

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202490787 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.05.22(51) Int. Cl. C12N 15/113 (2010.01)  
A61K 31/712 (2006.01)  
A61P 21/00 (2006.01)(22) Дата подачи заявки  
2022.09.28

## (54) АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ОДНУ ИЛИ БОЛЕЕ ЕДИНИЦ С УДАЛЕННЫМ АЗОТИСТЫМ ОСНОВАНИЕМ

(31) 63/261,860; 63/408,277

(72) Изобретатель:

(32) 2021.09.30; 2022.09.20

Оливер Райан, Ким Кевин, Ахерн  
Меган (US)

(33) US

(86) PCT/US2022/044995

(74) Представитель:

(87) WO 2023/055774 2023.04.06

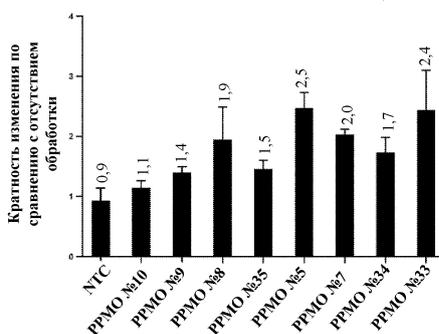
Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

САРЕПТА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.  
(US)

(57) Изобретение относится к олигонуклеотидам, конъюгатам пептид-олигонуклеотид и нацеливающей последовательности, комплементарной целевой области в пределах интрона 1 pre-mRNA гена кислой альфа-глюкозидазы (GAA) человека, содержащим по меньшей мере одну субъединицу с удаленным азотистым основанием без пурина и пиримидина. Также изобретение относится к способам лечения мышечного заболевания, вирусной инфекции или бактериальной инфекции у субъекта, нуждающегося в этом, включающим введение субъекту олигонуклеотидов, пептидов и конъюгатов пептид-олигонуклеотид, описанных в настоящем описании.

Анализ активности GAA (10 мкМ hFb)



A1

202490787

202490787

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580801EA/055

### АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ОДНУ ИЛИ БОЛЕЕ ЕДИНИЦ С УДАЛЕННЫМ АЗОТИСТЫМ ОСНОВАНИЕМ РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 63/408277, поданной 20 сентября 2022 года, и предварительной заявке на патент США № 63/261860, поданной 30 сентября 2021 года, полное содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Антисмысловая технология обеспечивает средства для модулирования экспрессии одного или более специфических генных продуктов, включая продукты альтернативного сплайсинга, и она уникальным образом применима в ряде вариантов применения с терапевтической, диагностической и исследовательской целью. Принцип, лежащий в основе антисмысловой технологии, заключается в том, что антисмысловое соединение, например олигонуклеотид, который гибридизируется с целевой нуклеиновой кислотой, модулирует такие виды активности экспрессии генов, как транскрипция, сплайсинг или трансляция, посредством любого из ряда антисмысловых механизмов. Специфичность последовательностей антисмысловых соединений делает их перспективными в качестве инструментов для валидации мишеней и функционализации генов, а также терапевтических средств, для избирательной модуляции экспрессии генов, участвующих в заболевании.

Болезнь накопления гликогена II типа (GSD-II) (также известная как болезнь Помпе, гликогеноз II, дефицит кислой мальтазы (AMD)) представляет собой наследственное аутосомно-рецессивное лизосомное нарушение накопления, обусловленное дефицитом фермента, называемого кислой альфа-глюкозидазой (GAA). Роль GAA в организме заключается в разрушении гликогена. Снижение уровней активности GAA или их отсутствие приводит к накоплению гликогена в пораженных тканях, включая сердце, скелетные мышцы (в том числе участвующие в дыхании), печень и нервную систему. Считается, что это накопление гликогена вызывает прогрессирующую мышечную слабость и дыхательную недостаточность у индивидуумов с GSD-II. GSD-II может возникать у младенцев, детей дошкольного возраста или взрослых людей, и прогноз различается в зависимости от ее времени начала и тяжести симптомов. С клинической точки зрения GSD-II может проявляться широким и непрерывным спектром значений степени тяжести в диапазоне от тяжелой (младенческой) до более легкой формы у взрослых людей с поздним началом. Пациенты в конечном итоге умирают из-за дыхательной недостаточности. Существует четкая корреляция между степенью тяжести заболевания и остаточной активностью кислой альфа-глюкозидазы, при этом активность составляет 10-20% от нормальной при позднем начале и менее 2% при формах с ранним началом заболевания. Согласно оценкам, GSD-II поражает примерно 5000-10000 людей во всем мире.

Наиболее распространенной мутацией, ассоциированной с формой заболевания, возникающей во взрослом возрасте, является IVS1-13T>G. Данная мутация, обнаруживаемая у более чем двух третей пациентов с GSD-II, возникающей во взрослом возрасте, может придавать избирательное преимущество у гетерозиготных индивидуумов или она представляет собой очень старую мутацию. Широкое этническое разнообразие индивидуумов с GSD-II, возникающей во взрослом возрасте, при наличии данной мутации противоречит общему основоположению.

Ген *GAA* состоит из 20 экзонов, охватывающих приблизительно 20 т. о. mRNA размером 3,4 т. о. кодирует белок с молекулярной массой приблизительно 105 кДа. Мутация IVS1-13T>G приводит к полной или частичной потере экзона 2 (577 оснований), который содержит иницирующий кодон AUG.

Лечение GSD-II, предусматривающее стратегии лечения с применением лекарственных средств, подбор диеты и трансплантацию костного мозга, значительного успеха не имело. В последние годы ферментозаместительная терапия (ERT) дала новую надежду пациентам с GSD-II. Например, в 2006 году лекарственное средство на основе рекомбинантного белка *GAA* Myozyme<sup>®</sup> получило одобрение для применения у пациентов с заболеванием GSD-II как в США, так и в Европе. Myozyme<sup>®</sup> зависит от манноза-6-фосфатов (М6Р) на поверхности белка *GAA* для доставки в лизосомы. Управление США по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов также одобрило Nexvzyme<sup>®</sup> (авалглюкозидаза альфа-ngpt) для лечения пациентов с болезнью Помпе с поздним началом. Nexvzyme представляет собой средство ферментозаместительной терапии (ERT), разработанное для специфического нацеливания на рецептор М6Р.

Антисмысловая технология, применяемая в основном для понижающей регуляции РНК, недавно была адаптирована для изменения процесса сплайсинга. Процессинг первичных генных транскриптов (pre-mRNA) множества генов включает удаление интронов и точный сплайсинг экзонов, при котором донорный участок сплайсинга присоединяется к акцепторному участку сплайсинга. Сплайсинг представляет собой точный процесс, включающий скоординированное распознавание донорного и акцепторного участков сплайсинга и точку разветвления (выше акцепторного предварительного участка) с помощью баланса положительных энхансеров сплайсинга экзонов (преимущественно расположенных в пределах экзон) и отрицательных мотивов сплайсинга (сайленсеры сплайсинга расположены преимущественно в интронах).

Хотя в области антисмысловой технологии был достигнут значительный прогресс, в данной области техники остается потребность в олигонуклеотидах и конъюгатах пептид-олигонуклеотид с улучшенными антисмысловыми или антигенными характеристиками для улучшенного лечения GSD-II.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к антисмысловым олигомерам и родственным композициям, а также способам индуцирования включения экзона в качестве лечения болезни накопления гликогена II типа (GSD-II) (также известной как болезнь Помпе,

гликогеноз II, дефицит кислой мальтазы (AMD), дефицит кислой альфа-глюкозидазы и дефицит лизосомной альфа-глюкозидазы), и более конкретно относится к индуцированию включения экзона 2 и, таким образом, к восстановлению уровней ферментативно активного белка кислой альфа-глюкозидазы (GAA), кодируемого геном *GAA*.

Таким образом, в данном документе предусмотрены антисмысловые олигомеры или их фармацевтически приемлемые соли, где антисмысловой олигомер составляет 18-40 субъединиц в длину, при этом он содержит нацеливающую последовательность, комплементарную целевой области в пределах интрона 1 (SEQ ID NO: 1) pre-mRNA гена кислой альфа-глюкозидазы (GAA) человека, где:

каждая субъединица антисмыслового олигомера содержит нуклеиновое основание или представляет собой субъединицу с удаленным азотистым основанием;

по меньшей мере одна субъединица представляет собой субъединицу с удаленным азотистым основанием; и

где нацеливающая последовательность, за исключением субъединицы или субъединиц с удаленным азотистым основанием, на по меньшей мере 80% комплементарна целевой области.

Антисмысловые олигомеры применимы для лечения различных заболеваний у субъекта, нуждающегося в этом, включая без ограничения такие заболевания, как болезнь Помпе.

Антисмысловой олигомер может представлять собой фосфородиамидатный морфолиновый олигомер. Антисмысловой олигомер может дополнительно содержать проникающий в клетку пептид. Пептид может представлять собой любой из пептидов, предусмотренных в данном документе или известных из уровня техники.

В одном варианте осуществления целевая область содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 (GAA-IVS1(-189-167)) и SEQ ID NO: 3 (GAA-IVS1(-80-24)). В другом варианте осуществления нацеливающая область выбрана из GAA-IVS1(-189-167), GAA-IVS1(-72,-48), GAA-IVS1(-71,-47), GAA-IVS1(-70,-46), GAA-IVS1(-69-45), GAA-IVS1(-65,-41), GAA-IVS1(-66,-42). В дополнительном варианте осуществления нацеливающая область представляет собой GAA-IVS1(-189-167). В другом варианте осуществления нацеливающая область представляет собой GAA-IVS1(-72,-48). В еще одном варианте осуществления нацеливающая область представляет собой GAA-IVS1(-71,-47). В еще одном варианте осуществления нацеливающая область представляет собой GAA-IVS1(-70,-46). В одном варианте осуществления нацеливающая область представляет собой GAA-IVS1(-69-45). В другом варианте осуществления нацеливающая область представляет собой GAA-IVS1(-65,-41). В еще одном варианте осуществления нацеливающая область представляет собой GAA-IVS1(-66,-42).

В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит любую из следующих последовательностей или состоит из нее:

<b>Название</b>	<b>Нацеливающая последовательность [от 5' до 3']</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
GAA-IVS1(-189, 167)	CCA GAA GGA AXX XCG AGA AAA GC	4
GAA-IVS1(-72,-48)	CTC ACX XXX CTC TCA AAG CAG CTC T	11
GAA-IVS1(-71,-47)	ACT CAC XXX XCT CTC AAA GCA GCT C	12
GAA-IVS1(-70,-46)	CAC TCA CXX XXC TCT CAA AGC AGC T	13
GAA-IVS1(-69-45)	GCA CTC ACX XXX CTC TCA AAG CAG C	14
GAA-IVS1(-65,-41)	GCG GCA CTC ACX XXX CTC TCA AAG C	15
GAA-IVS1(-66,-42)	GGC GGC ACT CAC XXX XCT CTC AAA G	16

где каждый X независимо выбран из гуанина (G) или представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием (B), при этом по меньшей мере один X представляет собой B. В случаях, когда X представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием (B), вместо нуклеиновых оснований А, С, Т или G присутствует водород.

В одном варианте осуществления B представляет собой H.

В дополнительном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит любую из следующих последовательностей или состоит из нее:

<b>Название</b>	<b>Нацеливающая последовательность [от 5' до 3']</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
GAA-IVS1(-189, 167) (-179 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA AGG BCG AGA AAA GC	5
GAA-IVS1(-189, 167) (-178 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA AGB GCG AGA AAA GC	6
GAA-IVS1(-189, 167) (-177 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA ABG GCG AGA AAA GC	7
GAA-IVS1(-189, 167) (-178,-179 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA AGB BCG AGA AAA GC	8
GAA-IVS1(-189, 167) (-177,-178 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA ABB GCG AGA AAA GC	9
GAA-IVS1(-189, 167) (-177,-179 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA ABG BCG AGA AAA GC	10
GAA-IVS1(-69-45) (G53B)	GCA CTC ACB GGG CTC TCA AAG CAG C	17
GAA-IVS1(-69-45) (G54B)	GCA CTC ACG BGG CTC TCA AAG CAG C	18
GAA-IVS1(-69-45) (G55B)	GCA CTC ACG GBG CTC TCA AAG CAG C	19
GAA-IVS1(-69-45) (G56B)	GCA CTC ACG GGB CTC TCA AAG CAG C	20

GAA-IVS1(-69-45) (G53B G54B)	GCA CTC ACB BGG CTC TCA AAG CAG C	21
GAA-IVS1(-69-45) (G54B G55B)	GCA CTC ACG BBG CTC TCA AAG CAG C	22
GAA-IVS1(-69-45) (G55B G56B)	GCA CTC ACG GBB CTC TCA AAG CAG C	23
GAA-IVS1(-65-41) (G54B G55B)	GGC GGC ACT CAC GBB GCT CTC AAA G	24.

В одном варианте осуществления В представляет собой Н.

В некоторых аспектах нуклеиновые основания антисмыслового олигомера связаны с кольцевыми структурами на основе морфолиновой группы, где кольцевые структуры на основе морфолиновой группы присоединены с помощью фосфорсодержащих межсубъединичных связей, присоединяющих азот морфолиновой группы одной кольцевой структуры к 5'-экзоциклическому углероду смежной кольцевой структуры.

В некоторых аспектах нуклеиновые основания антисмыслового олигомера связаны с пептидной нуклеиновой кислотой (PNA), где сахарофосфатный полинуклеотидный остов заменен гибким псевдопептидным полимером, с которым связаны нуклеиновые основания.

В некоторых аспектах по меньшей мере одно из нуклеиновых оснований антисмыслового олигомера связано с запертой нуклеиновой кислотой (LNA), где структура запертой нуклеиновой кислоты представляет собой аналог нуклеотида, который является химически модифицированным, где рибозный фрагмент имеет дополнительный мостик, соединяющий 2'-кислород и 4'-углерод.

В некоторых аспектах по меньшей мере одно из нуклеиновых оснований антисмыслового олигомера связано с мостиковой нуклеиновой кислотой (BNA), где конформация сахара является ограниченной или запертой вследствие введения дополнительной мостиковой структуры в фуранозный каркас. В некоторых аспектах по меньшей мере одно из нуклеиновых оснований антисмыслового олигомера связано с 2'-О,4'-С-этилен-мостиковой нуклеиновой кислотой (ENA).

В некоторых аспектах модифицированный антисмысловый олигомер может содержать субъединицы незапертой нуклеиновой кислоты (UNA). UNA и олигомеры UNA являются аналогом РНК, у которого связь С2'-С3' в субъединице расщеплена.

В некоторых аспектах модифицированный антисмысловый олигомер содержит один или более фосфотиоатов (или S-олигонуклеотидов), в которых один из атомов немостикового кислорода заменен атомом серы. В некоторых аспектах модифицированный антисмысловый олигомер содержит одно или более из 2'-О-метила, 2'-О-МОЕ, МСЕ и 2'-F, в которых 2'-ОН рибозы замещено метильной, метоксиэтильной, 2-(N-метилкарбамоил)этильной или фторгруппой соответственно.

В некоторых аспектах модифицированный антисмысловый олигомер представляет собой трицикло-ДНК (tc-DNA), которая является аналогом ДНК с ограниченной конформационной свободой, где каждый нуклеотид модифицирован посредством введения циклопропанового кольца для ограничения конформационной гибкости остова и оптимизации геометрии торсионного угла  $\gamma$  остова.

В одном аспекте антисмысловый олигомер представляет собой модифицированный

антисмысловой олигонуклеотид, где:

модифицированный антисмысловой олигонуклеотид составляет 18-40 субъединиц в длину, при этом он содержит нацеливающую последовательность, комплементарную целевой области в пределах интрона 1 (SEQ ID NO: 1) pre-mRNA гена кислой альфа-глюкозидазы (GAA) человека, где:

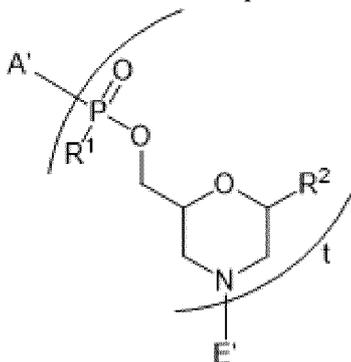
антисмысловой олигонуклеотид предусматривает морфолиновый олигомер;

каждая субъединица антисмыслового олигонуклеотида содержит нуклеиновое основание или представляет собой субъединицу с удаленным азотистым основанием, при этом каждая субъединица, взятая в совокупности в порядке от 5'-конца антисмыслового олигонуклеотида до 3'-конца антисмыслового олигонуклеотида, образует нацеливающую последовательность;

по меньшей мере одна субъединица представляет собой субъединицу с удаленным азотистым основанием; и

где нацеливающая последовательность, за исключением субъединицы или субъединиц с удаленным азотистым основанием, на по меньшей мере 80% комплементарна целевой области.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрены антисмысловые олигомеры в соответствии с формулой I:

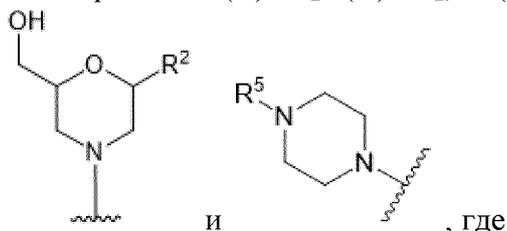


(I),

или их фармацевтически приемлемая соль,

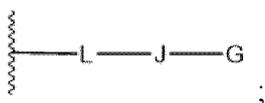
где

A' выбран из  $-N(H)CH_2C(O)NH_2$ ,  $-N(C_{1-6}\text{алкил})CH_2C(O)NH_2$ ,



$R^5$  представляет собой  $-C(O)(O\text{-алкил})_x-OH$ , где  $x$  составляет 3-10, и каждая алкильная группа независимо в каждом случае представляет собой  $C_{2-6}$ алкил,

или  $R^5$  выбран из H,  $-C(O)C_{1-6}$ алкила, тритила, монометокситритила,  $-(C_{1-6}\text{алкил})-R^6$ ,  $-(C_{1-6}\text{гетероалкил})-R^6$ , арил- $R^6$ , гетероарил- $R^6$ ,  $-C(O)O-(C_{1-6}\text{алкил})-R^6$ ,  $-C(O)O\text{-арил}-R^6$ ,  $-C(O)O\text{-гетероарил}-R^6$ , и



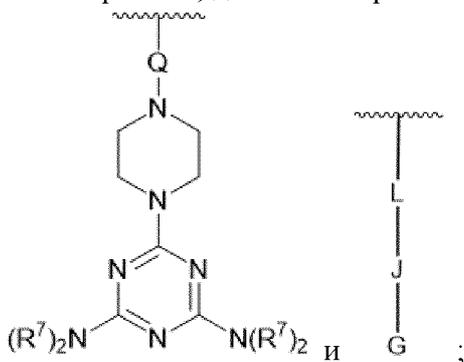
$R^6$  выбран из OH, SH и  $NH_2$ , или  $R^6$  представляет собой O, S или NH, каждый из которых ковалентно связан с твердой подложкой;

каждый  $R^1$  независимо выбран из OH и  $-N(R^3)(R^4)$ , где каждый из  $R^3$  и  $R^4$  независимо в каждом случае представляет собой H или  $-C_{1-6}$ алкил;

каждый  $R^2$  независимо в каждом случае выбран из H (с удаленным азотистым основанием), нуклеинового основания и нуклеинового основания, функционализованного химической защитной группой, при этом нуклеиновое основание независимо в каждом случае содержит  $C_{3-6}$ -гетероциклическое кольцо, выбранное из пиридина, пиримидина, пурина и дезапурина;

t составляет 8-40;

$E'$  выбран из H,  $-C_{1-6}$ алкила,  $-C(O)C_{1-6}$ алкила, бензоила, стеароила, тритила, монометокситритила, диметокситритила, триметокситритила,



где

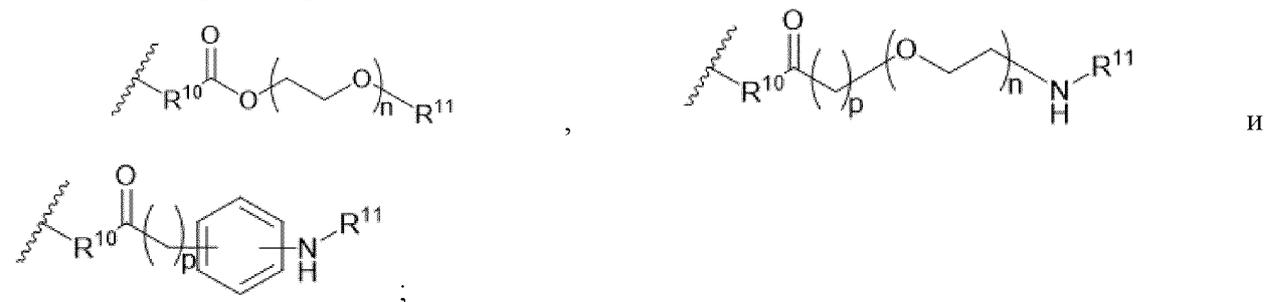
Q представляет собой  $-C(O)(CH_2)_6C(O)-$  или  $-C(O)(CH_2)_2S_2(CH_2)_2C(O)-$ ;

$R^7$  представляет собой  $-(CH_2)_2OC(O)N(R^8)_2$ , где  $R^8$  представляет собой  $-(CH_2)_6NHC(=NH)NH_2$ ;

L выбран из глицина, пролина, W, W-W или  $R^9$ , при этом L ковалентно связан посредством амидной связи с N-концом или C-концом J;

W представляет собой  $-C(O)-(CH_2)_m-NH-$ , где m составляет от 2 до 12;

$R^9$  выбран из группы, состоящей из

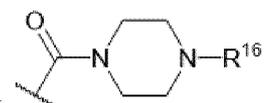


n равняется 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

p равняется 2, 3, 4 или 5;

$R^{10}$  выбран из связи, глицина, пролина, W или W-W;

R<sup>11</sup> выбран из группы, состоящей из глицина, пролина, W, W-W и

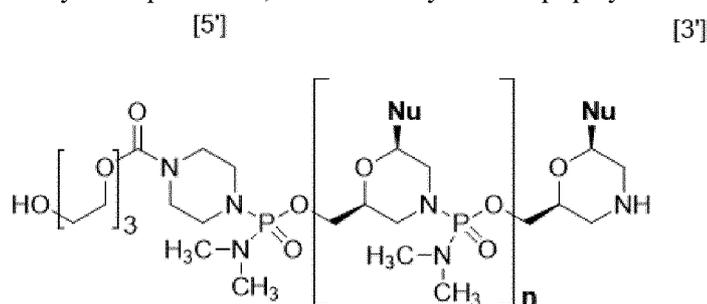


;

R<sup>16</sup> выбран из связи, глицина, пролина, W или W-W; при этом R<sup>16</sup> ковалентно связан посредством амидной связи с N-концом или C-концом J; J представляет собой проникающий в клетку пептид; и

G выбран из H, -C(O)C<sub>1-6</sub>алкила, бензоила и стеариола, при этом G ковалентно связан с J.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрен антисмысловой олигомер по настоящему изобретению, соответствующий формуле II:



(II),

или его фармацевтически приемлемая соль, где каждый Nu от 1 до n и от 5' до 3' соответствует нуклеиновым основаниям в одном из следующих:

Название	Нацеливающая последовательность [от 5' до 3']	SEQ ID NO:
GAA-IVS1(-189, 167)	CCA GAA GGA AXX XCG AGA AAA GC	4
GAA-IVS1(-72,-48)	CTC ACX XXX CTC TCA AAG CAG CTC T	11
GAA-IVS1(-71,-47)	ACT CAC XXX XCT CTC AAA GCA GCT C	12
GAA-IVS1(-70,-46)	CAC TCA CXX XXC TCT CAA AGC AGC T	13
GAA-IVS1(-69-45)	GCA CTC ACX XXX CTC TCA AAG CAG C	14
GAA-IVS1(-65,-41)	GCG GCA CTC ACX XXX CTC TCA AAG C	15
GAA-IVS1(-66,-42)	GGC GGC ACT CAC XXX XCT CTC AAA G	16

где каждый X независимо выбран из гуанина (G) или представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием (B), при этом по меньшей мере один X представляет собой B. В случаях, когда X представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием (B), вместо нуклеиновых оснований А, С, Т или G присутствует водород.

В одном варианте осуществления B представляет собой H.

В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит любую из следующих последовательностей или состоит из нее:

Название	Нацеливающая последовательность [от 5' до 3']	SEQ ID NO:
----------	--------------------------------------------------	------------

GAA-IVS1(-189, 167) (-179 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA AGG BCG AGA AAA GC	5
GAA-IVS1(-189, 167) (-178 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA AGB GCG AGA AAA GC	6
GAA-IVS1(-189, 167) (-177 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA ABG GCG AGA AAA GC	7
GAA-IVS1(-189, 167) (-178,-179 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA AGB BCG AGA AAA GC	8
GAA-IVS1(-189, 167) (-177,-178 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA ABB GCG AGA AAA GC	9
GAA-IVS1(-189, 167) (-177,-179 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA ABG BCG AGA AAA GC	10
GAA-IVS1(-69-45) (G53B)	GCA CTC ACB GGG CTC TCA AAG CAG C	17
GAA-IVS1(-69-45) (G54B)	GCA CTC ACG BGG CTC TCA AAG CAG C	18
GAA-IVS1(-69-45) (G55B)	GCA CTC ACG GBG CTC TCA AAG CAG C	19
GAA-IVS1(-69-45) (G56B)	GCA CTC ACG GGB CTC TCA AAG CAG C	20
GAA-IVS1(-69-45) (G53B G54B)	GCA CTC ACB BGG CTC TCA AAG CAG C	21
GAA-IVS1(-69-45) (G54B G55B)	GCA CTC ACG BBG CTC TCA AAG CAG C	22
GAA-IVS1(-69-45) (G55B G56B)	GCA CTC ACG GBB CTC TCA AAG CAG C	23
GAA-IVS1(-65-41) (G54B G55B)	GGC GGC ACT CAC GBB GCT CTC AAA G	24.

В одном варианте осуществления В представляет собой Н.

В одном варианте осуществления антисмысловой олигомер представляет собой конъюгат, содержащий модифицированный антисмысловой олигонуклеотид и проникающий в клетку пептид, где:

модифицированный антисмысловой олигонуклеотид составляет 18-40 субъединиц в длину, при этом он содержит нацеливающую последовательность, комплементарную целевой области в пределах интрона 1 (SEQ ID NO: 1) pre-mRNA гена кислой альфа-глюкозидазы (GAA) человека, где:

антисмысловой олигонуклеотид предусматривает морфолиновый олигомер;

антисмысловой олигонуклеотид ковалентно связан с проникающим в клетку пептидом;

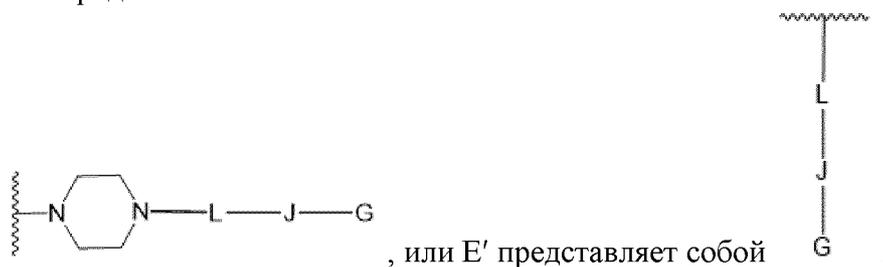
каждая субъединица антисмыслового олигонуклеотида содержит нуклеиновое основание или представляет собой субъединицу с удаленным азотистым основанием, при этом каждая субъединица, взятая в совокупности в порядке от 5'-конца антисмыслового олигонуклеотида до 3'-конца антисмыслового олигонуклеотида, образует нацеливающую последовательность;

по меньшей мере одна субъединица представляет собой субъединицу с удаленным азотистым основанием; и

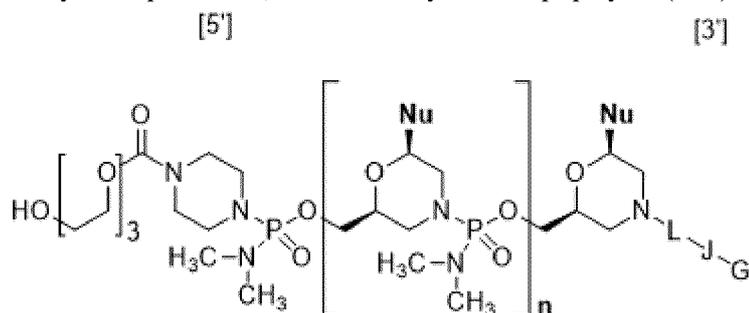
где нацеливающая последовательность, за исключением субъединицы или субъединиц с удаленным азотистым основанием, на по меньшей мере 80% комплементарна

целевой области.

Таким образом, в одном варианте осуществления формулы I или соответствующей ей соли A' представляет собой



В некоторых вариантах осуществления представлен антисмысловый олигомер по настоящему изобретению, соответствующий формуле (IIIa):



(IIIa),

или его фармацевтически приемлемая соль, где каждый Nu от 1 до n и от 5' до 3' соответствует нуклеиновым основаниям в одном из следующих:

Название	Нацеливающая последовательность [от 5' до 3']	SEQ ID NO:
GAA-IVS1(-189, 167)	CCA GAA GGA AXX XCG AGA AAA GC	4
GAA-IVS1(-72,-48)	CTC ACX XXX CTC TCA AAG CAG CTC T	11
GAA-IVS1(-71,-47)	ACT CAC XXX XCT CTC AAA GCA GCT C	12
GAA-IVS1(-70,-46)	CAC TCA CXX XXC TCT CAA AGC AGC T	13
GAA-IVS1(-69-45)	GCA CTC ACX XXX CTC TCA AAG CAG C	14
GAA-IVS1(-65,-41)	GCG GCA CTC ACX XXX CTC TCA AAG C	15
GAA-IVS1(-66,-42)	GGC GGC ACT CAC XXX XCT CTC AAA G	16.

где каждый X независимо выбран из гуанина (G) или представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием (B), при этом по меньшей мере один X представляет собой B. В случаях, когда X представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием (B), вместо нуклеиновых оснований A, C, T или G присутствует водород.

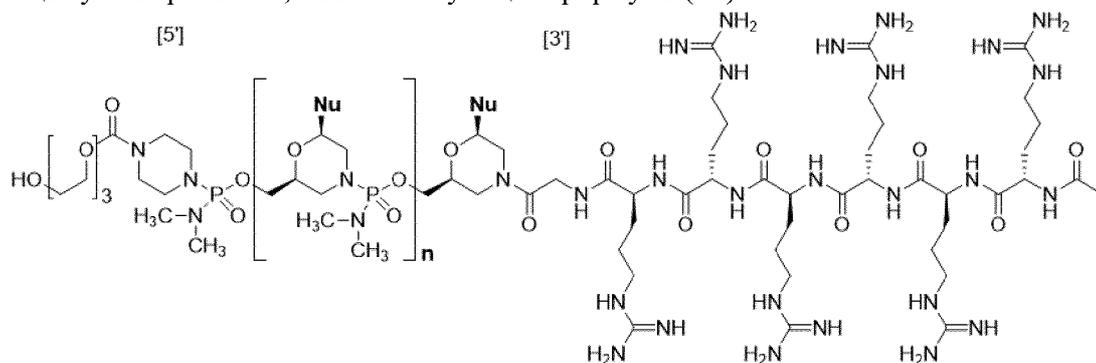
В одном варианте осуществления B представляет собой H.

В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит любую из следующих последовательностей или состоит из нее:

Название	Нацеливающая последовательность [от 5' до 3']	SEQ ID NO:
GAA-IVS1(-189, 167) (-179 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA AGG BCG AGA AAA GC	5
GAA-IVS1(-189, 167) (-178 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA AGB GCG AGA AAA GC	6
GAA-IVS1(-189, 167) (-177 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA ABG GCG AGA AAA GC	7
GAA-IVS1(-189, 167) (-178,-179 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA AGB BCG AGA AAA GC	8
GAA-IVS1(-189, 167) (-177,-178 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA ABB GCG AGA AAA GC	9
GAA-IVS1(-189, 167) (-177,-179 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA ABG BCG AGA AAA GC	10
GAA-IVS1(-69-45) (G53B)	GCA CTC ACB GGG CTC TCA AAG CAG C	17
GAA-IVS1(-69-45) (G54B)	GCA CTC ACG BGG CTC TCA AAG CAG C	18
GAA-IVS1(-69-45) (G55B)	GCA CTC ACG GBG CTC TCA AAG CAG C	19
GAA-IVS1(-69-45) (G56B)	GCA CTC ACG GGB CTC TCA AAG CAG C	20
GAA-IVS1(-69-45) (G53B G54B)	GCA CTC ACB BGG CTC TCA AAG CAG C	21
GAA-IVS1(-69-45) (G54B G55B)	GCA CTC ACG BBG CTC TCA AAG CAG C	22
GAA-IVS1(-69-45) (G55B G56B)	GCA CTC ACG GBB CTC TCA AAG CAG C	23
GAA-IVS1(-65-41) (G54B G55B)	GGC GGC ACT CAC GBB GCT CTC AAA G	24.

В одном варианте осуществления В представляет собой Н.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрен антисмысловый олигомер по настоящему изобретению, соответствующий формуле (III):



(III),

или его фармацевтически приемлемая соль, где каждый Nu от 1 до n и от 5' до 3'

соответствует нуклеиновым основаниям в одном из следующих:

Название	Нацеливающая последовательность [от 5' до 3']	SEQ ID NO:
GAA-IVS1(-189, 167)	CCA GAA GGA AXX XCG AGA AAA GC	4
GAA-IVS1(-72,-48)	CTC ACX XXX CTC TCA AAG CAG CTC T	11
GAA-IVS1(-71,-47)	ACT CAC XXX XCT CTC AAA GCA GCT C	12
GAA-IVS1(-70,-46)	CAC TCA CXX XXC TCT CAA AGC AGC T	13
GAA-IVS1(-69-45)	GCA CTC ACX XXX CTC TCA AAG CAG C	14
GAA-IVS1(-65,-41)	GCG GCA CTC ACX XXX CTC TCA AAG C	15
GAA-IVS1(-66,-42)	GGC GGC ACT CAC XXX XCT CTC AAA G	16

где каждый X независимо выбран из гуанина (G) или представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием (B), при этом по меньшей мере один X представляет собой B. В случаях, когда X представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием (B), вместо нуклеиновых оснований A, C, T или G присутствует водород.

В одном варианте осуществления B представляет собой H.

В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит любую из следующих последовательностей или состоит из нее:

Название	Нацеливающая последовательность [от 5' до 3']	SEQ ID NO:
GAA-IVS1(-189, 167) (-179 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA AGG BCG AGA AAA GC	5
GAA-IVS1(-189, 167) (-178 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA AGB GCG AGA AAA GC	6
GAA-IVS1(-189, 167) (-177 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA ABG GCG AGA AAA GC	7
GAA-IVS1(-189, 167) (-178,-179 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA AGB BCG AGA AAA GC	8
GAA-IVS1(-189, 167) (-177,-178 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA ABB GCG AGA AAA GC	9
GAA-IVS1(-189, 167) (-177,-179 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA ABG BCG AGA AAA GC	10
GAA-IVS1(-69-45) (G53B)	GCA CTC ACB GGG CTC TCA AAG CAG C	17
GAA-IVS1(-69-45) (G54B)	GCA CTC ACG BGG CTC TCA AAG CAG C	18
GAA-IVS1(-69-45) (G55B)	GCA CTC ACG GBG CTC TCA AAG CAG C	19

GAA-IVS1(-69-45) (G56B)	GCA CTC ACG GGB CTC TCA AAG CAG C	20
GAA-IVS1(-69-45) (G53B G54B)	GCA CTC ACB BGG CTC TCA AAG CAG C	21
GAA-IVS1(-69-45) (G54B G55B)	GCA CTC ACG BBG CTC TCA AAG CAG C	22
GAA-IVS1(-69-45) (G55B G56B)	GCA CTC ACG GBB CTC TCA AAG CAG C	23
GAA-IVS1(-65-41) (G54B G55B)	GGC GGC ACT CAC GBB GCT CTC AAA G	24.

В одном варианте осуществления В представляет собой Н.

Антисмысловой олигомер может способствовать сохранению экзона 2 в mRNA GAA после связывания нацеливающей последовательности с целевой областью. Антисмысловой олигомер сохраняет степень ферментативной активности GAA по сравнению со вторым антисмысловым олигонуклеотидом, который полностью комплементарен целевой области в SEQ ID NO: 1. В другом аспекте в данном документе предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая антисмысловой олигомер, предусмотренный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

Также в данном документе предусмотрен способ лечения заболевания, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антисмыслового олигомера, предусмотренного в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер, описанный в данном документе, может применяться для лечения болезни Помпе.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **фиг. 1** показана гистограмма, на которой отображена ферментативная активность GAA (ферментный анализ), определенная для различных соединений РМО в ходе скрининга. По оси Y представлена кратность повышения ферментативной активности GAA по сравнению с контролем без обработки. Доза отдельных соединений составляла 10 мкМ.

На **фиг. 2А** показана гистограмма, на которой отображена ферментативная активность GAA (ферментный анализ), определенная для различных соединений РМО в ходе скрининга. По оси Y представлена ферментативная активность (ммоль/мг ч) и кратность повышения ферментативной активности GAA по сравнению с контролем без обработки (UT). На **фиг. 2В** показана гистограмма, на которой отображена ферментативная активность GAA (ферментный анализ), определенная для различных соединений РМО в ходе скрининга. По оси Y представлена кратность повышения ферментативной активности GAA по сравнению с контролем без обработки. Доза отдельных соединений составляла 20 мкМ.

На **фиг. 3** показаны гистограммы, на которых отображены данные Microwalk для антисмысловых соединений в области -65 интрона 1 pre-mRNA гена кислой альфа-глюкозидазы (GAA) человека. Доза отдельных соединений составляла 20 мкМ.

На **фиг. 4А** показана гистограмма, на которой отображена ферментативная активность GAA (ферментный анализ), определенная для различных соединений РРМО в ходе скрининга. По оси X представлена кратность повышения ферментативной активности GAA по сравнению с ненацеливающим контролем. Доза отдельных соединений составляла

20 мкМ.

На **фиг. 4В** показана гистограмма, на которой отображены уровни транскриптов mRNA *GAA* (анализ qPCR), определенные для различных соединений РРМО в ходе скрининга. По оси X представлена кратность увеличения транскрипта mRNA *GAA*, измеренного в двух местоположениях в mRNA *GAA* по сравнению с ненацеливающим контролем и контролем без обработки. Доза отдельных соединений составляла 30 мкМ.

На **фиг. 5** показаны гистограммы, на которых отображены данные Microwalk для антисмысловых соединений в области -169 интрона 1 pre-mRNA гена *GAA*. Доза отдельных соединений составляла 10 мкМ.

На **фиг. 6** показана гистограмма, на которой отображены показатели дозозависимого повышения ферментативной активности *GAA* в фибробластах пациентов после гипнотической обработки с помощью РРМО № 33, 34, 5 и 7.

На **фиг. 7** показана гистограмма, на которой отображены уровни транскриптов mRNA *GAA* (анализ qPCR), выявленные для соединений РРМО в ходе скрининга. По оси Y представлена кратность увеличения транскрипта mRNA *GAA* по сравнению с ненацеливающим контролем и контролем без обработки. Дозы отдельных соединений составляли 1, 2,5, 5, 10, 20 и 30 мкМ.

На **фиг. 8** показан график, на котором отображены показатели дозозависимого повышения экспрессии *GAA*, измеренной вдоль соединения экзонов 1-2 в полученных из iPSC пациентов мышечных трубочках после гипнотической обработки с помощью выбранных РРМО № 34, 5 и 7.

На **фиг. 9** показаны цифровые изображения геля и графики, на которых отображены показатели повышения количества белка *GAA*, нормализованного к общему белку, в полученных из iPSC пациентов мышечных трубочках после обработки с помощью РРМО № 5, 7 и 34.

На **фиг. 10** показаны цифровое изображение геля и график, на которых отображены показатели повышения количества белка *GAA*, нормализованного к общему белку, в полученных из iPSC пациентов мышечных трубочках после обработки с помощью РРМО № 12 и 15.

На **фиг. 11** показан график, на котором отображены показатели повышения уровня ферментативной активности *GAA* в полученных из iPSC пациентов мышечных трубочках после обработки с помощью РРМО № 7, 5 и 12.

На **фиг. 12** показаны графики, на которых отображена эффективность агрегации выбранных соединений РРМО. Результаты представлены на графике в виде распределения по размеру/интенсивности.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе представлены антисмысловые олигомеры или их фармацевтически приемлемые соли, где антисмысловый олигомер составляет 18-40 субъединиц в длину, при этом он содержит нацеливающуюся последовательность, комплементарную целевой области в пределах интрона 1 (SEQ ID NO: 1) pre-mRNA гена

кислой альфа-глюкозидазы (GAA) человека, где по меньшей мере одна субъединица представляет собой субъединицу с удаленным азотистым основанием. Антисмысловые олигомеры применимы для лечения различных заболеваний у субъекта, нуждающегося в этом, включая без ограничения болезнь Помпе.

Определенные варианты осуществления относятся к способам повышения уровня GAA-кодирующей mRNA, содержащей экзон 2, по сравнению с mRNA GAA с удаленным экзоном 2 в клетке, включающим приведение клетки в контакт с антисмысловым олигомером достаточной длины и комплементарности для специфической гибридизации с областью в гене *GAA*, в результате чего уровень mRNA GAA, содержащей экзон 2, по сравнению с mRNA GAA с удаленным экзоном 2 в клетке повышается. В некоторых вариантах осуществления клетка находится в организме субъекта, и способ включает введение антисмыслового олигомера субъекту.

В одном варианте осуществления в данном документе предусмотрены антисмысловые олигомеры, содержащие проникающий в клетку пептид, при этом антисмысловой олигомер содержит нацеливающую последовательность, комплементарную целевой области в пределах интрона 1 (SEQ ID NO: 1) pre-mRNA гена кислой альфа-глюкозидазы (GAA) человека, и по меньшей мере одна субъединица представляет собой субъединицу с удаленным азотистым основанием.

Также в данном документе предусмотрен способ лечения болезни Помпе.

## I. Определения

Если не указано иное, то все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют такое же значение, как обычно понимают специалисты средней квалификации в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя на практике или при испытании объекта настоящего изобретения могут применяться любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, описаны предпочтительные способы и материалы. Для целей настоящего изобретения ниже определены следующие термины.

Термин «приблизительно» будет понятен лицам средней квалификации в данной области техники и будет в некоторой степени варьировать в зависимости от контекста, в котором его применяют. При использовании в данном документе в отношении измеряемой величины, такой как количество, продолжительность времени и т. п., подразумевается, что термин «приблизительно» охватывает вариации  $\pm 10\%$ , включая  $\pm 5\%$ ,  $\pm 1\%$  и  $\pm 0,1\%$  от указанной величины, поскольку такие вариации подходят для реализации раскрытых способов.

Термин «алкил» относится к насыщенным углеводородным фрагментам с прямой или разветвленной цепью, содержащим в некоторых вариантах осуществления от одного до шести или от одного до восьми атомов углерода соответственно. Примеры  $C_{1-6}$ алкильных фрагментов включают без ограничения метиловый, этиловый, пропиловый, изопропиловый, *n*-бутиловый, *трет*-бутиловый, неопентиловый, *n*-гексиловый фрагменты; и примеры  $C_{1-8}$ алкильных фрагментов включают без ограничения метиловый,

этиловый, пропиловый, изопропиловый, *n*-бутиловый, *трет*-бутиловый, неопентиловый, *n*-гексиловый, гептиловый и октиловый фрагменты.

Количество атомов углерода в алкильном заместителе может быть указано посредством индекса «C<sub>x-y</sub>», где *x* представляет собой минимальное, а *y* представляет собой максимальное количество атомов углерода в заместителе. Подобным образом C<sub>x</sub>-цепь означает алкильную цепь, содержащую *x* атомов углерода.

Термин «гетероалкил» сам по себе или в комбинации с другим термином означает, если не указано иное, стабильную алкильную группу с прямой или разветвленной цепью, состоящую из указанного количества атомов углерода и одного или двух гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из O, N и S, и при этом атомы азота и серы могут быть необязательно окислены, а гетероатом азота может быть необязательно кватернизирован. Гетероатом(ы) может(могут) быть расположен(ы) в любом положении гетероалкильной группы, в том числе между остальной частью гетероалкильной группы и фрагментом, к которому он(они) присоединен(ы), а также присоединен(ы) к наиболее отдаленному атому углерода в гетероалкильной группе. Примеры включают -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> и -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S(=O)-CH<sub>3</sub>. Вплоть до двух гетероатомов могут быть последовательными, как, например, -CH<sub>2</sub>-NH-OCH<sub>3</sub> или -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-S-CH<sub>3</sub>.

Термин «арил», используемый отдельно или в сочетании с другими терминами, означает, если не указано иное, карбоциклическую ароматическую систему, содержащую одно или более колец (обычно одно, два или три кольца), где такие кольца могут быть соединены вместе подвешенным образом, как например, бифенил, или могут быть конденсированы, как например, нафталин. Примеры арильных групп включают фенил, антрацил и нафтил. В различных вариантах осуществления примеры арильной группы могут включать фенил (например, C<sub>6</sub>арил) и бифенил (например, C<sub>12</sub>арил). В некоторых вариантах осуществления арильные группы содержат от шести до шестнадцати атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления арильные группы содержат от шести до двенадцати атомов углерода (например, C<sub>6-12</sub>арил). В некоторых вариантах осуществления арильные группы содержат шесть атомов углерода (например, C<sub>6</sub>арил).

При использовании в данном документе термин «гетероарил» или «гетероароматический» относится к гетероциклу, обладающему ароматическим характером. Гетероарильные заместители могут быть определены по количеству атомов углерода, например, C<sub>1-9</sub>гетероарил указывает на количество атомов углерода, содержащихся в гетероарильной группе, без учета количества гетероатомов. Например, C<sub>1-9</sub>гетероарил будет включать от одного до четырех дополнительных гетероатомов. Полициклический гетероарил может включать одно или более колец, которые частично насыщены. Неограничивающие примеры гетероариллов включают пиридил, пиразинил, пиримидинил (в том числе, например, 2- и 4-пиримидинил), пиридазинил, тиенил, фурил, пирролил (в том числе, например, 2-пирролил), имидазолил, тиазолил, оксазолил, пиразолил (в том числе, например, 3- и 5-пиразолил), изотиазолил, 1,2,3-триазолил, 1,2,4-

триазолил, 1,3,4-триазолил, тетразолил, 1,2,3-тиадиазолил, 1,2,3-оксадиазолил, 1,3,4-тиадиазолил и 1,3,4-оксадиазолил.

Неограничивающие примеры полициклических гетероциклов и гетероариллов включают индолил (в том числе, например, 3-, 4-, 5-, 6- и 7-индолил), индолинил, хинолил, тетрагидрохинолил, изохинолил (в том числе, например, 1- и 5-изохинолил), 1,2,3,4-тетрагидроизохинолил, циннолинил, хиноксалинил (в том числе, например, 2- и 5-хиноксалинил), хиназолинил, фталазинил, 1,8-нафтиридинил, 1,4-бензодиоксанил, кумарин, дигидрокумарин, 1,5-нафтиридинил, бензофурил (в том числе, например, 3-, 4-, 5-, 6- и 7-бензофурил), 2,3-дигидробензофурил, 1,2-бензизоксазолил, бензотиенил (в том числе, например, 3-, 4-, 5-, 6-, и 7-бензотиенил), бензоксазолил, бензотиазолил (в том числе, например, 2-бензотиазолил и 5-бензотиазолил), пуринил, бензимидазолил (в том числе, например, 2-бензимидазолил), бензотриазолил, тиоксантинил, карбазолил, карболинил, акридинил, пирролизидинил и хинолизидинил.

Термин «защитная группа» или «химическая защитная группа» относится к химическим фрагментам, которые блокируют некоторые или все реакционноспособные фрагменты соединения и предупреждают участие таких фрагментов в химических реакциях до удаления защитной группы, например, эти фрагменты перечислены и описаны в T.W. Greene, P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd ed. John Wiley & Sons (1999). При использовании разных защитных групп может быть целесообразным, чтобы каждую (отличающуюся) защитную группу можно было удалять разными способами. Защитные группы, которые отщепляются при абсолютно несхожих условиях реакции, обеспечивают дифференциальное удаление таких защитных групп. Например, защитные группы можно удалять с помощью кислоты, основания и гидрогенолиза. Такие группы, как тритильная, монометокситритильная, диметокситритильная, ацетальная и трет-бутилдиметилсилильная, являются неустойчивыми к кислотам и могут применяться для защиты реакционноспособных карбокси- и гидроксифрагментов в присутствии аминогрупп, защищенных группами Cbz, которые могут быть удалены посредством гидрогенолиза, и группами Fmoc, которые являются неустойчивыми к основаниям. Фрагменты карбоновой кислоты могут блокироваться с помощью неустойчивых к основаниям групп, таких как без ограничения метильная или этильная, и реакционноспособные гидроксифрагменты могут блокироваться с помощью неустойчивых к основаниям групп, таких как ацетильная, в присутствии аминов, блокируемых с помощью неустойчивых к кислотам групп, таких как трет-бутилкарбаматная, или с помощью карбаматов, которые устойчивы как к кислотам, так и к основаниям, но могут быть удалены гидролитически.

Реакционноспособные фрагменты карбоновой кислоты и гидроксильные фрагменты также могут блокироваться с помощью гидролитически удаляемых защитных групп, таких как бензильная группа, при этом аминогруппы могут блокироваться с помощью неустойчивых к основаниям групп, таких как Fmoc. Особенно применимой защитной группой для аминогруппы при синтезе соединений формулы I и формулы IV является

трифторацетамид. Реакционноспособные фрагменты карбоновой кислоты могут блокироваться с помощью защитных групп, удаляемых окислительным способом, таких как 2,4-диметоксибензил, при этом одновременно существующие аминогруппы могут блокироваться с помощью неустойчивых к фторидам силилкарбаматов.

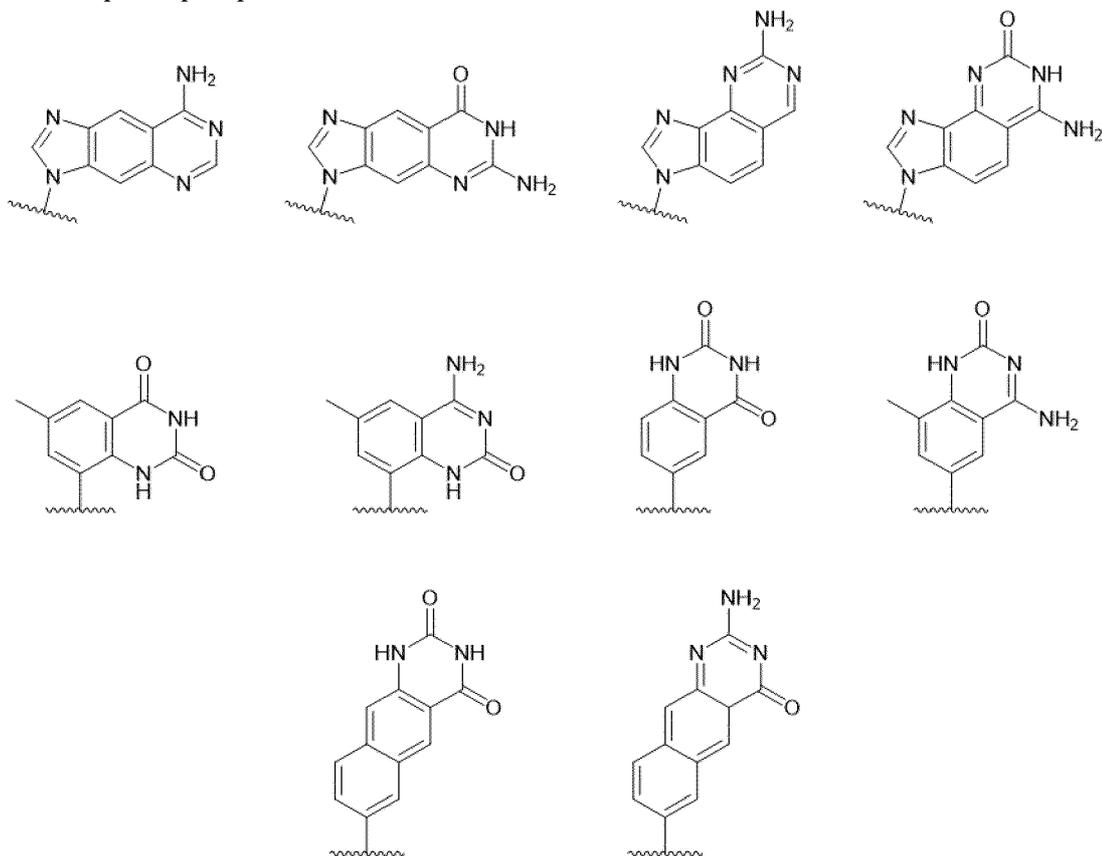
Аллил-блокирующие группы применимы в присутствии кислотных и основных защитных групп, поскольку последние являются устойчивыми и в последующем могут быть удалены с применением катализаторов на основе металлов или пи-кислоты. Например, защитную группу аллил-блокированной карбоновой кислоты можно удалить с помощью катализируемой палладием(0) реакции в присутствии неустойчивых к кислотам трет-бутилкарбаматных или неустойчивых к основаниям ацетатаминных защитных групп. Еще одной формой защитной группы является смола, к которой может быть присоединено соединение или промежуточное соединение. Пока остаток присоединен к смоле, эта функциональная группа блокируется и не может вступать в реакцию. После высвобождения от смолы функциональная группа может вступить в реакцию.

Термин «нуклеиновое основание», «фрагмент, представляющий собой спаренное основание», «фрагмент, представляющий собой спаренное нуклеиновое основание» или «основание» относится к части гетероциклического кольца нуклеозида, нуклеотида и/или морфолиновой субъединицы. Нуклеиновые основания могут быть встречающимися в природе (например, урацил, тимин, аденин, цитозин и гуанин), или могут быть модифицированными, или могут являться аналогами таких встречающихся в природе нуклеиновых оснований, например, один или более атомов азота нуклеинового основания могут быть независимо в каждом случае заменены атомом углерода. Иллюстративные аналоги включают гипоксантин (основной компонент нуклеозида инозина); 2,6-диаминопурин; 5-метилцитозин; C5-пропинил-модифицированные пиримидины; 10-(9-(аминоэтокси)феноксазил) (G-зажим) и т. п.

Дополнительными примерами фрагментов, представляющих собой спаренные основания, включают без ограничения урацил, тимин, аденин, цитозин, гуанин и гипоксантин, содержащие их соответствующие аминогруппы, защищенные защитными группами для ацильной группы, 2-фторурацил, 2-фторцитозин, 5-бром урацил, 5-йод урацил, 2,6-диаминопурин, азацитозин, аналоги пиримидина, такие как псевдоизоцитозин и псевдоурацил, и другие модифицированные нуклеиновые основания, такие как 8-замещенные пурины, ксантин или гипоксантин (последние два являются природными продуктами расщепления). Также рассматриваются модифицированные нуклеиновые основания, раскрытые в Chiu and Rana (2003) *RNA* 9:1034-1048, Limbach et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:2183-2196 and Revankar and Rao, *Comprehensive Natural Products Chemistry*, том 7, 313, содержания которых включены в данный документ посредством ссылки.

Дополнительные примеры фрагментов, представляющих собой спаренные основания, включают без ограничения нуклеиновые основания увеличенного размера, в структуру которых добавлены одно или более бензольных колец. Замены нуклеиновых

оснований, описанные в каталоге Glen Research ([www.glenresearch.com](http://www.glenresearch.com)); Krueger AT et al. (2007) *Acc. Chem. Res.* 40:141-150; Kool ET (2002) *Acc. Chem. Res.* 35:936-943; Benner SA et al. (2005) *Nat. Rev. Genet.* 6:553-543; Romesberg FE et al. (2003) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7:723-733; Hirao, I (2006) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10:622-627, содержания которых включены в данный документ посредством ссылки, рассматриваются как применимые для синтеза олигомеров, описанных в данном документе. Примеры нуклеиновых оснований увеличенного размера представлены ниже:



Термины «олигонуклеотид» или «олигомер» относятся к соединению, содержащему множество связанных нуклеозидов, нуклеотидов или комбинацию как нуклеозидов, так и нуклеотидов. В конкретных вариантах осуществления, предусмотренных в данном документе, олигонуклеотид представляет собой морфолиновый олигонуклеотид.

Используемые в данном документе термины «антисмысловый олигомер» или «антисмысловое соединение» применяются взаимозаменяемо и относятся к последовательности субъединиц, каждая из которых содержит основание, находящееся на субъединице остова, что состоит из рибозы или другого пентозного сахара или морфолиновой группы, и где группы остова связаны посредством межсубъединичных связей, позволяющих основаниям в соединении гибридизоваться с целевой последовательностью в нуклеиновой кислоте (как правило, РНК) посредством спаривания оснований по Уотсону-Крику с образованием гетеродуплекса нуклеиновая кислота:олигомер в целевой последовательности. Олигомер может характеризоваться точной комплементарностью последовательности с целевой последовательностью или близкой к точной комплементарностью. Такие антисмысловые олигомеры

сконструированы для блокирования или ингибирования трансляции mRNA, содержащей целевую последовательность, и, можно сказать, «направлены на» последовательность, с которой они гибридизируются.

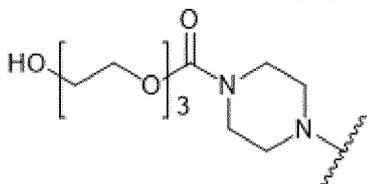
Также в данном документе в качестве типов «антисмыслового олигомера» или «антисмыслового соединения» рассматриваются фосфортиоат-модифицированные олигомеры, пептидные нуклеиновые кислоты (PNA), запертые нуклеиновые кислоты (LNA), 2'-фтор-модифицированные олигомеры, 2'-O,4'-C-этилен-мостиковые нуклеиновые кислоты (ENA), трицикло-ДНК, трицило-ДНК-фосфортиоат-модифицированные олигомеры, 2'-O-[2-(N-метилкарбамоил)этил]-модифицированные олигомеры, 2'-O-метилфосфортиоат-модифицированные олигомеры, 2'-O-метоксиэтил(2'-O-МОЕ)-модифицированные олигомеры и 2'-O-метилолигонуклеотиды или их комбинации, а также другие антисмысловые средства, известные в данной области техники.

Антисмысловый олигомер «специфически гибридизируется» с целевым полинуклеотидом, если олигомер гибридизируется с мишенью в физиологических условиях при  $T_m$  более  $37^{\circ}\text{C}$ , более  $45^{\circ}\text{C}$ , предпочтительно по меньшей мере  $50^{\circ}\text{C}$  и, как правило,  $60^{\circ}\text{C}$  -  $80^{\circ}\text{C}$  или выше. « $T_m$ » олигомера представляет собой температуру, при которой 50% гибридизируется с комплементарным полинуклеотидом.  $T_m$  определяется при стандартных условиях в физиологическом растворе, как описано, например, в Miyada et al. (1987) *Methods Enzymol.* 154:94-107. Такая гибридизация может происходить при «близкой» или «значительной» комплементарности антисмыслового олигомера с целевой последовательностью, а также при точной комплементарности.

Термины «комплементарный» и «комплементарность» относятся к олигонуклеотидам (т. е. последовательности нуклеотидов), соответствующим правилам спаривания оснований. Например, последовательность «Т-Г-А (5'-3')» комплементарна последовательности «Т-С-А (5'-3')». Комплементарность может быть «частичной», при которой лишь некоторые из оснований нуклеиновых кислот сопоставляются согласно правилам спаривания оснований. Или между нуклеиновыми кислотами может быть «полная», «общая» или «абсолютная» (100%) комплементарность. Степень комплементарности между нитями нуклеиновых кислот оказывает значительное влияние на эффективность и силу гибридизации между нитями нуклеиновых кислот. Хотя зачастую желательной является абсолютная комплементарность, некоторые варианты осуществления могут включать одно или более, но предпочтительно 6, 5, 4, 3, 2 или 1 несовпадение по отношению к целевой РНК. Такая гибридизация может происходить при «близкой» или «значительной» комплементарности антисмыслового олигомера с целевой последовательностью, а также при точной комплементарности. В некоторых вариантах осуществления олигомер может гибридизоваться с целевой последовательностью с приблизительно 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% комплементарностью. Включены вариации в любом положении в пределах олигомера. В определенных вариантах осуществления вариации в последовательности около конца олигомера в целом предпочтительнее вариаций во внутренней части, и при их наличии, как

правило, находятся в пределах приблизительно 6, 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотида на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах.

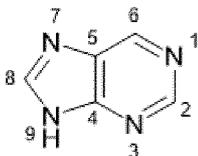
Термины «ТЕГ», «EG3» или «триэтиленгликолевый хвост» относятся к триэтиленгликолевым фрагментам, конъюгированным с олигомером, например, на его 3'-или 5'-конце. Например, в некоторых вариантах осуществления «ТЕГ» предусматривает, к примеру, что А' конъюгата формулы I или формулы IV представлен формулой:



Встречающиеся в природе основания нуклеотидов включают аденин, гуанин, цитозин, тимин и урацил, которые имеют символы А, G, С, Т и U соответственно. Основания нуклеотидов также могут охватывать аналоги встречающихся в природе оснований нуклеотидов. Спаривание оснований, как правило, происходит между пурином А и пиримидином Т или U, а также между пурином G и пиримидином С.

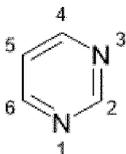
Олигонуклеотиды также могут включать модификации или замены нуклеиновых оснований (часто называемых в данной области техники просто «основанием»). Олигонуклеотиды, содержащие модифицированное или замещенное основание, включают олигонуклеотиды, в которых одно или более пуриновых или пиримидиновых оснований, наиболее часто встречающихся в нуклеиновых кислотах, заменены менее распространенными или неприродными основаниями. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновое основание ковалентно связано по атому N9 пуринового основания или по атому N1 пиримидинового основания с морфолиновым кольцом нуклеотида или нуклеозида.

Пуриновые основания содержат пиримидиновое кольцо, конденсированное с имидазольным кольцом, как описано общей формулой:



Аденин и гуанин являются двумя пуриновыми нуклеиновыми основаниями, наиболее часто встречающимися в нуклеиновых кислотах. Они могут быть замещены другими встречающимися в природе пуринами, включая без ограничения N6-метиладенин, N2-метилгуанин, гипоксантин и 7-метилгуанин.

Пиримидиновые основания содержат шестичленное пиримидиновое кольцо, описанное общей формулой:



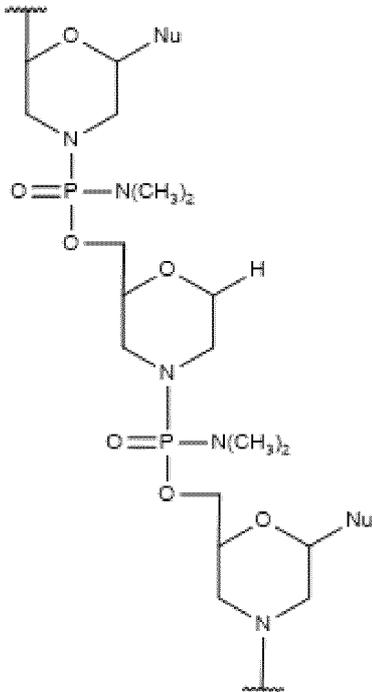
Цитозин, урацил и тимин являются пиримидиновыми основаниями, наиболее часто обнаруживаемыми в нуклеиновых кислотах. Они могут быть замещены другими встречающимися в природе пиримидинами, включая без ограничения 5-метилцитозин, 5-гидроксиметилцитозин, псевдоурацил и 4-тиоурацил. В одном варианте осуществления олигонуклеотиды, описанные в данном документе, содержат тиминовые основания вместо урацила.

Другие модифицированные или замещенные основания включают без ограничения 2,6-диаминопурин, оротовую кислоту, агматидин, лизидин, 2-тиопиримидин (например, 2-тиоурацил, 2-тиотимин), G-зажим и его производные, 5-замещенный пиримидин (например, 5-галогенурацил, 5-пропинилурацил, 5-пропинилцитозин, 5-аминометилурацил, 5-гидроксиметилурацил, 5-аминометилцитозин, 5-гидроксиметилцитозин, Super T), 7-дезагуанин, 7-дезааденин, 7-аза-2,6-диаминопурин, 8-аза-7-дезагуанин, 8-аза-7-дезааденин, 8-аза-7-деза-2,6-диаминопурин, Super G, Super A и N4-этилцитозин или их производные; N2-циклопентилгуанин (cPent-G), N2-циклопентил-2-аминопурин (cPent-AP) и N2-пропил-2-аминопурин (Pr-AP), псевдоурацил или их производные; и вырожденные или универсальные основания, такие как 2,6-дифтортолуол, или отсутствующие основания, такие как участки с удаленными основаниями (например, 1-дезоксирибоза, 1,2-дидезоксирибоза, 1-дезоксид-2-О-метилрибоза; или производные пирролидина, в которых атом кислорода кольца был заменен атомом азота (азарибоза)). Псевдоурацил представляет собой встречающийся в природе изомеризованный вариант урацила с C-гликозидом вместо обычного N-гликозида, как в урдине.

Определенные модифицированные или замещенные нуклеиновые основания являются особенно применимыми для повышения аффинности связывания антисмысловых олигонуклеотидов по настоящему изобретению. Они включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и 0-6-замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. В различных вариантах осуществления нуклеиновые основания могут включать замены 5-метилцитозина, которые, как было показано, повышают стабильность дуплекса на основе нуклеиновой кислоты на 0,6-1,2°C.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные или замещенные нуклеиновые основания применимы для облегчения очистки антисмысловых олигонуклеотидов. Например, в определенных вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды могут содержать три или более (например, 3, 4, 5, 6 или более) последовательных гуаниновых оснований. В определенных антисмысловых олигонуклеотидах цепочка из трех или более последовательных гуаниновых оснований может приводить к агрегации олигонуклеотидов, что усложняет очистку. В таких антисмысловых олигонуклеотидах один или более последовательных гуанинов могут быть замещены гипоксантином. Замещение гипоксантином одного или более гуанинов в цепочке из трех или более последовательных гуаниновых оснований может снижать агрегацию антисмыслового олигонуклеотида, тем самым облегчая очистку.

Термин «субъединица с удаленным азотистым основанием» относится к субъединице в антисмысловом олигомере, не содержащей пурина и пиримидина. В одном варианте осуществления «субъединица с удаленным азотистым основанием» представляет собой водород. Субъединицы с удаленным азотистым основанием, включенные в данный документ, сохраняют антисмысловой остов, но не содержат пуриновые или пиримидиновые основания. Неограничивающий пример антисмыслового олигомера, содержащего субъединицу с удаленным азотистым основанием, изображен ниже.



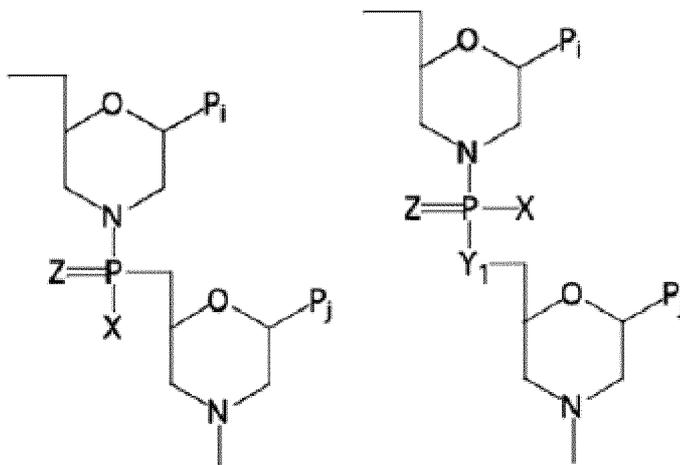
Олигонуклеотиды, предусмотренные в данном документе, синтезируют, при этом они не включают антисмысловые композиции биологического происхождения. Молекулы по настоящему изобретению также могут быть смешаны, инкапсулированы, конъюгированы или иным образом ассоциированы с другими молекулами, молекулярными структурами или смесями соединений, как, например, липосомы, нацеленные на рецептор молекулы, составы для перорального, ректального, местного или другого применения, для способствования поглощению, распределению или всасыванию, или их комбинации.

При использовании в данном документе «аналог нуклеиновой кислоты» относится к не встречающейся в природе молекуле нуклеиновой кислоты. Нуклеиновая кислота представляет собой полимер из нуклеотидных субъединиц, соединенных вместе в линейную структуру. Каждый нуклеотид состоит из азотсодержащего ароматического основания, присоединенного к пентозному (пятиуглеродному) сахару, который, в свою очередь, присоединен к фосфатной группе. Последовательные фосфатные группы связаны вместе посредством фосфодиэфирных связей с образованием полимера. Двумя обычными формами встречающихся в природе нуклеиновых кислот являются дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) и рибонуклеиновая кислота (РНК). Один конец цепи несет свободную фосфатную группу, присоединенную к 5'-атому углерода фрагмента сахара; он называется 5'-концом молекулы. Другой конец содержит свободную

гидроксильную (-ОН) группу при 3'-углероде фрагмента сахара и называется 3'-концом молекулы. Аналог нуклеиновой кислоты может включать одно или более из не встречающихся в природе нуклеиновых оснований, сахаров и/или межнуклеотидных связей, например, фосфородиамидатный *морфолиновый* олигомер (РМО). Как раскрыто в данном документе, в определенных вариантах осуществления «аналог нуклеиновой кислоты» представляет собой РМО, и в определенных вариантах осуществления «аналог нуклеиновой кислоты» представляет собой положительно заряженный катионный РМО.

«Морфолиновый олигомер» или «РМО» относится к полимерной молекуле, имеющей остов, который поддерживает основания, способные к водородному связыванию с типичными полинуклеотидами, где в полимере отсутствует фрагмент остова на основе пентозного сахара и более конкретно рибозный остов, связанный фосфодиэфирными связями, что является типичным для нуклеотидов и нуклеозидов, но вместо этого он содержит атом азота кольца со связью посредством атома азота кольца. Иллюстративный «морфолиновый» олигомер содержит структуры на основе морфолиновой субъединицы, связанные вместе с помощью фосфорамидатных или фосфородиамидатных связей, соединяющих азот морфолиновой группы одной субъединицы с 5'-экзоциклическим углеродом соседней субъединицы, при этом каждая субъединица содержит фрагмент, представляющий собой спаривающееся пуриновое или пиримидиновое основание, эффективный в отношении связывания, посредством специфического для оснований водородного связывания, с основанием в полинуклеотиде. Морфолиновые олигомеры (в том числе антисмысловые олигомеры) подробно описаны, например, в патентах США №№ 5034506; 5142047; 5166315; 5185444; 5217866; 5506337; 5521063; 5698685; 8076476 и 8299206; и публикации согласно РСТ под номером WO 2009/064471, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Предпочтительный морфолиновый олигомер представляет собой связанный с помощью фосфородиамидата морфолиновый олигомер, называемый в данном документе РМО. Такие олигомеры состоят из структур на основе морфолиновых субъединиц, таких как показанные ниже:



где X представляет собой NH<sub>2</sub>, NHR или NR<sub>2</sub> (где R представляет собой низший

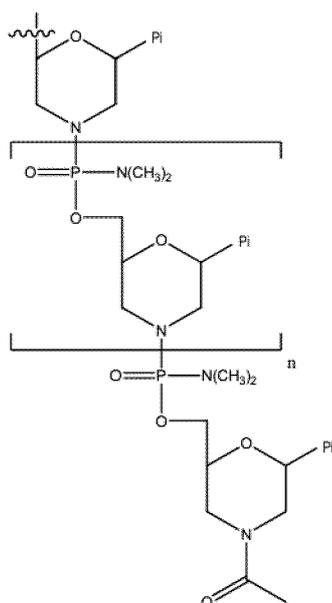
алкил, предпочтительно метил),  $Y_1$  представляет собой O, и Z представляет собой O, и  $P_i$  и  $P_j$  представляют собой фрагменты, являющиеся спаривающимися пуриновыми или пиримидиновыми основаниями, эффективные в отношении связывания посредством специфического для оснований водородного связывания с основанием в полинуклеотиде. Также предпочтительными являются структуры, содержащие альтернативную фосфородиамидатную связь, где X представляет собой низший алкокси, такой как метокси или этокси,  $Y_1$  представляет собой NH или NR, где R представляет собой низший алкил, и Z представляет собой O.

Иллюстративные РМО включают РМО, где межсубъединичные связи представляют собой связь (A1). См. таблицу 1.

Таблица 1. Иллюстративные межсубъединичные связи

№	Название	Структура
A1	РМО	
A2	РМО <sup>+</sup> (изображена непротонированная форма)	
A3	РМО <sup>+</sup> (+)	

«Фосфорамидатная» группа содержит фосфор с тремя присоединенными атомами кислорода и одним присоединенным атомом азота, а «фосфородиамидатная» группа содержит фосфор с двумя присоединенными атомами кислорода и двумя присоединенными атомами азота. Иллюстративный пример фосфородиамидата представлен ниже:



каждый  $P_i$  независимо выбран из H, нуклеинового основания и нуклеинового основания, функционализированного химической защитной группой, где нуклеиновое основание независимо в каждом случае содержит  $C_{3-6}$ -гетероциклическое кольцо, выбранное из пиридина, пиримидина, триазинана, пурина и деазапурина; и  $n$  представляет собой целое число от 6 до 38. Атом азота кольца субъединицы на 3'-конце РМО может быть кэпирован с помощью кэпирующей группы, такой как ацетил, или может быть лишен кэпирующей группы с помощью свободного водорода.

В незаряженных или модифицированных межсубъединичных связях олигомеров, описанных в данном документе, один атом азота всегда является подвешенным относительно цепи остова. Второй атом азота в фосфородиамидатной связи, как правило, представляет собой атом азота кольца в структуре морфолинового кольца.

РМО представляют собой водорастворимые, незаряженные или по существу незаряженные антисмысловые молекулы, которые подавляют экспрессию генов путем предупреждения связывания или прогрессирования компонентов механизма сплайсинга или трансляции. Также было показано, что РМО подавляют или блокируют вирусную репликацию (Stein, Skilling et al. 2001; McCaffrey, Meuse et al. 2003). Они высокоустойчивы к ферментативному расщеплению (Hudziak, Barofsky et al. 1996). РМО продемонстрировали высокую антисмысловую специфичность и эффективность *in vitro* на бесклеточных моделях и моделях клеточных культур (Stein, Foster et al. 1997; Summerton and Weller 1997) и *in vivo* на эмбрионах данио, лягушки и морского ежа (Heasman, Kofron et al. 2000; Nasevicius and Ekker 2000), а также на моделях взрослых животных, таких как крысы, мыши, кролики, собаки и свиньи (см., например, Arora and Iversen 2000; Qin, Taylor et al. 2000; Iversen 2001; Kipshidze, Keane et al. 2001; Devi 2002; Devi, Oldenkamp et al. 2002; Kipshidze, Kim et al. 2002; Ricker, Mata et al. 2002).

Было показано, что антисмысловые РМО-олигомеры поглощаются клетками и являются в большей степени неизменно эффективными *in vivo* с меньшим проявлением

неспецифических эффектов, чем другие широко применяемые антисмысловые олигонуклеотиды (см., например, P. Iversen, «Phosphoramidite Morpholino Oligomers» в Antisense Drug Technology, S.T. Crooke, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 2001). Было показано, что конъюгация РМО с пептидами с высоким содержанием аргинина обеспечивает увеличение их клеточного поглощения (см., например, патент США № 7468418, включенный в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

«Заряженный», «незаряженный», «катионный» и «анионный» при использовании в данном документе относятся к преобладающему состоянию химического фрагмента при рН, близком к нейтральному, например, приблизительно 6-8. Например, термин может относиться к преобладающему состоянию химического фрагмента при физиологическом рН, то есть, приблизительно 7,4.

«Катионный РМО» или «РМО+» относится к фосфородиамидатному морфолиновому олигомеру, содержащему любое количество (1-пиперазино)фосфинилиденокси-, (1-(4-( $\omega$ -гуанидиноалканоил))пиперазино) фосфинилиденоксисвязей (A2 и A3; см. таблицу 1), которые были описаны ранее (см., например, публикацию согласно РСТ WO 2008/036127, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

«Остов» аналога олигонуклеотида (например, незаряженного аналога олигонуклеотида) относится к структуре, поддерживающей фрагменты, представляющие собой спаривающиеся основания; например, в случае морфолинового олигомера, описанного в данном документе, «остов» включает морфолиновые кольцевые структуры, соединенные посредством межсубъединичных связей (например, фосфорсодержащих связей). «По существу незаряженный остов» относится к остову аналога олигонуклеотида, где менее 50% межсубъединичных связей являются заряженными при рН, близком к нейтральному. Например, по существу незаряженный остов может содержать менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20%, менее 10%, менее 5% или даже 0% межсубъединичных связей, которые являются заряженными при рН, близком к нейтральному. В некоторых вариантах осуществления по существу незаряженный остов содержит не более одной заряженной (при физиологическом рН) межсубъединичной связи на каждые четыре незаряженные (при физиологическом рН) связи, не более одной на каждые восемь или не более одной на каждые шестнадцать незаряженных связей. В некоторых вариантах осуществления аналоги нуклеиновых кислот, описанные в данном документе, являются полностью незаряженными.

Термин «нацеливающая последовательность оснований» или просто «нацеливающая последовательность» представляет собой последовательность в аналоге нуклеиновой кислоты, которая комплементарна (что означает, кроме того, по существу комплементарна) целевой последовательности, например, целевой последовательности в геноме РНК людей. Полная последовательность или только часть аналогичного соединения могут быть комплементарны целевой последовательности. Например, в аналоге, содержащем 20 оснований, только 12-14 могут представлять собой нацеливающие

последовательности. Как правило, нацеливающая последовательность образуется смежными основаниями в аналоге, но в качестве альтернативы может быть образована несмежными последовательностями, которые при их размещении вместе, *например*, с противоположных концов аналога, составляют последовательность, которая охватывает целевую последовательность.

Термин «пептид» относится к соединению, содержащему множество связанных аминокислот. Пептиды, предусмотренные в данном документе, можно рассматривать как проникающие в клетку пептиды.

Используемый в данном документе «проникающий в клетку пептид» (СРР) или «пептид-носитель» представляет собой относительно короткий пептид, способный облегчать поглощение РМО клетками, тем самым доставляя РМО во внутреннее пространство (цитоплазму) клеток. СРР или пептид-носитель, как правило, имеет длину от приблизительно 12 до приблизительно 40 аминокислот. Длина пептида-носителя конкретно не ограничена и варьируется в разных вариантах осуществления. В некоторых вариантах осуществления пептид-носитель содержит от 4 до 40 аминокислотных субъединиц. В других вариантах осуществления пептид-носитель содержит от 6 до 30, от 6 до 20, от 8 до 25 или от 10 до 20 аминокислотных субъединиц. В различных вариантах осуществления вариант осуществления СРР по настоящему изобретению может включать пептид с высоким содержанием аргинина, как дополнительно описано ниже.

При использовании в данном документе «конъюгированный с пептидом связанный с помощью фосфородиамидата морфолиновый олигомер» или «РРМО» относится к РМО, ковалентно связанному с пептидом, таким как проникающий в клетку пептид (СРР) или пептид-носитель. Проникающий в клетку пептид способствует поглощению РМО клетками, тем самым доставляя РМО во внутреннее пространство (цитоплазму) клеток. В зависимости от аминокислотной последовательности СРР, он может быть в целом эффективным или он может быть специфически или избирательно эффективным в отношении доставки РМО к конкретному типу или конкретным типам клеток. РМО и СРР, как правило, связаны на своих концах, например, С-концевой участок СРР может быть связан с 5'-концом РМО, или 3'-конец РМО может быть связан с N-концевым участком СРР. РРМО могут содержать незаряженные РМО, заряженные (например, катионные) РМО и их смеси. В одном варианте осуществления связывающий фрагмент конъюгатов, описанных в данном документе, может быть расщеплен с высвобождением РРМО.

Пептид-носитель может быть связан с аналогом нуклеиновой кислоты либо непосредственно, либо посредством необязательного линкера, например, одной или более дополнительных встречающихся в природе аминокислот, например, цистеина (С), глицина (G) или пролина (P), или дополнительных аналогов аминокислот, например, 6-аминогексановой кислоты (X), бета-аланина (B) или ХВ. Также могут использоваться другие связывающие фрагменты, известные из уровня техники.

«Аминокислотная субъединица» в целом представляет собой  $\alpha$ -аминокислотный остаток (-CO-CHR-NH-); но также может представлять собой  $\beta$ - или другой

аминокислотный остаток (например,  $-\text{CO}-\text{CH}_2\text{CHR}-\text{NH}-$ ), где R представляет собой боковую цепь аминокислоты.

Термин «встречающаяся в природе аминокислота» относится к аминокислоте, присутствующей в белках, обнаруживаемых в природе; примеры включают аланин (A), цистеин (C), аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E), фенилаланин (F), глицин (G), гистидин (H), изолейцин (I), лизин (K), лейцин (L). Метионин (M), аспарагин (N), пролин (P), глутамин (Q), аргинин (R), серин (S), треонин (T), валин (V), триптофан (W) и тирозин (Y). Термин «неприродные аминокислоты» относится к тем аминокислотам, которые отсутствуют в белках, обнаруживаемых в природе; примеры включают бета-аланин ( $\beta$ -Ala) и б-аминогексановую кислоту (Ahx).

Средство «активно поглощается клетками млекопитающих», если средство может проникать в клетку с помощью механизма, отличного от пассивной диффузии через клеточную мембрану. Средство может транспортироваться, например, с помощью «активного транспорта», относящегося к транспорту средств через клеточную мембрану млекопитающих посредством, *например*, АТФ-зависимого механизма транспорта, или с помощью «облегченного транспорта», относящегося к транспорту антисмысловых средств через клеточную мембрану посредством механизма транспорта, который требует связывания средства с транспортным белком, что затем облегчает прохождение связанного средства через мембрану.

При использовании в данном документе «эффективное количество» относится к любому количеству вещества, которое является достаточным для достижения требуемого биологического результата. «Терапевтически эффективное количество» относится к любому количеству вещества, которое является достаточным для достижения требуемого терапевтического результата.

При использовании в данном документе «субъект» является млекопитающим, которое может предусматривать мышь, крысу, хомяка, морскую свинку, кролика, козу, овцу, кошку, собаку, свинью, корову, лошадь, обезьяну, примата, отличного от человека, или человека. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек.

«Лечение» индивидуума (например, млекопитающего, такого как человек) или «обработка» клетки представляет собой любой тип вмешательства, применяемый с целью изменить естественное течение процесса у индивидуума или в клетке. Лечение включает без ограничения введение фармацевтической композиции и может быть выполнено либо профилактически, либо после начала патологического события или контакта с этиологическим агентом.

## II. Пептид-олигонуклеотиды

В некоторых вариантах осуществления, предложенных в данном документе, представлен антисмысловый олигомер, предусматривающий модифицированный антисмысловый олигонуклеотид, где:

модифицированный антисмысловый олигонуклеотид составляет 18-40 субъединиц в длину, при этом он содержит нацеливающую последовательность, комплементарную

целевой области в пределах интрона 1 (SEQ ID NO: 1) pre-mRNA гена кислой альфа-глюкозидазы (GAA) человека, где:

антисмысловой олигонуклеотид предусматривает морфолиновый олигомер;

каждая субъединица антисмыслового олигонуклеотида содержит нуклеиновое основание или представляет собой субъединицу с удаленным азотистым основанием, при этом каждая субъединица, взятая в совокупности в порядке от 5'-конца антисмыслового олигонуклеотида до 3'-конца антисмыслового олигонуклеотида, образует нацеливающую последовательность;

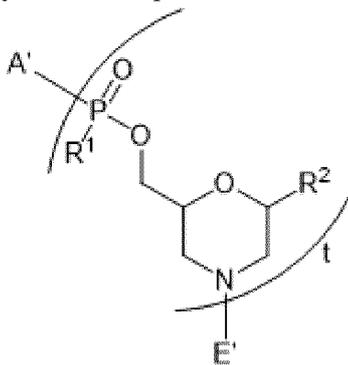
по меньшей мере одна субъединица представляет собой субъединицу с удаленным азотистым основанием; и

где нацеливающая последовательность, за исключением субъединицы или субъединиц с удаленным азотистым основанием, на по меньшей мере 80% комплементарна целевой области.

В одном варианте осуществления субъединица с удаленным азотистым основанием находится внутри по отношению к нацеливающей последовательности.

В одном варианте осуществления модифицированный антисмысловый олигонуклеотид составляет 20-40 субъединиц в длину. В другом варианте осуществления модифицированный антисмысловый олигонуклеотид составляет 19-29 субъединиц в длину. В другом варианте осуществления модифицированный антисмысловый олигонуклеотид составляет 18-40, 19-30, 19-29, 20-40, 20-30, 20-25, 21-40, 21-30, 21-25, 22-40, 22-30, 22-25, 23-40, 23-30 или 23-25 субъединиц в длину. В еще одном варианте осуществления модифицированный антисмысловый олигонуклеотид составляет 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 субъединиц в длину.

В одном варианте осуществления модифицированный антисмысловый олигонуклеотид представляет собой антисмысловый олигомер формулы I:

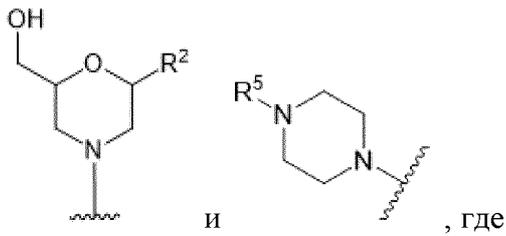


(I),

или его фармацевтически приемлемую соль,

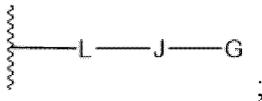
где

A' выбран из -N(H)CH<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub>, -N(C<sub>1-6</sub>алкил)CH<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub>,



$R^5$  представляет собой  $-C(O)(O\text{-алкил})_x\text{-OH}$ , где  $x$  составляет 3-10, и каждая алкильная группа независимо в каждом случае представляет собой  $C_{2-6}$ алкил,

или  $R^5$  выбран из H,  $-C(O)C_{1-6}$ алкила, тритила, монометокситритила,  $-(C_{1-6}$ алкил)- $R^6$ ,  $-(C_{1-6}$ гетероалкил)- $R^6$ , арил- $R^6$ , гетероарил- $R^6$ ,  $-C(O)O-(C_{1-6}$ алкил)- $R^6$ ,  $-C(O)O\text{-арил-}R^6$ ,  $-C(O)O\text{-гетероарил-}R^6$ , и



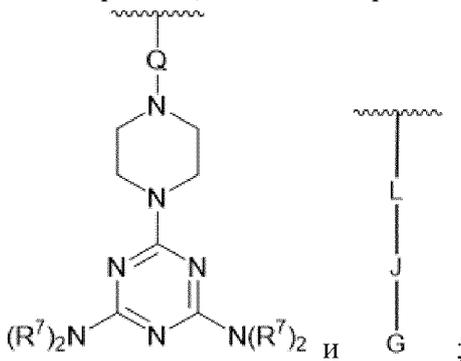
$R^6$  выбран из OH, SH и  $NH_2$ , или  $R^6$  представляет собой O, S или NH, каждый из которых ковалентно связан с твердой подложкой;

каждый  $R^1$  независимо выбран из OH и  $-N(R^3)(R^4)$ , где каждый из  $R^3$  и  $R^4$  независимо в каждом случае представляет собой H или  $-C_{1-6}$ алкил;

каждый  $R^2$  независимо в каждом случае выбран из H (с удаленным азотистым основанием), нуклеинового основания и нуклеинового основания, функционализированного химической защитной группой, при этом нуклеиновое основание независимо в каждом случае содержит  $C_{3-6}$ -гетероциклическое кольцо, выбранное из пиридина, пиримидина, пурина и дезапурина;

$t$  составляет 8-40;

$E'$  выбран из H,  $-C_{1-6}$ алкила,  $-C(O)C_{1-6}$ алкила, бензоила, стеароида, тритила, монометокситритила, диметокситритила, триметокситритила,



где

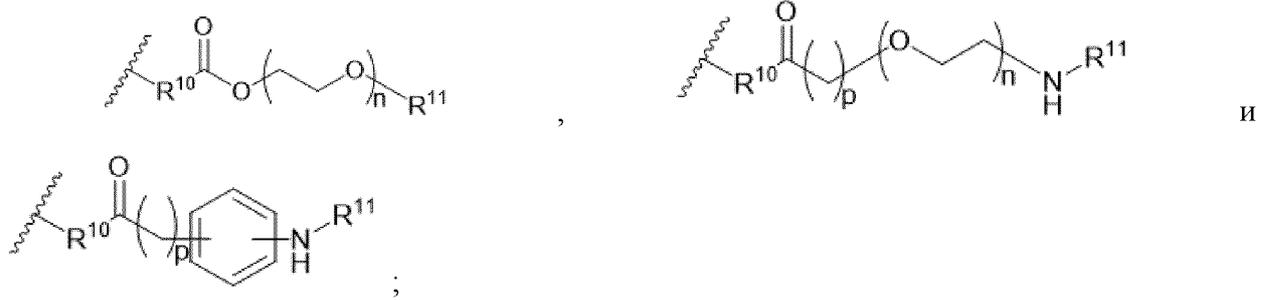
Q представляет собой  $-C(O)(CH_2)_6C(O)-$  или  $-C(O)(CH_2)_2S_2(CH_2)_2C(O)-$ ;

$R^7$  представляет собой  $-(CH_2)_2OC(O)N(R^8)_2$ , где  $R^8$  представляет собой  $-(CH_2)_6NHC(=NH)NH_2$ ;

L выбран из глицина, пролина, W, W-W или  $R^9$ , при этом L ковалентно связан посредством амидной связи с N-концом или C-концом J;

W представляет собой  $-C(O)-(CH_2)_m\text{-NH-}$ , где  $m$  составляет от 2 до 12;

R<sup>9</sup> выбран из группы, состоящей из

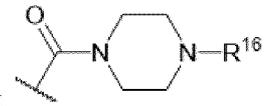


n равняется 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

p равняется 2, 3, 4 или 5;

R<sup>10</sup> выбран из связи, глицина, пролина, W или W-W;

R<sup>11</sup> выбран из группы, состоящей из глицина, пролина, W, W-W и



;

R<sup>16</sup> выбран из связи, глицина, пролина, W или W-W; при этом R<sup>16</sup> ковалентно связан посредством амидной связи с N-концом или C-концом J; J представляет собой проникающий в клетку пептид; и

G выбран из H, -C(O)C<sub>1-6</sub>алкила, бензоила и стеароила, при этом G ковалентно связан с J.

В одном аспекте в данном документе раскрыт антисмысловой олигомер, при этом антисмысловой олигомер представляет собой конъюгат, содержащий модифицированный антисмысловой олигонуклеотид и проникающий в клетку пептид, где

модифицированный антисмысловой олигонуклеотид составляет 18-40 субъединиц в длину, при этом он содержит нацеливающую последовательность, комплементарную целевой области в пределах интрона 1 (SEQ ID NO: 1) pre-mRNA гена кислой альфа-глюкозидазы (GAA) человека, где

антисмысловой олигонуклеотид предусматривает морфолиновый олигомер;

антисмысловой олигонуклеотид ковалентно связан с проникающим в клетку пептидом;

каждая субъединица антисмыслового олигонуклеотида содержит нуклеиновое основание или представляет собой субъединицу с удаленным азотистым основанием, при этом каждая субъединица, взятая в совокупности в порядке от 5'-конца антисмыслового олигонуклеотида до 3'-конца антисмыслового олигонуклеотида, образует нацеливающую последовательность;

по меньшей мере одна субъединица представляет собой субъединицу с удаленным азотистым основанием; и

где нацеливающая последовательность, за исключением субъединицы или субъединиц с удаленным азотистым основанием, на по меньшей мере 80% комплементарна целевой области.

В одном варианте осуществления модифицированный антисмысловой олигонуклеотид составляет 20-40 субъединиц в длину. В другом варианте осуществления модифицированный антисмысловой олигонуклеотид составляет 19-29 субъединиц в длину.

В одном варианте осуществления целевая область содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 (GAA-IVS1(-189-167)) и SEQ ID NO: 3 (GAA-IVS1(-80-24)). В дополнительном варианте осуществления целевая область содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 2. В другом варианте осуществления целевая область содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 3.

В одном варианте осуществления целевая область выбрана из GAA-IVS1(-189-167), GAA-IVS1(-80-56), GAA-IVS1(-76-52), GAA-IVS1(-74-55), GAA-IVS1(-72-48), GAA-IVS1(-71-47), GAA-IVS1(-70-46), GAA-IVS1(-69-45), GAA-IVS1(-66-42), GAA-IVS1(-65-41) и GAA-IVS1(-49-24). В дополнительном варианте осуществления целевая область представляет собой GAA-IVS1(-189-167). В другом варианте осуществления нацеливающая область представляет собой GAA-IVS1(-72,-48). В еще одном варианте осуществления нацеливающая область представляет собой GAA-IVS1(-71,-47). В еще одном варианте осуществления нацеливающая область представляет собой GAA-IVS1(-70,-46). В одном варианте осуществления нацеливающая область представляет собой GAA-IVS1(-69-45). В другом варианте осуществления нацеливающая область представляет собой GAA-IVS1(-65,-41). В еще одном варианте осуществления нацеливающая область представляет собой GAA-IVS1(-66,-42).

В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит последовательность CCA GAA GGA AXX XCG AGA AAA GC (SEQ ID NO: 4), где каждый X независимо выбран из гуанина (G) или представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием (B), при этом по меньшей мере один X представляет собой B. В другом варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- i) SEQ ID NO: 5 (CCA GAA GGA AGG BCG AGA AAA GC);
- ii) SEQ ID NO: 6 (CCA GAA GGA AGB GCG AGA AAA GC);
- iii) SEQ ID NO: 7 (CCA GAA GGA ABG GCG AGA AAA GC);
- iv) SEQ ID NO: 8 (CCA GAA GGA AGB BCG AGA AAA GC);
- v) SEQ ID NO: 9 (CCA GAA GGA ABB GCG AGA AAA GC) и
- vi) SEQ ID NO: 10 (CCA GAA GGA ABG BCG AGA AAA GC).

В одном варианте осуществления B представляет собой H.

В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит SEQ ID NO: 5 (CCA GAA GGA AGG BCG AGA AAA GC). В другом варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит SEQ ID NO: 6 (CCA GAA GGA AGB GCG AGA AAA GC). В еще одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит SEQ ID NO: 7 (CCA GAA GGA ABG GCG AGA AAA GC). В еще одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит SEQ ID NO: 8 (CCA GAA GGA AGB BCG AGA AAA GC). В одном варианте осуществления нацеливающая

последовательность содержит SEQ ID NO: 9 (CCA GAA GGA ABB GCG AGA AAA GC). В другом варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит SEQ ID NO: 10 (CCA GAA GGA ABG BCG AGA AAA GC).

В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из последовательности CCA GAA GGA AXX XCG AGA AAA GC (SEQ ID NO: 4). В другом варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 5 (CCA GAA GGA AGG BCG AGA AAA GC). В еще одном варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 6 (CCA GAA GGA AGB GCG AGA AAA GC). В еще одном варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 7 (CCA GAA GGA ABG GCG AGA AAA GC). В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 8 (CCA GAA GGA AGB BCG AGA AAA GC). В другом варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 9 (CCA GAA GGA ABB GCG AGA AAA GC). В еще одном варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 10 (CCA GAA GGA ABG BCG AGA AAA GC).

В одном варианте осуществления целевая область выбрана из группы, состоящей из GAA-IVS1(-80-56), GAA-IVS1(-76-52), GAA-IVS1(-74-55), GAA-IVS1(-72-48), GAA-IVS1(-71-47), GAA-IVS1(-70-46), GAA-IVS1(-69-45), GAA-IVS1(-66-42), GAA-IVS1(-65-41) и GAA-IVS1(-49-24). В другом варианте осуществления целевая область выбрана из группы, состоящей из GAA-IVS1(-72-48), GAA-IVS1(-71-47), GAA-IVS1(-70-46), GAA-IVS1(-69-45), GAA-IVS1(-66-42) и GAA-IVS1(-65-41).

В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из

- i) SEQ ID NO: 11 (CTC ACX XXX CTC TCA AAG CAG CTC T);
- ii) SEQ ID NO: 12 (ACT CAC XXX XCT CTC AAA GCA GCT C);
- iii) SEQ ID NO: 13 (CAC TCA CXX XXC TCT CAA AGC AGC T);
- iv) SEQ ID NO: 14 (GCA CTC ACX XXX CTC TCA AAG CAG C);
- v) SEQ ID NO: 15 (GCG GCA CTC ACX XXX CTC TCA AAG C);
- vi) SEQ ID NO: 16 (GGC GGC ACT CAC XXX XCT CTC AAA G);

где каждый X независимо выбран из гуанина (G) или представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием (B), при этом по меньшей мере один X представляет собой B. В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность выбрана из группы, состоящей из

- i) SEQ ID NO: 17 (GCA CTC ACB GGG CTC TCA AAG CAG C);
- ii) SEQ ID NO: 18 (GCA CTC ACG BGG CTC TCA AAG CAG C);
- iii) SEQ ID NO: 19 (GCA CTC ACG GBG CTC TCA AAG CAG C);
- iv) SEQ ID NO: 20 (GCA CTC ACG GGB CTC TCA AAG CAG C);
- v) SEQ ID NO: 21 (GCA CTC ACB BGG CTC TCA AAG CAG C);
- vi) SEQ ID NO: 22 (GCA CTC ACG BBG CTC TCA AAG CAG C);
- vii) SEQ ID NO: 23 (GCA CTC ACG GBB CTC TCA AAG CAG C) и



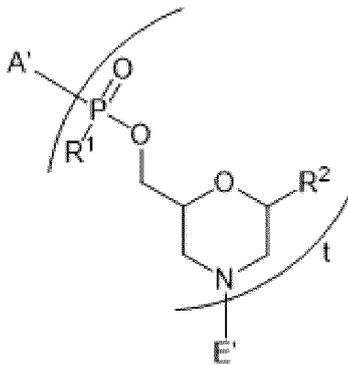
последовательность состоит из SEQ ID NO: 19 (GCA CTC ACG GBG CTC TCA AAG CAG C). В другом варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 20 (GCA CTC ACG GGB CTC TCA AAG CAG C). В еще одном варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 21 (GCA CTC ACB BGG CTC TCA AAG CAG C). В еще одном варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 22 (GCA CTC ACG BBG CTC TCA AAG CAG C). В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 23 (GCA CTC ACG GBV CTC TCA AAG CAG C). В другом варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 24 (GGC GGC ACT CAC GBV GCT CTC AAA G).

В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность, за исключением субъединицы или субъединиц с удаленным азотистым основанием, на по меньшей мере 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов комплементарна целевой области. В другом варианте осуществления нацеливающая последовательность, за исключением субъединицы или субъединиц с удаленным азотистым основанием, на по меньшей мере 84%, по меньшей мере 88% или по меньшей мере 92% комплементарна целевой области. В еще одном варианте осуществления нацеливающая последовательность, за исключением субъединицы или субъединиц с удаленным азотистым основанием, на по меньшей мере 90% комплементарна целевой области. В еще одном варианте осуществления нацеливающая последовательность, за исключением субъединицы или субъединиц с удаленным азотистым основанием, на по меньшей мере 95% комплементарна целевой области. В еще одном варианте осуществления нацеливающая последовательность, за исключением субъединицы или субъединиц с удаленным азотистым основанием, на 100% комплементарна целевой области.

В одном варианте осуществления каждая субъединица с удаленным азотистым основанием находится на расстоянии по меньшей мере 8 субъединиц от 5'- или 3'-конца нацеливающей последовательности.

Антисмысловый олигонуклеотид может содержать 1-5 субъединиц с удаленным азотистым основанием. В одном варианте осуществления антисмысловый олигонуклеотид содержит 1, 2, 3 или 4 субъединицы с удаленным азотистым основанием.

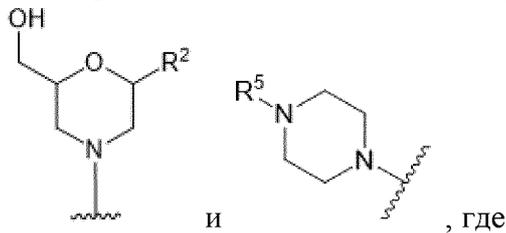
В другом варианте осуществления антисмысловый олигомер представлен конъюгатом на основе антисмыслового олигомера, характеризующегося формулой IV,



(IV),

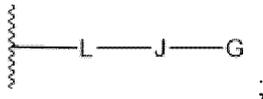
или его фармацевтически приемлемой соли,

где

A' выбран из  $-N(H)CH_2C(O)NH_2$ ,  $-N(C_{1-6}\text{алкил})CH_2C(O)NH_2$ ,

$R^5$  представляет собой  $-C(O)(O\text{-алкил})_x-OH$ , где  $x$  составляет 3-10, и каждая алкильная группа независимо в каждом случае представляет собой  $C_{2-6}$ алкил,

или  $R^5$  выбран из H,  $-C(O)C_{1-6}$ алкила, тритила, монометокситритила,  $-(C_{1-6}\text{алкил})-R^6$ ,  $-(C_{1-6}\text{гетероалкил})-R^6$ , арил- $R^6$ , гетероарил- $R^6$ ,  $-C(O)O-(C_{1-6}\text{алкил})-R^6$ ,  $-C(O)O\text{-арил}-R^6$ ,  $-C(O)O\text{-гетероарил}-R^6$ , и



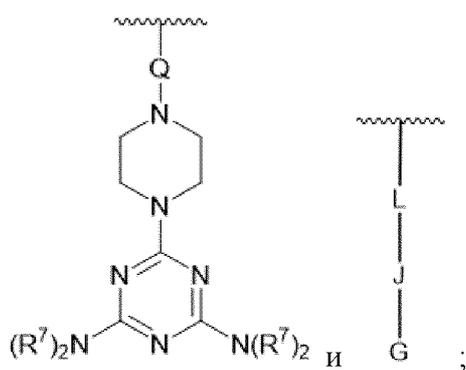
$R^6$  выбран из OH, SH и  $NH_2$ , или  $R^6$  представляет собой O, S или NH, каждый из которых ковалентно связан с твердой подложкой;

каждый  $R^1$  независимо выбран из OH и  $-N(R^3)(R^4)$ , где каждый из  $R^3$  и  $R^4$  независимо в каждом случае представляет собой H или  $-C_{1-6}$ алкил;

каждый  $R^2$  независимо в каждом случае выбран из H (с удаленным азотистым основанием), нуклеинового основания и нуклеинового основания, функционализованного химической защитной группой, при этом нуклеиновое основание независимо в каждом случае содержит  $C_{3-6}$ -гетероциклическое кольцо, выбранное из пиридина, пиримидина, пурина и дезапурина;

$t$  составляет 8-40;

$E'$  выбран из H,  $-C_{1-6}$ алкила,  $-C(O)C_{1-6}$ алкила, бензоила, стеароида, тритила, монометокситритила, диметокситритила, триметокситритила,



где

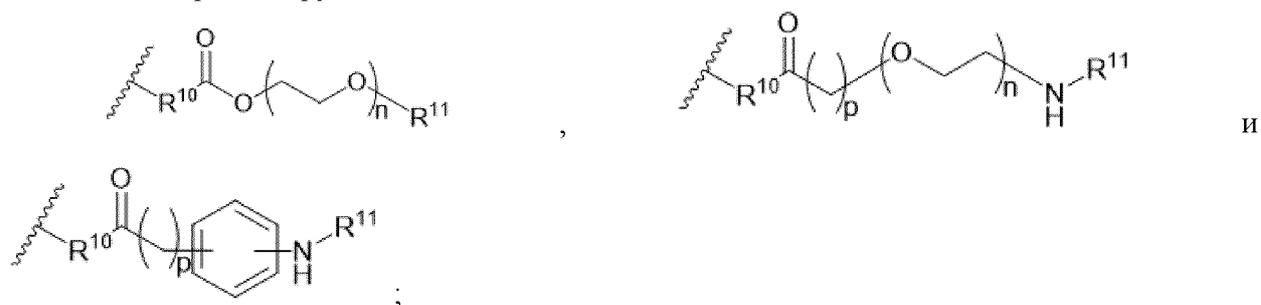
Q представляет собой  $-C(O)(CH_2)_6C(O)-$  или  $-C(O)(CH_2)_2S_2(CH_2)_2C(O)-$ ;

$R^7$  представляет собой  $-(CH_2)_2OC(O)N(R^8)_2$ , где  $R^8$  представляет собой  $-(CH_2)_6NHC(=NH)NH_2$ ;

L выбран из глицина, пролина, W, W-W или  $R^9$ , при этом L ковалентно связан посредством амидной связи с N-концом или C-концом J;

W представляет собой  $-C(O)-(CH_2)_m-NH-$ , где m составляет от 2 до 12;

$R^9$  выбран из группы, состоящей из

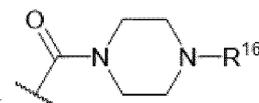


n равняется 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

p равняется 2, 3, 4 или 5;

$R^{10}$  выбран из связи, глицина, пролина, W или W-W;

$R^{11}$  выбран из группы, состоящей из глицина, пролина, W, W-W и

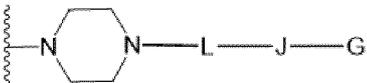


;

$R^{16}$  выбран из связи, глицина, пролина, W или W-W; при этом  $R^{16}$  ковалентно связан посредством амидной связи с N-концом или C-концом J; J представляет собой проникающий в клетку пептид; и

G выбран из H,  $-C(O)C_{1-6}$ -алкила, бензоила и стеариола, при этом G ковалентно связан с J;

при условии, что

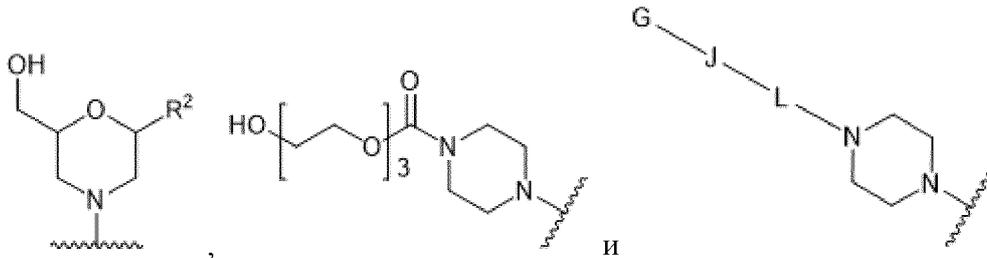
A' представляет собой , или E' представляет собой



В одном варианте осуществления E' выбран из H, -C<sub>1-6</sub>алкила, -C(O)C<sub>1-6</sub>алкила, бензоила, стеароида, тритила, монометокситритила, диметокситритила, триметокситритила и



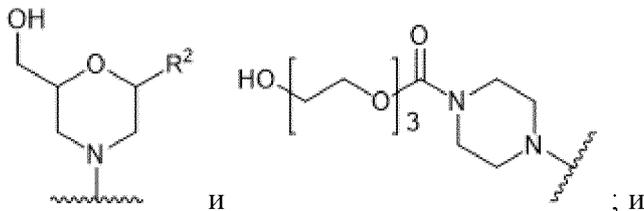
В одном варианте осуществления A' выбран из -N(C<sub>1-6</sub>алкил)CH<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub>,



В одном варианте осуществления E' выбран из H, -C(O)CH<sub>3</sub>, бензоила, стеароида, тритила, 4-метокситритила и



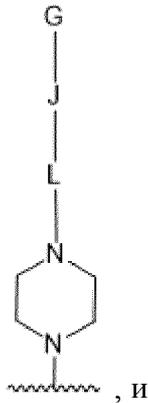
В одном варианте осуществления A' выбран из -N(C<sub>1-6</sub>алкил)CH<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub>,





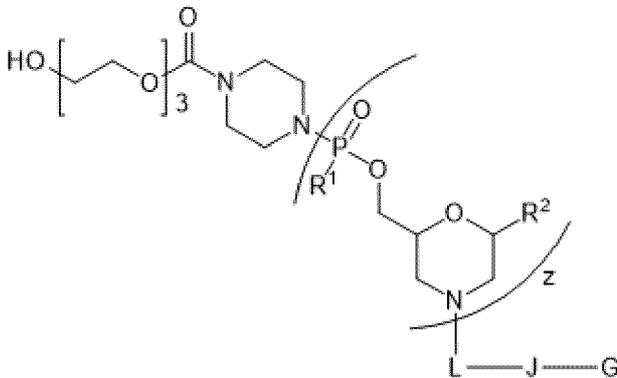
E' представляет собой

В одном варианте осуществления A' представляет собой

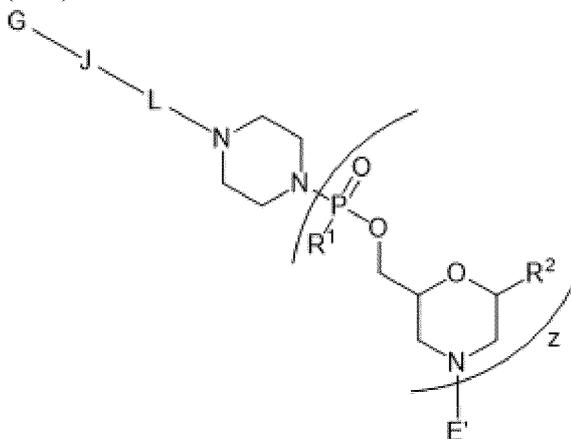


E' выбран из H, -C(O)CH<sub>3</sub>, тритила, 4-метокситритила, бензоила и стеарила.

В одном варианте осуществления конъюгат формулы IV представляет собой конъюгат, выбранный из



(IVa) и



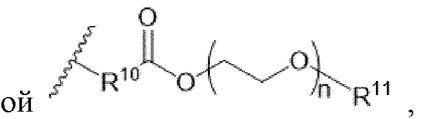
(IVb),

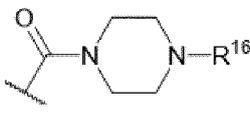
где E' выбран из H, C<sub>1-6</sub>-алкила, -C(O)CH<sub>3</sub>, бензоила и стеарила.

В одном варианте осуществления конъюгат соответствует формуле (IVa). В одном варианте осуществления конъюгат соответствует формуле (IVb).

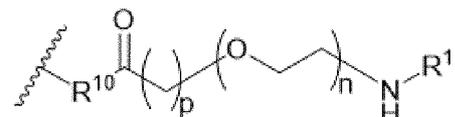
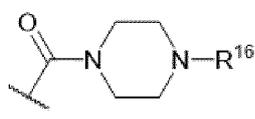
В одном варианте осуществления каждый  $R^1$  представляет собой  $-N(CH_3)_2$ .

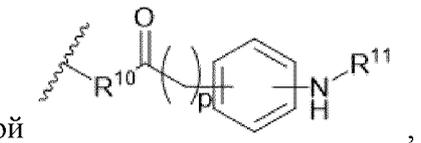
В одном варианте осуществления каждое нуклеиновое основание независимо в каждом случае выбрано из аденина, гуанина, цитозина, 5-метилцитозина, тимина, урацила и гипоксантина. В одном варианте осуществления L представляет собой глицин. В одном варианте осуществления L представляет собой пролин. В одном варианте осуществления L представляет собой  $-C(O)-(CH_2)_5-NH-$ . В одном варианте осуществления L представляет собой  $-C(O)-(CH_2)_2-NH-$ . В одном варианте осуществления L представляет собой  $-C(O)-(CH_2)_2-NH-C(O)-(CH_2)_5-NH-$ .

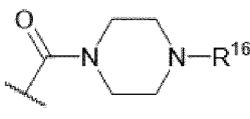
В одном варианте осуществления L представляет собой ,

где  $R^{10}$  представляет собой связь, и  $R^{11}$  выбран из глицина и .

В одном варианте осуществления L представляет собой

, где  $R^{10}$  представляет собой связь; и  $R^{11}$  выбран из глицина и .

В одном варианте осуществления L представляет собой ,

где  $R^{10}$  представляет собой связь, и  $R^{11}$  выбран из глицина и .

В одном варианте осуществления J выбран из rTAT, TAT,  $R_9F_2$ ,  $R_5F_2R_4$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_8$ ,  $R_9$ ,  $(RXR)_4$ ,  $(RXR)_5$ ,  $(RXRRBR)_2$ ,  $(RAR)_4F_2$ ,  $(RGR)_4F_2$ .

В одном варианте осуществления G выбран из H,  $C(O)CH_3$ , бензоила и стеарила. В одном варианте осуществления G представляет собой H или  $-C(O)CH_3$ . В одном варианте осуществления G представляет собой H. В одном варианте осуществления G представляет собой  $-C(O)CH_3$ .

В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность комплементарна целевой области в пределах интрона 1 (SEQ ID NO: 1) pre-mRNA гена кислой альфа-глюкозидазы (GAA) человека, где по меньшей мере одна субъединица представляет собой субъединицу с удаленным азотистым основанием. В другом варианте осуществления целевая область содержит последовательность, выбранную из группы,

состоящей из SEQ ID NO: 2 (GAA-IVS1(-189-167)) и SEQ ID NO: 3 (GAA-IVS1(-80-24)).

В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит последовательности:

- i) SEQ ID NO: 4 (CCA GAA GGA AXX XCG AGA AAA GC);
- ii) SEQ ID NO: 11 (CTC ACX XXX CTC TCA AAG CAG CTC T);
- iii) SEQ ID NO: 12 (ACT CAC XXX XCT CTC AAA GCA GCT C);
- iv) SEQ ID NO: 13 (CAC TCA CXX XXC TCT CAA AGC AGC T);
- v) SEQ ID NO: 14 (GCA CTC ACX XXX CTC TCA AAG CAG C);
- vi) SEQ ID NO: 15 (GCG GCA CTC ACX XXX CTC TCA AAG C);
- vii) SEQ ID NO: 16 (GGC GGC ACT CAC XXX XCT CTC AAA G);

где каждый X независимо выбран из гуанина (G) или представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием (B), при этом по меньшей мере один X представляет собой B.

В одном варианте осуществления B представляет собой H.

В дополнительном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из

- i) SEQ ID NO: 5 (CCA GAA GGA AGG BCG AGA AAA GC);
- ii) SEQ ID NO: 6 (CCA GAA GGA AGB GCG AGA AAA GC);
- iii) SEQ ID NO: 7 (CCA GAA GGA ABG GCG AGA AAA GC);
- iv) SEQ ID NO: 8 (CCA GAA GGA AGB BCG AGA AAA GC);
- v) SEQ ID NO: 9 (CCA GAA GGA ABB GCG AGA AAA GC);
- vi) SEQ ID NO: 10 (CCA GAA GGA ABG BCG AGA AAA GC);
- vii) SEQ ID NO: 17 (GCA CTC ACB GGG CTC TCA AAG CAG C);
- viii) SEQ ID NO: 18 (GCA CTC ACG BGG CTC TCA AAG CAG C);
- ix) SEQ ID NO: 19 (GCA CTC ACG GBG CTC TCA AAG CAG C);
- x) SEQ ID NO: 20 (GCA CTC ACG GGB CTC TCA AAG CAG C);
- xi) SEQ ID NO: 21 (GCA CTC ACB BGG CTC TCA AAG CAG C);
- xii) SEQ ID NO: 22 (GCA CTC ACG BBG CTC TCA AAG CAG C);
- xiii) SEQ ID NO: 23 (GCA CTC ACG GBB CTC TCA AAG CAG C) и
- xiv) SEQ ID NO: 24 (GGC GGC ACT CAC GBB GCT CTC AAA G).

В одном варианте осуществления B представляет собой H.

В одном варианте осуществления конъюгат представлен его фармацевтически приемлемой солью и по меньшей мере одним фармацевтически приемлемым носителем.

В одном варианте осуществления в данном документе предусмотрен способ лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение терапевтически эффективного количества конъюгата или фармацевтической композиции субъекту.

В одном варианте осуществления заболевание представляет собой болезнь Помпе. В одном варианте осуществления субъектом является человек. В дополнительном варианте осуществления человек представляет собой ребенка. В другом варианте осуществления

человек представляет собой взрослого человека.

### III. Химические свойства олигомера

В данном документе также предусмотрены антисмысловые олигомеры, где антисмысловой олигомер представляет собой модифицированный антисмысловой олигомер. Примеры модифицированных антисмысловых олигомеров включают без ограничения морфолиновые олигомеры, фосфоротиоатные модифицированные олигомеры, 2'-О-метил-модифицированные олигомеры, пептидную нуклеиновую кислоту (PNA), запертую нуклеиновую кислоту (LNA), фосфоротиоатные олигомеры, 2'-О-МОЕ-модифицированные олигомеры, 2'-фтор-модифицированный олигомер, 2'-О,4'-С-этилен-мостиковые нуклеиновые кислоты (ЕНА), трицикло-ДНК, трицикло-ДНК-фосфоротиоатные субъединицы, 2'-О-[2-(N-метилкарбамоил)этил]-модифицированные олигомеры, включая комбинации любых из вышеперечисленных. Модифицированные фосфоротиоатом и 2'-О-Ме-модифицированные химические компоненты могут быть объединены с получением 2'-О-Ме-фосфоротиоатного остова. См., например, публикации согласно РСТ №№ WO/2013/112053 и WO/2009/008725, которые настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые основания модифицированного антисмыслового олигомера связаны с кольцевыми структурами на основе морфолиновой группы, где кольцевые структуры на основе морфолиновой группы соединены фосфорсодержащими межсубъединичными связями, соединяющими азот морфолиновой группы одной кольцевой структуры с 5'-экзоциклическим углеродом смежной кольцевой структуры.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые основания антисмыслового олигомера связаны с пептидной нуклеиновой кислотой (PNA), где сахарофосфатный полинуклеотидный остов заменен гибким псевдопептидным полимером, с которым связаны нуклеиновые основания. В некоторых аспектах по меньшей мере одно из нуклеиновых оснований антисмыслового олигомера связано с запертой нуклеиновой кислотой (LNA), при этом структура запертой нуклеиновой кислоты представляет собой аналог нуклеотида, который является химически модифицированным, где рибозный фрагмент содержит дополнительный мостик, соединяющий 2'-кислород и 4'-углерод.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно из нуклеиновых оснований антисмыслового олигомера связано с мостиковой нуклеиновой кислотой (BNA), где конформация сахара является ограниченной или запертой вследствие введения дополнительной мостиковой структуры в фуранозный каркас. В некоторых аспектах по меньшей мере одно из нуклеиновых оснований антисмыслового олигомера связано с 2'-О,4'-С-этилен-мостиковой нуклеиновой кислотой (ЕНА).

В некоторых вариантах осуществления модифицированный антисмысловой олигомер может содержать субъединицы незапертой нуклеиновой кислоты (UNA). UNA и олигомеры UNA являются аналогом РНК, в котором связь С2'-С3' в субъединице расщеплена.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный антисмысловый олигомер содержит один или более фосфотиоатов (или S-олигонуклеотидов), в которых один из атомов мостикового кислорода заменен атомом серы. В некоторых аспектах модифицированный антисмысловый олигомер содержит одно или более из 2'-O-метила, 2'-O-МОЕ, МСЕ и 2'-F, в которых 2'-ОН рибозы замещено группой, представляющей собой метил, метоксиэтил, 2-(N-метилкарбамоил)этил или фтор соответственно.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный антисмысловый олигомер представляет собой трицикло-ДНК (tc-DNA), которая является аналогом ДНК с ограниченной конформационной свободой, где каждый нуклеотид модифицирован посредством введения циклопропанового кольца для ограничения конформационной гибкости остова и оптимизации геометрии торсионного угла  $\gamma$  остова.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно из нуклеиновых оснований антисмыслового олигомера связано с мостиковой нуклеиновой кислотой (BNA), где конформация сахара является ограниченной или запертой вследствие введения дополнительной мостиковой структуры в фуранозный каркас. В некоторых аспектах по меньшей мере одно из нуклеиновых оснований антисмыслового олигомера связано с 2'-O,4'-C-этилен-мостиковой нуклеиновой кислотой (ENA). В таких аспектах каждое нуклеиновое основание, которое связано с BNA или ENA, содержит 5-метильную группу. Иллюстративные варианты осуществления химических компонентов олигомеров по настоящему изобретению дополнительно описаны ниже.

#### *1. Пептидные нуклеиновые кислоты (PNA)*

Пептидные нуклеиновые кислоты (PNA) являются аналогами ДНК, остов которых характеризуется структурным сходством с остовом, состоящим из дезоксирибозы, состоящими из единиц N-(2-аминоэтил)глицина, к которым присоединены пиримидиновые или пуриновые основания. PNA, содержащие природные пиримидиновые и пуриновые основания, гибридизуются с комплементарными олигомерами согласно Уотсон-Криковским правилам спаривания оснований и имитируют ДНК в отношении распознавания пар оснований. Остов PNA образован пептидными связями, а не фосфодиэфирными связями, что делает их особенно подходящими для антисмысловых применений (см. структуру ниже). Остов является незаряженным, в результате чего образуются дуплексы PNA/DNA или PNA/RNA, которые демонстрируют повышенную термостабильность по сравнению с нормальной термостабильностью. PNA не распознаются нуклеазами или протеазами. Неограничивающий пример PNA изображен ниже.



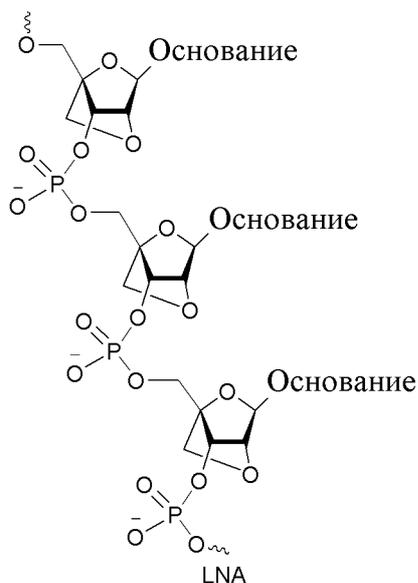
Несмотря на радикальное структурное изменение по сравнению с природной структурой, PNA способны к специфическому в отношении последовательности связыванию в форме спирали с ДНК или РНК. Характеристики PNA включают высокую аффинность связывания с комплементарной ДНК или РНК, дестабилизирующий эффект, вызванный несовпадением одной пары оснований, устойчивость к нуклеазам и протеазам, гибридизацию с ДНК или РНК независимо от концентрации соли и образование триплекса с гомопуриновой ДНК. В PANAGENE™ разработали свои собственные мономеры PNA Bts (Bts; бензотиазол-2-сульфонильная группа) и собственный способ олигомеризации. Олигомеризация PNA с применением мономеров PNA Bts состоит из повторяющихся циклов снятия защиты, связывания и кэпирования. PNA можно получать синтетически с применением любой методики, известной из уровня техники. См., например, патенты США №№ 6969766, 7211668, 7022851, 7125994, 7145006 и 7179896. См. также патенты США №№ 5539082, 5714331 и 5719262 для получения PNA. Дополнительные сведения о соединениях PNA можно найти в Nielsen *et al.*, *Science*, 254:1497-1500, 1991. Каждый из вышеуказанных источников включен посредством ссылки во всей своей полноте.

## 2. Запертые нуклеиновые кислоты (LNA)

Антисмысловые олигомеры также могут содержать субъединицы «запертых нуклеиновых кислот» (LNA). «LNA» являются представителями класса модифицированных соединений, называемых мостиковыми нуклеиновыми кислотами (BNA). BNA характеризуется ковалентной связью, которая блокирует конформацию рибозного кольца в C3'-эндо («северном») изломе плоскости углеводного кольца. В случае LNA мостик состоит из метилена, находящегося между положениями 2'-О и 4'-С. LNA обеспечивает улучшение в отношении предварительной организации остова и стэкинга оснований с повышением уровня гибридизации и термической стабильности.

Структуры LNA можно найти, например, в Wengel, *et al.*, *Chemical Communications* (1998) 455; Koshkin *et al.*, *Tetrahedron* (1998) 54:3607; Jesper Wengel, *Accounts of Chem. Research* (1999) 32:301; Obika, *et al.*, *Tetrahedron Letters* (1997) 38:8735; Obika, *et al.*, *Tetrahedron Letters* (1998) 39:5401; и Obika, *et al.*, *Bioorganic Medicinal Chemistry* (2008)

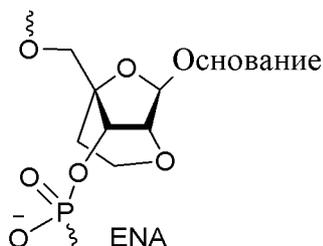
16:9230, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Неограничивающий пример LNA изображен ниже.



Антисмысловые олигомеры по настоящему изобретению могут включать одну или несколько LNA; в некоторых случаях антисмысловые олигомеры могут полностью состоять из LNA. Способы синтеза отдельных нуклеозидных субъединиц LNA и их включения в олигомеры описаны, например, в патентах США №№ 7572582, 7569575, 7084125, 7060809, 7053207, 7034133, 6794499 и 6670461, каждый из которых включен посредством ссылки во всей своей полноте. Типичные межсубъединичные линкеры включают фосфодизфирные и фосфоротиоатные фрагменты; в качестве альтернативы можно использовать линкеры, не содержащие фосфор. Дополнительные варианты осуществления включают содержащий LNA антисмысловый олигомер, где каждая субъединица LNA отделена субъединицей ДНК. Определенные антисмысловые олигомеры состоят из чередующихся субъединиц LNA и ДНК, где межсубъединичный линкер представляет собой фосфоротиоат.

### 3. Этилен-мостиковые нуклеиновые кислоты (ENA)

2'О,4'С-этилен-мостиковые нуклеиновые кислоты (ENA) являются еще одним представителем класса BNA. Неограничивающий пример изображен ниже.

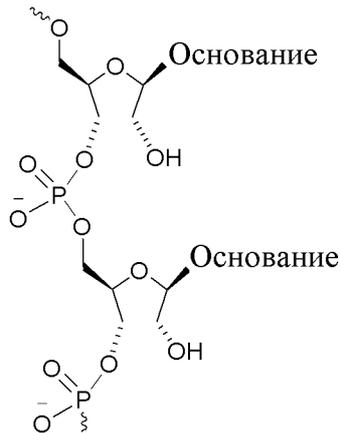


Олигомеры ENA и их получение описаны в Obika *et al.*, *Tetrahedron Lett* (1997) 38 (50): 8735, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Антисмысловые олигомеры по настоящему изобретению могут включать одну или более

субъединиц ENA.

#### 4. Незапёртая нуклеиновая кислота (UNA)

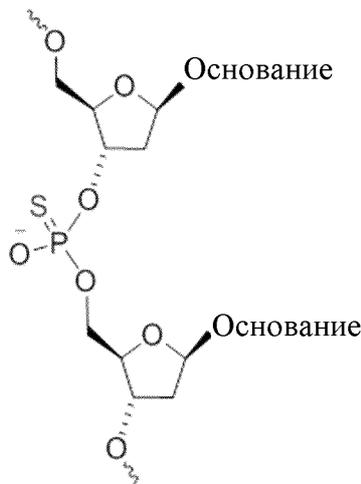
Антисмысловые олигомеры также могут содержать субъединицы незапёртой нуклеиновой кислоты (UNA). UNA и олигомеры UNA являются аналогом РНК, у которого связь С2'-С3' в субъединице расщеплена. В то время как LNA является конформационно ограниченной (по сравнению с ДНК и РНК), UNA является очень гибкой. UNA раскрыты, например, в WO 2016/070166. Неограничивающий пример UNA изображен ниже.



Типичные межсубъединичные линкеры включают фосфодиэфирные и фосфоротиоатные фрагменты; в качестве альтернативы можно использовать линкеры, не содержащие фосфор.

#### 5. Фосфоротиоаты

«Фосфоротиоаты» (или S-олигонуклеотиды) представляют собой вариант нормальной ДНК, в которой один из атомов немостикового кислорода заменен атомом серы. Неограничивающий пример фосфоротиоата изображен ниже.



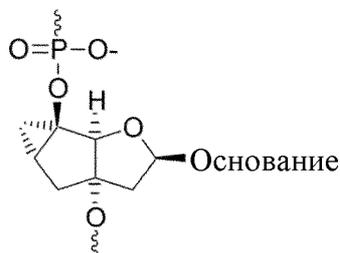
Сульфирование межнуклеотидной связи снижает воздействие эндо- и экзонуклеаз, включая 5'-3' и 3'-5' ДНК-эксонуклеазу POL 1, нуклеазы S1 и P1, РНКазы, сывороточные нуклеазы и фосфодиэстеразу змеиного яда. Фосфоротиоаты получают двумя основными путями: посредством обеспечения воздействия раствора элементарной серы в сероуглероде на гидрофосфонат или посредством способа сульфирования сложных фосфитных

триэфиров с использованием либо тетраэтилтиурамдисульфида (TETD), либо 3Н-1,2-бензодитиол-3-он-1,1-диоксида (BDTD) (см., например, Iyer *et al.*, *J. Org. Chem.* 55, 4693-4699, 1990, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). С помощью последних способов избегают проблемы, связанной с нерастворимостью элементарной серы в большинстве органических растворителей и токсичностью сероуглерода. Способы TETD и BDTD также обеспечивают получение фосфоротиоатов более высокой чистоты.

#### 6. Трицикло-ДНК и трициклофосфороотиоатные субъединицы

Трицикло-ДНК (tc-DNA) относится к классу аналогов ДНК с ограниченной конформационной свободой, в которых каждый нуклеотид модифицирован посредством введения циклопропанового кольца для ограничения конформационной гибкости остова и оптимизации геометрии торсионного угла  $\gamma$  остова. Содержащие один вид оснований, а именно аденин- и тиминсодержащие, tc-DNA образуют чрезвычайно стабильные пары оснований А-Т с комплементарными РНК. Трицикло-ДНК и их синтез описаны в публикации международной патентной заявки № WO 2010/115993, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Антисмысловые олигомеры по настоящему изобретению могут включать одну или более субъединиц трицикло-ДНК; в некоторых случаях антисмысловые олигомеры могут полностью состоять из субъединиц трицикло-ДНК.

Трициклофосфороотиоатные субъединицы представляют собой субъединицы трицикло-ДНК с фосфороотиоатными межсубъединичными связями. Трициклофосфороотиоатные субъединицы и их синтез описаны в публикации международной патентной заявки № WO 2013/053928, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Антисмысловые олигомеры по настоящему изобретению могут включать одну или более субъединиц трицикло-ДНК; в некоторых случаях антисмысловые олигомеры могут полностью состоять из субъединиц трицикло-ДНК. Неограничивающий пример трицикло-ДНК/трициклофосфороотиоатной субъединицы изображен ниже.

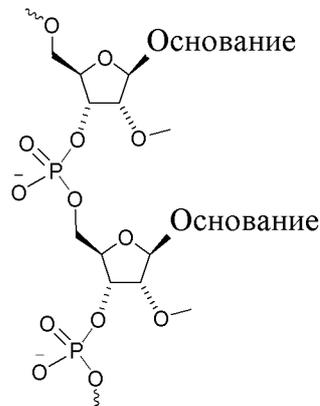


трицикло-ДНК

#### 7. 2'-О-Метил-, 2'-О-МОЕ- и 2'-F-олигомеры

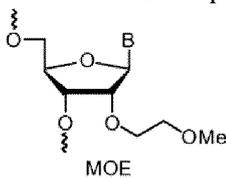
Молекулы «2'-О-Ме-олигомера» несут метильную группу при остатке 2'-ОН молекулы рибозы. 2'-О-Ме-РНК демонстрируют такое же (или подобное) поведение, что и ДНК, но они защищены от разрушения нуклеазой. 2'-О-Ме-РНК также могут быть объединены с фосфороотиоатными олигомерами (РТО) для дополнительной стабилизации.

2'-О-Ме-Олигомеры (фосфодиэфир или фосфоротиоат) могут быть синтезированы в соответствии со стандартными методиками в данной области техники (см., например, Yoo *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 32:2008-16, 2004, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Неограничивающий пример 2'-О-Ме-олигомера изображен ниже.

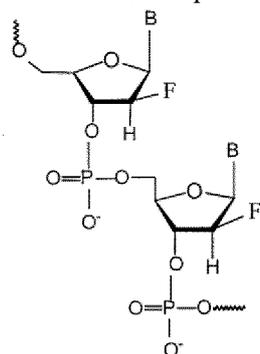


2'-О-Ме

2'-О-Метоксиэтил-олигомеры (2'-О-МОЕ) несут метоксиэтильную группу при остатке 2'-ОН молекулы рибозы и обсуждаются в Martin *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 78, 486-504, 1995, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Неограничивающий пример субъединицы 2'-О-МОЕ изображен ниже.



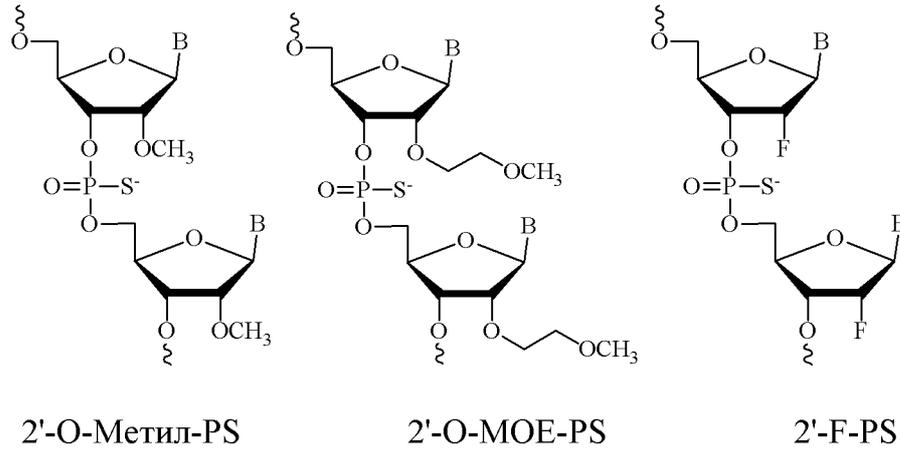
2'-Фтор-олигомеры (2'-F) содержат фтор-радикал в положении 2' вместо 2'-ОН. Неограничивающий пример 2'-F-олигомера изображен ниже.



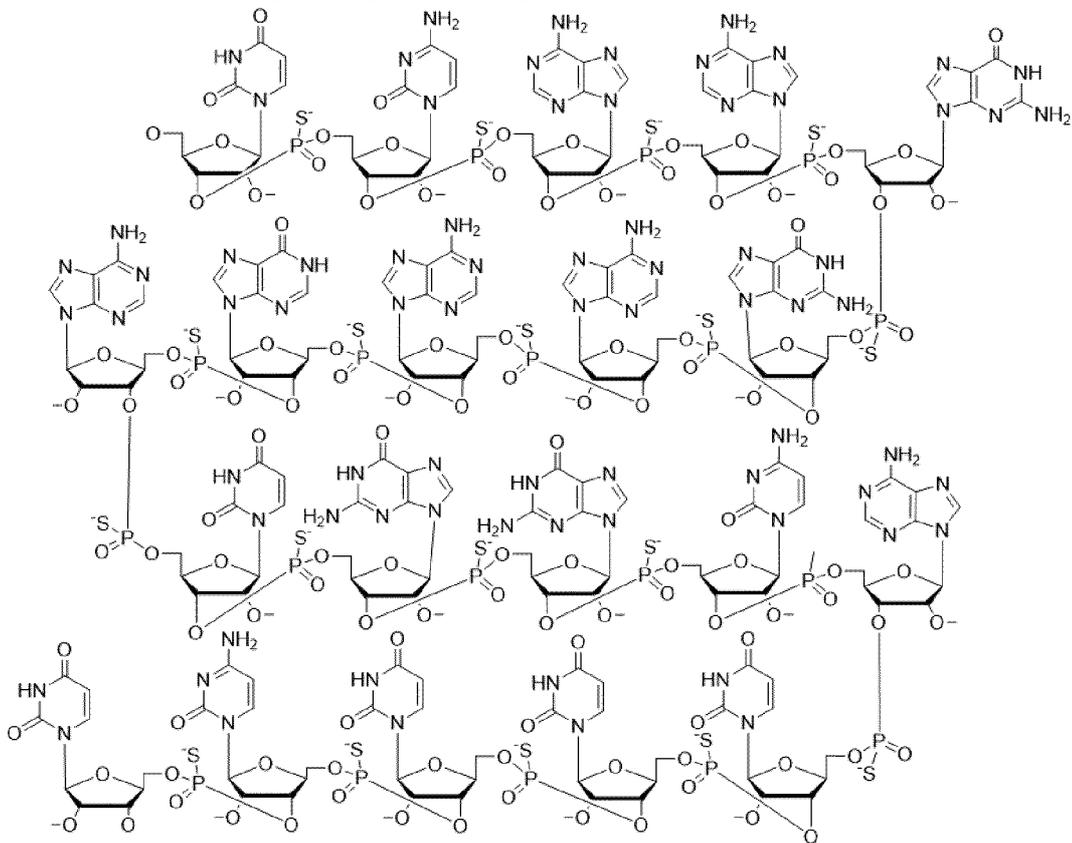
2'-F

2'-Фтор-олигомеры дополнительно описаны в WO 2004/043977, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

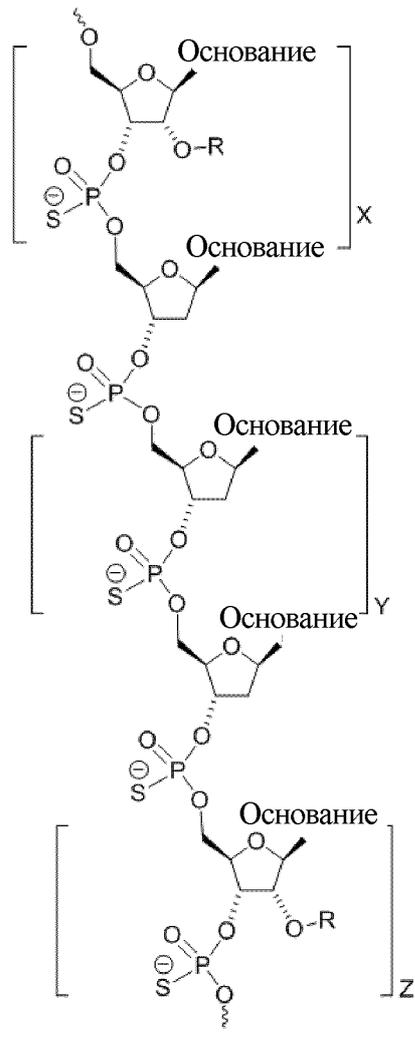
2'-О-Метил-, 2'-О-МОЕ- и 2'-F-олигомеры также могут содержать одну или несколько фосфоротиоатных (PS) связей, как изображено ниже.



Дополнительно 2'-O-метил-, 2'-O-MOE- и 2'-F-олигомеры могут содержать межсубъединичные PS-связи на протяжении всей структуры олигомера, например, как в 2'-O-метил-PS-олигомере дрисаперсене, изображенном ниже.



В качестве альтернативы 2'-O-метил-, 2'-O-MOE- и/или 2'-F-олигомеры могут содержать PS-связи на концах олигомера, как показано ниже:



где

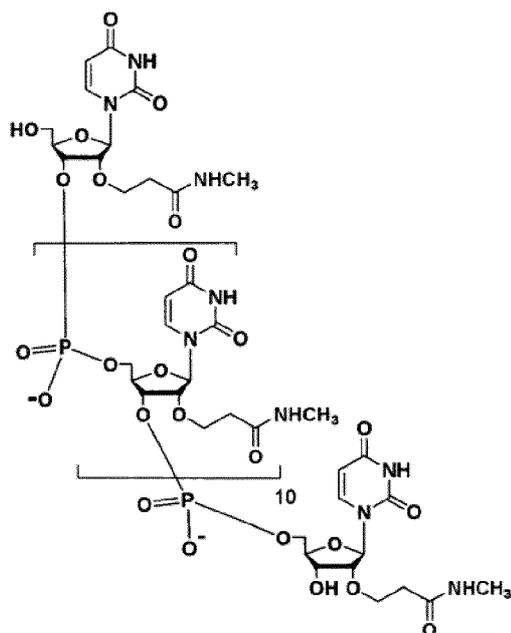
R представляет собой  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$  (метоксиэтил или МОЕ); и

X, Y и Z означают количество нуклеотидов, содержащихся в каждой из обозначенных областей с 5'-сегментом, центральным гэпом и 3'-сегментом соответственно.

Антисмысловые олигомеры по настоящему изобретению могут содержать одну или несколько 2'-O-метил-, 2'-O-МОЕ- и 2'-F-субъединиц, и в них могут использоваться любые из межсубъединичных связей, описанных в данном документе. В некоторых случаях антисмысловой олигомер по настоящему изобретению может полностью состоять из 2'-O-метил-, 2'-O-МОЕ или 2'-F-субъединиц. Один вариант осуществления антисмысловых олигомеров по настоящему изобретению полностью состоит из 2'-O-метил-субъединиц.

#### 8. 2'-O-[2-(N-Метилкарбамоил)этил]-олигомеры (МСЕ)

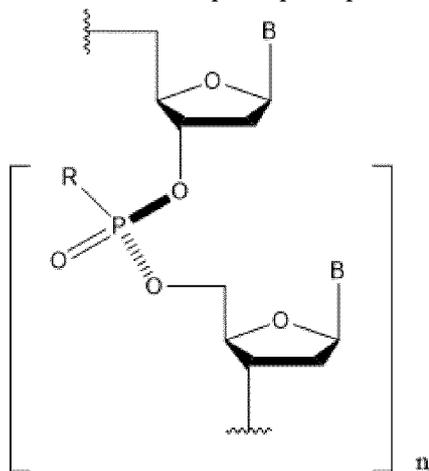
МСЕ представляют собой другой пример 2'-O-модифицированных рибонуклеозидов, применимых в антисмысловых олигомерах по настоящему изобретению. В данном случае 2'-ОН подвергают дериватизации с получением 2-(N-метилкарбамоил)этильного фрагмента для повышения устойчивости к воздействию нуклеаз. Неограничивающий пример МСЕ-олигомера изображен ниже.



МСЕ и их синтез описаны в Yamada *et al.*, *J. Org. Chem.* (2011) 76(9):3042-53, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Антисмысловые олигомеры по настоящему изобретению могут включать одну или более субъединиц МСЕ.

### 9. Стереоспецифические олигомеры

Стереоспецифические олигомеры представляют собой олигомеры, стереохимия каждой фосфорсодержащей связи в которых определяется способом синтеза, так что это приводит к получению по существу стереохимически чистого олигомера. Неограничивающий пример стереоспецифического олигомера изображен ниже.



В вышеприведенном примере каждый атом фосфора в олигомере характеризуется одинаковой стереоконфигурацией. Дополнительные примеры включают олигомеры, описанные в данном документе. Например, LNA, ENA, трицикло-ДНК, МСЕ, 2'-О-метил-, 2'-О-МОЕ-, 2'-F-олигомеры и олигомеры на основе морфолина можно получать со стереоспецифическими фосфорсодержащими межнуклеозидными связями, такими как, например, фосфоротиоатные, фосфодиэфирные, фосфорамидатные, фосфородиамидатные или другие фосфорсодержащие межнуклеозидные связи. Стереоспецифические олигомеры,

способы получения, синтез с контролем хиральности, разработка хиральности и хиральные вспомогательные вещества для применения в получении таких олигомеров подробно описаны, например, в WO2017192664, WO2017192679, WO2017062862, WO2017015575, WO2017015555, WO2015107425, WO2015108048, WO2015108046, WO2015108047, WO2012039448, WO2010064146, WO2011034072, WO2014010250, WO2014012081, WO20130127858 и WO2011005761, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Стереоспецифические олигомеры могут содержать фосфорсодержащие межнуклеозидные связи в конфигурации  $R_P$  или  $S_P$ . Хиральные фосфорсодержащие связи, в которых контролируется стереохимическая конфигурация связей, называются «стереохимически чистыми», в то время как хиральные фосфорсодержащие связи, в которых стереохимическая конфигурация не контролируется, называются «стереохимически произвольными». В определенных вариантах осуществления олигомеры по настоящему изобретению содержат множество стереохимически чистых и стереохимически произвольных связей, так что полученный олигомер содержит стереохимически чистые субъединицы в предварительно определенных положениях олигомера. Пример расположения стереохимически чистых субъединиц приведен в публикации международной заявки на патент под номером WO 2017/062862 A2, на фигурах 7A и 7B. В одном варианте осуществления все хиральные фосфорсодержащие связи в олигомере являются стереохимически произвольными. В одном варианте осуществления все хиральные фосфорсодержащие связи в олигомере являются стереохимически чистыми.

В одном варианте осуществления олигомера с  $n$  хиральными фосфорсодержащими связями (где  $n$  представляет собой целое число, равное 1 или больше) все  $n$  хиральных фосфорсодержащих связей в олигомере являются стереохимически произвольными. В одном варианте осуществления олигомера с  $n$  хиральными фосфорсодержащими связями (где  $n$  представляет собой целое число, равное 1 или больше) все  $n$  хиральных фосфорсодержащих связей в олигомере являются стереохимически чистыми. В одном варианте осуществления олигомера с  $n$  хиральными фосфорсодержащими связями (где  $n$  представляет собой целое число, равное 1 или больше) по меньшей мере 10% (с округлением до ближайшего целого числа) из  $n$  фосфорсодержащих связей в олигомере являются стереохимически чистыми. В одном варианте осуществления олигомера с  $n$  хиральными фосфорсодержащими связями (где  $n$  представляет собой целое число, равное 1 или больше) по меньшей мере 20% (с округлением до ближайшего целого числа) из  $n$  фосфорсодержащих связей в олигомере являются стереохимически чистыми. В одном варианте осуществления олигомера с  $n$  хиральными фосфорсодержащими связями (где  $n$  представляет собой целое число, равное 1 или больше) по меньшей мере 30% (с округлением до ближайшего целого числа) из  $n$  фосфорсодержащих связей в олигомере являются стереохимически чистыми. В одном варианте осуществления олигомера с  $n$  хиральными фосфорсодержащими связями (где  $n$  представляет собой целое число, равное 1 или больше) по меньшей мере 40% (с округлением до ближайшего целого числа) из  $n$





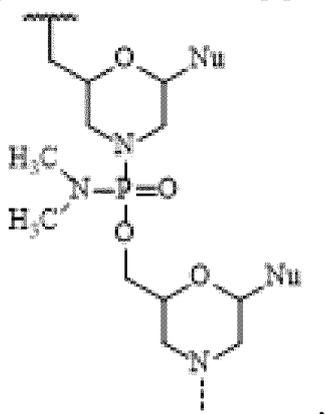
фосфорсодержащих связей в одной и той же стереоориентации (*m. e.* либо  $S_P$ , либо  $R_P$ ). В одном варианте осуществления олигомера с  $n$  хиральными фосфорсодержащими связями (где  $n$  представляет собой целое число, равное 1 или больше) олигомер содержит по меньшей мере 19 смежных стереохимически чистых фосфорсодержащих связей в одной и той же стереоориентации (*m. e.* либо  $S_P$ , либо  $R_P$ ). В одном варианте осуществления олигомера с  $n$  хиральными фосфорсодержащими связями (где  $n$  представляет собой целое число, равное 1 или больше) олигомер содержит по меньшей мере 20 смежных стереохимически чистых фосфорсодержащих связей в одной и той же стереоориентации (*m. e.* либо  $S_P$ , либо  $R_P$ ).

В одном варианте осуществления олигомера с  $n$  хиральными фосфорсодержащими связями (где  $n$  представляет собой целое число, равное 1 или больше) олигомер содержит по меньшей мере 2 смежные стереохимически чистые фосфорсодержащие связи в одной и той же стереоориентации (*m. e.* либо  $S_P$ , либо  $R_P$ ) и по меньшей мере 2 смежные стереохимически чистые фосфорсодержащие связи в другой стереоориентации. Например, олигомер может содержать по меньшей мере 2 смежные стереохимически чистые фосфорсодержащие связи в ориентации  $S_P$  и по меньшей мере 2 смежные стереохимически чистые фосфорсодержащие связи в ориентации  $R_P$ .

В одном варианте осуществления олигомера с  $n$  хиральными фосфорсодержащими связями (где  $n$  представляет собой целое число, равное 1 или больше) олигомер содержит по меньшей мере 2 смежные стереохимически чистые фосфорсодержащие связи в одной и той же стереоориентации, характеризующиеся поочередным расположением. Например, олигомер может содержать следующее в данном порядке: 2 или более  $R_P$ , 2 или более  $S_P$  и 2 или более  $R_P$  и т. д.

#### 10. Морфолиновые олигомеры

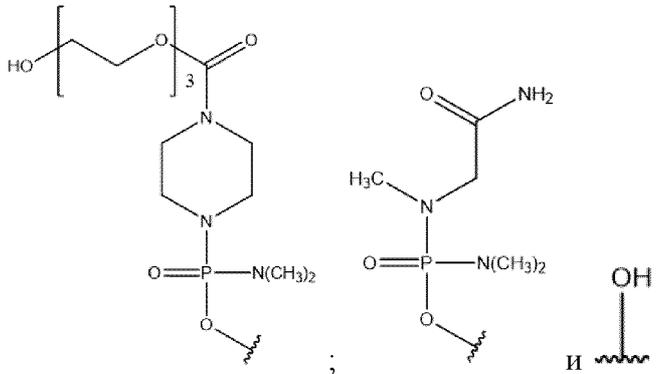
Иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к фосфородиамидатным морфолиновым олигомерам со следующей общей структурой:



и как описано на фигуре 2 из Summerton, J., *et al.*, *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 7: 187-195 (1997). Структуры на основе морфолина, описанные в данном документе, предназначены для охвата всех стереоизомеров и таутомеров, соответствующих вышеуказанной общей структуре. Характеристики синтеза, структур и связывания морфолиновых олигомеров подробно описаны в патентах США №№ 5698685, 5217866,

5142047, 5034506, 5166315, 5521063, 5506337, 8076476 и 8299206, все из которых включены в данный документ посредством ссылки.

В определенных вариантах осуществления структуры на основе морфолина конъюгированы при 5'- или 3'-конце олигомера с «хвостовым» фрагментом для повышения его стабильности и/или растворимости. Иллюстративные хвостовые фрагменты включают



В различных аспектах в настоящем изобретении предусмотрены бессмысленные олигомеры в соответствии с формулой (IV) или их фармацевтически приемлемые соли.

В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность комплементарна целевой области в пределах интрона 1 (SEQ ID NO: 1) pre-mRNA гена кислой альфа-глюкозидазы (GAA) человека, где по меньшей мере одна субъединица представляет собой субъединицу с удаленным азотистым основанием. В другом варианте осуществления целевая область содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 (GAA-IVS1(-189-167)) и SEQ ID NO: 3 (GAA-IVS1(-80-24)). В дополнительном варианте осуществления целевая область содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 2. В другом варианте осуществления целевая область содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 3.

В одном варианте осуществления целевая область выбрана из GAA-IVS1(-189-167), GAA-IVS1(-80-56), GAA-IVS1(-76-52), GAA-IVS1(-74-55), GAA-IVS1(-72-48), GAA-IVS1(-71-47), GAA-IVS1(-70-46), GAA-IVS1(-69-45), GAA-IVS1(-66-42), GAA-IVS1(-65-41) и GAA-IVS1(-49-24). В дополнительном варианте осуществления целевая область представляет собой GAA-IVS1(-189-167). В другом варианте осуществления нацеливающая область представляет собой GAA-IVS1(-72,-48). В еще одном варианте осуществления нацеливающая область представляет собой GAA-IVS1(-71,-47). В еще одном варианте осуществления нацеливающая область представляет собой GAA-IVS1(-70,-46). В одном варианте осуществления нацеливающая область представляет собой GAA-IVS1(-69-45). В другом варианте осуществления нацеливающая область представляет собой GAA-IVS1(-65,-41). В еще одном варианте осуществления нацеливающая область представляет собой GAA-IVS1(-66,-42).

В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит последовательность CCA GAA GGA AXX XCG AGA AAA GC (SEQ ID NO: 4), где каждый X независимо выбран из гуанина (G) или представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием (B), при этом по меньшей мере один X представляет собой B. В

другом варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- i) SEQ ID NO: 5 (CCA GAA GGA AGG BCG AGA AAA GC);
- ii) SEQ ID NO: 6 (CCA GAA GGA AGB GCG AGA AAA GC);
- iii) SEQ ID NO: 7 (CCA GAA GGA ABG GCG AGA AAA GC);
- iv) SEQ ID NO: 8 (CCA GAA GGA AGB BCG AGA AAA GC);
- v) SEQ ID NO: 9 (CCA GAA GGA ABB GCG AGA AAA GC) и
- vi) SEQ ID NO: 10 (CCA GAA GGA ABG BCG AGA AAA GC).

В одном варианте осуществления В представляет собой Н.

В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит SEQ ID NO: 5 (CCA GAA GGA AGG BCG AGA AAA GC). В другом варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит SEQ ID NO: 6 (CCA GAA GGA AGB GCG AGA AAA GC). В еще одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит SEQ ID NO: 7 (CCA GAA GGA ABG GCG AGA AAA GC). В еще одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит SEQ ID NO: 8 (CCA GAA GGA AGB BCG AGA AAA GC). В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит SEQ ID NO: 9 (CCA GAA GGA ABB GCG AGA AAA GC). В другом варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит SEQ ID NO: 10 (CCA GAA GGA ABG BCG AGA AAA GC).

В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из последовательности CCA GAA GGA AXX XCG AGA AAA GC (SEQ ID NO: 4). В другом варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 5 (CCA GAA GGA AGG BCG AGA AAA GC). В еще одном варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 6 (CCA GAA GGA AGB GCG AGA AAA GC). В еще одном варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 7 (CCA GAA GGA ABG GCG AGA AAA GC). В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 8 (CCA GAA GGA AGB BCG AGA AAA GC). В другом варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 9 (CCA GAA GGA ABB GCG AGA AAA GC). В еще одном варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 10 (CCA GAA GGA ABG BCG AGA AAA GC).

В одном варианте осуществления целевая область выбрана из группы, состоящей из GAA-IVS1(-80-56), GAA-IVS1(-76-52), GAA-IVS1(-74-55), GAA-IVS1(-72-48), GAA-IVS1(-71-47), GAA-IVS1(-70-46), GAA-IVS1(-69-45), GAA-IVS1(-66-42), GAA-IVS1(-65-41) и GAA-IVS1(-49-24). В другом варианте осуществления целевая область выбрана из группы, состоящей из GAA-IVS1(-72-48), GAA-IVS1(-71-47), GAA-IVS1(-70-46), GAA-IVS1(-69-45), GAA-IVS1(-66-42) и GAA-IVS1(-65-41).

В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из

- i) SEQ ID NO: 11 (CTC ACX XXX CTC TCA AAG CAG CTC T);

- ii) SEQ ID NO: 12 (ACT CAC XXX XCT CTC AAA GCA GCT C);
- iii) SEQ ID NO: 13 (CAC TCA CXX XXC TCT CAA AGC AGC T);
- iv) SEQ ID NO: 14 (GCA CTC ACX XXX CTC TCA AAG CAG C);
- v) SEQ ID NO: 15 (GCG GCA CTC ACX XXX CTC TCA AAG C);
- vi) SEQ ID NO: 16 (GGC GGC ACT CAC XXX XCT CTC AAA G);

где каждый X независимо выбран из гуанина (G) или представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием (B), при этом по меньшей мере один X представляет собой B. В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность выбрана из группы, состоящей из

- i) SEQ ID NO: 17 (GCA CTC ACB GGG CTC TCA AAG CAG C);
- ii) SEQ ID NO: 18 (GCA CTC ACG BGG CTC TCA AAG CAG C);
- iii) SEQ ID NO: 19 (GCA CTC ACG GBG CTC TCA AAG CAG C);
- iv) SEQ ID NO: 20 (GCA CTC ACG GGB CTC TCA AAG CAG C);
- v) SEQ ID NO: 21 (GCA CTC ACB BGG CTC TCA AAG CAG C);
- vi) SEQ ID NO: 22 (GCA CTC ACG BBG CTC TCA AAG CAG C);
- vii) SEQ ID NO: 23 (GCA CTC ACG GBB CTC TCA AAG CAG C) и
- viii) SEQ ID NO: 24 (GGC GGC ACT CAC GBB GCT CTC AAA G).

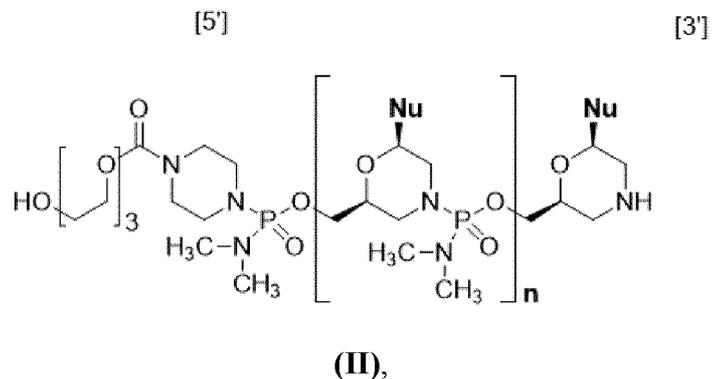
В одном варианте осуществления B представляет собой H.

В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит SEQ ID NO: 11 (CTC ACX XXX CTC TCA AAG CAG CTC T). В другом варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит SEQ ID NO: 12 (ACT CAC XXX XCT CTC AAA GCA GCT C). В еще одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит SEQ ID NO: 13 (CAC TCA CXX XXC TCT CAA AGC AGC T). В еще одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит SEQ ID NO: 14 (GCA CTC ACX XXX CTC TCA AAG CAG C). В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит SEQ ID NO: 15 (GCG GCA CTC ACX XXX CTC TCA AAG C). В другом варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит SEQ ID NO: 16 (GGC GGC ACT CAC XXX XCT CTC AAA G). В еще одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит SEQ ID NO: 17 (GCA CTC ACB GGG CTC TCA AAG CAG C). В еще одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит SEQ ID NO: 18 (GCA CTC ACG BGG CTC TCA AAG CAG C). В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит SEQ ID NO: 19 (GCA CTC ACG GBG CTC TCA AAG CAG C). В другом варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит SEQ ID NO: 20 (GCA CTC ACG GGB CTC TCA AAG CAG C). В еще одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит SEQ ID NO: 21 (GCA CTC ACB BGG CTC TCA AAG CAG C). В еще одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит SEQ ID NO: 22 (GCA CTC ACG BBG CTC TCA AAG CAG C). В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит SEQ ID NO: 23 (GCA CTC ACG GBB CTC TCA AAG CAG C). В другом варианте осуществления

нацеливающая последовательность содержит SEQ ID NO: 24 (GGC GGC ACT CAC GBB GCT CTC AAA G).

В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 11 (CTC ACX XXX CTC TCA AAG CAG CTC T). В другом варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 12 (ACT CAC XXX XCT CTC AAA GCA GCT C). В еще одном варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 13 (CAC TCA CXX XXC TCT CAA AGC AGC T). В еще одном варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 14 (GCA CTC ACX XXX CTC TCA AAG CAG C). В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 15 (GCG GCA CTC ACX XXX CTC TCA AAG C). В другом варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 16 (GGC GGC ACT CAC XXX XCT CTC AAA G). В еще одном варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 17 (GCA CTC ACB GGG CTC TCA AAG CAG C). В еще одном варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 18 (GCA CTC ACG BGG CTC TCA AAG CAG C). В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 19 (GCA CTC ACG GBG CTC TCA AAG CAG C). В другом варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 20 (GCA CTC ACG GGB CTC TCA AAG CAG C). В еще одном варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 21 (GCA CTC ACB BGG CTC TCA AAG CAG C). В еще одном варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 22 (GCA CTC ACG BBG CTC TCA AAG CAG C). В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 23 (GCA CTC ACG GBB CTC TCA AAG CAG C). В другом варианте осуществления нацеливающая последовательность состоит из SEQ ID NO: 24 (GGC GGC ACT CAC GBB GCT CTC AAA G).

В некоторых вариантах осуществления предусмотрен антисмысловой олигомер по настоящему изобретению, соответствующий формуле II:



или его фармацевтически приемлемая соль, где каждый **Nu** от 1 до **n** и от 5' до 3' соответствует нуклеиновым основаниям в одном из следующих:

<b>Название</b>	<b>Нацеливающая последовательность [от 5' до 3']</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
GAA-IVS1(-189, 167)	CCA GAA GGA AXX XCG AGA AAA GC	4
GAA-IVS1(-72,-48)	CTC ACX XXX CTC TCA AAG CAG CTC T	11
GAA-IVS1(-71,-47)	ACT CAC XXX XCT CTC AAA GCA GCT C	12
GAA-IVS1(-70,-46)	CAC TCA CXX XXC TCT CAA AGC AGC T	13
GAA-IVS1(-69-45)	GCA CTC ACX XXX CTC TCA AAG CAG C	14
GAA-IVS1(-65,-41)	GCG GCA CTC ACX XXX CTC TCA AAG C	15
GAA-IVS1(-66,-42)	GGC GGC ACT CAC XXX XCT CTC AAA G	16

где каждый X независимо выбран из гуанина (G) или представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием (B), при этом по меньшей мере один X представляет собой B. В случаях, когда X представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием (B), вместо нуклеиновых оснований А, С, Т или G присутствует водород.

В одном варианте осуществления B представляет собой H.

В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит любую из следующих последовательностей или состоит из нее:

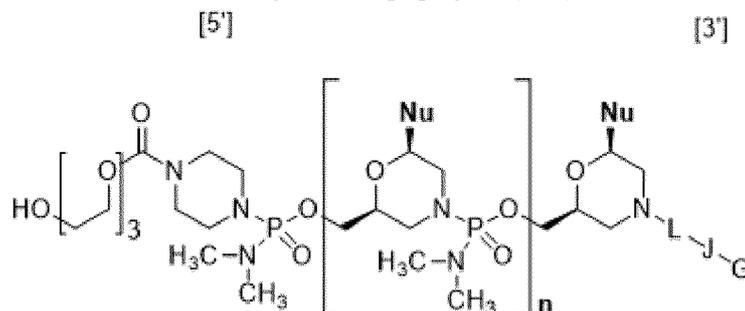
<b>Название</b>	<b>Нацеливающая последовательность [от 5' до 3']</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
GAA-IVS1(-189, 167) (-179 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA AGG BCG AGA AAA GC	5
GAA-IVS1(-189, 167) (-178 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA AGB GCG AGA AAA GC	6
GAA-IVS1(-189, 167) (-177 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA ABG GCG AGA AAA GC	7
GAA-IVS1(-189, 167) (-178,-179 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA AGB BCG AGA AAA GC	8
GAA-IVS1(-189, 167) (-177,-178 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA ABB GCG AGA AAA GC	9
GAA-IVS1(-189, 167) (-177,-179 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA ABG BCG AGA AAA GC	10
GAA-IVS1(-69-45) (G53B)	GCA CTC ACB GGG CTC TCA AAG CAG C	17
GAA-IVS1(-69-45) (G54B)	GCA CTC ACG BGG CTC TCA AAG CAG C	18
GAA-IVS1(-69-45) (G55B)	GCA CTC ACG GBG CTC TCA AAG CAG C	19
GAA-IVS1(-69-45) (G56B)	GCA CTC ACG GGB CTC TCA AAG CAG C	20

GAA-IVS1(-69-45) (G53B G54B)	GCA CTC ACB BGG CTC TCA AAG CAG C	21
GAA-IVS1(-69-45) (G54B G55B)	GCA CTC ACG BBG CTC TCA AAG CAG C	22
GAA-IVS1(-69-45) (G55B G56B)	GCA CTC ACG GBB CTC TCA AAG CAG C	23
GAA-IVS1(-65-41) (G54B G55B)	GGC GGC ACT CAC GBB GCT CTC AAA G	24.

В одном варианте осуществления В представляет собой Н.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (II) находится в форме свободного основания. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (II) представлен его фармацевтически приемлемой солевой формой. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (II) представлен его солью HCl (хлористоводородной кислоты). В определенных вариантах осуществления соль HCl представляет собой соль 1 HCl, 2 HCl, 3 HCl, 4 HCl, 5 HCl или 6 HCl. В определенных вариантах осуществления соль HCl представляет собой соль 6 HCl.

В некоторых вариантах осуществления представлен антисмысловой олигомер по настоящему изобретению, соответствующий формуле (IIIa):



(IIIa),

или его фармацевтически приемлемая соль, где каждый Nu от 1 до n и от 5' до 3' соответствует нуклеиновым основаниям в одном из следующих:

Название	Нацеливающая последовательность [от 5' до 3']	SEQ ID NO:
GAA-IVS1(-189, 167)	CCA GAA GGA AXX XCG AGA AAA GC	4
GAA-IVS1(-72,-48)	CTC ACX XXX CTC TCA AAG CAG CTC T	11
GAA-IVS1(-71,-47)	ACT CAC XXX XCT CTC AAA GCA GCT C	12
GAA-IVS1(-70,-46)	CAC TCA CXX XXC TCT CAA AGC AGC T	13
GAA-IVS1(-69-45)	GCA CTC ACX XXX CTC TCA AAG CAG C	14
GAA-IVS1(-65,-41)	GCG GCA CTC ACX XXX CTC TCA AAG C	15
GAA-IVS1(-66,-42)	GGC GGC ACT CAC XXX XCT CTC AAA G	16

где каждый X независимо выбран из гуанина (G) или представляет собой нуклеотид

с удаленным азотистым основанием (В), при этом по меньшей мере один X представляет собой В. В случаях, когда X представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием (В), вместо нуклеиновых оснований А, С, Т или G присутствует водород.

В одном варианте осуществления В представляет собой Н.

В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит любую из следующих последовательностей или состоит из нее:

Название	Нацеливающая последовательность [от 5' до 3']	SEQ ID NO:
GAA-IVS1(-189, 167) (-179 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA AGG BCG AGA AAA GC	5
GAA-IVS1(-189, 167) (-178 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA AGB GCG AGA AAA GC	6
GAA-IVS1(-189, 167) (-177 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA ABG GCG AGA AAA GC	7
GAA-IVS1(-189, 167) (-178,-179 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA AGB BCG AGA AAA GC	8
GAA-IVS1(-189, 167) (-177,-178 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA ABB GCG AGA AAA GC	9
GAA-IVS1(-189, 167) (-177,-179 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA ABG BCG AGA AAA GC	10
GAA-IVS1(-69-45) (G53B)	GCA CTC ACB GGG CTC TCA AAG CAG C	17
GAA-IVS1(-69-45) (G54B)	GCA CTC ACG BGG CTC TCA AAG CAG C	18
GAA-IVS1(-69-45) (G55B)	GCA CTC ACG GBG CTC TCA AAG CAG C	19
GAA-IVS1(-69-45) (G56B)	GCA CTC ACG GGB CTC TCA AAG CAG C	20
GAA-IVS1(-69-45) (G53B G54B)	GCA CTC ACB BGG CTC TCA AAG CAG C	21
GAA-IVS1(-69-45) (G54B G55B)	GCA CTC ACG BBG CTC TCA AAG CAG C	22
GAA-IVS1(-69-45) (G55B G56B)	GCA CTC ACG GBB CTC TCA AAG CAG C	23
GAA-IVS1(-65-41) (G54B G55B)	GGC GGC ACT CAC GBB GCT CTC AAA G	24

В одном варианте осуществления В представляет собой Н.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (Ша) находится в форме свободного основания. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (Ша) представлен его фармацевтически приемлемой солью. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (Ша) представлен его солью HCl (хлористоводородной кислоты). В определенных вариантах осуществления соль HCl представляет собой соль 5 HCl. В определенных вариантах

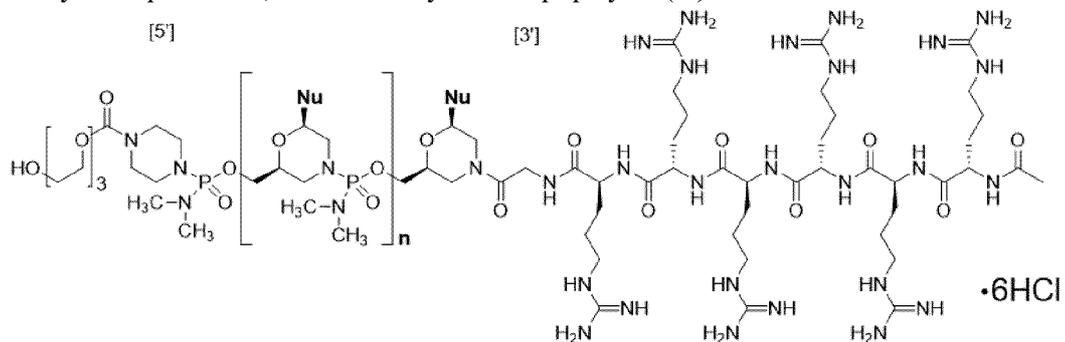


основанием)		
GAA-IVS1(-189, 167) (-178,-179 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA AGB BCG AGA AAA GC	8
GAA-IVS1(-189, 167) (-177,-178 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA ABB GCG AGA AAA GC	9
GAA-IVS1(-189, 167) (-177,-179 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA ABG BCG AGA AAA GC	10
GAA-IVS1(-69-45) (G53B)	GCA CTC ACB GGG CTC TCA AAG CAG C	17
GAA-IVS1(-69-45) (G54B)	GCA CTC ACG BGG CTC TCA AAG CAG C	18
GAA-IVS1(-69-45) (G55B)	GCA CTC ACG GBG CTC TCA AAG CAG C	19
GAA-IVS1(-69-45) (G56B)	GCA CTC ACG GGB CTC TCA AAG CAG C	20
GAA-IVS1(-69-45) (G53B G54B)	GCA CTC ACB BGG CTC TCA AAG CAG C	21
GAA-IVS1(-69-45) (G54B G55B)	GCA CTC ACG BBG CTC TCA AAG CAG C	22
GAA-IVS1(-69-45) (G55B G56B)	GCA CTC ACG GBB CTC TCA AAG CAG C	23
GAA-IVS1(-65-41) (G54B G55B)	GGC GGC ACT CAC GBB GCT CTC AAA G	24

В одном варианте осуществления В представляет собой Н.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (III) находится в форме свободного основания. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (III) представлен его фармацевтически приемлемой солью. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер формулы (III) представлен его солью HCl (хлористоводородной кислоты). В определенных вариантах осуществления соль HCl представляет собой соль 5 HCl. В определенных вариантах осуществления соль HCl представляет собой соль 6 HCl.

В некоторых вариантах осуществления представлен антисмысловой олигомер по настоящему изобретению, соответствующий формуле (V):



где каждый Nu от 1 до n и от 5' до 3' соответствует нуклеиновым основаниям в одном из следующего:

Название	Нацеливающая последовательность [от 5' до 3']	SEQ ID NO:
GAA-IVS1(-189, 167)	CCA GAA GGA AXX XCG AGA AAA GC	4
GAA-IVS1(-72,-48)	CTC ACX XXX CTC TCA AAG CAG CTC T	11
GAA-IVS1(-71,-47)	ACT CAC XXX XCT CTC AAA GCA GCT C	12
GAA-IVS1(-70,-46)	CAC TCA CXX XXC TCT CAA AGC AGC T	13
GAA-IVS1(-69-45)	GCA CTC ACX XXX CTC TCA AAG CAG C	14
GAA-IVS1(-65,-41)	GCG GCA CTC ACX XXX CTC TCA AAG C	15
GAA-IVS1(-66,-42)	GGC GGC ACT CAC XXX XCT CTC AAA G	16

где каждый X независимо выбран из гуанина (G) или представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием (B), при этом по меньшей мере один X представляет собой B. В случаях, когда X представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием (B), вместо нуклеиновых оснований A, C, T или G присутствует водород.

В одном варианте осуществления B представляет собой H.

В некоторых аспектах формулы (V) в одном случае X представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в других случаях каждый X представляет собой G. В определенных аспектах в двух случаях X представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в одном случае представляет собой G. В некоторых аспектах формулы (V) в первом случае X от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в других двух случаях X представляет собой G. В некоторых аспектах формулы (V) во втором случае X от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в первом и третьем случаях X представляет собой G. В определенных аспектах формулы (V) в третьем случае X от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в первом и втором случаях X представляет собой G.

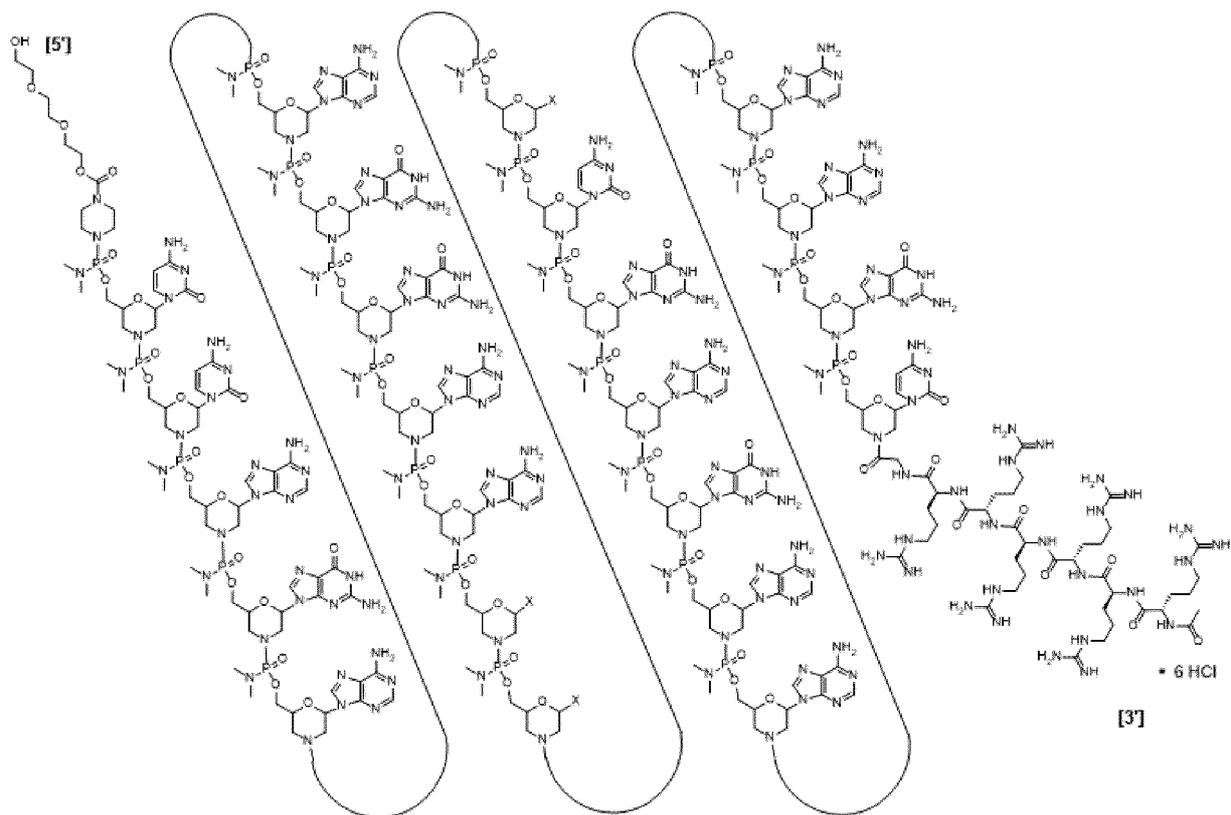
В некоторых аспектах формулы (V) в двух случаях X представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в другом случае X представляет собой G. В некоторых аспектах формулы (V) в первом и втором случаях X от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в третьем случае X представляет собой G. В некоторых аспектах формулы (V) в первом и третьем случаях X от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а во втором случае X представляет собой G. В некоторых аспектах формулы (V) во втором и третьем случаях X от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в первом случае X представляет собой G.

В одном варианте осуществления нацеливающая последовательность содержит любую из следующих последовательностей или состоит из нее:

Название	Нацеливающая последовательность [от 5' до 3']	SEQ ID NO:
GAA-IVS1(-189, 167) (-179 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA AGG BCG AGA AAA GC	5
GAA-IVS1(-189, 167) (-178 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA AGB GCG AGA AAA GC	6
GAA-IVS1(-189, 167) (-177 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA ABG GCG AGA AAA GC	7
GAA-IVS1(-189, 167) (-178,-179 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA AGB BCG AGA AAA GC	8
GAA-IVS1(-189, 167) (-177,-178 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA ABB GCG AGA AAA GC	9
GAA-IVS1(-189, 167) (-177,-179 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA ABG BCG AGA AAA GC	10
GAA-IVS1(-69-45) (G53B)	GCA CTC ACB GGG CTC TCA AAG CAG C	17
GAA-IVS1(-69-45) (G54B)	GCA CTC ACG BGG CTC TCA AAG CAG C	18
GAA-IVS1(-69-45) (G55B)	GCA CTC ACG GBG CTC TCA AAG CAG C	19
GAA-IVS1(-69-45) (G56B)	GCA CTC ACG GGB CTC TCA AAG CAG C	20
GAA-IVS1(-69-45) (G53B G54B)	GCA CTC ACB BGG CTC TCA AAG CAG C	21
GAA-IVS1(-69-45) (G54B G55B)	GCA CTC ACG BBG CTC TCA AAG CAG C	22
GAA-IVS1(-69-45) (G55B G56B)	GCA CTC ACG GBB CTC TCA AAG CAG C	23
GAA-IVS1(-65-41) (G54B G55B)	GGC GGC ACT CAC GBB GCT CTC AAA G	24

В одном варианте осуществления В представляет собой Н.

В некоторых вариантах осуществления, включая, например, некоторые варианты осуществления формулы (V), антисмысловой олигомер соответствует формуле (Va):



где каждый X независимо выбран из гуанина (G) или представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием (B), при этом по меньшей мере один X представляет собой B.

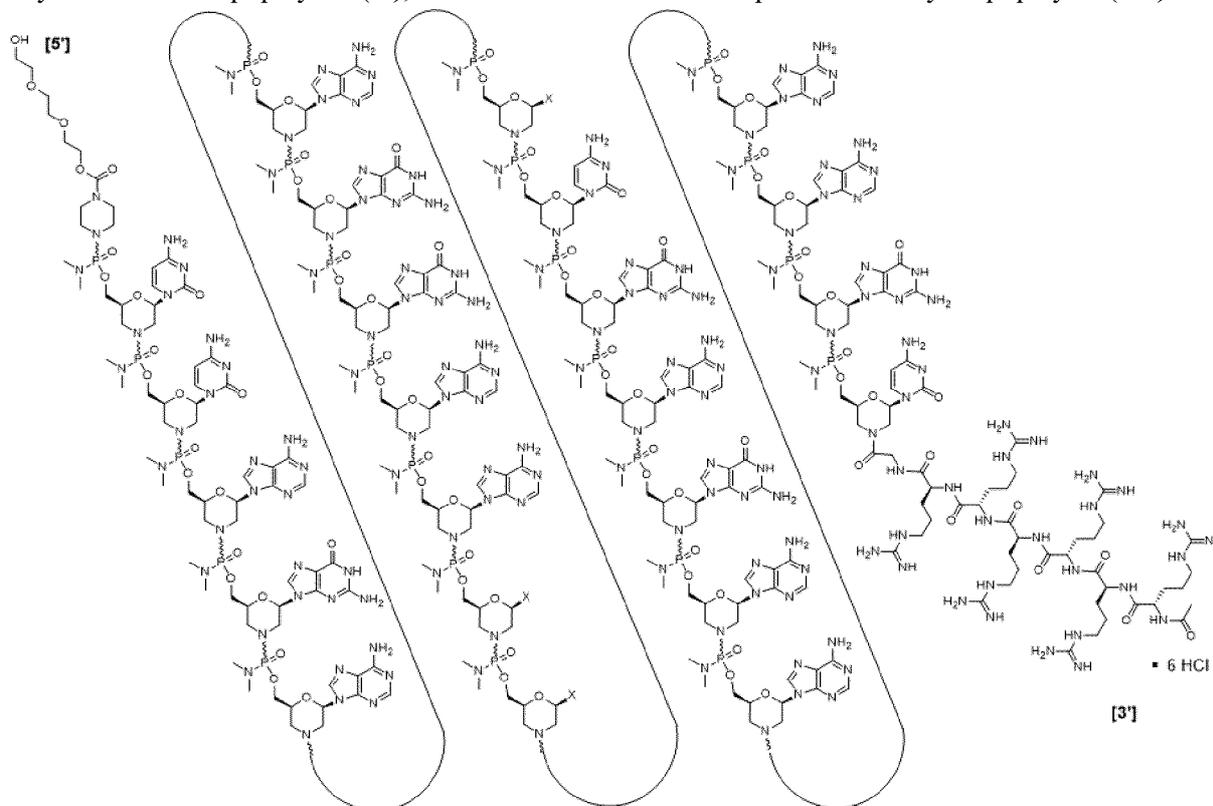
В одном варианте осуществления B представляет собой H.

В некоторых аспектах формулы (Va) в одном случае X представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в других случаях каждый X представляет собой G. В определенных аспектах формулы (Va) в двух случаях X представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в одном случае представляет собой G. В некоторых аспектах формулы (Va) в первом случае X от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в двух других случаях X представляет собой G. В некоторых аспектах формулы (Va) во втором случае X от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в первом и третьем случаях X представляет собой G. В определенных аспектах формулы (Va) в третьем случае X от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в первом и втором случаях X представляет собой G.

В некоторых аспектах формулы (Va) в двух случаях X представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, и в другом случае X представляет собой G. В некоторых аспектах формулы (Va) в первом и втором случаях X от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в третьем случае X представляет собой G. В некоторых аспектах формулы (Va) в первом и третьем случаях X от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а во втором случае X представляет собой G. В некоторых аспектах формулы (Va) во втором и третьем случаях X

от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в первом случае X представляет собой G.

В некоторых вариантах осуществления, включая, например, некоторые варианты осуществления формулы (V), антисмысловой олигомер соответствует формуле (Vb):



где каждый X независимо выбран из гуанина (G) или представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием (B), при этом по меньшей мере один X представляет собой B.

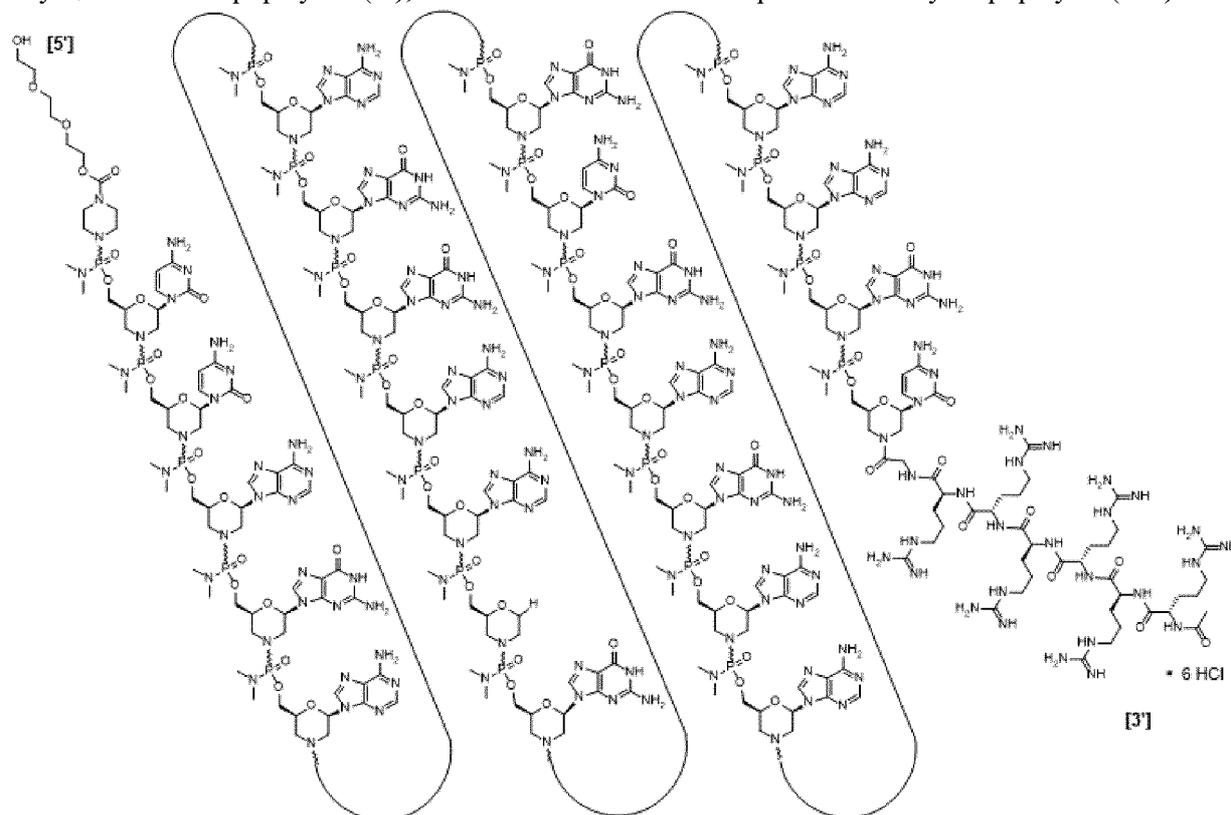
В одном варианте осуществления B представляет собой H.

В некоторых аспектах формулы (Vb) в одном случае X представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в других случаях каждый X представляет собой G. В определенных аспектах в двух случаях X представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в одном случае представляет собой G. В некоторых аспектах формулы (Vb) в первом случае X от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в двух других случаях X представляет собой G. В некоторых аспектах формулы (Vb) во втором случае X от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в первом и третьем случаях X представляет собой G. В определенных аспектах формулы (Vb) в третьем случае X от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в первом и втором случаях X представляет собой G.

В некоторых аспектах формулы (Vb) в двух случаях X представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в другом случае X представляет собой G. В некоторых аспектах формулы (Vb) в первом и втором случаях X от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в третьем случае X представляет

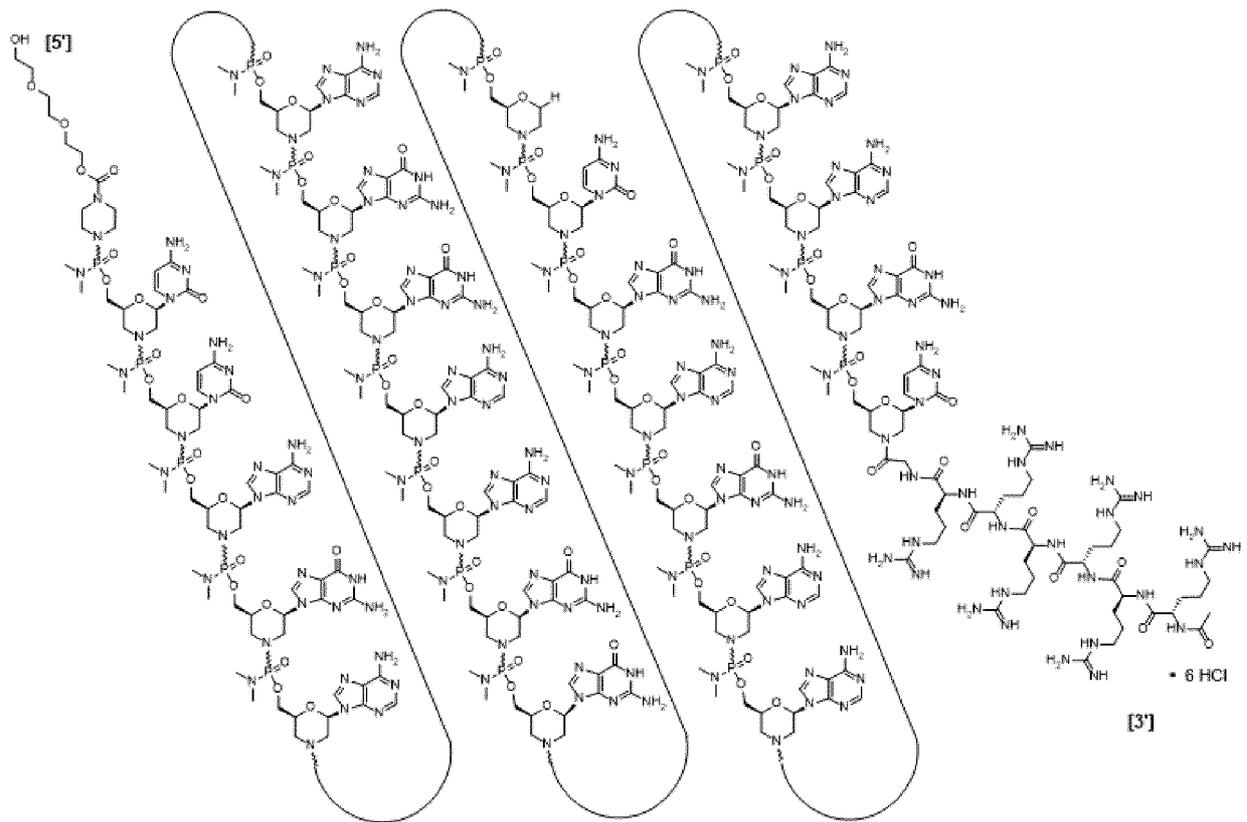
собой G. В некоторых аспектах формулы (Vb) в первом и третьем случаях X от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а во втором случае X представляет собой G. В некоторых аспектах формулы (Vb) во втором и третьем случаях X от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в первом случае X представляет собой G.

В некоторых вариантах осуществления, включая, например, некоторые варианты осуществления формулы (V), антисмысловой олигомер соответствует формуле (VII):



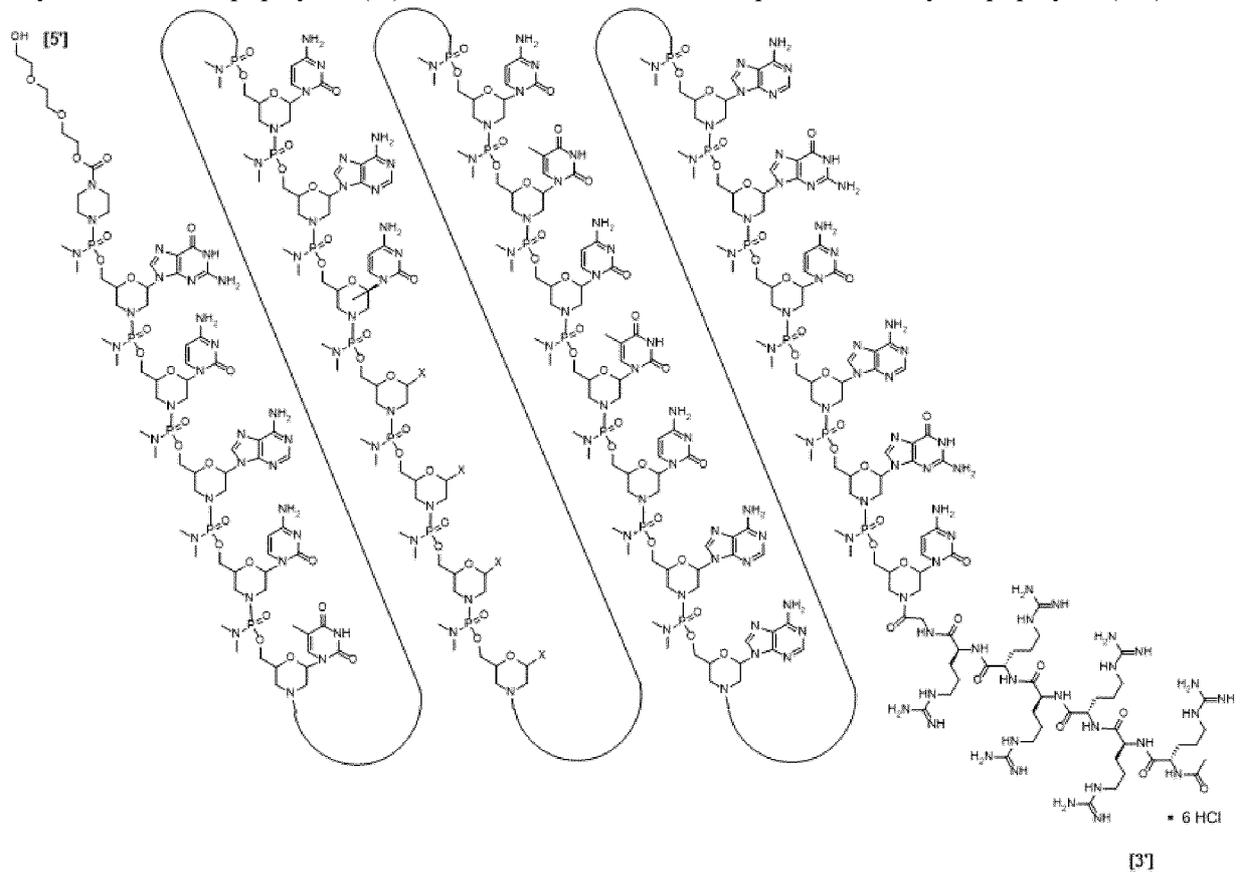
(VII).

В некоторых вариантах осуществления, включая, например, некоторые варианты осуществления формулы (V), антисмысловой олигомер соответствует формуле (VIII):



(VIII).

В некоторых вариантах осуществления, включая, например, некоторые варианты осуществления формулы (V), антисмысловой олигомер соответствует формуле (Vc):



где каждый X независимо выбран из гуанина (G) или представляет собой нуклеотид

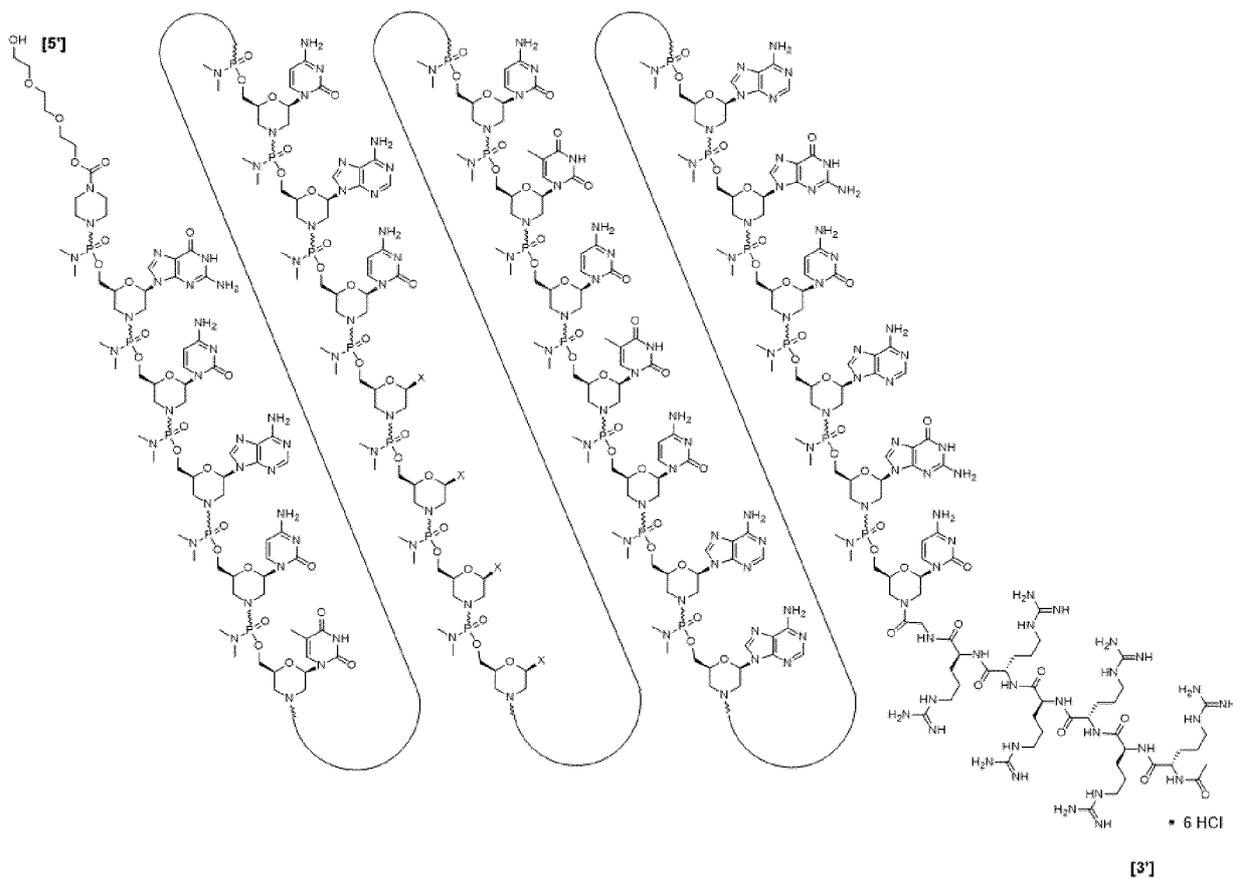
с удаленным азотистым основанием (В), при этом по меньшей мере один Х представляет собой В.

В одном варианте осуществления В представляет собой Н.

В некоторых аспектах формулы (Vc) в одном случае Х представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в других случаях каждый Х представляет собой G. В определенных аспектах формулы (Vc) в двух случаях Х представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в одном случае представляет собой G. В некоторых аспектах формулы (Vc) в первом случае Х от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в двух других случаях Х представляет собой G. В некоторых аспектах формулы (Vc) во втором случае Х от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в первом и третьем случаях Х представляет собой G. В определенных аспектах формулы (Vc) в третьем случае Х от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в первом и втором случаях Х представляет собой G.

В некоторых аспектах формулы (Vc) в двух случаях Х представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в другом случае Х представляет собой G. В некоторых аспектах формулы (Vc) в первом и втором случаях Х от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в третьем случае Х представляет собой G. В некоторых аспектах формулы (Vc) в первом и третьем случаях Х от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а во втором случае Х представляет собой G. В некоторых аспектах формулы (Vc) во втором и третьем случаях Х от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в первом случае Х представляет собой G.

В некоторых вариантах осуществления, включая, например, некоторые варианты осуществления формулы (V), антисмысловый олигомер соответствует формуле (Vd):



где каждый X независимо выбран из гуанина (G) или представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием (B), при этом по меньшей мере один X представляет собой B.

В одном варианте осуществления B представляет собой H.

В некоторых аспектах формулы (Vd) в одном случае X представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в других случаях каждый X представляет собой G. В определенных аспектах формулы (Vd) в двух случаях X представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в одном случае представляет собой G. В некоторых аспектах формулы (Vd) в первом случае X от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в двух других случаях X представляет собой G. В некоторых аспектах формулы (Vd) во втором случае X от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в первом и третьем случаях X представляет собой G. В определенных аспектах формулы (Vd) в третьем случае X от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в первом и втором случаях X представляет собой G.

В некоторых аспектах формулы (Vd) в двух случаях X представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в другом случае X представляет собой G. В некоторых аспектах формулы (Vd) в первом и втором случаях X от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в третьем случае X представляет собой G. В некоторых аспектах формулы (Vd) в первом и третьем случаях X от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а во втором случае X

представляет собой G. В некоторых аспектах формулы (Vd) во втором и третьем случаях X от 5' до 3' представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием, а в первом случае X представляет собой G.

#### IV. Целевые последовательности и целевые области

В некоторых вариантах осуществления в случае вариантов антисмыслового применения олигомер может быть на 100% комплементарен целевой последовательности нуклеиновой кислоты (за исключением по меньшей мере одной субъединицы с удаленным азотистым основанием) или он может содержать несовпадения, например, с обеспечением вариантов, при которых гетеродуплекс, образованный между олигомером и целевой последовательностью нуклеиновой кислоты, является достаточно устойчивым, чтобы противостоять воздействию клеточных нуклеаз и других средств разложения, которые могут встречаться *in vivo*. Несовпадения, при их наличии, являются менее дестабилизирующими в направлении концевых областей гибридного дуплекса, нежели в средней части. Количество допустимых несовпадений будет зависеть от длины олигомера, процентной доли пар оснований G:C в дуплексе и положения несовпадения(-ий) в дуплексе в соответствии с широко распространенными принципами стабильности дуплекса. Хотя такой антисмысловый олигомер не обязательно на 100% комплементарен целевой последовательности нуклеиновой кислоты, он эффективен в отношении стабильного и специфичного связывания с целевой последовательностью, за счет чего модулируется биологическая активность мишени, представляющей собой нуклеиновую кислоту, например, экспрессия кодируемого(-ых) белка(белков).

Стабильность дуплекса, образующегося между олигомером и целевой последовательностью, зависит от  $T_m$  связывания и чувствительности дуплекса к клеточному ферментативному расщеплению.  $T_m$  антисмыслового соединения по отношению к комплементарной последовательности РНК можно измерить с помощью общепринятых способов, таких как описанные в Hames et al., *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, 1985, стр.107-108, или описанные в Miyada CG. and Wallace RB (1987) *Oligonucleotide hybridization techniques, Methods Enzymol.*, том 154, стр. 94-107.

В некоторых вариантах осуществления каждый антисмысловый олигомер характеризуется  $T_m$  связывания по отношению к комплементарной последовательности РНК, превышающей температуру тела или в других вариантах осуществления превышающей 50°C. В других вариантах осуществления значения  $T_m$  находятся в диапазоне 60-80°C или выше. В соответствии с хорошо известными принципами  $T_m$  олигомерного соединения в отношении гибрида РНК на основе комплементарных оснований может быть повышена путем увеличения соотношения спаренных оснований C:G в дуплексе и/или путем увеличения длины (в парах оснований) гетеродуплекса. В то же время, в целях оптимизации клеточного поглощения может быть преимущественным ограничение размера олигомера. По этой причине соединения, которые демонстрируют высокую  $T_m$  (50°C или выше) при длине 20 оснований или меньше, в целом предпочтительнее соединений, требующих больше 20 оснований для высоких значений  $T_m$ .

В случае некоторых вариантов применения более длинные олигомеры, например длиннее 20 оснований, могут иметь определенные преимущества.

Основания нацеливающейся последовательности могут представлять собой нормальные основания ДНК или их аналоги, например, урацил и инозин, которые способны к спариванию оснований по Уотсону-Крику с основаниями РНК целевой последовательности.

Антисмысловой олигомер может быть сконструирован для блокирования, или подавления, или модуляции трансляции mRNA, или для подавления или модуляции сплайс-процессинга pre-mRNA, или индуцирования разрушения целевых mRNA, и, можно сказать, «направлен на» или «нацелен на» целевую последовательность, с которой он гибридизируется. В определенных вариантах осуществления целевая последовательность содержит область, включающую 3'- или 5'-участок сплайсинга предварительно обработанной mRNA, точку разветвления или другую последовательность, участвующую в регуляции сплайсинга. Целевая последовательность может находиться в пределах экзона или в пределах интрона или охватывать область соединения интрон/экзон.

Антисмысловой олигомер, характеризующийся достаточной комплементарностью последовательности с целевой последовательностью РНК для модулирования сплайсинга целевой РНК, означает, что антисмысловое средство содержит последовательность, достаточную для индуцирования маскирования участка связывания нативного белка, который в ином случае модулирует сплайсинг и/или изменяет трехмерную структуру целевой РНК. Подобным образом олигомерный реагент, характеризующийся достаточной комплементарностью последовательности с целевой последовательностью РНК для модуляции сплайсинга целевой РНК означает, что олигомерный реагент имеет последовательность, достаточную для индуцирования маскирования участка связывания нативного белка, который в ином случае модулирует сплайсинг и/или изменяет трехмерную структуру целевой РНК.

В определенных вариантах осуществления антисмысловой олигомер характеризуется достаточной длиной и комплементарностью с последовательностью в интроне 1 pre-mRNA GAA человека. Последовательности интрона 1 (SEQ ID NO:1) гена GAA человека показаны в **таблице 2** ниже (выделенный T/G вблизи 3'-конца SEQ ID NO:1 представляет собой мутацию IVS1-13T>G, описанную выше; нуклеотид в данном положении представляет собой либо T, либо G).

<b>Таблица 2</b>		
<b>Целевая область для GAA-нацеленных олигомеров</b>		
<b>Название</b>	<b>Последовательность (5'-3')</b>	<b>SEQ ID NO</b>
GAA-IVS1	GTGAGACACCTGACGTCTGCCCGCGCTGCCGGCGGTAACAT CCCAGAAGCGGGTTTGAACGTGCCTAGCCGTGCCCCAGCCT CTTCCCCTGAGCGGAGCTTGAGCCCCAGACCTCTAGTCCTCCC GGTCTTTATCTGAGTTCAGCTTAGAGATGAACGGGGAGCCGC	1

CCTCCTGTGCTGGGCTTGGGGCTGGAGGCTGCATCTTCCCGTT  
TCTAGGGTTTCCTTTCCCCTTTTGATCGACGCAGTGCTCAGTC  
CTGGCCGGGACCCGAGCCACCTCTCCTGCTCCTGCAGGACGC  
ACATGGCTGGGTCTGAATCCCTGGGGTGAGGAGCACCGTGCC  
CTGAGAGGGGGCCCCTGGGCCAGCTCTGAAATCTGAATGTCT  
CAATCACAAAGACCCCTTAGGCCAGGCCAGGGGTGACTGTC  
TCTGGTCTTTGTCCCTGGTTGCTGGCACATAGCACCCGAAACC  
CTTGAAACCGAGTGATGAGAGAGCCTTTTGCTCATGAGGTG  
ACTGATGACCGGGGACACCAGGTGGCTTCAGGATGGAAGCAG  
ATGGCCAGAAAGACCAAGGCCTGATGACGGGTTGGGATGGA  
AAAGGGGTGAGGGGCTGGAGATTGAGTGAATCACCAGTGGCT  
TAGTCAACCATGCCTGCACAATGGAACCCCGTAAGAAACCAC  
AGGGATCAGAGGGCTTCCCGCCGGGTTGTGGAACACACCAAG  
GCACTGGAGGGTGGTGCAGAGCAGAGAGCACAGCATCACTGCC  
CCCACCTCACACCAGGCCCTACGCATCTTCCATACGGCTGT  
CTGAGTTTTATCCTTTGTAATAAACCAGCAACTGTAAGAAACG  
CACTTTCCTGAGTCTGTGACCCTGAAGAGGGAGTCTGGGA  
ACCTCTGAATTTATAACTAGTTGATCGAAAGTACAAGTGACA  
ACCTGGGATTTGCCATTGGCCTCTGAAGTGAAGGCAGTGTTGT  
GGGACTGAGCCCTAACCTGTGGAGTCTGTGCTGACTCCAGG  
TAGTGTC AAGATTGAATTGAATTGTAGGACACCCAGCCGTGT  
CCAGAAAGTTGCAGAATTGATGGGTGTGAGAAAAACCCTACA  
CATTTAATGTCAGAAGTGTGGGTAAAATGTTTCACCCTCCAGC  
CCAGAGAGCCCTAATTTACCAGTGGCCACGGTGGAAACCA  
CGTCCGGCCGGGGGCAGAGCGTTCCAGCCAAGCCTTCTGTA  
ACATGACATGACAGGTGAGACTCCCTCGGGCCCTGAGTTCAC  
TTCTTCCCTGGTATGTGACCAGCTCCAGTACCAGAGAAGGTTG  
CACAGTCTCTGCTCCAAGGAGCTTCACTGGCCAGGGGCTGC  
TTTCTGAAATCCTTGCCTGCCTCTGCTCCAAGGCCGTTCTC  
AGAGACGCAGACCCTCTGATGGCTGACTTTGGTTTGAGGAC  
CTCTCTGCATCCCTCCCCATGGCCTTGCTCCTAGGACACCTT  
CTTCTCCTTTCCCTGGGGTCAGACTTGCCTAGGTGCGGTGGC  
TCTCCAGCCTTCCCCACGCCCTCCCCATGGTGTATTACACAC  
ACCAAAGGGACTCCCTATTGAAATCCATGCATATTGAATCG  
CATGTGGGTTCGGCTGCTCCTGGGAGGAGCCAGGCTAATAG  
AATGTTTGCCATAAAATATTAATGTACAGAGAAGCGAAACAA  
AGGTGCTTGGTACTTGTTAACCTTACCAGCAGAATAATGAAA  
GCGAACCCCATATCTCATCTGCACGCGACATCCTTGTTGTGT  
CTGTACCCGAGGCTCCAGGTGCAGCCACTGTTACAGAGACTG  
TGTTTCTTCCCATGTACCTCGGGGGCCGGGAGGGGTTCTGAT  
CTGCAAAGTCGCCAGAGGTTAAGTCCTTCTCTCTTGTGGCTT  
TGCCACCCCTGGAGTGTACCCTCAGCTGCGGTGCCAGGATT  
CCCCACTGTGGTATGTCCGTGCACCAGTCAATAGGAAAGGGA  
GCAAGGAAAGGTAAGTGGGTCCCCCTAAGGACATACGAGTTGC  
CAGAATCACTTCCGCTGACACCCAGTGGACCAAGCCGCACCT  
TTATGCAGAAGTGGGGCTCCAGCCAGGCGTGGTCACTCCTG  
AAATCCCAGCACTTCGGAAGGCCAAGGGGGGTGGATCACTTG  
AGCTCAGGAGTTCGAGACCAGCCTGGGTAACATGGCAAATC  
CCGTCTTACAAAAATACAGAAAATTAGCTGGGTGCGGTGGT  
GTGTGCCTACAGTCCCAGCTACTCAGGAGGCTGAAGTGGGAG  
GATTGCTTGAGTCTGGGAGGTGGAGGTTGCAGTGAGCCAGGA  
TCTCACCACAGCACTCTGGCCAGGCGACAGCTGTTTGGCCTG

	TTTCAAGTGTCTACCTGCCTTGCTGGTCTTCCTGGGGACATTC TAAGCGTGTGTTGATTTGTAACATTTTAGCAGACTGTGCAAGTG CTCTGCACTCCCCTGCTGGAGCTTTTCTCGCCCTTCCTTCTGGC CCTCTCCCCAGTCTAGACAGCAGGGCAACACCCACCCTGGCC ACCTTACCCACCTGCCTGGGTGCTGCAGTGCCAGCCGCGGTT GATGTCTCAGAGCTGCTTTGAGAGCCCCGTGAGTGCCGCCCT CCCGCCTCCCTGCTGAGCCCGCTTT/GCTTCTCCCGCAG	
GAA-IVS1 (-189-167)	GCTTTTCTCGCCCTTCCTTCTGG	2
GAA-IVS1 (-80-24)	GATGTCTCAGAGCTGCTTTGAGAGCCCCGTGAGTGCCGCCCT CCCGCCTCCCTGC	3

В определенных вариантах осуществления степень комплементарности между целевой последовательностью и антисмысловой нацеливающей последовательностью является достаточной для образования устойчивого дуплекса. Область комплементарности антисмысловых олигомеров, за исключением единиц с удаленным азотистым основанием, с целевой последовательностью РНК может составлять всего 8-11 оснований, но может составлять 12-15 оснований или больше, например, 10-40 оснований, 12-30 оснований, 12-25 оснований, 15-25 оснований, 12-20 оснований или 15-20 оснований, включая все целые значения в пределах этих диапазонов. Антисмысловый олигомер на приблизительно 14-15 оснований в целом является достаточно длинным, чтобы иметь уникальную комплементарную последовательность. В определенных вариантах осуществления может быть необходима минимальная длина комплементарных оснований для достижения необходимой  $T_m$  связывания, как рассматривается в данном документе.

В определенных вариантах осуществления могут быть подходящими олигомеры, длиной в 40 оснований, где по меньшей мере минимальное количество оснований, например 10-12 оснований, являются комплементарными целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления облегченное или активное поглощение в клетках является оптимизированным при значениях длины олигомера, составляющих менее приблизительно 30 оснований. В случае РМО-олигомеров, дополнительно описанных в данном документе, оптимальный баланс стабильности связывания и поглощения в целом наблюдается при значениях длины, составляющих 18-25 оснований. В настоящее изобретение включены антисмысловые олигомеры (например, РМО, РМО-Х, РНА, LNA, 2'-ОМе), которые состоят из приблизительно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, или 40 оснований, в которых по меньшей мере приблизительно 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, или 40 смежных или несмежных оснований комплементарны требуемым целевым последовательностям.

В определенных вариантах осуществления антисмысловые олигомеры могут быть на 100% комплементарны целевой последовательности (за исключением по меньшей мере одного нуклеотида с удаленным азотистым основанием) или могут содержать несовпадения, например, с обеспечением вариантов, при которых гетеродуплекс,

образованный между олигомером и целевой последовательностью, является достаточно устойчивым, чтобы противостоять воздействию клеточных нуклеаз и других средств разложения, которые могут встречаться *in vivo*. Следовательно, определенные олигомеры могут характеризоваться существенной комплементарностью, то есть, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 70% комплементарностью последовательности, например, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% комплементарностью последовательности, между олигомером (за исключением по меньшей мере одного нуклеотида с удаленным азотистым основанием) и целевой последовательностью. Остовы олигомеров, которые менее чувствительны к расщеплению нуклеазами, рассматриваются в данном документе. Несовпадения, при их наличии, обычно являются менее дестабилизирующими в направлении концевых областей гибридного дуплекса, чем в средней части. Количество допустимых несовпадений будет зависеть от длины олигомера, процентной доли пар оснований G:C в дуплексе и положения несовпадения(-ий) в дуплексе в соответствии с широко распространенными принципами стабильности дуплекса. Хотя такой антисмысловой олигомер не обязательно на 100% комплементарен целевой последовательности, он эффективен в отношении стабильного и специфического связывания с целевой последовательностью, за счет чего модулируется сплайсинг целевой *pre*-RNA. Стабильность дуплекса, образующегося между олигомером и целевой последовательностью, зависит от  $T_m$  связывания и чувствительности дуплекса к клеточному ферментативному расщеплению.  $T_m$  олигомера по отношению к комплементарной последовательности РНК можно измерить с помощью общепринятых способов, таких как описанные в Hames et al., *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, 1985, стр. 107-108, или описанные в Miyada C. G. and Wallace R. B., 1987, *Oligomer Hybridization Techniques*, *Methods Enzymol.*, том 154, стр. 94-107. В определенных вариантах осуществления антисмысловые олигомеры могут характеризоваться  $T_m$  связывания по отношению к комплементарной последовательности РНК, превышающей температуру тела и предпочтительно превышающей приблизительно 45°C или 50°C. Значения  $T_m$  в диапазоне 60-80°C или выше также включены. В соответствии с хорошо известными принципами  $T_m$  олигомера по отношению к гибриду РНК на основе комплементарных оснований может быть повышена путем увеличения соотношения спаренных оснований C:G в дуплексе и/или путем увеличения длины (в парах оснований) гетеродуплекса. В то же время, в целях оптимизации клеточного поглощения может быть преимущественным ограничение размера олигомера. По этой причине соединения, которые демонстрируют высокую  $T_m$  (45-50°C или выше) при длине 25 оснований или меньше в целом предпочтительнее соединений, требующих больше 25 оснований для высоких значений  $T_m$ .

В определенных вариантах осуществления антисмысловые нацеливающие последовательности сконструированы для гибридизации с областью одной или более целевых последовательностей, перечисленных в таблице 2. Выбранные антисмысловые нацеливающие последовательности можно сделать короче, например приблизительно 12

оснований, или длиннее, например приблизительно 40 оснований, и они включают небольшое число несовпадений, при которых последовательность достаточно комплементарна, чтобы влиять на сплайс-модуляцию после гибридизации с целевой последовательностью, и необязательно образует с РНК гетеродуплекс, характеризующийся  $T_m$  45°C или выше.

#### V. Проникающие в клетку пептиды (CPP)

Проникающие в клетку пептиды (CPP) с высоким содержанием аргинина, рассматриваемые в данном документе, например, в пределах объема заместителя J, могут быть эффективными в увеличении проникновения антисмысловых олигомеров в клетку и обуславливать пропуск экзонов в разных группах мышц в животных моделях.

Иллюстративные пептиды с высоким содержанием аргинина представлены ниже в **таблице 3**.

**Таблица 3.** Пептидные транспортеры с высоким содержанием аргинина (J)

Название (обозначение)	Последовательность
rTAT	RRRQRRKKR-L
Tat	RKKRRQRRR-L
R <sub>9</sub> F <sub>2</sub>	RRRRRRRRRFF-L
R <sub>5</sub> F <sub>2</sub> R <sub>4</sub>	RRRRRFFRRRR-L
R <sub>4</sub>	RRRR-L
R <sub>5</sub>	RRRR-L
R <sub>6</sub>	RRRR-L
R <sub>7</sub>	RRRR-L
R <sub>8</sub>	RRRR-L
R <sub>9</sub>	RRRR-L
(RXR) <sub>4</sub>	RXRRXRRXRRX-L
(RXR) <sub>5</sub>	RXRRXRRXRRXRRX-L
(RXRRβR) <sub>2</sub>	RXRRβRRXRRβR-L
(RAR) <sub>4</sub> F <sub>2</sub>	RARRARRARRARFFC-L
(RGR) <sub>4</sub> F <sub>2</sub>	RGRRGRRGRRGRFFC-L

<sup>a</sup>Последовательности, обозначенные SEQ ID NO, не содержат линкерную часть L. α и β относятся к β-аминогексановой кислоте и бета-аланину соответственно.

В другом аспекте иллюстративные проникающие в клетку пептиды в пределах объема заместителя J представлены в таблице 4. Точка присоединения к заместителю L показана в таблице.

**Таблица 4**

Иллюстративные последовательности пептидов-носителей	
Название	Последовательность (от amino- к карбоксиконцу)

---

(RFF) <sub>3</sub> ; CP0407	RFFRFFRFF-L
RTR	RTRTRFLRRT-L
RFFR	RFFRFFRFFR-L
KTR	KTRTKFLKKT-L
KFF	KFFKFFKFF-L
KFFK	KFFKFFKFFK-L
(RFF) <sub>2</sub>	RFFRFF-L
(RFF) <sub>2</sub> R	RFFRFFR-L
R $\alpha$	R $\alpha$ R $\alpha$ R-L
(R $\alpha$ R) <sub>4</sub> ; P007	R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ R-L
Tat <sub>47_58</sub>	YGRKKRRQRRR-L
Tat <sub>48_58</sub>	GRKKRRQRRR-L
Tat <sub>49_58</sub>	RKKRRQRRR-L
Проникновение	RQIKIWFQNRRMKWKKTG-L
Транспортан	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL-L
2 $\alpha$ Hph-1	YARVRRRGPRGYARVRRRGPRR-L
Hph-1	YARVRRRGPRR-L
Sim-2	AK AARQAAR-L
HSV1 VP22	DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVE-L
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV-L
Pep-2	KETWFETWFTEWSQPKKKRKV-L
ANTP	RQIKIWFQNRRMKWKK-L
R <sub>6</sub> Pen	RRRRRR-RQIKIWFQNRRMKWKKGG-L
rTat	RRRQRRKKRC-L
pTat	CYGRKKRRQRRR-L
R <sub>9</sub> F <sub>2</sub>	RRRRRRRRRFFC-L
R <sub>9</sub> CF <sub>2</sub>	RRRRRRRRRCFF-L
R <sub>8</sub> CF <sub>2</sub> R	RRRRRRRRRCFFR-L
R <sub>6</sub> CF <sub>2</sub> R <sub>3</sub>	RRRRRRRCFFRRR-L
R <sub>5</sub> FCFR <sub>4</sub>	RRRRRRCFFRRR-L
R <sub>5</sub> F <sub>2</sub> R <sub>4</sub>	RRRRRFFRRR-L
R <sub>4</sub> CF <sub>2</sub> R <sub>5</sub>	RRRRCFFRRRR-L
R <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> R <sub>7</sub>	RRCFFRRRRRR-L
CF <sub>2</sub> R <sub>9</sub>	CFRRRRRRRR-L
CR <sub>9</sub> F <sub>2</sub>	CRRRRRRRRFF-L
F <sub>2</sub> R <sub>9</sub>	FFRRRRRRRR-L

$R_5F_2CF_2R_4$	RRRRRFFCFFRRRR-L
$R_9I_2$	RRRRRRRRRII-L
$R_8F_3$	RRRRRRRRFFF-L
$R_9F_4$	RRRRRRRRRFFFF-L
$R_5F_2$	RRRRRRRRFF-L
$R_6F_2$	RRRRRRFF-L
$R_5F_2$	RRRRRFF-L
$(RR\alpha)_3RR$	RR $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RR-L
$(R\alpha R)_4$	R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ R-L
$(\alpha RR)_4$	$\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RR-L
$(R\alpha)_5RR$	R $\alpha$ R $\alpha$ R $\alpha$ R $\alpha$ R $\alpha$ R-L
$(R\alpha R)_3$	R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ R-L
$(R\alpha R)_2R$	R $\alpha$ RR $\alpha$ RR-L
$(R\alpha R)_2$	R $\alpha$ RR $\alpha$ R-L
$(RK\alpha)_3RK$	RK $\alpha$ RK $\alpha$ RK $\alpha$ RK-L
$(RH\alpha)_3RH$	RH $\alpha$ RH $\alpha$ RH $\alpha$ RH-L
$R_8CF_2R$	RRRRRRRRRCFFR-L
$(RR\alpha)_3RR$	RR $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RR-L
$(R\alpha R)_4$ ; P007	R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ R-L
$(\alpha RR)_4$	$\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RR-L
$(R\alpha)_5R$	R $\alpha$ R $\alpha$ R $\alpha$ R $\alpha$ R $\alpha$ R-L
$(R\alpha)_7R$	R $\alpha$ R $\alpha$ R $\alpha$ R $\alpha$ R $\alpha$ R $\alpha$ R-L
$(R\alpha R)_5$	R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ R-L
$(R\alpha RR\beta R)_2$ ; B	R $\alpha$ RR $\beta$ RR $\alpha$ RR $\beta$ R-L
$(R\alpha R)_3R\beta R$	R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\beta$ R-L
$(R\beta)_5R\alpha R\beta R$	R $\beta$ R $\beta$ R $\beta$ R $\beta$ R $\beta$ R $\alpha$ R $\beta$ R-L
$R\beta R\beta R\beta R\alpha R\beta R\beta R\beta R$	R $\beta$ R $\beta$ R $\beta$ R $\alpha$ R $\beta$ R $\beta$ R $\beta$ R-L
$\alpha(R\beta)_3R\alpha(R\beta)_3R-\alpha$	$\alpha$ R $\beta$ R $\beta$ R $\beta$ R $\alpha$ R $\beta$ R $\beta$ R $\beta$ R-L
$(R\beta R\alpha)_4$	R $\beta$ R $\alpha$ R $\beta$ R $\alpha$ R $\beta$ R $\alpha$ R $\beta$ R-L
$(R\beta)_4(R\alpha)_3R$	R $\beta$ R $\beta$ R $\beta$ R $\beta$ R $\alpha$ R $\alpha$ R $\alpha$ R-L
$R\alpha(R\beta)_2R\alpha(R\beta)_3R$	R $\alpha$ R $\beta$ R $\beta$ R $\alpha$ R $\beta$ R $\beta$ R $\beta$ R-L
$(R\beta)_7R$	R $\beta$ R-L
$R_4$	tg-RRRR-L
$R_5$	tg-RRRRR-L
$R_6$	tg-RRRRRR-L
$R_7$	tg-RRRRRRR-L

R <sub>8</sub>	tg-RRRRRRRR-L
R <sub>5</sub> GR <sub>4</sub>	tg-RRRRRGRRRR-L
R <sub>5</sub> F <sub>2</sub> R <sub>4</sub>	tg-RRRRRFFRRRR-L
Tat	tg-RKKRRQRRR-L
rTat	tg-RRRQRRKKR-L
	R $\alpha$ RR $\alpha$ R-L
	R $\beta$ RR $\beta$ R-L
	R $\alpha$ RR $\beta$ R-L
	R $\beta$ RR $\alpha$ R-L
	R $\alpha$ RY <sup>b</sup> R $\alpha$ R-L
	R $\beta$ RY <sup>b</sup> R $\beta$ R-L
	R $\alpha$ RY <sup>b</sup> R $\beta$ R-L
	R $\beta$ RY <sup>b</sup> R $\alpha$ R-L
	R $\alpha$ RILFQYR $\alpha$ R-L
	R $\beta$ RILFQYR $\beta$ R-L
	R $\alpha$ RILFQYR $\beta$ R-L
	R $\beta$ RILFQYR $\alpha$ R-L
	R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ R-L
	R $\beta$ RR $\beta$ RR $\beta$ R-L
	R $\alpha$ RR $\beta$ RR $\alpha$ R-L
	R $\alpha$ RR $\beta$ RR $\beta$ R-L
	R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\beta$ R-L
	R $\beta$ RR $\alpha$ RR $\beta$ R-L
	R $\beta$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ R-L
	R $\beta$ RR $\beta$ RR $\alpha$ R-L
	R $\alpha$ RY <sup>b</sup> R $\alpha$ RR $\alpha$ R-L
	R $\alpha$ RR $\alpha$ RY <sup>b</sup> R $\alpha$ R-L
	R $\alpha$ RILFQYR $\alpha$ RR $\alpha$ R-L
	R $\alpha$ RR $\alpha$ RILFQYR $\alpha$ R-L
	R $\alpha$ RY <sup>b</sup> R $\alpha$ RY <sup>b</sup> R $\alpha$ R-L
	R $\alpha$ RILFQYR $\alpha$ RILFQYR $\alpha$ R-L
	R $\alpha$ RILFQYR $\alpha$ RY <sup>b</sup> R $\alpha$ R-L
	R $\alpha$ RY <sup>b</sup> R $\alpha$ RILFQYR $\alpha$ R-L
	R $\beta$ RY <sup>b</sup> R $\beta$ RR $\beta$ R-L
	R $\beta$ RR $\beta$ RY <sup>b</sup> R $\beta$ R-L

$R\beta RILFQYR\beta RR\beta R-L$   
 $R\beta RR\beta RILFQYR\beta R-L$   
 $R\beta RYR\beta RY^b R\beta R-L$   
 $R\beta RILFQYR\beta RILFQYR\beta R-L$   
 $R\beta RY^b R\beta RILFQYR\beta R-L$   
 $R\beta RILFQYR\beta RY^b R\beta R-L$   
 $R\alpha RY^b R\beta RR\alpha R-L$   
 $R\alpha RR\beta RY^b R\alpha R-L$   
 $R\alpha RILFQYR\beta RR\alpha R-L$   
 $R\alpha RR\beta RILFQYR\alpha R-L$   
 $R\alpha RY^b R\beta RY^b R\alpha R-L$   
 $R\alpha RILFQYR\beta RILFQYR\alpha R-L$   
 $R\alpha RY^b R\beta RILFQYR\alpha R-L$   
 $R\alpha RILFQYR\beta RY^b R\alpha R-L$   
 $R\alpha RY^b R\beta RR\beta R-L$   
 $R\alpha RR\beta RY^b R\beta R-L$   
 $R\alpha RILFQYR\beta RR\beta R-L$   
 $R\alpha RR\beta RILFQYR\beta R-L$   
 $R\alpha RY^b R\beta RY^b R\beta R-L$   
 $R\alpha RILFQYR\beta RILFQYR\beta R-L$   
 $R\alpha RY^b R\beta RILFQYR\beta R-L$   
 $R\alpha RILFQYR\beta RY^b R\beta R-L$   
 $R\alpha RY^b R\alpha RR\beta R-L$   
 $R\alpha RR\alpha RY^b R\beta R-L$   
 $R\alpha RILFQYR\alpha RR\beta R-L$   
 $R\alpha RR\alpha RILFQYR\beta R-L$   
 $R\alpha RY^b R\alpha RY^b R\beta R-L$   
 $R\alpha RILFQYR\alpha RILFQYR\beta R-L$   
 $R\alpha RY^b R\alpha RILFQYR\beta R-L$   
 $R\alpha RILFQYR\alpha RY^b R\beta R-L$   
 $R\beta RY^b R\alpha RR\beta R-L$   
 $R\beta RR\alpha RY^b R\beta R-L$   
 $R\beta RILFQYR\alpha RR\beta R-L$   
 $R\beta RR\alpha RILFQYR\beta R-L$   
 $R\beta RY^b R\alpha RY^b R\beta R-L$

$R\beta RILFQYR\alpha RILFQYR\beta R-L$   
 $R\beta RY^b R\alpha RILFQYR\beta R-L$   
 $R\beta RILFQYR\alpha RY^b R\beta R-L$   
 $R\beta RY^b R\alpha RR\alpha R-L$   
 $R\beta RR\alpha RY^b R\alpha R-L$   
 $R\beta RILFQYR\alpha RR\alpha R-L$   
 $R\beta RR\alpha RILFQYR\alpha R-L$   
 $R\beta RY^b R\alpha RY^b R\alpha R-L$   
 $R\beta RILFQYR\alpha RILFQYR\alpha R-L$   
 $R\beta RY^b R\alpha RILFQYR\alpha R-L$   
 $R\beta RILFQYR\alpha RY^b R\alpha R-L$   
 $R\beta RY^b R\beta RR\alpha R-L$   
 $R\beta RR\beta RY^b R\alpha R-L$   
 $R\beta RILFQYR\beta RR\alpha R-L$   
 $R\beta RR\beta RILFQYR\alpha R-L$   
 $R\beta RY^b R\beta RY^b R\alpha R-L$   
 $R\beta RILFQYR\beta RILFQYR\alpha R-L$   
 $R\beta RY^b R\beta RILFQYR\alpha R-L$   
 $R\beta RILFQYR\beta RY^b R\alpha R-L$   
 $R\alpha RR\alpha RR\alpha RR\alpha R-L$   
 $R\alpha RR\beta RR\alpha RILFQYR\alpha R\beta R\alpha R-L$   
 $R\alpha RR\beta RR\alpha RR\beta R-L$   
 $YGRKKRRQRRRP-L$   
 $R\alpha RR\alpha RR\alpha RR\alpha R\alpha\beta ASSLNIA\alpha C-L$   
 $R\alpha RR\beta RR\alpha RILFQYR\alpha R\beta R\alpha R\beta ASSLNIA\alpha C-L$   
 $R\alpha RR\beta RR\alpha RASSLNIA R\alpha R\beta R\alpha R\beta C-L$   
 $R\alpha RR\beta RR\alpha RR\beta R\alpha\beta ASSLNIA-L$   
 $THRPPMWSPVWP-L$   
 $HRPPMWSPVWP-L$   
 $THRPPMWSPV-L$   
 $THRPPMWSP-L$   
 $THRPPMWSPVFP-L$   
 $THRPPMWSPVYP-L$   
 $THRPPMWSPA WP-L$   
 $THRPPMWSP LWP-L$

THRPPMWSPIWP-L  
THRPPMWTPVVWP-L  
THRPPMFSPVWP-L  
THRPPMWS-L  
HRPPMWSPVW-L  
THRPPMYSVWP-L  
THRPPnleWSPVWP-L (nle=норлейцин)  
THKPPMWSPVWP-L  
SHRPPMWSPVWP-L  
STFTHPR-L  
YDIDNRR-L  
AYKPVGR-L  
HAIYPRH-L  
HTPNSTH-L  
ASSPVHR-L  
SSLPLRK-L  
KKRS-L  
KRSK-L  
KKRSK-L  
KSRK-L  
SRKR-L  
RKRK-L  
KSRKR-L  
QHPPWRV-L  
THPPTTH-L  
YKHTPTT-L  
QGMHRGT-L  
SRKRK-L  
KSRKRK-L  
PKKKRKV-L  
GKKRSKV-L  
KSRKRKL-L  
HSPSKIP-L  
HMATFHY-L  
AQPnkfk-L

NLTRLHT-L

KKKR-L

KKRK-L

KKKRK-L

RRRRRRQIKIWFQNRRMKWKKGGC-L

RRRRRRRQIKIWFQNRRMKWKKGGC-L

RQIKIWFQNRRMKWKKGGC-L

RRRRRRRQIKIWFQNRRMKWKKC-L

R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RRQIKIWFQNRRMKWKKGGC-L

RRRRRRRQIKILFQNR $\alpha$ R $\alpha$ R $\alpha$ R $\alpha$ C-L

R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RC-L

R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ R $\alpha$ C-L

R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIKILFQNRRMKWKKGGC-L

R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIKILFQNRRMKWKKC-L

R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIKILFQNRMKWKKC-L

R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIKILFQN $\alpha$ RMKWKKC-L

R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIKILFQNRMKWKKC-L

R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIKILFQN $\alpha$ RMKWKKC-L

R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIKILFQN $\alpha$ RMKWKKC-L

R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIKILFQN $\alpha$ RMKWKAC-L

R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIKILFQN $\alpha$ RMKWHKAC-L

R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIKILFQN $\alpha$ RMKWHRC-L

R $\alpha$ R $\alpha$ R $\alpha$ R $\alpha$ RIKILFQNRRMKWKKC-L

RARARARARIKILFQNRRMKWKKC-L

R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RI $\alpha$ ILFQN $\alpha$ RMKWHKAC-L

R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIHILFQN $\alpha$ RMKWHKAC-L

R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIRILFQN $\alpha$ RMKWHKAC-L

R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RI $\alpha$ ILFQY $\alpha$ RMKWHKAC-L

R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RLYSPLSFQ $\alpha$ RMKWHKAC-L

R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RISILFQY $\alpha$ RMKWHKAC-L

R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RILFQY $\alpha$ RMKWHKAC-L

R $\alpha$ RR $\alpha$ RI $\alpha$ ILFQY $\alpha$ RMKWHKAC-L

R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RIHILFQY $\alpha$ RMKWHKAC-L

RARR $\alpha$ RRARIHILFQY $\alpha$ RMKWHKAC-L

R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIHILFQY $\alpha$ RMKWHKAC-L

R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RI $\alpha$ ILFQN $\alpha$ RMKWHKAC-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIHILFQN $\alpha$ RMKWHKAC-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIKILFQNRRMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIKILFQN $\alpha$ RMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RI $\alpha$ ILFQNRRMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RI $\alpha$ ILFQN $\alpha$ RMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIHILFQNRRMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIHILFQN $\alpha$ RMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIRILFQNRRMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIRILFQN $\alpha$ RMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIILFQNRRMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIILFQN $\alpha$ RMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RKILFQNRRMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RKILFQN $\alpha$ RMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ R $\alpha$ ILFQNRRMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ R $\alpha$ ILFQN $\alpha$ RMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RHILFQNRRMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RHILFQN $\alpha$ RMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RRILFQNRRMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RRILFQN $\alpha$ RMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RILFQNRRMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RILFQN $\alpha$ RMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIKILFQYRRMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIKILFQY $\alpha$ RMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RI $\alpha$ ILFQYRRMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RI $\alpha$ ILFQY $\alpha$ RMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIHILFQYRRMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIHILFQY $\alpha$ RMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIRILFQYRRMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIRILFQY $\alpha$ RMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIILFQYRRMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RIILFQY $\alpha$ RMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RKILFQYRRMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RKILFQY $\alpha$ RMKWHK-L  
R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ R $\alpha$ ILFQYRRMKWHK-L

$R\alpha RR\alpha RR\alpha R\alpha ILFQY\alpha RMKWHK-L$   
 $R\alpha RR\alpha RR\alpha RHILFQYRRMKWHK-L$   
 $R\alpha RR\alpha RR\alpha RHILFQY\alpha RMKWHK-L$   
 $R\alpha RR\alpha RR\alpha RRILFQYRRMKWHK-L$   
 $R\alpha RR\alpha RR\alpha RRILFQY\alpha RMKWHK-L$   
 $R\alpha RR\alpha RR\alpha RILFQYRRMKWHK-L$   
 $R\alpha RR\alpha RR\alpha RILFQY\alpha RMKWHK-L$   
 $R\alpha RR\alpha RR\alpha R-L$   
 $R\alpha RR\alpha RR\alpha RR\alpha R-L$   
 $RARRAR-L$   
 $RARRARRAR-L$   
 $RARRARRARRAR-L$   
 $R\alpha RR\alpha RI-L$   
 $R\alpha RRARR\alpha R-L$   
 $RARR\alpha RRAR-L$   
 $RRRRR-L$   
 $RRRRRR-L$   
 $RRRRRRR-L$   
 $R\alpha RR\alpha RR\alpha RR\alpha RC-L$   
 $R\alpha RR\alpha RR\alpha RR\alpha R\alpha C-L$   
 $R\alpha RR\alpha RR\alpha RIKILFQNRRMKWKKGGC-L$   
 $R\alpha RR\alpha RR\alpha RIKILFQNRRMKWKKC-L$   
 $R\alpha RR\alpha RR\alpha RIKILFQNRMKWKKC-L$   
 $R\alpha RR\alpha RR\alpha RIKILFQN\alpha RMKWKKC-L$   
 $R\alpha RR\alpha RR\alpha RIKILFQNRHRMKWKKC-L$   
 $R\alpha RR\alpha RR\alpha RIKILFQN\alpha RMKWKKC-L$   
 $R\alpha RR\alpha RR\alpha RIKILFQN\alpha RMKWKKC-L$   
 $R\alpha RR\alpha RR\alpha RIKILFQN\alpha RMKWKAC-L$   
 $R\alpha RR\alpha RR\alpha RIKILFQN\alpha RMKWHKAC-L$   
 $R\alpha RR\alpha RR\alpha RIKILFQN\alpha RMKWHRC-L$   
 $R\alpha R\alpha R\alpha R\alpha RIKILFQNRRMKWKKC-L$   
 $RARARARARIKILFQNRRMKWKKC-L$   
 $R\alpha RR\alpha RR\alpha RI\alpha ILFQN\alpha RMKWHKAC-L$   
 $R\alpha RR\alpha RR\alpha RIHILFQN\alpha RMKWHKAC-L$   
 $R\alpha RR\alpha RR\alpha RIRILFQN\alpha RMKWHKAC-L$

R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RI $\alpha$ ILFQ $\alpha$ RMKWHKAC-L  
 R $\alpha$ RR $\alpha$ RR $\alpha$ RLYSPLSFQ $\alpha$ RMKWHKAC-L  
 RRMKWHK-L  
 $\alpha$ RMKWHK-L  
 $\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha$ ILFQ $\alpha$ RMKWHK-L  
 $\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha$ ILFQ $\alpha$ RMKWHK-L  
 RRRRRRRQIKILFQNPKKKRKVGGC-L  
 HHHFRRRRRRRRRFFC-L  
 HHHHHRRRRRRRRRRFFC-L  
 HHHHHHFRRRRRRRRRFFC-L  
 HHHHH $\alpha$ RRRRRRRRRRFFC-L  
 HHHHHH $\alpha$ FFRRRRRRRRRRFFC-L  
 HHH $\alpha$ RRRRRRRRRRFF $\alpha$ HHHC-L  
 $\alpha$ RMKWHK-L  
 $\alpha$ RWKWHK-L  
 R $\alpha$ RAR $\alpha$ R-L  
 R $\alpha$ R $\alpha$ R $\alpha$ R-L  
 RAR $\alpha$ RAR-L  
 R $\alpha$ RAR-L  
 $\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha$ ILFQ $\alpha$ HMKWHK-L  
 $\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha$ ILFQ $\alpha$ RWKWHK-L  
 $\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha$ ILFQ $\alpha$ HWKWHK-L  
 $\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha$ ILFQ $\alpha$ R $\alpha$ RAR $\alpha$ R-L  
 $\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha$ ILFQ $\alpha$ R $\alpha$ R $\alpha$ R $\alpha$ R-L  
 $\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha$ ILFQ $\alpha$ R $\alpha$ RR $\alpha$ R-L  
 $\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha$ ILFQ $\alpha$ RAR $\alpha$ RAR-L  
 $\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha$ ILFQ $\alpha$ R $\alpha$ RAR $\alpha$ R-L  
 $\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha$ ILFQ $\alpha$ R $\alpha$ RAR-L  
 $\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha$ ILIQ $\alpha$ RMKWHK-L  
 $\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha$ ILIQ $\alpha$ HMKWHK-L  
 $\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha$ ILIQ $\alpha$ RWKWHK-L  
 $\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha$ ILIQ $\alpha$ HWKWHK-L  
 $\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha$ ILIQ $\alpha$ R $\alpha$ RAR $\alpha$ R-L  
 $\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha$ ILIQ $\alpha$ R $\alpha$ R $\alpha$ R $\alpha$ R-L  
 $\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha$ ILIQ $\alpha$ R $\alpha$ RR $\alpha$ R-L



RARR $\alpha$ RRARILFQY $\alpha$ RMKWHKAC-L  
 R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RILFQY $\alpha$ RMKWHKAC-L  
 R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RILFQY $\alpha$ HMKWHKAC-L  
 R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RILFQY $\alpha$ RMKWHKAC-L  
 R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RILFQY $\alpha$ RWKWHKAC-L  
 R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RILFQY $\alpha$ HWKWHKAC-L  
 R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RILFQYR $\alpha$ RAR $\alpha$ RAC-L  
 R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RILFQYR $\alpha$ R $\alpha$ R $\alpha$ RAC-L  
 R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RILIQY $\alpha$ RMKWHKAC-L  
 R $\alpha$ RR $\alpha$ RILFQYR $\alpha$ RR $\alpha$ RC-L  
 R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RILFQYR $\alpha$ RAR $\alpha$ RAC-L  
 R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RILFQYR $\alpha$ R $\alpha$ R $\alpha$ RAC-L  
 R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RILIQY $\alpha$ RMKWHKAC-L  
 R $\alpha$ RR $\alpha$ RILFQYR $\alpha$ RR $\alpha$ RCYS-L  
 RARR $\alpha$ RRARILFQYRAR $\alpha$ RARAC-L  
 RARR $\alpha$ RRARILFQYR $\alpha$ RAR $\alpha$ RAC-L  
 RARR $\alpha$ RRARILFQYR $\alpha$ RR $\alpha$ RAC-L  
 RARR $\alpha$ RRARILFQYR $\alpha$ RAR $\alpha$ AC-L  
 R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RILFQYR $\alpha$ RR $\alpha$ RAC-L  
 R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RILFQYR $\alpha$ RAR $\alpha$ AC-L  
 R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RIHILFQN $\alpha$ RMKWHKAC-L  
 R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RRAR $\alpha$ AC-L  
 R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RILFQY $\alpha$ HMKWHK-L  
 R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RILFQY $\alpha$ RMKWHK-L  
 R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RILFQY $\alpha$ RWKWHK-L  
 R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RILFQY $\alpha$ RMKWHK-L  
 R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RILFQYR $\alpha$ RAR $\alpha$ R-L  
 R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RILFQYR $\alpha$ R $\alpha$ R $\alpha$ R-L  
 R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RILFQYR $\alpha$ RR $\alpha$ R-L  
 R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RILFQYRAR $\alpha$ RAR-L  
 R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RILFQYR $\alpha$ RAR-L  
 R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RILIQY $\alpha$ HMKWHK-L  
 R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RILIQY $\alpha$ RMKWHK-L  
 R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RILIQY $\alpha$ RWKWHK-L  
 R $\alpha$ RRARR $\alpha$ RILIQY $\alpha$ RMKWHK-L

$R\alpha RRARR\alpha RILIQYR\alpha RAR\alpha R-L$   
 $R\alpha RRARR\alpha RILIQYR\alpha R\alpha R\alpha R-L$   
 $R\alpha RRARR\alpha RILIQYR\alpha RR\alpha R-L$   
 $R\alpha RRARR\alpha RILIQYRAR\alpha RAR-L$   
 $R\alpha RRARR\alpha RILIQYR\alpha RAR-L$   
 $RARR\alpha RRARILFQY\alpha HMKWHK-L$   
 $RARR\alpha RRARILFQY\alpha RMKWHK-L$   
 $RARR\alpha RRARILFQY\alpha RWKWHK-L$   
 $RARR\alpha RRARILFQY\alpha RMKWHK-L$   
 $RARR\alpha RRARILFQYR\alpha RAR\alpha R-L$   
 $RARR\alpha RRARILFQYR\alpha R\alpha R\alpha R-L$   
 $RARR\alpha RRARILFQYR\alpha RR\alpha R-L$   
 $RARR\alpha RRARILFQYRAR\alpha RAR-L$   
 $RARR\alpha RRARILFQYR\alpha RAR-L$   
 $RARR\alpha RRARILIQY\alpha HMKWHK-L$   
 $RARR\alpha RRARILIQY\alpha RMKWHK-L$   
 $RARR\alpha RRARILIQY\alpha RWKWHK-L$   
 $RARR\alpha RRARILIQY\alpha RMKWHK-L$   
 $RARR\alpha RRARILIQYR\alpha RAR\alpha R-L$   
 $RARR\alpha RRARILIQYR\alpha R\alpha R\alpha R-L$   
 $RARR\alpha RRARILIQYR\alpha RR\alpha R-L$   
 $RARR\alpha RRARILIQYRAR\alpha RAR-L$   
 $RARR\alpha RRARILIQYR\alpha RAR-L$   
 $R\alpha RR\alpha RILFQY\alpha HMKWHK-L$   
 $R\alpha RR\alpha RILFQY\alpha RMKWHK-L$   
 $R\alpha RR\alpha RILFQY\alpha RWKWHK-L$   
 $R\alpha RR\alpha RILFQY\alpha RMKWHK-L$   
 $R\alpha RR\alpha RILFQYR\alpha RAR\alpha R-L$   
 $R\alpha RR\alpha RILFQYR\alpha R\alpha R\alpha R-L$   
 $R\alpha RR\alpha RILFQYR\alpha RR\alpha R-L$   
 $R\alpha RR\alpha RILFQYRAR\alpha RAR-L$   
 $R\alpha RR\alpha RILFQYR\alpha RAR-L$   
 $R\alpha RR\alpha RILIQY\alpha HMKWHK-L$   
 $R\alpha RR\alpha RILIQY\alpha RMKWHK-L$   
 $R\alpha RR\alpha RILIQY\alpha RWKWHK-L$

$R\alpha RR\alpha RILIQY\alpha RMKWHK-L$   
 $R\alpha RR\alpha RILIQYR\alpha RAR\alpha R-L$   
 $R\alpha RR\alpha RILIQYR\alpha R\alpha R\alpha R-L$   
 $R\alpha RR\alpha RILIQYR\alpha RR\alpha R-L$   
 $R\alpha RR\alpha RILIQYR\alpha RAR\alpha RAR-L$   
 $R\alpha RR\alpha RILIQYR\alpha RAR-L$   
 $PRP\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha PRG-L$   
 $RRRRRRRR-L$   
 $RRMKWKK-L$   
 $PKKKRKV-L$   
 $CKDEPQRRSARLSAKPAPPKPEPKPKKAPAKK-L$   
 $RKKRRQRRR-L$   
 $RKKRRQRR-L$   
 $RKKRRQR-L$   
 $KKRRQRRR-L$   
 $KKRRQRRR-L$   
 $AKKRRQRRR-L$   
 $RAKRRQRRR-L$   
 $RKARRQRRR-L$   
 $RKKARQRRR-L$

L=является таким, как указано в формуле (I) и как описано в тексте описания;  $\beta=3$ -аланин;  $\alpha=6$ -аминогексановая кислота; tg=немодифицированный аминоконец или аминоконец, кэпированный с помощью ацетильной, бензоильной или стеароильной группы (т. е. ацетиламид, бензоиламид или стеароиламид), и Y представляет собой NH-(CHR)-C(O)-, где n составляет от 2 до 7, и каждый R независимо в каждом случае представляет собой водород или метил. В целях упрощения не все последовательности указаны с концевой группой td; однако каждая из вышеупомянутых последовательностей может содержать немодифицированный аминоконец или аминоконец, кэпированный с помощью ацетильной, бензоильной или стеароильной группы.

#### VI. Фармацевтические композиции

В настоящем изобретении также предусмотрены состав и доставка раскрытых антисмысловых олигомеров. Соответственно, одним из аспектов настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая антисмысловые олигомеры, раскрытые в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

Эффективная доставка антисмысловых олигомеров к целевой нуклеиновой кислоте является важным аспектом лечения. Пути доставки антисмысловых олигомеров включают

без ограничения различные системные пути, включая пероральный и парентеральный пути, например, внутривенный, подкожный, внутривнутрибрюшинный и внутримышечный, а также ингаляционную, трансдермальную и местную доставку. Подходящий путь может быть определен специалистом в данной области техники в зависимости от состояния субъекта, подлежащего лечению. Например, подходящим путем доставки антисмыслового олигомера в лечении вирусной инфекции кожи является местная доставка, тогда как доставка антисмыслового олигомера для лечения вирусной респираторной инфекции может являться внутривенной или ингаляционной. Антисмысловый олигомер также может быть доставлен непосредственно в любой конкретный участок вирусной инфекции.

Антисмысловый олигомер можно вводить в любой подходящей среде-носителе, которая является физиологически и/или фармацевтически приемлемой. Такая композиция может включать любой из ряда стандартных фармацевтически приемлемых носителей, применяемых специалистами в данной области техники. Примеры включают без ограничения солевой раствор, фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), воду (например, стерильную воду для инъекций), водный этанол, эмульсии, такие как эмульсии типа «масло в воде», или триглицеридные эмульсии, таблетки и капсулы. Выбор подходящего физиологически приемлемого носителя будет варьировать в зависимости от выбранного способа введения.

Соединения согласно настоящему изобретению (например, антисмысловый олигомер) в целом можно применять в качестве свободной кислоты или свободного основания. В качестве альтернативы соединения по настоящему изобретению можно применять в форме солей присоединения кислоты или основания. Соли присоединения кислоты свободных аминокислот можно получать с помощью способов, хорошо известных из уровня техники, и они могут образовываться из органических и неорганических кислот. Подходящие органические кислоты включают малеиновую, фумаровую, бензойную, аскорбиновую, янтарную, метансульфоновую, уксусную, трифторуксусную, щавелевую, пропионовую, винную, салициловую, лимонную, глюконовую, молочную, миндальную, коричную, аспарагиновую, стеариновую, пальмитиновую, гликолевую, глутаминовую и бензолсульфоновую кислоты. Подходящие неорганические кислоты включают хлористоводородную, бромистоводородную, серную, фосфорную и азотную кислоты. Соли присоединения основания включали соли, которые образуются с помощью карбоксилатного аниона и включают соли, образованные с помощью органических и неорганических катионов, таких как выбранные из щелочных и щелочноземельных металлов (например, лития, натрия, калия, магния, бария и кальция), а также иона аммония и его замещенных производных (например, дибензиламмония, бензиламмония, 2-гидроксиэтиламмония и т. п.). Таким образом, термин «фармацевтически приемлемая соль» структуры (I) предназначен охватывать все возможные приемлемые формы солей.

Кроме того, в контекст настоящего изобретения также включены пролекарства. Пролекарства представляют собой любые ковалентно связанные носители, которые

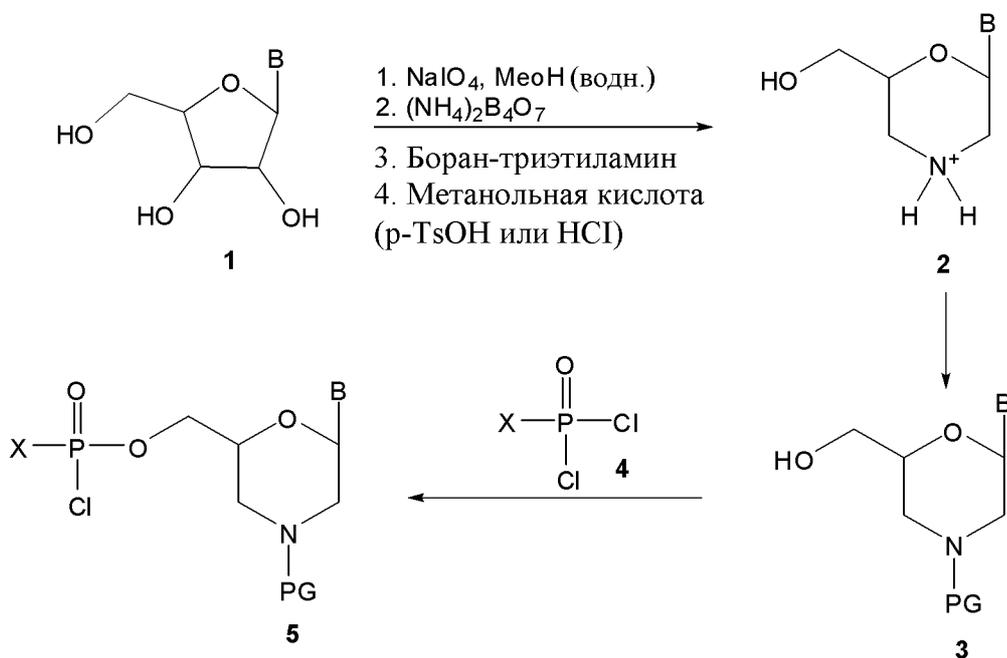
обеспечивают высвобождение соединения структуры (I) *in vivo*, если такое пролекарство вводится пациенту. Пролекарства в целом получают с помощью модифицирующих функциональных групп таким образом, чтобы модификация отщеплялась, либо путем обычной манипуляции, либо *in vivo*, с получением исходного соединения. Пролекарства включают, например, соединения по настоящему изобретению, где гидроксид-, аминная или сульфгидрильная группы связаны с любой группой, которая при введении пациенту отщепляется с образованием гидроксид-, аминной или сульфгидрильной групп. Таким образом, иллюстративные примеры пролекарств включают (без ограничения) ацетатные, формиатные и бензоатные производные спиртовых и аминных функциональных групп соединений структуры (I). Дополнительно, в случае карбоновой кислоты (-COOH) могут применяться сложные эфиры, такие как сложные метиловые эфиры, сложные этиловые эфиры и т. п.

## VII. Способы получения

### Получение олигомеров с основными азотными межнуклеозидными линкерами

Морфолиновые субъединицы, модифицированные межсубъединичные связи и олигомеры, содержащие их, можно получать, как описано, например, в патентах США №№ 5185444 и 7943762, которые включены посредством ссылки во всей своей полноте. Морфолиновые субъединицы можно получать в соответствии со следующей общей схемой реакции 1.

Схема реакции 1. Получение морфолиновой субъединицы



Ссылаясь на схему реакции 1, где В представляет собой фрагмент, представляющий собой спаривающиеся основания, и PG представляет собой защитную группу, морфолиновые субъединицы могут быть получены из соответствующего рибонуклеозида (1), как это показано. Морфолиновая субъединица (2) может быть необязательно защищена реакцией с подходящим предшественником защитной группы, например тритилхлоридом. 3'-Защитную группу обычно удаляют во время твердофазного синтеза олигомера, как более

подробно описано ниже. Фрагмент, представляющий собой спаренные основания, может быть подходящим образом защищен для твердофазного синтеза олигомеров. Подходящие защитные группы включают бензоил для аденина и цитозина, фенилацетил для гуанина и пивалоилоксиметил для гипоксантина (I). Пивалоилоксиметильная группа может быть введена в положение N1 гипоксантинового гетероциклического основания. Хотя можно использовать незащищенную гипоксантиновую субъединицу, выходы в реакциях активации намного выше, когда основание защищено. Другие подходящие защитные группы включают группы, раскрытые в патенте США № 8076476, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Реакция **3** с активированным соединением фосфора **4** приводит к образованию морфолиновых субъединиц, содержащих необходимый связующий фрагмент **5**. Соединения структуры **4** можно получать с применением любого количества способов, известных специалистам в данной области. Например, такие соединения можно получать с помощью реакции соответствующего амина и оксихлорида фосфора. В данном отношении аминный исходный материал может быть получен с применением любого способа, известного из уровня техники, например, способов, описанных в примерах и в патенте США № 7943762.

Соединения структуры **5** можно использовать в твердофазном автоматизированном синтезе олигомеров для получения олигомеров, содержащих межсубъединичные связи. Такие способы хорошо известны в данной области техники. Вкратце, соединение структуры **5** может быть модифицировано на 5'-конце, чтобы оно содержало линкер для связи с твердой подложкой. Например, соединение **5** может быть связано с твердой подложкой линкером. После нанесения защитную группу (например, тритил) удаляют, и свободный амин вступает в реакцию с активированным фосфорным фрагментом второго соединения структуры **5**. Эту последовательность действий повторяют до тех пор, пока не будет получен олигомер желаемой длины. Защитная группа в 5'-концевой области может быть удалена или оставлена, если 5'-модификация является необходимой.

Получение модифицированных морфолиновых субъединиц и морфолиновых олигомеров более подробно описано в примерах. Морфолиновые олигомеры, содержащие любое количество модифицированных связей, можно получать с применением способов, описанных в данном документе, способов, известных из уровня техники, и/или описанных в данном документе посредством ссылки. Также в примерах описаны глобальные модификации морфолиновых олигомеров, полученных, как описано ранее (см., например, публикацию согласно РСТ WO 2008/036127).

Синтез РМО, РМО+, РРМО и РМО-Х, содержащих дополнительные модификации связей, описанные в данном документе, осуществляли с применением способов, известных в данной области техники и описанных в заявках на патент США, находящихся на рассмотрении, №№ 8299206 и 8076476 и публикациях согласно РСТ под номерами WO 2009/064471, WO 2011/150408 и WO 2012/150960, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

**РМО с 3'-тритильной модификацией синтезируют по сути так, как описано в публикации согласно РСТ под номером WO 2009/064471, за исключением того, что стадию детритилирования пропускают.**

#### VIII. Способы лечения

В данном документе предусмотрен способ повышения экспрессии mRNA и/или белка GAA, содержащих экзон 2, с применением антисмысловых олигомеров по настоящему изобретению для терапевтических целей (например, лечения субъектов с GSD-II). Способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антисмыслового олигомера, раскрытого в данном документе, или фармацевтической композиции на его основе. В одном варианте осуществления заболевание представляет собой болезнь Помпе. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер, содержащий нуклеотидную последовательность достаточной длины и комплементарности для специфической гибридизации с областью pre-mRNA гена кислой альфа-глюкозидазы (GAA), где связывание антисмыслового олигомера с указанной областью обеспечивает повышение уровня mRNA GAA, содержащей экзон 2, в клетке и/или ткани субъекта. Иллюстративные антисмысловые нацеливающие последовательности показаны в таблицах 6A-6C в данном документе.

Также включены антисмысловые олигомеры для применения в получении лекарственного препарата для лечения болезни накопления гликогена II типа (GSD-II; болезнь Помпе), содержащие нуклеотидную последовательность достаточной длины и комплементарности для специфической гибридизации с областью pre-mRNA гена кислой альфа-глюкозидазы (GAA), где связывание антисмыслового олигомера с областью обеспечивает повышение уровня mRNA GAA, содержащей экзон 2.

В некоторых вариантах осуществления способа лечения GSD-II или лекарственного препарата для лечения GSD-II соединение, представляющее собой антисмысловой олигомер, предусматривает:

антисмысловой олигомер, который составляет 18-40 субъединиц в длину, при этом он содержит нацеливающую последовательность, комплементарную целевой области в пределах интрона 1 (SEQ ID NO: 1) pre-mRNA гена кислой альфа-глюкозидазы (GAA) человека, где

каждая субъединица антисмысловых олигомеров содержит нуклеиновое основание или представляет собой субъединицу с удаленным азотистым основанием;

по меньшей мере одна субъединица представляет собой субъединицу с удаленным азотистым основанием; и

где нацеливающая последовательность, за исключением субъединицы или субъединиц с удаленным азотистым основанием, на по меньшей мере 80% комплементарна целевой области. В некоторых вариантах осуществления способа лечения GSD-II или лекарственного препарата для лечения GSD-II соединение, представляющее собой антисмысловой олигомер, предусматривает:

антисмысловой олигомер, который составляет 18-40 субъединиц в длину, при этом

он содержит нацеливающую последовательность, комплементарную целевой области в пределах интрона 1 (SEQ ID NO: 1) pre-mRNA гена кислой альфа-глюкозидазы (GAA) человека, где

антисмысловой олигонуклеотид предусматривает морфолиновый олигомер;

каждая субъединица антисмыслового олигонуклеотида содержит нуклеиновое основание или представляет собой субъединицу с удаленным азотистым основанием, при этом каждая субъединица, взятая в совокупности в порядке от 5'-конца антисмыслового олигонуклеотида до 3'-конца антисмыслового олигонуклеотида, образует нацеливающую последовательность;

по меньшей мере одна субъединица представляет собой субъединицу с удаленным азотистым основанием; и

где нацеливающая последовательность, за исключением субъединицы или субъединиц с удаленным азотистым основанием, на по меньшей мере 80% комплементарна целевой области.

В некоторых вариантах осуществления способа лечения GSD-II или лекарственного препарата для лечения GSD-II соединение, представляющее собой антисмысловой олигомер, предусматривает:

модифицированный антисмысловой олигонуклеотид, который составляет 18-40 субъединиц в длину, содержащий нацеливающую последовательность, комплементарную целевой области в пределах интрона 1 (SEQ ID NO: 1) pre-mRNA гена кислой альфа-глюкозидазы (GAA) человека, при этом

антисмысловой олигонуклеотид предусматривает морфолиновый олигомер;

антисмысловой олигонуклеотид ковалентно связан с проникающим в клетку пептидом;

каждая субъединица антисмыслового олигонуклеотида содержит нуклеиновое основание или представляет собой субъединицу с удаленным азотистым основанием, при этом каждая субъединица, взятая в совокупности в порядке от 5'-конца антисмыслового олигонуклеотида до 3'-конца антисмыслового олигонуклеотида, образует нацеливающую последовательность;

по меньшей мере одна субъединица представляет собой субъединицу с удаленным азотистым основанием; и

где нацеливающая последовательность, за исключением субъединицы или субъединиц с удаленным азотистым основанием, на по меньшей мере 80% комплементарна целевой области.

Как указано выше, «GSD-II» относится к болезни накопления гликогена II типа (GSD-II или болезнь Помпе), аутосомному рецессивному заболеванию человека, которое часто характеризуется недостаточной экспрессией белка GAA у пораженных индивидуумов. Включены субъекты, у которых имеется младенческая форма GSD-II, и у которых имеются формы заболевания с поздним началом.

В определенных вариантах осуществления субъект характеризуется пониженной

экспрессией и/или активностью белка GAA в одной или более тканях (например, по сравнению со здоровым субъектом или более ранним моментом времени), включая ткани сердца, скелетных мышц, печени и нервной системы. В некоторых вариантах осуществления субъект характеризуется повышенным накоплением гликогена в одной или более тканях (например, по сравнению со здоровым субъектом или более ранним моментом времени), включая ткани сердца, скелетных мышц, печени и нервной системы. В конкретных вариантах осуществления у субъекта имеется по меньшей мере одна мутация IVS1-13T>G (также называемая с.336-13T>G), возможно в комбинации с другой(-ими) мутацией(-ями), которая(-ые) приводит(-ят) к пониженной экспрессии функционального белка GAA. Краткое описание молекулярного генетического тестирования, применяемого при GSD-II, показано в таблице 5 ниже.

<b>Таблица 5</b>				
<b>Символ гена</b>	<b>Способ тестирования</b>	<b>Обнаруженные мутации</b>	<b>Частота обнаружения мутаций посредством тестируемого способа</b>	<b>Доступность теста</b>
<i>GAA</i>	Анализ последовательности	p.Arg854*	~50% - 60%	Клинический
		p.Asp645Glu	~40% - 80%	
		IVS1-13T>G	~50% - 85%	
		Другие варианты последовательности в гене	83% - 93%	
	Анализ последовательности выбранных экзонов	Варианты последовательности в выбранных экзонах	83% - 93%	
	Анализ целевой мутации	Варианты последовательности в целевых участках	100% вариантов среди целевых мутаций	
	Анализ делеций/дупликаций	Делеции/дупликации в экзонах и полных генах	5% - 13%	

Определенные варианты осуществления относятся к способам повышения экспрессии mRNA или белка GAA, что содержит экзон 2, в клетке, ткани и/или организме субъекта, как описано в данном документе. В некоторых случаях уровень mRNA или белка GAA, содержащего экзон-2, повышается на приблизительно или на по меньшей мере приблизительно 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% по сравнению с контролем, например, контрольными клеткой/субъектом, контрольной композицией без антисмыслового олигомера, отсутствием лечения и/или более ранним моментом времени. Также включены способы поддержания экспрессии

содержащих GAA mRNA или белка относительно уровней здорового контроля.

Некоторые варианты осуществления относятся к способам повышения экспрессии функционального/активного белка GAA в клетке, ткани и/или организме субъекта, как описано в данном документе. В определенных случаях уровень функционального/активного белка GAA повышается на приблизительно или на по меньшей мере приблизительно 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% по сравнению с контролем, например, контрольными клеткой/субъектом, контрольной композицией без антисмыслового олигомера, отсутствием лечения и/или более ранним моментом времени. Также включены способы поддержания экспрессии функционального/активного белка GAA относительно уровней здорового контроля.

Конкретные варианты осуществления относятся к способам уменьшения накопления гликогена в одной или более клетках, тканях и/или организме субъекта, как описано в данном документе. В определенных случаях накопление гликогена уменьшено на приблизительно или на по меньшей мере приблизительно 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% по сравнению с контролем, например, контрольными клеткой/субъектом, контрольной композицией без антисмыслового олигомера, отсутствием лечения и/или более ранним моментом времени. Также включены способы поддержания нормальных или иным образом здоровых уровней гликогена в клетке, ткани и/или организме субъекта (например, бессимптомных уровней или уровней, ассоциированных со сниженной степенью проявления симптомов GSD-II).

Также включены способы снижения степени проявления одного или более симптомов GSD-II у субъекта, нуждающегося в этом. Конкретные примеры включают симптомы младенческой GSD-II, такой как кардиомегалия, гипотония, кардиомиопатия, обструкция выносящего тракта левого желудочка, затруднение дыхания, задержка развития моторики/мышечная слабость и сложности при кормлении/отсутствие прибавки в весе. Дополнительные примеры включают симптомы GSD-II с поздним началом, такие как мышечная слабость (например, слабость скелетных мышц, включая прогрессирующую мышечную слабость), ослабленный кашлевой рефлекс, рецидивирующие инфекции дыхательных путей, гипотония, задержка при достижении стадий моторного развития, трудности при глотании или жевании и пониженная жизненная емкость легких или дыхательная недостаточность.

Антисмысловые олигомеры по настоящему изобретению можно вводить субъектам для лечения (профилактически или терапевтически) GSD-II. В совокупности с таким лечением может рассматриваться фармакогеномика (т. е. исследование взаимосвязи между генотипом индивидуума и ответом этого индивидуума на чужеродное соединение или лекарственное средство). Отличия в метаболизме терапевтических средств могут привести к тяжелой токсичности или терапевтической неудаче путем изменения взаимосвязи между дозой и концентрацией в крови фармакологически активного лекарственного средства.

Таким образом, врач или клиницист может рассмотреть возможность применения знаний, полученных в релевантных исследованиях фармакогеномики при определении того, следует ли вводить терапевтическое средство, а также регулировать дозировку и/или терапевтическую схему лечения с помощью терапевтического средства.

Эффективная доставка антисмыслового олигомера к целевой нуклеиновой кислоте является одним из аспектов лечения. Пути доставки антисмысловых олигомеров включают без ограничения различные системные пути, включая пероральный и парентеральный пути, например, внутривенный, подкожный, внутривентриальный и внутримышечный, а также ингаляционную, трансдермальную и местную доставку. Подходящий путь может быть определен специалистом в данной области техники в зависимости от состояния субъекта, подлежащего лечению. Сосудистый или внесосудистый кровоток, кровеносная или лимфатическая система и спинномозговая жидкость представляют собой некоторые неограничивающие участки, где может быть введена РНК. Можно применять непосредственную доставку в ЦНС, например, в качестве путей введения может применяться внутримозговое желудочковое или интратекальное введение.

В конкретных вариантах осуществления антисмысловой(-ые) олигомер(ы) вводят субъекту с помощью внутримышечной инъекции (ИМ), т. е. его(их) вводят или доставляют внутримышечно. Неограничивающие примеры участков внутримышечной инъекции включают дельтовидную мышцу руки, латеральную широкую мышцу ноги, и вентро-ягодичные мышцы бедер, и верхние наружные квадранты мышц ягодиц. В конкретных вариантах осуществления РМО, РМО-Х или РРМО вводят посредством ИМ.

В определенных вариантах осуществления субъект нуждается в этом по мере накопления гликогена в тканях центральной нервной системы. Примеры включают случаи, при которых патология центральной нервной системы участвует в дефицитах дыхательных путей при GSD-II (см., например, DeRuisseau et al., PNAS USA. 106:9419-24, 2009). Соответственно, антисмысловые олигомеры, описанные в данном документе, можно доставлять в нервную систему субъекта с помощью любого принятого в данной области техники способа, например, если у субъекта имеется GSD-II с поражением ЦНС. Например, инъекция антисмысловых олигомеров по настоящему изобретению в периферическую кровь может применяться для доставки указанных реагентов к периферическим нейронам посредством диффузионных и/или активных средств. В качестве альтернативы антисмысловые олигомеры можно модифицировать с целью облегчения пересечения гематоэнцефалического барьера (БВБ) для достижения доставки указанных реагентов к нейронным клеткам центральной нервной системы (ЦНС). Конкретные недавние достижения в технологии антисмысловых олигомеров и стратегиях доставки расширили сферу применения антисмысловых олигомеров при нейронных нарушениях (см., например, Forte, A., et al. 2005. *Curr. Drug Targets* 6:21-29; Jaeger, L. B., and W. A. Banks. 2005. *Methods Mol. Med.* 106:237-251; Vinogradov, S. V., et al. 2004. *Bioconjug. Chem.* 5:50-60; вышеизложенное включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Например, антисмысловые олигомеры по настоящему изобретению могут быть

получены в виде соединений пептидной нуклеиновой кислоты (PNA). Было установлено, что каждый из реагентов PNA пересекает BBB (Jaeger, L. B., and W. A. Banks. 2005. *Methods Mol. Med.* 106:237-251). Также было описано, что лечение субъекта с помощью, например, вазоактивного средства, способствует транспорту через BBB (*Id*). Присоединение антисмысловых олигомеров по настоящему изобретению к средствам, которые активно транспортируются через BBB, также может применяться в качестве механизма доставки. Введение антисмысловых средств вместе с контрастными средствами, такими как йогексол (например, по отдельности, одновременно, в одном и том же составе), также может облегчать доставку через BBB, как описано в публикации согласно РСТ № WO/2013/086207, включенной посредством ссылки во всей своей полноте.

В определенных вариантах осуществления антисмысловые олигомеры по настоящему изобретению могут быть доставлены трансдермальными способами (например, посредством включения антисмысловых олигомеров, например, в эмульсии, при этом такие антисмысловые олигомеры необязательно упакованы в липосомы). Такие трансдермальные и опосредованные эмульсией/липосомами способы доставки описаны для доставки антисмысловых олигомеров в данной области техники, например, в патенте США № 6965025, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Антисмысловые олигомеры, описанные в данном документе, также могут быть доставлены посредством имплантируемого устройства. Конструирование такого устройства является принятым в данной области техники процессом, при этом, например, конструирование синтетического импланта описано, например, в патенте США № 6969400, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Антисмысловые олигомеры можно вводить в клетки с применением принятых в данной области техники методик (например, трансфекции, электрокорпорации, слияния, липосом, коллоидных полимерных частиц и вирусных и невирусных векторов, а также других средств, известных в данной области техники). Выбранный способ доставки будет зависеть от по меньшей мере химической структуры олигомера, клеток, подлежащих обработке, и местоположения клеток и будет очевиден для специалиста в данной области техники. Например, локализация может быть достигнута посредством липосом со специфическими маркерами на поверхности для направления липосомы, непосредственной инъекции в ткань, содержащую клетки-мишени, специфического рецепторопосредованного поглощения или т. п.

Как известно из уровня техники, антисмысловые олигомеры могут быть доставлены с применением, например, способов, включающих липосомоопосредованное поглощение, экзосомоопосредованное поглощение, липидные конъюгаты, полилизинопосредованное поглощение, опосредованное наночастицами поглощение и рецепторопосредованный эндоцитоз, а также дополнительных отличных от эндоцитозных способов доставки, таких как микроинъекция, пермеабилитация (например, пермеабилитация с применением

стрептолизина-О, пермеабилитация с применением анионных пептидов), электропорация, и различных неинвазивных отличных от эндоцитозных способов доставки, которые известны из уровня техники (см. Dokka and Rojanasakul, *Advanced Drug Delivery Reviews* 44, 35-49, включенный посредством ссылки во всей своей полноте).

Антисмысловые олигомеры можно вводить в любых подходящих среде-носителе или носителе, которые являются физиологически и/или фармацевтически приемлемыми. Такая композиция может содержать любой из ряда стандартных фармацевтически приемлемых носителей, применяемых специалистами в данном уровне техники. Примеры включают без ограничения солевой раствор, фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), воду, водный этанол, эмульсии, такие как эмульсии типа «масло в воде» или триглицеридные эмульсии, таблетки и капсулы. Выбор подходящего физиологически приемлемого носителя будет варьировать в зависимости от выбранного способа введения. Предполагается, что «фармацевтически приемлемый носитель» включает все возможные растворители, дисперсионные среды, средства для нанесения покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие всасывание средства и т. п., совместимые с фармацевтическим введением. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ хорошо известно из уровня техники. Рассматривается их применение в композициях, за исключением случаев, когда какие-либо традиционные среды или средства являются несовместимыми с активным соединением. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

Соединения (например, антисмысловые олигомеры) по настоящему изобретению в общем можно применять в качестве свободной кислоты или свободного основания. В качестве альтернативы соединения по настоящему изобретению можно применять в форме солей присоединения кислоты или основания. Соли присоединения кислоты свободных аминокислот по настоящему изобретению можно получать с помощью способов, хорошо известных из уровня техники, и они могут быть образованы из органических и неорганических кислот. Подходящие органические кислоты включают малеиновую, фумаровую, бензойную, аскорбиновую, янтарную, метансульфоновую, уксусную, трифторуксусную, щавелевую, пропионовую, винную, салициловую, лимонную, глюконовую, молочную, миндальную, коричную, аспарагиновую, стеариновую, пальмитиновую, гликолевую, глутаминовую и бензолсульфоновую кислоты.

Подходящие неорганические кислоты включают хлористоводородную, бромистоводородную, серную, фосфорную и азотную кислоты. Соли присоединения основания включали соли, которые образуются с помощью карбоксилатного аниона и включают соли, образованные с помощью органических и неорганических катионов, таких как выбранные из щелочных и щелочноземельных металлов (например, лития, натрия, калия, магния, бария и кальция), а также иона аммония и его замещенных производных (например, дибензиламмония, бензиламмония, 2-гидроксиэтиламмония и т. п.). Таким образом, термин «фармацевтически приемлемая соль» предназначен охватывать все

возможные приемлемые формы солей.

Кроме того, в контекст данного изобретения также включены пролекарства. Пролекарства представляют собой любые ковалентно связанные носители, которые обеспечивают высвобождение соединения *in vivo*, если такое пролекарство вводится пациенту. Пролекарства в целом получают с помощью модифицирующих функциональных групп таким образом, чтобы модификация отщеплялась, либо путем обычной манипуляции, либо *in vivo*, с получением исходного соединения. Пролекарства включают, например, соединения по настоящему изобретению, где гидроксид-, аминная или сульфгидрильная группы связаны с любой группой, которая при введении пациенту отщепляется с образованием гидроксид-, аминной или сульфгидрильной групп. Таким образом, иллюстративные примеры пролекарств включают (без ограничения) ацетатные, формиатные и бензоатные производные спиртовых и аминных функциональных групп антисмысловых олигомеров по настоящему изобретению. Дополнительно, в случае карбоновой кислоты (-COOH) могут применяться сложные эфиры, такие как сложные метиловые эфиры, сложные этиловые эфиры и т. п.

В некоторых случаях липосомы можно использовать для облегчения поглощения антисмыслового олигомера клетками (см., например, Williams, S.A., *Leukemia* 10(12):1980-1989, 1996; Lappalainen et al., *Antiviral Res.* 23:119, 1994; Uhlmann et al., *antisense oligomers: a new therapeutic principle*, *Chemical Reviews*, том 90, № 4, 25 страницы 544-584, 1990; Gregoriadis, G., Chapter 14, *Liposomes, Drug Carriers in Biology and Medicine*, стр. 287-341, Academic Press, 1979). В качестве сред-носителей для введения антисмысловых олигомеров также можно применять гидрогели, например, как описано в WO 93/01286. В качестве альтернативы олигомеры можно вводить в микросферах или микрочастицах. (См., например, Wu, G.Y. and Wu, C.H., *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432, 30 1987). В качестве альтернативы применение заполненных газом микропузырьков, образующих комплекс с антисмысловыми олигомерами, может обеспечивать усиление доставки в целевые ткани, как описано в патенте США № 6245747. Также можно применять композиции с замедленным высвобождением. Они могут включать полупроницаемые полимерные матрицы в форме изделий определенной формы, таких как пленки или микрокапсулы.

В одном варианте осуществления антисмысловой олигомер вводят субъекту-млекопитающему, например, человеку или домашнему животному, демонстрирующим симптомы лизосомного нарушения накопления, в подходящем фармацевтическом носителе. В одном аспекте способом субъектом является субъект-человек, например пациент, у которого диагностировано наличие GSD-II (болезнь Помпе). В одном предпочтительном варианте осуществления антисмысловой олигомер содержится в фармацевтически приемлемом носителе и доставляется перорально. В другом предпочтительном варианте осуществления олигомер содержится в фармацевтически приемлемом носителе и доставляется внутривенно (*i.v.*).

В одном варианте осуществления антисмысловое соединение вводят в количестве и посредством способа, эффективных для обеспечения пиковой концентрации

антисмыслового олигомера в крови, составляющей по меньшей мере 200-400 нМ. Как правило, одну или более доз антисмыслового олигомера вводят обычно через равные промежутки времени в течение периода, составляющего от приблизительно одной до двух недель. Предпочтительные дозы для перорального введения составляют приблизительно 1-1000 мг олигомера на 70 кг. В некоторых случаях могут быть необходимы дозы, превышающие 1000 мг олигомера/пациент. Для внутривенного введения предпочтительные дозы составляют от приблизительно 0,5 мг до 1000 мг олигомера на 70 кг. Антисмысловой олигомер можно вводить через равные промежутки времени в течение короткого периода времени, например, ежедневно в течение двух недель или меньше. Однако в некоторых случаях олигомер вводят периодически на протяжении более длительного периода времени. Его введение можно осуществлять после введения антибиотика или другого средства терапевтического лечения или же это можно осуществлять одновременно. Схему лечения (дозу, периодичность, путь и т. д.) можно корректировать, как указано, на основе результатов иммуноанализов, других биохимических тестов и физиологического исследования субъекта, подлежащего лечению.

В определенных вариантах осуществления способ представляет собой способ *in vitro*. В определенных других вариантах осуществления способ представляет собой способ *in vivo*.

В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку примата, отличного от человека. В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку человека.

В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку, встречающуюся в природе. В определенных других вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой сконструированную клетку.

В определенных вариантах осуществления антисмысловой олигомер вводят субъекту-млекопитающему, например, человеку или лабораторному или домашнему животному, в подходящем фармацевтическом носителе.

В определенных вариантах осуществления антисмысловой олигомер вводят субъекту-млекопитающему, например, человеку или лабораторному или домашнему животному, вместе с дополнительным средством. Антисмысловой олигомер и дополнительное средство можно вводить одновременно или последовательно посредством одного и того же или разных путей и/или мест введения. В определенных вариантах осуществления антисмысловой олигомер и дополнительное средство можно ввести в состав совместно и вводить вместе. В определенных вариантах осуществления антисмысловой олигомер и дополнительное средство могут быть предоставлены вместе в наборе.

В одном варианте осуществления антисмысловой олигомер, содержащийся в фармацевтически приемлемом носителе, доставляют перорально.

В одном варианте осуществления антисмысловой олигомер, содержащийся в фармацевтически приемлемом носителе, доставляют внутривенно (*i.v.*).

Дополнительные пути введения, например, подкожный, внутрибрюшинный и легочный, также предусмотрены настоящим изобретением.

В другом варианте применения способа субъектом является животное, относящееся к домашнему скоту, например, свинья, корова или коза и т. д., и лечение является либо профилактическим, либо терапевтическим. Также в способе вскармливания домашнего скота пищевым продуктом рассматривается улучшение, при котором пищевой продукт дополняют эффективным количеством композиции на основе антисмыслового олигомера, как описано выше.

В одном варианте осуществления антисмысловой олигомер вводят в количестве и посредством способа, эффективных для обеспечения пиковой концентрации антисмыслового олигомера в крови, составляющей по меньшей мере 200 нМ. В одном варианте осуществления антисмысловой олигомер вводят в количестве и посредством способа, эффективных для обеспечения пиковой концентрации антисмыслового олигомера в плазме крови, составляющей по меньшей мере 200 нМ. В одном варианте осуществления антисмысловой олигомер вводят в количестве и посредством способа, эффективных для обеспечения пиковой концентрации антисмыслового олигомера в сыворотке крови, составляющей по меньшей мере 200 нМ.

В одном варианте осуществления антисмысловой олигомер вводят в количестве и посредством способа, эффективных для обеспечения пиковой концентрации антисмыслового олигомера в крови, составляющей по меньшей мере 400 нМ. В одном варианте осуществления антисмысловой олигомер вводят в количестве и посредством способа, эффективных для обеспечения пиковой концентрации антисмыслового олигомера в плазме крови, составляющей по меньшей мере 400 нМ. В одном варианте осуществления антисмысловой олигомер вводят в количестве и посредством способа, эффективных для обеспечения пиковой концентрации антисмыслового олигомера в сыворотке крови, составляющей по меньшей мере 400 нМ.

Обычно вводят одну или более доз антисмыслового олигомера, как правило, через равные промежутки времени в течение периода, составляющего от приблизительно одной до двух недель. Предпочтительные дозы для перорального введения составляют приблизительно 0,01-15 мг антисмыслового олигомера на кг массы тела. В некоторых случаях могут потребоваться дозы более 15 мг антисмыслового олигомера/кг. Для внутривенного введения предпочтительные дозы составляют от приблизительно 0,005 мг до 15 мг антисмыслового олигомера на кг массы тела. Антисмысловой олигомер можно вводить через равные промежутки времени в течение короткого периода времени, например, ежедневно в течение двух недель или меньше. Однако в некоторых случаях антисмысловой олигомер вводят периодически на протяжении более длительного периода времени. Его введение можно осуществлять после введения антибиотика или другого средства терапевтического лечения или же это можно осуществлять одновременно. Схему лечения (дозу, периодичность, путь и т. д.) можно корректировать, как указано, на основе результатов иммуноанализов, других биохимических тестов и физиологического

исследования субъекта, подлежащего лечению.

Эффективная схема лечения *in vivo* с применением антисмыслового олигомера может варьировать в соответствии с продолжительностью, дозой, периодичностью и путем введения, а также состоянием субъекта, подлежащего лечению (т. е. профилактическое введение по сравнению с введением в ответ на локализованную или системную инфекцию). Соответственно, такая терапия *in vivo* часто требует контроля с помощью тестов при лечении и соответствующих корректировок дозы или схемы лечения с целью достижения оптимального терапевтического результата.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигомер активно поглощается клетками млекопитающего. В дополнительных вариантах осуществления антисмысловой олигомер может быть конъюгирован с транспортным фрагментом (например, транспортным пептидом), описанным в данном документе, для облегчения такого поглощения.

#### ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

Все публикации, патенты и заявки на патент, упомянутые в настоящем описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же мере, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были конкретно и отдельно указаны как подлежащие включению посредством ссылки.

#### ПРИМЕРЫ

Примеры были изложены ниже с целью иллюстрации и описания определенных конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения. Однако объем формулы изобретения никоим образом не должен ограничиваться примерами, изложенными в данном документе. Различные изменения и модификации раскрытых вариантов осуществления будут очевидны специалистам в данной области техники, и такие изменения и модификации, включая без ограничения те, которые относятся к химическим структурам, заместителям, производным, составам или способам по настоящему изобретению, могут быть реализованы без отступления от сущности настоящего изобретения и объема прилагаемой формулы изобретения. Определения переменных в структурах на схемах в данном документе согласуются с таковыми в соответствующих положениях в формулах, представленных в данном документе.

#### Пример 1. Конструирование антисмысловых нацеливающих последовательностей

Нацеливающие последовательности антисмысловых олигомеров конструировали для терапевтических вариантов применения с переключением сплайсинга, связанных с мутацией IVS1-13T>G в гене *GAA* человека. В данном документе предполагается, что олигомеры, обеспечивающие переключение сплайсинга, будут подавлять интронные и экзонные сплайс-сайленсерные элементы (элементы ISS и ESS соответственно) и тем самым способствовать сохранению экзона 2 в зрелой mRNA *GAA*. Затем восстановление нормальной или близкой к нормальной экспрессии *GAA* позволит синтезировать функциональный фермент с обеспечением тем самым клинической пользы для пациентов с GSD-II.

Иллюстративные олигомеры, содержащие нацеливающую последовательность, представленную в таблицах 6А-6С, получали в виде РРМО (олигомеры, конъюгированные с CPP, такие как CPP с высоким содержанием аргинина). Как описано ниже, такие антисмысловые олигомеры вводили в полученные от пациентов с GSD-II фибробласты и полученные из iPSC пациентов мышечные трубочки с применением протокола гимнотического поглощения, также описанного в примере 2 ниже.

#### Пример 2. Материалы и способы

**Клетки GSD-II.** Полученные от пациентов фибробласты, а именно от индивидуумов с GSD-II (клеточные линии Coriell GM00443 и GM11661), культивировали в соответствии со стандартными протоколами DMEM Игла с 10%-15% FBS. Клетки пересеивали по меньшей мере дважды перед экспериментами, и их конфлюентности при трансфекции составляла примерно 80%. Полученные от пациентов фибробласты GM00443 и GM11661 перепрограммировали в линии iPSC и затем обеспечивали их дифференцировку в миообласты, а также их размножали и консервировали. Полученные от пациентов миообласты iPSC культивировали в среде для размножения миообластов и дважды пересеивали перед применением. Обеспечивали дифференцировку миообластов в мышечные трубочки в течение двух дней перед обработкой.

Фибробласты GM00443 принадлежали 30-летнему мужчине. Возникающая во взрослом возрасте форма; начало в третьем десятилетии; нормальный размер и количество mRNA для GAA, белок GAA выявляется антителом, но лишь от 9 до 26% нормальной активности кислой альфа-1,4-глюкозидазы; пассаж 3 при CCR; субъект-донор является гетерозиготным по одному аллелю, несущему трансверсию T>G в положении -13 акцепторного участка интрона 1 гена *GAA*, что приводит к альтернативно сплайсированным транскриптам с делецией первого кодирующего экзона [экзона 2 (IVS1-13T>G)].

Фибробласты GM11661 принадлежали 38-летнему мужчине. Тесты в отношении аномальной функции печени; периодические судороги в ногах во время физической активности; утренние головные боли; непереносимость жирной пищи; киста в брюшной полости; дефицит в отношении активности фибробластов и кислой альфа-1,4-глюкозидазы WBC; субъект-донор представлен составной гетерозиготой: аллель один несет трансверсию T>G в положении -13 акцепторного участка интрона 1 гена *GAA* (IVS1-13T>G); полученный альтернативно сплайсированный транскрипт содержит делецию экзона 2 в пределах рамки считывания, который содержит иницирующий кодон; аллель два несет делецию экзона 18 в пределах рамки считывания.

**Протокол лечения.** Полученные от пациентов фибробласты пересеивали дважды перед применением. Клетки обрабатывали при конфлюентности на уровне приблизительно 80% посредством замены среды, содержащей различные концентрации РРМО. Перед применением полученные из iPSC пациентов миообласты пересеивали/размножали по меньшей мере дважды. Миообласты культивировали в течение одного дня и обеспечивали дифференцирование в мышечные трубочки в течение двух дней перед обработкой с применением среды для дифференцировки, содержащей различные концентрации РРМО.

**qPCR GAA.** Для экспериментов с помощью количественной ПЦР применяли мультиплексный анализ qPCR TaqMan, в котором одновременно амплифицируется mRNA *GAA* в соединениях экзонов 1-2 и экзонов 3-4 в дополнение к эталонному гену. 100-500 нг общей РНК из обработанных мышечных трубочек, полученных из iPSC пациентов, обратно транскрибировали с применением набора для синтеза cDNA SuperScript VILO (Thermo Fisher). cDNA разбавляли 3-10-кратно перед амплификацией с помощью мастер-микса TaqMan Multiplex (Thermo Fisher) с применением термоциклера Quantstudio 7 Pro (Thermo Fisher). При каждой реакции qPCR содержались зонд FAM для выявления соединения экзонов 1-2 *GAA*, зонд VIC для выявления соединения экзонов 3-4 *GAA* и зонд JUN для выявления эталонного гена. Получали относительные стандартные кривые для каждого анализа и набора зондов в мультиплексе и использовали для расчета исходного количества молекул каждого вида в обработанных образцах, нормализованных относительно эталонного гена.

**Ферментный анализ GAA и анализ белков Simple Wes.** Полученные от пациентов фибробласты культивировали при конfluence на уровне приблизительно 80% и затем обрабатывали с помощью соединений PPMO посредством гипнотического поглощения. Обработку продолжали в течение 6 дней, во время чего измеряли активность GAA с применением набора для анализа активности GAA Abcam (ab252887).

Вестерн-блоттинг в отношении белка GAA проводили с применением системы ProteinSimple® Jes™. GAA выявляли с применением рекомбинантного антитела к GAA (EPR4716(2))(Abcam ab137068) и модуля для выявления кроличьего антитела ProteinSimple® (DM-001) и модуля для разделения 12-230 кДа (SM-W004). Концентрации белка GAA нормализовали к общему белку с применением набора для нормализации белка ProteinSimple® (AM-PN01).

Пример 3. Получение антисмысловых PPMO ( $R^1$  представляет собой  $-N(CH_3)_2$ )

Антисмысловые PPMO конструировали для нацеливания на pre-mRNA *GAA* человека (например, интрон 1 pre-mRNA *GAA* человека), синтезировали, как описано в данном документе, и применяли для обработки полученных от пациентов с GSD-II фибробластов и полученных из iPSC пациентов с GSD-II мышечных трубочек.

<b>Таблица 6А</b>			
<b>Нуклеофицированные соединения PPMO (субъединицы с удаленным азотистым основанием)</b>			
<b>Название</b>	<b>Нацеливающая последовательность (TS)* (5'-3')</b>	<b>TS, SEQ ID NO</b>	<b>5'-конец 3'-конец</b>
GAA-IVS1(-189, 167)	CCA GAA GGA AGG GCG AGA AAA GC	33	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-189, 167)-G	CCA GAA GGA AGG CGA GAA AAG C	34	5' TEG 3' GR6

GAA-IVS1(-189, 167)-2G	CCA GAA GGA AGC GAG AAA AGC	35	5' TEG 3' GR6
H53A(-100-76) Отрицательный контроль (NTC)	CGT TAT CTC ACA TTT ATG TTG CTT A	NTC	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-189, 167)(-179 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA AGG BCG AGA AAA GC	5	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-189, 167)(-178 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA AGB GCG AGA AAA GC	6	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-189, 167)(-177 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA ABG GCG AGA AAA GC	7	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-189, 167) (- 178,-179 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA AGB BCG AGA AAA GC	8	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-189, 167) (- 177,-178 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA ABB GCG AGA AAA GC	9	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-189, 167) (- 177,-179 с удаленным азотистым основанием)	CCA GAA GGA ABG BCG AGA AAA GC	10	5' TEG 3' GR6

**GR6: Gly(Arg)<sub>6</sub> V:** субъединица с удаленным азотистым основанием без пурина и пиримидина. Включенные в данный документ субъединицы с удаленным азотистым основанием сохраняют фосфородиамидатный остов олигомера, но не содержат пуриновые или пиримидиновые основания.

<b>Таблица 6В</b>			
<b>Данные Microwalk</b>			
<b>Название</b>	<b>Нацеливающая последовательность (TS)* (5'-3')</b>	<b>TS, SEQ ID NO</b>	<b>5'-конец 3'-конец</b>
GAA-IVS1(-80,-56)	GCT CTC AAA GCA GCT CTG AGA CAT C	37	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-76,-52)	CGG GGC TCT CAA AGC AGC TCT GAG A	38	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-74,-55)	GGC TCT CAA AGC AGC TCT GA	39	5' TEG 3' R6
GAA-IVS1(-72,-48)	CTC ACG GGG CTC TCA AAG CAG CTC T	40	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-71,-47)	ACT CAC GGG GCT CTC AAA GCA GCT C	41	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-70,-46)	CAC TCA CGG GGC TCT CAA AGC AGC T	42	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-69,-45)	GCA CTC ACG GGG CTC TCA AAG CAG C	43	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-66,-42)	GGC GGC ACT CAC GGG GCT CTC AAA G	44	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-65,-41) - 2G	GGC GGC ACT CAC GGC TCT CAA AG	45	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-49,-24)	GCA GGG AGG CGG GAG GGG CGG CAC T	46	5' TEG 3' GR6

**GR6: Gly(Arg)<sub>6</sub>**

<b>Таблица 6С</b>			
<b>Нуклеофицированные соединения РРМО (субъединицы с удаленным азотистым основанием)</b>			
<b>Название</b>	<b>Нацеливающая последовательность (TS)* (5'-3')</b>	<b>TS, SEQ ID NO</b>	<b>5'- присоединение 3'- присоединение</b>
GAA h5'Ex1 (173 190)	TCC TAC CTG CTG CCT CAT	47	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-69-45) (G53B)	GCA CTC ACB GGG CTC TCA AAG CAG C	17	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-69-45) (G54B)	GCA CTC ACG BGG CTC TCA AAG CAG C	18	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-69-45) (G55B)	GCA CTC ACG GBG CTC TCA AAG CAG C	19	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-69-45) (G56B)	GCA CTC ACG GGB CTC TCA AAG CAG C	20	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-69-45) (G53B G54B)	GCA CTC ACB BGG CTC TCA AAG CAG C	21	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-69-45) (G54B G55B)	GCA CTC ACG BBG CTC TCA AAG CAG C	22	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-69-45) (G55B G56B)	GCA CTC ACG GBB CTC TCA AAG CAG C	23	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-65-41) (G54B G55B)	GGC GGC ACT CAC GBB GCT CTC AAA G	24	5' TEG 3' GR6

**GR6: Gly(Arg)<sub>6</sub> B:** субъединица с удаленным азотистым основанием без пурина и пиримидина. Включенные в данный документ субъединицы с удаленным азотистым основанием сохраняют фосфородиамидатный остов олигомера, но не содержат пуриновые или пиримидиновые основания.

<b>Таблица 6D</b>			
<b>Данные Microwalk</b>			
<b>Название</b>	<b>Нацеливающая последовательность (TS)* (5'-3')</b>	<b>TS, SEQ ID NO</b>	<b>5'-конец 3'-конец</b>
GAA-IVS1(-186-166)	GCC AGA AGG AAG GGC GAG AAA	48	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-188-168)	CAG AAG GAA GGG CGA GAA AAG	49	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-189-169)	AGA AGG AAG GGC GAG AAA AGC	50	5' TEG 3' R6
GAA-IVS1(-190-170)	GAA GGA AGG GCG AGA AAA GCT	51	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-191-171)	AAG GAA GGG CGA GAA AAG CTC	52	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-192-172)	AGG AAG GGC GAG AAA AGC TCC	53	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-196-176)	AGG GCG AGA AAA GCT CCA GCA	54	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-194-174)	GAA GGG CGA GAA AAG CTC CAG	55	5' TEG 3' GR6
GAA-IVS1(-198-178)	GGC GAG AAA AGC TCC AGC AGG	56	5' TEG 3' GR6

**GR6: Gly(Arg)<sub>6</sub>**

Пример 4. Активность GAA и содержание белка в полученных от пациентов с GSD-II фибробластах

Вышеописанные антисмысловые РРМО доставляли в фибробласты GM00443 или GM11661 и полученные из iPSC пациентов мышечные трубочки путем гипнотического поглощения. После четырех-шести дней инкубации при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> клетки лизировали и измеряли активность GAA в лизатах или экспрессию белка GAA с помощью иммуноанализа, как описано выше. В целом экспрессия белка фермента GAA в клетках, обработанных с помощью антисмысловых олигонуклеотидов по настоящему изобретению, была выше, чем уровень экспрессии GAA в необработанных клетках. Такие результаты указывают на то, что олигонуклеотиды по настоящему изобретению обеспечивают повышение экспрессии и/или активности фермента GAA в клетках от пациентов с болезнью Помпе с поздним началом. Нацеливающие последовательности вариантных олигонуклеотидов комплементарны целевой области в пределах интрона 1 (SEQ ID NO: 1) pre-mRNA гена альфа-глюкозидазы (GAA) человека, где целевая область содержит субъединицы с удаленным азотистым основанием без пурина и пиримидина. На удивление, применение таких субъединиц с удаленным азотистым основанием облегчало синтез олигонуклеотидов с низким выходом при сохранении эффективности исходной последовательности.

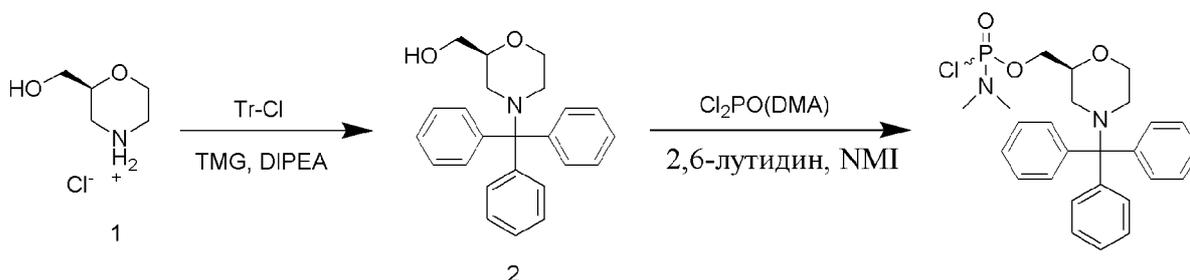
### Пример 5. Мелкомасштабный синтез активированной морфолиновой субъединицы с удаленным азотистым основанием

Общее получение. Соединение 1 (1,10 экв.) суспендировали в дихлорметане (7,00 мл/г). К данной суспензии добавляли тетраметилгуанидин (0,50 экв.) и диизопропилэтиламин (1,80 экв.) и смесь нагревали до 30°C и выдерживали в течение 60 минут для растворения материала перед охлаждением до комнатной температуры. Отдельно растворяли тритилхлорид (1,00 экв.) в дихлорметане (2,42 мл/г) и данный раствор медленно добавляли к первому раствору, поддерживая температуру ниже 30°C. По завершении реакции (1-2 ч) реакционную смесь промывали цитратным буфером (pH 4) и водой. Органическую фазу отделяли и анализировали в отношении содержания соединения 2 (выход: 93%).

К раствору соединения 2 (1,00 экв.) добавляли 2,6-лутидин (1,15 экв.) и *N*-метилимидазол (0,38 экв.) и раствор концентрировали путем перегонки при атмосферном давлении до объема 6,00 мл/г. В раствор добавляли дихлорметан (5,00 мл/г) и его снова концентрировали путем перегонки при атмосферном давлении до того самого объема. Данный процесс повторяли до тех пор, пока содержание воды не становилось невыявляемым при титровании по методу Карла-Фишера, и раствор охлаждали до 0-5°C. Тонкой струей добавляли диметиламинофосфорил дихлорид (1,05 экв.) и обеспечивали нагревание реакционной смеси до комнатной температуры в течение ночи.

После подтверждения завершения реакции смесь пропускали через колонку из молекулярных сит и полученный раствор очищали посредством хроматографии на силикагеле с применением пошаговых градиентов этилацетата в гептанах. Фракции, содержащие продукт, объединяли и пул выпаривали до сухого состояния с получением конечного продукта в виде твердых веществ (выход: 73% для конечной стадии и 68% для двухстадийного способа).

Схема реакции 2. Получение активированной морфолиновой субъединицы с удаленным азотистым основанием

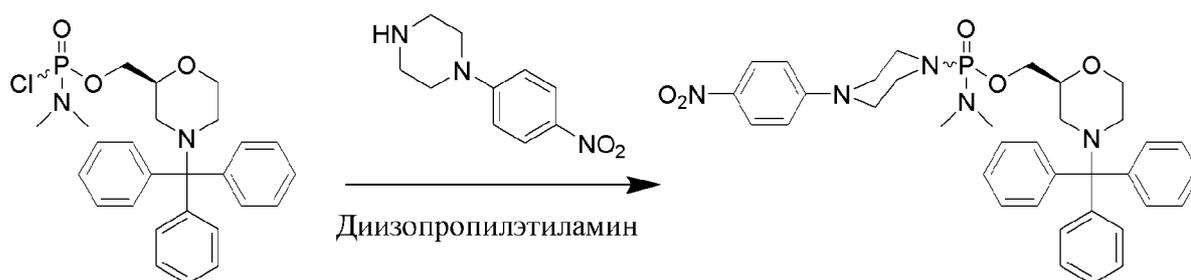


Поскольку активированные морфолиновые субъединицы нестабильны в водных подвижных фазах ВЭЖХ, применяли гасящую дериватизацию с помощью 1-(4-нитрофенил)пиперазина (NPP) с превращением субъединицы в стабильные диамидазные производные для анализа с применением ВЭЖХ. NPP характеризуется поглощением строго при 391 нм, поэтому, в дополнение к обеспечению стабильности, может применяться анализ при 391 нм для обнаружения примесей, которые, вероятно, вступают в реакцию с

растущей цепью олигомера.

Поскольку продукт для анализа представляет собой NPP-производную активированную морфолиновую основную субъединицу, стандарт данного материала синтезировали и характеризовали с помощью ВЭЖХ, масс-спектрометрии и ЯМР. Это позволяет идентифицировать активированную субъединицу путем сравнения относительно хроматограммы ВЭЖХ синтезированного стандарта, который характеризуется структурой, подтверждаемой масс-спектрометрией и ЯМР. Пик продукта в анализах ВЭЖХ слегка разделен вследствие частичного разделения двух диастереомеров.

Схема реакции 3. Получение устойчивого диамидатного производного морфолиновой субъединицы с удаленным азотистым основанием



Точная масса: 655,29

Пример 6. Активность GAA в полученных от пациентов с GSD-II фибробластах

Культуры клеток фибробластов. Клеточные линии фибробластов человека поддерживали в модифицированной среде Игла (MEM, Thermo Fisher), содержащий 15% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 2 мМ L-глутамин, в инкубаторе при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. Используемые в настоящее время клеточные линии фибробластов получали из Института Кориелла, и они включали следующие линии: GM08402 (здоровый контроль), GM08400 (здоровый контроль), GM00443 (болезнь Помпе с поздним началом), GM11661 (болезнь Помпе с поздним началом), GM20089 (болезнь Помпе с началом в младенчестве) и GM20123 (здоровый носитель болезни Помпе). За день до обработки клетки высевали в 24-луночные планшеты для культивирования клеток при 30000 клеток/лунка и инкубировали в течение ночи. Затем клетки промывали в PBS и в лунки добавляли средство обработки, содержащее PPMO и дополненное средой. Обеспечивали инкубирование клеток со средством обработки и без изменений среды в течение 6 дней. Для лизиса в анализе активности GAA клетки промывали один раз с помощью PBS и затем подвергали лизису в ледяном буфере для анализа активности GAA (Abcam). На фиг. 6 показано дозозависимое повышение экспрессии GAA в фибробластах пациентов после гимнотической обработки выбранными соединениями PPMO.

Пример 7. Активность GAA и содержание белка в полученных от пациентов с GSD-II мышечных трубочках

**Полученные из iPSC пациентов мышечные трубочки.** Фибробласты пациентов перепрограммировали в iPSC с применением способа без фидерных клеток и без «следа». Плурипотентность подтверждали путем иммуноокрашивания с помощью маркеров Oct3/4,

NANOG, TRA-1-60. iPSC сохраняли нормальный кариотип и активность щелочной фосфатазы. Обеспечивали дифференцировку линий iPSC в миобласты, замораживали их и восстанавливали. Миогенную линию подтверждали путем иммунофлуоресценции миобластных маркеров Desmin и MyoD и экспрессии ключевых маркеров, измеренной с помощью qPCR. Терминальную дифференцировку миобластов проводили на протяжении 3-6 дней культивирования и подтверждали путем экспрессии миогенных маркеров MHC и MyoG, измеренной с помощью иммунофлуоресценции.

**Неинтегративное перепрограммирование фибробластов в iPSC.** Фибробласты поддерживали в DMEM с 10% FCS. После инкубирования в течение ночи культуральную среду заменяли свежей средой и клетки трансфицировали с помощью 2 мкг эписомальных плазмид из набора для перепрограммирования Epi5™ iPSC (ThermoFisher) с применением реагента для трансфекции FuGENE6 (Promega). На следующий день культуральную среду заменяли средой mTeSR-plus (StemCell Technologies). Во время процесса перепрограммирования трансфицированные клетки культивировали в mTeSR-plus и среду заменяли через день в течение периода до 2 недель после трансфекции. Колонии переносили в новые чашки для культивирования, покрытые матрицей Geltrex, с применением наконечника пипетки. За час до процедуры в среду для культивирования добавляли 10 мкМ Y-27632. iPSC дополнительно размножали и поддерживали в среде mTeSR-plus, как описано в Alonso-Barroso et al., Stem Cell Res. 23, 173-177; 2017.

**Дифференцировка SKM.** Обеспечивали дифференцировку миогенных предшественников из hiPSC в соответствии с протоколами, описанными ранее [Chal, J et. Al. Nat. Biotech. 2015, 33, 962-969]. Вкратце, миогенные предшественники получали с помощью многостадийного протокола низкомолекулярной дифференцировки. Миогенные предшественники размножали, пересевали и криоконсервировали в 6-луночных планшетах, покрытых 60 мкг/мл коллагена I. Для дифференцировки миобластов замороженные миогенные предшественники оттаивали в среде для размножения миобластов (iXCells, кат. № MD-0102A). Среду для роста обновляли каждые 2 дня в течение 8 дней, затем криоконсервировали. Для дифференцировки мышечных трубочек миобласты восстанавливали, высевали при плотности 32000/см<sup>2</sup> и культивировали с использованием среды для размножения миобластов до достижения 100-процентной конfluence. Для дифференцировки клеток скелетных мышц конfluence культуры миобластов переводили на среду для дифференцировки миобластов (iXCells, кат. № MD-0102B) со сменой среды каждые 2 дня. Удлиненные мышечные трубочки были видны через 72 часа в среде для дифференцировки миобластов.

**РРМО обеспечивает увеличение экспрессии GAA в полученных из iPSC пациентов с LOPD мышечных трубочках.** Полученные из iPSC пациентов миобласты высевали в 96-луночный или 24-луночный покрытый коллагеном планшет (Corning) и размножали в среде для размножения полученных из iPSC миобластов (iXCells Biotechnologies) в течение 48 часов. Среду заменяли средой для дифференцировки мышечных трубочек (iXCells Biotechnologies) и обеспечивали продолжение

дифференцировки в течение 48 часов. Затем среду заменяли свежей средой для дифференцировки, содержащей указанные концентрации РРМО. РНК экстрагировали из клеточных культур через 72 часа гимнотической обработки с применением набора *Quick-RNA 96* (Zymo) согласно протоколу производителя. 100-300 нг РНК подвергали обратной транскрипции с применением набора *Superscript VILO* (Thermo Fisher) в соответствии с протоколом производителя. Применяли мультиплексный анализ qPCR с измерением экспрессии *GAA* в локусе экзонов 1-2 (Hs.PT.58.24962380, Интегрированные ДНК-технологии, праймеры 900 нМ, зонд 250 нМ) в канале FAM, *GAA* в локусе экзонов 3-4 (Hs01089834\_m1, Thermo Fisher, праймеры 1,8 мкМ, зонд 500 нМ) в канале VIC и *HPRT* (Hs99999909\_m1\_qsy, Thermo Fisher, праймеры 900 нМ, зонд 250 нМ) в канале JUN с помощью мастер-микса *Multiplex* (Thermo Fisher) на термоциклере *Quantstudio 7 Pro PCR* (Thermo Fisher). Условия циклов qPCR состояли из стадии исходной денатурации в течение 20 с при 95°C с последующими 40 циклами при 95°C в течение 3 с, 58°C в течение 20 с при скорости изменения температуры 1,92°C за секунду. На фиг. 7 и фиг. 8 показаны показатели дозозависимого повышения экспрессии *GAA* в полученных из iPSC пациентов мышечных трубочках после гимнотической обработки выбранными РРМО.

**РРМО обеспечивает повышение уровня белка *GAA* в полученных из iPSC пациентов с LOPD мышечных трубочках.** Полученные из iPSC пациентов миобласты высевали в 24-луночный покрытый коллагеном планшет (Corning) и размножали в среде для размножения полученных из iPSC миобластов (*iXCells Biotechnologies*) в течение 24 часов. Среду заменяли средой для дифференцировки мышечных трубочек (*iXCells Biotechnologies*) и обеспечивали продолжение дифференцировки в течение 24 часов. Затем среду заменяли свежей средой для дифференцировки, содержащей указанные концентрации РРМО. Клеточные лизаты готовили через 96 часов гимнотической обработки с применением буфера для лизиса *RIPA* (Thermo Fisher). Концентрацию белка измеряли с использованием набора для анализа *Pierce BCA* (Thermo Fisher). Клеточные лизаты готовили с использованием набора для получения образцов (*Proteinsimple*) для автоматизированной капиллярной системы для вестерн-блоттинга, системы *JESS* (*Proteinsimple*). Клеточные лизаты разбавляли до тех же концентраций белка с использованием 0,1X буфера для образцов (*Proteinsimple*) и смешивали с 5X мастер-микса для флуоресценции (*Proteinsimple*) в соответствии с инструкциями протокола. Образцы подвергали денатурированию при 95°C согласно инструкциям протокола. *JESS* проводили с применением разбавленного 1:400 первичного антитела к *GAA* (Abcam ab137068), разбавленного с помощью разбавителя для антител, не содержащего молока; субстрата для нормализации белка; вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (*HRP*); хемилюминесцентного субстрата и промывочного буфера, распределенного в указанные лунки планшета для анализа. Образцы загружали в указанные места на планшете *JESS* в трех повторностях с биотинилированным лэддерным маркером и планшет для анализа помещали в аппарат *JESS*. Интенсивность сигнала (площадь пика) белка нормализовали относительно площади пика общего белка, включенного в капиллярную лунку, с

применением набора для нормализации белка и анализа на программном обеспечении Compass (Proteinsimple). Количественный анализ полос белка GAA проводили с применением программного обеспечения Compass (Proteinsimple). На фиг. 9 и фиг. 10 показаны показатели увеличения уровня белка GAA в полученных из iPSC пациентов мышечных трубочках после обработки выбранными соединениями РРМО.

**РРМО обеспечивает повышение уровня белка GAA в полученных из iPSC пациентов с LOPD мышечных трубочках.** Полученные из iPSC пациентов миобласты высевали в 24-луночные покрытые коллагеном (Thermo Fisher) планшеты при 80000 клеток/луночка в среде для размножения (EM, iXCells Biotechnologies). Через 48 часов роста в EM клетки промывали в PBS и среду заменяли средой для дифференцировки (DM, iXCells Biotechnologies). Клетки инкубировали в DM в течение 48 часов, затем обрабатывали РРМО-дополненной DM и инкубировали без замен среды в течение 4 дней. Для лизиса в анализе активности GAA клетки промывали один раз с помощью PBS и затем их подвергали лизису в ледяном буфере для анализа активности GAA (Abcam). На фиг. 11 показаны показатели дозозависимого повышения ферментативной активности GAA в полученных из iPSC пациентов мышечных трубочках после обработки выбранными соединениями РРМО.

#### **Пример 8. Уменьшение агрегации РРМО путем замены с удалением азотистого основания**

Агрегацию образцов РРМО в растворах с постоянной концентрацией в PBS (Gibco) измеряли путем динамического светорассеяния с применением Zetasizer Nano (Malvern) по стандартному протоколу производителя. На фиг. 12 показано, что замена с удалением азотистого основания обеспечивает уменьшение агрегации РРМО. Доля свободного РРМО повышается при замене с удалением азотистого основания, что измерено путем динамического светорассеяния (DLS).

Подводя итог, соединения РРМО, предусмотренные в данном документе, неизменно обеспечивают правильный сплайсинг GAA и повышение уровней белка и ферментативной активности GAA в полученных от пациентов с LOPD мышечных трубочках. Целевое участие IVS1-GAA человека подтверждали на мышинной модели LOPD. Неожиданно то, что замена субъединицы с удаленным азотистым основанием почти настолько же эффективна в отношении восстановления ферментной активности GAA, что и исходная последовательность (например, РРМО 7 по сравнению с РРМО 33). Интересно отметить, что данные DLS указывают на некоторое изменение агрегации или образования вторичной структуры в таких последовательностях путем включения субъединицы с удаленным азотистым основанием.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат, содержащий модифицированный антисмысловой олигонуклеотид и проникающий в клетку пептид, где:

модифицированный антисмысловой олигонуклеотид составляет 18-40 субъединиц в длину, причем он содержит нацеливающую последовательность, комплементарную целевой области в пределах интрона 1 (SEQ ID NO: 1) pre-mRNA гена кислой альфа-глюкозидазы (GAA) человека, где

антисмысловой олигонуклеотид содержит морфолиновый олигомер;

антисмысловой олигонуклеотид ковалентно связан с проникающим в клетку пептидом;

каждая субъединица антисмыслового олигонуклеотида содержит нуклеиновое основание или представляет собой субъединицу с удаленным азотистым основанием, причем каждая субъединица, взятая в совокупности в порядке от 5'-конца антисмыслового олигонуклеотида до 3'-конца антисмыслового олигонуклеотида, образует нацеливающую последовательность;

по меньшей мере одна субъединица представляет собой субъединицу с удаленным азотистым основанием; и

где нацеливающая последовательность, за исключением субъединицы или субъединиц с удаленным азотистым основанием, на по меньшей мере 80% комплементарна целевой области.

2. Конъюгат по п.1, где целевая область содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 (GAA-IVS1(-189-167)) и SEQ ID NO: 3 (GAA-IVS1(-80-24)).

3. Конъюгат по п.2, где целевая область содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

4. Конъюгат по п.2, где целевая область содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3.

5. Конъюгат по п.1 или 2, где целевая область выбрана из GAA-IVS1(-189-167), GAA-IVS1(-80-56), GAA-IVS1(-76-52), GAA-IVS1(-74-55), GAA-IVS1(-72-48), GAA-IVS1(-71-47), GAA-IVS1(-70-46), GAA-IVS1(-69-45), GAA-IVS1(-66-42), GAA-IVS1(-65-41) и GAA-IVS1(-49-24).

6. Конъюгат по п.1 или 5, где целевая область представляет собой GAA-IVS1(-189-167).

7. Конъюгат по п.1 или 6, где нацеливающая последовательность содержит последовательность CCA GAA GGA AXX XCG AGA AAA GC (SEQ ID NO: 4), где каждый X независимо выбран из гуанина (G) или представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием (B), причем по меньшей мере один X представляет собой B.

8. Конъюгат по п.1 или 7, где нацеливающая последовательность содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

i) SEQ ID NO: 5 (CCA GAA GGA AGG BCG AGA AAA GC);

- ii) SEQ ID NO: 6 (CCA GAA GGA AGB GCG AGA AAA GC);
- iii) SEQ ID NO: 7 (CCA GAA GGA ABG GCG AGA AAA GC);
- iv) SEQ ID NO: 8 (CCA GAA GGA AGB BCG AGA AAA GC);
- v) SEQ ID NO: 9 (CCA GAA GGA ABB GCG AGA AAA GC) и
- vi) SEQ ID NO: 10 (CCA GAA GGA ABG BCG AGA AAA GC).

9. Пропущен.

10. Конъюгат по п.1 или 5, где целевая область выбрана из группы, состоящей из GAA-IVS1(-80-56), GAA-IVS1(-76-52), GAA-IVS1(-74-55), GAA-IVS1(-72-48), GAA-IVS1(-71-47), GAA-IVS1(-70-46), GAA-IVS1(-69-45), GAA-IVS1(-66-42), GAA-IVS1(-65-41) и GAA-IVS1(-49-24).

11. Конъюгат по п.1 или 10, где целевая область выбрана из группы, состоящей из GAA-IVS1(-72-48), GAA-IVS1(-71-47), GAA-IVS1(-70-46), GAA-IVS1(-69-45), GAA-IVS1(-66-42) и GAA-IVS1(-65-41).

12. Конъюгат по п.1 или 11, где нацеливающая последовательность содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- i) SEQ ID NO: 11 (CTC ACX XXX CTC TCA AAG CAG CTC T);
- ii) SEQ ID NO: 12 (ACT CAC XXX XCT CTC AAA GCA GCT C);
- iii) SEQ ID NO: 13 (CAC TCA CXX XXC TCT CAA AGC AGC T);
- iv) SEQ ID NO: 14 (GCA CTC ACX XXX CTC TCA AAG CAG C);
- v) SEQ ID NO: 15 (GCG GCA CTC ACX XXX CTC TCA AAG C);
- vi) SEQ ID NO: 16 (GGC GGC ACT CAC XXX XCT CTC AAA G);

где каждый X независимо выбран из гуанина (G) или представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием (B), причем по меньшей мере один X представляет собой B.

13. Конъюгат по п.1 или 12, где нацеливающая последовательность выбрана из группы, состоящей из:

- i) SEQ ID NO: 17 (GCA CTC ACB GGG CTC TCA AAG CAG C);
- ii) SEQ ID NO: 18 (GCA CTC ACG BGG CTC TCA AAG CAG C);
- iii) SEQ ID NO: 19 (GCA CTC ACG GBG CTC TCA AAG CAG C);
- iv) SEQ ID NO: 20 (GCA CTC ACG GGB CTC TCA AAG CAG C);
- v) SEQ ID NO: 21 (GCA CTC ACB BGG CTC TCA AAG CAG C);
- vi) SEQ ID NO: 22 (GCA CTC ACG BBG CTC TCA AAG CAG C);
- vii) SEQ ID NO: 23 (GCA CTC ACG GBB CTC TCA AAG CAG C) и
- viii) SEQ ID NO: 24 (GGC GGC ACT CAC GBV GCT CTC AAA G).

14. Конъюгат по любому из пп. 1-13, где нацеливающая последовательность, за исключением субъединицы или субъединиц с удаленным азотистым основанием, на по меньшей мере 84%, по меньшей мере 88% или по меньшей мере 92% комплементарна целевой области.

15. Конъюгат по любому из пп. 1-13, где нацеливающая последовательность, за исключением субъединицы или субъединиц с удаленным азотистым основанием, на по

меньшей мере 90% комплементарна целевой области.

16. Конъюгат по любому из пп. 1-5, где нацеливающая последовательность, за исключением субъединицы или субъединиц с удаленным азотистым основанием, на по меньшей мере 95% комплементарна целевой области.

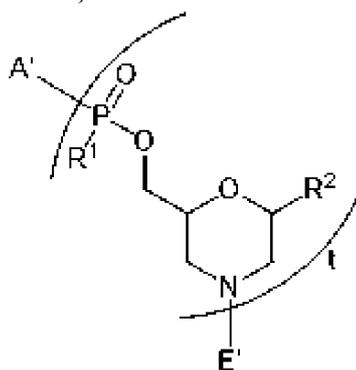
17. Конъюгат по любому из пп. 1-5, где нацеливающая последовательность, за исключением субъединицы или субъединиц с удаленным азотистым основанием, на 100% комплементарна целевой области.

18. Конъюгат по любому из пп. 1-4, где каждая субъединица с удаленным азотистым основанием находится на расстоянии по меньшей мере 8 субъединиц от 5'- или 3'-конца нацеливающей последовательности.

19. Конъюгат по любому из пп. 1-4, где антисмысловый олигонуклеотид содержит 1-5 субъединиц с удаленным азотистым основанием.

20. Конъюгат по любому из пп. 1-4 или 19, где антисмысловый олигонуклеотид содержит 1, 2, 3 или 4 субъединицы с удаленным азотистым основанием.

21. Конъюгат по любому из пп. 1-20, где конъюгат представляет собой соединение формулы IV,

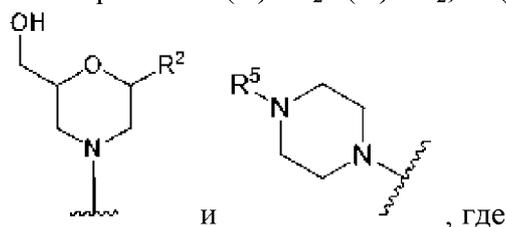


(IV),

или его фармацевтически приемлемую соль,

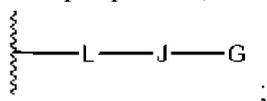
где

A' выбран из  $-N(H)CH_2C(O)NH_2$ ,  $-N(C_{1-6}\text{алкил})CH_2C(O)NH_2$ ,



R<sup>5</sup> представляет собой  $-C(O)(O\text{-алкил})_x-OH$ , где x составляет 3-10, и каждая алкильная группа независимо в каждом случае представляет собой C<sub>2-6</sub>алкил,

или R<sup>5</sup> выбран из H,  $-C(O)C_{1-6}\text{алкила}$ , тритила, монометокситритила,  $-(C_{1-6}\text{алкил})-R^6$ ,  $-(C_{1-6}\text{гетероалкил})-R^6$ , арил-R<sup>6</sup>, гетероарил-R<sup>6</sup>,  $-C(O)O-(C_{1-6}\text{алкил})-R^6$ ,  $-C(O)O\text{-арил}-R^6$ ,  $-C(O)O\text{-гетероарил}-R^6$ , и



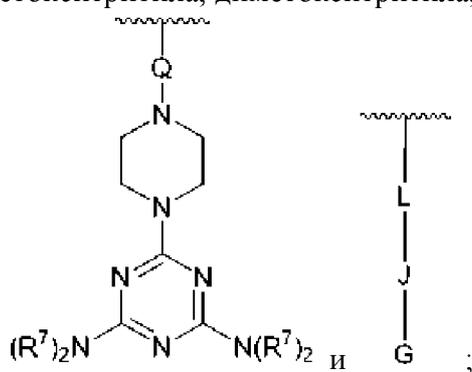
$R^6$  выбран из OH, SH и  $NH_2$ , или  $R^6$  представляет собой O, S или NH, каждый из которых ковалентно связан с твердой подложкой;

каждый  $R^1$  независимо выбран из OH и  $-N(R^3)(R^4)$ , где каждый из  $R^3$  и  $R^4$  независимо в каждом случае представляет собой H или  $-C_{1-6}$ алкил;

каждый  $R^2$  независимо в каждом случае выбран из H (с удаленным азотистым основанием), нуклеинового основания и нуклеинового основания, функционализованного химической защитной группой, при этом нуклеиновое основание независимо в каждом случае содержит  $C_{3-6}$ -гетероциклическое кольцо, выбранное из пиридина, пиримидина, пурина и деазапурина;

t составляет 8-40;

$E'$  выбран из H,  $-C_{1-6}$ алкила,  $-C(O)C_{1-6}$ алкила, бензоила, стеароида, тритила, монометокситритила, диметокситритила, триметокситритила,



где

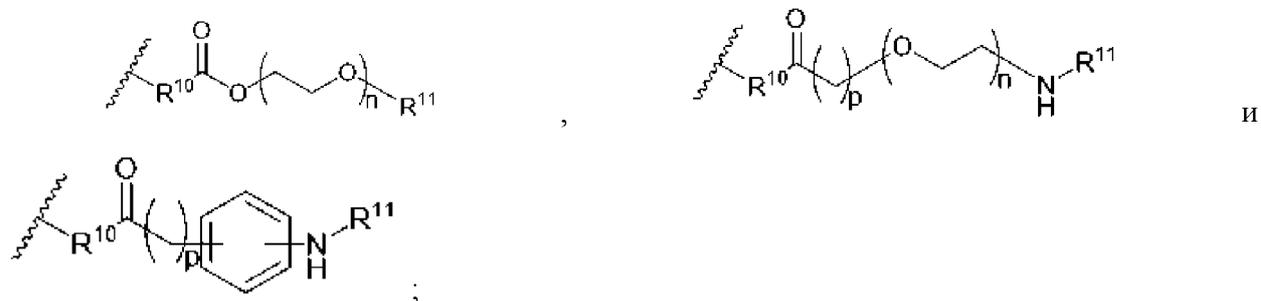
Q представляет собой  $-C(O)(CH_2)_6C(O)-$  или  $-C(O)(CH_2)_2S_2(CH_2)_2C(O)-$ ;

$R^7$  представляет собой  $-(CH_2)_2OC(O)N(R^8)_2$ , где  $R^8$  представляет собой  $-(CH_2)_6NHC(=NH)NH_2$ ;

L выбран из глицина, пролина, W, W-W или  $R^9$ , причем L ковалентно связан посредством амидной связи с N-концом или C-концом J;

W представляет собой  $-C(O)-(CH_2)_m-NH-$ , где m составляет от 2 до 12;

$R^9$  выбран из группы, состоящей из

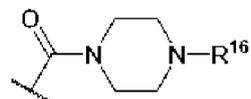


n составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

p составляет 2, 3, 4 или 5;

$R^{10}$  выбран из связи, глицина, пролина, W или W-W;

$R^{11}$  выбран из группы, состоящей из глицина, пролина, W, W-W и

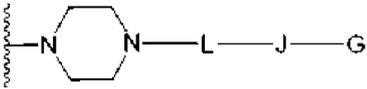


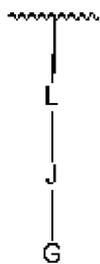
;

$R^{16}$  выбран из связи, глицина, пролина, W или W-W; при этом  $R^{16}$  ковалентно связан посредством амидной связи с N-концом или C-концом J; J представляет собой проникающий в клетку пептид; и

G выбран из H,  $-C(O)C_{1-6}$ алкила, бензоила и стеароила, при этом G ковалентно связан с J;

при условии, что

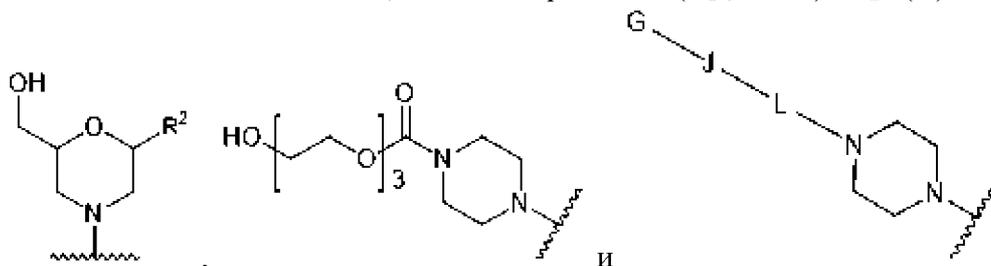
A' представляет собой , или E' представляет собой



22. Конъюгат по п.21, где E' выбран из H,  $-C_{1-6}$ алкила,  $-C(O)C_{1-6}$ алкила, бензоила, стеароила, тритила, монометокситритила, диметокситритила, триметокситритила и



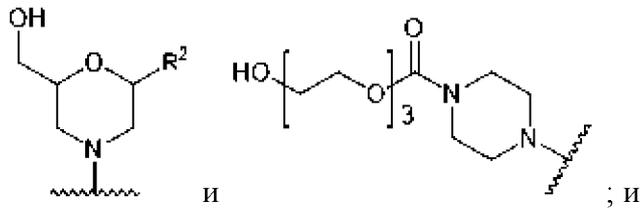
23. Конъюгат по п.21 или 22, где A' выбран из  $-N(C_{1-6}$ алкил) $CH_2C(O)NH_2$ ,



24. Конъюгат по любому из пп. 21-23, где E' выбран из H,  $-C(O)CH_3$ , бензоила, стеароила, тритила, 4-метокситритила и



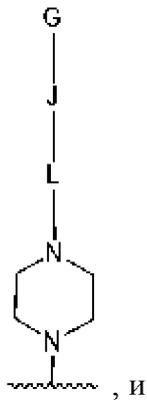
25. Конъюгат по любому из пп. 21-24, где A' выбран из  $-N(C_{1-6}$ алкил) $CH_2C(O)NH_2$ ,



E' представляет собой

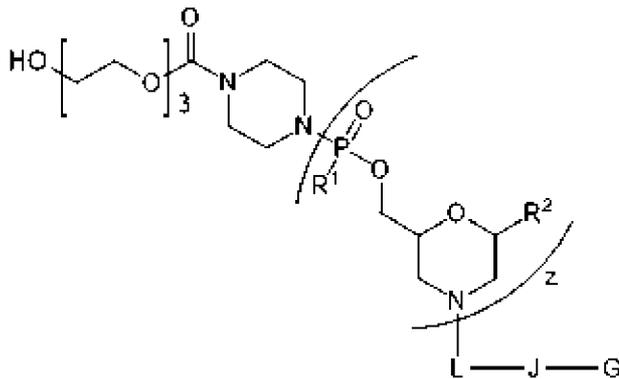


26. Конъюгат по любому из пп. 21-24, где A' представляет собой

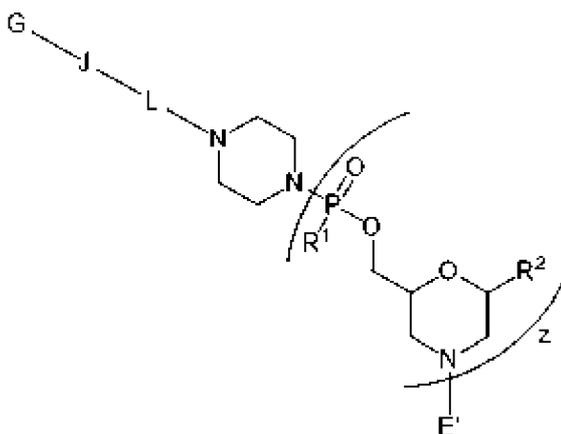


E' выбран из H, -C(O)CH<sub>3</sub>, тритила, 4-метокситритила, бензоила и стеарила.

27. Конъюгат по п.21, где конъюгат пептид-олигонуклеотид формулы IV представляет собой конъюгат пептид-олигонуклеотид, выбранный из



(IVa) и



(IVb),

где E' выбран из H, C<sub>1-6</sub>алкила, -C(O)CH<sub>3</sub>, бензоила и стеароида.

28. Конъюгат по любому из пп. 21-27, где конъюгат представлен формулой (IVa).

29. Конъюгат по любому из пп. 21-27, где конъюгат представлен формулой (IVb).

30. Конъюгат по любому из пп. 21-27, где каждый R<sup>1</sup> представляет собой -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

31. Конъюгат по любому из пп. 21-30, где каждое нуклеиновое основание независимо в каждом случае выбрано из аденина, гуанина, цитозина, 5-метилцитозина, тимина, урацила и гипоксантина.

32. Конъюгат по любому из пп. 21-31, где нацеливающая последовательность содержит последовательности:

i) SEQ ID NO: 4 (CCA GAA GGA AXX XCG AGA AAA GC);

ii) SEQ ID NO: 11 (CTC ACX XXX CTC TCA AAG CAG CTC T);

iii) SEQ ID NO: 12 (ACT CAC XXX XCT CTC AAA GCA GCT C);

iv) SEQ ID NO: 13 (CAC TCA CXX XXC TCT CAA AGC AGC T);

v) SEQ ID NO: 14 (GCA CTC ACX XXX CTC TCA AAG CAG C);

vi) SEQ ID NO: 15 (GCG GCA CTC ACX XXX CTC TCA AAG C);

vii) SEQ ID NO: 16 (GGC GGC ACT CAC XXX XCT CTC AAA G);

где каждый X независимо выбран из гуанина (G) или представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием (B), причем по меньшей мере один X представляет собой B.

33. Конъюгат по любому из пп. 21-33, где нацеливающая последовательность содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

i) SEQ ID NO: 5 (CCA GAA GGA AGG BCG AGA AAA GC);

ii) SEQ ID NO: 6 (CCA GAA GGA AGB GCG AGA AAA GC);

iii) SEQ ID NO: 7 (CCA GAA GGA ABG GCG AGA AAA GC);

iv) SEQ ID NO: 8 (CCA GAA GGA AGB BCG AGA AAA GC);

v) SEQ ID NO: 9 (CCA GAA GGA ABB GCG AGA AAA GC);

vi) SEQ ID NO: 10 (CCA GAA GGA ABG BCG AGA AAA GC);

vii) SEQ ID NO: 17 (GCA CTC ACB GGG CTC TCA AAG CAG C);

viii) SEQ ID NO: 18 (GCA CTC ACG BGG CTC TCA AAG CAG C);

ix) SEQ ID NO: 19 (GCA CTC ACG GBG CTC TCA AAG CAG C);

x) SEQ ID NO: 20 (GCA CTC ACG GGB CTC TCA AAG CAG C);

xi) SEQ ID NO: 21 (GCA CTC ACB BGG CTC TCA AAG CAG C);

xii) SEQ ID NO: 22 (GCA CTC ACG BBG CTC TCA AAG CAG C);

xiii) SEQ ID NO: 23 (GCA CTC ACG GBB CTC TCA AAG CAG C) и

xiv) SEQ ID NO: 24 (GGC GGC ACT CAC GBB GCT CTC AAA G).

34. Конъюгат по любому из пп. 21-33, где L представляет собой глицин.

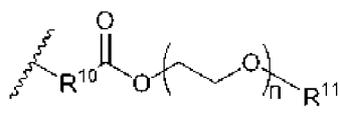
35. Конъюгат по любому из пп. 21-33, где L представляет собой пролин.

36. Конъюгат по любому из пп. 21-33, где L представляет собой  $-C(O)-(CH_2)_5-NH-$ .

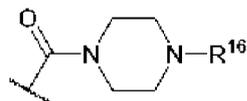
37. Конъюгат по любому из пп. 21-33, где L представляет собой  $-C(O)-(CH_2)_2-NH-$ .

38. Конъюгат по любому из пп. 21-33, где L представляет собой  $-C(O)-(CH_2)_2-NH-C(O)-(CH_2)_5-NH-$ .

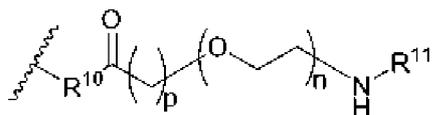
39. Конъюгат по любому из пп. 21-33, где L представляет собой



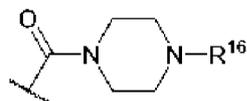
;  $R^{10}$  представляет собой связь; и  $R^{11}$  выбран из глицина и



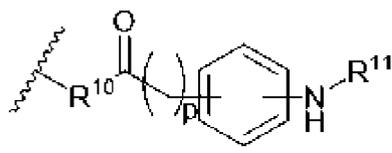
40. Конъюгат по любому из пп. 21-33, где L представляет собой



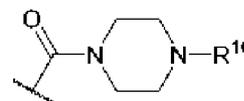
;  $R^{10}$  представляет собой связь; и  $R^{11}$  выбран из глицина и



41. Конъюгат по любому из пп. 21-33, где L представляет собой



$R^{10}$  представляет собой связь; и  $R^{11}$  выбран из глицина и



42. Конъюгат по любому из пп. 21-39, где J выбран из гТАТ, ТАТ,  $R_9F_2$ ,  $R_5F_2R_4$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_8$ ,  $R_9$ ,  $(RXR)_4$ ,  $(RXR)_5$ ,  $(RXRRBR)_2$ ,  $(RAR)_4F_2$ ,  $(RGR)_4F_2$ .

43. Конъюгат по любому из пп. 21-42, где G выбран из H,  $C(O)CH_3$ , бензоила и стеароила.

44. Конъюгат по любому из пп. 21-43, где G представляет собой H или  $-C(O)CH_3$ .

45. Конъюгат по любому из пп. 21-44, где G представляет собой H.

46. Конъюгат по любому из пп. 21-44, где G представляет собой  $-C(O)CH_3$ .

47. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по любому из пп. 1-46 или

его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

48. Способ лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата по любому из пп. 1-46 или фармацевтической композиции по п.47.

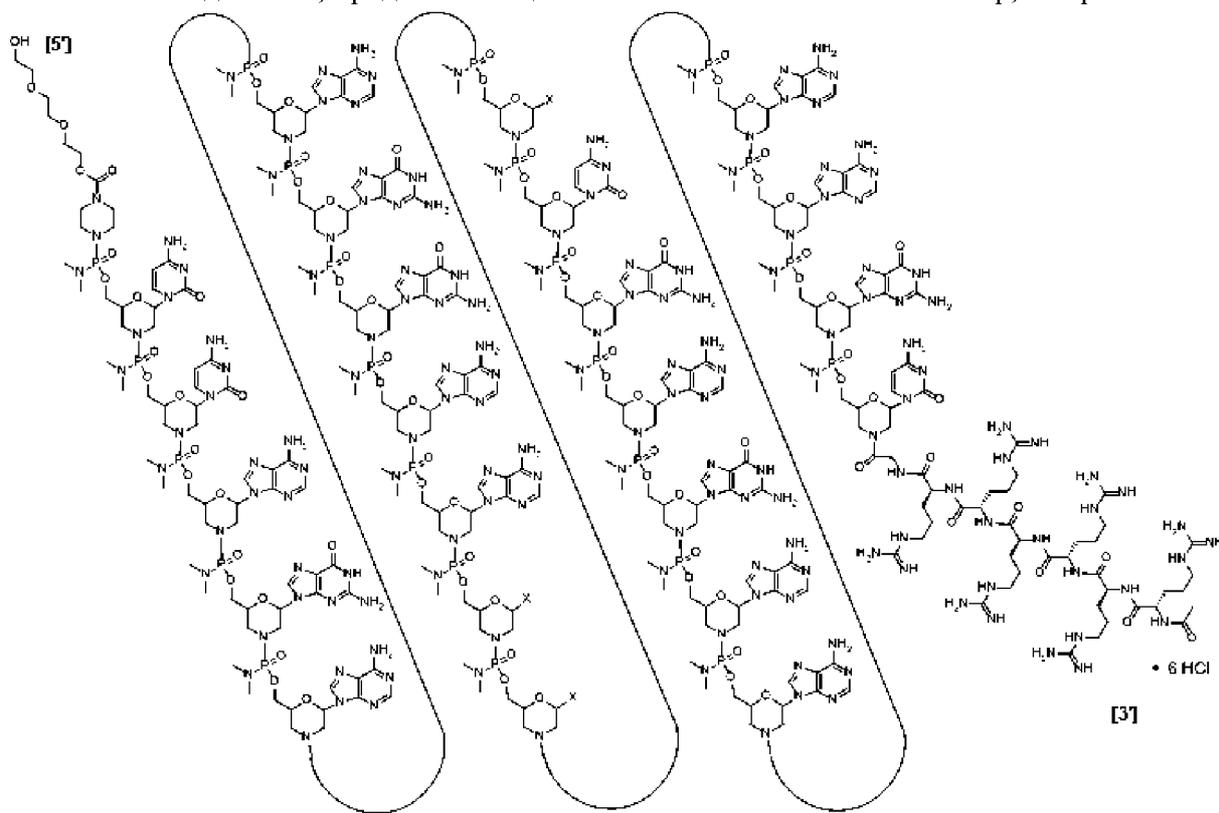
49. Способ по п.48, где заболевание представляет собой болезнь Помпе.

50. Способ по п.48, где субъект является человеком.

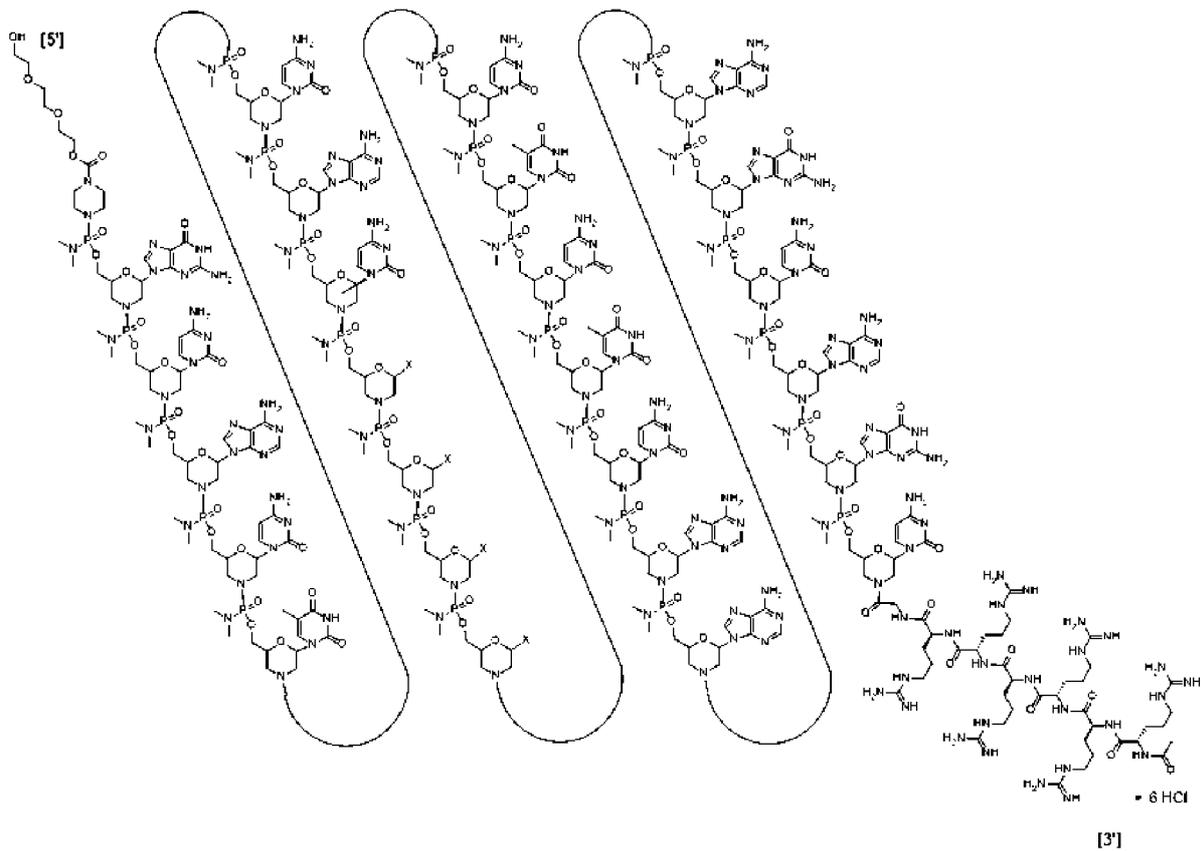
51. Способ по п.50, где человек является ребенком.

52. Способ по п.50, где человек является взрослым человеком.

53. Соединение, представляющее собой антисмысловой олигомер, выбранное из



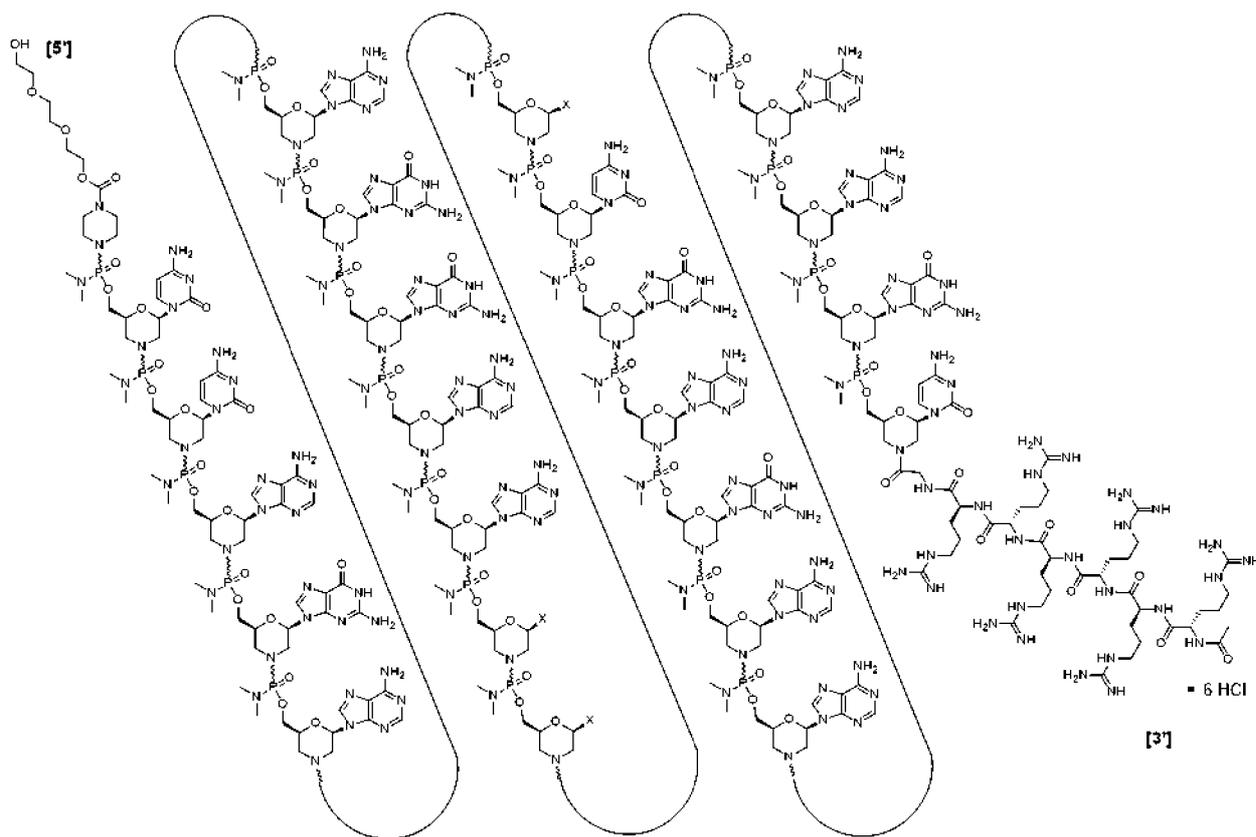
(Va) и



(Vc),

где каждый X независимо выбран из гуанина (G) или представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием (B), причем по меньшей мере один X представляет собой B.

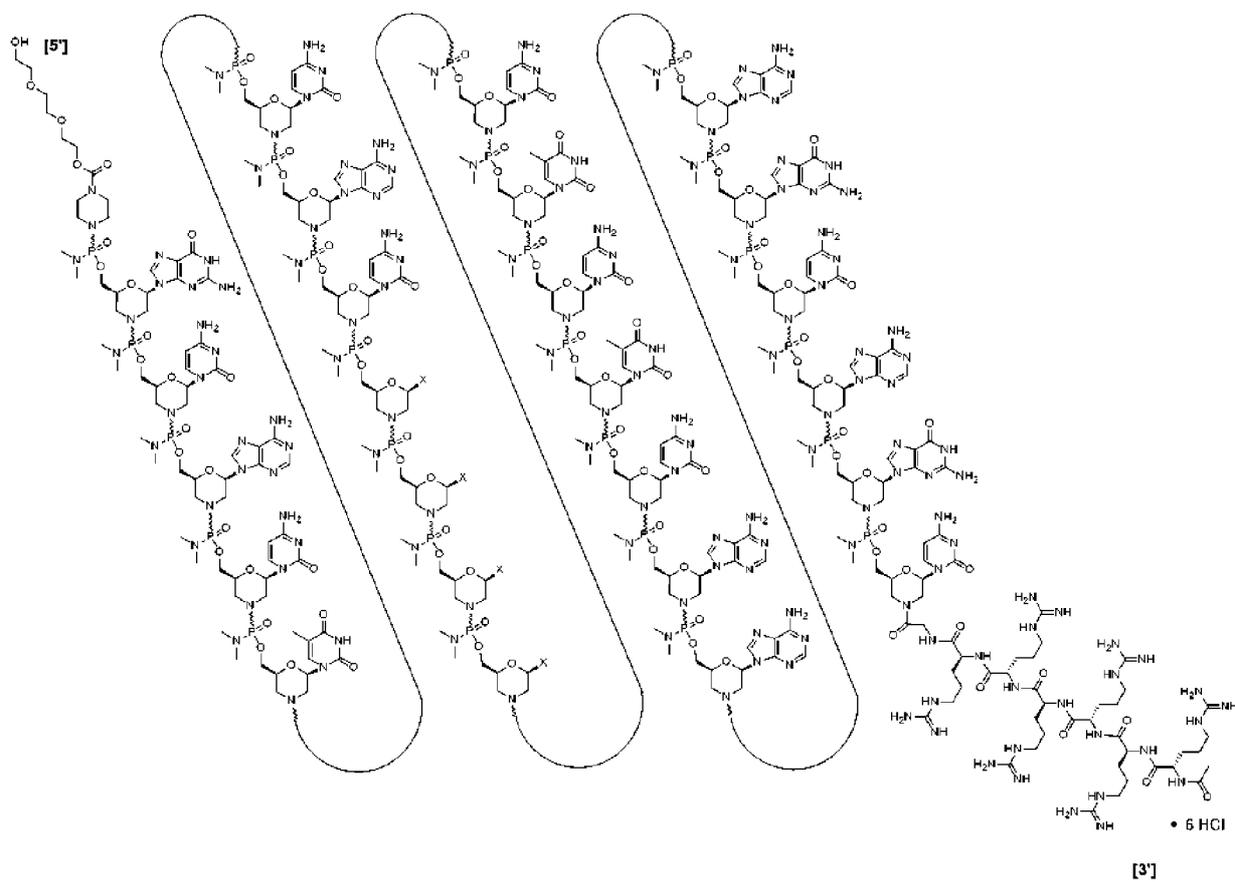
54. Соединение, представляющее собой антисмысловой олигомер, по п.53, где соединение, представляющее собой антисмысловой олигомер, представляет собой



(Vb),

где каждый X независимо выбран из гуанина (G) или представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием (B), причем по меньшей мере один X представляет собой B.

55. Соединение, представляющее собой антисмысловой олигомер, по п.53, где соединение, представляющее собой антисмысловой олигомер, представляет собой

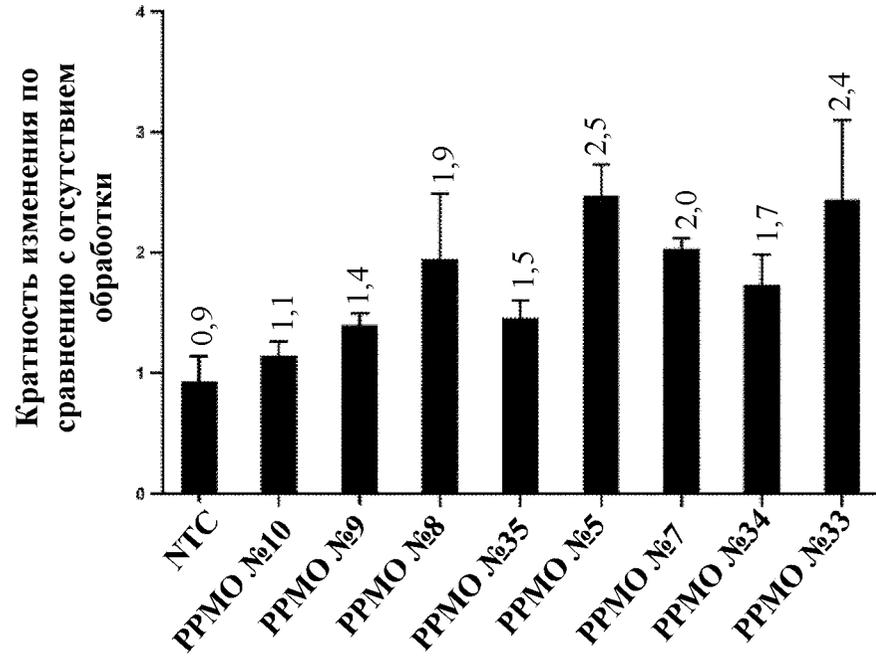


где каждый X независимо выбран из гуанина (G) или представляет собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием (B), причем по меньшей мере один X представляет собой B.

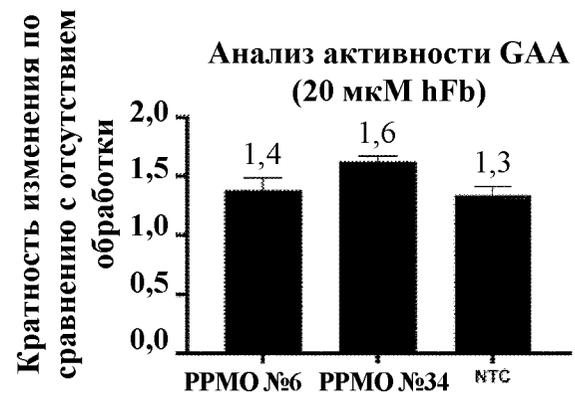
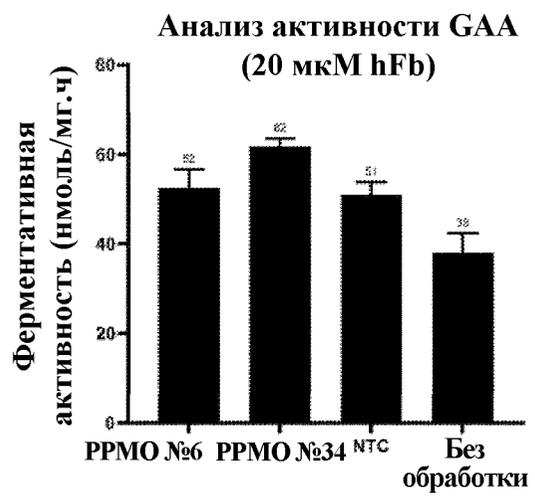
В одном варианте осуществления B представляет собой H.

По доверенности

### Анализ активности ГАА (10 мкМ hFb)

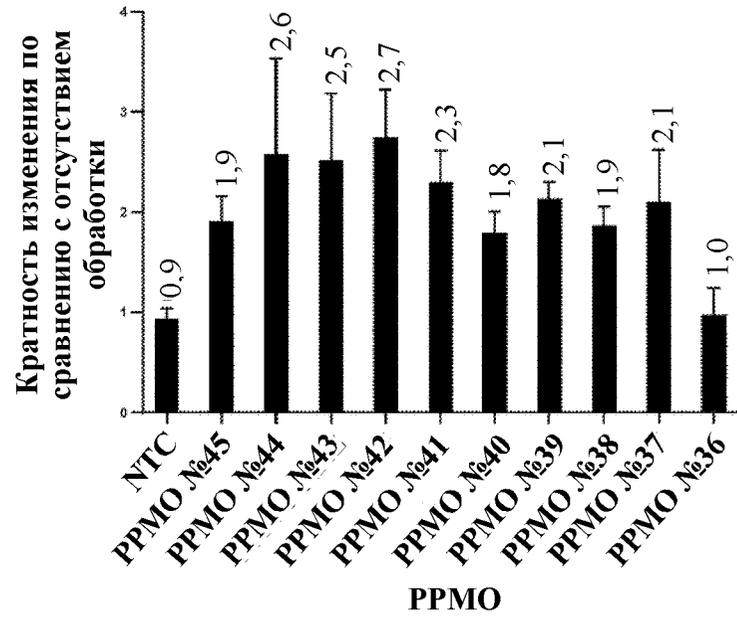


Фиг. 1



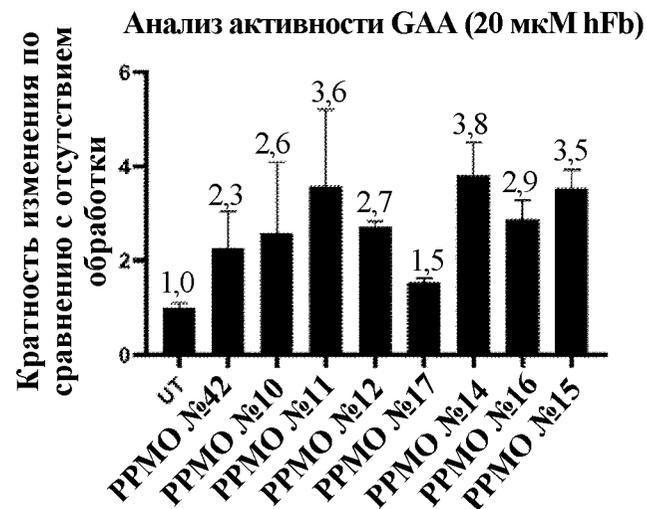
Фиг. 2

Анализ активности GAA (10 мкМ hFb)

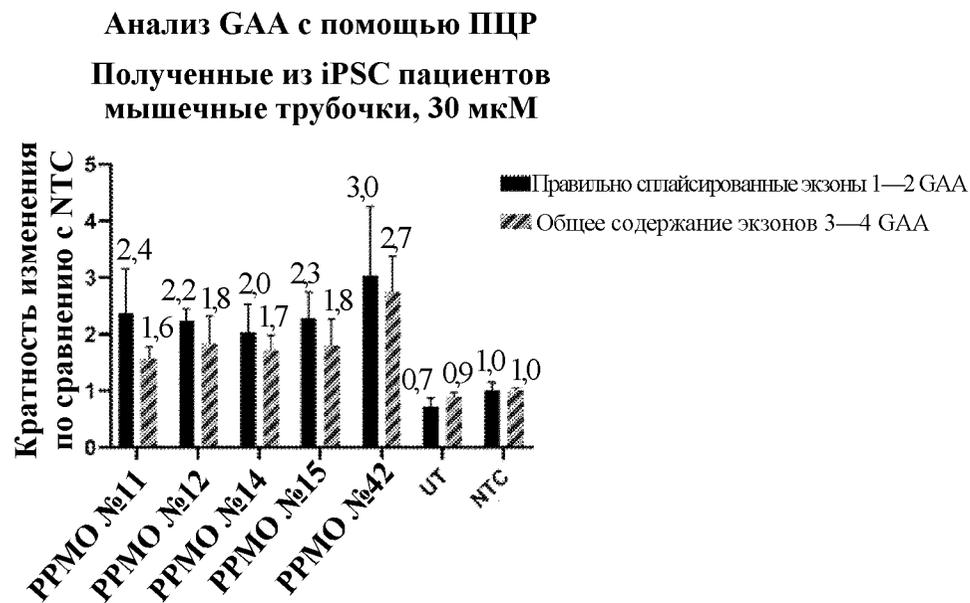


Фиг. 3

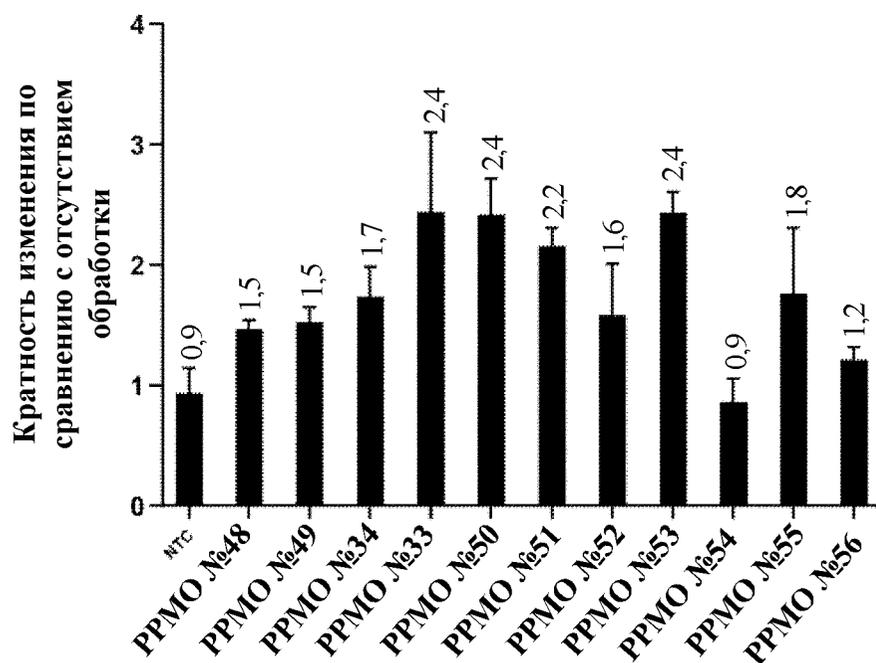
Фиг. 4А



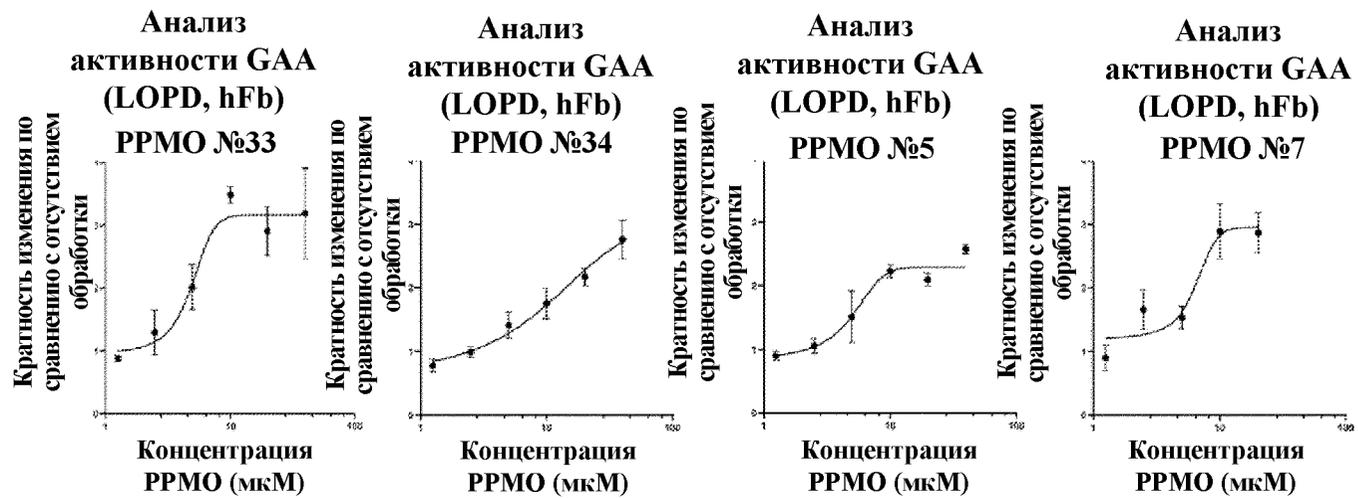
Фиг. 4В



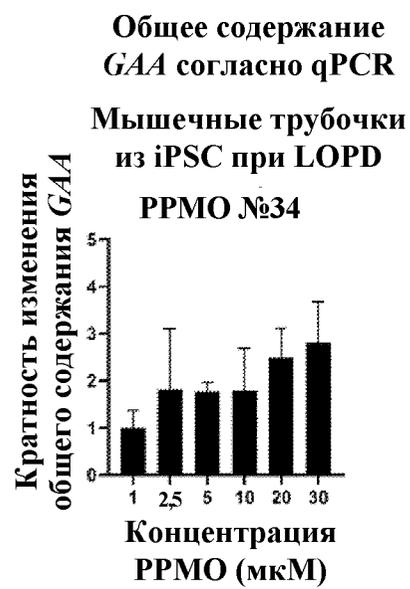
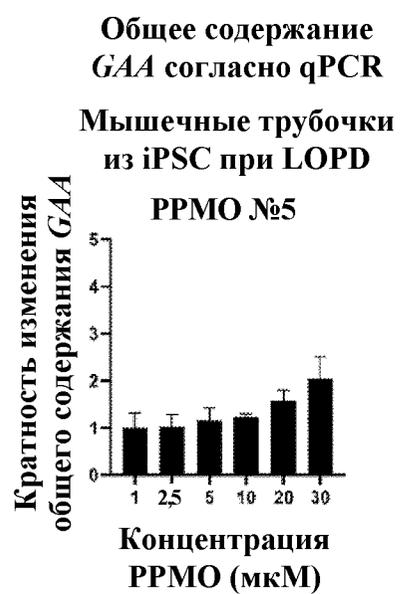
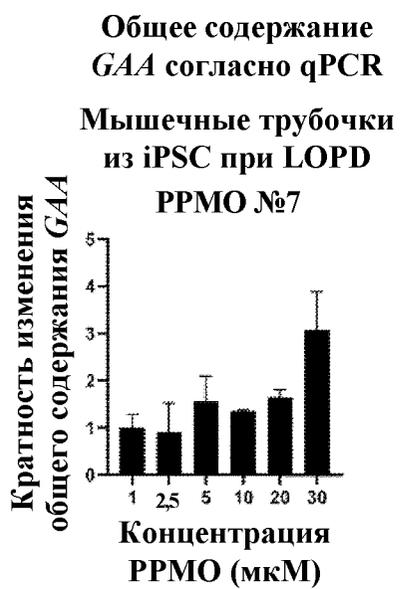
Анализ активности GAA (LOPD, 10 мкМ hFb)



Фиг. 5

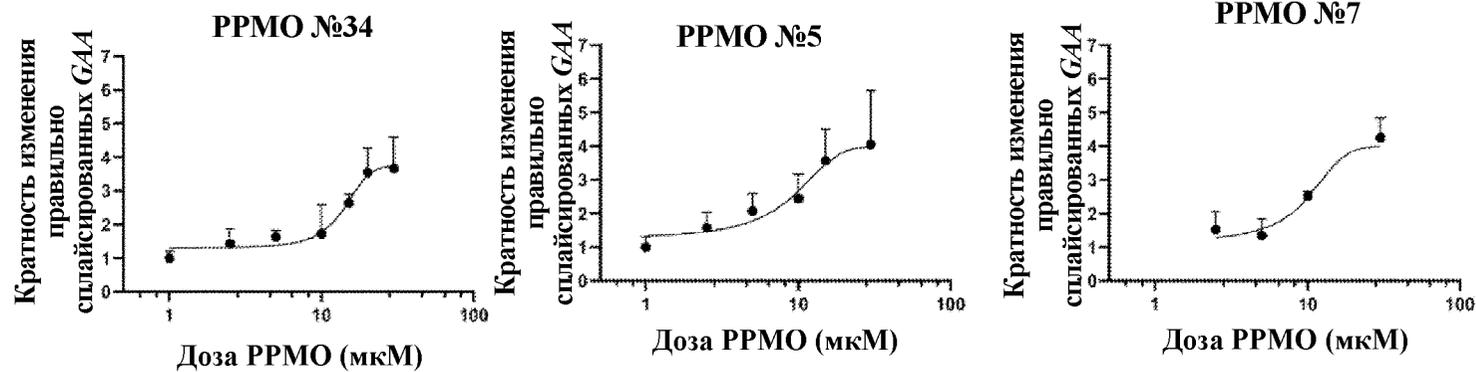


Фиг. 6

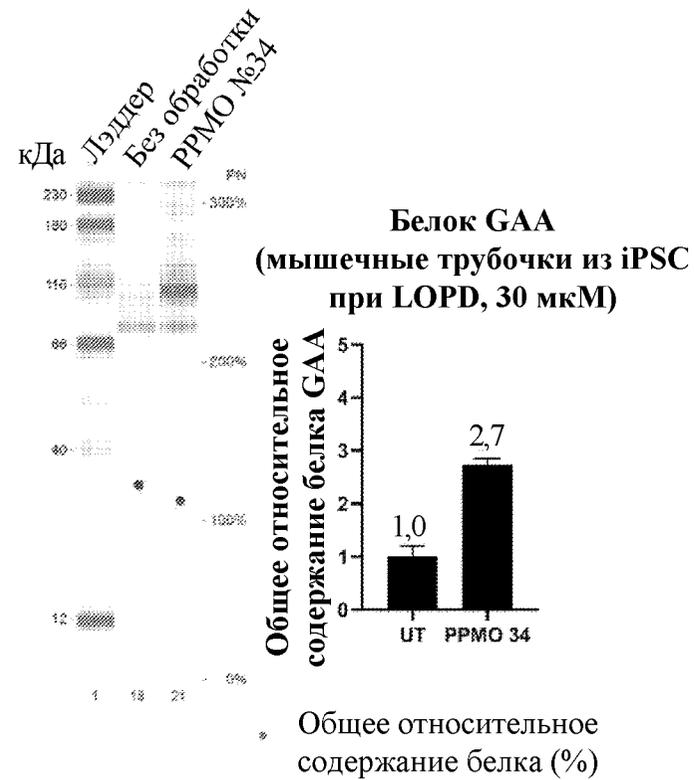
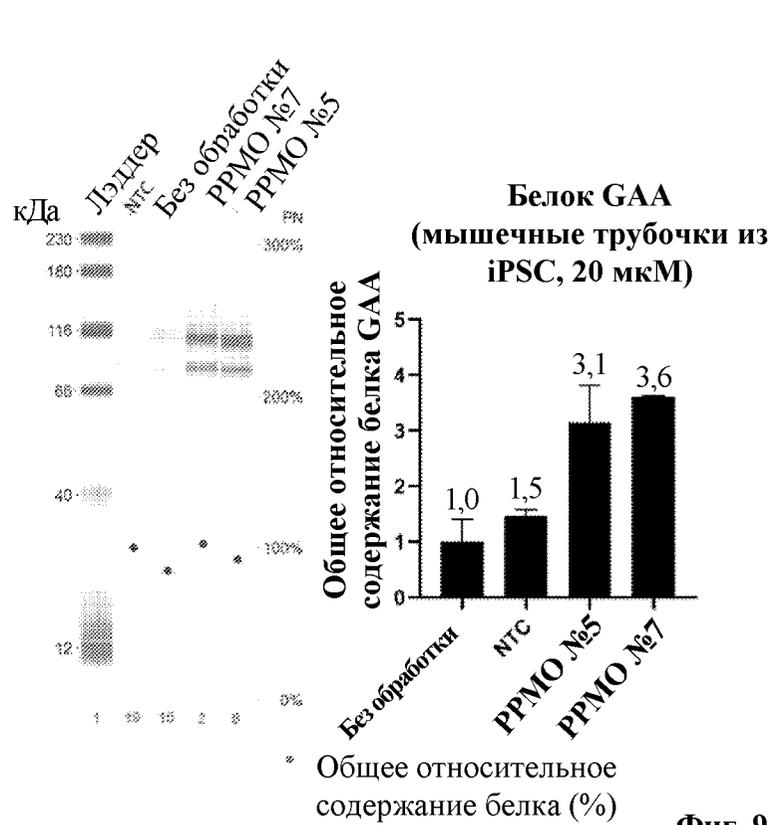


Фиг. 7

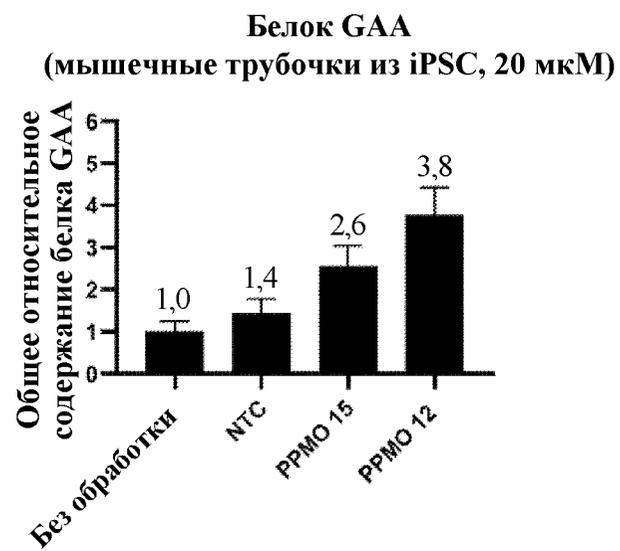
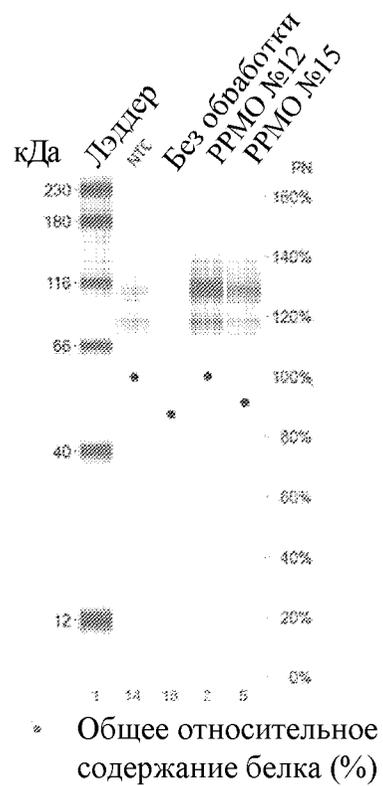
Правильно сплайсированные *GAA* согласно qPCR  
(мышечные трубочки из iPSC при LOPD)



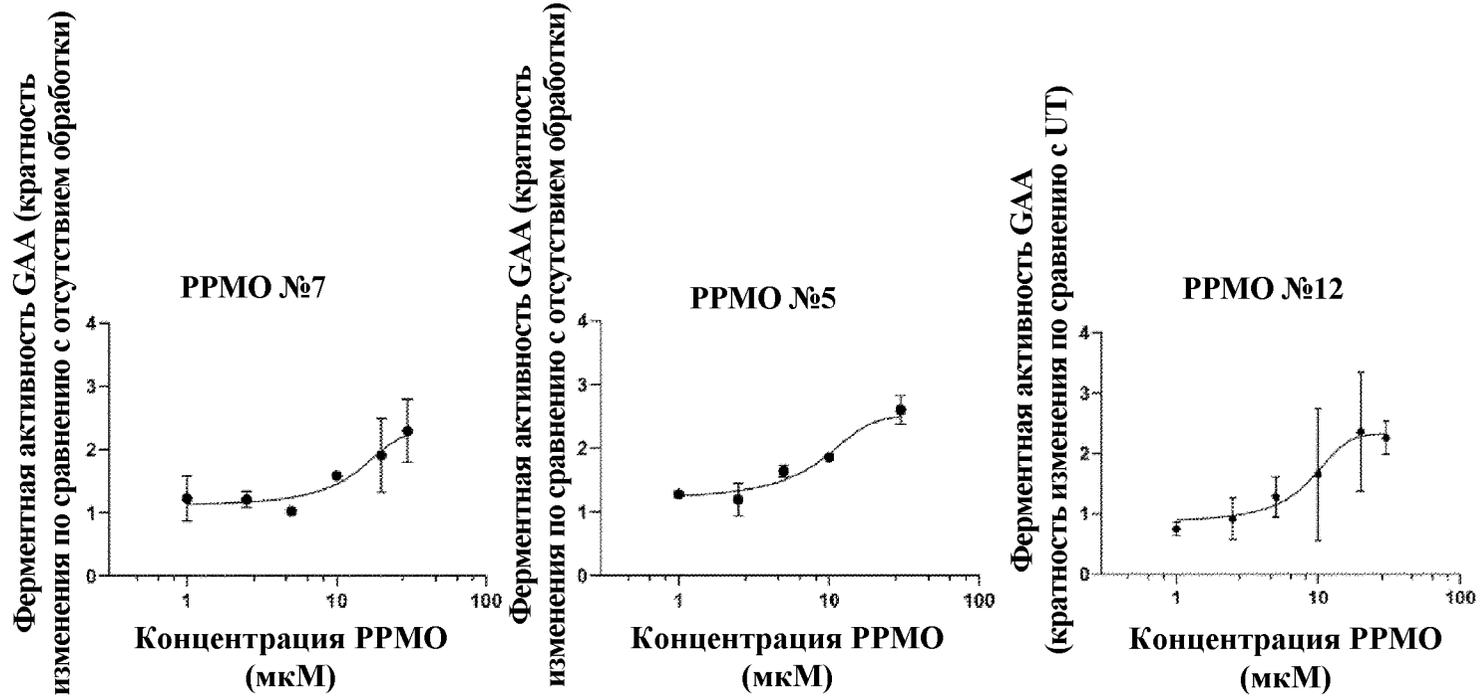
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11

### РРМО №33

### РРМО №34

### РРМО №7

Результаты		Размер (д.нм):	Интенсивность, %:	Ст. откл. (д.нм):	
Z-среднее значение (д.нм):	559,2	Пик 1:	514,2	91,1	103,7
PdI:	0,391	Пик 2:	3,214	8,9	0,5291
Точка пересечения:	0,733	Пик 3:	0,000	0,0	0,000

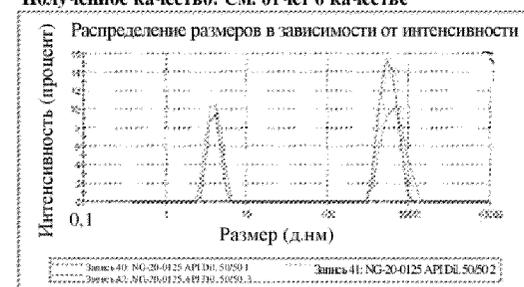
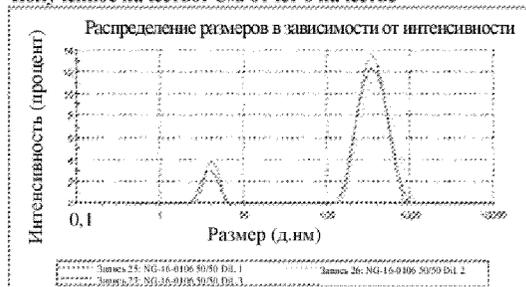
Результаты		Размер (д.нм):	Интенсивность, %:	Ст. откл. (д.нм):	
Z-среднее значение (д.нм):	153,1	Пик 1:	369,9	86,9	128,5
PdI:	0,862	Пик 2:	4,253	13,1	0,7256
Точка пересечения:	0,742	Пик 3:	0,000	0,0	0,000

Результаты		Размер (д.нм):	Интенсивность, %:	Ст. откл. (д.нм):	
Z-среднее значение (д.нм):	97,72	Пик 1:	668,1	57,7	208,9
PdI:	0,564	Пик 2:	4,062	42,3	0,8453
Точка пересечения:	0,581	Пик 3:	0,000	0,0	0,000

Полученное качество: См. отчет о качестве

Полученное качество: См. отчет о качестве

Полученное качество: См. отчет о качестве



Фиг. 12