

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045808**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.12.27**

(21) Номер заявки  
**202291813**

(22) Дата подачи заявки  
**2020.12.25**

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)  
*A61K 31/7088* (2006.01)  
*A61P 21/04* (2006.01)

---

(54) **АНТИСМЫСЛОВАЯ НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, КОТОРАЯ ИНДУЦИРУЕТ  
ПРОПУСК ЭКЗОНА 50**

---

(31) **2019-236704**

(32) **2019.12.26**

(33) **JP**

(43) **2022.08.15**

(86) **PCT/JP2020/048803**

(87) **WO 2021/132591 2021.07.01**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**НИПОН СИНЯКУ КО.,  
ЛТД.; НЭШНЛ СЕНТЕР  
ОФ НЬЮРОЛОДЖИ ЭНД  
САЙКАЙЭТРИ (JP)**

(72) Изобретатель:  
**Эниа Юкико, Сунадои Юта, Ваки  
Рейко, Мутима Канаме, Такеда  
Син'ити, Аоки Йосицугу (JP)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(56) JP-A-2012506703  
WO-A1-2013100190  
US-A1-20190330626  
WU, B. et al. "Targeted skipping of human  
dystrophin exons in transgenic mouse model  
systemically for antisense drug development", PLoS  
One, 2011, vol. 6(5):el9906, pp. 1-11, entire text

---

(57) В изобретении предлагается лекарственное средство, которое вызывает высокоэффективный пропуск экзона 50 в гене дистрофина человека. В изобретении предлагается антисмысловый олигомер, который индуцирует пропуск экзона 50 в гене дистрофина человека.

---

**B1**

**045808**

**045808**

**B1**

### Область техники

Изобретение относится к антисмысловому олигомеру, который индуцирует пропуск экзона 50 в человеческом гене дистрофина, и к фармацевтической композиции, содержащей антисмысловый олигомер.

#### Предшествующий уровень техники

Миодистрофия Дюшенна (МДД) представляет собой наиболее частую и тяжелую форму наследственной прогрессирующей мышечной атрофии, которая развивается примерно у 3500 новорожденных мальчиков. Хотя двигательные функции пациентов с МДД редко отличаются от здоровых людей в младенчестве и детстве, мышечную слабость наблюдают у детей примерно от 4 до 5 лет. Затем мышечная слабость у пациентов с МДД прогрессирует до потери способности ходить примерно к 12 годам и смерти от сердечной или дыхательной недостаточности в 20 лет. В настоящее время не существует достаточной терапии для МДД, и существует сильная потребность в разработке эффективного терапевтического средства.

Известно, что МДД вызывает мутация в гене дистрофина. Ген дистрофина расположен на X-хромосоме и представляет собой огромный ген, состоящий из 2,2 миллионов пар оснований ДНК. ДНК транскрибируется в предшественники мРНК, а интроны удаляются путем сплайсинга для синтеза мРНК из 11058 оснований, соответствующих транскрибируемой области, в которой 79 экзонов соединены вместе. Эта мРНК транскрибируется в 3685 аминокислот для производства белка дистрофина. Белок дистрофина связан с поддержанием мембранной стабильности в мышечных клетках и необходим для того, чтобы сделать мышечные клетки менее хрупкими. Ген дистрофина у пациентов с МДД содержит мутацию и, таким образом, редко экспрессируется белок дистрофина, который является функциональным в мышечных клетках. Таким образом, структура мышечных клеток не может поддерживаться в организме пациентов с МДД, что приводит к большому притоку ионов кальция в мышечные клетки. Таким образом, возникает воспалительно-подобный ответ, способствующий фиброзу, что затрудняет регенерацию мышечных клеток.

Миодистрофию Беккера (МДБ) также вызывает мутация в гене дистрофина. Симптомы включают мышечную слабость, сопровождающуюся атрофией мышц, но, как правило, они слабо выражены и прогрессируют медленно, по сравнению с МДД. Во многих случаях ее начало приходится на взрослый возраст. Считается, что различия в клинических симптомах между МДД и МДБ заключаются в том, нарушена ли мутацией рамка считывания аминокислот при трансляции мРНК дистрофина в белок дистрофина (непатентная литература 1). Более конкретно, при МДД присутствует мутационный сдвиг рамки считывания аминокислот и, тем самым, функциональный белок дистрофина экспрессируется редко, тогда как при МДБ вырабатывается белок дистрофина, который функционирует, хотя и несовершенно, поскольку сохранена рамка считывания аминокислот, в то время как часть экзонов удалена мутацией.

Ожидается, что пропуск экзона будет служить способом лечения МДД. Этот способ включает модификацию сплайсинга для восстановления аминокислотной рамки считывания мРНК дистрофина и индукции экспрессии белка дистрофина с частично восстановленной функцией (непатентная литература 2). Часть аминокислотной последовательности, которая является мишенью пропуска экзона, будет потеряна. По этой причине белок дистрофина, экспрессируемый при таком лечении, становится короче, чем обычно, но, поскольку аминокислотная рамка считывания сохраняется, функция стабилизации мышечных клеток частично сохраняется. Таким образом, ожидается, что пропуск экзона приведет МДД к симптомам, подобным симптомам МДБ, которая протекает мягче. Пропуск экзона был испытан на животных с использованием мышей или собак и в настоящее время его оценивают в клинических испытаниях на людях с МДД.

Пропуск экзона можно индуцировать связыванием антисмысловых нуклеиновых кислот, нацеленных либо на 5'-, либо на 3'-сайт сплайсинга, либо на оба сайта, либо на сайты внутри экзона. Экзон будет включен в мРНК только тогда, когда оба его сайта сплайсинга распознаются сплайсосомным комплексом. Таким образом, пропуск экзона можно индуцировать нацеливанием антисмысловых нуклеиновых кислот на сайты сплайсинга. Кроме того, связывание белка SR с энхансером сплайсинга экзонов (ESE) считается необходимым для того, чтобы экзон распознавался механизмом сплайсинга. Таким образом, пропуск экзона также можно индуцировать нацеливанием на ESE.

Поскольку мутация гена дистрофина может варьировать в зависимости от пациентов с МДД, антисмысловые нуклеиновые кислоты необходимо разрабатывать на основе сайта или типа соответствующей генетической мутации. В прошлом антисмысловые нуклеиновые кислоты, вызывающих пропуск экзона для всех 79 экзонов, производили Steve Wilton, et al., Университет Западной Австралии (непатентная литература 3), а антисмысловые нуклеиновые кислоты, вызывающих пропуск экзона для 39 экзонов, производили Annemieke Aartsma-Rus, et al., Нидерланды (непатентная литература 4).

Считают, что примерно 4% всех пациентов с МДД можно лечить пропуском 50-го экзона (далее в настоящем документе обозначаемый как "экзон 50") (непатентная литература 5). В последние годы несколько исследовательских организаций, в том числе заявитель, сообщили об исследованиях, в которых экзон 50 в гене дистрофина был мишенью для пропуска экзона (патентная литература с 1 по 6 и непатентная литература 6).

### Список цитирования

Патентная литература.

Патентная литература 1. Международная публикация WO 2013/100190.

Патентная литература 2. Международная публикация WO 2004/048570.

Патентная литература 3. Международная публикация WO 2006/000057.

Патентная литература 4. Международная публикация WO 2010/050802.

Патентная литература 5. Международная публикация WO 2010/048586.

Патентная литература 6. Международная публикация WO 2011/057350.

Непатентная литература.

Непатентная литература 1. Monaco A.P. et al., Genomics 2:90-95 (1988).

Непатентная литература 2. Matsuo M., Brain and Development 18:167-172 (1996).

Непатентная литература 3. Wilton S.D. et al., Molecular Therapy 15:1288-96 (2007).

Непатентная литература 4. Annemieke Aartsma-Rus et al., Neuromuscular Disorders 12:S71-S77 (2002).

Непатентная литература 5. Bladen C.L. et al., Human Mutation 36:395-402 (2015).

Непатентная литература 6. Bo Wu et al., PLoSOne 6(5):e19906 (2011).

### Сущность изобретения

Техническая задача.

При указанных выше обстоятельствах были желательны новые антисмысловые олигомеры, которые индуцируют пропуск экзона 50 в гене дистрофина с высокой эффективностью. Кроме того, желательны антисмысловые олигомеры, которые обладают превосходными физическими свойствами (например, растворимостью) в качестве лекарственных средств, сохраняя при этом активность по индукции пропуска экзона 50 в гене дистрофина с высокой эффективностью.

Решение задачи.

В результате детального изучения технического содержания вышеуказанных документов и структуры гена дистрофина авторы настоящего изобретения обнаружили, что пропуск экзона 50 в гене дистрофина человека с высокой эффективностью индуцируется введением антисмыслового олигомера, имеющего последовательность оснований, представленную любой из SEQ ID NO: 3-5. Авторы настоящего изобретения также обнаружили, что антисмысловый олигомер обладает превосходной растворимостью, индуцируя пропуск экзона 50 в гене дистрофина человека с высокой эффективностью. Основываясь на этом открытии, авторы настоящего изобретения выполнили настоящее изобретение.

Таким образом, настоящее изобретение заключается в следующем.

Антисмысловый олигомер, который выбран из группы, состоящей из (a)-(d) ниже:

a) антисмысловый олигомер, содержащий последовательность оснований любой из SEQ ID NO: от 3 до 5;

(b) антисмысловый олигомер, содержащий последовательность оснований, которая имеет делецию, замену, вставку и/или добавление от 1 до 5 оснований в последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 3-5, и обладает активностью индуцировать пропуск экзона 50 в гене дистрофина человека;

(c) антисмысловый олигомер, содержащий последовательность оснований, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью оснований любой из SEQ ID NO: 3-5 и обладает активностью индуцировать пропуск экзона 50 в гене дистрофина человека; и

(d) антисмысловый олигомер, который гибридизуется при жестких условиях с олигонуклеотидом, состоящим из последовательности оснований, комплементарной последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 3-5, и обладает активностью индуцировать пропуск экзона 50 в гене дистрофина человека, или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат.

Антисмысловый олигомер, который выбран из группы, состоящей из (e)-(h) ниже:

(e) антисмысловый олигомер, который состоит из последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 3-5;

(f) антисмысловый олигомер, который состоит из последовательности оснований, имеющей делецию и/или замену от 1 до 5 оснований в последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 3-5, и обладает активностью индуцировать пропуск экзона 50 в гене дистрофина человека;

(g) антисмысловый олигомер, который состоит из последовательности оснований, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью оснований любой из SEQ ID NO: 3-5, и обладает активностью индуцировать пропуск экзона 50 в гене дистрофина человека; и

(h) антисмысловый олигомер, который гибридизуется при очень жестких условиях с олигонуклеотидом, состоящим из последовательности оснований, комплементарной последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 3-5, и обладает активностью индуцировать пропуск экзона 50 в гене дистрофина человека, или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат.

Антисмысловый олигомер, или его фармацевтически приемлемая соль, или гидрат согласно вышеуказанным [1] или [2], где

антисмысловый олигомер представляет собой антисмысловый олигомер, который имеет нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с последовательностью оснований любой из SEQ ID NO: 3-5 и обладает активностью индуцировать

пропуск экзона 50 в гене дистрофина человека.

Антисмысловой олигомер, или его фармацевтически приемлемая соль, или гидрат согласно любому из вышеуказанных [1]-[3], где антисмысловой олигомер представляет собой олигонуклеотид.

Антисмысловой олигомер, или его фармацевтически приемлемая соль, или гидрат согласно [4] выше, где молекула сахара и/или группа с фосфатной связью по меньшей мере одного нуклеотида, входящего в состав олигонуклеотида, модифицированы.

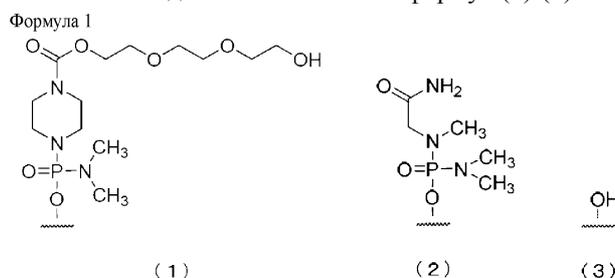
Антисмысловой олигомер, или его фармацевтически приемлемая соль, или гидрат согласно [4]-[5] выше, где молекула сахара по меньшей мере одного нуклеотида, входящего в состав олигонуклеотида, представляет собой рибозу, в которой группа 2'-ОН заменена любой одной, выбранной из группы, состоящей из OR, R, R'OR, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NR<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, CN, F, Cl, Br и I (где R представляет собой алкил или арил, а R' представляет собой алкилен).

Антисмысловой олигомер, или его фармацевтически приемлемая соль, или гидрат согласно любому из [4]-[6] выше, где группа с фосфатной связью по меньшей мере одного нуклеотида, входящего в состав олигонуклеотида, представляет собой любую одну, выбранную из группы, состоящей из тифосфатной связи, фосфородитиоатной связи, алкилфосфатной связи, фосфорамидатной связи и боранофосфатной связи.

Антисмысловой олигомер, или его фармацевтически приемлемая соль, или гидрат согласно любому из [1]-[3] выше, где антисмысловой олигомер представляет собой морфолиновый олигомер.

Антисмысловой олигомер, или его фармацевтически приемлемая соль, или гидрат согласно [8] выше, где антисмысловой олигомер представляет собой фосфородиамидатный морфолиновый олигомер.

Антисмысловой олигомер, или его фармацевтически приемлемая соль, или гидрат согласно [8] или [9] выше, где 5'-конец является любой одной из химических формул (1)-(3) ниже:



Антисмысловой олигомер, или его фармацевтически приемлемая соль, или гидрат согласно любому из [1]-[10] выше, где длина антисмыслового олигомера составляет 19 или 20 оснований.

Фармацевтическая композиция для лечения миодистрофии, содержащая антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемую соль, или гидрат согласно любому из [1]-[11] выше.

Фармацевтическая композиция согласно [12] выше, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

Фармацевтическая композиция согласно [12] или [13] выше для введения пациенту с миодистрофией, где пациентом является пациент с мутацией, которая восприимчива к пропуску экзона 50 в гене дистрофина.

Фармацевтическая композиция согласно [14] выше, где пациент имеет ген дистрофина, который имеет, по меньшей мере, мутацию сдвига рамки считывания, вызванную делецией экзона вблизи экзона 50, и в котором рамка считывания аминокислот корректируется пропуском экзона 50.

Фармацевтическая композиция согласно [14] или [15] выше, где пациент имеет мутацию сдвига рамки считывания, вызванную делециями экзонов 51, 51-53, 51-55 или 51-57 в гене дистрофина.

Фармацевтическая композиция согласно любому из [14]-[16] выше, где пациент является человеком.

Применение антисмыслового олигомера или его фармацевтически приемлемой соли, или гидрата согласно любому из [1]-[11] выше в производстве лекарственного средства для лечения миодистрофии.

Способ для лечения миодистрофии, который предусматривает введение пациенту с миодистрофией эффективного количества антисмыслового олигомера или его фармацевтически приемлемой соли, или гидрата согласно любому из [1]-[11] выше, или фармацевтической композиции согласно любому из [12]-[16] выше.

Способ для лечения согласно [19] выше, где пациент является человеком.

Антисмысловой олигомер, или его фармацевтически приемлемая соль, или гидрат согласно любому из [1]-[11] выше, или фармацевтическая композиция согласно любому из [12]-[16] выше для применения для лечения миодистрофии.

Антисмысловой олигомер или его фармацевтически приемлемая соль, или гидрат, или фармацевтическая композиция согласно [21] выше, где при лечении пациент с миодистрофией является человеком.

#### Эффекты по изобретению

Изобретение может обеспечить антисмысловой олигомер, который с высокой эффективностью индуцирует пропуск экзона 50 в гене дистрофина человека. Настоящее изобретение может обеспечить ан-

тисмысловой олигомер, который обладает превосходной растворимостью, сохраняя при этом активность, чтобы индуцировать пропуск экзона 50 в гене дистрофина человека с высокой эффективностью.

#### **Краткое описание чертежей**

На фиг. 1 представлена эффективность пропуска экзона 50 в гене дистрофина человека посредством антисмысловых олигомеров ФМО № 1 и 2 в клетках рабдомиосаркомы человека (клетки RD);

на фиг. 2 представлена эффективность пропуска экзона 50 в гене дистрофина человека посредством антисмысловых олигомеров ФМО № 1, 3 и 4 в клетках RD;

на фиг. 3 представлена эффективность пропуска экзона 50 в гене дистрофина человека посредством антисмысловых олигомеров ФМО № 1, 5, 6 и 7 в клетках RD.

#### **Описание вариантов осуществления**

Далее в настоящем документе настоящее изобретение описано подробно. Варианты осуществления, описанные ниже, предназначены для использования в качестве примера только для описания изобретения, но не предназначены для ограничения настоящего изобретения только следующими вариантами осуществления. Настоящее изобретение может быть реализовано разными способами без отступления от сути изобретения.

##### **1. Антисмысловой олигомер.**

Настоящее изобретение относится к антисмысловому олигомеру (далее в настоящем документе обозначаемому как "антисмысловой олигомер по настоящему изобретению"), который с высокой эффективностью вызывает пропуск экзона 50 в гене дистрофина человека.

Экзон 50 в гене дистрофина человека.

В настоящем изобретении термин "ген" включает геномный ген, а также включает кДНК, предшественник мРНК и мРНК. Предпочтительно, ген представляет собой предшественник мРНК, т.е. пре-мРНК.

В геноме человека ген дистрофина человека расположен в локусе Xp21.2. Ген дистрофина человека имеет размер 2,2 миллиона пар оснований и является самым большим геном среди известных человеческих генов. Однако кодирующая область гена дистрофина человека насчитывает всего 14 т.п.н., распределенных в виде 79 экзонов по всему гену дистрофина человека (Roberts R.G., et al., Genomics, 16: 536-538 (1993); и Koenig, M., et al., Cell 53, 219-228, 1988). Пре-мРНК, которая является транскриптом гена дистрофина человека, подвергается сплайсингу с образованием зрелой мРНК из 14 т.п.н. Известна последовательность оснований человеческого гена дистрофина дикого типа (номер доступа GeneBank NM\_004006).

Последовательность оснований, включающая экзон 50 и последовательность вблизи 5'-конца интрона 50 в человеческом гене дистрофина дикого типа, представлена в SEQ ID NO: 1.

Антисмысловой олигомер.

Антисмысловой олигомер по настоящему изобретению предназначен для того, чтобы вызывать пропуск экзона 50 в гене дистрофина человека, тем самым модифицируя белок типа МДД, кодируемый геном дистрофина, в белок дистрофина типа МДБ. Таким образом, экзон 50 в гене дистрофина, который является мишенью для пропуска экзона посредством антисмыслового олигомера, включает и дикий тип, и мутантные типы.

Антисмысловой олигомер по настоящему изобретению представляет собой специфический антисмысловой олигомер, который выбран из группы, состоящей из (a)-(d) ниже:

(a) антисмысловой олигомер, содержащий последовательность оснований любой из SEQ ID NO: 3-5;

(b) антисмысловой олигомер, содержащий последовательность оснований, которая имеет делецию, замену, вставку и/или добавление от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3, от 1 до 2 или от 1 оснований в последовательность оснований любой из SEQ ID NO: 3-5, и обладает активностью индуцировать пропуск экзона 50 в гене дистрофина человека;

(c) антисмысловой олигомер, содержащий последовательность оснований, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 94% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью оснований любой из SEQ ID NO: 3-5 и обладает активностью индуцировать пропуск экзона 50 в гене дистрофина человека; и

(d) антисмысловой олигомер, который гибридизуется при жестких условиях с олигонуклеотидом, состоящим из последовательности оснований, комплементарной последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 3-5 и обладает активностью индуцировать пропуск экзона 50 в гене дистрофина человека.

В другом варианте осуществления антисмысловой олигомер по настоящему изобретению представляет собой специфический антисмысловой олигомер, который выбран из группы, состоящей из (e)-(h) ниже.

(e) антисмысловой олигомер, который состоит из последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 3-5;

(f) антисмысловой олигомер, который состоит из последовательности оснований, имеющей делецию и/или замену от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3, от 1 до 2 или одного основания (оснований) в последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 3-5, и обладает способностью индуцировать пропуск экзона

50 в гене дистрофина человека;

(g) антисмысловой олигомер, который состоит из последовательности оснований, имеющих по меньшей мере 80%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 94% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с идентичностью последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 3-5 и обладает способностью индуцировать пропуск экзона 50 в гене дистрофина человека; и

(h) антисмысловой олигомер, который гибридизуется при очень жестких условиях с олигонуклеотидом, состоящим из последовательности оснований, комплементарной последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 3-5, и обладает активностью индуцировать пропуск экзона 50 в гене дистрофина человека

Антисмысловые олигомеры (b)-(d) и антисмысловые олигомеры (f)-(h) являются мутантами антисмыслового олигомера (a) и антисмыслового олигомера (e), соответственно, и, в частности, предназначены для соответствия мутациям (например, полиморфизму) гена дистрофина пациентов.

Как применяются в настоящем документе, термин "антисмысловой олигомер, который гибридизуется при жестких условиях" относится, например, к антисмысловому олигомеру, полученному путем гибридизации колоний, гибридизации бляшек, саузерн-гибридизации или т.п., с использованием в качестве зонда целого олигонуклеотида или его части, состоящего из последовательности оснований, комплементарной последовательности оснований, например любой из SEQ ID NO: 3-5. Способ гибридизации, который можно использовать, включает в себя способы, описанные, например, в "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" и т.д.

Как применяют в настоящем документе, термин "жесткие условия" может представлять собой любые из условий с низкой жесткостью, условий с умеренной жесткостью или условий с высокой жесткостью. Термин "условия с низкой жесткостью" означает, например, 5× SSC, 5× раствор Денхардта, 0,5% SDS, 50% формамид при 32°C. Термин "условия с умеренной жесткостью" означает, например, 5× SSC, 5× раствор Денхардта, 0,5% SDS, 50% формамид при 42°C, или 5× SSC, 1% SDS, 50 мМ Трис-HCl (pH 7,5), 50% формамид при 42°C. Термин "условия с высокой жесткостью" означает, например 1) 5× SSC, 5× раствор Денхардта, 0,5% SDS, 50% формамид при 50°C, (2) 0,2× SSC, 0,1% SDS при 60°C, (3) 0,2× SSC, 0,1% SDS при 62°C, (4) 0,2× SSC, 0,1% SDS при 65°C, или (5) 0,1× SSC, 0,1% SDS при 65°C, но не ограничивается указанными. Ожидается, что в этих условиях антисмысловые олигомеры с более высокой идентичностью последовательности будут эффективно получать при более высокой температуре. На жесткость гибридизации влияет множество факторов, включая температуру, концентрацию зонда, длину зонда, ионную силу, время, концентрацию солей и другие, и специалисты в данной области могут подходящим образом выбрать эти факторы для достижения аналогичной жесткости. В настоящем документе термин "идентичность последовательности" относится к идентичности во всем диапазоне оснований последовательности, подлежащей сравнению между парой двух определенных нуклеиновых кислот, и обозначается соотношением (%) совпадающих оснований при оптимальном выравнивании последовательности оснований, которое производят с использованием математического алгоритма, известного в области техники по настоящему изобретению. Например, антисмысловой олигомер, состоящий из последовательности оснований, имеющих по меньшей мере "80% идентичности последовательности" по отношению к антисмысловому олигомеру, состоящему из последовательности из 20 оснований, означает антисмысловой олигомер, имеющий 16 или более оснований, идентичных антисмысловому олигомеру из 20 оснований.

В этих условиях ожидается, что антисмысловые с более высокой идентичностью последовательности будут эффективно получать при более высоких температурах.

Когда для гибридизации используют коммерчески доступные наборы, можно, например, использовать систему прямой маркировки и обнаружения Alkphos (GE Healthcare). В этом случае, согласно приложенному к набору протоколу, после инкубации с меченым зондом в течение ночи мембрану отмывают первичным промывочным буфером, содержащим 0,1% (мас./об.) SDS при 55°C, что позволяет выявить гибридизированный антисмысловой олигомер. Альтернативно, когда зонд метят дигоксигенином (DIG) с использованием доступных реагентов (например, PCR Labeling Mix (Roche Diagnostics) и т.д.) при получении зонда на основе всей или части комплементарной последовательности к последовательности оснований любой из SEQ ID NO: 3-5, гибридизацию можно выявить с помощью набора для обнаружения нуклеиновых кислот DIG (Roche Diagnostics).

В дополнении к описанному выше антисмысловому олигомеру другие антисмысловые олигомеры, которые могут гибридизоваться, включают антисмысловые олигомеры, имеющие 90% или выше, 91% или выше, 92% или выше, 93% или выше, 94% или выше, 95% или выше, 96% или выше, 97% или выше, 98% или выше, 99% или выше, 99,1% или выше, 99,2% или выше, 99,3% или выше, 99,4% или выше, 99,5% или выше, 99,6% или выше, 99,7% или выше, 99,8% или выше и 99,9% или выше идентичности последовательности с последовательностью оснований любой из SEQ ID NO: 3-5, как рассчитано программой для поиска гомологии, такой как FASTA и BLAST с использованием параметров по умолчанию.

Идентичность последовательности можно определить с помощью FASTA (Science 227 (4693): 1435-1441, (1985)) или алгоритма BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Карлина и Альтшула (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873, 1993). Были разработаны программы blastn, blastx, tblastn и tblastx, основанные на алгоритме BLAST (Altschul S.F., et al: J. Mol. Biol. 215: 403, 1990). Если последовательность оснований анализируют с помощью blastn, параметрами являются, например, оценка=100 и длина слова=12. Если используют программы BLAST и Gapped BLAST, используют параметры по умолчанию для каждой программы.

Термин "индуцировать (активировать) пропуск экзона 50 в гене дистрофина человека" предназначен для обозначения того, что за счет связывания антисмыслового олигомера по настоящему изобретению с участком, соответствующим экзону 50 и/или соседнему с ним интрону транскрипта (например, пре-мРНК) в гене дистрофина человека происходит исключение экзона 50 и, например, последовательность оснований, соответствующая 5'-концу экзона 52 связана с последовательностью оснований, соответствующей 3'-концу экзона 49 у пациентов с МДД с делецией экзона 51, когда транскрипт подвергается сплайсингу, в результате чего образуется зрелая мРНК, свободная от сдвига рамки кодона.

Таким образом, пациентов с МДД, имеющих мутацию, восприимчивую к пропуску экзона 50 в гене дистрофина, можно лечить путем пропуска экзона 50. Примеры таких пациентов с МДД включают пациентов с МДД с геном дистрофина, который имеет, по меньшей мере, мутацию сдвига рамки считывания, вызванную делецией экзона вблизи экзона 50, и в котором аминокислотная рамка считывания корректируется путем пропуска экзона 50, и более конкретно, включают пациентов с МДД, имеющих мутацию сдвига рамки считывания, вызванную делецией экзонов 51, 51-53, 51-55, 51-57 и т.д. в гене дистрофина.

В настоящем документе вышеописанный термин "связывание" предназначен для обозначения того, что, когда антисмысловый олигомер по настоящему изобретению смешивают с транскриптом гена дистрофина человека, они оба гибридизируются друг с другом в физиологических условиях с образованием двухцепочечной нуклеиновой кислоты. Термин "в физиологических условиях" относится к условиям, имитирующим среду *in vivo* в отношении pH, состава композиции и температуры. Условия: от 25 до 40°C, предпочтительно 37°C, pH от 5 до 8, предпочтительно pH 7,4 и концентрация хлорида натрия 150 mM.

Произошел ли пропуск экзона 50 в гене дистрофина человека или нет, можно подтверждать путем введения антисмыслового олигомера по настоящему изобретению в экспрессирующую дистрофин клетку (например, клетки рабдомиосаркомы человека), амплификации мРНК области, окружающей экзон 50 в гене дистрофина человека, из общей РНК клетки, экспрессирующей дистрофин, с помощью ОТ-ПЦР и проведения анализа "вложенной" ПЦР или последовательности на амплификацию продукта ПЦР. Эффективность пропуска ES (%) можно определить следующим образом. мРНК гена дистрофина человека собирают из исследуемых клеток, и в мРНК измеряют уровень полинуклеотида в полосе, показывающей, что экзон 50 пропущен (уровень полинуклеотида "А"), и уровень полинуклеотида в полосе, показывающей, что экзон 50 не пропущен (уровень полинуклеотида "В"). Используя эти значения измерений "А" и "В", эффективность рассчитывается по следующему уравнению (1). Для расчета эффективности пропуска можно обратиться к международной публикации WO 2012/029986

$$ES=100 \times A/(A+B) \quad (1)$$

Предпочтительно, антисмысловый олигомер по настоящему изобретению вызывает пропуск экзона 50 с эффективностью 10% или выше, 20% или выше, 30% или выше, 40% или выше, 50% или выше, 60% или выше, 70% или выше, 80% и выше и 90% и выше.

Антисмысловый олигомер по настоящему изобретению относится, например, к олигонуклеотиду, морфолиновому олигомеру или олигомеру пептидной нуклеиновой кислоты (ПНК) с длиной 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 оснований. Длина антисмыслового олигомера составляет предпочтительно от 16 до 25, от 16 до 23, 19 или 20 оснований и предпочтительными являются морфолиновые олигомеры.

Олигонуклеотид, описанный выше (далее в настоящем документе, обозначаемый как "олигонуклеотид по настоящему изобретению") представляет собой антисмысловый олигомер по настоящему изобретению, состоящий из нуклеотидов в качестве составных единиц. Такие нуклеотиды могут быть любыми из рибонуклеотидов, дезоксирибонуклеотидов и модифицированных нуклеотидов.

Модифицированный нуклеотид относится к нуклеотиду, имеющему полностью или частично модифицированные нуклеиновые основания, молекулы сахара и/или группы фосфатной связи, которые составляют рибонуклеотид или дезоксирибонуклеотид.

В настоящем изобретении нуклеиновое основание включает, например, аденин, гуанин, гипоксантин, цитозин, тимин, урацил и их модифицированные основания. Примеры таких модифицированных оснований включают, но не ограничиваются ими, псевдоурацил, 3-метилурацил, дигидроурацил, 5-алкилцитозины (например, 5-метилцитозин), 5-алкилурацилы (например, 5-этилурацил), 5-галогенурацилы (5-бромурасил), 6-азапиримидин, 6-пиримидины (6-метилурацил), 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксигидроксиметил)урацил, 5'-карбоксиметиламинометил-2-тиоурацил, 5-карбоксиметиламинометилурацил, 1-метиладенин, 1-метилгипоксантин, 2,2-диметилгуанин, 3-метилцитозин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, N6-метиладенин, 7-метилгуанин, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, 5-ме-

тиламинотилурацил, 5-метилкарбонилметилурацил, 5-метилоксиурацил, 5-метил-2-тиоурацил, 2-метилтио-N6-изопентениладенин, урацил-5-оксиуксусную кислоту, 2-тиоцитозин, пурин, 2,6-диаминопурин, 2-аминопурин, изогуанин, индол, имидазол, ксантин и т.д.

Модификация молекул сахара может включать, например, модификации в 2'-положении рибозы и модификации других положений сахара. Модификация в 2'-положении рибозы включает модификацию, замещающую 2'-ОН рибозы на OR, R, R'OR, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NR<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, CN, F, Cl, Br или I, где R представляет собой алкил или арил, а R' представляет собой алкилен.

Модификация других положений сахара включает, например, замену O в 4'-положении рибозы или дезоксирибозы на S, соединение между 2'- и 4'-положениями сахара, например, ЗНК (закрытой нуклеиновой кислотой) или ENA (нуклеиновые кислоты с 2'-O,4'-C-этиленовым мостиком), но не ограничивается ими.

Модификация группы фосфатной связи включает, например, модификацию замены фосфодиэфирной связи тиофосфатной связью, фосфородитионатной связью, алкилфосфонатной связью, фосфорамидатной связью или боронофосфатной связью. (Enya et al: Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 18, 9154-9160) (см., например, японские отечественные повторные публикации заявок РСТ № 2006/129594 и 2006/038608).

В настоящем изобретении, алкил включает предпочтительно неразветвленный или разветвленный алкил имеющий от 1 до 6 атомов углерода. Конкретные примеры включают метил, этил, н-пропил, изо-пропил, н-бутил, изобутил, сек-бутил, трет-бутил, н-пентил, изопентил, пеопентил, трет-пентил, н-гексил и изогексил. Алкил необязательно может быть замещенным. Примеры таких заместителей представляют собой галоген, алкокси, циано и нитро. Алкил может быть замещен 1-3 заместителями.

В настоящем изобретении, циклоалкил включает предпочтительно циклоалкил, имеющий от 5 до 12 атомов углерода. Конкретные примеры включают циклопентил, циклогексил, циклогептил, циклооктил, циклодецил и циклододецил.

В настоящем изобретении, галоген включает фтор, хлор, бром и йод.

Алкокси включает неразветвленный или разветвленный алкокси, имеющий от 1 до 6 атомов углерода, такой как метокси, этокси, н-пропокси, изопропокси, н-бутокси, изобутокси, сек-бутокси, трет-бутокси, н-пентилокси, изопентилокси, н-гексилокси, изогексилокси и т.д. Наряду с другими, предпочтительным является алкокси, имеющий от 1 до 3 атомов углерода.

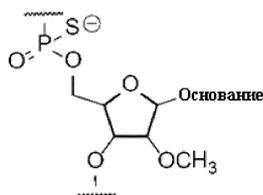
В настоящем изобретении, арил включает предпочтительно арил, имеющий от 6 до 10 атомов углерода. Конкретные примеры включают фенил, α-нафтил и β-нафтил. Наряду с другими предпочтительным является фенил. Арил необязательно может быть замещенным. Примеры таких заместителей представляют собой алкил, галоген, алкокси, циано и нитро. Арил может быть замещен 1-3 заместителями.

В настоящем изобретении, алкилен включает предпочтительно неразветвленный или разветвленный алкилен, имеющий от 1 до 6 атомов углерода. Конкретные примеры включают метилен, этилен, триметилен, тетраметилен, пентаметилен, гексаметилен, 2-этил триметилен и 1-метилтетраметилен.

В настоящем изобретении, ацил включает неразветвленный или разветвленный алканойл или ароил. Примеры алканойла включают формил, ацетил, 2-метилацетил, 2,2-диметилацетил, пропиноил, бутирил, изобутирил, пентаноил, 2,2-диметилпропионил, гексаноил и т.д. Примеры ароила включают бензоил, толуоил и нафтоил. Ароил необязательно может быть замещен по замещаемым положениям и может быть замещен алкилом/алкилами.

Олигонуклеотид по настоящему изобретению предпочтительно представляет собой антисмысловой олигомер по настоящему изобретению, содержащий составную единицу, представленную общей формулой ниже, где группа -ОН в положении 2' в рибозе замещена метокси и группа фосфатной связи представляет собой тиофосфатную связь

Формула 2

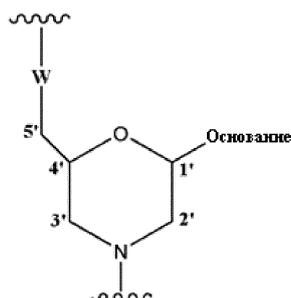


где основание представляет собой нуклеиновое основание.

Олигонуклеотид по настоящему изобретению можно легко синтезировать с использованием различных автоматических синтезаторов (например, АКТА oligopilot plus 10/100 (GE Healthcare)). Альтернативно, синтез также можно поручить сторонней организации (например, Promega Inc., Takara Co., или Japan Bio Service Co.) и т.д.

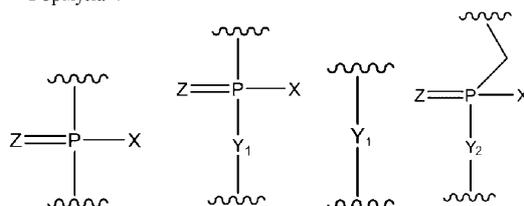
Морфолиновый олигомер по настоящему изобретению представляет собой антисмысловой олигомер по настоящему изобретению, содержащий составную единицу, представленную общей формулой ниже:

Формула 3



где основание имеет такое же значение, как определено выше, и W представляет собой группу, показанную одной из следующих групп:

Формула 4



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

$\text{R}^1$  представляет собой H или алкил;

$\text{R}^2$  и  $\text{R}^3$  могут быть одинаковыми или разными, и каждый представляет собой H, алкил, циклоалкил или арил;

$\text{Y}_1$  представляет собой O, S,  $\text{CH}_2$  или  $\text{NR}^1$ ;

$\text{Y}_2$  представляет собой O, S или  $\text{NR}^1$ ;

Z представляет собой O или S.

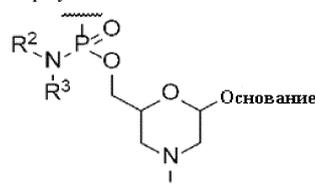
Примеры морфолиновых мономерных соединений, которые используют в синтезе морфолинового олигомера по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются указанными, следующие: морфолиновое мономерное соединение (A), морфолиновое мономерное соединение (C), морфолиновое мономерное соединение (T) и морфолиновое мономерное соединение (G).

Таблица 1

Морфолиновое соединение A	Морфолиновое соединение C	Морфолиновое соединение T	Морфолиновое соединение G

Морфолиновый олигомер предпочтительно представляет собой олигомер, содержащий составную единицу, представленную общей формулой ниже (фосфордиамидатный морфолиновый олигомер (далее в настоящем документе, обозначаемый как "ФМО")):

Формула 5



где основание,  $\text{R}^2$  и  $\text{R}^3$  имеют такое же значение, как определено выше.

Морфолиновый олигомер по настоящему изобретению включает олигомер, в котором все или часть нуклеиновых оснований, молекулы морфолинового кольца, группы фосфатной связи, 3'-конец и/или 5'-конец, которые составляют морфолиновый олигомер, являются модифицированными.

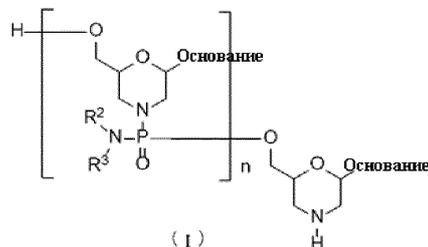
Модификация группы фосфатной связи включает, например, модификацию замещения фосфородиамидатной связью, тиофосфатной связью, фосфородитионатной связью, алкилфосфонатной связью, фосфорамидатной связью и боранофосфатной связью (Enya et al: Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 18, 9154-9160) (см., например, японские отечественные повторные публикации заявок РСТ № 2006/129594 и 2006/038608).

Морфолиновый олигомер можно получать в соответствии, например, с WO 1991/009033 или WO 2009/064471. В частности, ФМО можно получать способом, описанным в WO 2009/064471, или получать способом, показанным ниже.

Способ получения ФМО.

Вариант осуществления ФМО включает, например, соединение, представленное общей формулой (I) ниже (далее в настоящем документе ФМО (I)):

Формула 6



где основание,  $R^2$  и  $R^3$  имеют такое же значение, как определено выше; и,  $n$  представляет собой заданное целое число от 1 до 99, предпочтительно заданное целое число от 15 до 34, от 15 до 24 или от 15 до 22, более предпочтительно 18 или 19.

ФМО (I) можно получать в соответствии с известным способом, например можно получать, выполняя способы на следующих стадиях.

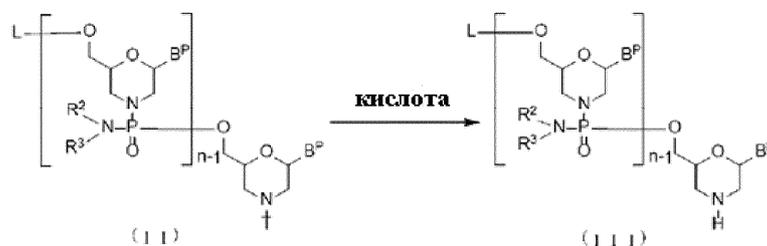
Соединения и реагенты, применяемые на стадиях ниже, конкретно не ограничены при условии, что они являются общепринятыми для получения ФМО.

Кроме того, все следующие стадии могут быть выполнены с помощью способа жидкой фазы или твердофазного способа (вручную или с использованием коммерческих автоматизированных синтезаторов для твердой фазы). При производстве ФМО по твердофазному способу целесообразно использовать автоматизированные синтезаторы ввиду простоты работы и точности синтеза.

(1) Стадия А.

Проводят реакцию соединения, представленного общей формулой (II) ниже (далее в настоящем документе, обозначаемого как соединение (II)) с кислотой для получения соединения, представленного общей формулой (III) ниже (далее в настоящем документе, обозначаемого как соединение (III)):

Формула 7



где  $n$ ,  $R^2$  и  $R^3$  имеют такое же значение, как определено выше; каждый  $B$  независимо представляет собой нуклеиновое основание, которое необязательно может быть защищенным;

$T$  представляет собой тритил, монометокситритил или диметокситритил; и,

$L$  представляет собой водород, ацил или группу, представленную общей формулой (IV) ниже (далее в настоящем документе, обозначаемую как группа (IV)):

Формула 8

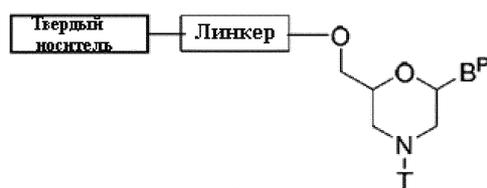


"Нуклеиновое основание" для  $B^P$  включает такое же "нуклеиновое основание" как и в основании, при условии, что аминогруппа или гидроксигруппа в нуклеиновом основании, показанном в  $B^P$  может быть защищенной.

Такая защитная группа для аминогруппы конкретно не ограничена при условии, что ее используют в качестве защитной группы для нуклеиновых кислот. Конкретные примеры включают бензоил, 4-метоксибензоил, ацетил, пропионил, бутирил, изобутирил, фенилацетил, феноксиацетил, 4-трет-бутилфеноксиацетил, 4-изопропилфеноксиацетил и диметиламинометил. Конкретные примеры защитной группы для гидроксигруппы включают 2-цианоэтил, 4-нитрофенэтил, фенилсульфонилэтил, метилсульфонилэтил, триметилсиллилэтил, фенил, который может быть замещен от 1 до 5 электроноакцепторных групп в необязательных замещаемых положениях, дифенилкарбамоил, диметилкарбамоил, диэтилкарбамоил, метилфенилкарбамоил, 1-пирролидинилкарбамоил, морфолинокарбамоил, 4-(трет-бутилкарбоксии)бензил, 4-[(диметиламино)карбоксии]бензил и 4-(фенилкарбоксии)бензил (см., например, WO



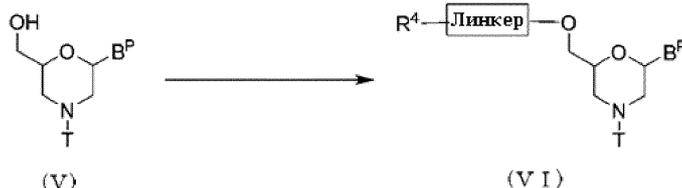
Формула 9



где  $B^P$ , T, линкер и твердый носитель имеют такое же значение, как определено выше.  
Стадия 1.

Проводят реакцию соединения, представленного общей формулой (V) ниже, с ацилирующим средством для получения соединения, представленного общей формулой (VI) ниже (далее в настоящем документе, обозначаемого как соединение (VI)):

Формула 10

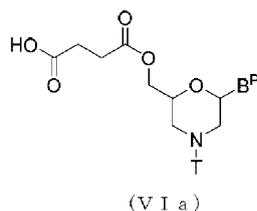


где  $B^P$ , T и линкер имеют такое же значение, как определено выше; и,  $R^4$  представляет собой гидроксильную, галоген, карбоксильную или аминогруппу.

Эту стадию можно проводить известными способами для введения линкеров с использованием соединения (V) в качестве исходного вещества.

В частности, соединение, представленное общей формулой (VIa) ниже, можно получать, выполняя способ, известный как этерификация, с использованием соединения (V) и янтарного ангидрида.

Формула 11

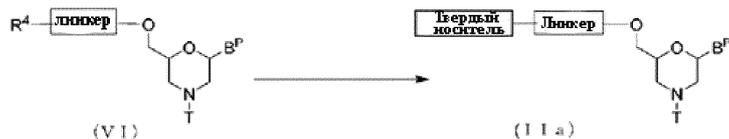


где  $B^P$  и T имеют такое же значение, как определено выше.

Стадия 2.

Проводят реакцию соединения (VI) с твердым носителем с использованием конденсирующего средства или т.п. для получения соединения (IIa)

Формула 12

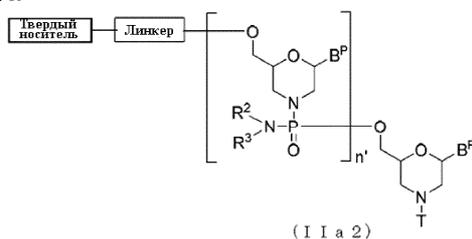


где  $B^P$ ,  $R^4$ , T, линкер и твердый носитель имеют такое же значение, как определено выше.

Эту стадию можно проводить с использованием соединения (VI) и твердого носителя в соответствии со способом, известным как реакция конденсации.

В соединении (II), соединении, представленное общей формулой (IIa2) ниже, где n представляет собой от 2 до 99 (предпочтительно, заданное целое число от 16 до 35, от 16 до 25 или от 16 до 23, предпочтительно 19 или 20) и L представляет собой группу, представленную общей формулой (IV), можно получать с использованием соединения (IIa) в качестве исходного вещества и повторения стадии A и стадии B из способа получения ФМО, приведенного в описании, необходимое число раз.

Формула 13

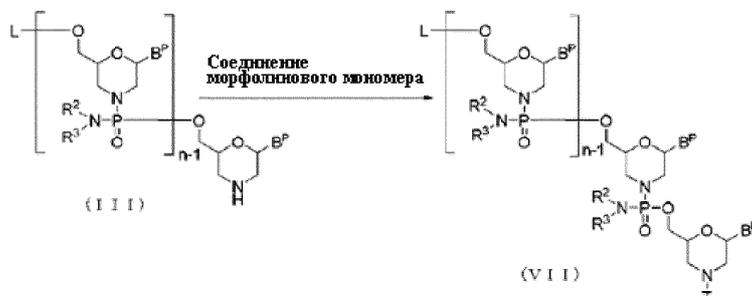


где  $B^P$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ , T, линкер и твердый носитель имеют такое же значение, как определено выше; и  $n'$  представляет собой от 1 до 98 (в конкретном варианте осуществления  $n'$  представляет собой, например, от 1 до 34, от 1 до 24, от 1 до 23, от 1 до 22, от 1 до 21, от 1 до 20, от 1 до 19, от 1 до 18, от 1 до 17, от 1 до 16, от 1 до 15).

(2) Стадия В.

Проводят реакцию соединения (III) с соединением морфолинового мономера в присутствии основания для получения соединения, представленного общей формулой (VII) ниже (далее в настоящем документе обозначаемого как соединение (VII)):

Формула 14

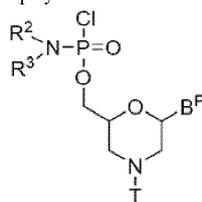


где каждый из  $B^P$ , L, n,  $R^2$ ,  $R^3$  и T имеет такое же значение, как определено выше.

На этой стадии можно проводить реакцию соединения (III) с соединением морфолинового мономера в присутствии основания.

Соединение морфолинового мономера включает, например, соединения, представленные общей формулой (VIII) ниже:

Формула 15



(VIII)

где  $B^P$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  и T имеют такое же значение, как определено выше.

"Основание", которое можно использовать на этой стадии, включает, например, диизопропилэтиламин, триэтиламин и N-этилморфолин. Количество используемого основания находится соответственно, например, в диапазоне от 1 моль-эквивалента до 1000 моль-эквивалентов на 1 моль соединения (III), предпочтительно от 10 моль-эквивалентов до 100 моль-эквивалентов на 1 моль соединения (III).

Соединение морфолинового мономера и основание, которое можно использовать на этой стадии, также можно использовать в разбавленном виде с соответствующим растворителем в концентрации от 0,1 до 30%. Растворитель конкретно не ограничен, поскольку инертен в реакции, и включает, например, N, N-диметилимидазолидон, N-метилпиперидон, ДМФ, дихлорметан, ацетонитрил, тетрагидрофуран или их смесь.

Температура реакции предпочтительно находится в диапазоне, например, от 0 до 100°C и более предпочтительно в диапазоне от 10 до 50°C.

Время реакции может варьировать в зависимости от типа используемого основания и температуры реакции, и соответственно находится в диапазоне от 1 мин до 48 ч, в основном, и предпочтительно в диапазоне от 30 мин до 24 ч.

Кроме того, после завершения этой стадии можно добавлять при необходимости ацилирующее средство. "Ацилирующее средство" включает, например, уксусный ангидрид, ацетилхлорид и феноксиуксусный ангидрид. Ацилирующее средство также можно использовать, например, в разведенном виде с соответствующим растворителем в концентрации от 0,1 до 30%. Растворитель конкретно не ограничен, поскольку он инертен в реакции, и включает, например, дихлорметан, ацетонитрил, тетрагидрофуран, спирт(ы) (этанол, изопропанол, трифторэтанол, и т.д.), воду или их смесь.

При необходимости также можно использовать основание, такое как пиридин, лутидин, коллидин, триэтиламин, диизопропилэтиламин, N-этилморфолин и т.д. в комбинации с ацилирующим средством. Количество используемого ацилирующего средства находится предпочтительно в диапазоне от 0,1 моль-эквивалента до 10000 моль-эквивалентов, и более предпочтительно в диапазоне от 1 моль-эквивалента до 1000 моль-эквивалентов. Количество используемого основания соответственно находится в диапазоне, например, от 0,1 моль-эквивалента до 100 моль-эквивалентов, а также в диапазоне от 1 моль-эквивалента до 10 моль-эквивалентов на 1 моль ацилирующего средства.

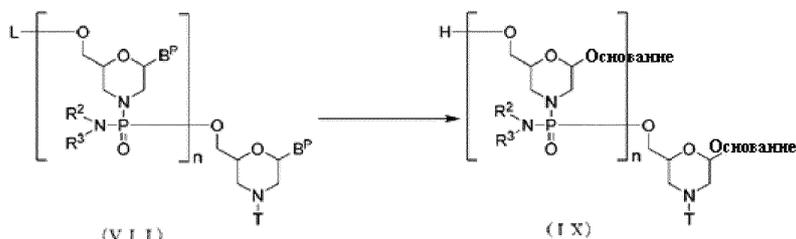
Температура реакции в этой реакции находится предпочтительно в диапазоне от 10 до 50°C, более

предпочтительно, в диапазоне от 10 до 50°C, еще более предпочтительно, в диапазоне от 20 до 40°C, и наиболее предпочтительно, в диапазоне от 25 до 35°C. Время реакции может варьировать в зависимости от типа используемого ацилирующего средства и температуры реакции, и соответственно находится в диапазоне от 0,1 мин до 24 ч, в основном, и предпочтительно в диапазоне от 1 мин до 5 ч.

### (3) Стадия С.

В соединении (VII), полученном на стадии В, защитную группу удаляют с использованием агента для снятия защиты для получения соединения, представленного общей формулой (IX)

Формула 16



где основание,  $B^P$ ,  $L$ ,  $n$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  и  $T$  имеют такое же значение как определено выше. На этой стадии можно проводить реакцию соединения (VII) с агентом для снятия защиты.

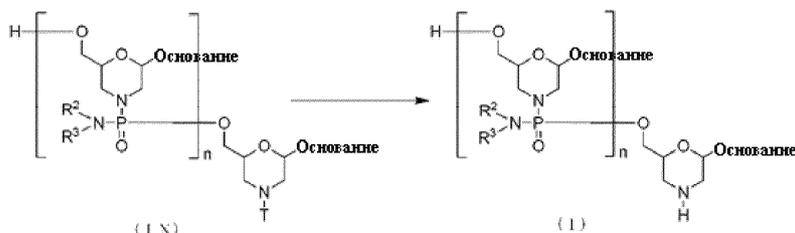
"Агент для снятия защиты" включает, например, концентрированную аммиачную воду и метиламин. "Агент для снятия защиты", используемый на этой стадии, также можно использовать в разбавленном виде, например, с водой, метанолом, этанолом, изопропиловым спиртом, ацетонитрилом, тетрагидрофураном, ДМФА,  $N,N$ -диметилимидазолидоном,  $N$ -метилпиперидоном или смесью этих растворителей. Среди них предпочтительным является этанол. Количество используемого агента для снятия защиты соответственно находится, например, в диапазоне от 1 моль-эквивалента до 100000 моль-эквивалентов, и предпочтительно в диапазоне от 10 моль-эквивалентов до 1000 моль-эквивалентов на 1 моль соединения (VII).

Температура реакции находится соответственно, например, в диапазоне от 15 до 75°C, предпочтительно, в диапазоне от 40 до 70°C, и более предпочтительно, в диапазоне от 50 до 60°C. Время реакции для снятия защиты может варьировать в зависимости от типа соединения (VII), температуры реакции и т.д., и находится соответственно в диапазоне от 10 мин до 30 ч, предпочтительно от 30 мин до 24 ч, и более предпочтительно в диапазоне от 5 ч до 20 ч.

### (4) Стадия D.

ФМО (I) получают путем реакции соединения (IX), полученного на стадии С с кислотой

Формула 17



где основание,  $n$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  и  $T$  имеют такое же значение как определено выше.

На этой стадии можно проводить добавление кислоты к соединению (IX).

"Кислота", которую можно использовать на этой стадии, включает, например, трихлоруксусную кислоту, дихлоруксусную кислоту, уксусную кислоту, фосфорную кислоту, соляную кислоту и т.д. Количество используемой кислоты применяют соответствующим образом для получения раствора с рН в диапазоне от 0,1 до 4,0, например, и более предпочтительно, в диапазоне рН от 1,0 до 3,0. Растворитель конкретно не ограничен при условии, что он инертен в реакции, и включает, например, ацетонитрил, воду или смесь этих растворителей.

Температура реакции находится предпочтительно в диапазоне от 10 до 50°C, более предпочтительно, в диапазоне от 20 до 40°C и более предпочтительно в диапазоне от 25 до 35°C. Время реакции для снятия защиты может варьировать в зависимости от типа соединения (IX), температуры реакции, и т.д., и находится соответственно в диапазоне от 0,1 мин до 5 ч, предпочтительно от 1 мин до 1 ч и более предпочтительно в диапазоне от 1 до 30 мин.

ФМО (I) можно получать, подвергая смесь, полученную на этой стадии, общепринятым способам разделения и очистки, таким как экстракция, концентрирование, нейтрализация, фильтрация, разделение центрифугированием, перекристаллизация, колоночная хроматография с обращенной фазой с использованием от C8 до C18, хроматография с катионообменными колонками, хроматография с анионообменными колонками, хроматография с колонками для гель-фильтрации, высокоэффективная жидкостная хроматография, диализ, ультрафильтрация и т.д., отдельно или в сочетании.

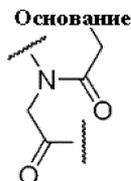
Таким образом, желаемый ФМО (I) можно выделить и очистить (см., например, WO 1991/09033).

При очистке ФМО (I) с использованием обратно-фазовой хроматографии в качестве растворителя для элюции можно использовать, например, раствор смеси 20 мМ триэтиламина/ацетатного буфера и ацетонитрила.

При очистке ФМО (I) с использованием ионообменной хроматографии в качестве растворителя для элюции можно использовать, например, раствор смеси 1М физиологического раствора и 10 мМ водного раствора гидроксида натрия.

Пептидная нуклеиновая кислота представляет собой антисмысловой олигомер по настоящему изобретению, характеризующийся группой, представленной следующей общей формулой в виде составной единицы:

Формула 18

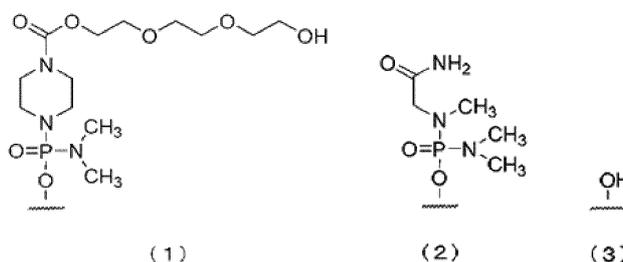


где основание имеет такое же значение, как определено выше. Пептидную нуклеинов кислоты можно получать, обращаясь, например, к следующим литературным источникам:

- 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 антисмысловом олигомере по настоящему изобретению, 5'-конец может быть одним из группы, показанной химической формулой (1)-(3) ниже, и предпочтительно представляет собой (3)-ОН

Формула 19



Далее в настоящем документе, группы, показанные (1), (2) и (3) выше обозначают как "Группа (1)", "Группа (2)" и "Группа (3)", соответственно.

Антисмысловой олигомер по настоящему изобретению может включать соединение со стереохимически оптически чистым атомом фосфора, поскольку атом фосфора в группе фосфатной связи служит центром ассиметрии. Специалист в данной области может получить чистые оптически активные формы из смесей изомеров (WO 2017/024264). Антисмысловой олигомер по настоящему изобретению может быть синтезирован в виде чистой оптически активной формы. Специалист в данной области может получать чистые оптически активные формы, контролируя реакции синтеза (японская патентная публикация для всеобщего ознакомления № 2018-537952).

## 2. Пептид-конъюгированный антисмысловой олигомер.

Антисмысловой олигомер по настоящему изобретению может образовывать комплекс с функциональным пептидом, направленным на повышение эффективности (например, мембранопроницаемым пептидом, направленным на повышение эффективности доставки к клеткам-мишеням) (WO 2008/036127, WO 2009/005793, WO 2012/150960, WO 2016/187425, WO 2018/118662, WO 2018/118599, WO 2018/118627, J. D. Ramsey, N. H. Flynn, Pharmacology & Therapeutics 154, 78-86 (2015), M.K. Tsoumpra et al., EBioMedicine, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.06.036>). Сайт конъюгации конкретно не ограничен. Желательно, 5'-конец или 3'-конец антисмыслового олигомера соединяется (конъюгируется) с аминоконцом или карбокси-концом функционального пептида.

В другом варианте осуществления антисмысловой олигомер по настоящему изобретению и функциональный пептид могут образовывать комплекс (конъюгат) через линкер. Линкер конкретно не ограничен. Предпочтительно, 5'-конец или 3'-конец антисмыслового олигомера соединен с одним концом линкера, в то время как аминоконцом или карбокси-концом функционального пептида соединен с другим концом линкера. Между функциональным пептидом и линкером может присутствовать дополнительная аминокислота.

### 3. Фармацевтическая композиция.

Антисмысловой олигомер по настоящему изобретению, даже если его длина является короткой по сравнению с антисмысловыми олигомерами известного уровня техники, может вызывать пропуск экзона 50 с высокой эффективностью. Антисмысловой олигомер по настоящему изобретению обладает отличной растворимостью, сохраняя при этом активность по индукции пропуска экзона 50 с высокой эффективностью. Таким образом, ожидают, что состояния миодистрофии могут быть улучшены с высокой эффективностью путем введения антисмыслового олигомера по настоящему изобретению пациентам с МДД, у которых есть мутация, восприимчивая к пропуску экзона 50 гена дистрофина (например, мутация со сдвигом рамки и миссенс-мутация/нонсенс-мутация в экзоне 50). Таким образом, ожидают, что состояния миодистрофии могут быть улучшены с высокой эффективностью путем введения антисмыслового олигомера по настоящему изобретению, например, по меньшей мере, у пациентов с МДД, у которых есть предопределенный мутантный ген дистрофина, имеющий делецию экзона вблизи экзона 50. Предопределенный мутантный ген дистрофина представляет собой ген дистрофина, который имеет, по меньшей мере, мутацию сдвига рамки считывания, вызванную делецией экзона вблизи экзона 50, и в котором аминокислотная рамка считывания корректируется путем удаления (пропуска) экзона 50. Примеры пациентов, имеющих такой предопределенный мутантный ген дистрофина, включают пациентов с МДД с мутацией сдвига рамки считывания, вызванной делецией экзонов 51, 51-53, 51-55, 51-57 и т.п.

Более конкретно, ожидают, что состояния миодистрофии могут быть улучшены с высокой эффективностью путем введения фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой олигомер по настоящему изобретению, пациентам с МДД, у которых есть мутация, превращающаяся в мутацию внутри рамки считывания за счет пропуска экзона 50, например у пациентов с делецией экзона 51, пациентов с делецией экзона 51-53, пациентов с делецией экзона 51-55, пациентов с делецией экзона 51-57 и т.д. Например, когда фармацевтическая композиция содержит антисмысловой олигомер по настоящему изобретению, тот же терапевтический эффект может быть достигнут даже в меньшей дозе, чем у олигомеров известного уровня техники. Таким образом, можно облегчить побочные эффекты и получить экономическую выгоду.

Антисмысловой олигомер по настоящему изобретению также подходит для получения фармацевтических композиций, потому что антисмысловой олигомер обладает превосходной растворимостью, сохраняя при этом активность по индукции пропуска экзона 50 с высокой эффективностью.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения миодистрофии, содержащей в качестве активного ингредиента антисмысловой олигомер по настоящему изобретению, его фармацевтически приемлемую соль или гидрата (далее в настоящем документе, обозначаемой как "композиция по настоящему изобретению").

Также, настоящее изобретение относится к способу лечения миодистрофии, который предусматривает введение пациенту с МДД антисмыслового олигомера по настоящему изобретению.

В указанном способе лечения антисмысловой олигомер по настоящему изобретению можно вводить в фармацевтической композиции для лечения миодистрофии.

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению антисмыслового олигомера по настоящему изобретению в производстве фармацевтической композиции для лечения миодистрофии и антисмыслового олигомера по настоящему изобретению для применения для лечения миодистрофии.

Примеры фармацевтически приемлемой соли антисмыслового олигомера по настоящему изобретению, содержащейся в композиции по настоящему изобретению, включают соли щелочных металлов, такие как соль натрия, соль калия и соль лития; соли щелочноземельных металлов, такие как соль кальция и соль магния; соли металлов, такие как соль алюминия, соль железа, соль цинка, соль меди, соль никеля, соль кобальта и т.д.; аммонийные соли; соли органических аминов, такие как т-октиламиновая соль, дибензиламиновая соль, морфолиновая соль, глюкозаминовая соль, фенилглициновая соль алкилового сложного эфира, этилендиаминовая соль, N-метилглюкаминовая соль, гуанидиновая соль, диэтиламинавая соль, триэтиламинавая соль, дициклогексиламиновая соль, N,N'-добензилэтилендиаминовая соль, хлорпрокаиновая соль, прокаиновая соль, диэтаноламиновая соль, N-бензилфенилэтиламинавая соль, пиперазиновая соль, тетраметиламмонийная соль, трис(гидроксиэтил)аминометановая соль; гидрогалогенидная соль, так как фтористоводородная кислая соль, гидроклоридная соль, гидробромидная соль и йодогидратная соль; неорганические кислые соли, такие как нитратная соль, перхлоратная соль, сульфатная соль, фосфатная соль и т.д.; соли низших алкансульфонатов, такие как метансульфонатная соль, трифторметансульфонатная соль и этансульфонатная соль; арилсульфонатная соль, такая как бензолсульфонатная соль и п-толуолсульфонатная соль; органические кислые соли, такие как ацетатная соль, соль яблочной кислоты, соль фумаровой кислоты, соль янтарной кислоты, соль лимонной кислоты, соль винной кислоты, оксалатная соль, соль малеиновой кислоты и т.д.; и, аминокислая соль, такая как глициновая соль, лизиновая соль, аргининовая соль, орнитиновая соль, глутаминовая кислая соль и аспарагиновая кислая соль. Эти соли можно получать известным способом. Альтернативно, антисмысловой олигомер по настоящему изобретению, входящий в состав композиции по настоящему изобретению, может быть в форме его гидрата.

Способ введения композиции по настоящему составу конкретно не ограничен при условии, что это

фармацевтический приемлемый способ введения, и он может быть выбран в зависимости от способа лечения. Ввиду легкости доставки в мышечные ткани предпочтительны внутривенное введение, внутриартериальное введение, внутримышечное введение, подкожное введение, пероральное введение, введение в ткань, трансдермальное введение и т.д. Кроме того, лекарственные формы, которые доступны для композиции по настоящему изобретению, конкретно не ограничены и включают, например, различные инъекции, пероральные средства, капельницы, ингаляции, мази, лосьоны и т.д.

При введении антисмыслового олигомера по настоящему изобретению пациентам с миодистрофией композиция по настоящему изобретению может содержать носитель для ускорения доставки олигомера в мышечные ткани. Такой носитель конкретно не ограничен, поскольку он является фармацевтически приемлемым, и примеры включают катионные носители, такие как катионные липосомы, катионные полимеры и т.д., или носители с использованием вирусной оболочки. Примеры катионных липосом включают, например, липосомы, состоящие из 2-О-(2-диэтиламиноэтил)карабамоил-1,3-О-диолеилглицерина и фосфолипидов в качестве основных компонентов (далее в настоящем документе, обозначаемые как "липосома А"), Олигофектамин (зарегистрированный товарный знак) (Invitrogen Corp.), Липофектин (зарегистрированный товарный знак) (Invitrogen Corp.), Липофектамин (зарегистрированный товарный знак) (Invitrogen Corp.), Липофектамин 2000 (зарегистрированный товарный знак) (Invitrogen Corp.), DMRIE-C (зарегистрированный товарный знак) (Invitrogen Corp.), GeneSilencer (зарегистрированный товарный знак) (Gene Therapy Systems), TransMessenger (зарегистрированный товарный знак) (QIAGEN, Inc.), TransIT TKO (зарегистрированный товарный знак) (Minis) и Nucleofector II (Lonza). Наряду с другими, предпочтительной является липосома А. Примеры катионных полимеров включают JetSI (зарегистрированный товарный знак) (Qbiogene, Inc.) и Jet-PEI (зарегистрированный товарный знак) (полиэтиленмин, Qbiogene, Inc.). Примеры носителей с использованием вирусной оболочки включают GenomeOne (зарегистрированный товарный знак) (липосома HVJ-E, Ishihara Sangyo). В качестве альтернативы, можно также использовать медицинские устройства, описанные в японском патенте № 2924179, и катионные носители, описанные в японских отечественных повторных публикациях заявок PCT № 2006/129594 и 2008/096690.

Для дополнительных деталей можно обратиться к патенту США № 4235871, патенту США № 4737323, WO 96/14057, "New RRC, Liposomes: A practical approach, IRL Press, Oxford (1990) pp 33-104", и т.д.

Концентрация антисмыслового олигомера по настоящему изобретению, содержащегося в композиции по настоящему изобретению, может варьироваться в зависимости от типа носителя и т.д., и в одном из вариантов осуществления соответственно находится в диапазоне от 0,1 нМ до 100 мкМ, предпочтительно в диапазоне от 100 нМ до 10 мкМ. Соотношение массы антисмыслового олигомера по настоящему изобретению, содержащегося в композиции по настоящему изобретению, и носителя (носитель/антисмысловый олигомер по настоящему изобретению) может варьироваться в зависимости от свойств олигомера, типа носителя и т.д., и соответственно находится в диапазоне от 0,1 до 100, предпочтительно в диапазоне от 0,1 до 10.

Композиция по настоящему изобретению может быть в форме водного раствора. В этом случае, композиция по настоящему изобретению может содержать антисмысловый олигомер по настоящему изобретению в концентрации от 2,5 до 500 мг/мл, от 5 до 450 мг/мл, от 10 до 400 мг/мл, от 15 до 350 мг/мл, от 20 до 300 мг/мл, от 20 до 250 мг/мл, от 20 до 200 мг/мл, от 20 до 150 мг/мл, от 20 до 100 мг/мл, от 20 до 50 мг/мл, от 20 до 40 мг/мл, от 20 до 30 мг/мл, от 23 до 27 мг/мл, от 24 до 26 мг/мл или от 25 мг/мл. Альтернативно, композиция по настоящему изобретению может содержать антисмысловый олигомер по настоящему изобретению в концентрации от 10 до 100 мг/мл, от 15 до 95 мг/мл, от 20 до 80 мг/мл, от 25 до 75 мг/мл, от 30 до 70 мг/мл, от 35 до 65 мг/мл, от 40 до 60 мг/мл, от 45 до 55 мг/мл, от 47 до 53 мг/мл, от 48 до 52 мг/мл, от 49 до 51 мг/мл или 50 мг/мл.

Композиция по настоящему изобретению может находиться в сухой форме. В этом случае, чтобы приготовить композицию по настоящему изобретению в виде водного раствора, композицию по настоящему изобретению в сухой форме, содержащую, например, 125 мг или 250 мг антисмыслового олигомера по настоящему изобретению в сухой форме, можно смешивать с 0,5-100 мл воды (что соответствует антисмысловому олигомеру по настоящему изобретению в концентрации от 1,25 до 250 мг/мл или от 2,5 до 500 мг/мл), предпочтительно от 1 до 50 мл воды (что соответствует антисмысловому олигомеру по настоящему изобретению в концентрации от 2,5 до 125 мг/мл или от 5 до 250 мг/мл), более предпочтительно от 5 до 10 мл воды (что соответствует антисмысловому олигомеру по настоящему изобретению в концентрации от 12,5 до 25 мг/мл или от 25 до 50 мг/мл) и использовать.

В дополнение к антисмысловым олигомерам по настоящему изобретению и их носителям, описанным выше, фармацевтически приемлемые добавки также могут необязательно входить в состав композиции по настоящему изобретению. Примерами таких добавок являются эмульгирующие добавки (например, жирные кислоты, имеющие от 6 до 22 атомов углевода и их фармацевтически приемлемые соли, альбумин и декстран), стабилизаторы (например, холестерин, фосфатидная кислота, сахара, маннит, сорбит и ксилит), средства, регулирующие изотоничность (например, хлорид натрия, глюкоза, мальтоза, лактоза, сахароза, трегалоза, маннит, сорбит и ксилит) и средства, регулирующие pH (например, соляная

кислота, серная кислота, фосфорная кислота, уксусная кислота, гидроксид натрия, гидроксид калия и триэтанолламин) Можно использовать одну или несколько из этих добавок. Содержание добавки в композиции по настоящему изобретению соответствует 90 мас.% или менее, предпочтительно 70 мас.% или менее и более предпочтительно 50 мас.% или менее.

Композицию по настоящему изобретению можно получить путем добавления антисмыслового олигомера по настоящему изобретению к дисперсии носителя и перемешивания смеси надлежащим образом. Добавки можно добавлять на соответствующей стадии либо до, либо после добавления антисмыслового олигомера по настоящему изобретению. Когда композиция по настоящему изобретению находится в форме водного раствора, водный растворитель, который можно использовать при добавлении антисмыслового олигомера по настоящему изобретению конкретно не ограничен, поскольку он является фармацевтически приемлемым, и примеры водного растворителя включают инъекционную воду или инъекционную концентрированную воду, электролитную жидкость, такую как физиологический раствор, и т.д., и сахарную жидкость, такую как глюкозная жидкость, мальтозная жидкость и т.д. Специалист в данной области может подходящим образом подобрать условия по pH и температуре для такого случая.

Композицию по настоящему изобретению можно получать, например, в жидкой форме и в форме ее лиофилизированного препарата. В одном из вариантов осуществления композиции по настоящему изобретению в сухой форме, лиофилизованная композиция по настоящему изобретению может быть получена путем лиофилизации композиции по настоящему изобретению в жидкой форме общепринятым способом. Лيوфилизацию можно проводить, например, путем соответствующей стерилизации композиции по настоящему изобретению в жидкой форме, дозирования аликвоты в контейнер, проведения предварительного замораживания в течение 2 ч при температуре приблизительно от  $-40$  до  $-20^{\circ}\text{C}$ , проведения первичной сушки при приблизительно от  $0$  до  $10^{\circ}\text{C}$  при пониженном давлении, а затем проведения вторичной сушки при приблизительно от  $15$  до  $25^{\circ}\text{C}$  при пониженном давлении. Как правило, лиофилизированный препарат композиции по настоящему изобретению можно затем получать путем замены газа в флаконе газообразным азотом и закупоркой.

Лيوфилизированный препарат композиции по настоящему изобретению можно использовать в основном после восстановления путем добавления необязательного растворителя (жидкости для восстановления) и повторного растворения препарата. Такая жидкость для восстановления включает инъекционную воду, физиологический раствор и другие инфузионные жидкости. Объем восстанавливающей жидкости может варьироваться в зависимости от назначения применения, и т.д., конкретно не ограничен, и обычно составляет от 0,5 до 2-кратного объема до лиофилизации или не более чем 500 мл.

Желательно контролировать вводимую дозу композиции по настоящему изобретению, принимая во внимание следующие факторы: тип и лекарственную форму антисмыслового олигомера по настоящему изобретению, содержащегося в композиции, состояния пациентов, включая возраст, массу тела и т.д., способ введения, и характеристики и степень заболевания. Суточная доза, рассчитанная как количество антисмыслового олигомера по настоящему изобретению, обычно составляет от 0,1 мг до 10 г/человек и предпочтительно от 1 мг до 1 г/человек. Этот числовой диапазон может иногда меняться в зависимости от типа заболевания-мишени, способа введения и молекулы-мишени. Таким образом, в некоторых случаях может быть достаточно дозы ниже диапазона и, наоборот, иногда может потребоваться доза выше диапазона. Композицию можно вводить от одного до нескольких раз в сутки или с интервалом от одних суток до нескольких суток.

В другом варианте осуществления композиции по настоящему изобретению предлагается фармацевтическая композиция, содержащая вектор, способный экспрессировать олигонуклеотид по настоящему изобретению, и носитель, описанный выше. Такой экспрессирующий вектор может быть вектором, способным экспрессировать несколько олигонуклеотидов по настоящему изобретению. Композицию можно формулировать с помощью фармацевтически приемлемых добавок в виде композиции по настоящему изобретению, содержащей антисмысловый олигомер по настоящему изобретению. Концентрация экспрессирующего вектора, содержащегося в композиции, может варьироваться в зависимости от типа носителя, и т.д., и в одном из вариантов осуществления соответственно находится в диапазоне от 0,1 нМ до 100 мкМ, предпочтительно в диапазоне от 100 нМ до 10 мкМ. Массовое соотношение экспрессирующего вектора и носителя, содержащихся в композиции (носитель/экспрессирующий вектор), может варьировать в зависимости от свойств экспрессирующего вектора, типа носителя и т.д., соответственно находится в диапазоне от 0,1 до 100, предпочтительно в диапазоне от 0,1 до 10. Содержание носителя, содержащегося в композиции, такое же, как в случае с композицией по настоящему изобретению, содержащей антисмысловый олигомер по настоящему изобретению, и способ его получения также такой же, как и в случае с композицией по настоящему изобретению.

Далее в настоящем документе настоящее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на примеры и примеры исследований ниже, но оно ими не ограничено.

### Примеры

Пример 1. Получение антисмыслового олигомера.

Согласно способу, описанному в WO 2013/100190, синтезировали антисмысловые олигомеры, показанные в табл. 1 (ФМО № 1-7 (SEQ ID NO: 2-8)), которые нацелены на частичную последовательность

оснований экзона 50 и/или соседний 3'-интрон (интрон 50) в гене дистрофина человека. Полный размер каждого антисмыслового олигомера составил от 19 до 21 звеньев. Также показано теоретическое значение молекулярной массы каждого антисмыслового олигомера и ее величина, найденная путем ESI-TOF-MS.

В табл. 1, например, "H50\_109-129" представляет собой вариант, когда 5'-концевое основание экзона 50 в гене дистрофина человека считается 1-м основанием, а его нижележащие основания в 3'-направлении нумеруются по порядку, антисмысловый олигомер нацелен на последовательность со 109 по 129 основание. Поскольку полноразмерный экзон 50 составляет 109 оснований, последовательность оснований со 110 по 130 в целевой последовательности оснований представляет собой последовательность оснований в интроне 50 в этом примере.

Таблица 1

Синтезированные антисмысловые олигомеры (ФМО № 1-7)

№ ФМО	Целевая последовательность оснований	Полная длина	Последовательность оснований ФМО	Молекулярная масса		SEQ ID NO
				Теоретическое значение	Обнаруженное значение	
1	H50_109-129	21	ATGGGATCCAGTATACTTAC A	6946,42	6946,25	2
2	H50_110-129	20	ATGGGATCCAGTATACTTAC	6607,30	6607,72	3
3	H50_110-128	19	TGGGATCCAGTATACTTAC	6268,18	6268,26	4
4	H50_111-129	19	ATGGGATCCAGTATACTT A	6292,19	6291,8	5
5	H50_107-125	19	GATCCAGTATACTTACAG G	6277,19	6276,75	6
6	H50_108-126	19	SOATCCAGTATACTTACAG	6277,19	6277,13	7
7	H50_112-130	19	AATOGGATCCAGTATACTT	6292,19	6292,97	8

Пример 2. Исследование активности антисмыслового олигомера по пропуску экзона.

Тест *in vitro* по пропуску экзона 50 в гене дистрофина человека.

(1) Способ исследования.

С использованием набора Amaxa Cell Line Nucleofector L и Nucleofector II (Lonza) трансфицировали до  $3,5 \times 10^5$  клеток RD (линии клеток рабдомиосаркомы человека, CCL-136, куплены в ATCC) от 0,1 до 1 мкМ каждого антисмыслового олигомера из табл. 1. Для трансфекции использовалась импульсная программа T-030.

После трансфекции клетки RD культивировали в течение трех ночей в 2 мл минимальной эссенциальной среды Игла (EMEM) (Sigma, далее в настоящем документе то же), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) (Invitrogen) в условиях 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

Трансфицированные клетки RD однократно отмывали PBS (Nissui, далее в настоящем документе то же) и добавляли к клеткам 350 мкл Буфера RA1 (Takara Bio Inc.), содержащего 1% 2-меркаптоэтанола (Nacalai Tesque, Inc.). После того как клеткам давали постоять при комнатной температуре в течение нескольких минут для лизиса клеток, лизат собирали на фильтре NucleoSpin (зарегистрированный товарный знак) (Takara Bio Inc.). Гомогенат был получен с помощью центрифугирования при 11000×g в течение 1 мин. Тотальную РНК экстрагировали из клеток в соответствии с протоколом, прилагаемым к NucleoSpin RNA (зарегистрированный товарный знак) (Takara Bio Inc.). Концентрация выделенной тотальной РНК определяли с использованием NanoDrop ONE (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Одностадийную ОТ-ПЦР проводили с 400 нг выделенной тотальной РНК с использованием набора QIAGEN One Step RT-PCR (Qiagen) и термоциклера. Реакционный раствор получали в соответствии с протоколом, приложенным к набору. Использовали термоциклер TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch (Takara Bio Inc.). Использовали следующую программу ОТ-ПЦР.

50°C, 30 мин: реакция обратной транскрипции;

95°C, 15 мин: активация полимеразы, инактивация обратной транскриптазы, термоденатурация кДНК;

94°C, 30 с; 60°C, 30 с; 72°C, 1 мин]×35 циклов: амплификация ПНР;

72°C, 10 мин: финальное удлинение;

Последовательности оснований прямого праймера и обратного праймера, используемые для ОТ-ПЦР, приведены ниже.

Прямой праймер: 5'-AACAAACCGGATGTGGAAGAG-3' (SEQ ID NO: 9)

Обратный праймер: 5'-TTGGAGATGGCAGTTTCCTT-3' (SEQ ID NO: 10).

1 мкл продукт реакции ПЦР выше анализировали с использованием биоанализатора (Agilent Technologies, Inc.) и MultiNA (Shimadzu Corp).

Уровень полинуклеотида в полосе, показывающей, что экзон 50 был пропущен (уровень полинуклеотида "А"), и уровень полинуклеотида в полосе, показывающей, что экзон 50 не был пропущен (уровень полинуклеотида "В"), измеряли как интенсивности сигналов полос. На основании этих измеренных значений "А" и "В", оценивали эффективность пропуска по уравнению (1), упомянутому выше.

2) Результаты исследований.

На фиг. 1-3 показаны результаты относительно эффективности пропуска экзона 50, полученной по каждому антисмысловому олигомеру. В табл. 2-4 ниже показано значение эффективной концентрации ( $EC_{50}$ ), при которой каждый антисмысловый олигомер проявляет 50% эффективность пропуска ES, которую рассчитывали из этих результатов. Это исследование показало, что ФМО № 1-4 среди антисмысловых олигомеров имели высокую эффективность пропуска ES и низкое значение  $EC_{50}$  и, таким образом, эффективно вызывали пропуск экзона 50.

Среди антисмысловых олигомеров с полноразмерной длиной 19 звеньев, как в ФМО № 3 и 4, ФМО № 5-7 имели низкую эффективность пропуска и высокое значение  $EC_{50}$ . Также велика степень перекрытия между последовательностями оснований, на которые нацелены ФМО № 3 и 4 и ФМО № 5-7. Таким образом, заметна эффективность ФМО № 3 и 4 для пропуска экзона 50.

Эти результаты показали, что антисмысловый олигомер по настоящему изобретению, даже если его длина коротка по сравнению с известным уровнем техники, может индуцировать пропуск экзона 50 с высокой эффективностью.

Таблица 2

 $EC_{50}$  антисмысловых олигомеров (ФМО № 1 и 2)

№ ФМО	$EC_{50}$ (мкМ)	$EC_{50}$ (мг/мл)
1	0,45	3,12
2	0,49	3,22

Таблица 3

 $EC_{50}$  антисмысловых олигомеров (ФМО № 1, 3 и 4)

№ ФМО	$EC_{50}$ (мкМ)	$EC_{50}$ (мг/мл)
1	0,31	2,16
3	0,45	2,82
4	0,52	3,

Таблица 4

 $EC_{50}$  антисмысловых олигомеров (ФМО № 1, 5, 6 и 7)

№ ФМО	$EC_{50}$ (мкМ)	$EC_{50}$ (мг/мл)
1	0,41	2,87
5	16,08	100,99
6	3,13	9,78
7	1,23	7,75

Пример 3. Исследование растворимости антисмыслового олигомера. Исследование растворимости антисмыслового олигомера в физиологическом растворе.

Среди антисмысловых олигомеров с высокой эффективностью пропуска ES в примере 2, каждый антисмысловый олигомер ФМО № 2, 3 и 4, который имел полную длину от от 19 до 20 нуклеотидов и был синтезирован подходящим способом, тестировали на его растворимость в физиологическом растворе для того, чтобы дополнительно подтвердить полезность для медицинского применения.

(1) Способ исследования.

45 мкл физиологического раствора добавляли в бутылку для образцов, содержащую 4,5 мг каждого антисмыслового олигомера выше, и перемешивали с использованием ультразвуковых волн и вортекса для приготовления 100 мг/мл физиологического раствора. Последовательность, которая не вызывала осаждения при комнатной температуре в течение 24 ч, оценивали как имеющую высокую растворимость.

(2) Результаты исследований.

Все исследованные антисмысловые олигомеры показали растворимость, равную или превышающую 100 мг/мл в физиологическом растворе. Эти антисмысловые олигомеры являются антисмысловыми олигомерами, в высшей степени полезными в качестве лекарственных средств из-за их высокой эффективности по пропуску экзона 50, а также высокой растворимости в физиологических растворах.

Эти результаты демонстрируют, что антисмысловый олигомер по настоящему изобретению имеет



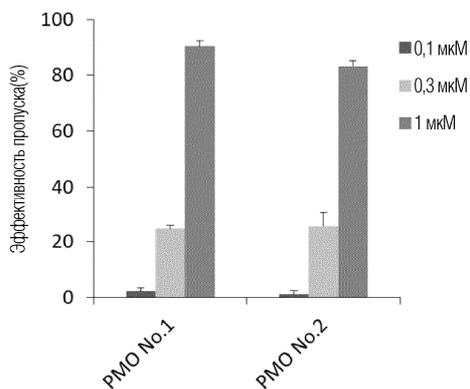
рата по любому из пп.1-10 в производстве лекарственного средства для лечения миодистрофии.

18. Способ лечения миодистрофии, который предусматривает введение пациенту с миодистрофией эффективного количества антисмыслового олигомера, или его фармацевтически приемлемой соли, или гидрата по любому из пп.1-10, или фармацевтической композиции по любому из пп.11-15.

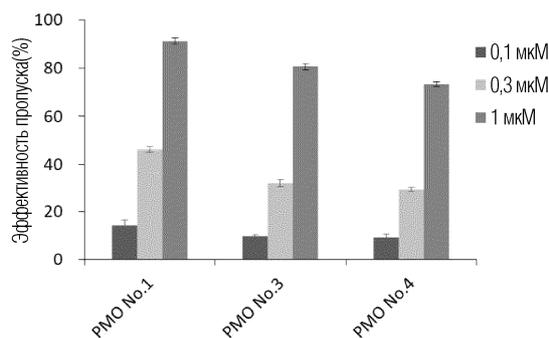
19. Способ лечения по п.18, в котором пациент является человеком.

20. Применение антисмыслового олигомера, или его фармацевтически приемлемой соли, или гидрата по любому из пп.1-10, или фармацевтической композиции по любому из пп.11-15 для лечения миодистрофии.

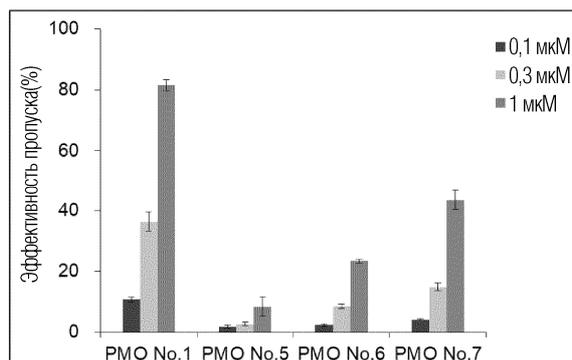
21. Применение по п.20, где при лечении пациент с миодистрофией является человеком.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

