



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej
Polskiej

(96) Data i numer zgłoszenia patentu europejskiego:
14.03.2014 14723583.2

(97) O udzieleniu patentu europejskiego ogłoszono:
**26.12.2018 Europejski Biuletyn Patentowy 2018/52
EP 2970964 B1**

(13) **T3**
(51) Int.Cl.
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)

(54) Tytuł wynalazku:

Kompozycje pomijające eksony do leczenia dystrofii mięśniowej

(30) Pierwszeństwo:
14.03.2013 US 201361782706 P

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
20.01.2016 w Europejskim Biuletynie Patentowym nr 2016/03

(45) O złożeniu tłumaczenia patentu ogłoszono:
28.06.2019 Wiadomości Urzędu Patentowego 2019/06

(73) Uprawniony z patentu:
Sarepta Therapeutics, Inc., Cambridge, US

(72) Twórca(y) wynalazku:
RICHARD K. BESTWICK, Bend, US
DIANE ELIZABETH FRANK, Seattle, US

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Marcin Maćkowski
JWP RZECZNIICY PATENTOWI DOROTA RZAŻEWSKA SP.K.
Sienna Center
ul. Żelazna 28/30
00-833 Warszawa

PL/EP 2970964 T3

Uwaga:

W ciągu dziewięciu miesięcy od publikacji informacji o udzieleniu patentu europejskiego, każda osoba może wnieść do Europejskiego Urzędu Patentowego sprzeciw dotyczący udzielonego patentu europejskiego. Sprzeciw wnosi się w formie uzasadnionego na piśmie oświadczenia. Uważa się go za wniesiony dopiero z chwilą wniesienia opłaty za sprzeciw (Art. 99 (1) Konwencji o udzielaniu patentów europejskich).

Kompozycje pomijające eksony do leczenia dystrofii mięśniowej

Opis

DZIEDZINA WYNAŁAZKU

[0001] Wynalazek dotyczy nowych antysensownych związków i kompozycji odpowiednich do ułatwiania pominięcia eksonów w ludzkim genie dystrofiny. Zapewnia również sposoby indukowania pominięcia eksonu z zastosowaniem nowych kompozycji antysensownych przystosowanych do zastosowania w sposobach według wynalazku.

TŁO WYNAŁAZKU

[0002] Technologie antysensowne są opracowywane z zastosowaniem szeregu chemii, aby wpływać na ekspresję genów na różnych poziomach (transkrypcja, splicing, stabilność, translacja). Wiele z tych badań skupiło się na zastosowaniu związków antysensownych do korekcji lub kompensacji nieprawidłowych lub związanych z chorobą genów w szerokim zakresie wskazań. Częsteczki antysensowne są zdolne do hamowania ekspresji genów ze swoistością, a z tego powodu wiele wysiłków badawczych dotyczących oligonukleotydów jako modulatorów ekspresji genów skupiło się na hamowaniu ekspresji docelowych genów lub funkcji elementów działających w układzie cis. Antysensowne oligonukleotydy są zazwyczaj skierowane przeciwko RNA, albo nici sensownej (np. mRNA), albo nici ujemnej w przypadku niektórych wirusowych cząsteczek RNA. Aby osiągnąć pożądaną regulację w dół genu, oligonukleotydy ogólnie sprzyjają rozpadowi docelowego mRNA, blokują translację mRNA lub blokują funkcję elementów RNA działających w układzie cis, tym samym skutecznie zapobiegając syntezie docelowego białka *de novo* lub replikacji wirusowego RNA.

[0003] Jednak takie techniki nie są przydatne, gdy celem jest regulacja w górę wytwarzania natywnego białka lub kompensacja mutacji, które indukują przedwczesne zakończenie translacji, takich jak mutacje nonsensowne lub zmieniające ramkę odczytu. W tych przypadkach wadliwy transkrypt genów nie powinien podlegać ukierunkowanej degradacji ani hamowaniu sterycznemu, dlatego chemia antysensownego oligonukleotydu nie powinna sprzyjać rozpadowi docelowego mRNA lub blokować translacji.

[0004] W różnych chorobach genetycznych wpływ mutacji na końcową ekspresję genu można modulować przez ukierunkowane pominięcie eksonu podczas splicingu. Splicing jest kierowany przez złożoną wieloskładnikową maszynę, która zbliża sąsiadujące połączenia ekson-intron w pre-mRNA w bliskim sąsiedztwie i przeprowadza rozszczepianie wiązań fosfodiesterowych na końcach intronów z ich późniejszą rearanżacją między eksonami, które mają podlegać splicingowi razem. Ten złożony i wysoce precyzyjny sposób jest mediowany przez motywy sekwencji w pre-mRNA, które są względnie krótkimi, częściowo zakonserwowanymi segmentami RNA, z którymi wiążą się różne czynniki splicingowe, które są następnie zaangażowane w reakcje wiązania w splicingu. Zmieniając sposób, w jaki maszyna splicingu odczytuje lub rozpoznaje motywy uczestniczące w przetwarzaniu pre-mRNA, możliwe jest tworzenie cząsteczek mRNA podlegających różnemu splicingowi. Stwierdzono, że większość genów ludzkich podlega alternatywnemu splicingowi podczas

normalnej ekspresji genów, chociaż nie zidentyfikowano mechanizmów. Bennett i wsp. (Patent USA nr 6,210,892) opisują modulację antysensowną przetwarzania komórkowego mRNA dzikiego typu z zastosowaniem antysensownych analogów oligonukleotydów, które nie indukują cięcia docelowego RNA mediowanego przez RNAzę H. Jest to przydatne w stosunku do możliwości tworzenia mRNA o alternatywnym splicingu, które nie mają specyficznych eksonów (np. jak opisali Sazani, Kole i wsp. 2007) do wytwarzania rozpuszczalnych receptorów nadrodziny TNF, które nie mają eksonów kodujących domeny rozciągające się przez błonę.

[0005] W przypadkach, w których normalnie funkcjonujące białko jest przedwcześnie zakończone z powodu mutacji w nim, okazało się, że środki do przywracania wytwarzania niektórych funkcjonalnych białek przez technologię antysensowną są możliwe dzięki interwencji podczas splicingu i, że jeśli eksony związane z mutacjami wywołującymi chorobę mogą być swoiście usuwane z niektórych genów, czasami można wytworzyć skrócony produkt białkowy, który ma podobne właściwości biologiczne natywnego białka lub ma wystarczającą aktywność biologiczną, aby złagodzić chorobę wywołaną przez mutacje związane z eksonem (patrz np. Sierakowska, Sambade i wsp. 1996; Wilton, Lloyd i wsp. 1999; van Deutekom, Bremmer-Bout i wsp. 2001; Lu, Mann i wsp. 2003; Aartsma-Rus, Janson i wsp. 2004). Kole i wsp. (patenty USA nr 5,627,274; 5,916,808; 5,976,879; i 5,665,593) ujawniają sposoby zwalczania nieprawidłowego splicingu z zastosowaniem zmodyfikowanych analogów antysensownych oligonukleotydów, które nie sprzyjają rozpadowi docelowego pre-mRNA. Bennett i wsp. (patent USA nr 6,210,892) opisują modulację antysensowną przetwarzania komórkowego mRNA dzikiego typu również z zastosowaniem antysensownych analogów oligonukleotydów, które nie indukują cięcia docelowego RNA mediowanego przez RNAzę H.

[0006] Sposób docelowego pominięcia eksonu prawdopodobnie będzie szczególnie przydatny w długich genach, gdzie występuje wiele eksonów i intronów, gdzie występuje nadmiar w genetycznej budowie eksonów lub gdy białko jest zdolne do funkcjonowania bez jednego lub więcej konkretnych eksonów. Wysiłki zmierzające do przekierowania przetwarzania genów w leczeniu chorób genetycznych związanych ze skróceniami spowodowanymi mutacjami w różnych genach skupiły się na zastosowaniu antysensownych oligonukleotydów, które albo: (1) całkowicie lub częściowo pokrywają się z elementami zaangażowanymi w splicing; lub (2) wiążą się z pre-mRNA w pozycji wystarczająco blisko elementu, aby przerwać wiązanie i funkcję czynników splicingowych, które normalnie pośredniczą w konkretnej reakcji splicingu, która występuje w tym elemencie.

[0007] Dystrofia mięśniowa Duchenne'a (DMD) jest spowodowana defektem ekspresji białka dystrofiny. Gen kodujący białko zawiera 79 eksonów rozproszonych na ponad 2 milionach nukleotydów DNA. Dowolna mutacja eksonów, która zmienia ramkę odczytu eksonu lub wprowadza kodon stop lub charakteryzuje się usunięciem całego eksonu lub eksonów poza ramką lub duplikacją jednego lub większej liczby eksonów, może zaburzyć wytwarzanie funkcjonalnej dystrofiny, w wyniku czego powstaje DMD.

[0008] Stwierdzono, że mniej ciężka postać dystrofii mięśniowej, dystrofia mięśniowa Beckera (ang. Becker muscular dystrophy - BMD) powstaje tam, gdzie mutacja, zazwyczaj delecja

jednego lub więcej eksonów, skutkuje prawidłową ramką odczytu wzdłuż całego transkryptu dystrofiny, tak że translacja mRNA na białko ulega przedwczesnej terminacji. Jeżeli łączenie eksonów znajdujących się w górę i w dół w przetwarzaniu zmutowanego pre-mRNA dystrofiny utrzymuje prawidłową ramkę odczytu genu, wynikiem jest mRNA kodujący białko z krótką wewnętrzną delecją, które zachowuje pewną aktywność, dając w rezultacie fenotyp Beckera.

[0009] Przez wiele lat wiadomo było, że delecje eksonu lub eksonów, które nie zmieniają ramki odczytu białka dystrofiny, mogą prowadzić do fenotypu BMD, podczas gdy delecja eksonu, która powoduje przesunięcie ramki, da początek DMD (Monaco, Bertelson i wsp. 1988). Ogólnie mutacje dystrofiny, w tym mutacje punktowe i delecje eksonów, które zmieniają ramkę odczytu i tym samym przerywają prawidłową translację białka, skutkują DMD. Należy również zauważyć, że niektórzy pacjenci z BMD i DMD mają delecje eksonów obejmujące wiele eksonów.

[0010] Opisano modulację zmutowanego splicingu pre-mRNA zmutowanej dystrofiny z antysensownymi oligorybonukleotydamি zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* (patrz np. Matsuo, Masumura i wsp. 1991; Takeshima, Nishio i wsp. 1995; Pramono, Takeshima i wsp. 1996; Dunckley, Eperon i wsp. 1997; Dunckley, Manoharan i wsp. 1998; Errington, Mann i wsp. 2003).

[0011] Pierwszy przykład swoistego i odtwarzalnego pomijania eksonu w mysim modelu *mdx* został opisany przez Wiltona *i wsp.* (Wilton, Lloyd i wsp. 1999). Przez skierowanie cząsteczki antysensownej do miejsca splicingu donora, w mRNA dystrofiny spójnie i wydajnie indukowano pomijanie eksonu 23 w ciągu 6 godzin od traktowania hodowanych komórek. Wilton *i wsp.* opisują również obieranie za cel regionu akceptora mysiego pre-mRNA dystrofiny za pomocą dłuższych oligonukleotydów antysensownych. Podczas gdy pierwszy antysensowny oligonukleotyd skierowany na miejsce splicingu donorowego intronu 23 wywoływał spójne pomijanie eksonu w pierwotnie hodowanych mioblastach, okazało się, że związek ten jest znacznie mniej skuteczny w unieśmiertnionych hodowlach komórkowych ekspresujących wyższe poziomy dystrofiny. Jednak dzięki udoskonalonemu celowaniu i projektowi antysensownego oligonukleotydu skuteczność usuwania swoistych eksonów wzrosła o prawie rząd wielkości (Mann, Honeyman i wsp. 2002).

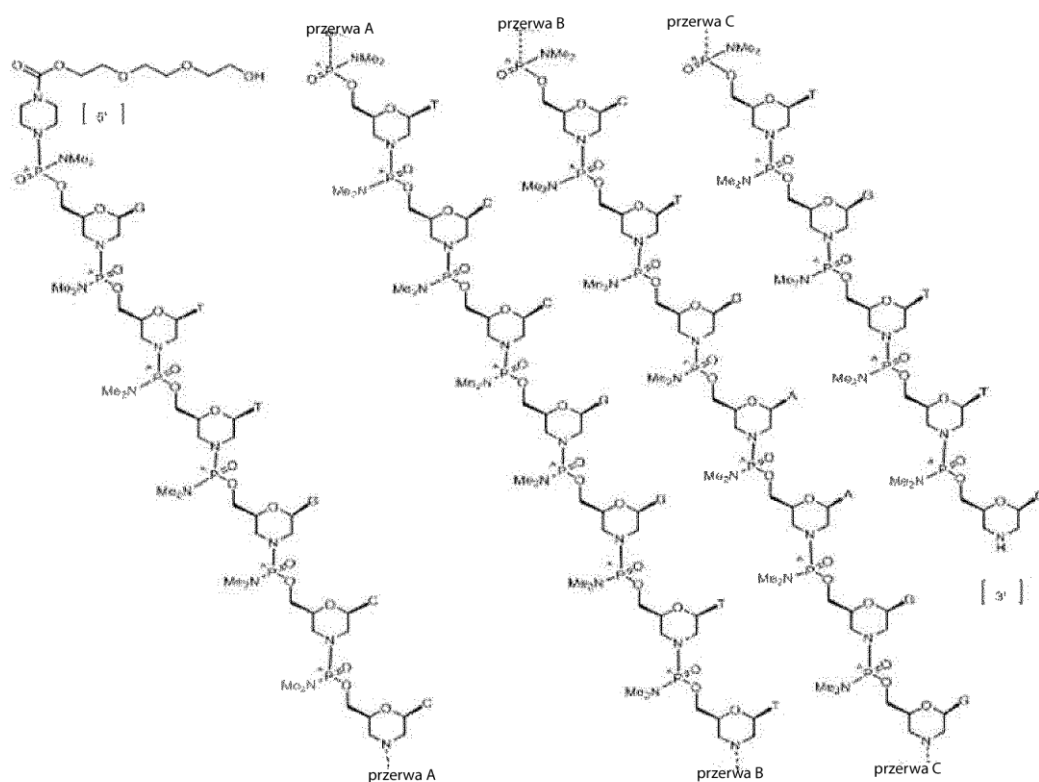
[0012] Niedawne badania zaczęły zajmować się wyzwaniem uzyskania przedłużonej ekspresji dystrofiny, której towarzyszy minimalny niekorzystny wpływ na tkanki dotknięte brakiem dystrofiny. Wstrzyknięcie domięśniowe oligonukleotydu antysensownego skierowanego do eksonu 51 (PRO051) do mięśnia piszczelowego przedniego u czterech pacjentów z DMD spowodowało swoiste pominięcie eksonu 51 bez żadnych klinicznie widocznych działań niepożądanych (Mann, Honeyman i wsp. 2002; van Deutekom, Janson i wsp. 2007). Badania dotyczące systemowego dostarczania antysensownego fosfordiamidowego oligomeru morfolino sprzężonego z peptydem penetrującym komórki (PPMO) skierowanym na ekson 23 u myszy *mdx* wytwarzały wysokie i podtrzymywane wytwarzanie białka dystrofiny w mięśniach szkieletowych i mięśniu sercowym bez wykrywalnej toksyczności (Jearawiriyapaisarn, Moulton i wsp. 2008; Wu, Moulton i wsp. 2008; Yin, Moulton i wsp. 2008).

[0013] Ostatnie badania kliniczne testujące bezpieczeństwo i skuteczność oligonukleotydów przełączania splicingu (ang. splice switching oligonucleotides - SSO) do leczenia DMD są oparte na technologii SSO do wywołania alternatywnego splicingu pre-mRNA przez blokowanie sterycznego spliceosomu (Cirak *i wsp.*, 2011; Goemans *i wsp.*, 2011, Kinali *i wsp.*, 2009, van Deutekom *i wsp.*, 2007).

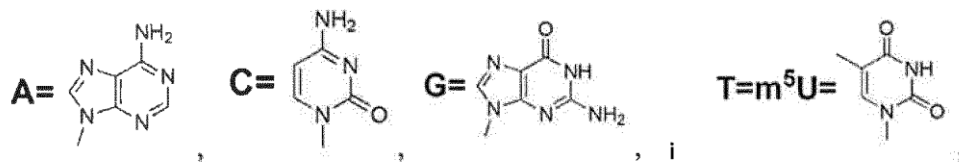
[0014] Pomimo tych sukcesów, nadal istnieje zapotrzebowanie na ulepszone antysensowne oligomery ukierunkowane na wiele eksonów dystrofiny i ulepszone kompozycje dostarczające i sposoby zastosowań terapeutycznych w DMD.

PODSUMOWANIE WYNAŁAZKU

[0015] Wynalazek zapewnia antysensownego oligonukleotydu o następującej strukturze:

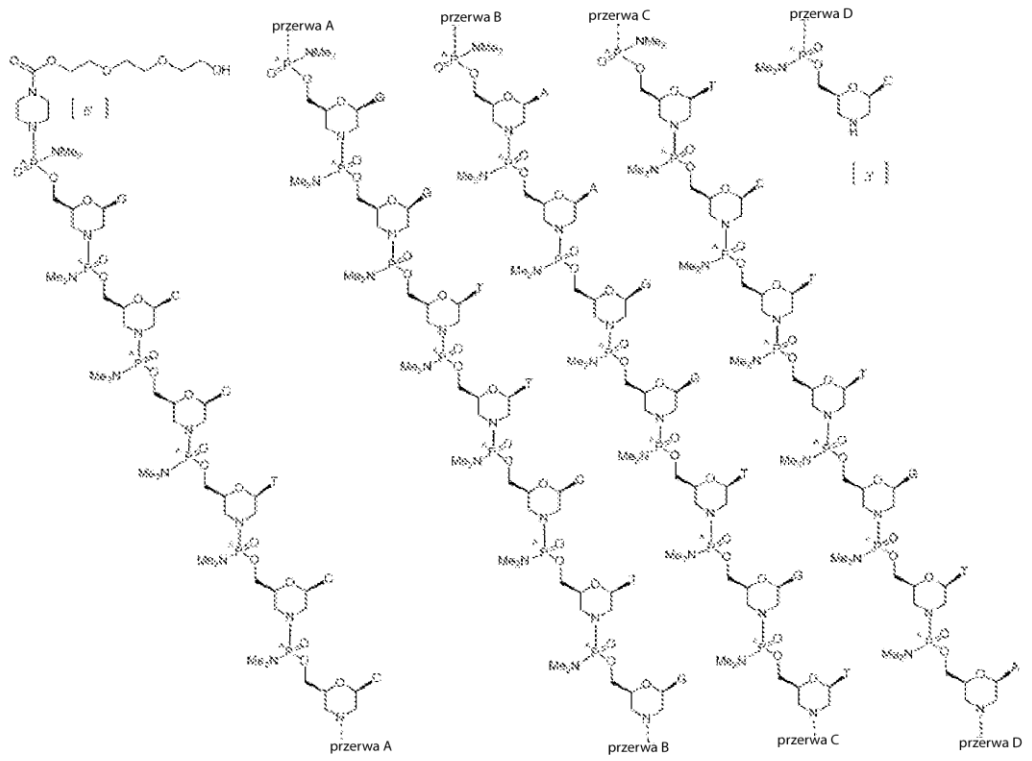


przy czym

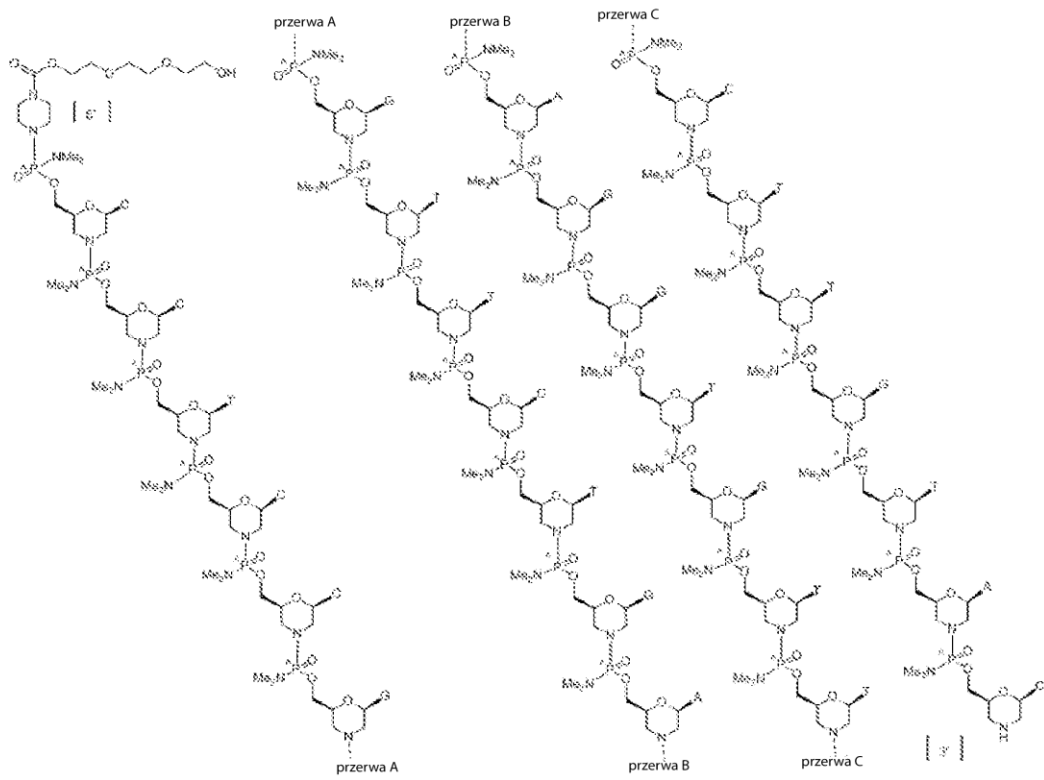


przy czym \wedge = stereochemia centrum fosforu nie jest zdefiniowana; lub jego farmaceutycznie dopuszczalną sól.

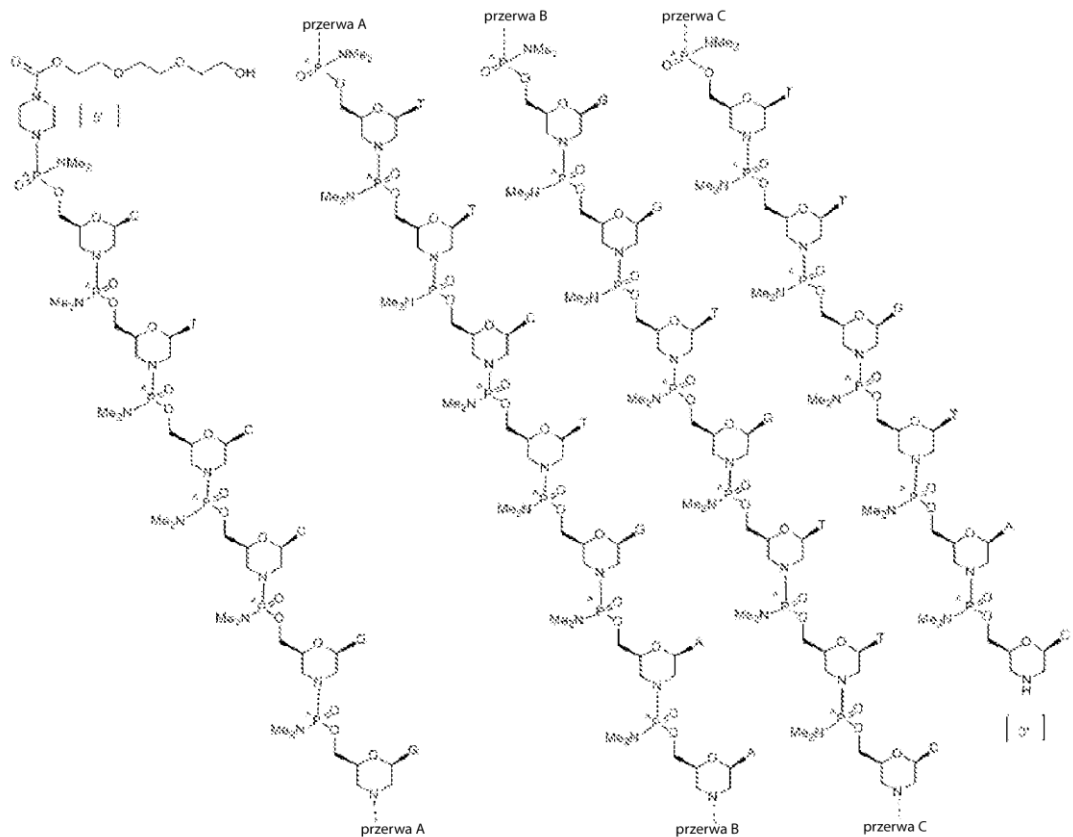
[0016] Wynalazek zapewnia również kompozycję farmaceutyczną zawierającą antysensowny oligonukleotyd według wynalazku i farmaceutycznie dopuszczalny nośnik.



H53A(+30+57),



H53A(+30+56) i



H53A(+30+55).

[0021] Zgodnie z jednym aspektem, wynalazek zapewnia cząsteczkę antysensowną zdolną do wiązania wybranego celu w pre-mRNA ludzkiej dystrofiny, do indukcji pominięcia eksonu.

[0022] Ujawnienie obejmuje sekwencje antysensowne skierowane na ekson 53, zidentyfikowane poniżej.

H53A(+36+60): 5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3' (SEQ ID NO:1)

[0023] Antysensowny oligomer swoiście hybryduje z miejscem przyłączenia H53A (+36+60) i ma sekwencję: SEQ ID NO: 1.

[0024] Antysensowny oligonukleotyd według wynalazku jest chemicznie połączony z ugrupowaniem glikolu polietylenowego.

[0025] W innym aspekcie wynalazek zapewnia kompozycje farmaceutyczne, które zawierają antysensowne oligonukleotydy według wynalazku i roztwór soli fizjologicznej, który zawiera bufor fosforanowy.

[0026] W innym aspekcie wynalazek zapewnia cząsteczkę antysensowną, jak tu zdefiniowano, do stosowania w leczeniu pacjenta cierpiącego na chorobę genetyczną, w której występuje mutacja w genie kodującym określone białko, a wpływ mutacji może zostać zniesiony przez pominięcie eksonu. Leczenie obejmuje następujące etapy: (a) wybór cząsteczki antysensownej zgodnie z opisanymi tu sposobami; i (b) podawanie cząsteczki pacjentowi potrzebującemu takiego leczenia.

[0027] W innym aspekcie, wynalazek zapewnia również kompozycję farmaceutyczną według wynalazku do stosowania w leczeniu dystrofii mięśniowej Duchenne'a.

[0028] Te i inne przedmioty i cechy będą bardziej zrozumiałe, gdy poniższy szczegółowy opis zostanie odczytany w połączeniu z figurami.

KRÓTKI OPIS FIGUR

[0029]

Fig. 1A pokazuje przykładową strukturę oligomeru morfolinowego z wiązaniem fosforodiamidowym;

Fig. 1B pokazuje koniugat peptydu bogatego w argininę i antysensownego oligomeru.

Fig. 1C pokazuje koniugat jak na fig. 1B (nie według wynalazku), przy czym wiązania szkieletowe zawierają jedną lub więcej dodatkowo naładowanych grup.

Fig. 1D-G przedstawiają powtarzający się segment podjednostki przykładowych oligonukleotydów morfolinowych oznaczonych D do G.

Fig. 2A-2B przedstawia schemat reakcji otrzymywania linkera do syntezy w fazie stałej i stałego nośnika do syntezy oligomerów.

Fig. 3 przedstawia wykres pokazujący względne aktywności przykładowych antysensownych oligomerów do indukowania pominięcia eksonu 53 w hodowanych pierwotnych mioblastach. RNA wyizolowane z pierwotnych mioblastów traktowanych wskazanymi oligomerami poddano amplifikacji nested RT-PCR swoistej dla eksonu 53, a następnie elektroforezie żelowej i kwantyfikacji natężenia pasma. Dane wykreślono jako % pominięcie eksonu, jak oceniono za pomocą PCR, tj. natężenie pasma pominiętego eksonu produktu w stosunku do produktu PCR pełnej długości.

Fig. 4 przedstawia wykres pokazujący względne aktywności przykładowych antysensownych oligomerów do indukowania pominięcia eksonu 53 w hodowanych komórkach ludzkiego mięśniakomięśaka prążkowanokomórkowego. RNA wyizolowane z komórek mięśniakomięśaka prążkowanokomórkowego traktowanych wskazanymi oligomerami poddano amplifikacji nested RT-PCR swoistej dla eksonu 53, a następnie elektroforezie żelowej i kwantyfikacji natężenia pasma. Dane wykreślono jako % pominięcie eksonu, jak oceniono za pomocą PCR, tj. natężenie pasma pominiętego eksonu produktu w stosunku do produktu PCR pełnej długości.

Fig. 5A-B przedstawia wykresy pokazujące względne aktywności przykładowych antysensownych oligomerów do indukowania pominięcia eksonu 53 w hodowanych pierwotnych mioblastach. RNA wyizolowane z pierwotnych mioblastów traktowanych wskazanymi oligomerami poddano amplifikacji nested RT-PCR swoistej dla eksonu 53, a następnie elektroforezie żelowej i kwantyfikacji natężenia pasma. Dane wykreślono jako % pominięcie eksonu, jak oceniono za pomocą PCR, tj. natężenie pasma pominiętego eksonu produktu w stosunku do produktu PCR pełnej długości.

SZCZEGÓŁOWY OPIS WYNALAZKU

[0030] Przykłady wykonania wynalazku dotyczą ogólnie ulepszonych związków antysensownych i sposobów ich stosowania, które są swoście zaprojektowane do indukowania pomijania eksonu w ludzkim genie dystrofiny. Dystrofina odgrywa istotną rolę w funkcjonowaniu mięśni, a różne choroby związane z mięśniami charakteryzują się zmutowanymi postaciami tego genu. Wobec tego opisane tu ulepszone związki antysensowne indukują pominięcie eksonu w zmutowanych postaciach ludzkiego genu dystrofiny, takich jak zmutowane geny dystrofiny stwierdzone w dystrofii mięśniowej Duchenne'a (DMD) i dystrofii mięśniowej Beckera (BMD).

[0031] Z powodu nieprawidłowych epizodów splicingu mRNA spowodowanych przez mutacje, te zmutowane geny ludzkiej dystrofiny albo ekspresują uszkodzone białko dystrofiny albo nie ekspresują w ogóle żadnej mierzalnej dystrofiny, jest to stan, który prowadzi do różnych postaci dystrofii mięśniowej. Aby zaradzić temu stanowi, związki antysensowne według wynalazku hybrydują do wybranych regionów wstępnie przetworzonego RNA zmutowanego genu ludzkiej dystrofiny, indukują pominięcie eksonu i różnicowy splicing w tym podlegającym inaczej nieprawidłowemu splicingowi mRNA dystrofiny, a tym samym umożliwiają komórkom mięśniowym wytwarzanie transkryptu mRNA, który koduje funkcjonalne białko dystrofiny. W niektórych przykładach wykonania uzyskane białko dystrofiny niekoniecznie jest postacią dystrofiny typu „dzikiego”, a raczej jest skróconą, ale funkcjonalną lub półfunkcjonalną postacią dystrofiny.

[0032] Zwiększając poziomy funkcjonalnego białka dystrofiny w komórkach mięśniowych, te i pokrewne przykłady wykonania są przydatne w profilaktyce i leczeniu dystrofii mięśniowej, zwłaszcza tych postaci dystrofii mięśniowej, takich jak DMD i BMD, które charakteryzują się ekspresją wadliwych białek dystrofiny z powodu nieprawidłowego splicingu mRNA. Opisane tu swoiste oligomery zapewniają ponadto ulepszone ukierunkowanie swoiste wobec eksonu dystrofiny w stosunku do innych stosowanych oligomerów i tym samym oferują istotne i praktyczne zalety w porównaniu z alternatywnymi sposobami leczenia odpowiednich postaci dystrofii mięśniowej.

[0033] Ujawniony tutaj oligomer antysensowny ma listę sekwencji o SEQ ID NO: 1 określoną poniżej:

H53A(+36+60): 5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3' (SEQ ID NO: 1)

[0034] O ile nie zdefiniowano inaczej, wszystkie zastosowane terminy techniczne i naukowe mają to samo znaczenie, jak powszechnie rozumiane przez znawców dziedziny, do której należy wynalazek. Pomimo tego, że w praktyce lub badaniu według wynalazku można zastosować dowolne sposoby i materiały podobne do lub równoważne opisanym tutaj, opisane są tu korzystne sposoby i materiały. Dla celów wynalazku poniżej definiuje się następujące terminy:

I. Definicje

[0035] Przez „około” rozumie się ilość, poziom, wartość, liczbę, częstotliwość, procent, rozmiar, wielkość, ilość, wagę lub długość, która zmienia się aż o 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6,

5, 4, 3, 2 lub 1% względem referencyjnej ilości, poziomu, wartości, liczby, częstotliwości, wartości procentowej, wymiaru, rozmiaru, ilości, wagi lub długości.

[0036] Terminy „komplementarny” i „komplementarność” dotyczą polinukleotydów (tj. sekwencji nukleotydów) związanych z regułami parowania zasad. Na przykład sekwencja „T-G-A (5'-3'”) jest komplementarna do sekwencji „T-C-A (5'3'”). Komplementarność może być „częściowa”, w której tylko niektóre z zasad kwasów nukleinowych są dopasowane zgodnie z zasadami parowania zasad. Lub może występować „całkowita” lub „pełna” komplementarność między kwasami nukleinowymi. Stopień komplementarności pomiędzy niemi kwasu nukleinowego ma istotny wpływ na wydajność i siłę hybrydyzacji między niemi kwasu nukleinowego. Chociaż często pożądana jest doskonała komplementarność, niektóre przykłady wykonania mogą zawierać jedno lub więcej, ale korzystnie 6, 5, 4, 3, 2 lub 1 niedopasowanie w odniesieniu do docelowego RNA. Uwzględniono różne warianty w obrębie oligomeru. W niektórych przykładach wykonania, zmiany sekwencji blisko końców oligomeru są na ogół lepsze niż zmiany we wnętrzu i jeśli występują, zazwyczaj znajdują się w obrębie około 6, 5, 4, 3, 2 lub 1 nukleotydów końca 5' i/lub 3'.

[0037] Terminy „peptyd penetrujący komórkę” i „CPP” (ang. cell penetrating peptide) są stosowane zamiennie i dotyczą kationowych peptydów penetrujących komórki, zwanych również peptydami transportowymi, peptydami nośnikowymi lub peptydowymi domenami transdukcyjnymi. Peptydy, jak pokazano, mają zdolność indukowania penetracji komórek w 100% komórek danej populacji komórek i umożliwiają translokację makrocząsteczkową w wielu tkankach *in vivo* po podaniu ogólnoustrojowym. Korzystnym przykładem wykonania CPP jest peptyd bogaty w argininę, jak opisano dalej poniżej.

[0038] Terminy „oligomer antysensowny” i „związek antysensowny” i „oligonukleotydy antysensowny” są stosowane zamiennie i dotyczą sekwencji podjednostek cyklicznych, z których każda zawiera grupę parującą zasadę, połączonych wiązaniami między podjednostkami, które pozwalają ugrupowaniom parowania zasad hybrydyzację z sekwencją docelową w kwasie nukleinowym (zazwyczaj RNA) przez parowanie zasad Watsona-Cricka, dla utworzenia heterodupleksu kwas nukleinowy:oligomer w obrębie sekwencji docelowej. Cykliczne podjednostki są oparte na rybozie lub innym cukrze pentozowym lub, w korzystnym przykładzie wykonania, na grupie morfolinowej (patrz opis oligomerów morfolinowych poniżej). Oligomer może mieć komplementarność dokładną lub zbliżoną do sekwencji docelowej; zmiany w sekwencji w pobliżu końców oligomeru są na ogół lepsze niż zmiany wewnątrz.

[0039] Taki antysensowny oligomer może być zaprojektowany do blokowania lub hamowania translacji mRNA lub do hamowania naturalnego przetwarzania splicingu pre-mRNA i można powiedzieć, że jest „skierowany do” lub „skierowany przeciwko” sekwencji docelowej, z którą hybryduje. Docelową sekwencją jest zazwyczaj region obejmujący kodon start AUG mRNA, oligomer tłumiący translację (ang. Translation Suppressing Oligomers) lub miejsce splicingu wstępnie przetworzonego mRNA, oligomer tłumiący splicing (ang. Splice Suppressing Oligomer - SSO). Sekwencja docelowa dla miejsca splicingu może zawierać sekwencję mRNA mającą jej koniec 5' do około 25 par zasad poniżej normalnego połączenia akceptorowego

splicingu we wstępnie przetworzonym mRNA. Korzystną docelową sekwencją jest dowolny region wstępnie przetworzonego mRNA, który obejmuje miejsce splicingu lub jest zawarty całkowicie w obrębie sekwencji kodującej ekson lub obejmuje miejsce akceptorowe lub donorowe splicingu. Ogólnie mówiąc, oligomer jest „skierowany przeciwko” biologicznie istotnemu celowi, takiemu jak białko, wirus lub bakteria, gdy jest skierowany przeciwko kwasowi nukleinowemu celu w sposób opisany powyżej.

[0040] Terminy „oligomer morfolinowy” lub „PMO” (oligomer morfolinowy fosforoamidany lub fosfordiamidany) dotyczą analogu oligonukleotydu złożonego z podjednostek morfolinowych, gdzie (i) struktury są połączone ze sobą za pomocą wiązań zawierających fosfor, o długości od jednego do trzech atomów, korzystnie dwóch atomów i korzystnie nienaładowane lub kationowe, łączące azot morfolinowy jednej podjednostki z 5' egzocyklicznym węglem sąsiedniej podjednostki i (ii) każdy pierścień morfolinowy przenosi purynowe lub pirymidynowe ugrupowanie parowania zasad skutecznie wiążące, przez wiązanie wodorowe specyficzne względem zasady, z zasadą w polinukleotydzie. Patrz, na przykład struktura na fig. 1A, która pokazuje korzystny typ wiązania fosfordiamidowego. Termin „struktura pierścienia morfolinowego” można stosować w sposób korzystny w terminach „podjednostka morfolinowa”. Zawieszony atom azotu przyłączony do fosforu jest dipodstawiony metylem. Ugrupowanie parowania zasad purynowych lub pirymidynowych to adenina, cytozyna, guanina lub tymina. Synteza, struktury i właściwości wiążące oligomerów morfolino są szczegółowo opisane w patentach US nr 5,698,685, 5,217,866, 5,142,047, 5,034,506, 5,166,315, 5,521,063, 5,506,337, 8,076,476, 8,299,206 i 7,943,762 (wiązania kationowe). Zmodyfikowane wiązania między podjednostkami i grupami końcowymi są szczegółowo opisane w zgłoszeniu PCT US2011/038459 i publikacji WO/2011/150408.

[0041] Określenie „podjednostka aminokwasowa” lub „reszta aminokwasowa” może dotyczyć reszty α -aminokwasowej (-CO-CHR-NH-) lub reszty β lub innej aminokwasowej (*np.*, -CO-(CH₂)_nCHR-NH-), przy czym R oznacza łańcuch boczny (który może obejmować wodór), a n oznacza 1 do 6, korzystnie 1 do 4.

[0042] Termin „naturalnie występujący aminokwas” dotyczy aminokwasu występującego w białkach występujących w przyrodzie. Termin „nienaturalne aminokwasy” dotyczy tych aminokwasów, które nie występują w białkach występujących w naturze, przykłady obejmują beta-alaninę (β -Ala), kwas 6-aminoheksanowy (Ahx) i kwas 6-aminopentanowy.

[0043] „Ekson” dotyczy określonej sekcji kwasu nukleinowego, która koduje białko lub sekwencję kwasu nukleinowego, która jest przedstawiona w dojrzałej postaci cząsteczki RNA po usunięciu za pomocą splicingu dowolnej spośród części wstępnie przetworzonego (lub prekursorowego) RNA. Dojrzała cząsteczka RNA może być informacyjnym RNA (mRNA) lub funkcjonalną postacią niekodującego RNA, taką jak rRNA lub tRNA. Ludzki gen dystrofiny ma około 79 eksonów.

[0044] „Intron” dotyczy regionu kwasu nukleinowego (w obrębie genu), który nie ulega translacji do białka. Intron jest sekcją niekodującą, która jest transkrybowana do

prekursorowego mRNA (pre-mRNA), a następnie usuwana przez splicing podczas tworzenia dojrzałego RNA.

[0045] „Skuteczna ilość” lub „terapeutycznie skuteczna ilość” dotyczy ilości związku terapeutycznego, takiego jak antysensowny oligomer, podawanego osobnikowi będącemu ssakiem, albo jako pojedyncza dawka, albo jako część serii dawek, która jest skuteczna wytwarzając pożądaną efekt terapeutyczny. W przypadku oligomeru antysensownego efekt ten zwykle uzyskuje się przez zahamowanie translacji lub naturalnego przetwarzania splicingowego wybranej sekwencji docelowej.

[0046] „Pominięcie eksonu” dotyczy ogólnie sposobu, za pomocą którego cały ekson lub jego część jest usuwany z danego wstępnie przetworzonego RNA, a tym samym jest wykluczony z obecności w dojrzałym RNA, takim jak dojrzały mRNA, który ulega translacji do białka. W związku z tym część białka, która jest inaczej kodowana przez pominięty ekson, nie jest obecna w eksprymowanej postaci białka, zazwyczaj tworząc zmienioną, choć wciąż funkcjonalną, postać białka. W niektórych przykładach wykonania pomijany ekson jest nieprawidłowym eksonem z genu ludzkiej dystrofiny, który może zawierać mutację lub inną zmianę w jego sekwencji, która w przeciwnym razie powoduje nieprawidłowy splicing. W pewnych przykładach wykonania pomijany ekson jest dowolnym jednym lub większą liczbą eksonów 1-79 genu dystrofiny, chociaż preferowany jest ekson 53 ludzkiego genu dystrofiny.

[0047] „Dystrofina” jest pałeczkowatym białkiem cytoplazmatycznym i istotną częścią kompleksu białkowego, która łączy cytoskielet włókna mięśniowego z otaczającą macierzą zewnątrzkomórkową przez błonę komórkową. Dystrofina zawiera wiele domen funkcjonalnych. Na przykład, dystrofina zawiera domenę wiążącą aktynę w okolicy aminokwasów 14-240 i centralną domenę prętową w okolicy aminokwasów 253-3040. Ta duża domena centralna jest utworzona przez 24 podobne do spektryny elementy potrójnie helikalne o około 109 aminokwasach, które mają homologię do alfa-aktyniny i spektryny. Powtórzenia są zwykle przerywane przez cztery niepowtarzalne segmenty bogate w prolinę, określane również jako regiony zawiasowe. Powtórzenia 15 i 16 są rozdzielone 18-aminokwasowym ciągiem, który wydaje się zapewniać główne miejsce dla proteolitycznego rozszczepienia dystrofiny. Identyczność sekwencji pomiędzy większością powtórzeń wynosi 10-25%. Jedno powtórzenie zawiera trzy alfa-helisy: 1, 2 i 3. Alfa-helisy 1 i 3 są uformowane przez 7 spiralnych zakrętów każda, prawdopodobnie oddziaływujących jako podwójna skrętka (ang. coiled-coil) przez połączenie hydrofobowe. Alfa-helisa 2 ma bardziej złożoną strukturę i jest utworzona przez segmenty czterech i trzech spiralnych zwojów, oddzielonych resztą glicyny lub proliny. Każde powtórzenie jest kodowane przez dwa eksony, zwykle przerwane intronem pomiędzy aminokwasami 47 i 48 w pierwszej części alfa-helisy 2. Inny intron znajduje się w różnych pozycjach powtórzenia, zwykle rozproszonych na helisie-3. Dystrofina zawiera również domenę bogatą w cysteinę w okolicy aminokwasów 3080-3360), w tym segment bogaty w cysteinę (tj. 15 cystein w 280 aminokwasach) wykazujący homologię z domeną C-końcową alfa-aktyniny śluzowca (*Dictyostelium discoideum*). Domena karboksy-końcowa znajduje się w okolicy aminokwasów 3361-3685.

[0048] Koniec aminowy dystrofiny wiąże się z aktyną F, a koniec karboksylowy wiąże się z kompleksem białkowym związanym z dystrofiną (DAPC) przy sarkolemnie. DAPC obejmuje dystroglikany, sarkoglikany, integryny i kaweolinę, a mutacje przy dowolnym z tych składników powodują autosomalnie odziedziczone dystrofie mięśniowe. DAPC ulega destabilizacji, gdy dystrofina jest nieobecna, co powoduje zmniejszenie poziomów białek członkowskich, a to z kolei prowadzi do progresywnego uszkodzenia włókien i przecieku błonowego. W różnych postaciach dystrofii mięśniowej, takich jak dystrofia mięśniowa Duchenne'a (DMD) i dystrofia mięśniowa Beckera (BMD), komórki mięśniowe wytwarzają zmienioną i funkcjonalnie wadliwą postać dystrofiny lub wcale nie produkuje dystrofiny, głównie z powodu mutacji w sekwencji genów prowadzić do nieprawidłowego splicingu. Przeważająca ekspresja wadliwego białka dystrofiny lub całkowity brak dystrofiny lub białka podobnego do dystrofiny, prowadzi do szybkiego postępu zwyrodnienia mięśni, jak wspomniano powyżej. Pod tym względem, „wadliwe” białko dystrofiny może być scharakteryzowane przez postaci dystrofiny, które są wytwarzane u pewnych osobników z DMD lub BMD, jak wiadomo w dziedzinie lub przez brak wykrywalnej dystrofiny.

[0049] Stosowane tutaj terminy „funkcja” i „funkcjonalny” i tym podobne dotyczą funkcji biologicznej, enzymatycznej lub terapeutycznej.

[0050] „Funkcjonalne” białko dystrofiny dotyczy ogólnie białka dystrofiny o wystarczającej aktywności biologicznej, aby zmniejszyć postępującą degradację tkanki mięśniowej, która jest poza tym charakterystyczna dla dystrofii mięśniowej, zazwyczaj w porównaniu ze zmienioną lub „wadliwą” postacią białka dystrofiny, która jest obecna u niektórych osobników z DMD lub BMD. W pewnych przykładach wykonania funkcjonalne białko dystrofiny może mieć około 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% lub 100% (w tym wszystkie liczby całkowite pośrednie znajdujące się pomiędzy) aktywności biologicznej *in vitro* lub *in vivo* dystrofiny typu dzikiego, mierzonej zgodnie z rutynowymi technikami w tej dziedzinie. Jako przykład, aktywność związaną z dystrofiną w hodowlach mięśni *in vitro* można zmierzyć na podstawie wielkości miotubuli, organizacji (lub dezorganizacji) miofibrilli, aktywności kurczliwej i spontanicznego grupowania receptorów acetylocholinowych (patrz, np. Brown i wsp., Journal of Cell Science 112:209-216, 1999). Modele zwierzęce są również cennymi zasobami do badania patogenezy choroby i zapewniają środki do badania aktywności związanej z dystrofiną. Dwa z najczęściej stosowanych modeli zwierzęcych do badań DMD to mysz mdx i pies golden retriever z dystrofią mięśniową (ang. golden retriever muscular dystrophy - GRMD), z których oba są negatywne pod względem dystrofiny (patrz np. Collins i Morgan, Int J Exp Pathol 84: 165-172, 2003). Te i inne modele zwierzęce można stosować do pomiaru aktywności funkcjonalnej różnych białek dystrofiny. Obejmuje to skrócone postacie dystrofiny, takie jak te, które są wytwarzane przez pewne pomijające eksony związku antysensowne według wynalazku.

[0051] Przez „wyizolowany” rozumie się materiał, który jest w dużej mierze lub zasadniczo wolny od składników, które normalnie towarzyszą mu w jego natywnym stanie. Na przykład stosowany tu „izolowany polinukleotyd” może dotyczyć polinukleotydu, który został

oczyszczony lub usunięty z sekwencji, które flankują go w stanie naturalnie występującym, np. fragment DNA, który został usunięty z sekwencji, które normalnie sąsiadują z fragmentem.

[0052] W stosowanym tu znaczeniu „wystarczająca długość” dotyczy antysensownego oligonukleotydu, który jest komplementarny do co najmniej 8, bardziej typowo 8-30, przylegających nukleozasad w docelowym pre-mRNA dystrofiny.

[0053] „Wzmacnianie” lub „wzmacniający” lub „zwiększanie” lub „zwiększający” lub „stymulowanie” lub „stymulujący” dotyczy ogólnie zdolności jednego lub antysensownych związków lub kompozycji do wytwarzania lub powodowania większej odpowiedzi fizjologicznej (tj. dalszych efektów) w komórce lub u osobnika, w porównaniu z odpowiedzią spowodowaną brakiem związku antysensownego lub związku kontrolnego. Mierzalna odpowiedź fizjologiczna może obejmować zwiększoną ekspresję funkcjonalnej postaci białka dystrofiny lub zwiększoną aktywność biologiczną związaną z dystrofiną w tkance mięśniowej, spośród innych odpowiedzi widocznych w rozumieniu dziedziny i w opisie. Można również zmierzyć wzrost funkcji mięśni, w tym zwiększenie lub poprawę funkcji mięśni o około 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% lub 100%. Można również zmierzyć procent włókien mięśniowych, które ekspresjują funkcjonalną dystrofinę, w tym zwiększoną ekspresję dystrofiny w około 1%, 2%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% lub 100% włókien mięśniowych. Na przykład wykazano, że około 40% poprawa funkcji mięśni może wystąpić, jeśli 25-30% włókien ekspresjuje dystrofinę (patrz np. DelloRusso i wsp., Proc Natl Acad Sci USA 99: 12979-12984, 2002). „Zwiększona” lub „wzmocniona” ilość jest zazwyczaj „istotna statystycznie” i może obejmować zwiększenie o 1,1, 1,2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 lub więcej razy (np. 500, 1000 razy) (w tym wszystkie liczby całkowite i dziesiętne pomiędzy nimi i powyżej 1), np. 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 itd.) ilości wytworzonej przez brak antysensownego związku (nieobecność środka) lub związek kontrolny.

[0054] Termin „redukować” lub „hamować” może ogólnie dotyczyć zdolności jednego lub więcej antysensownych związków według wynalazku do „zmniejszania” odpowiedniej odpowiedzi fizjologicznej lub komórkowej, takiej jak objaw opisanej tu choroby lub stanu, mierzonej zgodnie z rutynowymi technikami w dziedzinie diagnostyki. Odpowiednie odpowiedzi fizjologiczne lub komórkowe (*in vivo* lub *in vitro*) będą oczywiste dla znawców dziedziny i mogą obejmować zmniejszenie objawów lub patologii dystrofii mięśniowej lub zmniejszenie ekspresji wadliwych postaci dystrofiny, takich jak zmienione postaci dystrofiny, które są ekspresjonowane u osób z DMD lub BMD. „Zmniejszenie” w odpowiedzi może być istotne statystycznie w porównaniu z odpowiedzią wytworzoną bez żadnego antysensownego związku lub kontrolnej kompozycji i może obejmować 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% lub 100% spadku, w tym wszystkie liczby całkowite pośrednie.

[0055] „Leczenie” osobnika (np. ssaka, takiego jak człowiek) lub komórki jest dowolnym rodzajem interwencji stosowanym podejmując próbę zmiany naturalnego cyklu osobnika lub komórki. Leczenie obejmuje, ale nie wyłącznie, podawanie kompozycji farmaceutycznej i można je wykonywać profilaktycznie lub po początku zdarzenia patologicznego lub kontaktu ze środkiem etiologicznym. Leczenie obejmuje dowolny pożądanym wpływ na objawy lub patologię choroby lub stanu związanego z białkiem dystrofiny, jak w pewnych postaciach dystrofii mięśniowej i może obejmować, na przykład, minimalne zmiany lub poprawę jednego lub więcej mierzalnych markerów leczonej choroby lub stanu. Włączone są tu również terapie „profilaktyczne”, które można skierować do zmniejszenia szybkości progresji leczonej choroby lub stanu, opóźnienia wystąpienia tej choroby lub stanu lub zmniejszenia nasilenia jej wystąpienia. „Leczenie” lub „profilaktyka” niekoniecznie wskazuje na całkowitą eradykację, wyleczenie lub zapobieganie chorobie lub stanowi lub towarzyszącym im objawom.

[0056] W stosowanym tu znaczeniu „osobnik” obejmuje dowolne zwierzę, które wykazuje objaw lub jest zagrożone wystąpieniem objawu, który można leczyć związkiem antysensownym według wynalazku, takie jak osobnik, który ma lub ma ryzyko wystąpienia DMD lub BMD lub dowolnego z objawów związanych z tymi stanami (np. utrata włókien mięśniowych). Odpowiedni osobnicy (pacjenci) obejmują zwierzęta laboratoryjne (takie jak mysz, szczur, królik lub świnka morska), zwierzęta hodowlane i domowe lub zwierzęta domowe (takie jak kot lub pies). Włączone są tu naczelnie inne niż ludzie, a korzystnie pacjenci będący ludźmi.

[0057] „Alkil” lub „alkilen” oba dotyczą nasyconego prostego lub rozgałęzionego łańcucha węglowodorowego zawierającego od 1 do 18 atomów węgla. Przykłady obejmują między innymi metyl, etyl, propyl, izopropyl, butyl, izobutyl, tert-butyl, n-pentyl i n-heksyl. Termin „niższy alkil” dotyczy zdefiniowanej tu grupy alkilowej, zawierającej pomiędzy 1 a 8 atomów węgla.

[0058] „Alkenyl” dotyczy nienasyconego rodnika węglowodorowego o prostym lub rozgałęzionym łańcuchu zawierającego od 2 do 18 atomów węgla i zawierającego co najmniej jedno wiązanie podwójne węgiel-węgiel. Nieograniczające przykłady obejmują między innymi etenyl, propenyl, izopropenyl, butenyl, izobutenyl, tert-butenyl, n-pentenyl i n-heksenyl. Termin „niższy alkenyl” dotyczy zdefiniowanej tu grupy alkenylowej, zawierającej pomiędzy 2 a 8 atomów węgla.

[0059] „Alkinył” dotyczy nienasyconego rodnika węglowodorowego o prostym lub rozgałęzionym łańcuchu zawierającego od 2 do 18 atomów węgla i zawierającego co najmniej jedno wiązanie potrójne węgiel-węgiel. Nieograniczające przykłady obejmują między innymi etynyl, propynyl, izopropynyl, butynyl, izobutynyl, tert-butynyl, pentynyl i heksynyl. Termin „niższy alkinył” dotyczy zdefiniowanej tu grupy alkinyłowej, zawierającej pomiędzy 2 a 8 atomów węgla.

[0060] „Cykloalkil” dotyczy mono- lub policyklicznego rodnika alkilowego. Nieograniczające przykłady obejmują między innymi cyklobutyl, cyklopentyl, cykloheksyl, cykloheptyl i cyklooktyl.

[0061] „Aryl” dotyczy cyklicznego aromatycznego ugrupowania węglowodorowego zawierającego od do 18 atomów węgla mających jeden lub więcej pierścieni zamkniętych. Nieograniczające przykłady obejmują między innymi fenyl, benzyl, naftyl, antracenył, fenantracenył i bifenyl.

[0062] „Aralkil” dotyczy rodnika o wzorze RaRb, w którym Ra oznacza łańcuch alkilenowy, jak zdefiniowano powyżej i Rb oznacza jeden lub więcej rodników arylowych, jak zdefiniowano powyżej, na przykład, benzyl, difenylometyl i tym podobne.

[0063] „Tioalkoksy” dotyczy rodnika o wzorze -SRc, gdzie Rc oznacza zdefiniowany tu rodnik alkilowy. Termin „niższy tioalkoksy” dotyczy zdefiniowanej tu grupy alkoksylowej, zawierającej pomiędzy 1 a 8 atomów węgla.

[0064] „Alkoksył” dotyczy rodnika o wzorze -ORd przy czym Rd oznacza zdefiniowany tu rodnik alkilowy. Termin „niższy alkoksył” dotyczy zdefiniowanej tu grupy alkoksylowej, zawierającej pomiędzy 1 a 8 atomów węgla. Przykłady grup alkoksy obejmują, bez ograniczenia, metoksy i etoksy.

[0065] „Alkoksyalkil” dotyczy grupy alkilowej podstawionej przez grupę alkoksylową.

[0066] „Karbonył” dotyczy rodnika C(=O)-.

[0067] „Guanidynyl” dotyczy rodnika $H_2N(C=NH_2)$ -NH-.

[0068] „Amidynyl” dotyczy rodnika $H_2N(C=NH_2)CH$ -.

[0069] „Amino” dotyczy rodnika -NH₂.

[0070] „Alkiloamino” dotyczy rodnika o wzorze -NHRd lub -NRdRd, gdzie każdy Rd niezależnie oznacza rodnik alkilowy jak tu zdefiniowano. Termin „niższy alkiloamino” dotyczy zdefiniowanej tu grupy alkiloaminowej, zawierającej pomiędzy 1 a 8 atomów węgla.

[0071] „Heterocykl” oznacza 5- do 7-członowy monocykliczny lub 7- do 10-członowy bicykliczny, heterocykliczny pierścień, który jest albo nasycony, nienasycony, albo aromatyczny i który zawiera od 1 lub 4 heteroatomów niezależnie wybranych spośród azotu, tlenu i siarki, przy czym heteroatomy azotu i siarki mogą być opcjonalnie utleniane, a heteroatom azotu może być opcjonalnie kwaternizowany, włącznie z pierścieniami bicyklicznymi, w których dowolny z powyższych heterocykli jest połączony z pierścieniem benzenowym. Heterocykl może być przyłączony przez dowolny heteroatom lub atom węgla. Heterocykle obejmują heteroaryle, jak zdefiniowano poniżej. W związku z tym, oprócz heteroaryli wymienionych poniżej, heterocykle obejmują również morfolinył, pirolidynył, pirolidynył, piperidynył, piperidynył, hydantoinył, walerolaktyl, oksiranył, oksetanył, tetrahydrofuranyle, tetrahydropiranył, tetrahydropirydynył, tetrahydrotiofanył, tetrahydrotiopiranył, tetrahydropirydimyly, tetrahydrotiopiranył i tym podobne.

[0072] „Heteroarył” oznacza aromatyczny pierścień heterocykliczny o 5 do 10 członach i mający co najmniej jeden heteroatom wybrany spośród azotu, tlenu i siarki, i zawierający co najmniej 1 atom węgla, obejmujący zarówno mono-, jak i bicykliczne układy pierścieniowe. Reprezentatywne heteroaryle to pirydył, furył, benzofuranyle, tiofanył, benzotiofanył,

chinoliny, pirolil, indolil, oksazolil, benzoksazolil, imidazolil, benzimidazolil, tiazolil, benzotiazolil, izoksazolil, pirazolil, izotiazolil, pirydazynyl, pirymidynyl, pirazynyl, triazynyl, cinnoliny, ftalazynyl i chinazoliny.

[0073] Terminy „opcjonalnie podstawiony alkil”, „opcjonalnie podstawiony alkenyl”, „opcjonalnie podstawiony alkoksyl”, „opcjonalnie podstawiony tioalkoksyl”, „opcjonalnie podstawiony alkiloamino”, „opcjonalnie podstawiony niższy alkil”, „opcjonalnie podstawiony niższy alkenyl”, „opcjonalnie podstawiony niższy alkoksyl”, „opcjonalnie podstawiony niższy tioalkoksyl”, „opcjonalnie podstawiony niższy alkiloamino” i „opcjonalnie podstawiony heterocyklil” oznaczają, że przy podstawieniu, co najmniej jeden atom wodoru jest zastąpiony przez podstawnik. W przypadku podstawnika okso (= O) zastąpione zostają dwa atomy wodoru. Pod tym względem podstawniki obejmują: deuter, opcjonalnie podstawiony alkil, opcjonalnie podstawiony alkenyl, opcjonalnie podstawiony alkinyl, opcjonalnie podstawiony aryl, opcjonalnie podstawiony heterocykl, opcjonalnie podstawiony cykloalkil, okso, halogen, -CN, -OR_x, NR_xR_y, NR_xC(=O)R_y, NR_xSO₂R_y, -NR_xC(=O)NR_xR_y, C(=O)R_x, C(=O)OR_x, C(=O)NR_xR_y, -SOM_xR_y i -SOM_xNR_xR_y, przy czym m oznacza 0, 1 lub 2, R_x i R_y są takie same lub różne i niezależnie oznaczają wodór, opcjonalnie podstawiony alkil, opcjonalnie podstawiony alkenyl, opcjonalnie podstawiony alkinyl, opcjonalnie podstawiony aryl, opcjonalnie podstawiony heterocykl lub opcjonalnie podstawiony cykloalkil i każdy z tych opcjonalnie podstawionych alkili, opcjonalnie podstawiony alkenyl, opcjonalnie podstawiony alkinyl, opcjonalnie podstawiony aryl, opcjonalnie podstawiony heterocykl i opcjonalnie podstawione podstawniki cykloalkilowe mogą być dalej podstawione jednym lub większą liczbą spośród okso-, halogen, -CN, -OR_x, NR_xR_y, NR_xC(=O)R_y, NR_xSO₂R_y, -NR_xC(=O)NR_xR_y, C(=O)R_x, C(=O)OR_x, C(=O)NR_xR_y, -SOM_xR_y i -SOM_xNR_xR_y.

[0074] Zaproponowano i opublikowano system nomenklatury antysensownych cząsteczek, aby rozróżnić różne cząsteczki antysensowne (patrz Mann i wsp., (2002) J Gen Med 4, 644-654). Ta nomenklatura stała się szczególnie istotna przy testowaniu kilku nieznacznie różnych cząsteczek antysensownych, wszystkie skierowane na ten sam region docelowy, jak pokazano poniżej:

H#A/D(x:y).

[0075] Pierwsza litera oznacza gatunek (np. H: człowiek, M: mysz, C: pies). „#” oznacza docelową liczbę eksonów dystrofiny. „A/D” oznacza akceptorowe lub donorowe miejsce splicingu odpowiednio na początku i końcu eksonu (x y) reprezentuje współrzędne przyłączenia, gdzie „-” lub „+” wskazują odpowiednio sekwencje intronowe lub eksoniczne. Na przykład A(-6+18) wskazuje ostatnie 6 zasad intronu poprzedzającego docelowy ekson i pierwsze 18 zasad eksonu docelowego. Najbliższym miejscem splicingu będzie akceptor, więc te współrzędne będą poprzedzone znakiem „A”. Opisywanie współrzędnych przyłączenia w miejscu splicingu dawcy może być D (+2-18), gdzie ostatnie 2 zasady eksonowe i pierwsze 18 intronowych zasad odpowiadają miejscu hybrydyzacji cząsteczki antysensownej. Całkowicie eksonowe współrzędne wygaszania byłyby reprezentowane przez A (+65+85), czyli miejsce pomiędzy nukleotydem 65. a 85. od początku tego eksonu.

II. Antysensowne oligonukleotydy

[0076] Gdy cząsteczka lub cząsteczki antysensowne są ukierunkowane na sekwencje nukleotydowe zaangażowane w splicing eksonów w sekwencjach pre-mRNA, można zahamować normalny splicing eksonu, co powoduje omijanie przez maszynę splicingu całego docelowego eksonu z dojrzałego mRNA. W wielu genach delecja całego eksonu prowadziła do wytwarzania niefunkcjonalnego białka przez utratę ważnych domen funkcjonalnych lub przerwanie ramki odczytu. W niektórych białkach możliwe jest jednak skrócenie białka przez usunięcie jednego lub większej liczby eksonów z wnętrza białka, bez zakłócania ramki odczytu i bez poważnej zmiany aktywności biologicznej białka. Zazwyczaj takie białka mają strukturalną rolę i/lub mają funkcjonalne domeny na ich końcach. Dystrofia mięśniowa Duchenne'a powstaje w wyniku mutacji, które wykluczają syntezę funkcjonalnego produktu genu dystrofiny, zazwyczaj przez przerwanie ramki odczytu. Antysensowne oligonukleotydy, które indukują pominięcie eksonu regionu genu dystrofiny zawierającego mutację, mogą umożliwić komórkom mięśniowym wytworzenie dojrzałego transkryptu mRNA, który koduje funkcjonalne białko dystrofiny. Uzyskane białko dystrofiny niekoniecznie jest postacią dystrofiny typu „dzikiego”, ale raczej jest skróconą, ale funkcjonalną lub półfunkcjonalną postacią dystrofiny. Wynalazek opisuje cząsteczki antysensowne zdolne do wiązania się z określonymi celami pre-mRNA dystrofiny w eksonie 53 i skierowania przetwarzania tego genu.

[0077] Antysensowny oligonukleotyd i docelowy RNA są komplementarne w stosunku do siebie, gdy wystarczająca liczba odpowiadających pozycji w każdej cząsteczce jest zajęta przez nukleotydy, które mogą wiązać wodór ze sobą, tak że między oligonukleotydem a celem występuje stabilne i swoiste wiązanie. W związku z tym „swoście hybrydyzowalne” i „komplementarne” są terminami, które są stosowane do wskazania wystarczającego stopnia komplementarności lub precyzyjnego parowania, tak że stabilne i swoiste wiązanie występuje między oligonukleotydem a celem. Jest zrozumiałe w tej dziedzinie, że sekwencja cząsteczki antysensownej nie musi być w 100% komplementarna z sekwencją docelowej sekwencji, aby mogła być swoście hybrydyzowalna. Cząsteczka antysensowna jest swoście hybrydyzowalna, gdy wiązanie oligonukleotydu do cząsteczki docelowej zakłóca normalną funkcję docelowego RNA i istnieje wystarczający stopień komplementarności, aby uniknąć nieswoistego wiązania antysensownego oligonukleotydu z sekwencjami niecelowymi w warunkach, w których pożądanym jest swoiste wiązanie, tj. w warunkach fizjologicznych w przypadku testów *in vivo* lub leczenia terapeutycznego i w przypadku testów *in vitro*, w warunkach, w których przeprowadza się testy.

[0078] Delecja eksonu nie powinna prowadzić do przesunięcia ramki odczytu w skróconym transkrybowanym mRNA. W związku z tym, jeśli w sekwencji liniowej trzech eksonów koniec pierwszego eksonu koduje dwa z trzech nukleotydów w kodonie, a następny ekson jest usuwany, trzeci ekson w sekwencji liniowej musi rozpoczynać się od pojedynczego nukleotydu, który jest w stanie ukończyć triplet nukleotydowy dla kodonu. Jeśli trzeci ekson nie rozpocznie się od pojedynczego nukleotydu, nastąpi przesunięcie ramki odczytu, które doprowadziłoby do wytworzenia skróconego lub niefunkcjonalnego białka.

[0079] Należy zauważyć, że układy kodonów na końcu eksonów białek strukturalnych mogą nie zawsze pękać pod koniec kodonu, w związku z tym może zaistnieć potrzeba usunięcia więcej niż jednego eksonu z pre-mRNA, aby zapewnić odczyt mRNA w ramce. W takich okolicznościach konieczne może być wybranie wielu antysensownych oligonukleotydów sposobem według wynalazku, przy czym każdy jest skierowany do innego regionu odpowiedzialnego za indukcję splicingu w eksonach, które mają być usunięte.

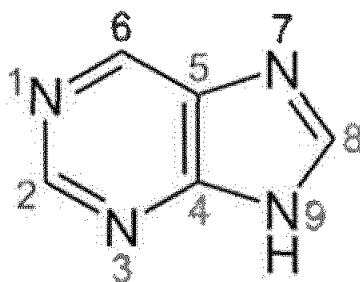
[0080] Aby uniknąć degradacji pre-mRNA podczas tworzenia dupleksu z cząsteczkami antysensownymi, cząsteczki antysensowne mogą być przystosowane do minimalizowania lub zapobiegania rozszczepianiu przez endogenną RNazę H. Właściwość ta jest wysoce korzystna w traktowaniu RNA niezmetylowanymi oligonukleotydami albo wewnątrzkomórkowo, albo w surowych ekstraktach zawierających RNazę H prowadząc do degradacji dupleksów pre-mRNA: antysensowny oligonukleotyd. Przykład cząsteczek antysensownych, które po dupleksie z RNA nie są rozszczepiane przez komórkową RNazę H stanowią pochodne 2'-O-metylowe. 2'-O-metylo-oligorybonukleotydy są

bardzo stabilne w środowisku komórkowym i tkankach zwierzęcych, a ich dupleksy z RNA mają wyższe wartości T_m niż ich odpowiedniki w rybo- lub dezoksyrybozowe. Metylacja pozycji 2' hydroksyrybozy i inkorporacja szkieletu fosforotionianowego jest powszechną strategią wytwarzania cząsteczek, które powierzchownie przypominają RNA, ale są znacznie bardziej odporne na degradację nukleazą.

[0081] Cząsteczki antysensowne, które nie aktywują RNazy H można wytworzyć zgodnie ze znanymi technikami (patrz, np. patent US nr 5,149,797). Takie antysensowne cząsteczki, które mogą być sekwencjami deoksyrybonukleotydowymi lub rybonukleotydowymi, po prostu zawierają dowolną strukturalną modyfikację, która sterycznie przeszkadza lub zapobiega wiązaniu RNazy H z dupleksową cząsteczką zawierającą oligonukleotyd jako jeden z jej elementów, która to modyfikacja strukturalna zasadniczo nie przeszkadza lub nie zakłóca tworzenia dupleksu. Ponieważ części oligonukleotydu biorące udział w tworzeniu dupleksu są zasadniczo różne od tych części zaangażowanych w wiązanie RNazy H, dostępnych jest wiele cząsteczek antysensownych, które nie aktywują RNazy H. Na przykład, takie cząsteczki antysensowne mogą być oligonukleotydami, w których co najmniej jedna lub wszystkie międzynukleotydowe mostkujące reszty fosforanowe są modyfikowanymi fosforanami, takimi jak fosfoniany metylu, fosforotioniany metylu, fosforomorfolidany, fosforopiperazydany i fosforoamidany. Na przykład, każdą inną jedną z mostkujących fosforanowych reszt międzynukleotydowych można modyfikować zgodnie z opisem. W innym nieograniczającym przykładzie, takie antysensowne cząsteczki są cząsteczkami, w których co najmniej jeden, kilka lub wszystkie nukleotydy zawierają niższe ugrupowanie alkilowe 2' (na przykład, C1-C4, liniowy lub rozgałęziony, nasycony lub nienasycony alkil, taki jak metyl, etyl, etenyl, propyl, 1-propenyl, 2-propenyl i izopropyl). Na przykład, każdy inny nukleotyd może być modyfikowany zgodnie z opisem.

[0082] Oligonukleotydy mogą również obejmować nukleozasadowe (często określaną w tej technice po prostu jako „zasadowe”) modyfikacje lub podstawienia.

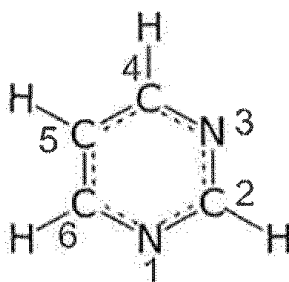
[0083] Zasady purynowe zawierają pierścień pirymidynowy skondensowany z pierścieniem imidazolowym, jak opisano w ogólnym wzorze:



Puryna

Adenina i guanina są dwiema purynowymi nukleozasadami najczęściej występującymi w kwasach nukleinowych.

[0084] Zasady pirymidynowe obejmują sześcioczłonowy pierścień pirymidynowy opisany ogólnym wzorem:



Pirymidyna

Cytozyna, uracyl i tymina są zasadami pirymidynowymi najczęściej spotykanymi w kwasach nukleinowych.

[0085] Antysensowny oligonukleotyd jest chemicznie połączony z ugrupowaniem, które wzmacnia aktywność, dystrybucję komórkową lub wychwyt komórkowy oligonukleotydu. Ugrupowanie to łańcuch glikolu polietylenowego.

[0086] Częsteczki antysensowne stosowane zgodnie z tym wynalazkiem mogą być dogodnie i rutynowo wytwarzane za pomocą dobrze znanej techniki syntezy w fazie stałej. Sprzęt do takiej syntezy jest sprzedawany przez kilku dostawców, na przykład, Applied Biosystems (Foster City, Kalifornia). Jeden ze sposobów syntezy oligonukleotydów na zmodyfikowanym nośniku stałym jest opisany w patencie US nr 4,458,066.

[0087] Dowolne inne środki takiej syntezy znane w tej dziedzinie można stosować dodatkowo lub alternatywnie. Dobrze znane jest stosowanie podobnych technik do otrzymywania innych oligonukleotydów, takich jak fosforotioaniny i alkiłowane pochodne. W jednym takim zautomatyzowanym przykładzie wykonania, jako materiały wyjściowe stosuje się dietylo-

fosforoamidoty i można je zsyntetyzować, jak opisali Beaucage i wsp., (1981) *Tetrahedron Letters*, 22:1859-1862.

[0088] Antysensowne cząsteczki według wynalazku syntetyzuje się *in vitro* i nie obejmują antysensownych kompozycji pochodzenia biologicznego. Cząsteczki według wynalazku można również mieszać, kapsułkować, sprzęgać lub w inny sposób wiązać z innymi cząsteczkami, strukturami cząsteczek lub mieszaninami związków, jak na przykład liposomami, cząsteczkami ukierunkowanymi na receptor, doustnymi, doodbytniczymi, miejscowymi lub innymi formulacjami, do ułatwienia wychwytu, dystrybucji i/lub absorpcji.

A. Oligomery morfolino

[0089] Oligomery morfolino mające szkieletowe wiązania zawierające fosfor zostały przedstawione na fig. 1A-1C. Połączony z fosforodiamidatem oligomer morfolino taki jak pokazany na fig. 1C, który jest zmodyfikowany, aby zawierał grupy o ładunku dodatnim, korzystnie 10% -50% wiązań szkieletu. Oligomery morfolino z nienaładowanymi połączeniami szkieletowymi, w tym antysensowne oligonukleotydy, są szczegółowo opisane na przykład w (Summerton i Weller 1997) i w będących wspólną własnością patentach USA nr 5,698,685, 5,217,866, 5,142,047, 5,034,506, 5,166,315, 5,185, 444, 5,521,063, 5,506,337, 8,076,476, 8,299,206 i 7,943,762. Oligomery morfolino ze zmodyfikowanymi wiązaniami, w tym naładowanymi wiązaniami, można znaleźć w publikacji zgłoszenia patentowego USA nr: 2012/0065169.

[0090] Ważne właściwości podjednostek opartych na morfolino obejmują: 1) zdolność do wiązania w postaci oligomerycznej przez stabilne, nienaładowane lub dodatnio naładowane wiązania szkieletowe; 2) zdolność do podtrzymywania zasady nukleotydowej (np. adeniny, cytozyny, guaniny, tymidyny, uracylu i inozyny) tak, że utworzony polimer może hybrydyzować z komplementarnym zasadowo docelowym kwasem nukleinowym, w tym docelowym RNA, z wartościami T_m powyżej około 45°C w stosunkowo krótkich oligonukleotydach (np. 10-15 zasad); 3) zdolność oligonukleotydu do aktywnego lub pasywnego transportu do komórek ssaków; i 4) zdolność heterodupleksu antysensownego oligonukleotydu:RNA do odporności wobec degradacji RNazą i RNazą H.

[0091] Przykładowe struktury szkieletowe dla oligonukleotydów antysensownych według zastrzeżonego przedmiotu wynalazku obejmują typy podjednostek morfolinowych przedstawione na fig. 1D-G, każda połączony przez niezwiązane lub dodatnio naładowane, zawierające fosfor wiązanie podjednostkowe. Na fig. 1D pokazano wiązanie zawierające fosfor, które tworzy powtarzalny pięcioczłonowy szkielet jednostki, gdzie pierścienie morfolinowe są połączone wiązaniem fosfoamidowym z jednym atomem. Fig. 1E pokazuje połączenie, które wytwarza 6-atomowy szkielet jednostki powtarzalnej. W tej strukturze atom Y łączący węgiel 5' morfoliny z grupą fosforową może być siarką, azotem, węglem lub, korzystnie, tlenem. Ugrupowanie X zawieszona z fosforu może oznaczać fluor, alkil lub podstawiony alkil, alkoksyl lub podstawiony alkoksyl, tioalkoksyl lub podstawiony tioalkoksyl lub niepodstawiony, monopodstawiony lub dipodstawiony atom azotu, w tym struktury cykliczne, takie jak linie morfolinowe lub piperydyny. Alkil, alkoksyl i tioalkoksyl korzystnie

zawierają 1-6 atomów węgla. Ugrupowania Z oznaczają atom siarki lub tlenu i korzystnie jest to tlen.

[0092] Wiązania pokazane na fig. 1F i 1G są zaprojektowane dla 7-atomowych szkieletów o długości jednostki. Na Strukturze 1F ugrupowanie X jest takie jak na Strukturze 1E, a częścią Y może być metylen, siarka lub korzystnie tlen. W Strukturze 1G ugrupowania X i Y są takie jak na Strukturze 1E. Szczególnie korzystne oligonukleotydy morfolinowe obejmują te złożone struktury podjednostek morfolinowych o postaci przedstawionej na fig. 1E, gdzie $X=NH_2$, $N(CH_3)_2$ lub 1-piperazynę lub inną naładowaną grupę, $Y=O$ i $Z=O$.

[0093] Zasadniczo nienaładowany oligonukleotyd może być modyfikowany, zgodnie z aspektem wynalazku, do włączenia naładowanych wiązań, np. do około 1 na każde 2-5 nienaładowanych wiązań, na przykład około 4-5 na co 10 nienaładowanych wiązań. W niektórych przykładach wykonania optymalną poprawę aktywności antysensownej można zaobserwować, gdy około 25% wiązań szkieletu jest kationowych. W niektórych przykładach wykonania, wzmocnienie może być widoczne z niewielką liczbą np. 10-20% wiązań kationowych lub gdy liczba wiązań kationowych mieści się w zakresie 50-80%, tak jak około 60%.

[0094] Dostarczono oligomery mające dowolną liczbę kationowych połączeń, w tym oligomery połączone w pełni kationowo. Korzystnie jednak oligomery są częściowo naładowane, na przykład w ilości 10%-80%. W korzystnych przykładach wykonania około 10% do 60% i korzystnie 20% do 50% wiązań jest kationowych.

[0095] W jednym przykładzie wykonania kationowe wiązania są przeplatane wzdłuż szkieletu. Częściowo naładowane oligomery korzystnie zawierają co najmniej dwa kolejne nienaładowane wiązania; to znaczy, oligomer korzystnie nie ma ściśle naprzemiennego wzoru na całej swojej długości.

[0096] Rozważane są również oligomery mające bloki kationowych połączeń i bloki połączeń nienaładowanych; na przykład centralny blok nienaładowanych wiązań może być otoczony przez bloki kationowych wiązań lub odwrotnie. W jednym przykładzie wykonania oligomer ma w przybliżeniu równe długości 5', 3' i regiony centralne, a procent połączeń kationowych w centralnym regionie jest większy niż około 50%, korzystnie większy niż około 70%.

[0097] W pewnych przykładach wykonania, antysensowne związki według wynalazku można otrzymywać etapami syntezy w fazie stałej, stosując sposoby wyszczególnione w cytowanych powyżej pozycjach literaturowych i poniżej w odniesieniu do syntezy oligonukleotydów mających mieszaninę lub nienaładowanych i kationowych połączeń szkieletowych. W niektórych przypadkach może być pożądanym dodanie dodatkowych związków chemicznych do związku antysensownego, np. do zwiększenia farmakokinetyki lub ułatwienia wychwytywania lub wykrywania związku. Takie ugrupowanie może być przyłączone kowalencyjnie, zgodnie ze standardowymi sposobami syntezy. Przykładowo, dodanie ugrupowania glikolu polietylenowego lub innego polimeru hydrofilowego, np. takiego, który ma 1-100 podjednostek monomerycznych, może być przydatne w zwiększaniu rozpuszczalności.

[0098] Do celów detekcji można dołączyć cząstkę reporterową, taką jak fluoresceina lub grupa radioznakowana. Alternatywnie, znacznik reporterowy przyłączony do oligomeru może być ligandem, takim jak antygen lub biotyna, zdolnym do wiązania wyznakowanego przeciwciała lub streptawidyny. Przy wyborze ugrupowania do przyłączenia lub modyfikacji związku antysensownego, ogólnie pożądane jest oczywiście wybranie związków chemicznych z grup, które są biokompatybilne i prawdopodobnie są tolerowane przez osobnika bez niepożądanych efektów ubocznych.

[0099] Każda struktura pierścienia morfolinowego wspiera ugrupowanie parowania zasad, aby utworzyć sekwencję ugrupowań do parowania zasad, która jest typowo zaprojektowana do hybrydyzacji z wybranym celem antysensownym w komórce lub u leczonego osobnika. Podstawową cząsteczką parowania może być puryna lub pirymidyna znaleziona w natywnym DNA lub RNA (*np.* A, G, C, T lub U).

III. Formułacje i sposoby podawania

[0100] W niektórych przykładach wykonania, wynalazek zapewnia kompozycje farmaceutyczne odpowiednie do terapeutycznego dostarczania oligomerów antysensownych według wynalazku. W związku z tym, w niektórych przykładach wykonania, Wynalazek dostarcza farmaceutycznie dopuszczalne kompozycje, które zawierają terapeutycznie skuteczną ilość jednego lub więcej oligomerów według wynalazku, formułowanych razem z jednym lub większą liczbą farmaceutycznie dopuszczalnych nośników (dodatków) i/lub rozcieńczalników. Chociaż możliwe jest podawanie oligomeru według wynalazku osobno, korzystne jest podawanie związku jako formułacji farmaceutycznej (kompozycji).

[0101] Sposoby dostarczania cząsteczek kwasu nukleinowego są opisane, na przykład, w Akhtar i wsp., 1992, Trends Cell Bio., 2:139; i Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar; Sullivan i wsp., PCT WO 94/02595. Te i inne protokoły można stosować do dostarczania praktycznie dowolnej cząsteczki kwasu nukleinowego, w tym izolowanych oligomerów według wynalazku.

[0102] Jak wyszczególniono poniżej, kompozycje farmaceutyczne według wynalazku mogą być specjalnie formułowane do podawania w postaci stałej lub ciekłej, w tym dostosowane do następujących: (1) podawanie doustne, na przykład, roztwory (wodne lub niewodne roztwory lub zawiesiny), tabletki, *np.* te przeznaczone do wchłaniania policzkowego, podjęzykowego i ogólnoustrojowego, bolusy, proszki, granulki, pasty do stosowania na języku; (2) podawanie pozajelitowe, na przykład, przez wstrzyknięcie podskórne, domięśniowe, dożylnie lub zewnątrzoponowe, na przykład, jako sterylny roztwór lub zawiesina lub formułacja o przedłużonym uwalnianiu; (3) stosowanie miejscowe, na przykład, jako krem, maść lub plaster lub spray o kontrolowanym uwalnianiu nakładany na skórę; (4) dopochwowo lub doodbytniczo, na przykład, jako pesarium, krem lub pianka; (5) podjęzykowo; (6) do oczu; (7) przezskórnice; lub (8) donosowo.

[0103] Określenie „farmaceutycznie dopuszczalny”, zgodnie z zastosowaniem, dotyczy związków, materiałów, kompozycji i/lub postaci dawkowania, itd. które są w zakresie racjonalnej oceny medycznej odpowiednie do stosowania w kontakcie z tkankami istot ludzkich

i zwierząt bez nadmiernej toksyczności, podrażnienia, odpowiedzi alergicznej lub innego problemu lub powikłania, współmiernie do racjonalnego współczynnika korzyści/ryzyka.

[0104] Stosowane tu określenie „farmaceutycznie dopuszczalny nośnik” oznacza farmaceutycznie dopuszczalny materiał, kompozycję lub nośnik, taki jak ciekły lub stały wypełniacz, rozcieńczalnik, substancja pomocnicza, środek ułatwiający wytwarzanie (np. środek poślizgowy, talk, magnez, wapń lub cynk; stearynian lub kwas stearynowy) lub materiał kapsułkujący rozpuszczalnik, zaangażowany w przenoszenie lub transport przedmiotowego związku z jednego narządu lub części ciała do innego narządu lub części ciała. Każdy nośnik musi być „dopuszczalny” w znaczeniu bycia kompatybilnym z innymi składnikami formułacji i nieszkodliwym dla pacjenta.

[0105] Niektóre przykłady materiałów, które mogą służyć jako farmaceutycznie dopuszczalne nośniki obejmują, nieograniczająco: (1) cukry, takie jak laktoza, glukoza i sacharoza; (2) skrobie, takie jak skrobia kukurydziana i skrobia ziemniaczana; (3) celuloza i jej pochodne, takie jak sól sodowa karboksymetylocelulozy, etyloceluloza i octan celulozy; (4) sproszkowana tragakanta; (5) sól; (6) żelatyna; (7) talk; (8) substancje pomocnicze, takie jak masło kakaowe i woski do czopków; (9) oleje, takie jak olej arachidowy, olej bawełniany, olej szafranowy, olej sezamowy, oliwa z oliwek, olej kukurydziany i olej sojowy; (10) glikole, takie jak glikol propylenowy; (11) poliole, takie jak gliceryna, sorbitol, mannitol i glikol polietylenowy; (12) estry, takie jak oleinian etylu i laurynian etylu; (13) agar; (14) środki buforujące, takie jak wodorotlenek magnezu i wodorotlenek glinu; (15) kwas alginowy; (16) wolna od pirogenów woda; (17) izotoniczny roztwór soli; (18) roztwór Ringera; (19) alkohol etylowy; (20) roztwory buforowane pH; (21) poliestry, poliwęglany i/lub polibezwodniki; i (22) inne nietoksyczne kompatybilne substancje stosowane w formułacjach farmaceutycznych.

[0106] Dodatkowe nieograniczające przykłady środków odpowiednich do formułowania z antysensownymi oligomerami według wynalazku obejmują: Sprzężone z PEG kwasy nukleinowe, sprzężone z fosfolipidem kwasy nukleinowe, kwasy nukleinowe zawierające cząsteczki lipofilowe, fosforotioniany, inhibitory P-glikoproteiny (takie jak Pluronic P85), które mogą zwiększać przenikanie leków do różnych tkanek; biodegradowalne polimery, takie jak mikrosfery z poli(DL-laktydu-koglikolidu) do dostarczania o przedłużonym uwalnianiu po implantacji (Emerich, DF i wsp., 1999, Cell Transplant, 8, 47-58) Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.; i załadowane nanocząsteczki, takie jak te wytworzone z cyjanoakrylanu polibutyloвого, które mogą dostarczać leki przez barierę krew-mózg i mogą zmieniać neuronalne mechanizmy wychwyty (Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999).

[0107] Wynalazek dotyczy również zastosowania kompozycji farmaceutycznej zawierającej liposomy modyfikowane powierzchniowo, zawierające lipidy poli(glikolu etylenowego)(modyfikowane PEG, rozgałęzione i nierozgałęzione lub ich kombinacje, lub długo krążące liposomy lub utajone liposomy). Oligomery do stosowania w wynalazku mogą również zawierać kowalencyjnie przyłączone cząsteczki PEG o różnych masach cząsteczkowych. Te formułacje oferują sposób zwiększania akumulacji leków w tkankach docelowych. Ta klasa nośników leków jest odporna na opsonizację i eliminację przez jednojądrzaste układy fagocytyjące (MPS lub RES), umożliwiając w ten sposób dłuższy czas

krażenia we krwi i zwiększoną ekspozycję tkanki na kapsułkowany lek (Lasic i wsp. Chem. Rev. 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata i wsp., Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 1005-1011). Wykazano, że takie liposomy gromadzą się selektywnie w nowotworach, prawdopodobnie przez wynaczynienie i wychwytywanie w neowaskularyzowanych tkankach docelowych (Lasic i wsp., Science 1995, 267, 1275-1276, Oku i wsp., 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1238, 86-90). Długo cyrkulujące liposomy polepszają farmakokinetykę i farmakodynamikę DNA i RNA, zwłaszcza w porównaniu z konwencjonalnymi liposomami kationowymi, które są znane z gromadzenia się w tkankach MPS (Liu i wsp., J. Biol. Chem. 1995, 42, 24864-24870; Choi i wsp., międzynarodowa publikacja PCT nr WO 96/10391; Ansell i wsp., międzynarodowa publikacja PCT nr WO 96/10390; Holland i wsp., międzynarodowa publikacja PCT nr WO 96/10392). Długo krążące liposomy mogą również chronić leki przed degradacją nukleazami w większym stopniu w porównaniu z kationowymi liposomami, w oparciu o ich zdolność unikania gromadzenia się w metabolicznie agresywnych tkankach MPS, takich jak wątroba i śledziona.

[0108] W kolejnym przykładzie wykonania wynalazek obejmuje oligomerowe kompozycje farmaceutyczne otrzymywane do dostarczania, jak opisano w U.S. Pat. Nr 6,692,911, 7,163,695 i 7,070,807. Pod tym względem, w jednym przykładzie wykonania, wynalazek zapewnia oligomer według wynalazku w kompozycji zawierającej kopolimery lizyny i histydyny (HK) (jak opisano w patentach US nr 7,163,695, 7,070,807 i 6,692,911), samodzielnie lub w połączeniu z PEG (np. rozgałęziony lub nierozgałęziony PEG lub ich mieszanina), w kombinacji z PEG i ugrupowaniem kierującym lub dowolnym z powyższych w połączeniu ze środkiem sieciującym. W niektórych przykładach wykonania, wynalazek zapewnia oligomery antysensowne w kompozycjach farmaceutycznych zawierających zmodyfikowaną kwasem glukonowym polihistydynę lub glukonylowaną-polihistydynę/transferynę-polilizynę. Znaczący dziedziński zauważy również, że aminokwasy o właściwościach podobnych do His i Lys mogą być podstawione w kompozycji.

[0109] Pewne przykłady wykonania oligomerów według wynalazku mogą zawierać zasadową grupę funkcyjną, taką jak amino lub alkiloaminowa i są zatem zdolne do tworzenia farmaceutycznie dopuszczalnych soli z farmaceutycznie dopuszczalnymi kwasami. Termin „farmaceutycznie dopuszczalne sole” w tym względzie dotyczy względnie nietoksycznych, nieorganicznych i organicznych soli addycyjnych z kwasami związków według wynalazku. Sole te można otrzymać *in situ* w nośniku do podawania leku lub w sposobie wytwarzania postaci dawkowania lub przez oddzielną reakcję oczyszczonego związku według wynalazku w postaci wolnej zasady z odpowiednim kwasem organicznym lub nieorganicznym i wyodrębnianie tak utworzonej soli podczas późniejszego oczyszczenia. Reprezentatywne sole obejmują sole bromowodorków, chlorowodorków, siarczanów, wodorosiarczanów, fosforanów, azotanów, octanów, walerianianów, oleinianów, palmitynianów, stearynianów, laurynianów, benzoosanów, mleczanów, fosforanów, tosylianów, cytrynianów, maleinianów, fumaranów, bursztynianów, winianów, naftalanianów, mesylianów, glukoheptanianów, laktobionianów i laurylosulfonianów. (Patrz np. Berge i wsp. (1977) „Pharmaceutical Salts”, J. Pharm. Sci. 66:1-19).

[0110] Farmaceutycznie dopuszczalne sole oligomerów według wynalazku obejmują konwencjonalne nietoksyczne sole lub czwartorzędowe sole amoniowe związków, np. z nietoksycznych organicznych lub nieorganicznych kwasów. Na przykład, takie konwencjonalne nietoksyczne sole obejmują sole pochodzące od kwasów nieorganicznych, takich jak chlorowodorek, bromowodorki, siarkowy, sulfamowy, fosforowy, azotowy i tym podobne; i sole otrzymane z kwasów organicznych, takich jak kwas octowy, propionowy, bursztynowy, glikolowy, stearynowy, mlekowy, jabłkowy, winowy, cytrynowy, askorbinowy, palmitynowy, maleinowy, hydroksymaleinowy, fenylooctowy, glutaminowy, benzoesowy, salicylowy, sulfanilowy, 2-acetoksybenzoesowy, fumarowy toluenosulfonowy, metanosulfonowy, etanodisulfonowy, szczawiowy, izotoniowy i tym podobne.

[0111] W niektórych przykładach wykonania, oligomery według wynalazku mogą zawierać jedną lub więcej kwasowych grup funkcyjnych, a zatem są zdolne do tworzenia farmaceutycznie dopuszczalnych soli z farmaceutycznie dopuszczalnymi zasadami. Termin „farmaceutycznie dopuszczalne sole” w tych przypadkach dotyczy względnie nietoksycznych, nieorganicznych i organicznych soli addycyjnych z zasadami związków według wynalazku. Sole te można podobnie otrzymać *in situ* w nośniku do podawania lub sposobie wytwarzania postaci dawkowania lub przez osobną reakcję oczyszczonego związku w jego postaci wolnego kwasu z odpowiednią zasadą, taką jak wodorotlenek, węglan lub wodorowęglan farmaceutycznie dopuszczalnego kationu metalu, z amoniakiem lub z farmaceutycznie dopuszczalną organiczną pierwszorzędową, drugorzędową lub trzeciorzędową aminą. Reprezentatywne sole zasadowe lub metali ziem alkalicznych obejmują sole litu, sodu, potasu, wapnia, magnezu i glinu i tym podobne.

Reprezentatywne aminy organiczne przydatne do tworzenia soli addycyjnych z zasadami obejmują etyloaminę, dietyloaminę, etylenodiaminę, etanoloaminę, dietanoloaminę, piperazynę i tym podobne. (Patrz np. Berge i wsp., powyżej).

[0112] Środki zwilżające, emulgatory i środki poślizgowe, takie jak laurylosiarczan sodu i stearynian magnezu, jak również środki barwiące, środki antyadhezyjne, środki powlekające, środki słodzące, smakowe i zapachowe, środki konserwujące i przeciwutleniacze mogą również być obecne w kompozycjach.

[0113] Przykłady farmaceutycznie dopuszczalnych przeciwutleniaczy obejmują: (1) rozpuszczalne w wodzie przeciwutleniacze, takie jak kwas askorbinowy, chlorowodorek cysteiny, wodorosiarczan sodu, metabisulfite sodu, siarczyny sodu i tym podobne; (2) rozpuszczalne w oleju przeciwutleniacze, takie jak palmitynian askorbylu, butylowany hydroksyanizol (BHA), butylowany hydroksytoluen (BHT), lecytyna, galusan propylowy, alfa-tokoferol i tym podobne; (3) środki chelatujące metale, takie jak kwas cytrynowy, kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA), sorbitol, kwas winowy, kwas fosforowy i tym podobne.

[0114] Kompozycje farmaceutyczne według wynalazku obejmują kompozycje odpowiednie do podawania doustnego, donosowego, miejscowego (w tym policzkowego i podjęzykowego), doodbytniczego, dopochwowego i/lub pozajelitowego. Formułacje mogą być dogodnie przedstawione w jednostkowej formie dawkowania i mogą zostać otrzymane za pomocą

dowolnych sposobów dobrze znanych w dziedzinie farmacji. Ilość składnika aktywnego, która może zostać połączona z materiałem nośnikowym do wytworzenia pojedynczej postaci dawkowania będzie różna w zależności od leczonego gospodarza, konkretnego sposobu podawania. Ilość substancji aktywnej, którą można połączyć z materiałem nośnikowym do wytworzenia pojedynczej postaci dawkowania, będzie na ogół tą ilością związku, która daje efekt terapeutyczny. Ogólnie, w stu procentach ta ilość będzie w zakresie od około 0,1 procent do około dziewięćdziesięciu dziewięciu procent składnika aktywnego, korzystnie od około 5 procent do około 70 procent, najkorzystniej od około 10 procent do około 30 procent.

[0115] W pewnych przykładach wykonania, kompozycja farmaceutyczna według wynalazku zawiera substancję pomocniczą wybraną spośród cyklodekstryn, celuloz, liposomów, środków tworzących micelle, np. kwasów żółciowych i nośników polimerycznych, np. poliestrów i polibezwodników; i oligomer według wynalazku. W niektórych przykładach wykonania wyżej wymieniona formuła czyni oligomer według wynalazku biodostępnym doustnie.

[0116] Sposoby otrzymywania tych kompozycji farmaceutycznych obejmują etap doprowadzania do połączenia oligomeru według wynalazku z nośnikiem i, opcjonalnie, jednym lub większą liczbą składników pomocniczych. Ogólnie, kompozycje farmaceutyczne otrzymuje się przez jednorodne i dokładne połączenie związku według wynalazku z ciekłymi nośnikami lub drobno podzielonymi stałymi nośnikami lub z obydwojoma, a następnie, jeśli to konieczne, kształtowanie produktu.

[0117] Kompozycje farmaceutyczne według wynalazku odpowiednie do podawania doustnego mogą mieć postać kapsułek, opłatków, pigułek, tabletek, pastylek do ssania (stosując bazę smakowo-zapachową, zazwyczaj sacharozę i gumę arabską lub tragakant), proszki, granulki lub jako roztwór lub zawiesinę w wodnej lub niewodnej cieczy lub jako ciekłą emulsję olej w wodzie lub woda w oleju lub jako eliksir lub syrop lub jako pastylki (z zastosowaniem obojętnej zasady, takiej jak żelatyna i gliceryna lub sacharoza i guma arabska) i/lub jako płukanki do ust i tym podobne, z których każda zawiera z góry określoną ilość antysensownego oligonukleotydu według wynalazku jako składnik aktywny. Antysensowny oligonukleotyd według wynalazku można również podawać jako bolus, powidełko lub pastę.

[0118] W stałych postaciach dawkowanych według wynalazku do podawania doustnego (kapsułki, tabletki, pigułki, drażetki, proszki, granulki, pastylki i tym podobne), składnik aktywny można mieszać z jednym lub więcej farmaceutycznie dopuszczalnymi nośnikami, takimi jak cytrynian sodu lub fosforan diwapniowy i/lub dowolne z poniższych: (1) wypełniacze lub rozcieńczalniki, takie jak skrobie, laktoza, sacharoza, glukoza, mannitol i/lub kwas krzemowy; (2) środki wiążące, takie jak na przykład karboksymetyloceluloza, alginiany, żelatyna, poliwinylpirolidon, sacharoza i/lub guma arabska; (3) środki nawilżające, takie jak glicerol; (4) środki dezintegrujące, takie jak agar-agar, węglan wapnia, skrobia ziemniaczana lub tapioka, kwas alginowy, pewne krzemiany i węglan sodu; (5) środki opóźniające rozpuszczanie, takie jak parafina; (6) przyspieszacze absorpcji, takie jak czwartorzędowe związki amoniowe i surfaktanty, takie jak poloksamer i laurylosiarczan sodu; (7) środki zwilżające, takie jak na przykład alkohol cetylowy, monostearynian glicerolu i niejonowe surfaktanty; (8) absorbenty, takie jak glina kaolinowa i bentonitowa; (9) środki poślizgowe,

takie jak talk, stearynian wapnia, stearynian magnezu, stałe glikole polietylenowe, laurylosiarczan sodu, stearynian cynku, stearynian sodu, kwas stearynowy i ich mieszaniny; (10) środki barwiące; i (11) środki do kontrolowanego uwalniania, takie jak krospowidon lub etyloceluloza. W przypadku kapsułek, tabletek i pigułek, kompozycje farmaceutyczne mogą również zawierać środki buforujące. Kompozycje w stanie stałym podobnego typu można zastosować również jako wypełniacze w miękkich lub twardych wypełnionych kapsułkach żelatynowych, stosując takie substancje pomocnicze jak laktoza lub cukry mlekowe, a także glikole polietylenowe o wysokiej masie cząsteczkowej i tym podobne.

[0119] Tabletkę można wytwarzać przez prasowanie lub formowanie, opcjonalnie z jednym lub większą liczbą składników dodatkowych. Sprasowane tabletki można wytwarzać stosując środek wiążący (np. żelatynę lub hydroksypropylometylocelulozę), środek poślizgowy, obojętny rozcieńczalnik, środek konserwujący, środek rozpraszający (na przykład, glikolan sodowy skrobi lub sieciowaną karboksymetylocelulozę sodową), środek aktywny powierzchniowo lub rozpraszający. Uformowane tabletki można wytworzyć przez uformowanie w odpowiedniej maszynie mieszaniny sproszkowanego związku zmoczonego obojętnym płynnym rozcieńczaczem.

[0120] Tabletki i inne stałe postacie dawkowania kompozycji farmaceutycznych według wynalazku, takie jak drażetki, kapsułki, pigułki i granulki, mogą być opcjonalnie nacinane lub otrzymywane z powłokami i osłonkami, takimi jak powłoki dojelitowe i inne powłoki dobrze znane w dziedzinie formułowania farmaceutycznego. Można je również formułować tak, aby zapewnić powolne lub kontrolowane uwalnianie składnika aktywnego (składników aktywnych) za pomocą, na przykład, hydroksypropylometylocelulozy w różnych proporcjach, aby zapewnić pożądany profil uwalniania, innych matryc polimerowych, liposomów i/lub mikrosfer. Można je formułować do szybkiego uwalniania, np. liofilizować. Mogą być sterylizowane, na przykład, za pomocą filtracji przez filtr zatrzymujący bakterie lub przez wprowadzenie środków sterylizujących w postaci sterylnych kompozycji w stanie stałym, które można rozpuścić w sterylnej wodzie lub innym sterylnym wstrzykiwalnym ośrodku bezpośrednio przed zastosowaniem. Kompozycje te mogą również opcjonalnie zawierać środki zmętniające i mogą być kompozycjami, które uwalniają tylko składnik aktywny (składniki aktywne) lub korzystnie, w pewnej części przewodu pokarmowego, opcjonalnie w sposób opóźniony. Przykłady kompozycji osadzających, które można stosować obejmują substancje polimeryczne i woski. Składnik aktywny może również występować w postaci mikrokapsułkowanej, jeśli to odpowiednie, z jedną lub większą liczbą opisanych powyżej substancji pomocniczych.

[0121] Ciekłe postacie dawkowania do podawania doustnego oligonukleotydów antysensownych według wynalazku obejmują farmaceutycznie dopuszczalne emulsje, mikroemulsje, roztwory, zawiesiny, syropy i eliksiry. Dodatkowo oprócz składnika aktywnego, płynne postacie dawkowania mogą zawierać obojętne rozcieńczacze powszechnie stosowane w dziedzinie, takie jak na przykład woda lub inne rozpuszczalniki, środki zwiększające rozpuszczalność i emulgatory, takie jak alkohol etylowy, alkohol izopropylowy, węglan etylu, octan etylu, alkohol benzylový, benzoesan benzylu, glikol propylenowy, glikol 1,3-

butylenowy, oleje (zwłaszcza oleje z nasion bawełny, orzeszków ziemnych, kukurydzy, kielków, oliwę z oliwek, olej rycynowy i sezamowy), glicerol, alkohol tetrahydrofurylowy, glikole polietylenowe i estry kwasów tłuszczowych sorbitanu i ich mieszaniny.

[0122] Oprócz obojętnych rozcieńczaczy, kompozycje doustne mogą także zawierać adjuwanty, takie jak środki zwilżające, środki emulgujące i zawieszające, środki słodzące, smakowe, barwiące, perfumujące i konserwujące.

[0123] Zawiesiny, oprócz substancji aktywnej, mogą zawierać środki zawieszające, takie jak na przykład etoksylowane alkohole izostearylowe, polioksyetylenowany sorbitol i estry sorbitanu, celuloza mikrokrystaliczna, metawodorotlenek glinu, bentonit, agar-agar i tragakanta i ich mieszaniny.

[0124] Formulacje do podawania doodbytniczego lub dopochwowego mogą być prezentowane jako czopek, który można otrzymywać przez zmieszanie jednego lub więcej związków według wynalazku z jedną lub więcej niż pożądaną substancją pomocniczą lub nośnikami zawierającymi, na przykład, masło kakaowe, glikol polietylenowy, воск do czopków lub salicylan, który jest stały w temperaturze pokojowej, ale ciekły w temperaturze ciała, a zatem topi się w odbytnicy lub w jamie pochwy i uwalnia związek aktywny.

[0125] Dostarczone tu formulacje lub postacie dawkowania do miejscowego lub przezskórnego podawania oligomeru obejmują proszki, aerozole, maści, pasty, kremy, balsamy, żele, roztwory, plastry i środki do inhalacji. Oligomery aktywne można mieszać w sterylnych warunkach z farmaceutycznie dopuszczalnym nośnikiem i z dowolnymi konserwantami, buforami lub gazami pędnymi, które mogą być wymagane. Maści, pasty, kremy i żele mogą zawierać, oprócz związku aktywnego według wynalazku, substancje pomocnicze takie jak tłuszcze zwierzęce i roślinne, oleje, woski, parafiny, skrobia, tragakanta, pochodne celulozy, glikole polietylenowe, silikony, bentonity, kwas krzemowy, talk i tlenek cynku lub ich mieszaniny.

[0126] Proszki i spreje mogą zawierać oprócz oligomeru według wynalazku substancje pomocnicze, takie jak laktoza, talk, kwas krzemowy, wodorotlenek glinu, krzemiany wapnia i proszek poliamidowy lub mieszaniny tych substancji. Spreje mogą dodatkowo zawierać zwyczajowe gazy pędne, takie jak chloro-fluorowęglowodory i lotne niepodstawione węglowodory, takie jak butan i propan.

[0127] Plastry przezskórne mają dodatkową zaletę zapewnienia kontrolowanego dostarczenia oligomeru według wynalazku do organizmu. Takie postacie dawkowania można wytworzyć za pomocą rozpuszczania lub wydzielania oligomeru w odpowiednim medium. Substancje zwiększające wchłanianie mogą być również stosowane do zwiększenia przepływu środka przez skórę. Szybkość takiego strumienia można kontrolować przez zapewnienie membrany kontrolującej szybkość lub dyspergującej środek w macierzy polimerowej lub żelu, spośród innych sposobów znanych w dziedzinie.

[0128] Kompozycje farmaceutyczne odpowiednie do podawania pozajelitowego mogą zawierać jeden lub więcej oligomerów według wynalazku w połączeniu z jednym lub większą liczbą farmaceutycznie dopuszczalnych sterylnych izotonicznych wodnych lub niewodnych

roztworów, dyspersji, zawiesin lub emulsji lub sterylnych proszków, które można odtwarzać w sterylnych roztworach lub dyspersjach do zastrzyków tuż przed zastosowaniem, które mogą zawierać cukry, alkohole, przeciwutleniacze, bufory, bakteriostatyki, substancje rozpuszczone, które czynią formułację izotoniczną z krwią zamierzonego biorcy lub środki zawieszające lub zagęszczające. Przykłady odpowiednich wodnych i niewodnych nośników, które można stosować w kompozycjach farmaceutycznych według wynalazku, obejmują wodę, etanol, poliole (takie jak glicerol, glikol propylenowy, glikol polietylenowy i tym podobne) i ich odpowiednie mieszaniny, oleje roślinne, takie jak oliwa z oliwek i wstrzykiwane estry organiczne, takie jak oleinian etylu. Odpowiednią płynność można utrzymać, na przykład, za pomocą materiałów powlekających takich jak lecytyna, za pomocą utrzymywania wymaganego rozmiaru cząsteczek w przypadku dyspersji lub za pomocą zastosowania surfaktantów.

[0129] Kompozycje te mogą również zawierać adiuwanty, takie jak środki konserwujące, środki zwilżające, środki emulgujące i środki dyspergujące. Zapobieganie działaniu mikroorganizmów na przedmiotowe oligomery można zapewnić przez włączenie różnych środków przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych, na przykład, parabenu, chlorobutanolu, fenolu kwasu sorbinowego i tym podobnych. Może być również pożądane włączenie środków izotonicznych, takich jak cukry, chlorek sodu i tym podobne do kompozycji. Dodatkowo, przedłużoną absorpcję wstrzykiwalnej postaci farmaceutycznej można uzyskać przez włączenie środków, które opóźniają absorpcję, takich jak monostearynian glinu i żelatyna.

[0130] W niektórych przypadkach, do przedłużenia efektu leku, często pożądane jest zwolnienie absorpcji leku ze wstrzyknięcia podskórnego lub domięśniowego. Można to osiągnąć przez zastosowanie ciekłej zawiesiny krystalicznego lub bezpostaciowego materiału o słabej rozpuszczalności w wodzie, spośród innych sposobów znanych w dziedzinie. W związku z tym szybkość absorpcji leku zależy od jego szybkości rozpuszczania, co z kolei może zależeć od wielkości kryształów i postaci krystalicznej. Alternatywnie, opóźnioną absorpcję pozajelitowo podawanej postaci leku uzyskuje się przez rozpuszczenie lub zawieszenie leku w nośniku olejowym.

[0131] Wstrzykiwalne postaci o przedłużonym uwalnianiu można wytwarzać przez tworzenie mikrokapsułkowanych macierzy przedmiotowych oligomerów w biodegradowalnych polimerach takich jak polilaktyd-poliglikolid. W zależności od stosunku oligomeru do polimeru i charakteru konkretnego wykorzystanego polimeru, szybkość uwalniania oligomeru może być kontrolowana. Przykłady innych biodegradowalnych polimerów obejmują poli(ortoestry) i poli(bezwodniki). Wstrzykiwalne formułacje o przedłużonym uwalnianiu można również otrzymać łącznie lek w liposomach lub mikroemulsjach, które są kompatybilne z tkankami organizmu.

[0132] Kiedy oligomery według wynalazku są podawane jako farmaceutyki, ludziom i zwierzętom, mogą być podawane *per se* lub jako kompozycja farmaceutyczna zawierająca, na przykład, 0,1 do 99% (korzystniej 10 do 30%) składnika aktywnego w kombinacji w farmaceutycznie dopuszczalnym przenośniku.

[0133] Jak zauważono powyżej, kompozycje farmaceutyczne według wynalazku można podawać doustnie, pozajelitowo, miejscowo lub doodbytniczo. Zazwyczaj są one podawane w postaciach odpowiednich dla każdej drogi podawania. Na przykład, są one podawane w postaci tabletek lub kapsułek, przez wstrzyknięcie, inhalację, płyn do oczu, maść, czopek, itp. podawanie przez wstrzyknięcie, wlew lub inhalację; miejscowo przez balsam lub maść; i doodbytniczo przez czopki.

[0134] Określenia „podawanie pozajelitowe” i „podawane pozajelitowo” w stosowanym tu znaczeniu oznaczają sposoby podawania inne niż podawanie dojelitowe i miejscowe, zwykle przez wstrzyknięcie, i obejmują, nieograniczająco, dożylnie, domięśniowe, dotętnicze, dooponowe, wewnątrztorbkowe, oczodołowe, dosercowe, śródskórne, dootrzewnowe, dotchawicze, podskórne, podnaskórkowe, wewnątrzczaszkowe, podtorbkowe, podpajęczynówkowe, dordzeniowe i domostkowe wstrzyknięcia i wlewy.

[0135] Określenia „podawanie ogólnoustrojowe”, „podawane układowo”, „podawanie obwodowe” i „podawane obwodowo”, jak tu stosowane, oznaczają podawanie związku, leku lub innego materiału innego niż bezpośrednio do centralnego układu nerwowego, tak, że wchodzi w system pacjenta, a zatem podlega metabolizmowi i innym podobnym sposobom, na przykład podskórne podanie.

[0136] Bez względu na wybraną drogę podawania, antysensowny oligonukleotyd według wynalazku, które mogą być stosowane w odpowiedniej postaci uwodnionej i/lub kompozycje farmaceutyczne według wynalazku mogą być formułowane do farmaceutycznie dopuszczalnych postaci dawkowania za pomocą konwencjonalnych sposobów znanych znawcom dziedziny. Rzeczywiste poziomy dawkowania składników aktywnych w kompozycjach farmaceutycznych według wynalazku można zmieniać tak, aby uzyskać ilość składnika aktywnego, która jest skuteczna do uzyskania pożądanej odpowiedzi terapeutycznej dla konkretnego pacjenta, kompozycji i trybu podawania, bez niedopuszczalnej toksyczności dla pacjenta.

[0137] Wybrany poziom dawkowania będzie zależeć od wielu czynników obejmujących aktywność konkretnego oligomeru według wynalazku lub jego estru, soli lub amidu, drogę podawania, czas podawania, szybkość wydalania lub metabolizm konkretnego stosowanego oligomeru, szybkość i stopień absorpcji, czas trwania leczenia, inne leki, związki i/lub materiały stosowane w połączeniu z konkretnym stosowanym oligomerem, wiek, płeć, masę, stan, ogólny stan zdrowia i wcześniejszy wywiad medyczny leczonego pacjenta i podobne czynniki dobrze znane w dziedzinie medycyny.

[0138] Lekarz lub weterynarz będący znawcą dziedziny może łatwo określić i przepisać skuteczną ilość wymaganej kompozycji farmaceutycznej. Na przykład, lekarz lub weterynarz może rozpocząć dawki związków według wynalazku zastosowanych w kompozycji farmaceutycznej na poziomie niższym niż wymagany do osiągnięcia pożądanego efektu terapeutycznego i stopniowo zwiększać dawkę, aż do uzyskania pożądanego efektu. Ogólnie, odpowiednią dawką dzienną związku według wynalazku będzie ta ilość związku, która jest najniższą skuteczną dawką do wywołania efektu terapeutycznego. Taka skuteczna dawka

będzie ogólnie zależeć od czynników opisanych powyżej. Ogólnie, doustne, dożylnie, do komór mózgu i podskórne dawki związków według wynalazku dla pacjenta, gdy są stosowane do wskazanych efektów, będą w zakresie od około 0,0001 do około 100 mg na kilogram masy ciała na dzień.

[0139] Jeśli jest to pożądane, skuteczną dzienną dawkę związku aktywnego można podawać jako dwie, trzy, cztery, pięć, sześć lub więcej dawek składowych podawanych osobno w odpowiednich przedziałach w ciągu dnia, opcjonalnie w jednostkowych postaciach dawkowania. W niektórych sytuacjach dawkowanie to jedna dawka dziennie. W niektórych przykładach wykonania, dawkowanie to jedno lub więcej podań co każde 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 dni lub co 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 tygodni lub co 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 miesięcy, w zależności od potrzeb, do utrzymania pożądanej ekspresji funkcjonalnego białka dystrofiny.

[0140] Cząsteczki kwasu nukleinowego można podawać komórkom różnymi sposobami znanymi znawcom dziedziny, w tym, ale nie wyłącznie, enkapsulacją w liposomach, przez jontoforezę, lub przez włączenie do innych nośników, takich jak hydrożele, cyklodekstryny, biodegradowalne nanokapsułki i bioadhezyjne mikrosfery, jak tu opisano i jak wiadomo w dziedzinie. W niektórych przykładach wykonania można stosować technologię mikroemulsyfikacji do poprawy biodostępności lipofilowych (nierozpuszczalnych w wodzie) środków farmaceutycznych. Przykłady obejmują Trimetrine (Dordunoo, S. K. i wsp., Drug Development and Industrial Pharmacy, 17(12), 1685-1713, 1991 and REV 5901 (Sheen, P. C. i wsp., J Pharm Sci 80(7), 712-714, 1991). Wśród innych korzyści, mikroemulsyfikacja zapewnia zwiększoną biodostępność przez preferencyjne kierowanie absorpcji do układu limfatycznego zamiast układu krążenia, tym samym omijając wątrobę i zapobiegając zniszczeniu związków w krążeniu wątrobowo-żółciowym.

[0141] W jednym aspekcie wynalazku, kompozycje farmaceutyczne zawierają micelle utworzone z oligomeru tu dostarczonego i co najmniej jednego nośnika amfifilowego, przy czym micelle mają średnią średnicę mniejszą niż około 100 nm. Korzystniejsze przykłady wykonania zapewniają micelle mające średnią średnicę mniejszą niż około 50 nm, a jeszcze korzystniejsze przykłady wykonania zapewniają micelle mające średnią średnicę mniejszą niż około 30 nm lub nawet mniejszą niż około 20 nm.

[0142] Chociaż rozważa się wszystkie odpowiednie nośniki amfifilowe, obecnie korzystnymi nośnikami są na ogół te, które mają status Ogólnie Uznawany za Bezpieczny (ang. Generally-Recognized-as-Safe or GRAS) i które mogą zarówno solubilizować związek według wynalazku, jak i mikroemulsyfikować go na późniejszym etapie, gdy roztwór wchodzi w kontakt ze złożoną fazą wodną (taką jak ta obecna w ludzkim przewodzie pokarmowym). Zazwyczaj składniki amfifilowe, które spełniają te wymagania, mają wartości HLB (równowaga hydrofilowa do lipofilowej) wynoszące 2-20, a ich struktury zawierają prostołańcuchowe reszty alifatyczne w zakresie od C-6 do C-20. Przykładami są glikolizowane tłuszczowe glicerydy polietylenowe i glikole polietylenowe.

[0143] Przykłady nośników amfifilowych obejmują nasycone i jednonienasycone polietylenoglikolizowane glicerydy kwasów tłuszczowych, takie jak te uzyskane z całkowicie lub częściowo uwodornionych różnych olejów roślinnych. Takie oleje mogą korzystnie składać się z glicerydów tri-, di- i mono-kwasów tłuszczowych i estrów di- i mono-glikolu polietylenowego odpowiednich kwasów tłuszczowych, ze szczególnie korzystną kompozycją kwasów tłuszczowych obejmującą kwas kaprynowy 4-10, kwas kaprynowy 3- 9, kwas laurynowy 40-50, kwas mirystynowy 14-24, kwas palmitynowy 4-14 i kwas stearynowy 5-15%. Inna przydatna klasa amfifilowych nośników obejmuje częściowo zestryfikowany sorbitan i/lub sorbitol, z nasyconymi lub mono-nienasyconymi kwasami tłuszczowymi (seria SPAN) lub odpowiednimi etoksylovanymi analogami (seria TWEEN).

[0144] Dostępne komercyjnie nośniki amfifilowe mogą być szczególnie przydatne, w tym seria Gelucire, Labrafil, Labrasol lub Lauroglycol (wszystkie wytwarzane i dystrybuowane przez Gattefosse Corporation, Saint Priest, Francja), mono-oleinian PEG, dioleinian PEG, monolaurynian i dilaurynian PEG, lecytyna, polisorbitat 80, itp. (produkowane i dystrybuowane przez wiele firm w USA i na całym świecie).

[0145] W niektórych przykładach wykonania, dostarczenie może nastąpić przez zastosowanie liposomów, nanokapsulek, mikrocząstek, mikrosfer, cząsteczek lipidowych, pęcherzyków i tym podobnych, do wprowadzenia kompozycji według wynalazku do odpowiednich komórek gospodarza. Kompozycje farmaceutyczne według wynalazku można formułować zwłaszcza do dostarczania albo kapsułkowanych w cząsteczce lipidowej, liposomie, pęcherzyku, nanosferze, nanocząsteczce lub tym podobnych. Formułowanie i zastosowanie takich dostarczających nośników można prowadzić stosując znane i konwencjonalne techniki.

[0146] Hydrofilowymi polimerami odpowiednimi do stosowania w wynalazku są polimery, które łatwo rozpuszczają się w wodzie, mogą być kowalencyjnie związane z lipidem tworzącym pęcherzyki i które są tolerowane *in vivo* bez efektów toksycznych (tj. są biokompatybilne). Odpowiednie polimery obejmują glikol polietylenowy (PEG), polilaktyk (również określane jako polilaktyd), kwas poliglikolowy (również określane jako poliglikolid), kopolimer polilaktydu - kwasu poliglikolowego i alkohol poliwinylowy. W pewnych przykładach wykonania polimery mają masę cząsteczkową od około 100 lub 120 daltonów do około 5000 lub 10000 daltonów lub od około 300 daltonów do około 5000 daltonów. W innych przykładach wykonania, polimer jest glikolem polietylenowym o masie cząsteczkowej od około 100 do około 5000 daltonów lub ma masę cząsteczkową od około 300 do około 5000 daltonów. W pewnych przykładach wykonania, polimerem jest glikol polietylenowy o masie 750 daltonów (PEG (750)). Polimery można również zdefiniować przez liczbę zawartych w nich monomerów; w korzystnym przykładzie wykonania wynalazku wykorzystuje się polimery co najmniej około trzech monomerów, takie polimery PEG składające się z trzech monomerów (około 150 daltonów).

[0147] Inne hydrofilowe polimery, które mogą być odpowiednie do zastosowania w wynalazku obejmują poliwinylpirolidon, polimetoksazolinę, polietyloksazolinę, polihydroksypropylo-metakryloamid, polimetakryloamid, polidimetakryloamid i pochodne celulozy, takie jak hydroksymetyloceluloza lub hydroksyetyloceluloza.

[0148] W niektórych przykładach wykonania, kompozycja farmaceutyczna według wynalazku zawiera biokompatybilny polimer wybrany z grupy składającej się z poliamidów, poliwęglanów, polialkilenów, polimery estrów akrylowych i metakrylowych, polimerów poliwinylowych, poliglikolidów, polisiloksanów, poliuretanów i ich kopolimerów celuloz, polipropylenu, polietylenów, polistyrenu, polimerów kwasu mlekowego i glikolowego, polibezwodników, poli(orto)estrów, poli(kwasu butynowego), poli(kwasu walerianowego), poli(laktydu-ko-kaprolaktonu), polisacharydów, białek kwasów polihialuronowych, policyjanoakrylanów i ich mieszanek, mieszanin lub kopolimerów.

[0149] Cyklodekstryny są cyklicznymi oligosacharydami, składającymi się z 6, 7 i 8 jednostek glukozy, oznaczonych odpowiednio grecką literą α , β lub γ . Jednostki glukozy połączone są wiązaniami α -1,4-glikozydowymi. W wyniku konformacji krzesłkowej jednostek cukrowych, wszystkie drugorzędowe grupy hydroksylowe (w C-2, C-3) znajdują się po jednej stronie pierścienia, podczas gdy wszystkie pierwszorzędowe grupy hydroksylowe w C-6 znajdują się po drugiej stronie pierścienia. W rezultacie powierzchnie zewnętrzne są hydrofilowe, co powoduje, że cyklodekstryny są rozpuszczalne w wodzie. W przeciwieństwie do tego, wnętrza cyklodekstryn są hydrofobowe, ponieważ są wyłożone wodorem atomów C-3 i C-5 i eteropodobnymi atomami tlenu. Matryce te umożliwiają kompleksowanie z szeregiem związków, stosunkowo hydrofobowych, w tym, na przykład, związkami steroidowymi, takimi jak 17 α -estradiol (patrz, na przykład, Van Uden i wsp. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 38:1-3-113 (1994)). Kompleksowanie odbywa się przez oddziaływania Van der Waalsa i tworzenie wiązań wodorowych. Ogólny przegląd chemii cyklodekstryn można znaleźć w Wenz, *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33:803-822 (1994).

[0150] Właściwości fizykochemiczne pochodnych cyklodekstryny zależą silnie od rodzaju i stopnia podstawienia. Na przykład ich rozpuszczalność w wodzie waha się od nierozpuszczalnych (np. triacetylo-beta-cyklodekstryna) do 147% rozpuszczalnych (wag./obj.) (G-2-beta-cyklodekstryna). Ponadto są rozpuszczalne w wielu rozpuszczalnikach organicznych. Właściwości cyklodekstryn umożliwiają kontrolę rozpuszczalności różnych składników formulacji przez zwiększenie lub zmniejszenie ich rozpuszczalności.

[0151] Opisano liczne cyklodekstryny i sposoby ich otrzymywania. Na przykład, Parmeter (I) i wsp. (patent USA nr 3,453,259) i Gramera i wsp. (patent USA nr 3 459 731) opisali elektroneutralne cyklodekstryny. Inne pochodne obejmują cyklodekstryny o kationowych właściwościach [Parmeter (II), patent US nr 3,453,257], nierozpuszczalne usieciowane cyklodekstryny (Solms, patent US nr 3,420,788) i cyklodekstryny o właściwościach anionowych [Parmeter (III), patent US nr 3,426,011]. Spośród pochodnych cyklodekstryny o właściwościach anionowych do macierzystej cyklodekstryny dołączono kwasy karboksylowe, kwasy fosfonowe, kwasy fosfinowe, kwasy fosforawe, kwasy fosforowe, kwasy tiofosfonowe, kwasy tiosulfonowe i kwasy sulfonowe [patrz Parametr (III), powyżej]. Ponadto, pochodne cyklodekstryny eteru sulfoalkilowego zostały opisane przez Stellę i wsp. (patent USA nr 5,134,127).

[0152] Liposomy składają się z co najmniej jednej dwuwarstwowej błony lipidowej otaczającej wodny przedział wewnętrzny. Liposomy mogą być charakteryzowane przez rodzaj błony i

rozmiar. Małe pęcherzyki jednowarstwowe (SUV) mają pojedynczą membranę i zazwyczaj mają średnicę od 0,02 do 0,05 μm ; duże pęcherzyki jednowarstwowe (ang. large unilamellar vesicles - LUVS) są zazwyczaj większe niż 0,05 μm . Oligolamelarne duże pęcherzyki i multilamelarne pęcherzyki mają wiele, na ogół współśrodkowych, warstw membranowych i są zwykle większe niż 0,1 μm . Liposomy z kilkoma niekoncentrycznymi błonami, tj. kilka mniejszych pęcherzyków zawartych w większym pęcherzyku, są nazywane pęcherzykami wielopęcherzykowymi.

[0153] Jeden aspekt wynalazku dotyczy kompozycji farmaceutycznych zawierających liposomy zawierające oligomer według wynalazku, przy czym błona liposomowa jest formułowana do zapewnienia liposomu o zwiększonej nośności. Alternatywnie lub dodatkowo, antysensowny oligonukleotyd według wynalazku może być zawarty w, lub zaadsorbowany na dwuwarstwie liposomowej liposomu. Antysensowny oligonukleotyd według wynalazku może być agregowany z lipidowym surfaktantem i przenoszony w wewnętrznej przestrzeni liposomu; w tych przypadkach membrana liposomowa jest formułowana tak, aby była odporna na zakłócające działanie agregatu środka aktywnego-surfaktantu.

[0154] Według jednego przykładu wykonania wynalazku, podwójna warstwa lipidowa liposomu zawiera lipidy derywatyzowane glikolem polietylenowym (PEG), tak, że łańcuchy PEG przebiegają od wewnętrznej powierzchni dwuwarstwy lipidowej do przestrzeni wewnętrznej kapsułkowanej przez liposom i przebiegają od zewnętrznej warstwy dwuwarstwy lipidowej do otaczającego środowiska.

[0155] Substancje aktywne zawarte w liposomach według wynalazku są w postaci solubilizowanej. Agregaty surfaktantu i substancji aktywnej (takie jak emulsje lub micelle zawierające substancję aktywną będącą przedmiotem zainteresowania) mogą być zamknięte w wewnętrznej przestrzeni liposomów według wynalazku. Surfaktant działa dyspergując i solubilizując środek aktywny i może być wybrany spośród dowolnego odpowiedniego alifatycznego, cykloalifatycznego lub aromatycznego surfaktantu, w tym, ale nie wyłącznie, biokompatybilnych lizofosfatydylocholin (LPG) o różnych długościach łańcucha (na przykład od około C14 do około C20). Lipidy pochodzące od polimerów, takie jak lipidy PEG, można także stosować do tworzenia miceli, ponieważ będą one hamować fuzję miceli/błony i ponieważ dodanie polimeru do cząsteczek surfaktantu obniża CMC surfaktantu i pomaga w tworzeniu miceli. Korzystne są surfaktanty z CMO w zakresie mikromolowym; surfaktanty o wyższej ilości CMC można wykorzystać do otrzymywania miceli uwięzionych w liposomach według wynalazku.

[0156] Liposomy według wynalazku można otrzymać dowolną z wielu technik, które są znane w dziedzinie. Patrz np. patent USA nr 4,235,871; opublikowane zgłoszenia PCT WO 96/14057; New RRC, Liposomes: A practical approach, IRL Press, Oxford (1990), strony 33-104; Lasic DD, Liposomes from physics to applications, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1993. Na przykład, liposomy według wynalazku można otrzymać przez dyfundowanie lipidu derywatyzowanego hydrofilowym polimerem do wcześniej wytworzonych liposomów, tak jak przez ekspozycję wcześniej wytworzonych liposomów na micelle złożone z polimerów szczepionych lipidem, przy stężeniach lipidów odpowiadających końcowym procentom

molowym derywatyzowanego lipidu, który jest pożądanym w liposomie. Liposomy zawierające polimer hydrofilowy można również wytworzyć przez homogenizację, hydratację w polu lipidowym lub techniki wytlaczania, jakie są znane w dziedzinie.

[0157] W innej przykładowej procedurze formulacji, środek aktywny jest najpierw dyspergowany przez sonikację w lizofosfatydylocholinie lub innym surfaktancie o niskiej CMC (w tym lipidach szczepionych polimerem), który łatwo rozpuszcza cząsteczki hydrofobowe. Otrzymaną micelną zawiesinę środka aktywnego stosuje się następnie do uwodnienia wysuszonej próbki lipidowej, która zawiera odpowiedni procent molowy lipidu zaszczeplonego polimerem lub cholesterolu. Zawiesina lipidów i substancji aktywnych jest następnie formowana w liposomy z zastosowaniem technik wytlaczania znanych w dziedzinie, a uzyskane liposomy oddziela się od niekapsułkowanego roztworu za pomocą standardowej separacji kolumnowej.

[0158] W jednym aspekcie wynalazku, liposomy są otrzymywane tak, aby miały zasadniczo jednorodny rozmiar w wybranym zakresie wielkości. Jeden skuteczny sposób wymiarowania obejmuje wytłaczanie wodnej zawiesiny liposomów za pomocą szeregu membran poliwęglanowych o wybranej jednorodnej wielkości porów; Rozmiar porów membrany odpowiada w przybliżeniu największym rozmiarom liposomów wytwarzanych przez wytłaczanie przez tę membranę. Patrz np. patent USA nr 4,737,323 (12 kwietnia 1988 r.). W niektórych przykładach wykonania odczynnik, takie jak DharmaFECT® i Lipofectamine® mogą być stosowane do wprowadzania polinukleotydów lub białek do komórek.

[0159] Charakterystyka uwalniania kompozycji farmaceutycznej według wynalazku zależy od materiału kapsułkującego, stężenia kapsułkowanego leku i obecności modyfikatorów uwalniania. Na przykład, uwalnianie może być poddane manipulacjom, aby było zależne od pH, na przykład, stosując powłokę wrażliwą na pH, która uwalnia tylko przy niskim pH, jak w żołądku, lub przy wyższym pH, jak w jelicie. Można zastosować powłokę dojelitową, aby zapobiec uwolnieniu do momentu przejścia przez żołądek. Można stosować wiele powłok lub mieszanin cyjanamidu kapsułkowanych w różnych materiałach do uzyskania początkowego uwalniania w żołądku, z dalszym późniejszym uwalnianiem w jelicie. Uwalnianie można także poddawać manipulacjom przez włączenie soli lub środków porotwórczych, które mogą zwiększać pobieranie wody lub uwalnianie leku przez dyfuzję z kapsułki. Do kontrolowania szybkości uwalniania można również stosować substancje pomocnicze, które modyfikują rozpuszczalność leku. Można również włączyć środki, które zwiększają degradację macierzy lub uwalnianie z macierzy. Można je dodawać do leku, dodawać jako osobną fazę (tj. jako cząsteczki) lub można je wspólnie rozpuszczać w fazie polimeru, w zależności od związku. W większości przypadków ilość ta powinna wynosić od 0,1 do 30% (wag./wag. polimeru). Typy wzmacniaczy degradacji obejmują sole nieorganiczne, takie jak siarczan amonu i chlorek amonu, kwasy organiczne, takie jak kwas cytrynowy, kwas benzoowy i kwas askorbinowy, zasady nieorganiczne, takie jak węglan sodu, węglan potasu, węglan wapnia, węglan cynku i wodorotlenek cynku; zasady organiczne, takie jak siarczan protaminy, spermina, cholina, etanoloamina, dietanoloamina i trietanoloamina i surfaktanty, takie jak Tween® i Pluronic®. Środki porotwórcze, które dodają mikrostrukturę do matrycy (tj. związki rozpuszczalne w

wodzie, takie jak nieorganiczne sole i cukry) dodaje się w postaci cząsteczek. Zakres wynosi zazwyczaj od jednego do trzydziestu procent (wag./wag. polimeru).

[0160] Wychwyty można także poddawać manipulacji zmieniając czas przebywania cząstek w jelitach. Można to osiągnąć, na przykład, przez powlekanie cząsteczki lub wybór jako materiału kapsułkującego, polimeru adhezyjnego śluzówki. Przykłady obejmują większość polimerów z wolnymi grupami karboksylowymi, takich jak chitozan, celulozy, a zwłaszcza poliakrylany (zgodnie z zastosowaniem tu, poliakrylany dotyczą polimerów obejmujących grupy akrylanowe i zmodyfikowane grupy akrylanowe, takie jak cyjanoakrylany i metakrylany).

[0161] Oligomer można formułować tak, aby był zawarty w lub dostosowany do uwalniania za pomocą chirurgicznego lub medycznego wyrobu lub implantu. W niektórych aspektach implant może być powleczony lub w inny sposób potraktowany oligomerem. Na przykład, hydrożele lub inne polimery, takie jak biokompatybilne i/lub biodegradowalne polimery, mogą być stosowane do powlekania implantu kompozycjami według wynalazku (tj. kompozycja może być dostosowana do zastosowania z wyrobem medycznym z zastosowaniem hydrożelu lub innego polimeru). Polimery i kopolimery do powlekania wyrobów medycznych środkiem są dobrze znanym w dziedzinie. Nieograniczające przykłady implantów obejmują, między innymi, stenty, stenty uwalniające lek, szwy, protezy, cewniki naczyniowe, cewniki do dializy, przeszczepy naczyniowe, protezy zastawek serca, rozruszniki serca, wszczepialne defibrylatory kardiowertery, igły dożylnie, urządzenia do nastawiania i formowania kości, takie jak szpilki, śruby, płytki i inne wyroby i matryce tkanek sztucznych do gojenia ran.

[0162] Oprócz dostarczonych tutaj sposobów, oligomery do zastosowania według wynalazku można formułować do podawania w dowolny dogodny sposób do stosowania w medycynie ludzkiej lub weterynaryjnej, analogicznie do innych środków farmaceutycznych. Anty-sensowne oligomery i ich odpowiednie kompozycje farmaceutyczne można podawać osobno lub w kombinacji z innymi strategiami terapeutycznymi w leczeniu dystrofii mięśniowej, takimi jak przeszczepianie mioblastów, terapie komórkami macierzystymi, podawanie antybiotyków aminoglikozydowych, inhibitory proteasomów i terapie regulujące w górę (np. podwyższające poziom utrofiny, autosomalnego paralogu dystrofiny).

[0163] Opisane drogi podawania są jedynie orientacyjne, ponieważ wykwalifikowany lekarz będzie w stanie łatwo określić optymalną drogę podawania i dowolną dawkę dla dowolnego konkretnego zwierzęcia i stanu. Podjęto wiele prób wprowadzenia funkcjonalnego nowego materiału genetycznego do komórek, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* (Friedmann (1989) *Science*, 244:1275-1280). Podejścia te obejmują integrację genu podlegającego ekspresji do zmodyfikowanych retrowirusów (Friedmann (1989) *supra*; Rosenberg (1991) *Cancer Research* 51(18), suppl.: 5074S-5079S); integrację z wektorami nie-retrowirusowymi (np. wektorami na bazie wirusów związanych z adenowirusami) (Rosenfeld, i wsp. (1992) *Cell*, 68:143-155; Rosenfeld i wsp. (1991) *Science*, 252:431-434); lub dostarczanie transgenu połączonego z heterologicznym elementem wzmacniającym promotor przez liposomy (Friedmann (1989), powyżej, Brigham, i wsp. (1989) *Am. J. Med. Sci.*, 298:278-281; Nabel i wsp. (1990) *Science*, 249:1285-1288; Hazinski i wsp. (1991) *Am. J. Resp. Cell Molec. Biol.*, 4:206-209; i Wang i Huang (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 84:7851-7855); sprzężone ze specyficznymi dla

ligandu układami transportowymi opartymi na kationach (Wu i Wu (1988) J. Biol. Chem., 263:14621-14624) lub zastosowanie nagiego DNA, wektorów ekspresyjnych (Nabel i wsp. (1990), *supra*); Wolff i wsp. (1990) Science, 247:1465-1468). Bezpośrednie wstrzyknięcie transgenów do tkanki wytwarza tylko lokalną ekspresję (Rosenfeld (1992) *supra*); Rosenfeld i wsp. (1991) *supra*; Brigham i wsp. (1989) *supra*; Nabel (1990) *supra*; i Hazinski i wsp. (1991) *supra*). Grupa Brigham i wsp. (Am. J. Med. Sci. (1989) 298: 278-281 i Clinical Research (1991) 39 (abstrakt)) opisali transfekcję *in vivo* tylko płuc myszy po dożylnym lub dotchawicznym podaniu kompleksu liposomowego DNA. Przykładem artykułu przeglądowego na temat procedur terapii genowej człowieka jest: Anderson, Science (1992) 256:808-813.

IV. Przykłady

Materiały i sposoby

Warunki traktowania hodowli komórkowych i tkankowych

[0164] Komórki ludzkiego mięsaka prązkowanokomórkowego (ATCC, CCL-136; komórki RD) wysiano do kolb T75 traktowanych hodowlą tkankową (Nunc) przy $1,5 \times 10^6$ komórek/kolbę w 24 ml ogrzanej DMEM z L-glutaminą (HyClone), 10% płodową surowicą bydlęcą i 1% roztworem antybiotykowym, penicyliny-streptomycyny (CelGro); po 24 godzinach podłoże odessano, komórki przemyto raz w ogrzewanym PBS i dodano świeże podłoże. Komórki hodowano do 80% konfluencji w inkubatorze w 37°C przy 5,0% CO₂ i zbierano za pomocą trypsyny. Liofilizowane fosfordiamidowe oligomery morfolinowe (PMO) ponownie zawieszono w około 0,5 do 2,0 mM w wodzie wolnej od nukleazy; do zweryfikowania molarności, roztwory PMO zmierzono z zastosowaniem spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). PMO dostarczono do komórek RD stosując nukleoporację zgodnie z instrukcjami producenta i zestawem SG (Lonza). PMO testowano w różnych stężeniach, jak wskazano (np. 2,5, 5, 10, 12,5, 20 i 25 mikromolarnym). Komórki inkubowano przez 24 godziny po nukleoporacji przy w przybliżeniu $2 - 3 \times 10^5$ komórek na dołek 12- lub 24-dołkowej płytki (n = 2 lub 3), a następnie poddano ekstrakcji RNA, jak opisano poniżej.

[0165] Pierwotne ludzkie mioblasty hodowano w podłożach Skeletal Muscle Cell Growth Media (PromoCell), stosując standardowe techniki. Nukleopację PMO przy różnych stężeniach przeprowadzono jak opisano powyżej dla komórek RD. Komórki następnie umieszczono w potrójnych dołkach 12-dołkowej płytki w podłożu wzrostowym PromoCell i pozostawiono do inkubacji przez 24 godziny przed ekstrakcją RNA, jak opisano poniżej.

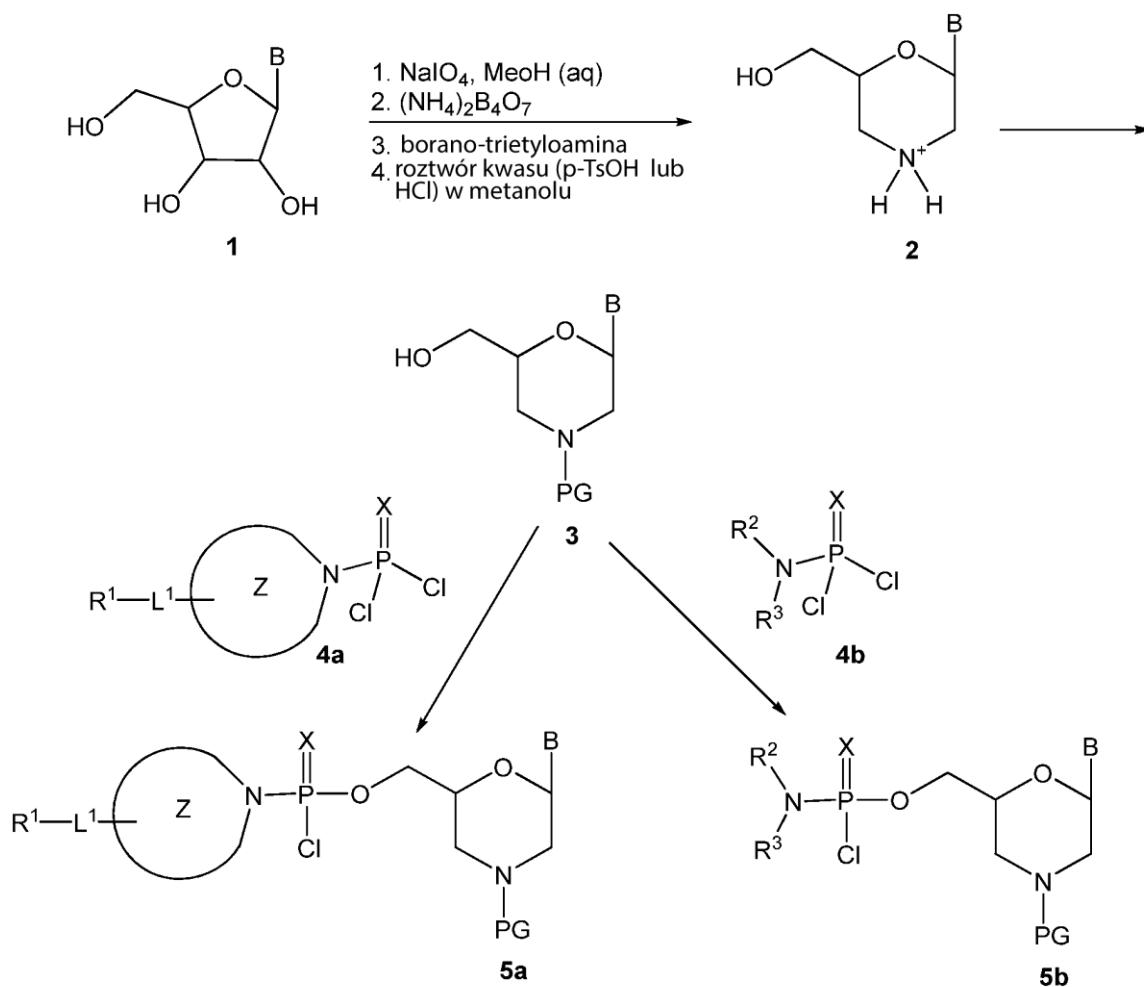
Ekstrakcja RNA i amplifikacja PCR

[0166] RNA ekstrahowano z komórek traktowanych PMO (komórki RD lub pierwotne ludzkie mioblasty) z zastosowaniem 96-dołkowego zestawu do izolacji RNA RNASpin od GE Healthcare i poddano nested RT-PCR, stosując standardowe techniki i następujące pary primerów. Zewnętrzne primery: przedni 5'-CTTGGACAGAACTTACCGACTGG-3' (SEQ ID NO: 22), wsteczny 5'-GTTTCT- TCCAAAGCAGCCTCTCG -3'(SEQ ID NO: 23); wewnętrzne primery: przedni 5'-GCAGGATTTGGAACAGAGGCG-3'(SEQ ID NO: 25), wsteczny 5'-CATCTACATTTGTCTGCCACTGG-3'(SEQ ID NO: 25). Pomijanie eksonu

mierzone za pomocą elektroforezy żelowej lub z zastosowaniem bioanalyzera Caliper LabChip i % pominięcia eksonów (tj. natężenie pasma produktu z pominięciem eksonu w stosunku do produktu PCR o pełnej długości), jak pokazano na **fig. 3-5**.

Otrzymywanie podjednostek morfolinowych, PMO i PMO ze zmodyfikowanymi połączeniami między podjednostkami

[0167]



schemat 1: ogólny szlak syntezy dla PMO i podjednostek zmodyfikowanych PMO

[0168] W odniesieniu do Schematu Reakcji 1, przy czym B oznacza ugrupowanie do parowania zasad i PG reprezentuje grupę zabezpieczającą, podjednostki morfolinowe można otrzymać z odpowiedniego rybonukleozydu (1), jak pokazano. Podjednostka morfolinowa (2) może być opcjonalnie zabezpieczona przez reakcję z odpowiednim prekursorem grupy zabezpieczającej, na przykład chlorkiem tritylu. Grupę zabezpieczającą 3' ogólnie usuwa się podczas syntezy oligomerowej w stanie stałym, jak opisano bardziej szczegółowo poniżej. Ugrupowania parowania zasad może być odpowiednio zabezpieczone do syntezy oligomeru w fazie stałej. Odpowiednie grupy zabezpieczające obejmują benzoil dla adeniny i cytozyny, fenyloacetyl dla guaniny i piwaloiloksymetyl dla hipoksantyny (I). Grupa piwaloiloksymetylowa może zostać

wprowadzona na pozycję N1 heterocyklicznej zasady hipoksantyny. Chociaż można zastosować niezabezpieczoną podjednostkę hipoksantynową, wydajności reakcji aktywacji są o wiele lepsze, gdy zasada jest zabezpieczona. Inne odpowiednie grupy zabezpieczające obejmują te ujawnione w patencie USA nr 8,076,476, który włącza się tu w całości jako odniesienie.

[0169] Reakcja związku **3** z aktywowanym związkiem fosforu **4a** lub **4b** skutkuje podjednostkami morfolinowymi mającymi pożądane ugrupowanie łączące (**5a** lub **5b**). Należy zauważyć, że ugrupowanie R¹ i/lub L¹ może być również zainstalowane na heterocyklicznym pierścieniu Z po utworzeniu wiązania P-O lub nawet po włączeniu podjednostki do oligomeru.

[0170] Związki o strukturze **4a** lub **4b** można otrzymywać stosując dowolną liczbę sposobów znanych znawcom, w tym te opisane w przykładach. Sprzężenie z ugrupowaniem morfolinowym przebiega następnie jak wskazano powyżej.

[0171] Związki o strukturze **5a** lub **5b** mogą być stosowane w syntezie oligomerowej w fazie stałej do otrzymywania oligomerów obejmujących połączenia między podjednostkami. Takie sposoby są również dobrze znane w dziedzinie. W skrócie, związek o strukturze **5a** lub **5b** można modyfikować na końcu 5', aby zawierał linkera do stałego nośnika. Po związaniu, grupę zabezpieczającą **5a** lub **5b** (np. trityl na końcu 3') usuwa się i wolną aminę poddaje się reakcji z ugrupowaniem aktywowanego fosforu drugiego związku o strukturze **5** (lub jego analogu). Tę sekwencję powtarza się aż do uzyskania pożądanej długości oligo. Grupa zabezpieczająca na końcu 3' może zostać albo usunięta, albo pozostawiona, jeśli pożądana jest modyfikacja 3'. Oligo można usunąć ze stałego nośnika, stosując dowolną liczbę sposobów lub przykładowe traktowanie zasadą do rozszczepienia połączenia z nośnikiem stałym.

[0172] Otrzymywanie oligomerów morfolino w ogólnych i swoistych oligomerach morfolino według wynalazku opisano bardziej szczegółowo w przykładach.

Przykład 1

Otrzymywanie oligomerów morfolino

[0173] Otrzymywanie związków według wynalazku przeprowadza się stosując następujący protokół:

Otrzymywanie fenylokarbaminianu tritylopiiperazyny **35** (**fig. 2**): Do schłodzonej zawiesiny związku **11** w dichlorometanie (6 ml/g **11**) dodano roztwór węglanu potasu (3,2 równ.) w wodzie (4 ml/g węglanu potasu). Do tej dwufazowej mieszaniny powoli dodano roztwór chloromrówczanu fenylu (1,03 równ.) w dichlorometanie (2 g/g chloromrówczanu fenylu). Mieszaninę reakcyjną ogrzano do 20°C. Po zakończeniu reakcji (1-2 godziny) warstwy rozdzielono. Warstwę organiczną przemyto wodą i wysuszono nad bezwodnym węglanem potasu. Produkt **35** wyizolowano za pomocą krystalizacji z acetonitrylu.

Otrzymywanie alkoholu karbaminianowego **36**: Wodorek sodu (1,2 równ.) zawieszono w 1-metylo-2-pirolidonie (32 ml/g wodoru sodu). Do tej zawiesiny dodano glikol trietylenowy (10,0 równ.) i związek **35** (1,0 równ.). Powstałą zawiesinę ogrzano do 95°C. Po zakończeniu reakcji (1-2 godziny) mieszaninę schłodzono do 20°C. Do tej mieszaniny

dodano 30% eter dichlorometan/eter tert-butylo-metylowy (obj.:obj.) i wodę. Warstwę organiczną zawierającą produkt przemyto kolejno wodnym NaOH, wodnym kwasem bursztynowym i nasyconym wodnym roztworem chlorku sodu. Produkt 36 wyizolowano przez krystalizację z dichlorometanu/eteru tert-butylo-metylowego/heptanu.

Otrzymywanie ogonowego kwasu 37: Do roztworu związku 36 w tetrahydrofuranie (7 ml/g 36) dodano bezwodnik bursztynowy (2,0 równ.) i DMAP (0,5 równ.). Mieszaninę ogrzano do 50°C. Po zakończeniu reakcji (5 godzin), mieszaninę schłodzono do 20°C i doprowadzono do pH 8,5 wodnym NaHCO₃. Dodano eter metylo-tert-butylowy i produkt ekstrahowano do warstwy wodnej. Dodano dichlorometan i pH mieszaniny doprowadzono do 3 za pomocą wodnego roztworu kwasu cytrynowego. Warstwę organiczną zawierającą produkt przemyto mieszaniną buforu cytrynianowego i nasyconego wodnego roztworu chlorku sodu o pH = 3. Ten roztwór dichlorometanu 37 zastosowano bez izolacji do otrzymania związku 38.

Otrzymywanie 38: Do roztworu związku 37 dodano imid kwasu N-hydroksy-5-norborneno-2,3-dikarboksylowego (HONB) (1,02 równ.), 4-dimetyloaminopirydynę (DMAP) (0,34 równ.), a następnie chlorowodorek 1-(3-dimetyloaminopropyl)-N'-etylokarbodiimidu (EDC) (1,1 równ.). Mieszaninę ogrzano do 55°C. Po zakończeniu reakcji (4-5 godzin), mieszaninę schłodzono do 20°C i przemyto kolejno 1:1 0,2 M kwasem cytrynowym/solanką i solanką. Roztwór dichlorometanu poddano wymianie rozpuszczalnika na aceton, a następnie na N,N-dimetyloformamid i produkt wyizolowano przez wytrącenie z acetonu/N,N-dimetyloformamidu do nasyconego wodnego roztworu chlorku sodu. Surowy produkt ponownie zawieszono kilka razy w wodzie do usunięcia resztkowego N,N-dimetyloformamidu i soli.

[0174] Wprowadzenie aktywowanego „ogona” na żywicę załadowaną kotwicą przeprowadzono w dimetyloimidazolidynie (DMI) za pomocą procedury stosowanej do wprowadzania podjednostek podczas syntezy w fazie stałej.

[0175] Otrzymywanie stałego nośnika do syntezy oligomerów morfolinowych: Procedurę tę przeprowadza się w silanizowanym, opłaszczonym peptydowym naczyniu (ChemGlass, NJ, USA) ze spieku szklanego o grubej porowatości (40-60 μm), z górnym mieszadłem i 3-stronnym zaworem typu stopcock z teflonu, aby umożliwić N₂ wydzielanie się pęcherzykami przez spiek lub ekstrakcję próżniową.

[0176] Etapy traktowania/przemywania żywicy w poniższej procedurze składają się z dwóch podstawowych operacji: fluidyzacji żywicy lub reaktora ze złożem mieszanym i ekstrakcji rozpuszczalnikiem/roztworem. W przypadku fluidyzacji żywicy, zawór stopcock ustawiono tak, aby umożliwić przepływanie N₂ przez spiek, a określone traktowanie/przemywanie żywicą dodawano do reaktora i umożliwiano przenikanie i całkowite zwilżenie żywicy. Rozpoczęto mieszanie i mieszano zawiesinę żywicy przez określony czas. Do ekstrakcji rozpuszczalnika/roztworu, zatrzymano mieszanie i przepływ N₂ i uruchomiono pompę próżniową, a następnie ustawiono stopcock, aby umożliwić odprowadzenie

traktowania/przemycia żywicy do odpadów. Wszystkie objętości traktowania/przemycania żywicy wynosiły 15 ml/g żywicy, o ile nie podano inaczej.

[0177] Do żywicy aminometylopolistyrenowej (100-200 mesh; -1,0 mmol/g obciążenia w oparciu o substytucję azotu; 75 g, 1 równ., Polymer Labs, Wielka Brytania, nr części 1464-X799) w silanizowanym, opłaszczonym naczyniu peptydowym dodano 1-metylo-2-pirolidynon (NMP, 20 ml/g żywicy) i żywicy umożliwiono pęcznienie z mieszaniem przez 1-2 h. Po usunięciu rozpuszczalnika spęczniającego żywicę przemyto dichlorometanem (2 x 1-2 minuty), 5% diizopropylometyloaminą w 25% izopropanolu/dichlorometanie (2 x 3-4 minuty) i dichlorometanem (2 x 1-2 minuty). Po odprowadzeniu końcowego płukania żywicę potraktowano roztworem disiarczkowej kotwicy 34 w 1-metylo-2-pirolidynonie (0,17 M, 15 ml/g żywicy, -2,5 równ.) i mieszaninę żywica/reagent ogrzewano do 45°C przez 60 godzin. Po zakończeniu reakcji ogrzewanie przzerwano i roztwór kotwicy odprowadzono, a żywicę przemyto 1-metylo-2-pirolidynonem (4 x 3-4 minuty) i dichlorometanem (6 x 1-2 minuty). Żywicę potraktowano roztworem 10% (obj./obj.) diwęglanu dietylu w dichlorometanie (16 ml/g, 2 x 5-6 minut), a następnie przemyto dichlorometanem (6 x 1-2 minuty). Żywicę 39 (patrz fig. 4) suszono pod strumieniem N₂ przez 1-3 godziny, a następnie w warunkach próżni do stałej masy ($\pm 2\%$). Wydajność: 110-150% pierwotnej masy żywicy.

[0178] Oznaczenie ładunku żywicy aminometylopolistyrenowej-disiarczkowej: Obciążenie żywicy (liczba potencjalnie dostępnych miejsc reaktywnych) określa się za pomocą spektrometrycznego oznaczenia liczby grup trifenylometrylowych (tritylowych) na gram żywicy.

[0179] Znaną masę wysuszonej żywicy (25 ± 3 mg) przenosi się do silanizowanej 25 ml kolby wolumetrycznej i dodaje się ~ 5 ml 2% (obj./obj.) kwasu trifluorooctowego w dichlorometanie. Zawartość miesza się łagodnie wirując, a następnie odstawia na 30 minut. Objętość doprowadzono do 25 ml dodatkowym 2% (obj./obj.) kwasem trifluorooctowym w dichlorometanie i zawartość dokładnie wymieszano. Stosując pipetę z dodatnim przesunięciem, próbkę roztworu zawierającego trityl (500 μ l) przenosi się do 10 ml kolby wolumetrycznej i objętość doprowadza się do 10 ml za pomocą kwasu metanosulfonowego.

[0180] Zawartość kationu tritylowego w końcowym roztworze mierzy się za pomocą absorbancji UV przy 431.7 nm obciążenia żywicy obliczanego w grupach tritylowych na gram żywicy (μ mol/g), stosując odpowiednie objętości, rozcieńczenia, współczynnik ekstynkcji (ϵ : 41 μ mol \cdot 1cm \cdot l) i masę żywicy. Test przeprowadza się trzykrotnie i oblicza średnie obciążenie.

[0181] Procedura obciążania żywicą w tym przykładzie zapewni żywicę z obciążeniem około 500 μ mol/g. Obciążenie 300-400 w μ mol/g, gdy etap włączania kotwicy disiarczkowej prowadzi się przez 24 godziny w temperaturze pokojowej.

[0182] Obciążenie ogona: Stosując tę samą konfigurację i objętości jak przy otrzymywaniu żywicy aminometylopolistyrenowej-disiarczkowej, Ogon można wprowadzić do stałego nośnika. Żywicę obciążoną kotwicą najpierw odbezpieczono w warunkach kwasowych i otrzymany materiał zobojętniono przed sprzęganiem. Do etapu sprzęgania zastosowano roztwór 38 (0,2 M) w DMI zawierający 4-etylomorfolinę (NEM, 0,4 M) zamiast roztworu

kotwicy disiarczkowej. Po 2 godzinach w 45°C żywicę 39 przemyto dwukrotnie 5% diizopropylloetyloaminą w 25% izopropanolu/dichlorometanie i jednokrotnie DCM. Do żywicy dodano roztwór bezwodnika benzoowego (0,4 M) i NEM (0,4 M). Po 25 minutach płaszcz reaktora schłodzony do temperatury pokojowej i żywicę przemyto dwukrotnie 5% diizopropylloetyloaminą w 25% izopropanolu/dichlorometanie i ośmiokrotnie DCM. Żywicę 40 odfiltrowano i wysuszono w warunkach wysokiej próżni. Obciążenie żywicy 40 definiuje się jako obciążenie pierwotnej żywicy aminometylopolistyreno-disiarczkowe 39 zastosowanej w obciążeniu Ogon.

[0183] Synteza fazy stałej: Oligomery morfolinowe otrzymano na Zautomatyzowanym Syntezatorze Peptydów Gilson AMS-422 w 2 ml kolumnach reakcyjnych z polipropylem Gilson (część nr 3980270). Aluminiowy blok z kanałami do przepływu wody został umieszczony wokół kolumn, gdy znajdowały się one na syntezatorze. AMS-422 będzie alternatywnie dodawać roztwory odczynników/do przemywania, utrzymywać przez określony czas i opróżniać kolumny za pomocą próżni.

[0184] W przypadku oligomerów w zakresie aż do około 25 podjednostek długości, żywicę aminometylopolistyreno-disiarczkową z obciążeniem w pobliżu 500 $\mu\text{mol/g}$ żywicy jest korzystna. W przypadku dużych oligomerów, żywica aminometylopolistyreno-disiarczkowa z obciążeniem 300-400 $\mu\text{mol/g}$ żywicy jest korzystna. Jeśli pożądana jest cząsteczka z ogonem 5', żywica, która została obciążona Ogonem, jest wybrana z tymi samymi wytycznymi obciążenia.

[0185] Otrzymano następujące roztwory odczynników:

Roztwór detrytylacyjny: 10% kwas cyjanooctowy (wag./obj.) w 4:1 dichlorometanie/acetonytrylu; Roztwór neutralizacyjny: 5% diizopropylloetyloamina w 3:1 dichlorometanie/izopropanolu; Roztwór sprzęgający: 0,18 M (lub 0,24 M dla oligomerów mających więcej niż 20 podjednostek) aktywowanej podjednostki morfolinowej pożądanej zasady i typu wiązania i 0,4 M N-etylomorfoliny, w 1,3-dimetyloimidazolidynie. Dichlorometan (DCM) zastosowano jako przemywanie przejściowe, oddzielając różne przemywania roztworem odczynnika.

[0186] Na syntezatorze, przy bloku nastawionym na 42°C, do każdej kolumny zawierającej 30 mg żywicy aminometylopolistyrenodisiarczkowej (lub żywicy Ogon) dodano 2 ml 1-metylo-2-pirolidynonu i pozostawiono w temperaturze pokojowej na 30 minut. Po przemyciu 2 razy 2 ml dichlorometanu, zastosowano następujący cykl syntezy:

<u>Etap</u>	<u>Objętość</u>	<u>Dostarczanie</u>	<u>Czas utrzymywania</u>
Detrytylacja	1,5 ml	Kolektor	15 sekund
Detrytylacja	1,5 ml	Kolektor	15 sekund
Detrytylacja	1,5 ml	Kolektor	15 sekund
Detrytylacja	1,5 ml	Kolektor	15 sekund
Detrytylacja	1,5 ml	Kolektor	15 sekund

Detrytylacja	1,5 ml	Kolektor	15 sekund
Detrytylacja	1,5 ml	Kolektor	15 sekund
DCM	1,5 ml	Kolektor	30 sekund
Neutralizacja	1,5 ml	Kolektor	30 sekund
Neutralizacja	1,5 ml	Kolektor	30 sekund
Neutralizacja	1,5 ml	Kolektor	30 sekund
Neutralizacja	1,5 ml	Kolektor	30 sekund
Neutralizacja	1,5 ml	Kolektor	30 sekund
DCM	1,5 ml	Kolektor	30 sekund
Sprzężenie	350-500 μ l	Strzykawka	40 minut
DCM	1,5 ml	Kolektor	30 sekund
Neutralizacja	1,5 ml	Kolektor	30 sekund
Neutralizacja	1,5 ml	Kolektor	30 sekund
DCM	1,5 ml	Kolektor	30 sekund
DCM	1,5 ml	Kolektor	30 sekund
DCM	1,5 ml	Kolektor	30 sekund

[0187] Sekwencje poszczególnych oligomerów zaprogramowano w syntezaorze tak, aby każda kolumna otrzymywała właściwy roztwór sprzęgający (A, C, G, T, I) we właściwej sekwencji. Gdy oligomer w kolumnie zakończył włączenie jego końcowej podjednostki, kolumnę usunięto z bloku, a ostatni cykl przeprowadzono ręcznie za pomocą roztworu sprzęgającego złożonego z chlorku 4-metoksytrifenylometylu (0,32 M w DMI) zawierającego 0,89 M 4-etylomorfoliny.

[0188] Rozszczepienie z żywicy i usunięcie zasad i grup zabezpieczających szkielet: Po metoksytrytylacji żywicę przemyto 8 razy 2 ml 1-metylo-2-pirolidynonu. Dodano 1 ml roztworu do rozszczepiania zawierającego 0,1 M 1,4-ditiotreitol (DTT) i 0,73 M trietyloaminy w 1-metylo-2-pirolidynie, zamknięto kolumnę i pozostawiono w temperaturze pokojowej na 30 minut. Po tym czasie roztwór został spuszczonej do 12 ml fiolki Wheatona. Bardzo skurczoną żywicę przemyto dwukrotnie 300 μ l roztworu do rozszczepienia. Do roztworu dodano 4,0 ml stęż. wodnego amoniaku (przechowywanego w temperaturze -20°C), fiolkę szczelnie zamknięto (nakrętką pokrytą teflonem) i mieszanina odwirowano, aby wymieszać roztwór. Fiolkę umieszczono w piecu o temperaturze 45°C na 16-24 godziny, aby uzyskać rozszczepienie grup zabezpieczających zasadę i szkielet.

[0189] Oczyszczanie surowego produktu: Roztwór amoniaku z fiolki usunięto z pieca i pozostawiono do schłodzenia do temperatury pokojowej. Roztwór rozcieńczono 20 ml 0,28%

wodnego roztworu amoniaku i przepuszczono przez kolumnę o wymiarach 2,5 x 10 cm, zawierającą żywicę Macroprep HQ (BioRad). Gradient soli (A: 0,28% amoniaku z B: 1 M chlorku sodu w 0,28% amoniaku; 0-100% B w 60 min) zastosowano do eluowania piku zawierającego metoksytrytyl. Połączone frakcje połączone i dalej przetwarzano w zależności od pożądanego produktu.

[0190] Demetoksytrytylacja oligomerów morfolinowych: Połączone frakcje z oczyszczania Macroprep traktowano 1 M H₃PO₄ do obniżenia pH do 2,5. Po początkowym mieszanii próbki pozostawiono w temperaturze pokojowej na 4 minuty, po czym zobojętniono je do pH 10-11 za pomocą 2,8% roztworu amoniaku/wody. Produkty oczyszczono za pomocą ekstrakcji w fazie stałej (ang. solid phase extraction - SPE).

[0191] Pakowanie i kondycjonowanie kolumny SPE: Amberchrome CG-300M (Rohm and Haas, Filadelfia, PA) (3 ml) upakowano w 20 ml kolumnach spiekanych (kolumny BioRad Econo-Pac Chromatography (732-1011)) i żywicę przepłukano 3 ml następujących: 0,28% NH₄OH/80% acetonitrylem; 0,5 M NaOH/20% etanolem; wodą; 50 mM H₃PO₄/80% acetonitrylem; wodą; 0,5 NaOH/20% etanolem; wodą; 0,28% NH₄OH.

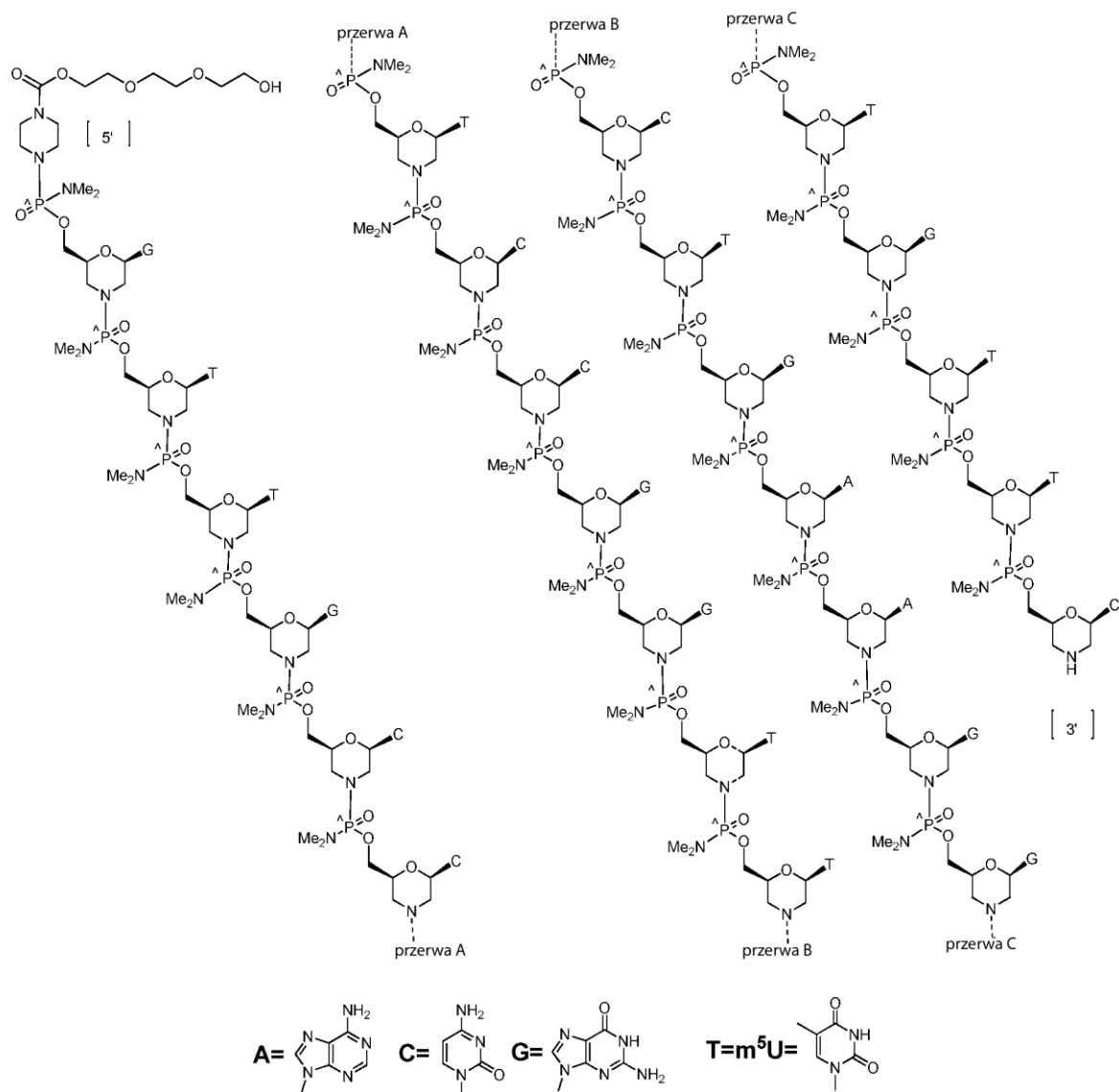
[0192] Oczyszczanie SPE: Roztwór z demetoksytrytylacji załadowano do kolumny i żywicę przepłukano trzy razy 3-6 ml 0,28% wodnego roztworu amoniaku. Fiolkę Wheaton (12 ml) umieszczono pod kolumną i produkt eluowano dwoma przemyciami za pomocą 2 ml 45% acetonitrylu w 0,28% wodnym roztworze amoniaku.

[0193] Izolacja produktu: Roztwory zamrożono w suchym lodzie i fiołki umieszczono w liofilizatorze do wytworzenia puszystego białego proszku. Próbkę rozpuszczono w wodzie, odfiltrowano przez filtr 0,22 mikronowy (Pall Life Sciences, 25 mm filtr strzykawkowy Acrodisc, z 0,2-mikronową membraną HT Tuffryn) za pomocą strzykawki i zmierzono gęstość optyczną (ang. Optical Density - OD) na spektrofotometrze UV do określenia obecnych jednostek OD oligomeru, a także pobrania próbki do analizy. Roztwory następnie umieszczono ponownie w fiołkach Wheaton do liofilizacji.

[0194] Analiza oligomerów morfolinowych za pomocą MALDI: Spektrometrię mas MALDI-TOF zastosowano do określenia kompozycji frakcji w oczyszczeniach, a także jako dowód identyczności (masy cząsteczkowej) oligomerów. Próbkę prowadzono po rozcieńczeniu roztworem kwasu 3,5-dimetoksy-4-hydroksycynamonowego (kwasu synapinowego), 3,4,5-trihydroksyacetonu (THAP) lub kwasu alfa-cyjano-4-hydroksycynamonowego (HCCA) jako matryce.

Przykład 2

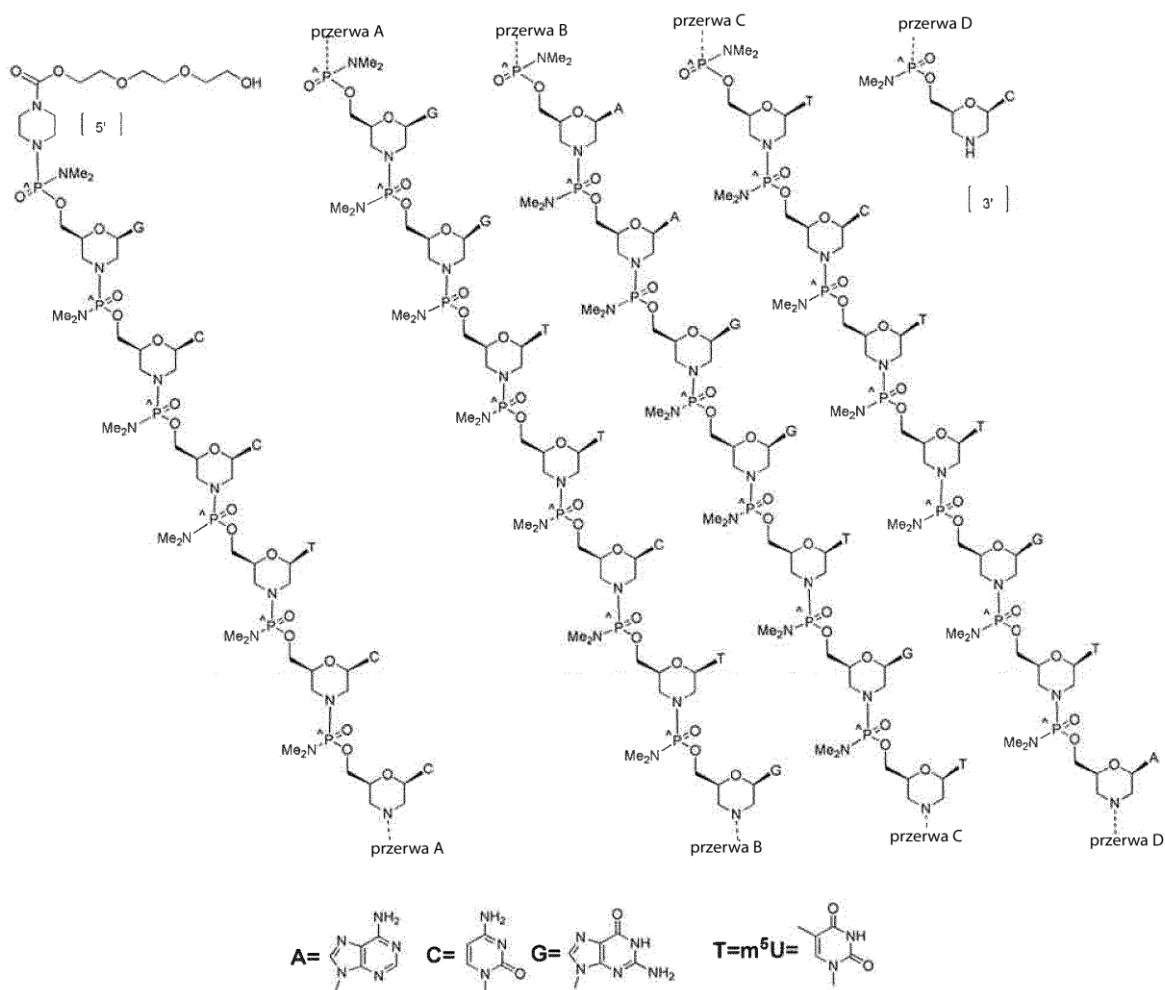
[0195] Stosując protokół opisany w Przykładzie 1, zsyntetyzowano następujące PMO, H53A(+36+60), SEQ ID NO: 1 (5'- GTTGCCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC -3') i zastosowano w Przykładach.



Przykład odniesienia 3

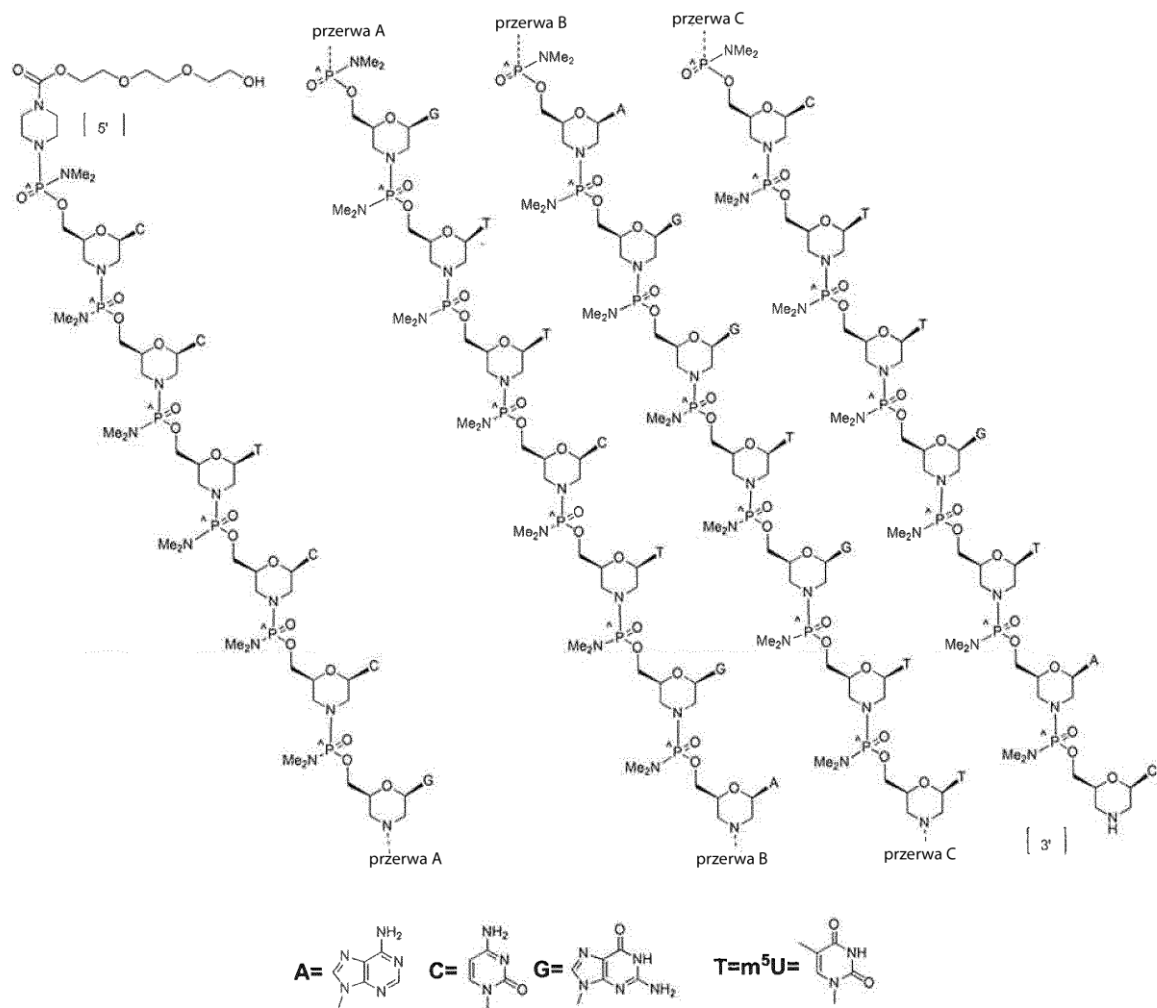
[0196] Stosując protokół opisany w Przykładzie 1, zsyntetyzowano następujące PMO, H53A(+30+57), SEQ ID NO:

2 (5'- GCC TCC GGT TCT GAA GGT GTT CTT GTA C-3')



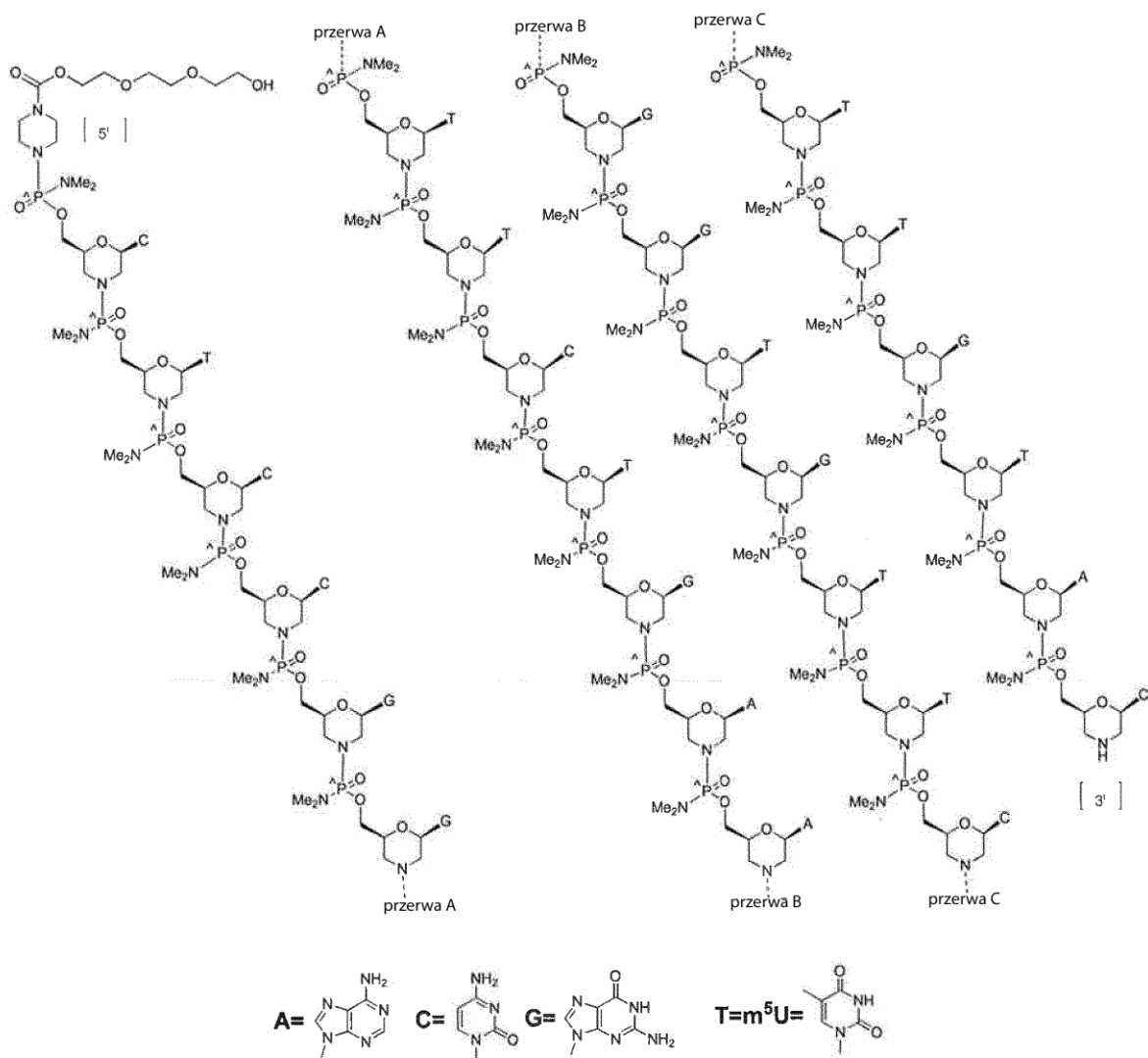
Przykład odniesienia 4

[0197] Stosując protokół opisany w Przykładzie 1, zsyntetyzowano następujące PMO, H53A(+30+56), SEQ ID NO: 3 (5'- CCT CCG GTT CTG AAG GTG TTC TTG TAC-3') i zastosowano w Przykładach.



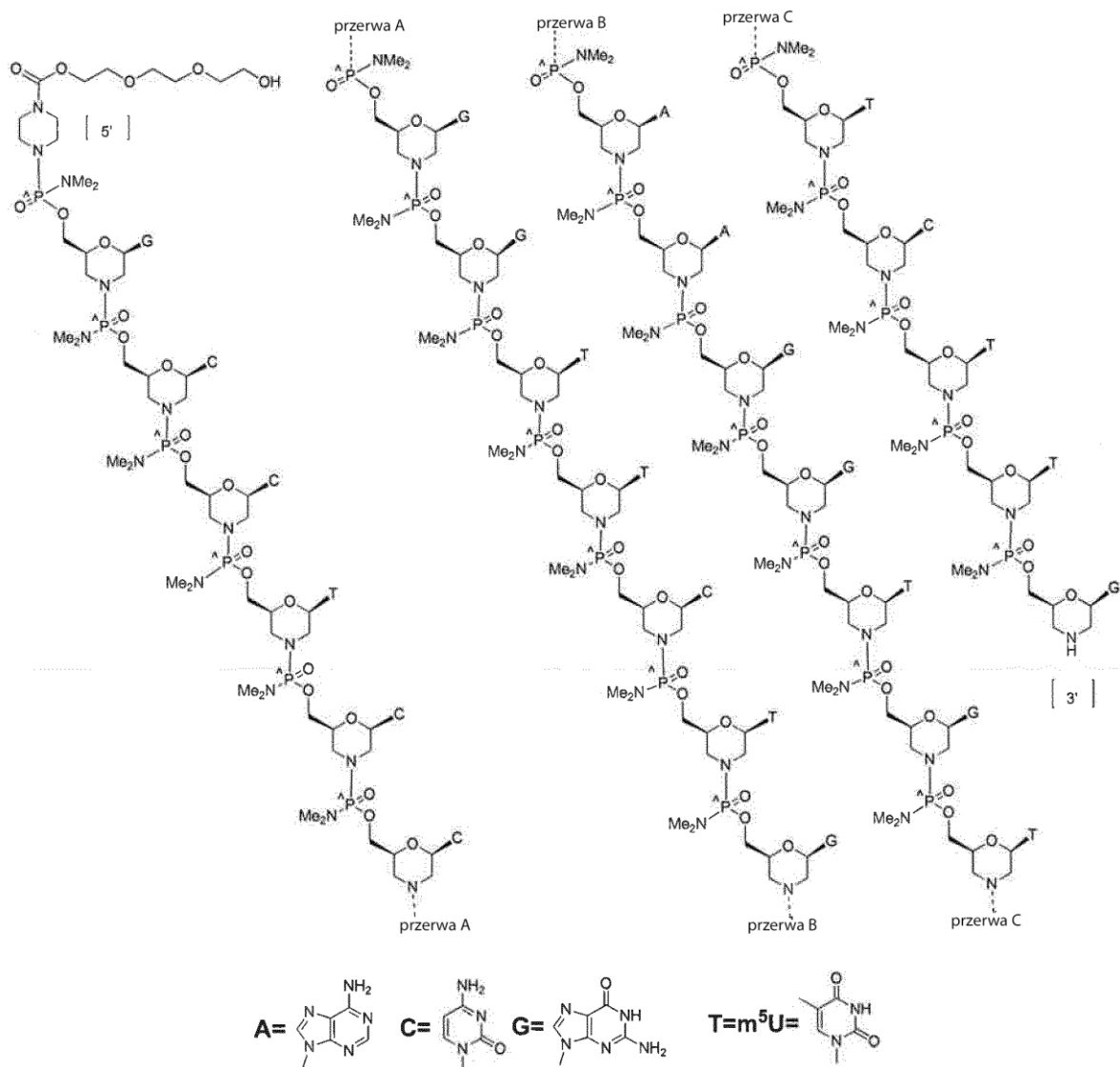
Przykład Odniesienia 5

[0198] Stosując protokół opisany w Przykładzie 1, zsyntetyzowano następujące PMO, H53A(+30+55), SEQ ID NO: 4 (5'- CTC CGG TTC TGA AGG TGT TCT TGT AC-3') i zastosowano w Przykładach.



Przykład odniesienia 6

[0199] Stosując protokół opisany w Przykładzie 1, zsyntetyzowano następujące PMO, H53A(+33+57), SEQ ID NO: 5 (5'- GCC TCC GGT TCT GAA GGT GTT CTT G-3') i zastosowano w Przykładach.



Przykład 7

Pomijanie eksonu 53

[0200] Serię antysensownych oligomerów, które są ukierunkowane na ekson 53 ludzkiej dystrofiny, zaprojektowano i zsyntetyzowano następująco:

Opis	Sekwencja	SEQ ID NO:
H53A(+36+60)	GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC	1
H53A(+30+57)	GCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTAC	2
H53A(+30+56)	CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTAC	3
H53A(+30+55)	CTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTAC	4
H53A(+33+57)	GCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTG	5
H53A(+33+60)	GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTG	6

H53A(+31+55)	CTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTA	7
H53A(+22+46)	TGAAGGTGTTCTTGTA	8
H53A(+23+47)	CTGAAGGTGTTCTTGTA	9

(SEQ ID NO: 2 do 9 nie są według wynalazku)

[0201] Antysensowne oligomery powyżej oceniono pod kątem skuteczności pomijania eksonów przez traktowanie pierwotnych ludzkich mioblastów przy różnych wskazanych stężeniach. W tych eksperymentach jako oligomery porównawcze stosowano antysensowne oligomery odpowiadające H53A(+33+60) i H53A(+31+55). Jak pokazano na **fig. 3 i 4**, oligomer H53A(+36+60) (SEQ ID NO: 1) był wysoce skuteczny w indukowaniu pomijania eksonu 53 w pierwotnych ludzkich komórkach mioblastach. H53A(+31+55) (SEQ ID NO: 7) i H53A(+22+46) (SEQ ID NO: 8) również indukowały pominięcie eksonu 53, ale w mniejszym stopniu niż H53A(+33+60) (SEQ ID NO: 6) i H53A(+36+60) (SEQ ID NO: 1). Jak pokazano na **fig. 3**, H53A(+33+60) i H53A(+36+60) (SEQ ID NO: 6 i SEQ ID NO: 1, odpowiednio) były wysoce skuteczne w indukowaniu pomijania eksonu 53 w hodowanych mioblastach w porównaniu do innych wysoce aktywnych antysensownych oligonukleotydów.

[0202] Dodatkowe powyższe oligomery antysensowne oceniono pod kątem skuteczności pomijania eksonów przez traktowanie komórek RD przy różnych wskazanych stężeniach. W tych eksperymentach oligomer antysensowny odpowiadający H53A(+33+60) (SEQ ID NO: 6) stosowano jako porównawczy oligomer. Jak pokazano na **fig. 4**, oligomery H53A(+30+57), H53A(+30+56), H53A(+30+55) i H53A(+33+57) (odpowiednio SEQ ID NO: 2-5) były porównywalne pod względem aktywności z oligomerem H53A(+33+60) (SEQ ID NO: 6).

[0203] W innym doświadczeniu antysensowny oligomer według wynalazku badano pod kątem pominięcia eksonu 53 w pierwotnych ludzkich mioblastach w porównaniu z opublikowanymi antysensownymi oligonukleotydami. Oprócz H53A(+23+47) (SEQ ID NO: 9) opisanych powyżej, H53A(+39+69), H53A(+39+62) i H53A(+45+69) (odpowiednio SEQ ID NO: 10, 11 i 12) z US 8,232,384; h53AON1 (+45+62) (SEQ ID NO: 13) z W02004/083446; i PMO3(+32+56) i PMO8(+36+56) (odpowiednio SEQ ID NO: 14 i 15) z WO2012/029986 zostały porównane z przykładowym oligomerem według wynalazku H53A(+36+60) (SEQ ID NO:1). Jak pokazano na fig. 5A i 5B, oligomer, który wykazał najniższe EC50, określono jako H53A(+36+60) SEQ ID NO: 1. Zostało to potwierdzone przez poddanie wyników analizie regresji trzech parametrów w programie GraphPad Prism do wygenerowania wartości EC50, jak pokazano w poniższej tabeli.

	EC50
SEQIDNO:10 H53A(+39+69)	6,482
SEQIDNO:9 H53A(+23+47)	9,135
SEQIDNO:1 H53A(+36+60)	3,910
SEQIDNO:13 H53A(+45+62)	17,13

SEQIDNO:11 H53A(+39+62)	6,061
SEQIDNO:12 H53A(+45+69)	13,11
SEQIDNO:14 PMO3(+32+56)	11,80
SEQIDNO:15 PMO8(+36+56)	15,81

ŹRÓDŁA

[0204]

Aartsma-Rus, A., A. A. Janson, i wsp. (2004). „Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense.” *Am J Hum Genet* 74(1): 83-92.

Cirak, S., V. Arechavala-Gomez, i wsp. (2011). „Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study.” *Lancet* 378(9791): 595-605.

Dunckley, M. G., I. C. Eperon, i wsp. (1997). „Modulation of splicing in the DMD gene by antisense oligoribonucleotides.” *Nucleosides & Nucleotides* 16(7-9): 1665-1668.

Dunckley, M. G., M. Manoharan, i wsp. (1998). „Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured Mdx muscle cells by antisense oligoribonucleotides.” *Hum Mol Genet* 7(7): 1083-90.

Errington, S. J., C. J. Mann, i wsp. (2003). „Target selection for antisense oligonucleotide induced exon skipping in the dystrophin gene.” *J Gene Med* 5(6): 518-27.

Goemans, N. M., M. Tulinius, i wsp. (2011). „Systemic Administration of PRO051 in Duchenne’s Muscular Dystrophy.” *N Engl J Med*.

Jearawiriyapaisarn, N., H. M. Moulton, i wsp. (2008). „Sustained Dystrophin Expression Induced by Peptide-conjugated Morpholino Oligomers in the Muscles of mdx Mice.” *Mol Ther*.

Kinali, M., V. Arechavala-Gomez, i wsp. (2009). „Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of- concept study.” *Lancet Neurol* 8(10): 918-28.

Lu, Q. L., C. J. Mann, i wsp. (2003). „Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse.” *Nat Med* 9(8): 1009-14.

Mann, C. J., K. Honeyman, i wsp. (2002). „Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy.” *J Gene Med* 4(6): 644-54.

Marshall, N. B., S. K. Oda, i wsp. (2007). „Arginine-rich cell-penetrating peptides facilitate delivery of antisense oligomers into murine leukocytes and alter pre-mRNA splicing.” *Journal of Immunological Methods* 325(1-2): 114-126.

Matsuo, M., T. Masumura, i wsp. (1991). „Exon skipping during splicing of dystrophin mRNA precursor due to an intraexon deletion in the dystrophin gene of Duchenne muscular dystrophy kobe.” *J Clin Invest* 87(6): 2127-31.

Monaco, A. P., C. J. Bertelson, i wsp. (1988). „An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus.” *Genomics* 2(1): 90-5.

Pramono, Z. A., Y. Takeshima, i wsp. (1996). „Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence.” *Biochem Biophys Res Commun* 226(2): 445-9.

Sazani, P., R. Kole, i wsp. (2007). Splice switching oligomers for the TNF superfamily receptors and their use in treatment of disease. PCT WO2007058894, University of North Carolina

Sierakowska, H., M. J. Sambade, i wsp. (1996). „Repair of thalassemic human beta-globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides.” *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(23): 12840-4.

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

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

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

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

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

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

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

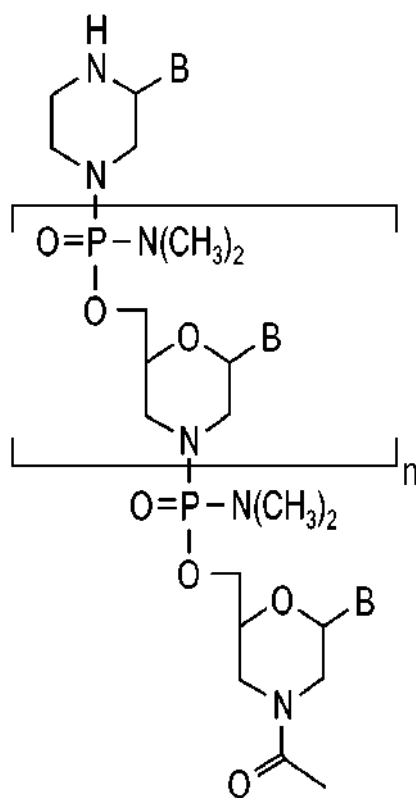
Yin, H., H. M. Moulton, i wsp. (2008). „Cell-penetrating peptide-conjugated antisense oligonucleotides restore systemic muscle and cardiac dystrophin expression and function.” *Hum Mol Genet* 17(24): 3909-18.

LISTA SEKWENCJI

Opis	Sekwencja	SEQ ID NO:
H53A(+36+60)	GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC	1
H53A(+30+57)	GCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTAC	2
H53A(+30+56)	CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTAC	3
H53A(+30+55)	CTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTAC	4
H53A(+33+57)	GCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTG	5
H53A(+33+60)	GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTG	6
h53A(+31+55)	CTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTA	7
H53A(+22+46)	TGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCCC	8
H53A(+23+47)	CTGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCC	9
H53 (+39+69)	CATTCAACTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTG	10
H53(+39+62)	CTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTG	11
H53 (+45+69)	CATTCAACTGTTGCCTCCGGTTCTG	12
H53 (+45+62)	CTGTTGCCTCCGGTTCTG	13
PMO3(+32+56)	CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGT	14
PMO8(+36+56)	CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC	15
rTAT	RRRQRRKKR	16
Tat	RKKRRQRRR	17
R ₉ F ₂	RRRRRRRRFF	18
R ₅ F ₂ R ₄	RRRRRFFRRR	19
R ₄	RRRR	20
R ₅	RRRRR	21
R ₆	RRRRRR	22
R ₇	RRRRRRR	23
R ₈	RRRRRRRR	24
R ₉	RRRRRRRRR	25
(RX) ₈	RXRXRXRXRXRXR	26
(RAhxR) ₄ ; (P007)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	27
(RAhxR) ₅ ; (CP04057)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	28

(RAhxRRBR) ₂ ; (CP06062)	RAhxRRBRRAhxRRBR	29
(RAR) ₄ F ₂	RARRARRARRARFF	30
(RGR) ₄ F ₂	RGRRGRRGRRGRFF	31
Primer	CTTGGACAGAACTTACCGACTGG	32
Primer	GTTTCTTCCAAAGCAGCCTCTCG	33
Primer	GCAGGATTTGGAACAGAGGCG	34
Primer	CATCTACATTTGTCTGCCACTGG	35

FIG. 1A



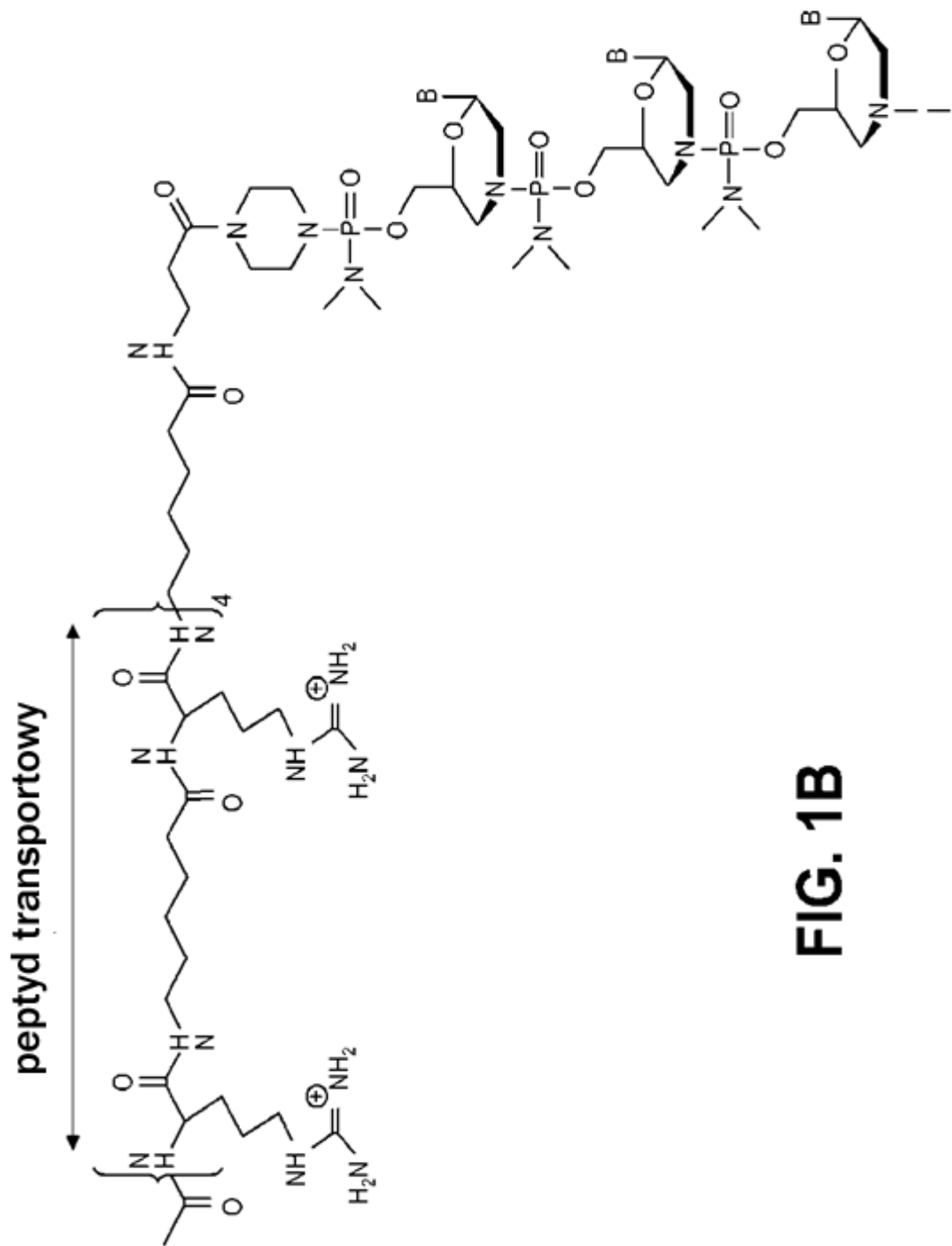


FIG. 1B

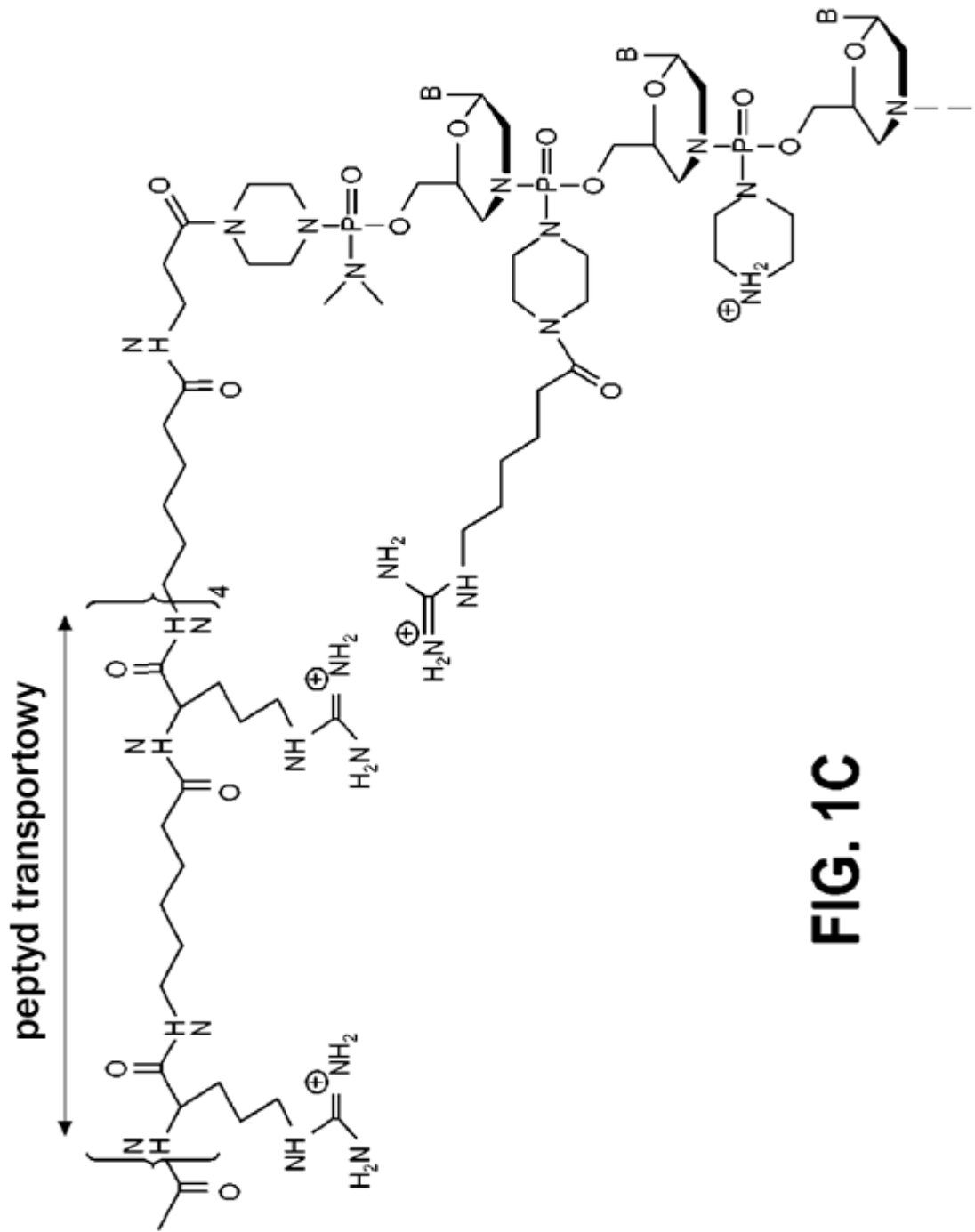


FIG. 1D

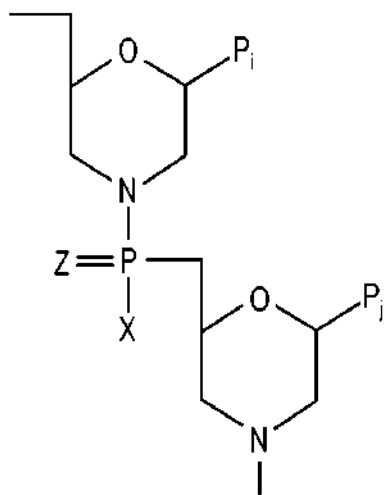


FIG. 1E

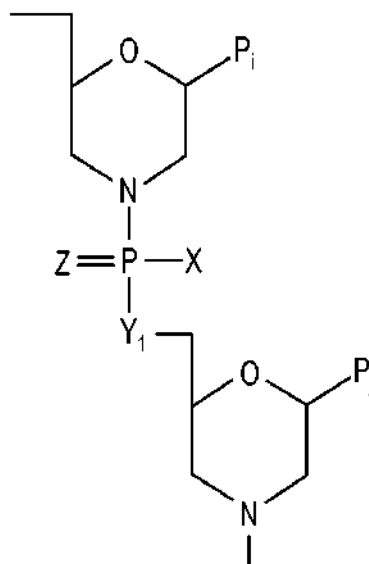


FIG. 1F

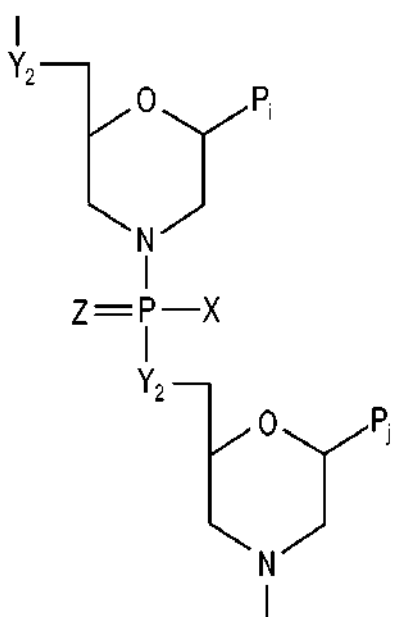
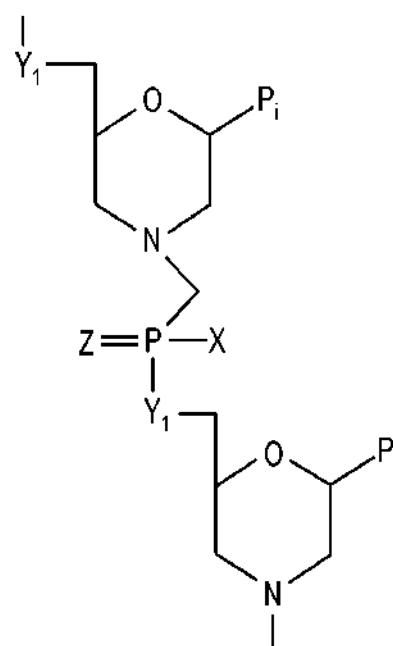


FIG. 1G



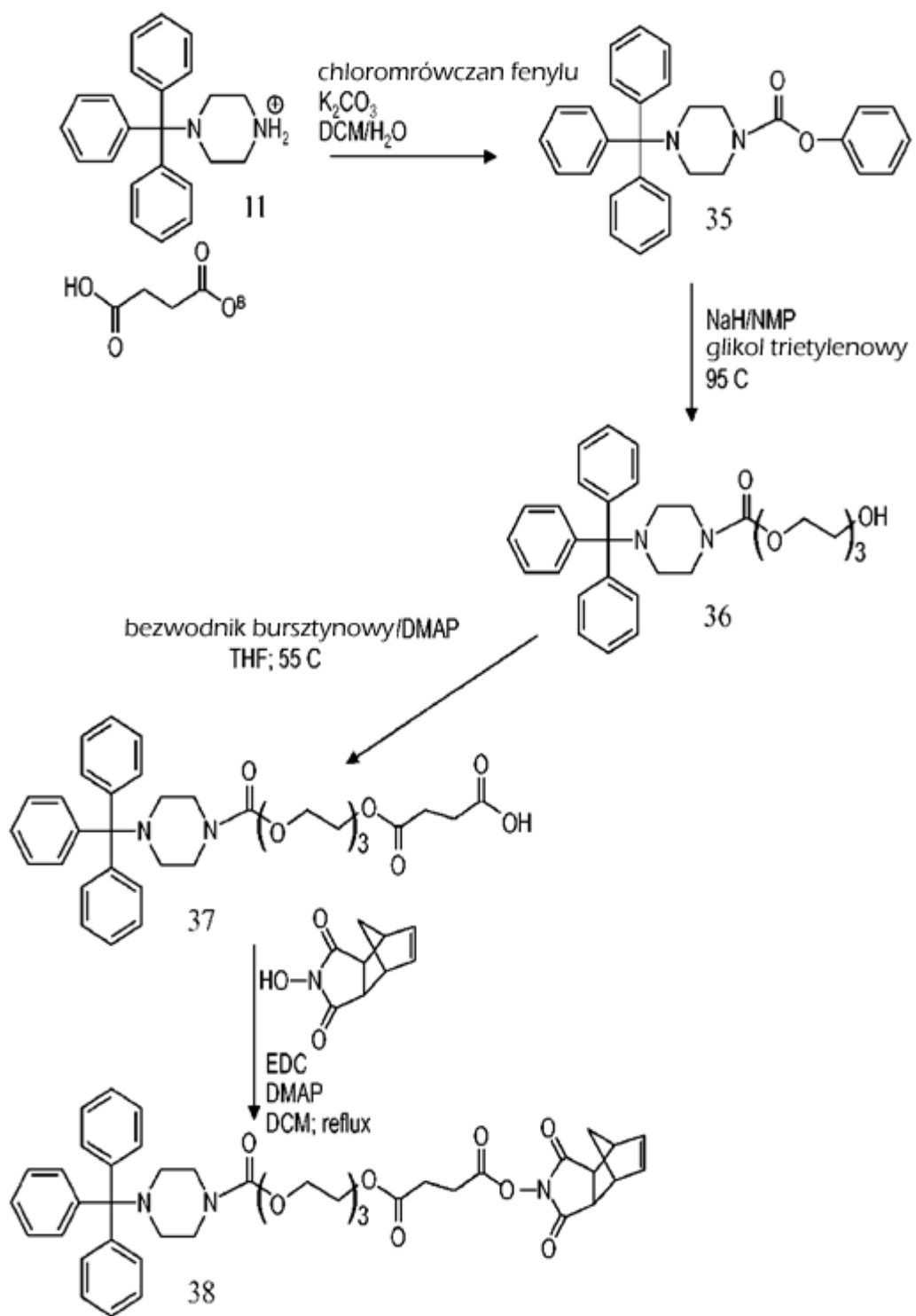


FIG. 2A

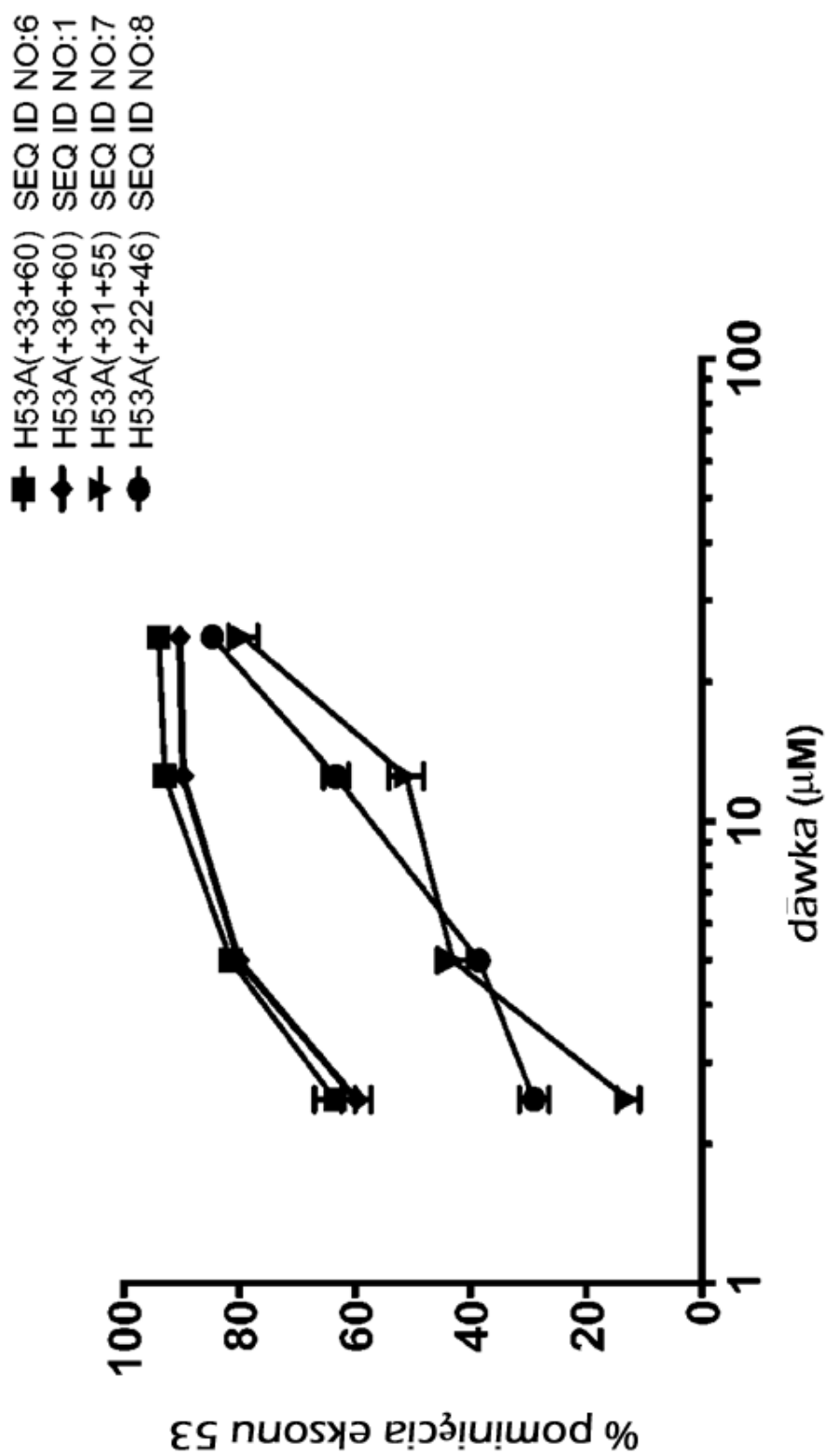


FIG. 3

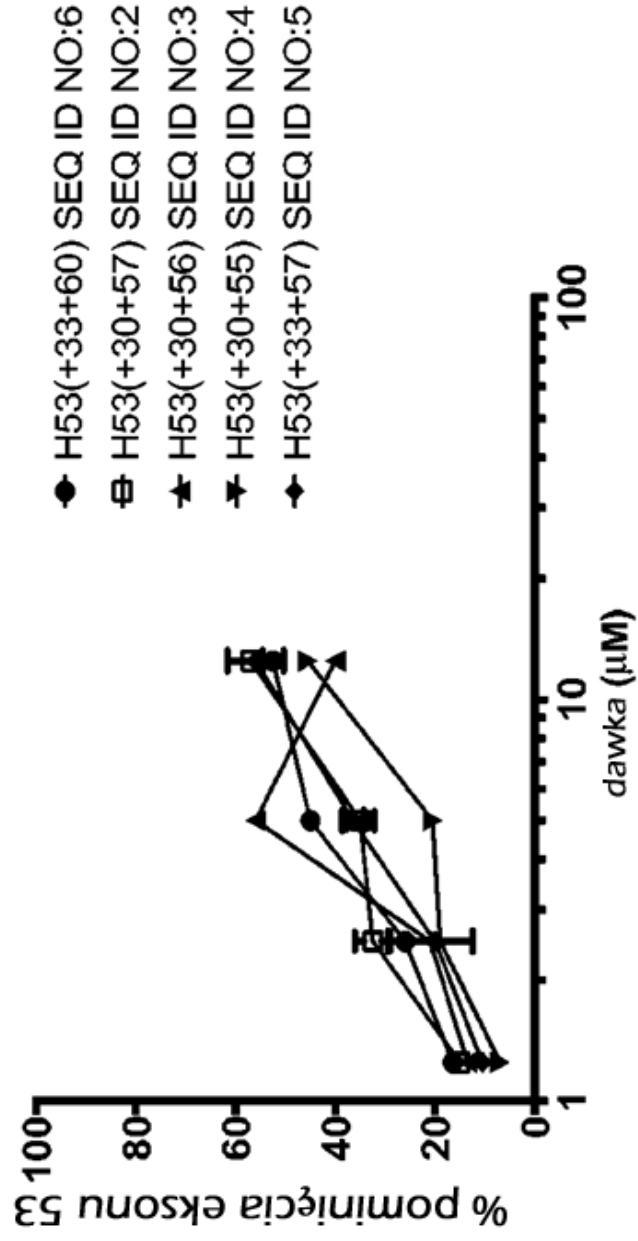


FIG. 4

