
21	UGUCCAAGCCCGGUUGAAAUUC	7286	7286,00
22	CGGUAAGUUCUGUCCAAGCCC	7262	7262,929
23	GAAAGCCAGUCGGUAAGUUCU	7350	7351,869
24	AUCAAGCAGAGAAAGCCAGUC	7379	7378,383
25	UUUAUAACUUGAUCAAGCAGAG	7319	7320,149
26	CUCUGUGAUUUUAUAACUUGA	7211	7212,295
27	CACCAUCACCCUCUGUGAUUU	7144	7145,555
28	CAAGGUCACCCACCAUCACCC	7187	7187,709
29	UUGAUAUCCUCAAGGUCACCC	7207	7210,071
30	GAUCAUCUCGUUGAUAUCCUC	7185	71882,39
31	UCUGCUUGAUGAUCAUCUCGU	7202	7203,926
32	GGCAUUUCUAGUUUGGAGAUG	7346	7346,562
33	CAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG	7375	7375,678
34	CCUCCAACAUCAAGGAAGAUG	7317	7318,343

## ПРОМИСЛОВА ПРИДАТНІСТЬ

- 5 Експериментальні результати в прикладах досліджень демонструють, що олігомери за представленим винаходом спричиняють пропуск екзона 51 з помітно високою ефективністю в RD клітинах. Таким чином, олігомери за представленим винаходом є надзвичайно корисними в лікуванні DMD.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> NIPPON SHINYAKU CO., LTD.  
NATIONAL CENTER OF NEUROLOGY AND PSYCHIATRY

<120> АНТИСЕНСОВА НУКЛЕЇНОВА КИСЛОТА

<130> G1311WO

<150> JPA2014-48897  
<151> 2014-03-12

<160> 34

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 30  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтетична нуклеїнова кислота

<400> 1  
cggtaaagtc tgcctcaag gaagatggca 30

<210> 2  
<211> 30  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтетична нуклеїнова кислота

<400> 2  
ctcatacctt ctgctcaag gaagatggca 30

<210> 3  
<211> 233  
<212> ДНК  
<213> Homo sapiens

<400> 3  
ctctactca gactgttact ctggtgacac aacctgtggt tactaaggaa actgccatct 60  
ccaaactaga aatgccatct tcttgatgt tggaggtacc tgctctggca gattcaacc 120  
gggcttggac agaacttacc gactggcttt ctctgcttga tcaagttata aaatcacaga 180  
gggtgatggt gggtgacctt gaggatatca acgagatgat catcaagcag aag 233

<210> 4  
 <211> 30  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> Синтетична нуклеїнова кислота  
  
 <400> 4  
 ctccaacatc aaggaagatg gcatttctag 30

<210> 5  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> Синтетична нуклеїнова кислота  
  
 <400> 5  
 ctgagtggaa ggcggtaaac 20

<210> 6  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> Синтетична нуклеїнова кислота  
  
 <400> 6  
 gaagtttcag ggccaagtca 20

<210> 7  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> Синтетична нуклеїнова кислота  
  
 <400> 7  
 aacatcaagg aagatggcat t 21

<210> 8  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>		
<223>	Синтетична нуклеїнова кислота	
<400>	8	
	tccaacatca aggaagatgg c	21
<210>	9	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Синтетична нуклеїнова кислота	
<400>	9	
	acstccaaca tcaaggaaga t	21
<210>	10	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Синтетична нуклеїнова кислота	
<400>	10	
	gaguaacagu cugaguagga g	21
<210>	11	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Синтетична нуклеїнова кислота	
<400>	11	
	ugugisacca gaguaacagu c	21
<210>	12	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Синтетична нуклеїнова кислота	
<400>	12	
	аассасaggi ugugisacca g	21

<210> 13	
<211> 21	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Синтетична нуклеїнова кислота	
<400> 13	
uuuccuagu aaccasaggu u	21
<210> 14	
<211> 21	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Синтетична нуклеїнова кислота	
<400> 14	
gagauggcag uuuccuagu a	21
<210> 15	
<211> 21	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Синтетична нуклеїнова кислота	
<400> 15	
uuuaguuug gagauggcag u	21
<210> 16	
<211> 21	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Синтетична нуклеїнова кислота	
<400> 16	
aagauggcau uuuaaguuug g	21
<210> 17	
<211> 21	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	

<220>		
<223> Синтетична нуклеїнова кислота		
<400> 17		
аасаусаagg аагаuggсаи u	21	
<210> 18		
<211> 21		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Синтетична нуклеїнова кислота		
<400> 18		
agguассисс аасаусаagg а	21	
<210> 19		
<211> 21		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Синтетична нуклеїнова кислота		
<400> 19		
сигссаgаgс agguассисс а	21	
<210> 20		
<211> 21		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Синтетична нуклеїнова кислота		
<400> 20		
сggиигаааи сигссаgаgс а	21	
<210> 21		
<211> 21		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Синтетична нуклеїнова кислота		
<400> 21		
игиссаagсс сggиигаааи с	21	

<210>	22	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Синтетична нуклеїнова кислота	
<400>	22	
cgguaaguuc ugucsaagcc c		21
<210>	23	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Синтетична нуклеїнова кислота	
<400>	23	
gaaagccagu cgguaaguuc u		21
<210>	24	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Синтетична нуклеїнова кислота	
<400>	24	
aucaagcaga gaaagccagu c		21
<210>	25	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Синтетична нуклеїнова кислота	
<400>	25	
uaaiaacuuug aucaagcaga g		21
<210>	26	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	

<220>

<223> Синтетична нуклеїнова кислота

<400> 26

cucugugauu uuaaaciug a

21

<210> 27

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична нуклеїнова кислота

<400> 27

сассаусасс cucugugauu u

21

<210> 28

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична нуклеїнова кислота

<400> 28

сааггусасс сассаусасс с

21

<210> 29

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична нуклеїнова кислота

<400> 29

уугауаусси сааггусасс с

21

<210> 30

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична нуклеїнова кислота

<400> 30

гаусауссг уугауаусси с

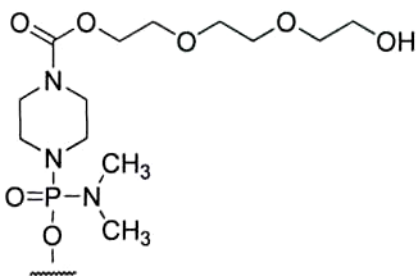
21



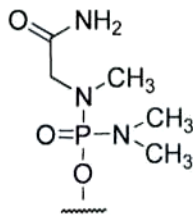
<210> 31	
<211> 21	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Синтетична нуклеїнова кислота	
<400> 31	
ucugcuugau gaucaucug u	21
<210> 32	
<211> 21	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Синтетична нуклеїнова кислота	
<400> 32	
ggcauuuca guuuggagau g	21
<210> 33	
<211> 21	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Синтетична нуклеїнова кислота	
<400> 33	
саaggaagau ggcauuuca g	21
<210> 34	
<211> 21	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Синтетична нуклеїнова кислота	
<400> 34	
ссссаасаа саaggaagau g	21

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Антисенсовий олігомер, який вибирають з групи, яка складається з (е) та (ф), зазначених  
нижче, або його фармацевтично прийнятна сіль або гідрат, де  
(е) антисенсовий олігомер, який містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1 або 2;  
та  
(ф) антисенсовий олігомер, який містить нуклеотидну послідовність, яка має делецію, заміщення,  
вставку та/або додавання від 1 до 3 нуклеотидів в нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1 або  
2, та має активність, щоб викликати пропуск 51-ого екзону в гені дистрофіну людини.
2. Антисенсовий олігомер за пунктом 1, який являє собою олігонуклеотид або його  
фармацевтично прийнятну сіль або гідрат.
3. Антисенсовий олігомер за пунктом 2 або його фармацевтично прийнятна сіль або гідрат, в  
якому цукровий фрагмент та/або зв'язуюча фосфат ділянка щонайменше одного нуклеотиду, з  
якого складається олігонуклеотид, є модифікованими.
4. Антисенсовий олігомер за пунктом 2 або 3 або його фармацевтично прийнятна сіль або  
гідрат, в якому цукровий фрагмент щонайменше одного нуклеотиду, з якого складається  
олігонуклеотид, являє собою рибозу, в якій 2'-ОН-група заміщується на будь-яку групу, вибрану  
з групи, яка складається з OR, R, R'OR, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NR<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, CN, F, Cl, Br та I, де R являє  
собою алкіл або арил, та R' являє собою алкілен.
5. Антисенсовий олігомер за будь-яким одним з пунктів 2-4 або його фармацевтично прийнятна  
сіль або гідрат, в якому зв'язуюча фосфат ділянка щонайменше одного нуклеотиду, з якого  
складається олігонуклеотид, являє собою будь-яку ділянку, вибрану з групи, яка складається з  
фосфоротіоатного зв'язку, фосфородітіоатного зв'язку, алкілфосфонатного зв'язку,  
фосфорамідатного зв'язку та боранофосфатного зв'язку.
6. Антисенсовий олігомер за пунктом 1, який являє собою морфоліноолігомер, або його  
фармацевтично прийнятна сіль або гідрат.
7. Антисенсовий олігомер за пунктом 6, який являє собою фосфородіамідатний  
морфоліноолігомер, або його фармацевтично прийнятна сіль або гідрат.
8. Антисенсовий олігомер за будь-яким одним з пунктів 6 або 7 або його фармацевтично  
прийнятна сіль або гідрат, в якому 5'-кінець являє собою будь-яку ділянку з хімічних формул  
(1)-(3), зазначених нижче:



, (1)



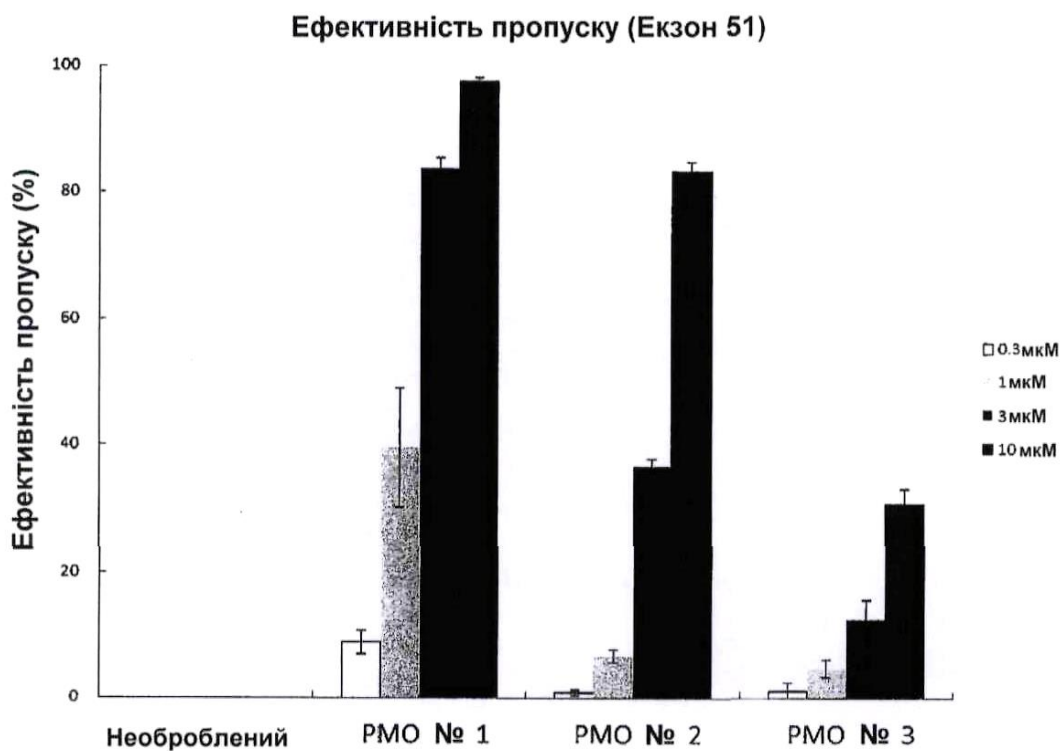
, (2)



. (3)

9. Фармацевтична композиція для лікування м'язової дистрофії, яка містить як активний  
інгредієнт антисенсовий олігомер або його фармацевтично прийнятну сіль або гідрат за будь-  
яким одним з пунктів 1-8.
10. Фармацевтична композиція за пунктом 9, яка містить фармацевтично прийнятний носій.
11. Спосіб лікування м'язової дистрофії, який включає введення пацієнту з м'язовою дистрофією  
антисенсового олігомера за будь-яким одним з пунктів 1-8 або фармацевтичної композиції за  
пунктом 9 або 10.
12. Спосіб лікування за пунктом 11, в якому пацієнт з м'язовою дистрофією є пацієнтом з  
делеціями нуклеотидів в межах екзонів 29-50, 50, 45-50, 48-50, 49-50, 52, 52-63, 13-50, 19-50, 43-  
50 або 47-50.
13. Спосіб лікування за пунктом 11 або 12, в якому пацієнтом є людина.
14. Застосування антисенсового олігомера або його фармацевтично прийнятної солі або гідрату  
за будь-яким одним з пунктів 1-8 у виробництві фармацевтичної композиції для лікування  
м'язової дистрофії.
15. Антисенсовий олігомер або його фармацевтично прийнятна сіль або гідрат за будь-яким  
одним з пунктів 1-8 для застосування в лікуванні м'язової дистрофії.

16. Антисенсовий олігомер або його фармацевтично прийнятна сіль або гідрат за пунктом 15, де пацієнт з м'язовою дистрофією в зазначеному лікуванні є пацієнтом з делеціями нуклеотидів в межах екзонів 29-50, 50, 45-50, 48-50, 49-50, 52, 52-63, 13-50, 19-50, 43-50 або 47-50.
17. Антисенсовий олігомер або його фармацевтично прийнятна сіль або гідрат за пунктом 15 або 16, в якому пацієнтом є людина.



Фіг. 1

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,  
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601