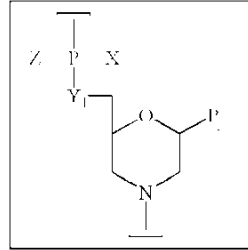


**ÖZET****İNSAN LMNA'SINI HEDEF ALAN OLİGONÜKLEOTİD ANALOGLARI**

5 Progerini kodlayan bir veya birden fazla aberan bir şekilde uçları-birleştirilmiş LMNA mRNA'sı izoformlarının ekspresyonunu azaltmak için LMNA-hedefli antisens oligonükleotidler sağlanır.

## İSTEMLER

1. Anormal bir şekilde uçları-birleştirilmiş LMNA mRNA'sının ekspresyonunu azaltmak için bir antisens oligonükleotid olup, özelliği oligonükleotidin bir büyük ölçüde yüksüz omurgaya sahip olması ve morfolino alt-birimlerinden ve bir alt-birimin bir morfolino nitrojenini bir bitişik alt-birimin bir 5'-ekzosiklik karbonuna birleştiren fosfor-içeren alt-birim-arası bağlantılardan oluşturulması, 25-40 baz içermesi ve
- SEQ ID NO.'ları: 4, 5, 10, 11, 13, 14 ve 16'nın herhangi birini içeren bir hedefleme dizisi içermesidir,
- burada antisens oligonükleotid, bir hücreye-nüfuz etme peptidine ve bağlayıcı kısma kovalent olarak tutturulur, burada bağlayıcı kısım, glisin, sistein, prolin, 6-aminohekzanoik asit (Ahx),  $\beta$ -alanin (B) ve Ahx-B arasından seçilir ve hücreye-nüfuz etme peptidi SEQ ID NO.'ları: 39-54 aralığından seçilir.
2. İstem 1'e göre oligonükleotid olup, özelliği oligonükleotid içindeki morfolino alt-birimlerinin, aşağıdaki yapıya uygun olarak fosfor-içeren bağlantılar ile birleştirilmesidir:



20

burada Z, S'dir veya O'dur,

X = NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>'dir veya OR<sup>6</sup>'dir,

25

Y = O'dur veya NR<sup>7</sup>'dir,

P<sub>j</sub>, bir pürin veya pirimidin bazı-eşleşme kısmıdır,

30

ve söz konusu her bir bağlantı aşağıdakilerden seçilir:

(a) yüksüz bağlantı (a), burada  $R^1$ 'in,  $R^2$ 'nin,  $R^6$ 'nın ve  $R^7$ 'nin her biri bağımsız bir şekilde hidrojen ve düşük alkil arasından seçilir;

(b1) katyonik bağlantı (b1), burada  $X = NR^1R^2$ 'dir ve  $Y = O$ 'dur ve  $NR^1R^2$ , bir opsiyonel sübstüte edilmiş piperazino grubunu temsil eder, böylece  $R^1R^2 = -CHRCHR(R^3)(R^4)CHRCHR-$ 'dir, burada

her bir  $R^4$ , H'dir,  $CH_3$ 'tür veya yoktur ve

$R^3$ , H, düşük alkil,  $C(=NH)NH_2$ , Z-L-NHC(=NH)NH<sub>2</sub> ve  $[C(O)CHR'NH]_mH$  arasından seçilir, burada Z, karbonil ( $C(O)$ )'dur veya bir doğrudan bağdır, L, alkil, alkoksi ve alkilamino arasından seçilen bağlara sahip olan en fazla 18 atom uzunluğundaki bir opsiyonel bağlayıcıdır,  $R'$ , bir doğal oluşumlu amino asidin bir yan zinciridir veya bunun bir- veya iki-karbonlu homologudur ve m, 1 ila 6 aralığındadır;

(b2) katyonik bağlantı (b2), burada  $X = NR^1R^2$ 'dir ve  $Y = O$ 'dur,  $R^1 = H$ 'dir veya  $CH_3$ 'tür ve  $R^2 = LNR^3R^4R^5$ 'tir, burada L,  $R^3$  ve  $R^4$ , yukarıda olduğu şekilde tanımlanır ve  $R^5$ , H'dir, düşük alkildir veya düşük (alkoksi)alkildir; ve

(b3) katyonik bağlantı (b3), burada  $Y = NR^7$ 'dir ve  $X = OR^6$ 'dir ve  $R^7 = LNR^3R^4R^5$ 'tir, burada L,  $R^3$  ve  $R^4$  ve  $R^5$ , yukarıda olduğu şekilde tanımlanır ve  $R^6$ , H'dir veya düşük alkildir; ve en az bir söz konusu bağlantı, katyonik bağlantılar (b1), (b2) ve (b3) arasından seçilir.

### 3. İstem 2'ye göre oligonükleotid olup, özelliği

(i)  $R^1$ 'in ve  $R^2$ 'nin her birinin, (a) tipi bağlantılarında metil olması;

(ii) en az bir bağlantının, (b1) tipinde olmasıdır, burada her bir R, H'dir,  $R^4$ , H'dir,  $CH_3$ 'tür veya bir elektron çiftidir ve  $R^3$ , H,  $CH_3$ ,  $C(=NH)NH_2$  ve  $C(O)-L-NHC(=NH)NH_2$  arasından seçilir;

(iii) en az bir bağlantı, (b1) tipindedir, burada her bir R, H'dir,  $R^4$ , bir elektron çiftidir ve  $R^3$ ,  $C(=NH)NH_2$  ve  $C(O)-L-NHC(=NH)NH_2$  arasından seçilir;

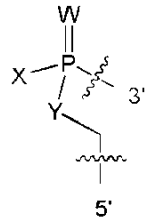
(iv) en az bir bağlantı, (b1) tipindedir, burada her bir R, H'dir, R<sup>4</sup>, bir elektron çiftidir ve R<sup>3</sup>, C(=NH)NH<sub>2</sub> ve C(O)-L-NHC(=NH)NH<sub>2</sub> arasından seçilir ve opsiyonel olarak burada R<sup>3</sup>, C(O)-L-NHC(NH)NH<sub>2</sub>'dir ve L, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- yapısına sahip olan bir hidrokarbondur, burada n, 1 ila 12 aralığındadır; veya

(v) en az bir bağlantı, (b1) tipindedir, burada her bir R, H'dir ve R<sup>3</sup>'ün ve R<sup>4</sup>'ün her biri bağımsız bir şekilde H'dir veya CH<sub>3</sub>'tür.

10 4. İstemler 1 - 3'ten herhangi birine göre oligonükleotid olup, özelliği hücreye-nüfuz etme peptidinin bunun C-ucundan bağlayıcı kısım vasıtasıyla oligonükleotidin 5' ucuna veya 3' ucuna tutturulmasıdır.

15 5. Bir antisens oligonükleotid olup, özelliği oligonükleotidin anormal bir şekilde uçları-birleştirilmiş LMNA mRNA'sının ekspresyonunu azaltmasıdır, oligonükleotid bir omurga içerir, omurga, alt-birim-arası bağlantılar ile birleştirilmiş bir morfolino halka yapısının bir dizisini içerir, alt-birim-arası bağlantılar, bir morfolino halka yapısının 3'-ucunu bir bitişik morfolino halka yapısının bir 5'-ucuna birleştirir, burada her bir morfolino halka yapısı, bir baz-eşleşme kısmına bağlanır, böylece oligonükleotid, bir hedef nükleik aside bir dizi-spesifik şekilde bağlanabilir; SEQ ID NO.'ları: 4, 5, 10, 11, 13, 14 ve 16'nın herhangi birini içeren bir hedefleme dizisini içerir, burada alt-birim-arası bağlantılar aşağıdaki genel yapıya (I) veya bunun bir tuzuna veya izomerine sahiptir:

25



(I)

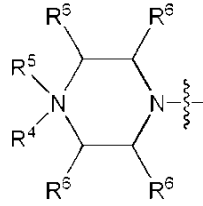
ve burada alt-birim-arası bağlantıların (I) her biri, bağımsız bir şekilde (A) bağlantısıdır veya (B) bağlantısıdır:

30

burada (A) bağlantısı için:

W, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde S'dir veya O'dur;

5 X, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde  $-N(CH_3)_2$ 'dir,  $-NR^1R^2$ 'dir,  $-OR^3$ 'tür veya;



(II)

10 Y, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde O'dur veya  $-NR^2$ 'dir;  
 $R^1$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir veya metildir;  
 $R^2$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir veya  $-LNR^4R^5R^7$ 'dir;

15  $R^3$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir veya  $C_1-C_6$  alkildir;

$R^4$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir, metildir,  $-C(=NH)NH_2$ ,  $-Z-L-NHC(=NH)NH_2$  veya  $-[C(O)CHR^1NH]_mH$ 'dir, burada Z, karbonildir ( $C(O)$ ) veya bir doğrudan bağdır,  $R^1$ , bir doğal oluşumlu amino asidin bir yan zinciridir veya bunun bir- veya iki-karbonlu homologudur ve m, 1 ila 6 aralığındadır;

$R^5$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir, metildir veya bir elektron çiftidir;

$R^6$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir veya metildir;

20  $R^7$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir  $C_1-C_6$  alkildir veya  $C_1-C_6$  alkoksialkildir;

25 L, alkil, alkoksi veya alkilamino gruplarını veya bunların kombinasyonlarını içeren en fazla 18 atom uzunluğundaki bir opsiyonel bağlayıcıdır; ve

burada (B) bağlantısı için:

30 W, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde S'dir veya O'dur;

X, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde  $-NR^8R^9$ 'dur veya  $-OR^3$ 'tür;  
ve

Y, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde O'dur veya  $-NR^{10}$ 'dur veya  
Y'nin ve W'nin her biri O'dur,

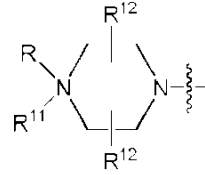
5  $R^8$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir veya  $C_2-C_{12}$   
alkildir;

$R^9$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir,  $C_1-C_{12}$  alkildir,  
 $C_1-C_{12}$  aralkildir veya arildir;

10  $R^{10}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir,  $C_1-C_{12}$  alkildir  
veya  $-LNR^4R^5R^7$ 'dir;

burada  $R^8$  ve  $R^9$ , bir 5-18 üyeli mono veya bisiklik heterosiklik  
oluşturmak için birleşebilir veya  $R^8$ ,  $R^9$  veya  $R^3$ , bir 5-7 üyeli heterosiklik  
oluşturmak için  $R^{10}$  ile birleşebilir ve burada X, 4-piparazino olduğunda,  
X, aşağıdaki yapıya (III) sahiptir:

15



(III)

burada:

20  $R^{11}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde  $C_2-C_{12}$  alkildir,  $C_1-C_{12}$   
aminoalkildir,  $C_1-C_{12}$  alkilkarbonildir, arildir, heteroarildir veya  
heterosiklildir; ve

R, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde bir elektron çiftidir,  
hidrojenidir veya  $C_1-C_{12}$  alkildir; ve

25  $R^{12}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir,  $C_1-C_{12}$  alkildir,  
 $C_1-C_{12}$  aminoalkildir,  $-NH_2$ ,  $-NR^{13}R^{14}$ ,  $-NR^{13}R^{14}R^{15}$ ,  $C_1-C_{12}$  alkilkarbonildir,  
oksodur,  $-CN$ , triflorometildir, amidildir, amidinildir, amidinilalkildir,  
amidinilalkilkarbonildir, guanidinildir, guanidinilalkildir,  
guanidinilalkilkarbonildir, kolattır, deoksikolattır, arildir, heteroarildir,  
heterosiklidir,  $-SR^{13}$  veya  $C_1-C_{12}$  alkoksidir, burada  $R^{13}$ ,  $R^{14}$  ve  $R^{15}$ , her  
30 bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde  $C_1-C_{12}$  alkildir;

burada alt-birim-arası bağlantıların en az biri (B) bağlantısıdır veya burada, mevcut olduğunda, her bir (B) bağlantısı her bir bulunuşunda aynı yapıya sahiptir; ve

5 burada antisens oligonükleotid bir hücreye-nüfuz etme peptidine ve bağlayıcı kısma kovalent olarak tutturulur, burada bağlayıcı kısım glisin, sistein, prolin, 6-aminohekzanoik asit (Ahx),  $\beta$ -alanin (B) ve Ahx-B arasından seçilir ve hücreye-nüfuz etme peptidi SEQ ID NO.'ları: 39-54 aralığından seçilir.

10 6. İstемler 1 - 5'ten herhangi birine göre oligonükleotid olup, özelliği hedefleme dizisinin, SEQ ID NO.'ları: 4, 5, 10, 11, 13, 14 ve 16'nın herhangi birinden oluşmasıdır.

15 7. İstемler 1 - 6'dan herhangi birine göre oligonükleotid olup, özelliği hedefleme dizisinin, SEQ ID NO: 4 olmasıdır.

8. İstемler 1 - 6'dan herhangi birine göre oligonükleotid olup, özelliği hedefleme dizisinin, SEQ ID NO: 5 olmasıdır.

20 9. İstемler 1 - 6'dan herhangi birine göre oligonükleotid olup, özelliği hedefleme dizisinin, SEQ ID NO: 10 olmasıdır.

10. İstемler 1 - 6'dan herhangi birine göre oligonükleotid olup, özelliği hedefleme dizisinin, SEQ ID NO: 11 olmasıdır.

25

11. İstемler 1 - 6'dan herhangi birine göre oligonükleotid olup, özelliği hedefleme dizisinin, SEQ ID NO: 13 olmasıdır.

12. İstемler 1 - 6'dan herhangi birine göre oligonükleotid olup, özelliği hedefleme dizisinin, SEQ ID NO: 14 olmasıdır.

30

13. İstемler 1 - 6'dan herhangi birine göre oligonükleotid olup, özelliği hedefleme dizisinin, SEQ ID NO: 16 olmasıdır.

## TARİFNAME

### İNSAN LMNA'SINI HEDEF ALAN OLİGONÜKLEOTİD ANALOGLARI

#### ALT-YAPI

5

#### Teknik Saha

Mevcut buluş genel olarak, insan lamin A hedefli antisens bileşikler ile ilgilidir.

#### 10 İlgili Tekniğin Açıklaması

Hutchinson-Gilford progeria sendromu (HGPS), prematüre arterioskleroz ve vasküler düz kas hücrelerinin (SMC'lerin) dejenerasyonu ile karakterize edilen bir nadir genetik bozukluktur. HGPS etkilenmiş çocuklarda kendisini en göze çarpan şekilde hızlandırılmış, prematüre yaşlanma olarak gösterir. HGPS'li çocuklar, progresif semptomlara, örneğin, büyüme retardasyonuna, alopesiye, subkütan yağ kaybına ve kemik anormalliklerine, sahiptir. Ortalama yaşam-süresi, en yaygın ölüm nedeninin miyokard enfarktüs veya inme olması ile 12 yıldır.

20 Çoğu HGPS olgusu, lamin A (LMNA) geninde, progerinin, lamin A'nın bir kırılmış uç-birleştirme mutantının, üretilmesi ile sonuçlanan, bir tek-nokta mutasyonundan kaynaklanır. Tek-nokta mutasyonu, lamin A (LMNA) geninin ekzon 11'inde bir *de novo* sessiz süstitüsyondur (1824C>T, Gly608Gly). Süstitüsyon, 50 amino asitlik bir iç silinme taşıyan bir dominant negatif mutant lamin A proteininin üretilmesine yol açan bir kriptik uç-birleştirme donör yerini aktive eder. Progerin olarak adlandırılan mutant protein, nükleer membran üzerinde birikir, karakteristik nükleer çıkıntıya neden olur ((Scaffidi and Misteli 2005; Cao, Blair et al., 2011)).

30 Aberan uç-birleştirmenin fosforodiamidat morfolino oligonükleotidleri (PMO'lar) veya daha spesifik olarak, uç-birleştirme-değiştirme oligonükleotidleri (SSO'lar) kullanılarak düzeltilebileceği bilinir. SSO'lar, yerlerde veya yakınlarında hibridize etme, böylece hücrel uç-birleştirme mekanizması tarafından tanınmayı önleme, ile aberan uç-birleştirme yerlerini bloke eder. Tercih edilen SSO'lar, nükleazlara dirençlidir ve elde edilen çift-sarmallı yapı, RNaz H tarafından RNA klevajı olasılığını elimine eder. 35 SSO'ların, talasemi ve Duchenne müsküler distrofi için hem *in vitro* hem de *in vivo* uç-



birleştirme paternini etkili bir şekilde onardığı gösterilmiştir (Kinali, Arechavala-Gomez et al., 2009; Svasti, Suwanmanee et al., 2009). LMNA'nın HGPS ile ilişkili aberan uç-birleştirmesinin, hem hücre kültüründe (Scaffidi and Misteli, 2005) hem de bir ilgili hayvan modelinde (Osorio, Navarro et al., 2011) aktive edilmiş kriptik uç-birleştirme yerine hedeflenmiş modifiye edilmiş antisens oligonükleotidler kullanılarak aberan uç-birleştirme olayının düzeltilmesi ile azaltıldığı gösterilmiştir.

LMNA'nın HGPS'deki rolü göz önüne alındığında, progerinin ekspresyonunu elimine etmek için LMNA pre-mRNA'sının uç-birleştirmesini modüle eden oligonükleotidler gereklidir.

Fernando G. Osorio et al., "Splicing-Directed Therapy in a New Mouse Model of Human Accelerated Aging", Science Translational Medicine, American Association for the Advancement of Science, vol. 3, no. 106, pages 145-155, Hutchinson-Gilford progeria sendromu (HGPS) bağlamında, patojenik Lmna uç-birleştirmesini önleyen, progerinin birikmesini ve bunun ilişkili nükleer kusurlarını azaltan, bir antisens morfolino-bazlı terapi ile ilgilidir.

WO 2007/047913 A2, bir hücrede, dokuda veya hayvanda LMNA'nın ekspresyonunu modüle etmek için bileşikleri, bileşimleri ve yöntemleri açıklar.

Paola Scaffidi et al., "Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome", Nature Medicine, vol. 11, no. 43, pages 440-445, HGPS hücrelerinde endojen lamin A transkriptinde aberan uç-birleştirmenin düzeltilmesi ile ilgilidir.

Loren G. Fong et al., "Activating the synthesis of progerin, the mutant prelamin A in Hutchinson-Gilford progeria syndrome, with antisens oligonucleotides", Human Molecular Genetics, vol. 18, no. 13, pages 2462-2471, ekzon 11 uç-birleştirme donör yerinden aşağı akış ekzon 11 dizilerine karşı antisens oligonükleotidlerin hem doğal suş hem de HGPS fibroblastlarında uç-birleştirmeyi dönüşümlü olarak değiştirdiğini böylece progerinin sentezini arttırdığını, gösterir.

## **KISA AÇIKLAMA**

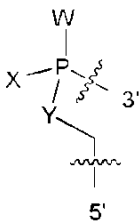
Mevcut buluş ekli istemlerde izah edilir.

Bu doğrultuda, mevcut buluş anormal bir şekilde uçları-birleştirilmiş LMNA mRNA'sının ekspresyonunu azaltmak için bir antisens oligonükleotid ile ilgilidir, oligonükleotid bir büyük ölçüde yüksüz omurgaya sahiptir ve morfolino alt-birimlerinden ve bir alt-birimin bir morfolino nitrojenini bir bitişik alt-birimin bir 5'-ekzosiklik karbonuna birleştiren fosfor- içeren alt-birim-arası bağlantılardan oluşturulur,

25-40 baz içerir ve  
SEQ ID NO.'ları: 4, 5, 10, 11, 13, 14 ve 16'nın herhangi birini içeren bir hedefleme dizisi içerir,

burada antisens oligonükleotid bir hücreye-nüfuz etme peptidine ve bağlayıcı kısma kovalent olarak tutturulur, burada bağlayıcı kısım glisin, sistein, prolin, 6-aminohekzanoik asit (Ahx),  $\beta$ -alanin (B) ve Ahx-B arasından seçilir ve hücreye-nüfuz etme peptidi SEQ ID NO.'ları: 39-54 aralığından seçilir.

15 Mevcut buluş ayrıca bir antisens oligonükleotid ile de ilgilidir, burada oligonükleotid anormal bir şekilde uçları-birleştirilmiş LMNA mRNA'sının ekspresyonunu azaltır, oligonükleotid bir omurga içerir, omurga, alt-birim-arası bağlantılar ile birleştirilmiş bir morfolino halka yapısının bir dizisini içerir, alt-birim-arası bağlantılar, bir morfolino halka yapısının 3'-ucunu bir bitişik morfolino halka yapısının bir 5'-ucuna birleştirir, burada her bir morfolino halka yapısı, bir baz-eşleşme kısmına bağlanır, böylece oligonükleotid, bir hedef nükleik aside bir dizi-spesifik şekilde bağlanabilir; SEQ ID NO.'ları: 4, 5, 10, 11, 13, 14 ve 16'nın herhangi birini içeren bir hedefleme dizisini içerir, burada alt-birim-arası bağlantılar aşağıdaki genel yapıya (I) veya bunun bir tuzuna veya izomerine sahiptir:



(I)

ve burada alt-birim-arası bağlantıların (I) her biri bağımsız bir şekilde (A) bağlantısıdır veya (B) bağlantısıdır:

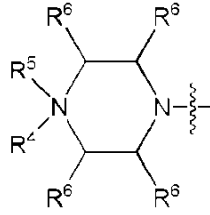
30

burada (A) bağlantısı için:

W, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde S'dir veya O'dur;

X, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde  $-N(CH_3)_2$ 'dir,  $-NR^1R^2$ 'dir,  $-OR^3$ 'tür veya;

5



(II)

Y, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde O'dur veya  $-NR^2$ 'dir,

10

$R^1$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojen dir veya metil dir;

$R^2$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojen dir veya  $-LNR^4R^5R^7$ 'dir;

$R^3$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojen dir veya  $C_1-C_6$  alkildir;

$R^4$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojen dir, metil dir,  $-C(=NH)NH_2$ ,

$-Z-L-NHC(=NH)NH_2$  veya  $-[C(O)CHR^1NH]_mH$ 'dir, burada Z, karbonil dir ( $C(O)$ )

15

veya bir doğrudan bağdır,  $R^1$ , bir doğal oluşumlu amino asidin bir yan zinciridir

veya bunun bir- veya iki-karbonlu homologudur ve m, 1 ila 6 aralığındadır;

$R^5$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojen dir, metil dir veya bir elektron çiftidir;

$R^6$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojen dir veya metil dir;

20

$R^7$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojen dir  $C_1-C_6$  alkildir veya

$C_1-C_6$  alkoksialkildir;

L, alkil, alkoksi veya alkilamino gruplarını veya bunların kombinasyonlarını içeren en fazla 18 atom uzunluğundaki bir opsiyonel bağlayıcıdır; ve

25

burada (B) bağlantısı için:

W, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde S'dir veya O'dur;

X, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde  $-NR^8R^9$ 'dur veya  $-OR^3$ 'tür; ve

Y, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde O'dur veya  $-NR^{10}$ 'dur veya

Y'nin ve W'nin her biri O'dur,

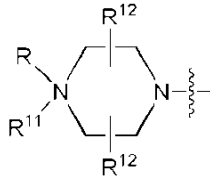
30

$R^8$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojen dir veya  $C_2-C_{12}$  alkildir;

$R^9$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir,  $C_1-C_{12}$  alkildir,  $C_1-C_{12}$  aralkildir veya arildir;

$R^{10}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir,  $C_1-C_{12}$  alkildir veya - $LNR^4R^5R^7$ 'dir;

5 burada  $R^8$  ve  $R^9$ , bir 5-18 üyeli mono veya bisiklik heterosiklik oluşturmak için birleşebilir veya  $R^8$ ,  $R^9$  veya  $R^3$ , bir 5-7 üyeli heterosiklik oluşturmak için  $R^{10}$  ile birleşebilir ve burada X, 4-piparazino olduğunda, X, aşağıdaki yapıya (III) sahiptir:



10

(III)

burada:

$R^{11}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde  $C_2-C_{12}$  alkildir,  $C_1-C_{12}$  aminoalkildir,  $C_1-C_{12}$  alkilkarbonildir, arildir, heteroarildir veya heterosiklildir ve

15

R, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde bir elektron çiftidir, hidrojenidir veya  $C_1-C_{12}$  alkildir; ve

$R^{12}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir,  $C_1-C_{12}$  alkildir,  $C_1-C_{12}$  aminoalkildir,  $-NH_2$ ,  $-NR^{13}R^{14}$ ,  $-NR^{13}R^{14}R^{15}$ ,  $C_1-C_{12}$  alkilkarbonildir, oksodur,  $-CN$ , triflorometildir, amidildir, amidinildir, amidinilalkildir, amidinilalkilkarbonil

20

guanidinildir, guanidinilalkildir, guanidinilalkilkarbonildir, kolattır, deoksikolattır, arildir, heteroarildir, heterosiklidir,  $-SR^{13}$  veya  $C_1-C_{12}$  alkoksidir, burada  $R^{13}$ ,  $R^{14}$  ve  $R^{15}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde  $C_1-C_{12}$  alkildir;

burada alt-birim-arası bağlantıların en az biri (B) bağlantısıdır veya burada, mevcut olduğunda, her bir (B) bağlantısı her bir bulunuşunda aynı yapıya sahiptir; ve

25

burada antisens oligonükleotid bir hücreye-nüfuz etme peptidine ve bağlayıcı kısma kovalent olarak tutturulur, burada bağlayıcı kısım glisin, sistein, prolin, 6-aminoheksanoik asit (Ahx),  $\beta$ -alanin (B) ve Ahx-B arasından seçilir ve hücreye-nüfuz etme peptidi SEQ ID NO.'ları: 39-54 aralığından seçilir. Buluşun uygulamaları bağımlı istemlerde ve aşağıda izah edilir.

30

Mevcut buluşun bağlamında, LMNA pre-mRNA'sının aberan uç-birleştirmesini modüle eden bileşimler açıklanır. Örneğin, mevcut buluşun bağlamında, burada bir insan LMNA pre-mRNA'sının aberan uç-birleştirmesini modüle etmede kullanım için antisens oligonükleotidlerin sağlandığı açıklanır, bu oligonükleotidler morfolino alt-birimlerinden ve bir alt-birimin bir morfolino nitrojenini bir bitişik alt-birimin bir 5'-ekzosiklik karbonuna birleştiren fosfor-içeren alt-birim-arası bağlantılardan oluşur ve:

- (i) bir büyük ölçüde yüksüz, nükleaz dirençli omurgaya sahiptir;
- (ii) memeli konak hücreleri tarafından alınabilir;
- 10 (iii) yaklaşık 12-40 aralığında nükleotid bazı içerir; ve
- (iv) bir insan LMNA pre-mRNA'sının ekzon 10'una, intron 10'una, ekzon 11'ine veya bunların kombinasyonlarına komplementer bitişik en az yaklaşık 12 alt-birimlik bir hedefleme dizisine sahiptir.

15 Daha spesifik uygulamalarda, oligonükleotidin hedefleme dizisi, bir insan LMNA pre-mRNA'sının ekzon 11 kriptik uç-birleştirme yerinin yukarı akış bazlarına komplementerdir. Diğer spesifik uygulamalarda, hedefleme dizisi, bir insan LMNA pre-mRNA'sının ekzon 11 kriptik uç-birleştirme yerinin aşağı akış bazlarına komplementerdir. Daha başka spesifik uygulamalarda, hedefleme dizisi, insan LMNA

20 pre-mRNA'sının ekzon 11 kriptik uç-birleştirme yeri ile kesişmez.

İlave uygulamalarda, buluşun yöntemlerinde kullanılan oligonükleotid içindeki hedefleme dizisi, 1824C>T mutasyonu ile kesişmez.

25 Bir başka spesifik uygulamada, hedefleme dizisinin en 3'-bazı, LMNA ekzon 11'i içinde, bir insan LMNA pre-mRNA'sının ekzon 11 kriptik uç-birleştirme yerinin aşağı akış yaklaşık 1-30 bazları olan, bir baza komplementerdir.

Bir başka spesifik uygulamada, hedefleme dizisinin en 3'-bazı, LMNA ekzon 11'i içinde,

30 bir insan LMNA pre-mRNA'sının ekzon 11 kriptik uç-birleştirme yerinin aşağı akış yaklaşık 1-30 bazları olan, bir baza komplementerdir.

Daha bir başka spesifik uygulamada, hedefleme dizisinin en 3'-bazı, LMNA ekzon 11'i içinde, bir insan LMNA pre-mRNA'sının ekzon 11 kriptik uç-birleştirme yerinin yukarı

35 akış yaklaşık 10-40 bazları olan, bir baza komplementerdir.

Burada ayrıca mevcut buluşun bağlamında, hedefleme dizisinin en 3'-bazının, LMNA intron 10'u içinde, LMNA ekzon 11'inin yukarı akış yaklaşık 1-60 bazları olan, bir baza komplementer olduğu da açıklanır.

- 5 Burada ayrıca mevcut buluşun bağlamında, hedefleme dizisinin en 3'-bazının, LMNA ekzon 10'u içinde, LMNA intron 10'unun yukarı akış yaklaşık 1-30 bazları olan, bir baza komplementer olduğu da açıklanır.

- 10 Daha bir başka spesifik uygulamada, hedefleme dizisi, LMNA pre-mRNA'sının ekzonları 10'un ve 11'in uç-birleştirme donörünün (SD) veya uç-birleştirme akseptörünün (SA) uç-birleştirme bağlantı-yeri ile kesişen bir bölgeye komplementerdir ve ön-işlenmiş mRNA'nın bir ekzonik bölgesinin bir kısmına ve bir intronik bölgesinin bir kısmına komplementerdir.

- 15 Buluşun daha da spesifik uygulamalarında, oligonükleotidin hedefleme dizisi, SEQ ID NO.'ları: 3-34'ün herhangi birinin bitişik en az 12 bazına komplementerdir veya SEQ ID NO.'ları: 3-34'ün herhangi birine en az %90 özdeşdir veya SEQ ID NO.'ları: 3-34'ün herhangi birini içerir veya SEQ ID NO.'ları: 3-34'ün herhangi birinden oluşur.

- 20 Buluşun daha da spesifik uygulamalarında, oligonükleotidin hedefleme dizisi, SEQ ID NO.'ları: 3-7'nin veya 14-16'nın herhangi birinin bitişik en az 12 bazına komplementerdir veya SEQ ID NO.'ları: 3-7'nin veya 14-16'nın herhangi birine en az %90 özdeşdir veya SEQ ID NO.'ları: 3-7'nin veya 14-16'nın herhangi birini içerir veya SEQ ID NO.'ları: 3-7'nin veya 14-16'nın herhangi birinden oluşur.

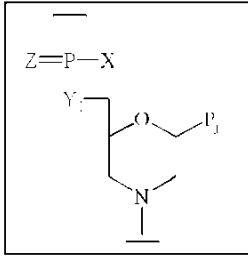
25

Buluşun daha da spesifik uygulamalarında, oligonükleotidin hedefleme dizisi, SEQ ID NO: 4'ün bitişik en az 12 bazına komplementerdir ve SEQ ID NO: 4'e en az %90 özdeşdir veya SEQ ID NO: 4'ü içerir veya SEQ ID NO: 4'ten oluşur.

- 30 Buluşun diğer daha spesifik uygulamalarında, oligonükleotidin hedefleme dizisi, SEQ ID NO: 11'in bitişik en az 12 bazına komplementerdir veya SEQ ID NO: 11'e en az %90 özdeşdir veya SEQ ID NO: 11'i içerir veya SEQ ID NO: 11'den oluşur.

Diğer uygulamalarda, oligonükleotid, bir fosfordiamidat morfolino oligonükleotididir (PMO) veya bir veya birden fazla piperazin-içeren alt-birim-arası bağlantı içeren bir PMO'dur (PMOplus) veya bir PMO-X oligonükleotididir.

- 5 Buluşun belirli uygulamalarına göre, emsal morfolino alt-birimleri, aşağıdaki yapıya uygun şekilde, fosfordiamidat bağlantıları ile birleştirilir:



- 10 burada Z, S'dir veya O'dur,  
X = NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>'dir veya OR<sup>6</sup>'dir,  
Y = O'dur veya NR<sup>7</sup>'dir,

ve söz konusu her bir bağlantı aşağıdakilerden seçilir:

15

(a) yüksüz bağlantı (a), burada R<sup>1</sup>'in, R<sup>2</sup>'nin, R<sup>6</sup>'nın ve R<sup>7</sup>'nin her biri bağımsız bir şekilde hidrojen ve düşük alkil arasından seçilir;

20

(b1) kationik bağlantı (b1), burada X = NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>'dir ve Y= O'dur ve NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>, bir opsiyonel sübstitüe edilmiş piperazino grubunu temsil eder, böylece R<sup>1</sup>R<sup>2</sup> = -CHRCHR(R<sup>3</sup>)(R<sup>4</sup>)CHRCHR-'dir, burada

her bir R<sup>4</sup>, H'dir, CH<sub>3</sub>'tür veya yoktur ve

25

R<sup>3</sup>, H, düşük alkil, C(=NH)NH<sub>2</sub>, Z-L-NHC(=NH)NH<sub>2</sub> ve [C(O)CHR'NH]<sub>m</sub>H arasından seçilir, burada Z, karbonil (C(O))'dur veya bir doğrudan bağdır, L, alkil, alkoksi ve alkilamino arasından seçilen bağlara sahip olan en fazla 18 atom uzunluğundaki bir opsiyonel bağlayıcıdır, R', bir doğal oluşumlu amino asidin bir yan zinciridir veya bunun bir- veya iki-karbonlu homologudur ve m, 1

30

ila 6 aralığındadır;

(b2) katyonik bağlantı (b2), burada  $X = NR^1R^2$ 'dir ve  $Y = O$ 'dur,  $R^1 = H$ 'dir veya  $CH_3$ 'tür ve  $R^2 = LNR^3R^4R^5$ 'tir, burada  $L$ ,  $R^3$  ve  $R^4$ , yukarıda olduğu şekilde tanımlanır ve  $R^5$ ,  $H$ 'dir, düşük alkildir veya düşük (alkoksi)alkildir; ve

5 (b3) katyonik bağlantı (b3), burada  $Y = NR^7$ 'dir ve  $X = OR^6$ 'dir ve  $R^7 = LNR^3R^4R^5$ 'tir, burada  $L$ ,  $R^3$  ve  $R^4$  ve  $R^5$ , yukarıda olduğu şekilde tanımlanır ve  $R^6$ ,  $H$ 'dir veya düşük alkildir; ve en az bir söz konusu bağlantı, katyonik bağlantılar (b1), (b2) ve (b3) arasından seçilir.

10 Yukarıdaki yapının daha spesifik bir uygulamasında,  $R^1$ 'in ve  $R^2$ 'nin her biri, (a) tipi bağlantılarında, metildir.

Yukarıdaki yapının bir başka spesifik uygulamasında, en az bir bağlantı, (b1) tipindedir, burada her bir  $R$ ,  $H$ 'dir,  $R^4$ ,  $H$ 'dir,  $CH_3$ 'tür veya bir elektron çiftidir ve  $R^3$ ,  $H$ ,  $CH_3$ ,  
15  $C(=NH)NH_2$  ve  $C(O)-L-NHC(=NH)NH_2$  arasından seçilir.

Yukarıdaki yapının bir başka spesifik uygulamasında, en az bir bağlantı, (b1) tipindedir, burada her bir  $R$ ,  $H$ 'dir,  $R^4$ , bir elektron çiftidir ve  $R^3$ ,  $C(=NH)NH_2$  ve  $C(O)-L-NHC(=NH)NH_2$  arasından seçilir.

20

Yukarıdaki yapının daha bir başka spesifik uygulamasında, en az bir bağlantı, (b1) tipindedir, burada her bir  $R$ ,  $H$ 'dir,  $R^4$ , bir elektron çiftidir ve  $R^3$ ,  $C(=NH)NH_2$  ve  $C(O)-L-NHC(=NH)NH_2$  arasından seçilir.

25 Yukarıdaki yapının daha da bir başka spesifik uygulamasında,  $R^3$ ,  $C(O)-L-NHC(NH)NH_2$ 'dir ve  $L$ ,  $-(CH_2)_n-$  yapısına sahip olan bir hidrokarbondur, burada  $n$ , 1 ila 12 aralığındadır.

Yukarıdaki yapının bir başka spesifik uygulamasında, en az bir bağlantı, (b1) tipindedir,  
30 burada her bir  $R$ ,  $H$ 'dir ve  $R^3$ 'ün ve  $R^4$ 'ün her biri bağımsız bir şekilde  $H$ 'dir veya  $CH_3$ 'tür.

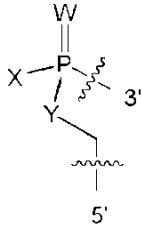
Buluşun diğer uygulamalarında, antisens oligonükleotid bir hücreye-nüfuz etme peptidine, örneğin, bir arjinin açısından zengin peptide, kovalent olarak tutturulur. Daha spesifik bir uygulamada, arjinin açısından zengin peptit, bunun C-ucundan bir- veya iki-  
35 amino asitli bağlayıcı vasıtasıyla oligonükleotidin 5' ucuna tutturulur. Alternatif olarak,



bir başka uygulamada, peptit, bunun C-ucundan bir- veya iki-amino asitli bağlayıcı vasıtasıyla oligonükleotidin 3' ucuna tutturulur. Tercih edilen bir uygulamada, hücreye-nüfuz etme peptidi, bir glisin amino asidi vasıtasıyla oligonükleotide bağlanır.

- 5 Buluşun bir ilave uygulamasında, bir omurga içeren bir oligonükleotid sağlanır, omurga, alt-birim-arası bağlantılar ile birleştirilmiş bir morfolino halka yapısının bir dizisini içerir, alt-birim-arası bağlantılar, bir morfolino halka yapısının 3'-ucunu bir bitişik morfolino halka yapısının bir 5'-ucuna birleştirir, burada her bir morfolino halka yapısı bir baz-eşleşme kısmına bağlanır, böylece oligonükleotid bir hedef nükleik asidi bir dizi-spesifik şekilde bağlayabilir; SEQ ID NO.'ları: 1-34'ün herhangi birinde izah edilen bir dizinin en az 12 bazına komplementer olan veya SEQ ID NO.'ları: 3-34'ün herhangi birini veya birden fazlasını içeren bir hedefleme dizisi içeren bir oligonükleotid sağlanır, burada alt-birim-arası bağlantılar aşağıdaki genel yapıya (I) veya bunun bir tuzuna veya izomerine sahiptir:

15



(I)

ve burada alt-birim-arası bağlantıların (I) her biri bağımsız bir şekilde (A) bağlantısıdır veya (B) bağlantısıdır:

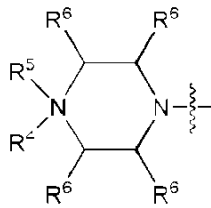
20

burada (A) bağlantısı için:

W, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde S'dir veya O'dur;

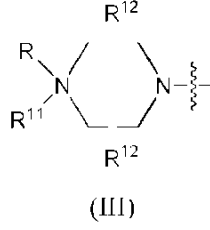
X, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde  $-N(CH_3)_2$ 'dir,  $-NR^1R^2$ 'dir,  $-OR^3$ 'tür veya;

25



(II)

- Y, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde O'dur veya -NR<sup>2</sup>'dir,
- R<sup>1</sup>, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir veya metildir;
- R<sup>2</sup>, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir veya -LNR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>R<sup>7</sup>'dir;
- 5 R<sup>3</sup>, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir veya C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkildir;
- R<sup>4</sup>, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkildir, -C(=NH)NH<sub>2</sub>, -Z-L-NHC(=NH)NH<sub>2</sub> veya -[C(O)CHR'NH]<sub>m</sub>H'dir, burada Z, karbonildir (C(O)) veya bir doğrudan bağıdır, R', bir doğal oluşumlu amino asidin bir yan zinciridir veya bunun bir- veya iki-karbonlu homologudur ve m, 1 ila 6
- 10 aralığındadır;
- R<sup>5</sup>, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir, metildir veya bir elektron çiftidir;
- R<sup>6</sup>, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir veya metildir;
- R<sup>7</sup>, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkildir veya C<sub>1</sub>-
- 15 C<sub>6</sub> alkoksialkildir;
- L, alkil, alkoksi veya alkilamino gruplarını veya bunların kombinasyonlarını içeren en fazla 18 atom uzunluğundaki bir opsiyonel bağlayıcıdır; ve burada (B) bağlantısı için:
- W, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde S'dir veya O'dur;
- 20 X, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde -NR<sup>8</sup>R<sup>9</sup>'dur veya -OR<sup>3</sup>'tür; ve
- Y, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde O'dur veya -NR<sup>10</sup>'dur,
- R<sup>8</sup>, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir veya C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> alkildir;
- R<sup>9</sup>, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alkildir, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> aralkildir veya arildir;
- 25 R<sup>10</sup>, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alkildir veya -LNR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>R<sup>7</sup>'dir;
- burada R<sup>8</sup> ve R<sup>9</sup>, bir 5-18 üyeli mono veya bisiklik heterosiklik oluşturmak için birleşebilir veya R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup> veya R<sup>3</sup>, bir 5-7 üyeli heterosiklik oluşturmak için R<sup>10</sup> ile birleşebilir ve burada X, 4-piparazino olduğunda, X, aşağıdaki yapıya (III)
- 30 sahiptir:



burada:

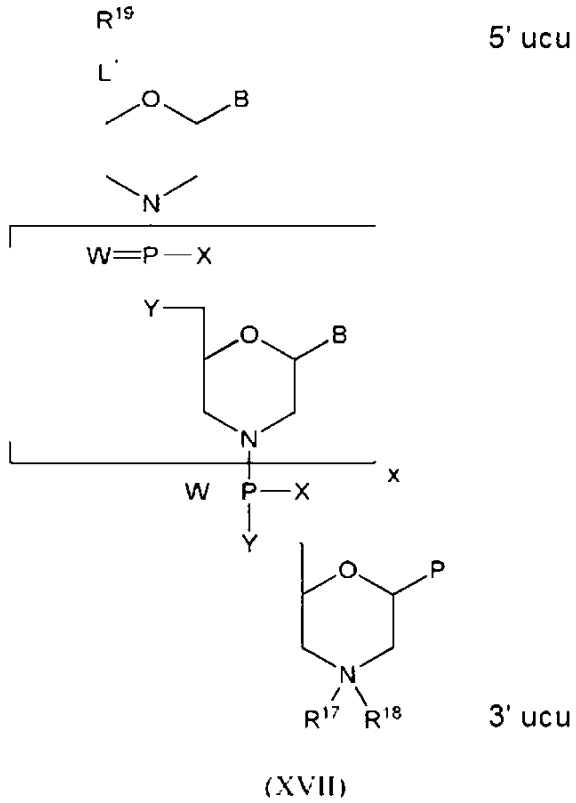
- 5 R<sup>11</sup>, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> alkildir, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> aminoalkildir, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alkilkarbonildir, arildir, heteroarildir veya heterosiklidir; ve R, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde bir elektron çiftidir, hidrojenidir veya C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alkildir; ve
- 10 R<sup>12</sup>, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alkildir, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> aminoalkildir, -NH<sub>2</sub>, -NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>R<sup>15</sup>, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alkilkarbonildir, oksodur, -CN, triflorometildir, amidildir, amidinildir, amidinilalkildir, amidinilalkilkarbonil guanidinildir, guanidinilalkildir, guanidinilalkilkarbonildir, kolattır, deoksikolattır, arildir, heteroarildir, heterosiklidir, -SR<sup>13</sup> veya C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alkoksidir, burada R<sup>13</sup>, R<sup>14</sup> ve R<sup>15</sup>, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alkildir; ve burada alt-
- 15 birim-arası bağlantıların en az biri (B) bağlantısıdır.

Yukarıdaki yapının bazı uygulamalarında, alt-birim-arası bağlantıların en az %5'i (B) bağlantısıdır. İlgili bir uygulamada, alt-birim-arası bağlantıların %10 ila %50'si (B) bağlantısıdır. Bir başka ilgili uygulamada, her bir (B) bağlantısı, her bir bulunuşunda aynı yapıya sahiptir. Yukarıdaki yapının daha bir başka spesifik uygulamasında, her bir Y ve her bir W, O'dur.

İnsan LMNA genindeki ekzon 10'un veya ekzon 11'in bir veya birden fazla bazına komplementer olan ve SEQ ID NO.'ları: 3-34'ün herhangi birinde izah edilen bir diziyeye komplementer bitişik en az 12 baz içeren bir hedefleme dizisi içeren bir antisens oligonükleotid burada açıklanır.

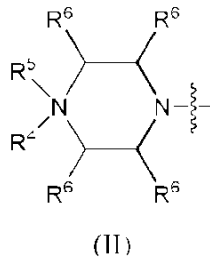
Buluşun ilave uygulamaları, bir omurga içeren bir antisens oligonükleotid sağlar, omurga, (A), (B) tipi alt-birim-arası bağlantılar veya bunların kombinasyonları ile birleştirilmiş morfolino halka yapılarının bir dizisini içerir, burada her bir morfolino halka yapısı bir baz-eşleşme kısmını destekler, böylece oligonükleotid bileşiği, bir hedef

- nükleik asidi bir dizi-spesifik şekilde bağlayabilir; SEQ ID NO.'ları: 1-34'ün en az 12 bazına komplementer olan veya SEQ ID NO.'ları: 3-34'ün herhangi birini veya birden fazlasını içeren bir hedefleme dizisi içeren bir oligonükleotid sağlar ve burada oligonükleotid bir 3' ucu, bir 5' ucu içerir ve aşağıdaki yapıya (XVII) veya bunun bir tuzuna veya izomerine sahiptir ve:



burada (A) bağlantısı için:

- 10 W, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde S'dir veya O'dur;  
X, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde  $-N(CH_3)_2$ 'dir,  $-NR^1R^2$ 'dir,  $-OR^3$ 'tür veya;

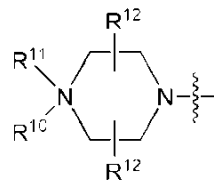


- Y, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde O'dur veya -NR<sup>2</sup>'dir,  
 R<sup>1</sup>, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir veya metildir;  
 R<sup>2</sup>, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir veya -LNR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>R<sup>7</sup>'dir;  
 R<sup>3</sup>, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir veya C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkildir;  
 5 R<sup>4</sup>, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir, metildir, -C(=NH)NH<sub>2</sub>,  
 -Z-L-NHC(=NH)NH<sub>2</sub> veya -[C(O)CHR'NH]<sub>m</sub>H'dir, burada Z, karbonildir (C(O))  
 veya bir doğrudan bağdır, R', bir doğal oluşumlu amino asidin bir yan zinciridir  
 veya bunun bir- veya iki-karbonlu homologudur ve m, 1 ila 6 aralığındadır;  
 R<sup>5</sup>, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir, metildir veya bir  
 10 elektron çiftidir;  
 R<sup>6</sup>, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir veya metildir;  
 R<sup>7</sup>, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkildir veya C<sub>1</sub>-  
 C<sub>6</sub> alkoksialkildir;  
 L, alkil, alkoksi veya alkilamino gruplarını veya bunların kombinasyonlarını  
 15 içeren en fazla 18 atom uzunluğundaki bir opsiyonel bağlayıcıdır; ve

burada (B) bağlantısı için:

- W, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde S'dir veya O'dur;  
 X, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde -NR<sup>8</sup>R<sup>9</sup>'dur veya -OR<sup>3</sup>'tür; ve  
 20 Y, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde O'dur veya -NR<sup>10</sup>'dur,  
 R<sup>8</sup>, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir veya C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> alkildir;  
 R<sup>9</sup>, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alkildir, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>  
 aralkildir veya arildir;  
 R<sup>10</sup>, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alkildir veya -  
 25 LNR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>R<sup>7</sup>'dir;  
 burada R<sup>8</sup> ve R<sup>9</sup>, bir 5-18 üyeli mono veya bisiklik heterosiklik oluşturmak için  
 birleşebilir veya R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup> veya R<sup>3</sup>, bir 5-7 üyeli heterosiklik oluşturmak için R<sup>10</sup> ile  
 birleşebilir ve burada X, 4-piparazino olduğunda, X, aşağıdaki yapıya (III)  
 sahiptir:

30



(III)

burada:

5  $R^{10}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde  $C_2-C_{12}$  alkildir,  $C_1-C_{12}$  aminoalkildir,  $C_1-C_{12}$  alkilkarbonildir, arildir, heteroarildir veya heterosiklidir; ve  $R^{11}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde bir elektron çiftidir, hidrojenidir veya  $C_1-C_{12}$  alkildir;

10  $R^{12}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir,  $C_1-C_{12}$  alkildir,  $C_1-C_{12}$  aminoalkildir,  $-NH_2$ ,  $-NR^{13}R^{14}$ ,  $-NR^{13}R^{14}R^{15}$ ,  $C_1-C_{12}$  alkilkarbonildir,  $-CN$ , triflorometildir, amidildir, amidinildir, amidinilalkildir, amidinilalkilkarbonildir, guanidinildir, guanidinilalkildir, guanidinilalkilkarbonildir, kolattır, deoksikolattır, arildir, heteroarildir, heterosiklidir,  $-SR^{13}$  veya  $C_1-C_{12}$  alkoksidir, burada  $R^{13}$ ,  $R^{14}$  ve  $R^{15}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde  $C_1-C_{12}$  alkildir; ve

15  $R^{17}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde yoktur, hidrojenidir veya  $C_1-C_6$  alkildir;

$R^{18}$  ve  $R^{19}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde yoktur, hidrojenidir, bir hücreye-nüfuz etme peptididir, bir doğal veya doğal-olmayan amino asittir,  $C_2-C_{30}$  alkilkarbonildir,  $-C(=O)OR^{21}$ 'dir veya  $R^{20}$ 'dir;

20  $R^{20}$  is, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde guanidinildir, heterosiklidir,  $C_1-C_{30}$  alkildir,  $C_3-C_8$  sikloalkildir;  $C_6-C_{30}$  arildir,  $C_7-C_{30}$  aralkildir,  $C_3-C_{30}$  alkilkarbonildir,  $C_3-C_8$  sikloalkilkarbonildir,  $C_3-C_8$  sikloalkilalkilkarbonildir,  $C_7-C_{30}$  arilkarbonildir,  $C_7-C_{30}$  aralkilkarbonildir,  $C_2-C_{30}$  alkiloksikarbonildir,  $C_3-C_8$  sikloalkiloksikarbonildir,  $C_7-C_{30}$  ariloksikarbonildir,  $C_8-C_{30}$  aralkiloksikarbonildir veya  $-P(=O)(R^{22})_2$ 'dir;

25  $R^{21}$ , bir veya birden fazla oksijen veya hidroksil kısmı veya bunların kombinasyonlarını içeren  $C_1-C_{30}$  alkildir;

her bir  $R^{22}$ , bağımsız bir şekilde  $C^6-C^{12}$  ariloksidir;

B, bir baz-eşleşme kısmıdır;

30  $L^1$ , alkil, hidroksil, alkoksi, alkilamino, amid, ester, karbonil, karbamat, fosfordiamidat, fosforoamidat, fosforotiyoat, piperazin ve fosfodiester arasından seçilen bağlar içeren en fazla 18 atom uzunluğundaki bir opsiyonel bağlayıcıdır;

x, 0 veya daha büyük olan bir tam sayıdır; ve

burada  $R^{17}$ 'nin ve  $R^{18}$ 'in her ikisinin de bulunmaması kaydıyla ve  $R^{18}$ 'in veya  $R^{19}$ 'un en az biri,  $R^{20}$ 'dir.

Buluşun bu ve diğer yönleri aşağıdaki detaylı açıklamaya başvurma üzerine anlaşılır olacaktır. Bu amaçla, belirli alt-yapı bilgisini, prosedürleri, bileşikleri ve/veya bileşimleri daha detaylı bir şekilde tarif eden çeşitli referanslar burada izah edilir.

## 5 ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

Şekil 1A, bir fosfordiamidat bağlantısı ile bir emsal morfolino oligomer yapısını gösterir;

10 Şekil 1B, Şekil 1A'da olduğu şekilde bir morfolino oligomerini gösterir, ancak burada omurga bağlantıları bir (piperazino) fosfordiamidat bağlantısı formunda bir pozitif yüklü grup içerir;

15 Şekil 1C, buluşun bir uygulamasına uygun şekilde, bir arjinin açısından zengin peptidin ve bir antisens oligomerin bir konjugatını gösterir;

Şekiller 1D-G, D ila G arasındaki harfler ile gösterilen, emsal morfolino oligonükleotidlerinin tekrar eden alt-birim segmentini gösterir.

20 Şekil 2, progerinin ve lamin A/C'nin immüno-flüoresans taraması için sonuçları gösterir.

Şekil 3, lamin A'nın ve progerinin Western analizi için sonuçları gösterir.

25 Şekil 4, lamin A'nın ve progerinin RT-qPCR analizi için sonuçları gösterir.

Şekil 5, lamin A'nın, lamin C'nin ve progerinin Western analizi için sonuçları gösterir.

## 30 DETAYLI AÇIKLAMA

Mevcut buluş, burada tarif edildiği şekilde oligonükleotidler ve bunu içeren bileşim ile ilgilidir. Mevcut buluşun bağlamında ayrıca, in vitro yöntemler de açıklanır, burada oligonükleotidler, örneğin, LMNA pre-mRNA'sının uç-birleştirmesini modüle etme ile, 35 mutant LMNA proteini mRNA'sının ekspresyonunu inhibe eder.

## Tanımlar

Aksi tanımlanmadıkça, burada kullanılan tüm teknik ve bilimsel terimler, buluşun ait olduğu teknikte normal uzmanlığı olan kişiler tarafından yaygın bir şekilde anlaşılan ile aynı anlama sahiptir. Burada tarif edilenlere benzer veya eş-değer olan herhangi bir yöntemin ve materyalin mevcut buluşun pratiğinde veya testlerinde kullanılabilmesine rağmen, tercih edilen yöntemler ve materyaller tarif edilir. Mevcut buluşun amaçları için, aşağıdaki terimler aşağıda tanımlanır.

10

"Bir" ve "biri" tanımlıkları burada, tanımlığın gramatikal objesinin birini veya birden fazlasını (*yani*, en az birini) ifade etmek için kullanılır. Örnek olarak, "bir eleman", bir eleman veya birden fazla eleman anlamına gelir.

15

"Yaklaşık" ile, bir referans niceliğe, düzeye, değere, sayıya, sıklığa, yüzdeye, boyuta, boya, miktara, ağırlığa veya uzunluğa %30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 veya 1 kadar çeşitlilik gösteren bir nicelik, düzey, değer, sayı, sıklık, yüzde, boyut, boy, miktar, ağırlık veya uzunluk kastedilir.

20

"Kodlama dizisi" ile, bir genin polipeptit ürünü için koda katkı sağlayan herhangi bir nükleik asit dizisi kastedilir. Aksine, "kodlamayan dizi" terimi, bir genin polipeptit ürünü için koda katkı sağlamayan herhangi bir nükleik asit dizisini ifade eder.

25

Bu spesifikasyon boyunca, bağlam aksini gerektirmedikçe, "içermek", "içerir" ve "içeren" sözcüklerinin, bir ifade edilen adımın veya elemanın veya adımlar veya elemanlar grubunun dahil edildiğini, ancak herhangi bir başka adımın veya elemanın veya adımlar veya elemanlar grubunun dışlanmadığını gösterdiği anlaşılacaktır.

30

"Oluşan" ile, "oluşan" ifadesini takip edenleri içerdiği ve bunlarla sınırlı olduğu, kastedilir. Böylelikle, "oluşan" ifadesi, listelenen elemanların gerektiğini veya mecburi olduğunu ve başka elemanların bulunamayacağını gösterir. "Esas olarak oluşan" ile, ifadeden sonra listelenen herhangi bir elemanı içerdiği ve listelenen elemanlar için açıklamada belirtilen aktiviteye veya etkiye müdahale etmeyen veya katkı sağlamayan diğer elemanlar ile sınırlı olduğu kastedilir. Böylelikle, "esas olarak oluşan" ifadesi,

35

listelenen elemanların gerektiğini veya mecburi olduğunu, ancak diğer elemanların



opsiyonel olduğunu ve bunların listelenen elemanların aktivitesini veya etkisini maddesel olarak etkileyip etkilememesine bağlı olarak bulunabileceğini veya bulunamayacağını gösterir.

5 "Komplementer" ve "tamamlayıcılık" terimleri, baz-eşleşme kuralları ile ilgili olan polinükleotidi (*yani*, nükleotidlerin bir dizisini) ifade eder. Örneğin, "A-G-T" dizisi, "T-C-A" dizisine komplementerdir. Tamamlayıcılık, "parsiyel" olabilir, burada nükleik asitlerin bazlarının yalnızca bazıları baz eşleşme kurallarına göre eşleşir. Veya burada "nükleik asitler arasında "tam" veya "toplam" tamamlayıcılık olabilir. Nükleik asit sarmalları arasındaki tamamlayıcılığın derecesi, nükleik asit sarmalları arasındaki hibridizasyonun etkinliği ve gücü üzerinde anlamlı etkilere sahiptir. Mükemmel tamamlayıcılık sıklıkla arzu edilirken, bazı uygulamalar hedef RNA açısından bir veya birden fazla, ancak tercihen 6, 5, 4, 3, 2 veya 1 yanlış-eşleşme içerebilir. Oligomer içindeki herhangi bir lokasyondaki varyasyonlar dahil edilir. Belirli uygulamalarda, bir oligomerin uçlarına yakın dizi içindeki varyasyonlar genel olarak, içindeki varyasyonlara kıyasla tercih edilebilir ve mevcut olduğunda tipik olarak 5' ve/veya 3' ucunun tipik olarak yaklaşık 6, 5, 4, 3, 2 veya 1 nükleotidi içindedir.

"Hücreye nüfuz etme peptidi" veya "CPP" terimleri birbiri ile değiştirilebilir bir şekilde kullanılır ve katyonik hücreye nüfuz etme peptitlerini ifade eder, aynı zamanda taşıma peptitleri, taşıyıcı peptitler veya peptit iletim alanları olarak da adlandırılır. Burada gösterildiği üzere, peptitler verilen bir hücre kültürü popülasyonunun hücrelerinin, aralardaki tüm tam sayılar dahil olmak üzere, %30'unda, %40'ında, %50'sinde, %60'ında, %70'inde, %80'inde, %90'ında veya %100'ünde hücre nüfuzunu indükleme kapasitesine sahiptir ve sistemik uygulama üzerine çok sayıda dokuda *in vivo* makromoleküler translokasyona izin verir.

"Antisens oligomer" veya "antisens bileşik" veya "antisens oligonükleotid" veya "oligonükleotid" terimleri burada birbiri ile değiştirilebilir bir şekilde kullanılır ve her biri, hedef dizi içinde bir nükleik asit:oligomer heterodupleksi oluşturmak için, baz-eşleşme kısımlarının bir nükleik asit (tipik olarak bir RNA) içindeki bir hedef diziyeye Watson-Crick baz eşleşmesi ile hibridize olmasına izin veren alt-birim-arası bağlantılar ile bağlanmış, bir baz-eşleşme kısmı taşıyan sıklık alt-birimlerin bir dizisini ifade eder. Sıklık alt-birimler, riboz veya bir başka pentoz şekerine veya belirli uygulamalarda, bir morfolino grubuna dayanabilir (aşağıdaki morfolino oligomerlerinin açıklamasına bakınız). Peptit

nükleik asitleri (PNA'lar), kilimli nükleik asitler (LNA'lar) ve 2'-O-Metil oligonükleotidler ve teknikte bilinen diğer antisens ajanlar da tasarlanır.

Bu tarz bir antisens oligomer, mRNA'nın translasyonunu bloke etmek veya inhibe etmek için veya doğal pre-mRNA uç-birleştirme işlemlerini inhibe etmek için veya hedeflenmiş mRNA'ların parçalanmasını indüklemek için tasarlanabilir ve bunun bununla hibridize olduğu bir hedef diziyeye "yönlendirildiği" veya "karşı hedeflendiği" söylenebilir. Belirli uygulamalarda, hedef dizi, bir mRNA'nın bir AUG başlangıç kodonunu, bir ön-işlenmiş mRNA'nın bir 3' veya 5' uç-birleştirme yerini veya bir dallanma noktasını çevreleyen veya içeren bir bölgedir. Hedef dizi, bir ekzon içinde veya bir intron içinde veya bir kombinasyonu içinde olabilir. Bir uç-birleştirme yeri için hedef dizi, bir ön-işlenmiş mRNA'nın bir normal uç-birleştirme akseptör bağlantı yerinin aşağı akış bunun 5' ucu 1 ila yaklaşık 25 baz çiftine sahip olan bir mRNA dizisi içerebilir. Bir uç-birleştirme için bir tercih edilen hedef dizi, bir pre-işlenmiş mRNA'nın, bir uç-birleştirme yeri içeren veya bütünüyle bir ekzon kodlama dizisi içine dahil edilen veya bir uç-birleştirme akseptör veya donör yerine uzanan, herhangi bir bölgedir. Bir oligomerin daha genel olarak, bu yukarıda tarif edildiği şekilde hedefin nükleik asidine karşı hedeflendiğinde, bir biyolojik olarak ilgili hedefe, örneğin, mevcut buluşta, lamin A proteinini kodlayan bir insan LMNA geni pre-mRNA'sına, "karşı hedeflendiği" söylenir. Emsal hedefleme dizileri, SEQ ID NO.'ları: 3-34'ü içerir.

SEQ ID NO.'ları: 3-34'ün birini veya birden fazlasını içeren, esas olarak bundan oluşan veya oluşan antisens oligonükleotidler dahil edilir. Ayrıca, bu antisens oligomerlerin, SEQ ID NO.'ları: 3-34'ün herhangi birine (aralardaki tüm tam sayılar dahil olmak üzere) %80, %85, %90, %95, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine veya dizi homolojisine sahip olan varyant oligomerleri ve/veya bu dizilerden yaklaşık 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 veya 10 nükleotid farklılık gösteren varyantları, tercihen bir hücre içinde progerin ekspresyonunu modüle eden varyantları içeren, varyantları da dahil edilir. Ayrıca, SEQ ID NO.'ları: 3-34'ün herhangi birinin veya birden fazlasının, burada tarif edildiği üzere, uygun bir sayıda, *örneğin*, her bir 2-5 yüksüz bağlantı için en fazla yaklaşık 1, *örneğin*, her bir 10 yüksüz bağlantı için yaklaşık 4-5, katyonik veya başka modifiye edilmiş bağlantı içeren ve/veya ayrıca burada da tarif edildiği üzere, buna tutturulmuş bir Arg açısından zengin hücreye-nüfuz etme taşıma peptidi içeren oligonükleotidler de dahil edilir.

"Morfolino oligomeri" veya "PMO" (fosforamidat- veya fosfordiamidat morfolino oligomeri) terimleri, morfolino alt-birimi yapılarından oluşan bir oligonükleotid analogunu ifade eder, burada (i) yapılar, bir alt-birimin morfolino nitrojenini bir bitişik alt-birimin bir 5' ekzosiklik karbonuna birleştiren, bir ila üç atom uzunluğunda, tercihen iki atom uzunluğunda ve tercihen yüksüz veya katyonik olan, fosfor-içeren bağlantılar ile birbirine bağlanır ve (ii) her bir morfolino halkası bir pürin veya pirimidin veya baz spesifik hidrojen bağlama ile bir polinükleotid içindeki bir bazı bağlamak için etkili olan bir eş-değer baz-eşleşme kısmı taşır. Bunlar bağlamaya veya aktiviteye müdahale etmediği sürece, bu bağlantıya varyasyonlar yapılabilir. Örneğin, fosfora tutturulmuş oksijen, sülfür ile sübstüte edilebilir (tiyofosfordiamidat). 5' oksijen, amino veya düşük alkil sübstüte edilmiş amino ile sübstüte edilebilir. Fosfora tutturulmuş asılı nitrojen sübstüte edilmeyebilir, (opsiyonel olarak sübstüte edilmiş) düşük alkil ile mono-sübstüte edilebilir veya di-sübstüte edilebilir. Ayrıca, aşağıdaki katyonik bağlantıların tartışmasına bakınız. Pürin veya pirimidin baz eşleşme kısmı tipik olarak, adenindir, sitozindir, guanindir, urasildir, timindir veya inosindir. Morfolino oligomerlerinin sentezi, yapıları ve bağlama karakteristikleri U.S. Patent No. 5,698,685, 5,217,866, 5,142,047, 5,034,506, 5,166,315, 5,521,063 ve 5,506,337 ve PCT/US07/11435 (katyonik bağlantılar) ve US08/012804 (iyileştirilmiş sentez) Numaralı PCT Başvuruları'nda detaylandırılır.

20

"PMO+", önceden tarif edilmiş olan (*bakınız, örneğin, WO/2008/036127 PCT Yayını*), herhangi bir sayıda (1-piperazino)fosfinilidenoksi, (1-(4-( $\omega$ -guanidino-alkanoil))-piperazino)fosfinilidenoksi bağlantısı (A2 ve A3) içeren fosfordiamidat morfolino oligomerlerini ifade eder.

25

"PMO-X", burada açıklanan, en az bir (B) bağlantısı veya açıklanan uç modifikasyonların en az birini içeren ve WO2011/150408'de ve US2012/0065169'da açıklandığı üzere fosfordiamidat morfolino oligomerlerini ifade eder. Burada kullanılan ilave PMO-X fosfordiamidat morfolino oligomerleri US2014/0330006'da bulunabilir.

30

Bir "fosforamidat" grubu, tutturulmuş üç oksijen atomu ve tutturulmuş bir nitrojen atomu içerirken, bir "fosfordiamidat" grubu, tutturulmuş iki oksijen atomuna ve tutturulmuş iki nitrojen atomuna sahip olan fosfor içerir. Burada ve WO2011/150408'de ve US7,943,762'de tarif edilen oligomerlerin yüksüz veya modifiye edilmiş alt-birim-arası

35

bağlantılarında, bir nitrojen daima omurga zincirine asılıdır. Bir fosfordiamidat bağlantısındaki, ikinci nitrojen tipik olarak, bir morfolino halka yapısı içindeki halka nitrojenidir.

- 5 "Tiyofosforamidat" veya "tiyofosfordiamidat" bağlantıları sırasıyla fosforamidat veya fosfordiamidat bağlantılarıdır, burada bir oksijen atomu, tipik olarak, omurgaya asılı oksijen, sülfür ile değiştirilir.

10 "Alt-birim-arası bağlantı", iki morfolino alt-birimini bağlayan bağlantıyı, örneğin, yapı (I), ifade eder.

Burada kullanıldığı şekliyle, "yükü", "yüksüz", "katyonik" ve "anyonik", nötrala yakın, örneğin, yaklaşık 6 ila 8 aralığındaki, pH'ta bir kimyasal kısmın hakim olan halini ifade eder. Örneğin, terim fizyolojik, yani, yaklaşık 7,4, pH'ta kimyasal kısmın hakim olan  
15 halini ifade edebilir.

"Oligonükleotid analogu" terimi, (i) bir modifiye edilmiş omurga yapısına, *örneğin*, doğal oligo- ve polinükleotidlerde bulunan standart fosfodiester bağlantı dışındaki bir omurgaya ve (ii) opsiyonel olarak, modifiye edilmiş şeker kısımlarına, *örneğin*, riboz  
20 veya deoksiriboz kısımlarından ziyade morfolino kısımlarına, sahip olan bir oligonükleotidi ifade eder. Oligonükleotid analogları, standart polinükleotid bazlarına Watson-Crick baz eşleşmesi ile hidrojen bağlama yapabilen bazları destekler, burada analog omurgası oligonükleotid analog molekülü ve bir standart polinükleotid (*örneğin*, tek-sarmallı RNA veya tek-sarmallı DNA) içindeki bazlar arasında bir dizi-spesifik  
25 şekilde bu tarz hidrojen bağlamaya izin veren bir şekilde bazları sunar. Tercih edilen analoglar, bir büyük ölçüde yüksüz, fosfor içeren omurgaya sahip olanlardır.

Bir oligonükleotid analogu içindeki bir büyük ölçüde yüksüz, fosfor içeren omurga, burada alt-birim bağlantılarının çoğunluğunun, *örneğin*, bu bağlantıların %50-100'ünün,  
30 tipik olarak en az %60 ila %100'ünün veya %75'inin veya %80'inin, yüksüz olduğu ve bir tek fosfor atomu içerdiği bir omurgadır. Antisens oligonükleotidler ve oligonükleotid analogları, (aralardaki tüm tam sayılar ve aralıklar dahil olmak üzere) yaklaşık 8 ile 40 alt-birim, tipik olarak yaklaşık 8-25 alt-birim ve tercihen yaklaşık 12 ila 25 alt-birim, içerebilir. Belirli uygulamalarda, oligonükleotidler, aşağıda tanımlandığı üzere, hedef  
35 diziye tam dizi tamamlayıcılığına veya yakın tamamlayıcılığa sahip olabilir.

Bir oligonükleotidin bir "alt-birimi", bir nükleotid (veya nükleotid analogu) birimi ifade eder. Terim, bir "yükü alt-birimi" ifade ettiğinde, yükün tipik olarak alt-birim-arası bağlantı (*örneğin*, bir fosfat veya fosforotiyoat bağlantısı veya bir katyonik bağlantı) içinde yer almasına rağmen, tutturulmuş alt-birim-arası bağlantı içeren veya tutturulmuş alt-birim-arası bağlantı içermeyen nükleotidi ifade edebilir.

Pürin veya pirimidin bazı eşleşme kısmı tipik olarak, adenindir, sitozindir, guanindir, urasildir, timindir veya inosindir. Bazlar, *örneğin*, piridin-4-on, piridin-2-on, fenil, psödourasil, 2,4,6-trimetoksi benzen, 3-metil urasil, dihidroüridin, naftil, aminofenil, 5-alkilsitidinler (*örneğin*, 5-metilsitidin), 5-alkilüridinler (*örneğin*, ribotimidin), 5-haloüridin (*örneğin*, 5-bromoüridin) veya 6-azapirimidinler veya 6-alkilpirimidinler (*örneğin*, 6-metilüridin), propin, kuesosin, 2-tiyoüridin, 4-tiyoüridin, vibütosin, vibütoksosin, 4-asetiltidin, 5-(karboksihidroksimetil)üridin, 5'-karboksimetilaminometil-2-tiyoüridin, 5-karboksimetilaminometilüridin,  $\beta$ -D-galaktosilkueosin, 1-metiladenosin, 1-metilinosen, 2,2-dimetilguanosen, 3-metilsitidin, 2-metiladenosin, 2-metilguanosen, N6-metiladenosin, 7-metilguanosen, 5-metoksiaminometil-2-tiyoüridin, 5-metilaminometilüridin, 5-metilkarbonilmetilüridin, 5-metiloksiüridin, 5-metil-2-tiyoüridin, 2-metil-2-tiyo-N6-izopenteniladenosin,  $\beta$ -D-mannosilkueosin, üridin-5-oksiasetik asit, 2-tiyositidin, treonin türevleri ve diğerleri (Burgin *et al.*, 1996, Biochemistry, 35, 14090; Uhlman & Peyman, yukarıda) de dahil edilir. Bu yönünde "modifiye edilmiş bazlar" ile, yukarıda gösterildiği üzere, adenin (A), guanin (G), sitozin (C), timin (T) ve urasil (U) dışındaki nükleotid bazları kastedilir; bu tarz bazlar antisens molekül içindeki herhangi bir pozisyonda kullanılabilir. Teknikte uzmanlığı olan kişiler, oligomerlerin kullanımlarına bağlı olarak, T'lerin ve U'ların birbiri ile değiştirilebilir olduğunu anlayacaktır. Mesela, diğer antisens kimyalar, *örneğin*, daha çok RNA-benzeri olan 2'-O-metil antisens oligonükleotidler ile, T bazları U olarak gösterilebilir (*bakınız, örneğin*, Dizi Listesi).

Bir "amino asit alt-birimi" veya "amino asit rezidüsü", bir  $\alpha$ -amino asit rezidüsünü (-CO-CHR-NH-) veya bir  $\beta$ - veya başka amino asit rezidüsünü (*örneğin*, -CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHR-NH-) ifade edebilir, burada R, bir yan zincirdir (hidrojen içerebilir) ve n, 1 ila 7 aralığındadır, tercihen 1 ila 4 aralığındadır.

"Doğal oluşumlu amino asit" terimi, doğada bulunan proteinlerde bulunan bir amino asidi, *örneğin*, protein biyosentezi sırasında yararlanılan 20 (L)-amino asitlerini aynı

zamanda diğerlerini, örneğin, 4-hidroksiprolini, hidroksilizini, desmosini, izodesmosini, homosisteini, sitrüllini ve ornitini, ifade eder. "Doğal-olmayan amino asitler" terimi, doğada bulunan proteinlerde bulunmayan amino asitleri ifade eder, örnekler beta-alanini ( $\beta$ -Ala), 6-aminoheksanoik asidi (Ahx) ve 6-aminopentanoik asidi içerir. "Doğal-olmayan amino asitler'in" ilave örnekleri, sınırlandırma olmaksızın, teknikte uzmanlığı olan bir kişi tarafından bilinen, (D)-amino asitleri, norlösini, norvalini, p-florofenilalanini, etiyonini ve benzerlerini, içerir.

"İzole edilmiş" ile, normalde buna bunun natif halinde eşlik eden bileşenlerden büyük ölçüde veya esas olarak yoksun olan materyal kastedilir. Örneğin, burada kullanıldığı şekliyle, bir "izole edilmiş polinükleotid" veya "izole edilmiş oligonükleotid", bir doğal-oluşumlu halde bunun iki yanında yer alan dizilerden saflaştırılmış veya uzaklaştırılmış bir polinükleotidi, *örneğin*, fragmana normalde bitişik olan dizilerden uzaklaştırılmış olan bir DNA fragmanını, ifade edebilir.

Bir "etkili miktar", antisens oligomerinin progerinin ekspresyonunu in vitro modüle etmek için etkili olan bir miktarını ifade eder.

"Güçlendirmek" veya "güçlendirme" veya "arttırmak" veya "arttırma" veya "stimüle etmek" veya "stimüle etme" ile genel olarak, antisens bileşik veya bir kontrol bileşiği olmadan neden olunan yanıt ile karşılaştırıldığında, birinin veya antisens bileşiklerin veya bileşimlerin bir hücre içinde daha büyük bir fizyolojik yanıt (*yani*, aşağı akış etkiler) üretme veya bunlara neden olma yetisini ifade eder. Bir "arttırılmış" veya "güçlendirilmiş" miktar tipik olarak, bir "istatistiksel olarak anlamlı" miktardır ve antisens bileşik (bir ajanın olmaması) veya bir kontrol bileşiği olmadan üretilen miktarın 1,1, 1,2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 veya daha fazla katı (*örneğin*, 500, 1000 katı) (aralardaki ve 1'in üstündeki tüm tam sayılar ve ondalık sayılar dahil olmak üzere), *örneğin*, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, vb.) katı olan bir artışı içerebilir.

"Azaltmak" veya "inhibe etmek" terimi genel olarak, buluşun bir veya birden fazla antisens bileşiğinin, tanısal teknikteki rutin tekniklere göre ölçüldüğü üzere, bir ilgili fizyolojik veya hücrel yanıtı,, "düşürme" yetisi ile ilgili olabilir. İlgili fizyolojik veya hücrel yanıtlar (*in vivo* veya *in vitro*) teknikte uzmanlığı olan kişiler için anlaşılır olacaktır ve örneğin, mRNA ve/veya protein düzeyleri ile ölçüldüğü üzere progerinin ekspresyonundaki düşüşleri, içerebilir. Bir yanıtta bir "düşüş", antisens bileşik veya bir

kontrol bileşimi olmaması ile üretilen yanıt ile karşılaştırıldığında "istatistiksel olarak anlamlı" olabilir ve aralardaki tüm tam sayılar dahil olmak üzere, bir %1'lik, %2'lik, %3'lük, %4'lük, %5'lik, %6'lık, %7'lik, %8'lik, %9'luk, %10'luk, %11'lik, %12'lik, %13'lük, %14'lük, %15'lik, %16'lık, %17'lik, %18'lik, %19'luk, %20'lik, %25'lik, %30'luk, %35'lik, %40'lık, %45'lik, %50'lik, %55'lik, %60'lık, %65'lik, %70'lik, %75'lik, %80'lik, %85'lik, %90'lık, %95'lik veya %100'lük düşüşü içerebilir.

"Hedef dizi" terimi, hedef RNA'nın, oligonükleotidin veya antisens ajanın buna karşı yönlendirildiği bir kısmını, yani, oligonükleotidin bir komplementer dizinin Watson-Crick baz eşleşmesi ile buna hibridize olacağı diziyi ifade eder. Belirli uygulamalarda, hedef dizi, hem intron hem de ekzon hedef diziyi içeren, bir pre-mRNA'nın bir kesintisiz bölgesi olabilir. Belirli diğer uygulamalarda, hedef dizi özel olarak, intron veya ekzon dizilerinden oluşacaktır.

"Hedefleme dizisi" veya "antisens hedefleme dizisi" terimi, bir oligonükleotid veya başka antisens içinde, RNA genomu içindeki hedef diziyeye komplementer (yani, buna ek olarak, büyük ölçüde komplementer) olan diziyi ifade eder. Antisens bileşiğin tüm dizisi veya yalnızca bir kısmı, hedef diziyeye komplementer olabilir. Örneğin, 20-30 baza sahip olan bir oligonükleotid içinde, yaklaşık 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 veya 29 baz, hedef bölgeye komplementer olan hedefleme dizileri olabilir. Tipik olarak, hedefleme dizisi, bitişik bazlardan oluşturulur, ancak alternatif olarak, *örneğin*, oligonükleotidin karşı uçlarından, birlikte konumlandırıldığında, hedef diziyi kapsayan diziyi oluşturan bitişik-olmayan dizilerden oluşturulabilir.

25

Hedef diziler ve hedefleme dizileri, bir anti-paralel konfigürasyonda hibridizasyon gerçekleştiğinde, bir diğerine "komplementer" olarak tarif edilir. Bir hedefleme dizisi, hedef diziyeye "yakın" veya "büyük ölçüde" tamamlayıcılığa sahip olabilir ve hala mevcut buluşun amacı için işlev gösterebilir, yani, bu hala fonksiyonel olarak "komplementer" olabilir. Belirli uygulamalarda, bir oligonükleotid hedef dizi ile 10 nükleotidden en fazla bir yanlış-eşleşmeye ve tercihen 20 nükleotidden en fazla bir yanlış-eşleşmeye sahip olabilir. Alternatif olarak, bir oligonükleotid, burada tarif edilen emsal antisens hedefleme dizileri ile, en az %90 dizi homolojisine ve tercihen en az %95 dizi homolojisine sahip olabilir.

35

Bir oligonükleotid, oligomer fizyolojik koşullar altında 45°C'den büyük ölçüde daha yüksek olan, tercihen en az 50°C ve tipik olarak 60°C-80°C veya daha yüksek, olan bir Tm ile hedefe hibridize olduğunda, bir hedef polinükleotide" spesifik olarak hibridize olur. Bu tarz hibridizasyon tercihen, sert hibridizasyon koşullarına karşılık gelir. Verilen

5 bir iyonik güçte ve pH'ta, Tm, bir hedef dizisinin %50'sinin bir komplementer polinükleotide hibridize olduğu sıcaklıktır. Yine, bu tarz hibridizasyon, antisens oligomerin hedef diziyeye "yakın" veya "büyük ölçüde" tamamlayıcılığı ile aynı zamanda tam tamamlayıcılığı ile gerçekleşebilir.

10 "Homoloji", amino asitlerin, özdeş olan veya konservatif süstitüsyonları oluşturan sayı yüzdesini ifade eder. Homoloji, dizi karşılaştırma programları, örneğin, GAP (Deveraux *et al.*, 1984, *Nucleic Acids Research* 12, 387-395), kullanılarak belirlenebilir. Bu şekilde, burada alıntı yapılanlara bir benzer veya bunlardan büyük ölçüde farklı uzunluktaki dizi hizalama içine boşlukların yerleştirilmesi ile karşılaştırılabilir, bu tarz

15 boşluklar, örneğin, GAP ile kullanılan karşılaştırma algoritması ile, belirlenir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "dizi özdeşliği" veya örneğin, "...'ye %50 özdeş bir dizi" içeren, terimler, dizinin bir karşılaştırma penceresi boyunca bir nükleotid-nükleotid temelinde veya bir amino asit-amino asit temelinde ne derece özdeş olduğunu ifade

20 eder. Böylelikle, bir "dizi özdeşliği yüzdesi", karşılaştırma penceresi boyunca optimal olarak hizalanmış iki diziyi karşılaştırma, burada eşleşmiş pozisyonların sayısını üretmek için her iki dizide özdeş nükleik asit bazının (*örneğin*, A, T, C, G, I) veya özdeş amino asit rezidüsünün (*örneğin*, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys ve Met) bulunduğu pozisyonların sayısını

25 belirleme, eşleşmiş pozisyonların sayısına karşılaştırma penceresi içindeki pozisyonların toplam sayısına (*yani*, pencere boyutuna) bölme ve dizi özdeşliği yüzdesini üretmek için sonucu 100 ile çarpma ile hesaplanabilir.

İki veya daha fazla polinükleotid veya polipeptit arasındaki dizi ilişkilerini tarif etmek için

30 kullanılan terimler, "referans dizi'yi", "karşılaştırma penceresi'ni", "dizi özdeşliği'ni", "dizi özdeşliği yüzdesi'ni" ve "büyük ölçüde özdeşliği" içerir. Bir "referans dizi", nükleotidler ve amino asit rezidüleri dahil olmak üzere, en az 8 veya 10 ancak sıklıkla 15 ila 18 ve sıklıkla en az 25 monomer birimi uzunluğundadır. İki polinükleotidin her biri (1) iki polinükleotid arasında benzer olan bir diziyi (*yani*, tam polinükleotid dizisinin yalnızca

35 bir kısmını) ve (2) iki polinükleotid arasında farklı olan bir diziyi içerebildiğinden, iki



(veya daha fazla) polinükleotid arasındaki dizi karşılaştırmaları tipik olarak, dizi özdeşliğinin lokal bölgelerini tanımlamak ve karşılaştırmak için bir "karşılaştırma penceresi" boyunca iki polinükleotidin dizilerini karşılaştırma ile gerçekleştirilir. Bir "karşılaştırma penceresi", burada, iki dizi optimal olarak hizalandıktan sonra, bir dizinin aynı sayıdaki bitişik pozisyonların bir referans dizisi ile karşılaştırıldığında bitişik en az 6, genel olarak yaklaşık 50 ila yaklaşık 100, daha genel olarak yaklaşık 100 ila yaklaşık 150, pozisyonluk bir kavramsal segmenti ifade eder. Karşılaştırma penceresi, iki dizinin optimal hizalaması için (eklenmeler veya silinmeler içermeyen) referans dizi ile karşılaştırıldığında yaklaşık %20 veya daha az olan eklenmeler veya silinmeler (*yani*, boşluklar) içerebilir.

Bir karşılaştırma penceresini hizalamak için dizilerin optimal hizalaması, algoritmaların bilgisayarlı uygulamaları (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, ABD içindeki GAP, BESTFIT, FASTA ve TFASTA) ile veya inceleme ve çeşitli yöntemlerin seçilen herhangi biri ile üretilen en iyi (*yani*, karşılaştırma penceresi boyunca en yüksek homoloji yüzdesi ile sonuçlanan) hizalama ile yürütülebilir. Referans ayrıca, örneğin, Altschul *et al.*, 1997, *Nucl. Acids Res.* 25:3389, tarafından açıklandığı üzere BLAST programları familyasına da yapılabilir. Dizi analizinin detaylı bir tartışması, Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology," John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15, kaynağının Ünite 19.3'ünde bulunabilir.

Bir "nükleaz-dirençli" oligomerik molekül (oligomer), omurgası, hibridize edilmemiş veya hibridize edilmiş formda; vücut içindeki yaygın ekstraselüler ve intraselüler nükleazlar ile, nükleaz klevajına büyük ölçüde dirençli olanları ifade eder; *yani*, oligomer, oligomerin bunlara maruz bırakıldığı vücut içindeki normal nükleaz koşulları altında çok küçük nükleaz klevajı gösterir veya hiç nükleaz klevajı göstermez.

Bir ajan, pasif difüzyon dışındaki bir mekanizma ile hücre membranını geçerek hücreye girebildiğinde, "memeli hücreleri tarafından aktif bir şekilde alınır". Ajan, örneğin, ajanın, *örneğin*, bir ATP-bağımlı taşıma mekanizması, ile bir memeli hücresi membranını geçerek taşınmasını ifade eden "aktif taşıma" ile veya antisens ajanların, ajanın bir taşıma proteini bağlamasını gerektiren, akabinde bağlı ajanın membranı geçerek geçişini kolaylaştıran, bir taşıma mekanizması ile hücre membranını geçerek taşınmasını ifade eden "kolaylaştırılmış taşıma" ile, taşınabilir. Hem aktif hem de

kolaylaştırılmış taşıma için, oligonükleotid analogları tercihen, aşağıda tanımlandığı üzere, bir büyük ölçüde yüksüz omurgaya sahiptir.

5 Bir "heterodubleks", bir antisens oligonükleotid ve bir hedef RNA'nın komplementer kısmı arasındaki bir dubleksi ifade eder. Bir "nükleaz-dirençli heterodubleks", bir antisens oligomerin bunun komplementer hedefini bağlaması ile oluşturulan, böylece heterodubleksin intraselüler ve ekstraselüler nükleazlar, örneğin, çift-sarmallı RNA/RNA veya RNA/DNA komplekslerini kesebilen, RNaz H, ile in vivo parçalanmaya büyük ölçüde dirençli olduğu, bir heterodubleksi ifade eder.

10

Burada kullanıldığı şekliyle, "vücut sıvısı" terimi, bir süjeden elde edilen, idrarı, tükürüğü, plazmayı, kanı, spinal sıvıyı veya biyolojik orijinli başka örneği, örneğin, cilt hücrelerini veya dermal debrisini, içeren çeşitli örnek tiplerini kapsar ve bunun içinde süspanse edilen hücreleri veya hücre fragmanlarını veya sıvı vasatı ve bunun çözünen maddelerini ifade edebilir.

15

"Bağlı miktar" terimi, burada bir test ölçümü ve bir kontrol ölçümü arasında bir karşılaştırma yapıldığında kullanılır. Bir reaksiyon içinde bir kompleks oluşturan bir reaktifin bağlı miktarı, bir kontrol numunesi ile reaksiyona giren miktar ile 20 karşılaştırıldığında, bir test numunesi ile reaksiyona giren miktardır. Kontrol numunesi, aynı analiz içinde ayrı bir şekilde yürütülebilir veya bu aynı örneğin parçası olabilir (örneğin, bir doku kesiti içinde bir malign alanı çevreleyen normal doku).

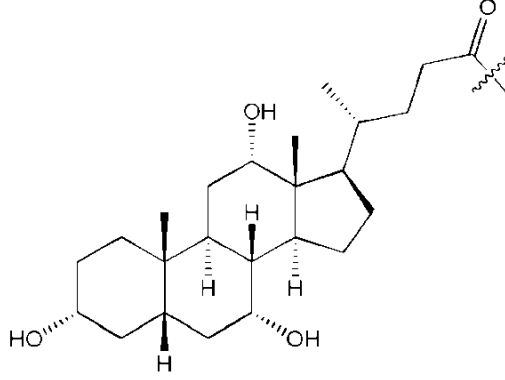
25 Bir doğal-suş gen veya gen ürünü, bir popülasyon içinde en sık gözlenendir ve böylelikle keyfi olarak genin "normal" veya "doğal-suş" formu olarak gösterilir.

Aşağıdaki kimyasal terimler, aksi gösterilmedikçe, aşağıdaki anlamlara sahiptir:

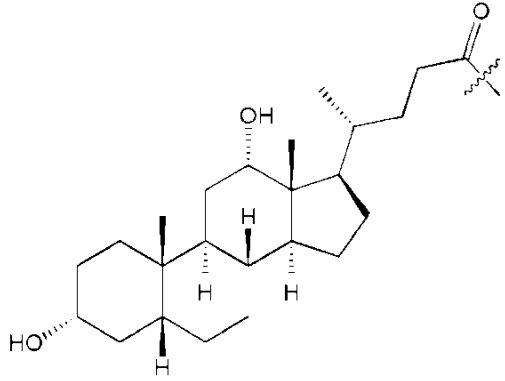
- "Amino",  $-NH_2$  radikalini ifade eder.
- "Siyano" veya "nitril",  $-CN$  radikalini ifade eder.
- 30 "Hidroksi" veya "hidroksil",  $-OH$  radikalini ifade eder.
- "İmino",  $=NH$  süstitüentini ifade eder.
- "Guanidini",  $-NHC(=NH)NH_2$  süstitüentini ifade eder.
- "Amidini",  $-C(=NH)NH_2$  süstitüentini ifade eder.
- "Nitro",  $-NO_2$  radikalini ifade eder.
- 35 "Okso",  $=O$  süstitüentini ifade eder.

"Tiyokso", =S sübstitüentini ifade eder.

"Kolat", aşağıdaki yapıyı ifade eder:



5 "Deoksikolat", aşağıdaki yapıyı ifade eder:



"Alkil", doymuş veya doymamış (*yani*, bir veya birden fazla ikili ve/veya üçlü bağ  
10 içeren), bir ila otuz karbon atomuna sahip olan ve molekülün geri kalanına bir tekli bağ  
ile tutturulan bir düz veya dallanmış hidrokarbon zinciri radikalini ifade eder. 1 ila 30  
aralığında herhangi bir sayıda karbon atomu içeren alkiler dahil edilir. En fazla 30  
karbon atomu içeren bir alkil, bir C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> alkil olarak ifade edilir, benzer şekilde, örneğin,  
en fazla 12 karbon atomu içeren bir alkil, bir C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alkildir. Diğer sayılarda karbon  
15 atomları içeren alkiler (ve burada tanımlanan diğer kısımlar) benzer şekilde temsil  
edilir. Alkil grupları, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> alkili, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> alkili, C<sub>1</sub>-C<sub>15</sub>  
alkili, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkili, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> alkili, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkili, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkili, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> alkili, C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> alkili, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>  
alkili, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> alkili ve C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> alkili, içerir. Temsili alkil grupları, bunlarla sınırlı kalmamak  
kaydıyla, metil, etil, *n*-propil, 1-metiletil (*izo*-propil), *n*-bütil, *i*-bütil, *s*-bütil, *n*-pentil, 1,1-  
20 dimetiletil (*t*-bütil), 3-metilheksil, 2-metilheksil, etenil, prop-1-enil, büt-1-enil, pent-1-enil,  
penta-1,4-dienil, etinil, propinil, büt-2-inil, büt-3-inil, pentinil, heksinil ve benzerlerini,

içerir. Spesifikasyonda spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, bir alkil grubu aşağıda tarif edildiği üzere opsiyonel olarak sübstüte edilebilir.

"Alkilen" veya "alkilen zinciri", molekülün geri kalanını bir radikal gruba bağlayan bir düz veya dallanmış iki-değerlikli hidrokarbon zincirini ifade eder. Alkilenler, doymuş veya doymamış olabilir (*yani*, bir veya birden fazla ikili ve/veya üçlü bağ içerir). Temsili alkilenler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alkileni, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> alkileni, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkileni, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkileni, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> alkileni, C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> alkileni, C<sub>1</sub> alkileni, içerir. Temsili alkilen grupları, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, metileni, etileni, propileni, *n*-bütileni, etenileni, propenileni, *n*-bütenileni, propinileni, *n*-bütinileni ve benzerlerini, içerir. Alkilen zinciri, molekülün geri kalanına bir tekli veya ikili bağ vasıtasıyla ve radikal gruba bir tekli veya ikili bağ vasıtasıyla tutturulur. Alkilen zincirinin molekülün geri kalanına ve radikal gruba tutturulma noktası zincir içindeki bir karbon veya herhangi iki karbon vasıtasıyla olabilir. Spesifikasyonda spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, bir alkilen zinciri, aşağıda tarif edildiği üzere, opsiyonel olarak sübstüte edilebilir.

"Alkoksi", -OR<sub>a</sub> formülünün bir radikalini ifade eder, burada R<sub>a</sub>, tanımlandığı şekilde bir alkil radikalidir. Spesifikasyonda spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, bir alkoksi grubu, aşağıda tarif edildiği üzere, opsiyonel olarak sübstüte edilebilir.

"Alkoksialkil", -R<sub>b</sub>OR<sub>a</sub> formülünün bir radikalini ifade eder, burada R<sub>a</sub>, tanımlandığı şekilde bir alkil radikalidir ve burada R<sub>b</sub>, tanımlandığı şekilde bir alkilen radikalidir. Spesifikasyonda spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, bir alkoksialkil grubu, aşağıda tarif edildiği üzere, opsiyonel olarak sübstüte edilebilir.

"Alkilkarbonil", -C(=O)R<sub>a</sub> formülünün bir radikalini ifade eder, burada R<sub>a</sub>, yukarıda tanımlandığı şekilde bir alkil radikalidir. Spesifikasyonda spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, bir alkilkarbonil grubu, aşağıda tarif edildiği üzere, opsiyonel olarak sübstüte edilebilir.

"Alkiloksikarbonil", -C(=O)OR<sub>a</sub> formülünün bir radikalini ifade eder, burada R<sub>a</sub>, tanımlandığı şekilde bir alkil radikalidir. Spesifikasyonda spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, bir alkiloksikarbonil grubu, aşağıda tarif edildiği üzere, opsiyonel olarak sübstüte edilebilir.

35

"Alkilamino",  $-NHR_a$  veya  $-NR_aR_a$  formülünün bir radikalini ifade eder, burada her bir  $R_a$ , bağımsız bir şekilde, yukarıda tanımlandığı şekilde bir alkil radikalidir. Spesifikasyonda spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, bir alkilamino grubu, aşağıda tarif edildiği üzere, opsiyonel olarak sübstüte edilebilir.

5

"Amidil",  $-N(H)C(=O)R_a$  formülünün bir radikalini ifade eder, burada  $R_a$ , burada tanımlandığı şekilde bir alkil veya aril radikalidir. Spesifikasyonda spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, bir amidil grubu, aşağıda tarif edildiği üzere, opsiyonel olarak sübstüte edilebilir.

10

"Amidinilalkil",  $-R_b-C(=NH)NH_2$  formülünün bir radikalini ifade eder, burada  $R_b$ , yukarıda tanımlandığı şekilde bir alkilen radikalidir. Spesifikasyonda spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, bir amidinilalkil grubu, aşağıda tarif edildiği üzere, opsiyonel olarak sübstüte edilebilir.

15

"Amidinilalkilkarbonil",  $-C(=O)R_b-C(=NH)NH_2$  formülünün bir radikalidir, burada  $R_b$ , yukarıda tanımlandığı şekilde bir alkilen radikalidir. Spesifikasyonda spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, bir amidinilalkilkarbonil grubu, aşağıda tarif edildiği üzere, opsiyonel olarak sübstüte edilebilir.

20

"Aminoalkil",  $-R_b-NR_aR_a$  formülünün bir radikalidir, burada  $R_b$ , yukarıda tanımlandığı şekilde bir alkilen radikalidir ve her bir  $R_a$ , bağımsız bir şekilde bir hidrojen veya bir alkil radikalidir.

25

"Tiyoalkil",  $-SR_a$  formülünün bir radikalini ifade eder, burada  $R_a$ , yukarıda tanımlandığı şekilde bir alkil radikalidir. Spesifikasyonda spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, bir tiyoalkil grubu opsiyonel olarak sübstüte edilebilir.

30

"Aril", hidrojen, 6 ila 30 karbon atomu ve en az bir aromatik halka içeren bir hidrokarbon halka sisteminden türetilen bir radikali ifade eder. Aril radikali, kaynaştırılmış veya köprülü halka sistemlerini içerebilen, bir monosiklik, bisiklik, trisiklik veya tetrasiklik halka sistemi olabilir. Aril radikalleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, aseantrilen, asenaftilen, asefenantrilen, antrasen, azulen, benzen, krisen, floranten, floren, as-indasen, s-indasen, indan, inden, naftalen, fenalen, fenantren, pleiaden, piren ve

35

trifenilen hidrokarbon halka sistemlerinden türetilen aril radikallerini, içerir.

Spesifikasyonda spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, "aril" veya "ar-" ön-eki (örneğin, "aralkil") ile, opsiyonel olarak sübstüte edilen aril radikallerini içerdiği kastedilir.

"Aralkil",  $-R_b-R_c$  formülünün bir radikalini ifade eder, burada  $R_b$ , yukarıda tanımlandığı şekilde bir alkilen zinciridir ve  $R_c$ , yukarıda tanımlandığı şekilde bir veya birden fazla aril radikalidir, örneğin, benzildir, difenilmetildir, tritildir ve benzerleridir. Spesifikasyonda spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, bir aralkil grubu opsiyonel olarak sübstüte edilebilir.

"Arilkarbonil",  $-C(=O)R_c$  formülünün bir radikalini ifade eder, burada  $R_c$ , yukarıda tanımlandığı şekilde bir veya birden fazla aril radikalidir, örneğin, fenildir. Spesifikasyonda spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, bir arilkarbonil grubu opsiyonel olarak sübstüte edilebilir.

"Ariksikarbonil",  $-C(=O)OR_c$  formülünün bir radikalini ifade eder, burada  $R_c$ , yukarıda tanımlandığı şekilde bir veya birden fazla aril radikalidir, örneğin, fenildir. Spesifikasyonda spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, bir ariksikarbonil grubu opsiyonel olarak sübstüte edilebilir.

"Aralkilkarbonil",  $-C(=O)R_b-R_c$  formülünün bir radikalini ifade eder, burada  $R_b$ , yukarıda tanımlandığı şekilde bir alkilen zinciridir ve  $R_c$ , yukarıda tanımlandığı şekilde bir veya birden fazla aril radikalidir, örneğin, fenildir. Spesifikasyonda spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, bir aralkilkarbonil grubu opsiyonel olarak sübstüte edilebilir.

"Aralkiloksikarbonil",  $-C(=O)OR_b-R_c$  formülünün bir radikalini ifade eder, burada  $R_b$ , yukarıda tanımlandığı şekilde bir alkilen zinciridir ve  $R_c$ , yukarıda tanımlandığı şekilde bir veya birden fazla aril radikalidir, örneğin, fenildir. Spesifikasyonda spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, bir aralkiloksikarbonil grubu opsiyonel olarak sübstüte edilebilir.

"Ariksiksi",  $-OR_c$  formülünün bir radikalini ifade eder, burada  $R_c$ , yukarıda tanımlandığı şekilde bir veya birden fazla aril radikalidir, örneğin, fenildir. Spesifikasyonda spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, bir arilkarbonil grubu opsiyonel olarak sübstüte edilebilir.

"Sikloalkil", kaynaştırılmış veya köprülü halka sistemlerini içerebilen, doymuş veya doymamış olan ve molekülün kalanına bir tekli bağ ile tutturulan bir kararlı, aromatik-olmayan, monosiklik veya polisiklik karbosiklik halkayı ifade eder. Temsili sikloalkiller,

bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, üç ila on beş karbon atomuna ve üç ila sekiz karbon atomuna sahip olan sikloalkilleri, içerir. Monosiklik sikloalkil radikalleri, örneğin, siklopropili, siklobütüli, siklopentili, sikloheksili, sikloheptili ve siklooktili, içerir. Polisiklik radikaller, örneğin, adamantili, norbornili, dekalinili ve 7,7-dimetil-bisiklo[2.2.1]heptanili, içerir. Spesifikasyonda spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, bir sikloalkil grubu opsiyonel olarak sübstüte edilebilir.

"Sikloalkilalkil",  $-R_bR_d$  formülünün bir radikalini ifade eder, burada  $R_b$ , yukarıda tanımlandığı şekilde bir alkilen zinciridir ve  $R_d$ , yukarıda tanımlandığı şekilde bir sikloalkil radikalidir. Spesifikasyonda spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, bir sikloalkilalkil grubu opsiyonel olarak sübstüte edilebilir.

"Sikloalkilkarbonil",  $-C(=O)R_d$  formülünün bir radikalini ifade eder, burada  $R_d$ , yukarıda tanımlandığı şekilde bir sikloalkil radikalidir. Spesifikasyonda spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, bir sikloalkilkarbonil grubu opsiyonel olarak sübstüte edilebilir.

"Sikloalkiloksikarbonil",  $-C(=O)OR_d$  formülünün bir radikalini ifade eder, burada  $R_d$ , yukarıda tanımlandığı şekilde bir sikloalkil radikalidir. Spesifikasyonda spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, bir sikloalkiloksikarbonil grubu opsiyonel olarak sübstüte edilebilir.

"Kaynaştırılmış", bir var olan halka yapısına kaynaştırılmış burada tarif edilen herhangi bir halka yapısını ifade eder. Kaynaştırılmış halka, bir heterosiklik halkasıdır veya bir heteroaril halkasıdır, kaynaştırılmış heterosiklik halkasının veya kaynaştırılmış heteroaril halkasının parçası haline gelen var olan halka yapısı üzerindeki herhangi bir karbon atomu bir nitrojen atomu ile değiştirilebilir.

"Guanidinalkil",  $-R_b-NHC(=NH)NH_2$  formülünün bir radikalini ifade eder, burada  $R_b$ , yukarıda tanımlandığı şekilde bir alkilen radikalidir. Spesifikasyonda spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, bir guanidinalkil grubu, aşağıda tarif edildiği üzere, opsiyonel olarak sübstüte edilebilir.

"Guanidinalkilkarbonil",  $-C(=O)R_b-NHC(=NH)NH_2$  formülünün bir radikalini ifade eder, burada  $R_b$ , yukarıda tanımlandığı şekilde bir alkilen radikalidir. Spesifikasyonda spesifik

olarak aksi ifade edilmedikçe, bir guanidinilalkilkarbonil grubu, aşağıda tarif edildiği üzere, opsiyonel olarak sübstüte edilebilir.

"Halo" veya "halojen, bromoyu, kloroyu, floroyu veya iyodoyu ifade eder.

5

"Haloalkil", yukarıda tanımlandığı şekilde, yukarıda tanımlandığı üzere, bir veya birden fazla halo radikali ile sübstüte edilen bir alkil radikalini, *örneğin*, triflorometili, diflorometili, florometili, triklorometili, 2,2,2-trifloroetili, 1,2-difloroetili, 3-bromo-2-floropropili, 1,2-dibromoetili ve benzerlerini, ifade eder. Spesifikasyonda spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, bir haloalkil grubu opsiyonel olarak sübstüte edilebilir.

10

"Perhalo" veya "perfloro", burada her bir hidrojen atomunun sırasıyla bir halo atomu veya flor atomu ile değiştirilmiş olduğu bir kısmı ifade eder.

15

"Heterosiklil" veya "heterosiklik halka", 2 ila 23 karbon atomu ve nitrojenden, oksijenden, fosfordan ve sülfürden oluşan gruptan seçilen bir ila 8 heteroatom içeren bir kararlı 3- ila 24-üyelik aromatik-olmayan halka radikalini ifade eder. Spesifikasyonda spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, heterosiklil radikali, kaynaştırılmış veya köprülü halka sistemleri içerebilen bir monosiklik, bisiklik, trisiklik veya tetrasiklik halka sistemi olabilir; ve heterosiklil radikali içindeki nitrojen, karbon veya sülfür atomları opsiyonel olarak oksitlenebilir; nitrojen atomu opsiyonel olarak kuaternize edilebilir; ve heterosiklil radikali parsiyel olarak veya tamamen doymuş olabilir. Bu tarz heterosiklil radikallerinin örnekleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, dioksolanil, tiyenil[1,3]ditiyanil, dekahidroizokuinolinil, imidazolinil, imidazolidinil, izotiyazolidinil, izoksazolidinil, morfolinil, oktahidroindolil, oktahidroizoindolil, 2-okso-piperazinil, 2-okso-piperidinil, 2-okso-pirrolidinil, oksazolidinil, piperidinil, piperazinil, 4-piperidonil, pirrolidinil, pirazolidinil, kuinöklidinil, tiyazolidinil, tetrahidrofüril, tritiyanil, tetrahidropiranil, tiyomorfolinil, tiyamorfolinil, 1-okso-tiyomorfolinil, 1,1-diokso-tiyomorfolinil, 12-taç-4, 15-taç-5, 18-taç-6, 21-taç-7, aza-18-taç-6, diaza-18-taç-6, aza-21-taç-7 ve diaza-21-taç-7, içerir. Spesifikasyonda spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, bir heterosiklil grubu opsiyonel olarak sübstüte edilebilir.

20

25

30

35

"Heteroaril", hidrojen atomları, bir ila on üç karbon atomu, nitrojenden, oksijenden, fosfordan ve sülfürden oluşan gruptan seçilen bir ila altı heteroatom ve en az bir aromatik halka içeren bir 5- ila 14-üyelik halka sistemi radikalini ifade eder. Bu buluşun



amaçları için, heteroaril radikali, kaynaştırılmış veya köprülü halka sistemleri içerebilen bir monosiklik, bisiklik, trisiklik veya tetrasiklik halka sistemi olabilir; s ve heteroaril radikali içindeki nitrojen, karbon veya sülfür atomları opsiyonel olarak oksitlenebilir; nitrojen atomu opsiyonel olarak kuaternize edilebilir. Örnekler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, azepinil, akridinil, benzimidazolil, benzotiyazolil, benzindolil, benzodioksolil, benzofüranil, benzoookdazolil, benzotiyazolil, benzotiyadiazolil, benzo[b][1,4]dioksepinil, 1,4-benzodioksanil, benzonaftofüranil, benzoksazolil, benzodioksolil, benzodioksinil, benzopiranil, benzopiranonil, benzofüranil, benzofüranonil, benzotiyenil (benzotiyofenil), benzotriazolil, benzo[4,6]imidazo[1,2-a]piridinil, karbazolil, sinnolinil, dibenzofüranil, dibenzotiyofenil, füranil, füranonil, izotiyazolil, imidazolil, indazolil, indolil, indazolil, izoindolil, indolinil, izoindolinil, izokuinolinil, indolizinil, izoksazolil, naftiridinil, oksadiazolil, 2-oksoazepinil, oksazolil, oksiranil, 1-oksidopiridinil, 1-oksidopirimidinil, 1-oksidopirazinil, 1-oksidopiridazinil, 1-fenil-1H-pirrolil, fenazinil, fenotiyazinil, fenokdazininil, ftalazinil, pteridinil, pürinil, pirrolil, pirazolil, piridinil, pirazinil, pirimidinil, piridazinil, kuinazolinil, kuinoksalinil, kuinolinil, kuinöklidinil, izokuinolinil, tetrahidrokuinolinil, tiyazolil, tiyadiazolil, triazolil, tetrazolil, triazinil ve tiyofenil (*yani*, tiyenil), içerir. Spesifikasyonda spesifik olarak aksi ifade edilmedikçe, bir heteroaril grubu opsiyonel olarak sübstüte edilebilir.

Yukarıdaki tüm gruplar sübstüte edilebilir veya sübstüte edilmeyebilir. Burada kullanıldığı şekliyle, "sübstüte edilmiş" terimi, yukarıdaki grupların herhangi birinin (*yani*, alkil, alkilen, alkoksi, alkoksialkil, alkilkarbonil, alkiloksikarbonil, alkilamino, amidil, amidinilalkil, amidinilalkilkarbonil, aminoalkil, aril, aralkil, arilkarbonil, ariloksikarbonil, aralkilkarbonil, aralkiloksikarbonil, ariloksi, sikloalkil, sikloalkilalkil, sikloalkilkarbonil, sikloalkilalkilkarbonil, sikloalkiloksikarbonil, guanidinilalkil, guanidinilalkilkarbonil, haloalkil, heteroskilil ve/veya heteroaril) ilaveten işlevselleştirilebildiği anlamına gelir, burada en az bir hidrojen atomu bir bağ tarafından bir hidrojen-olmayan atom sübstitüentine değiştirilir. Spesifikasyonda spesifik olarak ifade edilmedikçe, bir sübstüte edilmiş grup, aşağıdakilerden seçilen bir veya birden fazla sübstitüenti içerebilir: okso, -CO<sub>2</sub>H, nitril, nitro, hidroksil, tiyooksi, alkil, alkilen, alkoksi, alkoksialkil, alkilkarbonil, alkiloksikarbonil, aril, aralkil, arilkarbonil, ariloksikarbonil, aralkilkarbonil, aralkiloksikarbonil, ariloksi, sikloalkil, sikloalkilalkil, sikloalkilkarbonil, sikloalkilalkilkarbonil, sikloalkiloksikarbonil, heteroskilil, heteroaril, dialkilaminler, arilaminler, alkilarilaminler, diarilaminler, N-oksitler, imidler ve enaminler; gruplarda, örneğin, trialkilsilil gruplarında, dialkilarilsilil gruplarında, alkildiarilsilil gruplarında,

triarilsilil gruplarında, perfloroalkilde veya perfloroalkokside, örneğin, triflorometilde veya triflorometokside, bir silikon atomu. "Sübstüte edilmiş" ayrıca, burada bir veya birden fazla hidrojen atomunun bir daha yüksek-mertebedeki bağ (örneğin, bir ikili-veya üçlü-bağ) vasıtasıyla bir heteroatoma, örneğin, okso, karbonil, karboksil ve ester gruplarında oksijene ve gruplarda, örneğin, iminlerde, oksimlerde, hidrazonlarda ve nitrillerde, nitrojene, değiştirildiği, yukarıdaki grupların herhangi biri anlamına da gelir. Örneğin, "sübstüte edilmiş", burada bir veya birden fazla hidrojen atomunun -NR<sub>g</sub>C(=O)NR<sub>g</sub>R<sub>h</sub>, -NR<sub>g</sub>C(=O)OR<sub>h</sub>, -NR<sub>g</sub>SO<sub>2</sub>R<sub>h</sub>, -OC(=O)NR<sub>g</sub>R<sub>h</sub>, -OR<sub>g</sub>, -SR<sub>g</sub>, -SOR<sub>g</sub>, -SO<sub>2</sub>R<sub>g</sub>, -OSO<sub>2</sub>R<sub>g</sub>, -SO<sub>2</sub>OR<sub>g</sub>, =NSO<sub>2</sub>R<sub>g</sub> ve -SO<sub>2</sub>NR<sub>g</sub>R<sub>h</sub> ile değiştirildiği, yukarıdaki grupların herhangi birini içerir. "Sübstüte edilmiş" ayrıca, burada bir veya birden fazla hidrojen atomunun -C(=O)R<sub>g</sub>, -C(=O)OR<sub>g</sub>, -CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>R<sub>g</sub>, -CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>NR<sub>g</sub>R<sub>h</sub>, -SH, -SR<sub>g</sub> veya -SSR<sub>g</sub> ile değiştirildiği yukarıdaki grupların herhangi biri anlamına da gelir. Yukarıda, R<sub>g</sub> ve R<sub>h</sub> aynıdır veya farklıdır ve bağımsız bir şekilde, hidrojen, alkil, alkoksit, alkilamin, tiyoalkil, aril, aralkil, sikloalkil, sikloalkilalkil, haloalkil, heterosiklil, N-heterosiklil, heterosiklilalkil, heteroaril, N-heteroaril ve/veya heteroarilalkil. Buna ek olarak, yukarıdaki sübstitüentlerin her biri ayrıca opsiyonel olarak yukarıdaki sübstitüentlerin biri veya birden fazlası ile opsiyonel olarak da sübstüte edilebilir. İlaveten, yukarıdaki grupların herhangi biri, bir veya birden fazla iç oksijen veya sülfür atomu içermesi için sübstüte edilebilir. Örneğin, bir alkil grubu, bir eter veya polieter grubu oluşturmak için bir veya birden fazla iç oksijen atomu ile sübstüte edilebilir. Benzer şekilde, bir alkil grubu, bir tiyoeter, disülfid, vb. oluşturmak için bir veya birden fazla iç sülfür atomu ile sübstüte edilebilir. Amidil kısımları, en fazla 2 halo atomu ile sübstüte edilebilirken, yukarıdaki diğer gruplar bir veya birden fazla halo atomu ile sübstüte edilebilir. Alkil grupları istisnası ile, tüm diğer gruplar ayrıca amino veya monoalkilamino ile de sübstüte edilebilir. Alkil ve alkilkarbonil grupları istisnası ile, tüm diğer gruplar ayrıca guanidinil veya amidinil ile de sübstüte edilebilir. Yukarıdaki grupların herhangi biri için opsiyonel sübstitüentler ayrıca, arilfosforili, örneğin, -RaP(Ar)<sub>3</sub>'ü, de içerir, burada Ra, bir alkildir ve Ar, aril kısmıdır, örneğin, fenil.

30

"Düşük alkil", metil, etil, n-bütül, i-bütül, t-bütül, izoamil, n-pentil ve izopentil ile emsallendirildiği üzere, bir ila altı karbon atomunun bir alkil radikalini ifade eder. Belirli uygulamalarda, bir "düşük alkil" grubu, bir ila dört karbon atomuna sahiptir. Diğer uygulamalarda, bir "düşük alkil" grubu, bir ila iki karbon atomuna sahiptir; yani, metil

veya etil. Benzer şekilde, "düşük alkenil", allil ve bütenil ile emsallendirildiği üzere, iki ila altı, tercihen üç veya dört, karbon atomunun bir alkenil radikalini ifade eder.

5 Bir "araya-girmeyen" sübstitüent, burada tarif edildiği üzere bir antisens oligomerin bunun amaçlanan hedefini bağlama yetisini advers bir şekilde etkilemeyen sübstitüenttir. Bu tarz sübstitüentler, küçük ve/veya görece polar-olmayan grupları, örneğin, metili, etili, metoksiyi, etoksiyi veya floroyu, içerir.

### LMNA Hedefleme

10

Örnekler, aşağıda tartışılan, SEQ ID NO.'ları 1'i ve/veya 2'yi hedef alan antisens oligonükleotidleri içerir.

15

Belirli antisens oligonükleotidler, doğal-suş diziyi (SEQ ID NO: 1) ve/veya SEQ ID NO: 2'de gösterildiği üzere, HGPS hastalarında bulunan diziyi içeren insan LMNA genindeki ekzon 11'in bir veya birden fazla bazına komplementer olan bir hedefleme dizisini içerebilir. Bu hedef diziler, aşağıda Tablo 1'de gösterilir:

**Tablo 1. Emsal LMNA Hedef Dizileri**

ADI	DİZİSİ	SEQ ID NO:
LMNA ekzon 11	GGCTCCCACTGCAGCAGCTCGGGGGACCCCGGTGA GTACAACCTGGGCTCGGGCACCGTGGTGTGCGGGA CCTGGGGCAGCCCGCCGACAAGGCATCTGCCAGC GGCTCAGGAGCCCGGGTGGGCGGACCCATCTCTC TGGCTCTCTCCCTCCAGTCTCACGGTCACTGGCA GCTACCGCAGTGTGGGGGCAGTGGGGGTGGCAGC TTCGGGGACAACTCTGGTCAACCCGCTCCTACCTCCT  GGGCAACTCCAGCCCCCGAACCCAG	1
HGPS ekzon 11	GGCTCCCACTGCAGCAGCTCGGGGGACCCCGGTGA CTACAACCTGGGCTCGGGCACCGTGGTGTGCGGGA CCTGGGGCAGCCCGCCGACAAGGCATCTGCCAGC GGCTCAGGAGCCCGGGTGGGTTGGACCCATCTCTC TGGCTCTCTCCCTCCAGTCTCACGGTCACTGGCA GCTACCGCAGTGTGGGGGCAGTGGGGGTGGCAGC TTCGGGGACAACTCTGGTCAACCCGCTCCTACCTCCT GGGCAACTCCAGCCCCCGAACCCAG	2

Örnekler, Tablo 1'de SEQ ID NO: 1'de ve 2'de altı çizili LMNA ekzon 11'inin kriptik uç-birleştirme yerine (*örneğin*, CAGGTGGGC/T) de komplementer olanları içeren LMNA ekzon 11'ine (SEQ ID NO: 1'e veya 2'ye) tam olarak komplementer olan antisens oligonükleotidleri içerir. Belirli antisens oligonükleotidler, bir hedefleme dizisi içerebilir, burada en 3'-baz, LMNA ekzon 11'i içinde, SEQ ID NO: 1'de veya 2'de altı çizili kriptik uç-birleştirme yerinin aşağı akış 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 veya 30 bazı olan bir baza komplementerdir (*bakınız*, Tablo 1) veya LMNA ekzon 11'i içinde, kriptik uç-birleştirme yerinin yukarı akış 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 veya 40 bazı olan bir baza komplementerdir. Bu tipin emsal oligonükleotidleri aşağıda SEQ ID NO.'ları: 3-16'da listelenenler arasındadır. Belirli antisens oligonükleotidler, bir hedefleme dizisi içerebilir, burada en 3'-baz, LMNA intron 10'u içinde, LMNA ekzon 11'i SEQ ID NO: 1'in veya 2'nin yukarı akış 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 veya 60 bazı olan bir baza komplementerdir (*bakınız*, Tablo 1). Belirli antisens oligonükleotidler, bir hedefleme dizisi içerebilir, burada en 3'-baz, LMNA ekzon 10'u içinde, LMNA intron 10'unun yukarı akış 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 veya 30 bazı olan bir baza komplementerdir. Belirli uygulamalar bu antisens ajanların bir kombinasyonunun kullanımı ile ilgilidir. Spesifik uygulamalar, SEQ ID NO: 1'in ve/veya 2'nin tümünü veya bir kısmını (*örneğin*, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 veya 40 bazını) içeren antisens oligonükleotidleri içerir.

Antisens oligonükleotidler ayrıca, bir ön-işlenmiş LMNA mRNA'sı, *örneğin*, bir ekzon, bir intron, bir ekzon-intron bağlantı-yeri veya bir uç-birleştirme bağlantı-yeri, içinde çeşitli bölgelere karşı yönlendirilebilir veya komplementer de olabilir. *Örneğin*, belirli antisens oligonükleotidler, LMNA pre-MRNA'nın ekzonları 10'un ve 11'in bir uç-birleştirme donörünün (SD) veya uç-birleştirme akseptörünün (SA) uç-birleştirme bağlantı-yeri ile kesişen bir bölgeye (hedef diziye) komplementer olan ve ön-işlenmiş mRNA'nın bir ekzonik bölgenin bir kısmına (*örneğin*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 veya 25 nükleotide) ve bir intronik bölgenin bir kısmına (*örneğin*, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22,

23, 24 veya 25 nükleotide) komplementer olan bir hedefleme dizisi içerebilir. Yukarıdaki tiplerdeki emsal hedefleme dizileri aşağıda SEQ ID NO.'ları: 17-34 olarak listelenir.

- Seçilmiş antisens hedefleme dizileri daha kısa, *örneğin*, yaklaşık 12 bazlık veya daha uzun, *örneğin*, yaklaşık 40 bazlık, yapılabilir ve dizi uç-birleştirmeyi ve/veya hedef ile hibridizasyon üzerine inhibisyonun başka formunu etkilemek için yeterli şekilde komplementer olduğu ve hedef RNA ile 45°C veya daha yüksek olan bir Tm'ye sahip olan bir heterodubleks oluşturduğu sürece, az sayıda yanlış-eşleşme içerebilir.
- 10 Belirli uygulamalarda, hedef ve antisens hedefleme dizisi arasındaki tamamlayıcılığın derecesi, bir kararlı dubleks oluşturmak için yeterlidir. Antisens oligomerlerin hedef RNA dizisi ile tamamlayıcılık bölgesi, 8-11 baz kadar kısa olabilir, ancak tercihen, bu aralıklar arasındaki tüm tam sayılar ve aralıklar dahil olmak üzere, 12-15 bazdır veya daha fazladır, *örneğin*, 12-20 bazdır, 12-25 bazdır veya 15-25 bazdır. Yaklaşık 14-15 bazlık bir antisens oligomer genel olarak, hedef mRNA içinde bir eşsiz komplementer diziye sahip olmak için yeterli uzunluktadır. Belirli uygulamalarda, komplementer bazların bir minimum uzunluğu, aşağıda tartışıldığı üzere, zorunlu bağlama Tm'sini başarmak için gerekli olabilir.
- 20 Belirli uygulamalarda, 40 baz kadar uzun oligomerler uygun olabilir, burada en az bir minimum baz sayısı, *örneğin*, 10-12 baz, hedef diziye komplementerdir. Bununla birlikte, genel olarak, hücrelerdeki kolaylaştırılmış veya aktif alım, yaklaşık 30'dan daha az olan oligomer uzunluklarında optimize edilir. Aşağıda ilaveten tarif edilen, PMO oligomerleri için, bağlama kararlılığının ve alımın bir optimum dengesi genel olarak, 18-30 bazlık uzunluklarda gerçekleşir. Yaklaşık 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 veya 40 bazdan oluşan antisens oligomerler (*örneğin*, PNA'lar, LNA'lar, 2'-OMe, MOE, PMO'lar) dahil edilir, burada en az yaklaşık 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 veya 40 bitişik ve/veya bitişik-olmayan baz, SEQ ID NO.'ları 1'in ve/veya 2'nin hedef dizilerini veya bunların varyantlarını içeren, burada tarif edilen bir hedef diziye komplementerdir.

Belirli uygulamalarda, antisens oligomerler, LMNA pre-mRNA nükleik asit hedef dizisine %100 komplementer olabilir veya bunlar, oligomer ve hedef dizi arasında oluşturulan bir heterodubleks hücresel nükleazların etkisine ve *in vivo* gerçekleşebilen

diğer parçalanma veya yer-değiştirme modlarına karşı koymak için yeterli bir şekilde kararlı olduğu sürece, *örneğin* varyantlara uyum sağlamak için, yanlış-eşleşmeler içerebilir. Nükleazlar tarafından klevaja daha az duyarlı olan oligomer omurgaları aşağıda tartışılır. Mevcut olduğunda, yanlış-eşleşmeler, orta bölgelerine kıyasla hibrit 5 dubleksin uç bölgelerine doğru daha az destabilize olur. Yanlış-eşleşmelerin izin verilen sayısı, dubleks kararlılığının iyi anlaşılması prensiplerine göre, oligomerin uzunluğuna, dubleks içindeki G:C baz çiftlerinin yüzesine ve dubleks içindeki yanlış-eşleşmelerin pozisyonuna bağlı olacaktır. Bu tarz bir antisens oligomerin hedef diziye zorunlu bir şekilde %100 komplementer olmamasına rağmen, bu hedef diziyi kararlı bir şekilde ve 10 spesifik olarak bağlamak için etkilidir, böylece nükleik asit hedefinin bir biyolojik aktivitesi, *örneğin*, progerin proteininin ekspresyonu, modüle edilir.

Bir oligomer ve bir hedef dizi arasında oluşturulan dubleksin kararlılığı, bağlama Tm'sinin ve dubleksin hücrel enzimatik klevaja duyarlılığının bir fonksiyonudur. 15 Komplementer-dizi RNA'sı açısından bir antisens bileşiğinin Tm'si, geleneksel yöntemler, *örneğin*, Hames *et al.*, Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, 1985, pp.107-108, tarafından tarif edilenler ile veya Miyada C.G. ve Wallace R.B., 1987, Oligonucleotide hybridization techniques, *Methods Enzymol.* Vol. 154 pp. 94-107, kaynağında tarif edildiği üzere ölçülebilir. Belirli uygulamalarda, antisens oligomer, bir komplementer- 20 dizi RNA'sı açısından, vücut sıcaklığından daha yüksek olan ve tercihen 50°C'den daha yüksek olan, bir bağlama Tm'sine sahip olabilir. 60-80°C aralığında veya daha yüksek olan Tm'ler tercih edilir. İyi bilinen prensiplere göre, bir komplementer-bazlı RNA hibridi açısından, bir oligomer bileşiğinin Tm'si, dubleks içindeki C:G eşleşmiş bazların oranını artırma ile ve/veya heterodubleksin (baz çiftleri açısından) uzunluğunu 25 artırma ile artırılabilir. Aynı zamanda, hücrel alımı optimize etme amaçları için, oligomerin boyunu sınırlandırmak avantajlı olabilir. Bu amaçla, yüksek Tm değerleri için 25'ten daha fazla baz gerektirenlere kıyasla, 25 veya daha az bazlık bir uzunlukta yüksek Tm (50°C veya yüksek) gösteren bileşikler genel olarak tercih edilir.

30 Belirli uygulamalarda, bu tarz PMO oligomerlerinde, bir oligomerin antisens aktivitesi, Şekil 1C'de emsallendirildiği üzere, yüksüz ve katyonik fosforodiamidat bağlantılarının bir karışımının kullanımı ile güçlendirilebilir. Oligomer içindeki katyonik bağlantıların toplam sayısı, (aralardaki tüm tam sayılar dahil olmak üzere) 1 ila 10 aralığında çeşitlilik gösterebilir ve oligomer boyunca aralıklı konumlandırılabilir. Tercihen, yüklü 35 bağlantıların sayısı, en az 2'dir ve toplam omurga bağlantılarının en fazla yarısıdır,







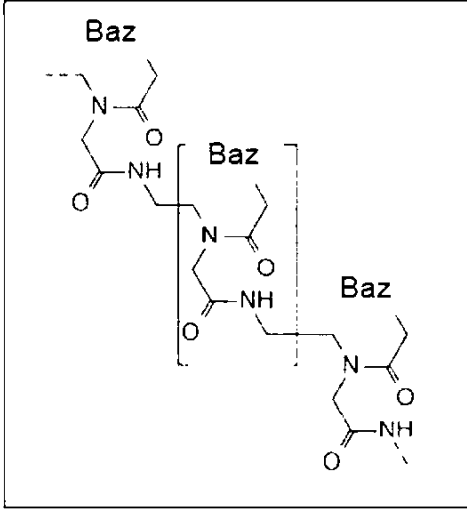
Mevcut buluşun antisens oligonükleotidleri tipik olarak, (a) memeli hücreleri tarafından aktif bir şekilde alınma yetisine sahiptir ve (b) alındığında, yaklaşık 45°C'den daha yüksek olan bir T<sub>m</sub> ile hedef RNA ile bir dubleks oluşturur. Belirli uygulamalarda, oligomer omurgası büyük ölçüde yüksüz olabilir ve tercihen hücre membranını geçerek aktif veya kolaylaştırılmış taşıma için bir substrat olarak tanınabilir. Oligomerin hedef RNA ile bir kararlı dubleks oluşturma yetisi ayrıca, oligomer omurgasının, hedef açısından antisens oligomerin uzunluğunu ve tamamlayıcılık derecesini içeren diğer özellikleri, G:C ile A-T baz eşleşmelerinin oranı ve herhangi bir yanlış-eşleşmiş bazın pozisyonları ile de ilgili olabilir. antisens oligomerin hücresel nükleazlara direnme yetisi, ajanın sağ kalımını ve hücre sitoplazmasına nihai aktarımını destekleyebilir. Burada tarif edilen PMO, PMO+ (*PMOplus*), PMO-X, LNA, PNA'lar ve/veya 2'O-Me-bazlı kimyalardan oluşan antisens oligomerler dahil edilir. Genel olarak, PNA ve LNA kimyaları, PMO ve 2'O-Me oligomerleri ile karşılaştırıldığında, bunların görece yüksek hedef bağlama gücünden dolayı daha kısa hedefleme oligomerlerinden yararlanır.

15

Peptit nükleik asitleri (PNA'lar), burada omurganın, buna pirimidin veya pürin bazlarının tutturulduğu N-(2-aminoetil) glisin birimlerinden oluşan, bir deoksiriboz omurgası ile yapısal olarak homomorf olduğu DNA analoglarıdır. Doğal pirimidin ve pürin bazları içeren PNA'lar, Watson-Crick baz-eşleşme kurallarına uyarak komplementer oligonükleotidlere hibridize olur ve baz çifti tanıma açısından DNA'yı taklit eder (Egholm, Buchardt *et al.*, 1993). PNA'ların omurgası, fosfodiester bağlarından ziyade peptit bağları ile oluşturulur, bu bunları antisens uygulamalar için gayet uygun hale getirir (aşağıdaki yapıya bakınız). Omurga yüksüzdür, bu normale kıyasla daha büyük termal kararlılık gösteren PNA/DNA veya PNA/RNA dubleksleri ile sonuçlanır. PNA'lar nükleazlar veya proteazlar tarafından tanınmaz.

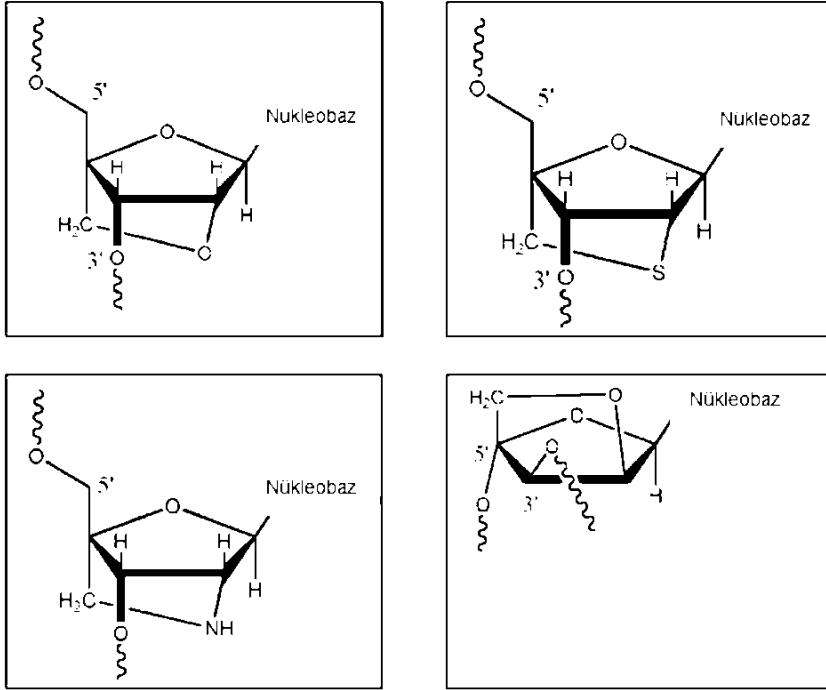
25

PNA'lar, teknikte bilinen herhangi bir teknik kullanılarak sentetik olarak üretilir. PNA, burada bir poliamid omurgasının aşağıda gösterildiği üzere DNA'nın geleneksel fosfat riboz halkasının yerini aldığı bir DNA analogudur.



Doğal RNA veya DNA yapısına bir radikal yapısal değişime rağmen, PNA bir heliks form içinde DNA'yı veya RNA'yı dizi-spesifik bağlayabilir. PNA'nın karakteristikleri, komplementer DNA'ya veya RNA'ya bir yüksek bağlama afinitesini, tek-baz yanlış eşleşmesinden kaynaklanan bir stabilize etme etkisini, nükleazlara ve proteazlara direnci, tuz konsantrasyonundan bağımsız olarak DNA veya RNA ile hibridizasyonu ve homo-pürin DNA ile tripleks oluşumunu içerir. Panagene™, bunun tescilli Bts PNA monomerlerini (Bts; benzotiyazol-2-sülfonil grubu) ve tescilli oligomerizasyon prosesini geliştirmiştir. Bts PNA monomerleri kullanılan PNA oligomerizasyonu, tekrarlı koruyucu grubun uzaklaştırılması, kuplaj ve başlıklandırma sikluslarından oluşturulur. Bu teknolojiye Panagene'nin patentleri, US 6969766, US 7211668, US 7022851, US 7125994, US 7145006 ve US 7179896'yi içerir. PNA bileşiklerinin preparasyonunu öğreten temsili Amerika Birleşik Devletleri patentleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, U.S. Pat. No. 5,539,082; 5,714,331; ve 5,719,262'yi içerir. PNA bileşiklerinin ilave öğretisi, Nielsen *et al.*, Science, 1991, 254, 1497, kaynağında bulunabilir.

Oligonükleotid bileşikleri ayrıca, "kilitli nükleik asi" alt-birimleri (LNA'lar) da içerebilir. LNA'ların yapıları teknikte bilinir: örneğin, Wengel *et al.*, Chemical Communications (1998) 455; Tetrahedron (1998) 54, 3607 ve Accounts of Chem. Research (1999) 32, 301; Obika *et al.*, Tetrahedron Letters (1997) 38, 8735; (1998) 39, 5401 ve Bioorganic Medicinal Chemistry (2008)16, 9230. Emsal, sınırlayıcı-olmayan LNA yapıları aşağıda gösterilir:



Buluşun bileşikleri, bir veya birden fazla LNA katabilir. Münferit LNA nükleosid alt-birimlerinin sentezi ve bunların oligonükleotidlere katılması için yöntemler teknikte bilinir: U.S. Patentleri 7,572,582; 7,569,575; 7,084,125; 7,060,809; 7,053,207; 7,034,133; 6,794,499; ve 6,670,461. Tipik alt-birim-arası bağlantılar, fosfodiester ve fosfortiyoat kısımlarını içerir; alternatif olarak, fosfor-içermeyen bağlantılar kullanılabilir. Bir tercih edilen uygulama, bir LNA içeren bileşiktir, burada her bir LNA alt-birimi bir DNA alt-birimi (yani, bir deoksiriboz nükleotidi) ile ayrılır. İlâveten tercih edilen bileşikler, değişen LNA ve DNA alt-birimlerinden oluşturulur, burada alt-birim-arası bağlantı fosfortiyoattır.

Bir tercih edilen oligomer yapısı, yukarıda tarif edildiği üzere, yüksüz bağlantılar ile birleştirilen, baz-eşleşme kısımları taşıyan morfolino-bazlı alt-birimleri kullanır. Bir büyük ölçüde yüksüz fosfordiamidat-bağlı morfolino oligomeri (PMO) özellikle tercih edilir. Antisens oligomerleri içeren morfolino oligonükleotidleri, örneğin, müşterek U.S. Patent No. 5,698,685, 5,217,866, 5,142,047, 5,034,506, 5,166,315, 5,185, 444, 5,521,063 ve 5,506,337 ve PCT başvuru No. US08/088339'da detaylandırılır.

Morfolino-bazlı alt-birimlerin belirli özellikleri aşağıdakileri içerir: kararlı, yüksüz omurga bağlantıları ile bir oligomerik formda bağlanma yetisi; bir nükleotid bazını (örneğin, adenini, sitozini, guanini veya urasili) destekleme yetisi, böylece oluşturulan polimer

hedef RNA'yı içeren bir komplementer-bazlı hedef nükleik asit ile, yüksek  $T_m$  ile, hatta 10-14 bazlık kadar kısa oligomerler ile, hibridize olabilir; oligomerin memeli hücrelerine aktif bir şekilde taşınma yetisi ve oligomer:RNA heterodubleksinin RNaz parçalamasına direnme yetisi.

5

Morfolino-bazlı alt-birimlerin özellikleri aşağıdakileri içerir: 1) kararlı, yüksüz veya pozitif yüklü omurga bağlantıları ile bir oligomerik formda bağlanma yetisi; 2) bir nükleotid bazını (*örneğin*, adenini, sitozini, guanini, timidini, urasili ve hipoksantini) destekleme yetisi, böylece oluşturulan polimer hedef RNA'yı içeren, bir komplementer-bazlı hedef nükleik asit ile, görece kısa (*örneğin*, 10-15 bazlık) oligonükleotidlerde yaklaşık 45°C'nin üstünde  $T_m$  değerleri ile, hibridize olabilir; 3) oligonükleotidin memeli hücrelerine aktif veya pasif bir şekilde taşınma yetisi; ve 4) antisens oligonükleotid:RNA heterodubleksinin sırasıyla RNaz ve RNazH parçalamasına direnme yetisi.

10

15

Fosfor-içeren omurga bağlantılarına sahip olan morfolino oligonükleotidlerinin örnekleri Şekiller 1A-1C'de gösterilir. Mevcut buluşun bir yönüne uygun şekilde, bunun omurga bağlantılarının tercihen %10-%50'sinde pozitif yüklü gruplar içermesi için modifiye edilen bir tercih edilen fosfordiamidat-bağlı morfolino oligonükleotidi Şekil 1C'de gösterilir. Her biri bir yüksüz veya pozitif yüklü, fosfor-içeren alt-birim bağlantısı ile bağlanmış, talep edilen söz konusu antisens oligonükleotidler için emsal omurga yapıları Şekiller 1A-1C'de gösterilen morfolino alt-birim tiplerini içerir. Şekil 1D, beş atomlu tekrarlama-birimi omurgasını oluşturan bir fosfor-içeren bağlantıyı gösterir, burada morfolino halkaları, bir 1-atomlu fosfoamid bağlantısı ile bağlanır. Şekil 1E, bir 6-atomlu tekrarlama-birimi omurgasını üreten bir bağlantıyı gösterir. Bu yapıda, 5' morfolino karbonunu fosfor grubuna bağlayan Y atomu, sülfür, nitrojen, karbon veya tercihen oksijen olabilir. Fosfordan asılan X kısmı, flor, bir alkil veya sübstüte edilmiş alkil, bir alkoksi veya sübstüte edilmiş alkoksi, bir tiyoalkoksi veya sübstüte edilmiş tiyoalkoksi veya siklik yapıları, *örneğin*, morfolinleri veya piperidinleri, içeren, sübstüte edilmemiş, mono-sübstüte edilmiş veya di-sübstüte edilmiş nitrojen olabilir. Alkil, alkoksi ve tiyoalkoksi tercihen, 1-6 karbon atomu içerir. Z kısımları, sülfürdür veya oksijendir ve tercihen oksijendir.

20

25

30

35

Şekiller 1F'de ve 1G'de gösterilen bağlantılar, 7-atomlu birim-uzunluktaki omurgalar için gösterilir. Şekil 1F'de, X kısmı, Şekil 1E'de olduğu şekildedir ve Y kısmı, metilen, sülfür veya tercihen, oksijen olabilir. Şekil 1G'de, X ve Y kısımları, Şekil 1E'de olduğu

şekildedir. Özel olarak tercih edilen morfolino oligonükleotidleri, Şekil 1E'de gösterilen formdaki morfolino alt-birim yapılarından oluşanları içerir, burada  $X=NH_2$ 'dir,  $N(CH_3)_2$ 'dir veya 1-piperazindir veya başka yüklü gruptur,  $Y=O$ 'dur ve  $Z=O$ 'dur.

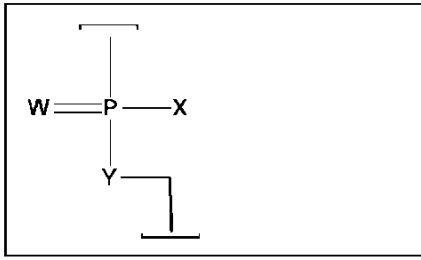
- 5 Yukarıda bildirildiği üzere, büyük ölçüde yüksüz oligonükleotid, yüklü bağlantılar, *örneğin*, her bir 2-5 yüksüz bağlantı için en fazla yaklaşık 1, *örneğin*, her bir 10 yüksüz bağlantı için yaklaşık 4-5, içermesi için buluşun bir yönüne uygun şekilde modifiye edilebilir. Belirli uygulamalarda, antisens aktivitesindeki optimal iyileştirme, omurga bağlantılarının yaklaşık %25'i katyonik oluşunda görülebilir. Belirli uygulamalarda, 10 güçlendirme, küçük bir sayıda, *örneğin*, %10-20, katyonik bağlantı ile veya burada katyonik bağlantıların sayısı %50-80 aralığında, *örneğin*, yaklaşık %60, olduğunda görülebilir. Eklenmiş katyonik omurga yükleri ile görülen güçlendirme, bazı durumlarda, *örneğin*, bu yüklü bağlantıların en az %70'inin en-merkezdeki 10 bağlantı içinde lokalize olduğu, 8 katyonik omurga bağlantısı içeren bir 20-mer oligonükleotid içinde, 15 antisens oligonükleotidin "merkez-bölgesi" omurga bağlantılarının yakınındaki yüklerin yığınının dağıtma ile ilaveten güçlendirilebilir.

- Buluşun antisens bileşikleri, yukarıda alıntı yapılan referanslarda veya aşağıda yüksüz ve katyonik omurga bağlantılarının bir karışımına sahip olan oligonükleotidlerin sentezi 20 açısından detaylandırılan yöntemler kullanılarak, adım-adım katı-faz sentezi ile hazırlanabilir. Bazı durumlarda, *örneğin*, bileşiğin farmakokinetiklerini güçlendirmek için veya yakalanmasını veya saptanmasını kolaylaştırmak için, antisens bileşiğe ilave kimyasal kısımlar eklemek arzu edilebilir. Bu tarz bir kısım, standart sentetik yöntemlere göre, tipik olarak oligomerin bir ucuna, kovalent olarak tutturulabilir. 25 *Örneğin*, bir polietilenglikol kısmının veya başka hidrofilik polimerin, *örneğin*, 10-100 monomerik alt-birime sahip olan birinin, eklenmesi çözünürlüğü arttırmada yararlı olabilir. Bir veya birden fazla yüklü grup, *örneğin*, anyonik yüklü grup, *örneğin*, bir organik asit, hücre alımını arttırabilir.

- 30 Bir raportör kısım, *örneğin*, floresein veya bir radyoaktif olarak etiketlenmiş grup, saptama amaçları için tutturulabilir. Alternatif olarak, oligomere tutturulmuş olan raportör etiket, bir etiketlenmiş antikoru veya streptavidini, bağlayabilen bir ligand, *örneğin*, bir antijen veya biyotin olabilir. Bir antisens bileşiğin tutturulması veya modifikasyonu için bir kısmı seçmede, genel olarak elbette biyo-uyumlu olan ve büyük

olasılıkla, istenmeyen yan etkiler olmadan, bir süje tarafından tolere edilecek olan kimyasal bileşiklerin gruplarını seçmek arzu edilir.

5 Yukarıda bildirildiği üzere, antisens bileşiklerin bazıları, aralarına yukarıda tarif edilen tipteki yüksüz bağlantılar konumlandırılmış seçilmiş bir sayıda katyonik bağlantılar içermesi için yapılabilir. Hem yüksüz hem de katyonik, alt-birim-arası bağlantılar tercihen, aşağıdaki yapıya sahip olan, fosfor-içeren bağlantılardır:



10

burada:

W, S'dir veya O'dur ve tercihen O'dur,

X = NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>'dir veya OR<sup>6</sup>'dir,

Y = O'dur veya NR<sup>7</sup>'dir,

15

ve oligomer içindeki söz konusu her bir bağlantı aşağıdakilerden seçilir:

(a) yüksüz bağlantı (a), burada R<sup>1</sup>'in, R<sup>2</sup>'nin, R<sup>6</sup>'nın ve R<sup>7</sup>'nin her biri bağımsız bir şekilde hidrojen ve düşük alkil arasından seçilir;

20

(b1) katyonik bağlantı (b1), burada X = NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>'dir ve Y= O'dur ve NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>, bir opsiyonel sübstitüe edilmiş piperazino grubunu temsil eder, böylece R<sup>1</sup>R<sup>2</sup> = -CHRCHR(N(R<sup>3</sup>))(R<sup>4</sup>)CHRCHR-'dir, burada

her bir R, bağımsız bir şekilde H'dir veya CH<sub>3</sub>'tür,

R<sup>4</sup>, H'dir, CH<sub>3</sub>'tür veya bir elektron çiftidir ve

R<sup>3</sup>, H, düşük alkil, *örneğin*, CH<sub>3</sub>, C(=NH)NH<sub>2</sub>, Z-L-NHC(=NH)NH<sub>2</sub> ve

25

[C(O)CHR'NH]<sub>m</sub>H arasından seçilir, burada: Z, C(O)'dur veya bir doğrudan bağdır, L, alkil, alkoksi ve alkilamino arasından seçilen bağlara sahip olan en fazla 18 atom, tercihen en fazla 12 atom ve daha tercihen en fazla 8 atom uzunluğundaki bir opsiyonel bağlayıcıdır, R', bir doğal oluşumlu amino asidin bir yan zinciridir veya bunun bir- veya iki-karbonlu homologudur ve m, 1 ila 6 aralığındadır, tercihen 1 ila 4 aralığındadır;

30

(b2) katyonik bağlantı (b2), burada  $X = NR^1R^2$ 'dir ve  $Y = O$ 'dur,  $R^1 = H$ 'dir veya  $CH_3$ 'tür ve  $R^2 = LNR^3R^4R^5$ 'tir, burada L,  $R^3$  ve  $R^4$ , yukarıda olduğu şekilde tanımlanır ve  $R^5$ , H'dir, düşük alkildir veya düşük (alkoksi)alkildir; ve

5 (b3) katyonik bağlantı (b3), burada  $Y = NR^7$ 'dir ve  $X = OR^6$ 'dir ve  $R^7 = LNR^3R^4R^5$ 'tir, burada L,  $R^3$ ,  $R^4$  ve  $R^5$ , yukarıda olduğu şekilde tanımlanır ve  $R^6$ , H'dir veya düşük alkildir;

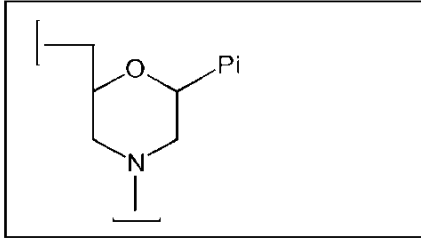
10 ve en az bir söz konusu bağlantı, katyonik bağlantılar (b1), (b2) ve (b3) arasından seçilir.

Belirli uygulamalarda, bir oligomer ardışık en az iki (a) tipi bağlantı (*yani*, yüksüz bağlantı) içerebilir. İlave uygulamalarda, oligomer içindeki bağlantıların en az %5'i, katyonik bağlantılardır (*yani*, tip (b1), (b2) veya (b3)); örneğin, bağlantıların %10 ila 15 %60'ı ve tercihen %20-50'si, katyonik bağlantılar olabilir.

Bir uygulamada, en az bir bağlantı, (b1) tipidir, burada, tercihen, her bir R, H'dir,  $R^4$ , H'dir,  $CH_3$ 'tür veya bir elektron çiftidir ve  $R^3$ , H, düşük alkil, *örneğin*,  $CH_3$ ,  $C(=NH)NH_2$  ve  $C(O)-L-NHC(=NH)NH_2$  arasından seçilir.  $R^3$ 'ün son iki uygulaması sırasıyla, 20 pepirazin halkasına doğrudan tutturulmuş veya bir bağlayıcı grup L'ye asılı bir guanidino kısmı sağlar. Sentez kolaylığı için, gösterildiği üzere,  $R^3$  içindeki Z değişkeni, tercihen C(O)'dur (karbonil).

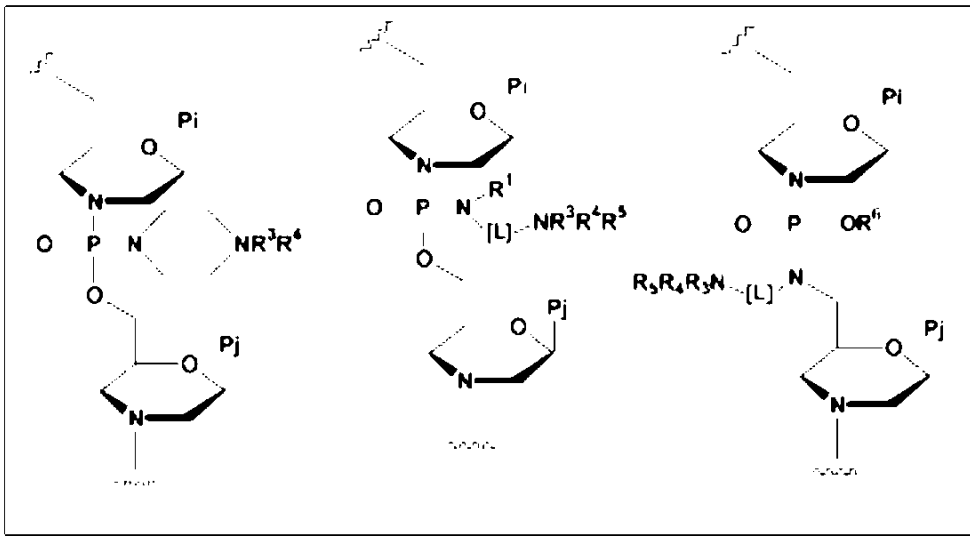
Yukarıda bildirildiği üzere, bağlayıcı grup L, L içindeki uç atomların (*örneğin*, karbonile 25 veya nitrojene bitişik olanların) karbon atomları olası kaydıyla, bunun omurgası içinde alkil (*örneğin*,  $-CH_2-CH_2-$ ), alkoksi ( $-C-O-$ ) ve alkilamino (*örneğin*,  $-CH_2-NH-$ ) arasından seçilen bağlar içerir. Dallanmış bağlantıların (*örneğin*,  $-CH_2-CHCH_3-$ ) mümkün olmasına rağmen, bağlayıcı tercihen dallanmamıştır. Bir uygulamada, bağlayıcı, bir hidrokarbon bağlayıcıdır. Bu tarz bir bağlayıcı,  $-(CH_2)_n-$  yapısına sahip olabilir, burada 30 n, 1-12 aralığındadır, tercihen 2-8 aralığındadır ve daha tercihen 2-6 aralığındadır.

Morfolino alt-birimleri aşağıdaki yapıya sahip olabilir:



(i)

burada Pi, bir baz-eşleşme kısmıdır ve yukarıda gösterilen bağlantılar, (i)'nin nitrojen atomunu bir bitişik alt-birimin 5' karbonuna bağlar. Baz-eşleşme kısımları Pi, aynı veya farklı olabilir ve genel olarak, bir hedef nükleik asidi bağlayan bir dizi sağlamak için tasarlanır. Morfolino alt-birimlerini bağlamak için yukarıdaki (b1), (b2) ve (b3) tipi bağlantıların uygulamalarının kullanımı aşağıda olduğu şekilde grafiksel olarak gösterilebilir:



(b1)

(b2)

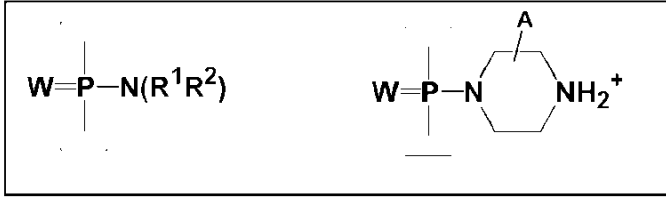
(b3)

Tercihen, oligomer içindeki tüm katyonik bağlantılar, aynı tiptedir; *yani*, tümü (b1) tipidir, tümü (2) tipidir veya tümü (b3) tipidir.

15

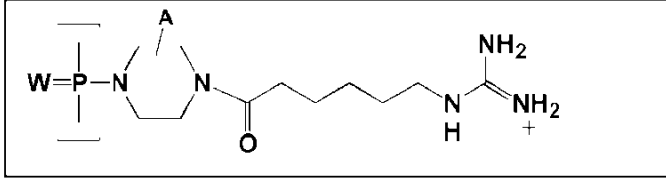
İlave uygulamalarda, katyonik bağlantılar, aşağıda gösterildiği üzere, (b1') ve (b1'') bağlantıları arasından seçilir, burada (b1') burada, bir "Pip" bağlantısını ifade eder ve (b1'') burada, bir "GuX" bağlantısını ifade eder:





(a)

(b1')



(b1'')

- 5 Yukarıdaki yapılarda, W, S'dir veya O'dur ve tercihen O'dur; R<sup>1</sup>'in ve R<sup>2</sup>'nin her biri bağımsız bir şekilde, hidrojen ve düşük alkil arasından seçilir ve tercihen metildir; ve A, hidrojeni veya (b1') ve (b1'') içindeki bir veya birden fazla karbon atomu üzerinde bir araya-girmeyen sübstüenti temsil eder. Tercihen, piperazin halkası içindeki halka karbonları sübstüte edilmemiştir; bununla birlikte, bunlar, araya-girmeyen
- 10 sübstüentler, örneğin, metil veya flor, içerebilir. Tercihen, en fazla bir veya iki karbon atomu bu şekilde sübstüte edilir. İlave uygulamalarda, bağlantıların en az %10'u, (b1') veya (b1'') tipidir; örneğin, bağlantıların %10-%60'ı ve tercihen %20 ila %50'si, (b1') veya (b1'') tipi olabilir.
- 15 Belirli uygulamalarda, oligomer yukarıdaki (b1') tipi bağlantıları içermez. Alternatif olarak, oligomer (b1) tipi bağlantıları içermez, burada her bir R, H'dir, R<sup>3</sup>, H'dir veya CH<sub>3</sub>'tür ve R<sup>4</sup>, H'dir, CH<sub>3</sub>'tür veya bir elektron çiftidir.

- 20 Morfolino alt-birimleri ayrıca, aşağıda ilaveten tarif edildiği üzere, fosfor-olmayan-bazlı alt-birim-arası bağlantılar ile de bağlanabilir, burada en az bir bağlantı, yukarıda tarif edildiği üzere, bir asılı katyonik grup ile modifiye edilir.

- Bunların modifiye edilmemiş halinde yüksüz olan, ancak ayrıca bir asılı amin sübstüenti de taşıyabilen başka oligonükleotid analogu bağlantılar kullanılabilir.
- 25 Örneğin, bir morfolino halkası üzerinde bir 5' nitrojen atomu, bir sülfamid bağlantısında veya bir üre bağlantısında kullanılabilir (burada fosfor sırasıyla karbon veya sülfür ile

değiştirilir) ve yukarıdaki (b3) yapısındaki 5'-nitrojen atomuna benzer bir şekilde modifiye edilebilir.

5 Tam olarak katyonik-bağlanmış oligomerleri içeren, herhangi bir sayıda katyonik bağlantıya sahip olan oligomerler sağlanır. Bununla birlikte, tercihen, oligomerler, örneğin, %10-%80'i, parsiyel olarak yüklenir. Tercih edilen uygulamalarda, bağlantıların yaklaşık %10 ila %60'ı ve tercihen %20 ila %50'si katyoniktir.

10 Bir uygulamada, katyonik bağlantılar omurga boyunca aralıklı konumlandırılır. Parsiyel olarak yüklü oligomerler tercihen, ardışık en az iki yüksüz bağlantı içerir; yani, oligomer tercihen, bunun tüm uzunluğu boyunca bir katı bir şekilde dönüşümlü (alternatif) paterne sahip değildir.

15 Katyonik bağlantıların bloklarına ve yüksüz bağlantıların bloklarına sahip olan oligomerler de düşünülür; örneğin, yüksüz bağlantıların bir merkezi blokunun iki yanında, katyonik bağlantıların blokları yer alabilir veya tam tersi. Bir uygulamada, oligomer yaklaşık olarak eşit-uzunlukta 5', 3' ve merkez bölgelerine sahiptir ve merkez bölgesindeki katyonik bağlantıların yüzdesi, yaklaşık %50'den büyüktür, tercihen yaklaşık %70'ten büyüktür.

20 Antisens uygulamalarında kullanım için oligomerler genel olarak, yaklaşık 10 ila yaklaşık 40 alt-birim, daha tercihen yaklaşık 10 ila 30 alt-birim ve tipik olarak 15-25 baz, uzunluğu aralığındadır. Örneğin, buluşun 19-20 alt-birime, bir antisens bileşik için kullanışlı bir uzunluk, sahip olan bir oligomeri ideal olarak iki ila on, *örneğin*, dört ila 25 sekiz, katyonik bağlantıya sahip olabilir ve geri kalanlar yüksüz bağlantılardır. 14-15 alt-birime sahip olan bir oligomer ideal olarak, iki ila yedi, *örneğin*, 3,4 veya 5, katyonik bağlantıya sahip olabilir ve geri kalanlar yüksüz bağlantılardır.

30 Her bir morfolino halka yapısı, tedavi edilmekte olan bir hücrede veya bir süjude bir seçilmiş antisens hedefe hibridize olması için tipik olarak tasarlanan baz eşleşme kısımlarının bir dizisini oluşturmak için, bir baz eşleşme kısmını destekler. Baz eşleşme kısmı, natif DNA veya RNA içinde bulunan bir pürin veya pirimidin (*örneğin*, A, G, C, T veya U) veya bir analog, örneğin, hipoksantin (nükleosid inosinin baz bileşeni) veya 5-metil sitozin olabilir.

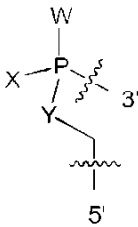
35

Yukarıda bildirildiği üzere, belirli uygulamalar, PMO-X oligomerlerini ve modifiye edilmiş uç gruplara sahip olanları içeren, yeni alt-birim-arası bağlantılar içeren oligomere yöneliktir. Bazı uygulamalarda, bu oligomerler, karşılık gelen modifiye edilmemiş oligomere olana kıyasla DNA ve RNA için daha yüksek afiniteye sahiptir ve başka alt-birim-arası bağlantılara sahip olan oligomerler ile karşılaştırıldığında iyileştirilmiş hücre aktarımı, potens ve/veya doku dağılımı özellikleri gösterir. Bir uygulamada, oligomerler, burada tanımlandığı şekilde en az bir (B) tipi alt-birim-arası bağlantı içerir. Oligomerler ayrıca, burada tanımlandığı üzere bir veya birden fazla (A) tipi alt-birim-arası bağlantı da içerebilir. Çeşitli bağlantı tiplerinin ve oligomerlerin yapısal nitelikleri ve özellikleri, aşağıdaki tartışmada daha detaylı bir şekilde tarif edilir. Bu ve ilgili oligomerlerin sentezi, bütünüyle referans olarak eklenmiş olan, müşterek U.S. Başvuru No. 13/118,298'de tarif edilir.

### **(A) Bağlantısı**

15

Başvuru sahipleri, antisens aktivitesinin, biyo-dağılımın ve/veya diğer arzu edilebilir özelliklerin güçlendirilmesinin çeşitli alt-birim-arası bağlantılara sahip olan oligomerler hazırlama ile optimize edilebileceğini bulmuştur. Örneğin, oligomerler opsiyonel olarak (A) tipi bir veya birden fazla alt-birim-arası bağlantı içerebilir ve belirli uygulamalarda, oligomerler (A) tipi en az bir bağlantı içerir. Bazı diğer uygulamalarda, (A) tipi her bir bağlantı aynı yapıya sahiptir. (A) tipi bağlantılar, burada bütünüyle referans olarak eklenmiş olan, müşterek U.S. Patent No. 7,943,762'de açıklanan bağlantıları içerebilir. (A) bağlantısı aşağıdaki yapıya (I) veya bunun bir tuzuna veya izomerine sahiptir, burada 3' ve 5', morfolino halkasının (yani, aşağıda tartışılan yapı (i)), sırasıyla, 3' ve 5' uçlarına tutturulma noktasını gösterir:



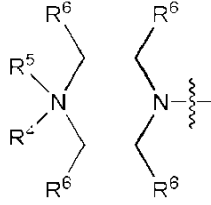
I

burada:

30

W, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde S'dir veya O'dur;

X, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde  $-N(CH_3)_2$ 'dir,  $-NR^1R^2$ 'dir,  $-OR^3$ 'tür veya;



(II)

5

Y, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde O'dur veya  $-NR^2$ 'dir,

$R^1$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir veya metildir;

$R^2$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir veya  $-LNR^4R^5R^7$ 'dir;

$R^3$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir veya  $C_1-C_6$  alkildir;

10

$R^4$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir,  $C_1-C_6$  alkildir,  $-C(=NH)NH_2$ ,  $-Z-L-NHC(=NH)NH_2$  veya  $-[C(O)CHR'NH]_mH$ 'dir, burada Z,  $-C(=O)$  veya bir doğrudan bağdır, R', bir doğal oluşumlu amino asidin bir yan zinciridir veya bunun bir- veya iki-karbonlu homologudur ve m, 1 ila 6 aralığındadır;

$R^5$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir, metildir veya bir elektron çiftidir;

15

$R^6$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir veya metildir;

$R^7$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir  $C_1-C_6$  alkildir veya  $C_1-C_6$  alkoksialkildir; ve

L, alkil, alkoksi veya alkilamino gruplarını veya bunların kombinasyonlarını içeren en fazla 18 atom uzunluğundaki bir opsiyonel bağlayıcıdır.

20

Bazı örneklerde, oligomer, (A) tipi en az bir bağlantı içerir. Bazı diğer uygulamalarda, oligomer (A) tipi en az iki ardışık bağlantı içerir. İlave uygulamalarda, oligomer içindeki bağlantıların en az %5'i, (A) tipidir; örneğin, bazı uygulamalarda, bağlantıların %5-  
25 %95'i, %10 ila %90'ı, %10 ila %50'si veya %10 ila %35'i (A) tipi bağlantı olabilir. Diğer spesifik uygulamalarda, en az bir (A) tipi bağlantı,  $-N(CH_3)_2$ 'dir. Diğer uygulamalarda, (A) tipi her bir bağlantı,  $-N(CH_3)_2$ 'dir. Diğer uygulamalarda, en az bir (A) tipi bağlantı, piperizin-1-ildir, örneğin, sübstüte edilmemiş piperazin-1-ildir (örneğin, A2 veya A3). Diğer uygulamalarda, en az bir (A) tipi bağlantı, piperizin-1-ildir, örneğin, sübstüte  
30 edilmemiş piperazin-1-ildir.

Bazı uygulamalarda, W, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde S'dir veya O'dur ve belirli uygulamalarda, W, O'dur.

5 Bazı uygulamalarda, X, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde  $-N(CH_3)_2$ 'dir,  $-NR^1R^2$ 'dir,  $-OR^3$ 'tür. Bazı uygulamalarda, X,  $-N(CH_3)_2$ 'dir. Diğer yönlerinde, X,  $-NR^1R^2$ 'dir ve diğer örneklerde, X,  $-OR^3$ 'tür.

10 Bazı uygulamalarda,  $R^1$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir veya metildir. Bazı uygulamalarda,  $R^1$ , hidrojenidir. Diğer uygulamalarda, X, metildir.

15 Bazı uygulamalarda,  $R^2$ , her bir bulunuşunda, hidrojenidir. Diğer uygulamalarda,  $R^2$ , her bir bulunuşunda,  $-LNR^4R^5R^7$ 'dir. Bazı uygulamalarda,  $R^3$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir veya  $C_1$ - $C_6$  alkildir. Diğer uygulamalarda,  $R^3$ , metildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^3$ , etildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^3$ , n-propildir veya izopropildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^3$ ,  $C_4$  alkildir. Diğer uygulamalarda,  $R^3$ ,  $C_5$  alkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^3$ ,  $C_6$  alkildir.

20 Belirli uygulamalarda,  $R^4$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir. Diğer uygulamalarda,  $R^4$ , metildir veya etildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^4$ ,  $-C(=NH)NH_2$ 'dir ve diğer uygulamalarda,  $R^4$ ,  $-Z-L-NHC(=NH)NH_2$ 'dir. Daha da başka uygulamalarda,  $R^4$ ,  $-[C(=O)CHR^1NH]_mH$ 'dir. Bir uygulamada, Z,  $-C(=O)$ 'dur ve bir başka uygulamada, Z, bir doğrudan bağıdır.  $R^1$ , bir doğal oluşumlu amino asidin bir yan zinciridir. Bazı uygulamalarda,  $R^1$ , bir doğal oluşumlu amino asidin bir yan zincirinin bir-veya iki-karbonlu homologudur.

25 m, 1 ila 6 aralığındaki bir tam sayıdır. m, 1 olabilir, m, 2 olabilir, m, 3 olabilir, m, 4 olabilir, m, 5 olabilir, m, 6 olabilir.

30 Bazı uygulamalarda,  $R^5$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir, metildir veya bir elektron çiftidir. Bazı uygulamalarda,  $R^5$ , hidrojenidir. Diğer uygulamalarda,  $R^5$ , metildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^5$ , bir elektron çiftidir.

Bazı uygulamalarda,  $R^6$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir veya metildir. Bazı uygulamalarda,  $R^6$ , hidrojenidir. Diğer uygulamalarda,  $R^6$ , metildir.

Diğer uygulamalarda,  $R^7$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir,  $C_1-C_6$  alkildir veya  $C_2-C_6$  alkoksialkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^7$ , hidrojenidir. Diğer uygulamalarda,  $R^7$ ,  $C_1-C_6$  alkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^7$ ,  $C_2-C_6$  alkoksialkildir.

5 Bazı uygulamalarda,  $R^7$ , metildir. Diğer uygulamalarda,  $R^7$ , etildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^7$ , n-propildir veya izopropildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^7$ ,  $C_4$  alkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^7$ ,  $C_5$  alkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^7$ ,  $C_6$  alkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^7$ ,  $C_2$  alkoksialkildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^7$ ,  $C_3$  alkoksialkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^7$ ,  $C_4$  alkoksialkildir. Bazı uygulamalarda,

10  $R^7$ ,  $C_5$  alkoksialkildir. Diğer uygulamalarda,  $R^7$ ,  $C_6$  alkoksialkildir.

Yukarıda bildirildiği üzere, bağlayıcı grup L bunun omurgasında, L içindeki uç atomların (örneğin, karbonile veya nitrojene bitişik olanların) karbon atomları olması kaydıyla, alkil (örneğin,  $-CH_2-CH_2-$ ), alkoksi (örneğin,  $-C-O-C-$ ) ve alkilamino (örneğin,  $-CH_2-NH-$ )

15 ) arasından seçilen bağlar içerir. Dallanmış bağlantıların (örneğin,  $-CH_2-CHCH_3-$ ) mümkün olmasına rağmen, bağlayıcı, genel olarak, dallanmamıştır. Bir uygulamada, bağlayıcı, bir hidrokarbon bağlayıcıdır. Bu tarz bir bağlayıcı,  $(CH_2)_n-$  yapısına sahip olabilir, burada n, 1-12 aralığındadır, tercihen 2-8 aralığındadır ve daha tercihen 2-6 aralığındadır.

20

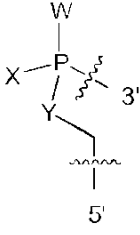
Herhangi bir sayıda (A) tipi bağlantıya sahip olan oligomerler sağlanır. Bazı uygulamalarda, oligomer, (A) tipi bağlantı içermez. Belirli uygulamalarda, bağlantıların yüzde 5'i, 10'u, 20'si, 30'u, 40'ı, 50'si, 60'ı, 70'i, 80'i veya 90'ı, (A) tipi bağlantıdır. Seçilmiş uygulamalarda, bağlantıların yüzde 10 ila 80'i, 20 ila 80'i, 20 ila 60'ı, 20 ila

25 50'si, 20 ila 40'ı veya 20 ila 35'i, (A) tipi bağlantıdır.

### **(B) Bağlantısı**

Bazı uygulamalarda, oligomerler, (B) tipi en az bir bağlantı içerir. Örneğin, oligomerler,

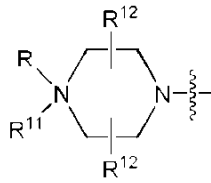
30 1, 2, 3, 4, 5, 6 veya daha fazla (B) tipi bağlantı içerebilir. (B) tipi bağlantılar, bitişik olabilir veya oligomer boyunca aralıklı konumlandırılabilir. (B) tipi bağlantı, aşağıdaki yapıya (I) veya bunun bir tuzuna veya izomerine sahiptir:



(I)

burada:

- W, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde S'dir veya O'dur;
- 5 X, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde  $-NR^8R^9$ 'dur veya  $-OR^3$ 'tür; ve
- Y, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde O'dur veya  $-NR^{10}$ 'dur,
- $R^3$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir veya  $C_1-C_6$  alkildir;
- $R^8$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir veya  $C_2-C_{12}$  alkildir;
- $R^9$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir,  $C_1-C_{12}$  alkildir,  $C_1-C_{12}$
- 10 aralkildir veya arildir;
- $R^{10}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir,  $C_1-C_{12}$  alkildir veya  $-LNR^4R^5R^7$ 'dir;
- burada  $R^8$  ve  $R^9$ , bir 5-18 üyeli mono veya bisiklik heterosiklik oluşturmak için
- birleşebilir veya  $R^8$ ,  $R^9$  veya  $R^3$ , bir 5-7 üyeli heterosiklik oluşturmak için  $R^{10}$  ile
- 15 birleşebilir ve burada X, 4-piparazino olduğunda, X, aşağıdaki yapıya (III) sahiptir:



(III)

20 burada:

- $R^{11}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde  $C_2-C_{12}$  alkildir,  $C_1-C_{12}$  aminoalkildir,  $C_1-C_{12}$  alkilkarbonildir, arildir, heteroarildir veya heterosiklidir;
- R, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde bir elektron çiftidir, hidrojenidir veya  $C_1-C_{12}$  alkildir; ve
- 25  $R^{12}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde, hidrojenidir,  $C_1-C_{12}$  alkildir,  $C_1-C_{12}$  aminoalkildir,  $-NH_2$ ,  $-NR^{13}R^{14}$ ,  $-NR^{13}R^{14}R^{15}$ ,  $C_1-C_{12}$  alkilkarbonildir, oksodur,  $-CN$ ,

triflorometildir, amidildir, amidinildir, amidinilalkildir, amidinilalkilkarbonil guanidinildir, guanidinilalkildir, guanidinilalkilkarbonildir, kolattır, deoksikolattır, arildir, heteroarildir, heterosiklidir,  $-SR^{13}$  veya  $C_1-C_{12}$  alkoksidir, burada  $R^{13}$ ,  $R^{14}$  ve  $R^{15}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde  $C_1-C_{12}$  alkildir.

5

Bazı örneklerde, oligomer, (B) tipi bir bağlantı içerir. Bazı diğer uygulamalarda, oligomer, (B) tipi iki bağlantı içerir. Bazı diğer uygulamalarda oligomer, (B) tipi üç bağlantı içerir. Bazı diğer uygulamalarda, oligomer, (B) tipi dört bağlantı içerir. Daha da başka uygulamalarda, (B) tipi bağlantılar ardışıktır (*yani*, (B) tipi bağlantılar, birbirine bitişiktir). İlave uygulamalarda, oligomer içindeki bağlantıların en az %5'i (B) tipidir; 10 örneğin, bazı uygulamalarda, bağlantıların %5-%95'i, %10 ila %90'ı, %10 ila %50'si veya %10 ila %35'i (B) tipi bağlantı olabilir.

Diğer uygulamalarda,  $R^3$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir veya 15  $C_1-C_6$  alkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^3$ , metil olabilir. Bazı uygulamalarda,  $R^3$ , etil olabilir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^3$ , n-propil veya izopropil olabilir. Daha başka uygulamalarda,  $R^3$ ,  $C_4$  alkil olabilir. Bazı uygulamalarda,  $R^3$ ,  $C_5$  alkil olabilir. Bazı uygulamalarda,  $R^3$ ,  $C_6$  alkil olabilir.

20 Bazı uygulamalarda,  $R^8$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir veya  $C_2-C_{12}$  alkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^8$ , hidrojenidir. Daha başka uygulamalarda,  $R^8$ , etildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^8$ , n-propildir veya izopropildir. Bazı uygulamalarda,  $R^8$ ,  $C_4$  alkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^8$ ,  $C_5$  alkildir. Diğer uygulamalarda,  $R^8$ ,  $C_6$  alkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^8$ ,  $C_7$  alkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^8$ ,  $C_8$  alkildir. Diğer 25 uygulamalarda,  $R^8$ ,  $C_9$  alkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^8$ ,  $C_{10}$  alkildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^8$ ,  $C_{11}$  alkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^8$ ,  $C_{12}$  alkildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^8$ ,  $C_2-C_{12}$  alkildir ve  $C_2-C_{12}$  alkil, bir veya birden fazla ikili bağ (örneğin, alken), üçlü bağ (örneğin, alkin) veya her ikisini içerir. Bazı uygulamalarda,  $R^8$ , sübstitüe edilmemiş  $C_2-C_{12}$  alkildir.

30

Bazı uygulamalarda,  $R^9$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir,  $C_1-C_{12}$  35 alkildir,  $C_1-C_{12}$  aralkildir veya arildir. Bazı uygulamalarda,  $R^9$ , hidrojenidir. Daha başka uygulamalarda,  $R^9$ ,  $C_1-C_{12}$  alkildir. Diğer uygulamalarda,  $R^9$ , metildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^9$ , etildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^9$ , n-propildir veya izopropildir. Bazı uygulamalarda,  $R^9$ ,  $C_4$  alkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^9$ ,  $C_5$  alkildir. Daha başka

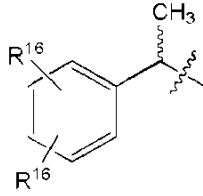


uygulamalarda,  $R^9$ ,  $C_6$  alkildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^9$ ,  $C_7$  alkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^9$ ,  $C_8$  alkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^9$ ,  $C_9$  alkildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^9$ ,  $C_{10}$  alkildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^9$ ,  $C_{11}$  alkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^9$ ,  $C_{12}$  alkildir.

5

Bazı diğer uygulamalarda,  $R^9$ ,  $C_1$ - $C_{12}$  aralkildir. Örneğin, bazı uygulamalarda  $n$ ,  $R^9$ , benzildir ve benzil opsiyonel olarak, fenil halkası veya benzilik karbon üzerinde sübstüte edilebilir. Bu bağlamlarda sübstitüentler, alkil ve alkoksi gruplarını, örneğin, metili veya metoksiyi, içerir. Bazı uygulamalarda, benzil grubu benzilik karbondaki metil ile sübstüte edilir. Örneğin, bazı uygulamalarda,  $R^9$ , aşağıdaki yapıya (XIV) sahiptir:

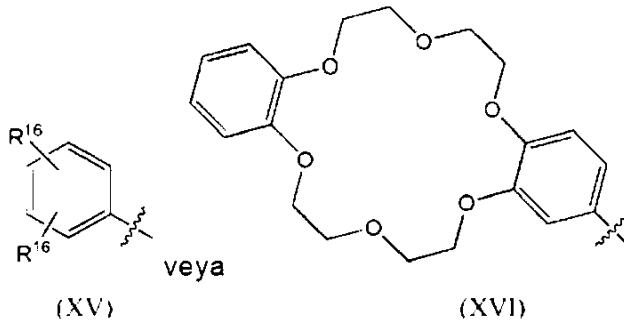
10



(XIV)

Diğer uygulamalarda,  $R^9$ , arildir. Örneğin, bazı uygulamalarda,  $R^9$ , fenildir ve fenil, opsiyonel olarak sübstüte edilebilir. Bu bağlamdaki sübstitüentler sübstitüentler, alkil ve alkoksi gruplarını, örneğin, metili veya metoksiyi, içerir. Diğer uygulamalarda,  $R^9$ , fenildir ve fenil, bir taç eter kısmı, örneğin, bir 12-18 üyeli taç eter, içerir. Bir uygulamada, taç eter, 18 üyelidir ve ilaveten bir ilave fenil kısmı içerir. Örneğin, bir uygulamada,  $R^9$ , aşağıdaki yapıların (XV) veya (XVI) birine sahiptir:

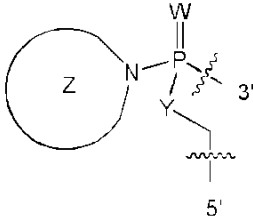
20



Bazı uygulamalarda,  $R^{10}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir,  $C_1$ - $C_{12}$  alkildir veya  $-LNR^4R^5R^7$ 'dir, burada  $R^4$ ,  $R^5$  ve  $R^7$ , (A) bağlantısı açısından yukarıda

tanımlandığı şekildedir. Diğer uygulamalarda,  $R^{10}$ , hidrojendir. Diğer uygulamalarda,  $R^{10}$ ,  $C_1-C_{12}$  alkildir ve diğer uygulamalarda,  $R^{10}$ ,  $-LNR^4R^5R^7$ 'dir. Bazı uygulamalarda,  $R^{10}$ , metildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{10}$ , etildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{10}$ ,  $C_3$  alkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{10}$ ,  $C_4$  alkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{10}$ ,  $C_5$  alkildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^{10}$ ,  $C_6$  alkildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{10}$ ,  $C_7$  alkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{10}$ ,  $C_8$  alkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{10}$ ,  $C_9$  alkildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{10}$ ,  $C_{10}$  alkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{10}$ ,  $C_{11}$  alkildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^{10}$ ,  $C_{12}$  alkildir.

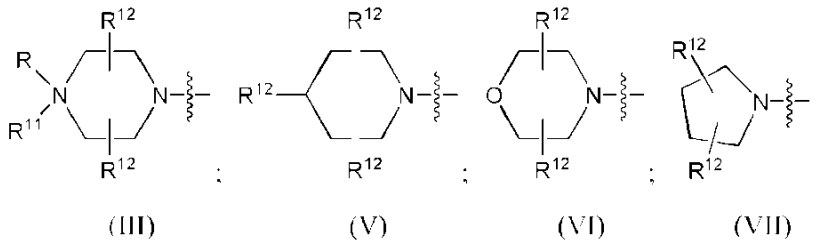
- 10 Bazı uygulamalarda,  $R^8$  ve  $R^9$ , bir 5-18 üyeli mono veya bisiklik heterosiklik oluşturmak için birleşir. Bazı uygulamalarda, heterosiklik, bir 5 veya 6 üyeli monosiklik heterosiklidir. Örneğin, bazı uygulamalarda, (B) bağlantısı, aşağıdaki yapıya (IV) sahiptir:

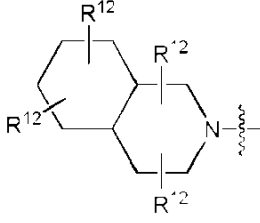


- 15 (IV)

Diğer uygulamalarda, heterosiklik, bisiklik, örneğin, bir 12-üyeli bisiklik heterosiklidir. Heterosiklik, piperizinil olabilir. Heterosiklik, morfolino olabilir. Heterosiklik, piperidinil olabilir. Heterosiklik, dekahidroizokuinolin olabilir. Temsili heterosiklikler aşağıdakileri

- 20 içerir:





(VIII)

Bazı uygulamalarda,  $R^{11}$  is, her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde  $C_2$ - $C_{12}$  alkildir,  
5  $C_1$ - $C_{12}$  aminoalkildir, arildir, heteroarildir veya heterosiklidir.

Bazı uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_2$ - $C_{12}$  alkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{11}$ , etildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_3$  alkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{11}$ , izopropildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_4$  alkildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_5$  alkildir. Bazı  
10 uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_6$  alkildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_7$  alkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_8$  alkildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_9$  alkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_{10}$  alkildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_{11}$  alkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_{12}$  alkildir.

Diğer uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_1$ - $C_{12}$  aminoalkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  
15 metilaminodur. Bazı uygulamalarda,  $R^{11}$ , etilaminodur. Diğer uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_3$  aminoalkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_4$  aminoalkildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_5$  aminoalkildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_6$  aminoalkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_7$  aminoalkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_8$  aminoalkildir.  
20 Diğer uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_9$  aminoalkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_{10}$  aminoalkildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_{11}$  aminoalkildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_{12}$  aminoalkildir.

Diğer uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_1$ - $C_{12}$  alkilkarbonildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_1$   
25 alkilkarbonildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_2$  alkilkarbonildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_3$  alkilkarbonildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_4$  alkilkarbonildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_5$  alkilkarbonildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_6$  alkilkarbonildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_7$  alkilkarbonildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_8$  alkilkarbonildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_9$  alkilkarbonildir.  
30 Daha başka uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_{10}$  alkilkarbonildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_{11}$

alkilkarbonildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $C_{12}$  alkilkarbonildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{11}$ ,  $-C(=O)(CH_2)_nCO_2H$ 'dir, burada n, 1 ila 6 aralığındadır. Örneğin, bazı uygulamalarda, n, 1'dir. Diğer uygulamalarda, n, 2'dir. Daha başka uygulamalarda, n, 3'tür. Bazı diğer uygulamalarda, n, 4'tür. Daha başka uygulamalarda, n, 5'tir. Diğer uygulamalarda, n, 6'dir.

Diğer uygulamalarda,  $R^{11}$ , arildir. Örneğin, bazı uygulamalarda,  $R^{11}$ , fenildir. Bazı uygulamalarda, fenil, örneğin, bir nitro grubu ile, sübstüte edilir.

10 Diğer uygulamalarda,  $R^{11}$ , heteroarildir. Örneğin, bazı uygulamalarda,  $R^{11}$ , piridinildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{11}$ , pirimidinildir.

Diğer uygulamalarda,  $R^{11}$ , heterosiklidir. Örneğin, bazı uygulamalarda,  $R^{11}$ , piperidinildir, örneğin, piperidin-4-ildir.

15

Bazı uygulamalarda,  $R^{11}$ , etildir, izopropildir, piperidinildir, pirimidinildir, kolattır, deoksikolattır veya  $-C(=O)(CH_2)_nCO_2H$ 'dir, burada n, 1 ila 6 aralığındadır.

Bazı uygulamalarda, R, bir elektron çiftidir. Diğer uygulamalarda, R, hidrojenidir ve diğer uygulamalarda, R,  $C_1-C_{12}$  alkildir. Bazı uygulamalarda, R, metildir. Bazı uygulamalarda, R, etildir. Diğer uygulamalarda, R,  $C_3$  alkildir. Daha başka uygulamalarda, R, izopropildir. Bazı diğer uygulamalarda, R,  $C_4$  alkildir. Daha başka uygulamalarda, R,  $C_5$  alkildir. Bazı uygulamalarda, R,  $C_6$  alkildir. Diğer uygulamalarda, R,  $C_7$  alkildir. Daha başka uygulamalarda, R,  $C_8$  alkildir. Diğer uygulamalarda, R,  $C_9$  alkildir. Bazı uygulamalarda, R,  $C_{10}$  alkildir. Daha başka uygulamalarda, R,  $C_{11}$  alkildir. Bazı uygulamalarda, R,  $C_{12}$  alkildir.

Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde, hidrojenidir,  $C_1-C_{12}$  alkildir,  $C_1-C_{12}$  aminoalkildir,  $-NH_2$ ,  $-NR^{13}R^{14}$ ,  $-NR^{13}R^{14}R^{15}$ , oksodur,  $-CN$ , triflorometildir, amidildir, amidinildir, amidinilalkildir, amidinilalkilkarbonildir, guanidinildir, guanidinilalkildir, guanidinilalkilkarbonildir, kolattır, deoksikolattır, arildir, heteroarildir, heterosiklidir,  $-SR^{13}$  veya  $C_1-C_{12}$  alkoksidir, burada  $R^{13}$ ,  $R^{14}$  ve  $R^{15}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde  $C_1-C_{12}$  alkildir.

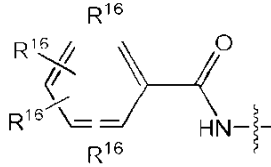
30

- Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ , hidrojenidir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_1-C_{12}$  alkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_1-C_{12}$  aminoalkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $-NH_2$ 'dir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $-NR^{13}R^{14}$ tür. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $-NR^{13}R^{14}R^{15}$ tir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_1-C_{12}$  alkikarbonildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ , oksodur. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $-CN$ 'dir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ , triflorometildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ , amidildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ , amidinildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ , amidinilalkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ , amidinilalkilkarbonildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ , guanidinildir, örneğin, mono metilguanidinildir veya dimetilguanidinildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ , guanidinilalkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ , amidinilalkilkarbonildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ , kolattır. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ , deoksikolattır. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ , arildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ , heteroarildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ , heterosiklidir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $-SR^{13}$ tür. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_1-C_{12}$  alkoksidir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ , dimetil amindir.
- Diğer uygulamalarda,  $R^{12}$ , metildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{12}$ , etildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_3$  alkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ , izopropildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_4$  alkildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_5$  alkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_6$  alkildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_7$  alkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_8$  alkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_9$  alkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_{10}$  alkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_{11}$  alkildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_{12}$  alkildir. Daha başka uygulamalarda, alkil kısmı, bir eter kısmı, örneğin, bir metoksimetil kısmı, oluşturmak için bir veya birden fazla oksijen atomu ile sübstüte edilir.
- Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ , metilaminodur. Diğer uygulamalarda,  $R^{12}$ , etilaminodur. Daha başka uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_3$  aminoalkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_4$  aminoalkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_5$  aminoalkildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_6$  aminoalkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_7$  aminoalkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_8$  aminoalkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_9$  aminoalkildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_{10}$  aminoalkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_{11}$  aminoalkildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_{12}$  aminoalkildir. Bazı uygulamalarda, amino alkil, bir dimetilamino alkildir.

Daha başka uygulamalarda,  $R^{12}$ , asetildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_2$  alkilkarbonildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_3$  alkilkarbonildir. Daha başka

uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_4$  alkilkarbonildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_5$  alkilkarbonildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_6$  alkilkarbonildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_7$  alkilkarbonildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_8$  alkilkarbonildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_9$  alkilkarbonildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_{10}$  alkilkarbonildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_{11}$  alkilkarbonildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_{12}$  alkilkarbonildir. Alkilkarbonil bir karboksi kısmı ile sübstüte edilir, örneğin, alkilkarbonil bir süksinik asit kısmı (yani, bir 3-karboksialkilkarbonil) oluşturmak için sübstüte edilir. Diğer uygulamalarda, alkilkarbonil bir uç -SH grubu ile sübstüte edilir.

10 Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ , amidildir. Bazı uygulamalarda, amidil, örneğin, -SH, karbamat veya bunların kombinasyonları ile, ilaveten sübstüte edilmiş bir alkil kısmı içerir. Diğer uygulamalarda, amidil, bir aril kısmı, örneğin, fenil, ile sübstüte edilir. Belirli uygulamalarda,  $R^{12}$ , (IX) aşağıdaki yapıya sahip olabilir:



15 (IX)

burada  $R^{16}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir,  $C_1$ - $C_{12}$  alkildir,  $C_1$ - $C_{12}$  alkoksidir, -CN'dir, arildir veya heteroarildir.

20 Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ , metoksidir. Diğer uygulamalarda,  $R^{12}$ , etoksidir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_3$  alkoksidir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_4$  alkoksidir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_5$  alkoksidir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_6$  alkoksidir. Diğer uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_7$  alkoksidir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_8$  alkoksidir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_9$  alkoksidir. Diğer uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_{10}$  alkoksidir. Bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_{11}$  alkoksidir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{12}$ ,  $C_{12}$  alkoksidir.

Belirli uygulamalarda,  $R^{12}$ , pirrolidinildir, örneğin, pirrolidin-1-ildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{12}$ , piperidinildir, örneğin, piperidin-1-ildir veya piperidin-4-ildir. Bir başka uygulamada,  $R^{12}$ , morfolinodur, örneğin, morfolin-4-ildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{12}$ , fenildir ve hatta ilave uygulamalarda, fenil, örneğin, bir nitro grubu ile, sübstüte edilir. Daha da başka uygulamalarda,  $R^{12}$ , pirimidinildir, örneğin, pirimidin-2-ildir.

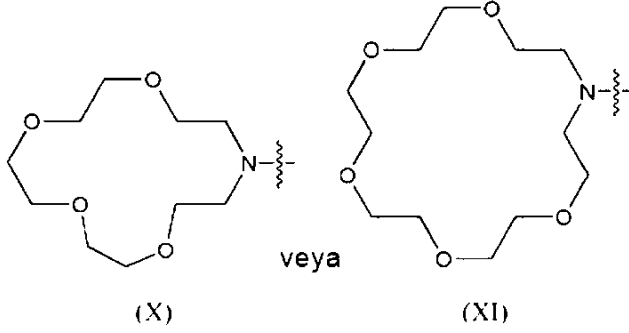
Diğer uygulamalarda,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$  ve  $R^{15}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde  $C_1$ - $C_{12}$  alkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$  veya  $R^{15}$ , metildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$  veya  $R^{15}$ , etildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$  veya  $R^{15}$ ,  $C_3$  alkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$  veya  $R^{15}$ , izopropildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$  veya  $R^{15}$ ,  $C_4$  alkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$  veya  $R^{15}$ ,  $C_5$  alkildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$  veya  $R^{15}$ ,  $C_6$  alkildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$  veya  $R^{15}$ ,  $C_7$  alkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$  veya  $R^{15}$ ,  $C_8$  alkildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$  veya  $R^{15}$ ,  $C_9$  alkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$  veya  $R^{15}$ ,  $C_{10}$  alkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$  veya  $R^{15}$ ,  $C_{11}$  alkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$  veya  $R^{15}$ ,  $C_{12}$  alkildir.

Yukarıda bildirildiği üzere, bazı uygulamalarda,  $R^{12}$ , bir aril kısmı ile sübstüte edilmiş amidildir. Bu bağlamda,  $R^{16}$ 'nın her bir bulunuşunda, aynı veya farklı olabilir. Bu uygulamaların bazılarında,  $R^{16}$ , hidrojendir. Diğer uygulamalarda,  $R^{16}$ , -CN'dir. Diğer uygulamalarda,  $R^{16}$ , heteroarildir, örneğin, tretrazolildir. Belirli diğer uygulamalarda,  $R^{16}$ , metoksidir. Diğer uygulamalarda,  $R^{16}$ , arildir ve aril opsiyonel olarak sübstüte edilir. Bu bağlamda opsiyonel sübstitüentler aşağıdakileri içerir:  $C_1$ - $C_{12}$  alkil,  $C_1$ - $C_{12}$  alkoksi, örneğin, metoksi; trifloromeoksi; halo, örneğin, kloro; ve triflorometil.

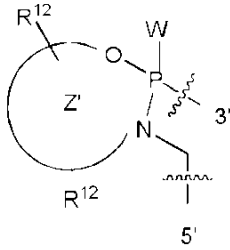
Diğer uygulamalarda,  $R^{16}$ , metildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{16}$ , etildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{16}$ ,  $C_3$  alkildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^{16}$ , izopropildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{16}$ ,  $C_4$  alkildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{16}$ ,  $C_5$  alkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{16}$ ,  $C_6$  alkildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^{16}$ ,  $C_7$  alkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{16}$ ,  $C_8$  alkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{16}$ ,  $C_9$  alkildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^{16}$ ,  $C_{10}$  alkildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{16}$ ,  $C_{11}$  alkildir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^{16}$ ,  $C_{12}$  alkildir.

Bazı uygulamalarda,  $R^{16}$ , metoksidir. Bazı uygulamalarda,  $R^{16}$ , etoksidir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{16}$ ,  $C_3$  alkoksidir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^{16}$ ,  $C_4$  alkoksidir. Diğer uygulamalarda,  $R^{16}$ ,  $C_5$  alkoksidir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^{16}$ ,  $C_6$  alkoksidir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{16}$ ,  $C_7$  alkoksidir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^{16}$ ,  $C_8$  alkoksidir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{16}$ ,  $C_9$  alkoksidir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^{16}$ ,  $C_{10}$  alkoksidir. Bazı uygulamalarda,  $R^{16}$ ,  $C_{11}$  alkoksidir. Bazı diğer uygulamalarda,  $R^{16}$ ,  $C_{12}$  alkoksidir.

Bazı diğer uygulamalarda,  $R^8$  ve  $R^9$ , bir 12-18 üyeli taç eter oluşturmak için birleşir. Örneğin, bazı uygulamalarda, taç eter, 18 üyelidir ve diğer uygulamalarda, taç eter, 15 üyelidir. Belirli uygulamalarda,  $R^8$  ve  $R^9$ , aşağıdaki yapıların (X) veya (XI) birine sahip olan bir heterosiklik oluşturmak için birleşir:



Bazı uygulamalarda,  $R^8$ ,  $R^9$  veya  $R^3$ , bir 5-7 üyeli heterosiklik oluşturmak için  $R^{10}$  ile birleşir. Örneğin, bazı uygulamalarda,  $R^3$ , bir 5-7 üyeli heterosiklik oluşturmak için  $R^{10}$  ile birleşir. Bazı uygulamalarda, heterosiklik, 5-üyelidir. Diğer uygulamalarda, heterosiklik, 6-üyelidir. Diğer uygulamalarda, heterosiklik, 7-üyelidir. Bazı uygulamalarda, heterosiklik, aşağıdaki yapı (XII) ile temsil edilir:

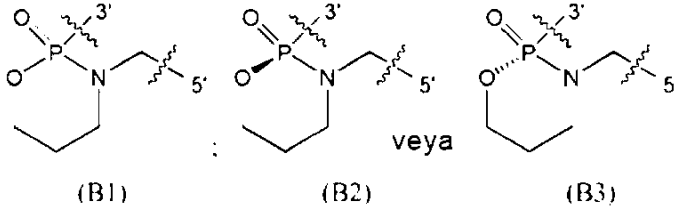


15

burada  $Z'$ , bir 5-7 üyeli heterosiklik'i temsil eder. Yapının (XI) belirli uygulamalarında,  $R^{12}$ , her bir bulunuşunda, hidrojenidir. Örneğin, (B) bağlantısı, aşağıdaki yapıların (B1), (B2) veya (B3) birine sahip olabilir:

20





Belirli diğer uygulamalarda,  $R^{12}$ , bir arilfosforil kısmı, örneğin, bir trifenil fosforil kısmı, ile ilaveten sübstüte edilmiş  $C_1-C_{12}$  alkilkarbonildir veya amididir. Bu yapıya sahip olan 5 bağlantıların örnekleri, B56'yı ve B55'i içerir.

Belirli uygulamada, (B) bağlantısı, A1-A5 arasındaki yapıların herhangi birine sahip değildir. Tablo 3, temsili (A) ve (B) tipi bağlantıları gösterir.

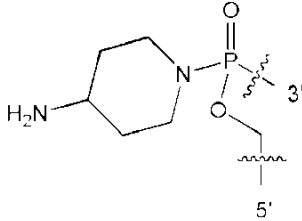
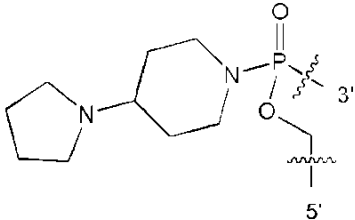
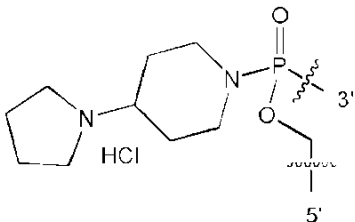
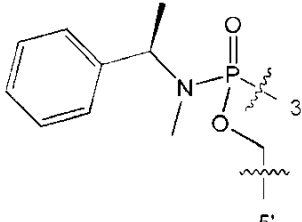
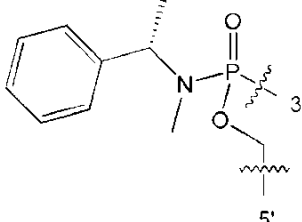
10

**Tablo 3. Temsili Alt-birim-arası Bağlantılar**

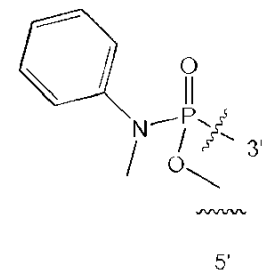
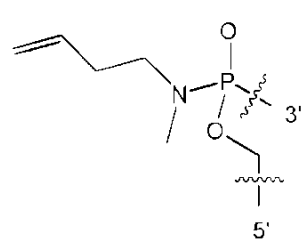
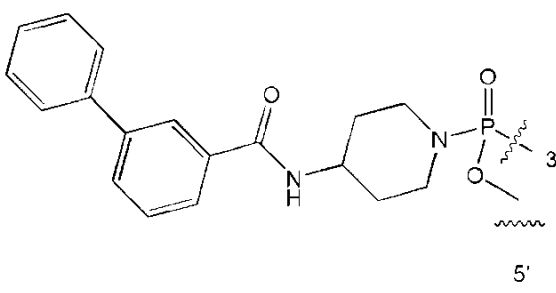
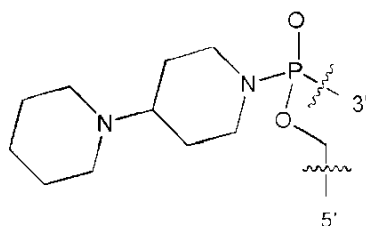
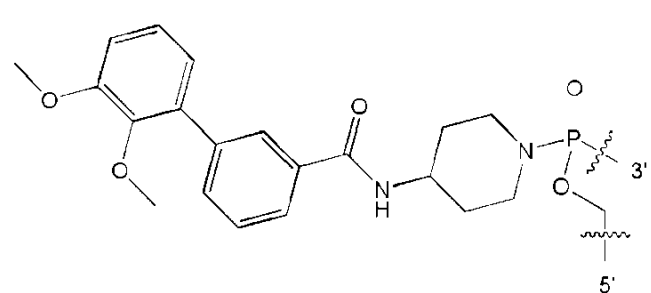
No.	Adı	Yapısı
A1	PMO	
A2	PMO <sup>+</sup> (gösterilen protonlanmamış form)	
A3	PMO <sup>+</sup> (+)	

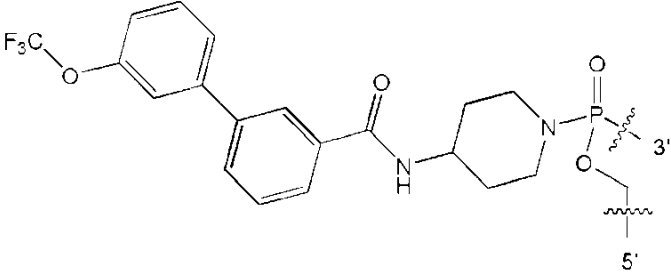
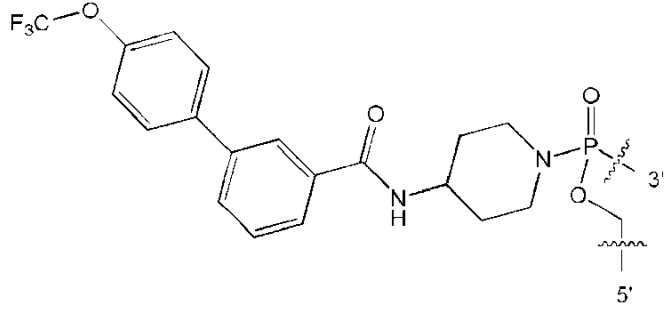
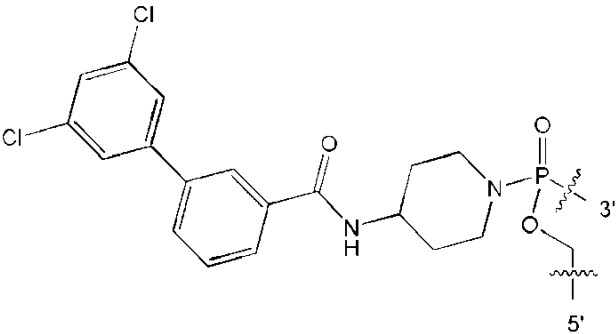
No.	Adı	Yapısı
A4	PMO <sup>mepip</sup> (m+)	
A5	PMO <sup>GUX</sup>	
B1	PMO <sup>cp</sup>	
B2	PMO <sup>cps</sup>	
B3	PMO <sup>cpr</sup>	
B4	PMO <sup>Shc</sup>	

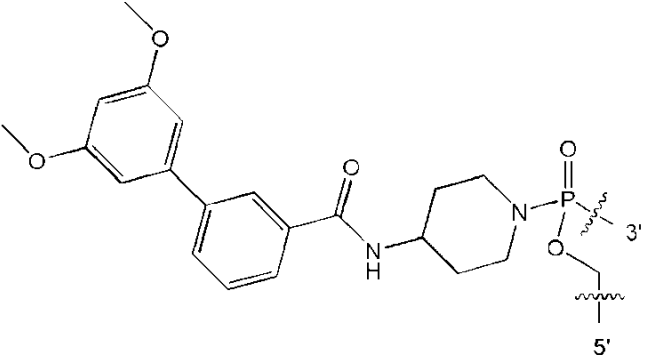
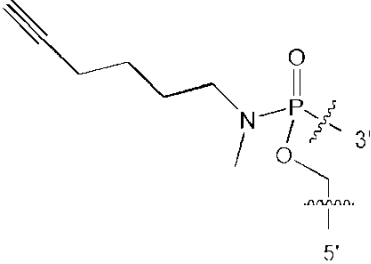
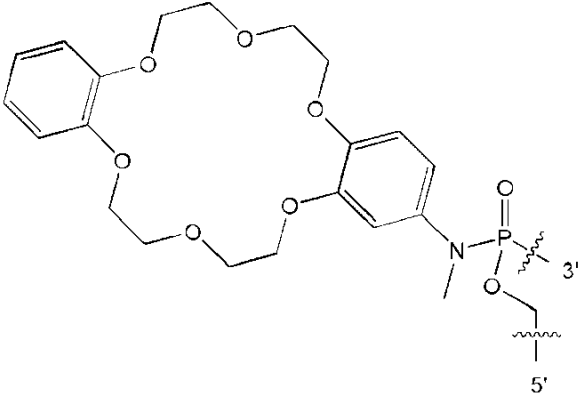
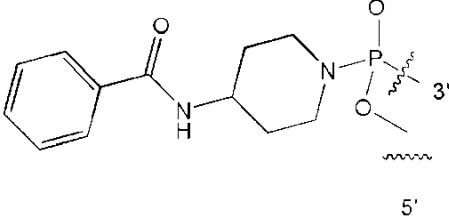
No.	Adı	Yapısı
B5	PMO <sup>morfolino</sup> (m)	
B6	PMO <sup>tri</sup> (t)	
B7	PMO <sup>heks</sup> (h)	
B8	PMO <sup>dodek</sup>	
B9	PMO <sup>diheks</sup>	
B10	PMO <sup>apn</sup> (a)	

No.	Adı	Yapısı
		
B11	PMO <sup>pyr</sup> (p)	
B12	PMO <sup>pyr</sup> (HCl Tuzu)	
B13	PMO <sup>rba</sup>	
B14	PMO <sup>sba</sup>	
B15	PMO <sup>dimetilapn</sup>	

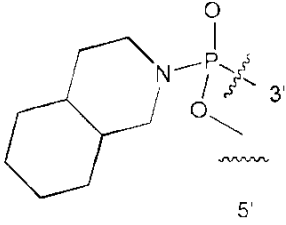
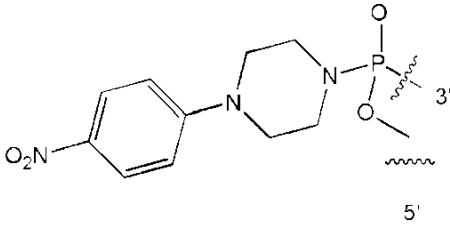
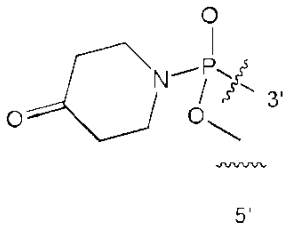
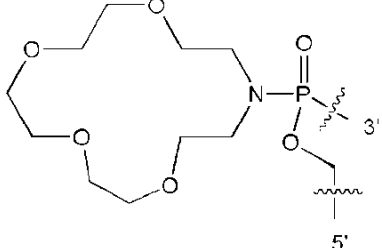
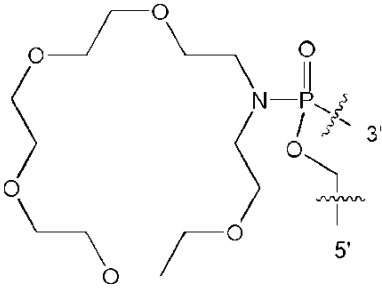
No.	Adı	Yapısı
B16	PMO <sup>etpip</sup>	
B17	PMO <sup>iprpi</sup>	
B18	PMO <sup>pyrQMe</sup>	
B19	PMO <sup>cb</sup>	
B20	PMO <sup>ma</sup>	

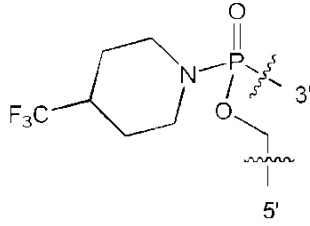
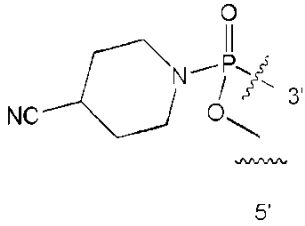
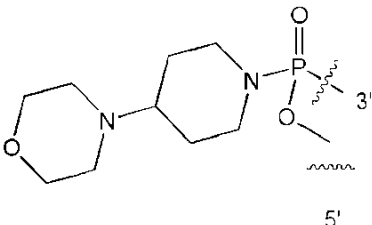
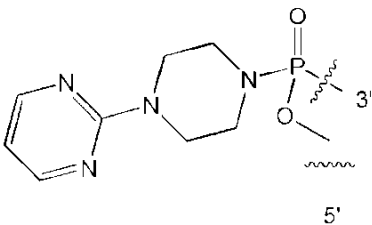
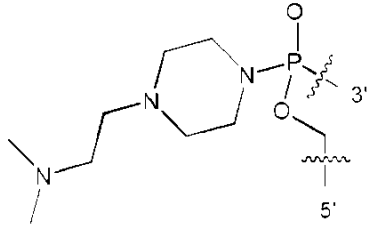
No.	Adı	Yapısı
		
B21	PMO <sup>bu</sup>	
B22	PMO <sup>bi</sup>	
B23	PMO <sup>pip</sup>	
B24	PMO <sup>odmb</sup>	
B25	PMO <sup>tfb</sup>	

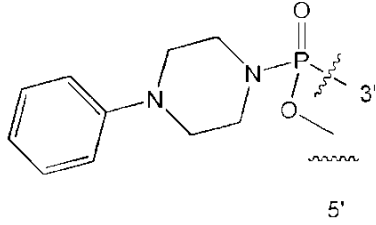
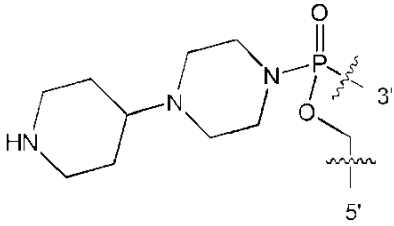
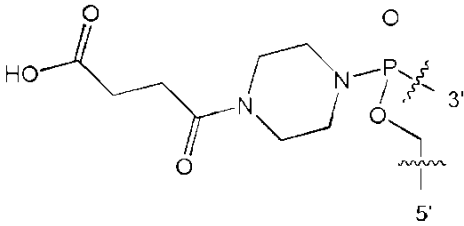
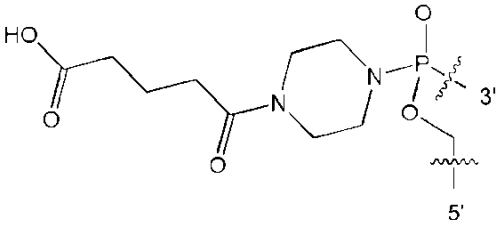
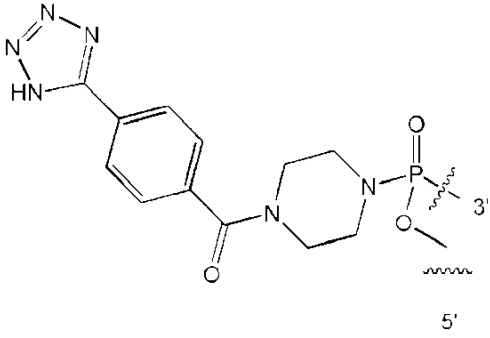
No.	Adı	Yapısı
B26	$\text{PMO}^{\text{ctfb}}$	
B27	$\text{PMO}^{\text{ptfb}}$	
B28	$\text{PMO}^{\text{dcb}}$	
B29	$\text{PMO}^{\text{dmb}}$	

No.	Adı	Yapısı
		 <p>The structure shows a phosphoramidite group (P=O, O-, and a wavy line representing the 5' carbon) attached to a nitrogen atom. This nitrogen is part of a piperidine ring. The piperidine ring is further substituted with a benzamide group (-NH-C(=O)-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-), which is in turn connected to a 3,4,5-trimethoxyphenyl group.</p>
B30	PMO <sup>hy</sup>	 <p>The structure shows a phosphoramidite group (P=O, O-, and a wavy line representing the 5' carbon) attached to a nitrogen atom. This nitrogen is part of a piperidine ring. The piperidine ring is further substituted with a 4-ethynylbutyl group (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C≡CH).</p>
B31	PMO <sup>6ce</sup>	 <p>The structure shows a phosphoramidite group (P=O, O-, and a wavy line representing the 5' carbon) attached to a nitrogen atom. This nitrogen is part of a piperidine ring. The piperidine ring is further substituted with a crown ether group (18-crown-6) that is also attached to a phenyl ring.</p>
B32	PMO <sup>b</sup>	 <p>The structure shows a phosphoramidite group (P=O, O-, and a wavy line representing the 5' carbon) attached to a nitrogen atom. This nitrogen is part of a piperidine ring. The piperidine ring is further substituted with a benzamide group (-NH-C(=O)-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).</p>
B33	PMO <sup>q</sup>	

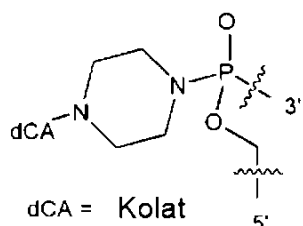
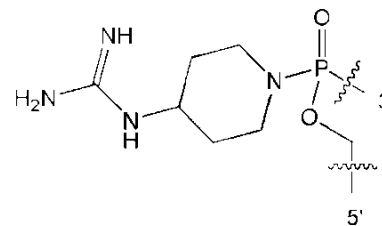
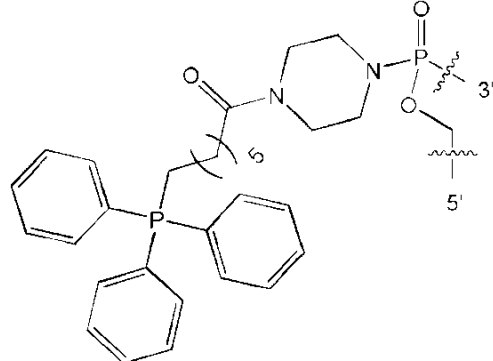
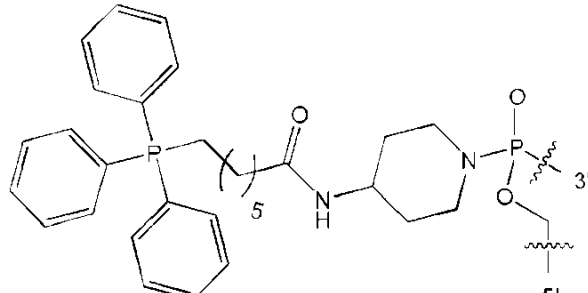


No.	Adı	Yapısı
		
B34	PMO <sup>np</sup>	
B35	PMO <sup>o</sup>	
B36	PMO <sup>4ce</sup>	
B37	PMO <sup>5ce</sup>	
B38	PMO <sup>f3p</sup>	

No.	Adı	Yapısı
		
B39	PMO <sup>cyp</sup>	
B40	PMO <sup>mop</sup>	
B41	PMO <sup>pp</sup>	
B42	PMO <sup>dmepip</sup>	
B43	PMO <sup>NPpip</sup>	

No.	Adı	Yapısı
		
B44	PMO <sup>bipip</sup>	
B45	PMO <sup>suc</sup>	
46	PMO <sup>glutarik</sup>	
B47	PMO <sup>tet</sup>	
B48	PMO <sup>tiyol (SH)</sup>	

No.	Adı	Yapısı
B49	PMO <sup>pros</sup>	
B50	PMO <sup>pror</sup>	
B51	PMO <sup>tme</sup>	
B52	PMO <sup>ca</sup>	<p data-bbox="938 1805 1098 1843">CA = Kolat</p>

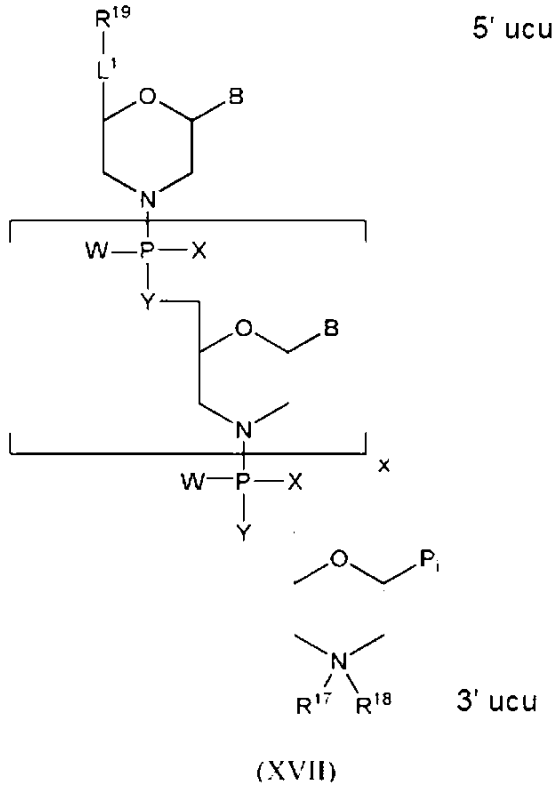
No.	Adı	Yapısı
B53	PMO <sup>dca</sup>	 <p>dCA = Kolot</p>
B54	PMO <sup>guan</sup> (g)	
B55	PMO <sup>+fos</sup>	
B56	PMO <sup>apnfos</sup>	

Dizilerde ve aşağıdaki tartışmada, bağlantılar için yukarıdaki adlar sıklıkla kullanılır. Örneğin, bir PMO<sup>apn</sup> bağlantısı içeren bir baz, <sup>apn</sup>B olarak gösterilir, burada B, bir bazdır. Diğer bağlantılar benzer şekilde gösterilir. Buna ek olarak, kısaltılmış gösterimler kullanılabilir, örneğin, parantezler içindeki kısaltılmış gösterimler

kullanılabilir (örneğin, <sup>a</sup>B, <sup>apn</sup>B'yi ifade eder). Diğer kolaylıkla tanımlanabilir kısaltmalar da kullanılabilir.

- 5 Yukarıdaki bildirildiği üzere, mevcut açıklama ayrıca, modifiye edilmiş uç grupları içeren bir oligomer de sağlar. Başvuru sahipleri, oligomerin 3' ve/veya 5' ucunun çeşitli kimyasal kısımlar ile modifikasyonunun, oligomerlere yararlı terapötik özellikler (örneğin, arttırılmış hücresel alım, potens ve/veya doku dağılımı, vb.) sağladığını bulmuştur. Çeşitli uygulamalarda, modifiye edilmiş uç grupları, bir hidrofobik kısmı içerirken, diğer uygulamalarda, modifiye edilmiş uç grupları bir hidrofilik kısmı içerir.
- 10 Modifiye edilmiş uç grupları, yukarıda tarif edilen bağlantılar ile veya bunlar olmadan bulunabilir. Örneğin, bazı uygulamalarda, oligomerler bir veya birden fazla modifiye edilmiş uç grup ve (A) tipi bağlantılar, örneğin, burada X'in, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> olduğu bağlantılar, içerir. Diğer uygulamalarda, oligomerler bir veya birden fazla modifiye edilmiş uç grup ve (B) tipi bağlantılar, örneğin, burada X'in, 4-aminopiperidin-1-il (*yani*, APN) olduğu
- 15 bağlantılar, içerir. Daha başka uygulamalarda, oligomerler bir veya birden fazla modifiye edilmiş uç grup ve (A) ve (B) bağlantılarının bir karışımını içerir. Örneğin, oligomerler, bir veya birden fazla modifiye edilmiş uç grup (örneğin, tritil veya trifenil asetil) ve burada X'in, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> olduğu bağlantılar ve burada X'in, 4-aminopiperidin-1-il olduğu bağlantılar içerebilir. Modifiye edilmiş uç grupların ve modifiye edilmiş
- 20 bağlantıların diğer kombinasyonları da oligomerlere olumlu terapötik özellikler sağlar.

Bir uygulamada, uç modifikasyonlar içeren oligomerler aşağıdaki yapıya (XVII) veya bunların bir tuzuna veya izomerine sahiptir:



burada X, W ve Y, (A) ve (B) bağlantılarının herhangi biri için yukarıda tanımlandığı şekildedir ve:

- 5 R<sup>17</sup>, her bir bulunduğu, bağımsız bir şekilde yoktur, hidrojenidir veya C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkildir;
- R<sup>18</sup> ve R<sup>19</sup>, her bir bulunduğu, bağımsız bir şekilde yoktur, hidrojenidir, bir hücreye-nüfuz etme peptididir, bir doğal veya doğal-olmayan amino asittir, C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub> alkilkarbonildir, -C(=O)OR<sup>21</sup>'dir veya R<sup>20</sup>'dir;
- 10 R<sup>20</sup> is, her bir bulunduğu, bağımsız bir şekilde guanidindir, heterosiklildir, C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> alkildir, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> sikloalkildir; C<sub>6</sub>-C<sub>30</sub> arildir, C<sub>7</sub>-C<sub>30</sub> aralkildir, C<sub>3</sub>-C<sub>30</sub> alkilkarbonildir, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> sikloalkilkarbonildir, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> sikloalkilalkilkarbonildir, C<sub>7</sub>-C<sub>30</sub> arilkarbonildir, C<sub>7</sub>-C<sub>30</sub> aralkilkarbonildir, C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub> alkiloksikarbonildir, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> sikloalkiloksikarbonildir, C<sub>7</sub>-C<sub>30</sub> ariloksikarbonildir, C<sub>8</sub>-C<sub>30</sub> aralkiloksikarbonildir veya -P(=O)(R<sup>22</sup>)<sub>2</sub>'dir;
- 15 B, bir baz-eşleşme kısmıdır;
- L<sup>1</sup>, alkil, hidroksil, alkoksi, alkilamino, amid, ester, karbonil, karbamat, fosfordiamidat, fosforoamidat, fosforotiyoat, piperazin ve fosfodiester

arasından seçilen bağlar içeren en fazla 18 atom uzunluğundaki bir opsiyonel bağlayıcıdır ve

x, 0 veya daha büyük olan bir tam sayıdır; ve burada  $R^{18}$ 'in veya  $R^{19}$ 'un en az biri,  $R^{20}$ 'dir; ve

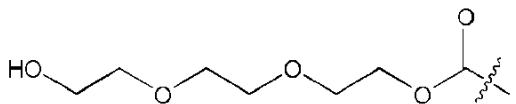
- 5 burada  $R^{17}$ 'nin ve  $R^{18}$ 'in her ikisinin de bulunmaması kaydıyla ve  $R^{18}$ 'in veya  $R^{19}$ 'un en az biri,  $R^{20}$ 'dir.

- 10 Modifiye edilmiş uç grupları olan oligomerler, herhangi bir sayıda (A) ve (B) tipi bağlantılar içerebilir. Örneğin, oligomerler yalnızca (A) tipi bağlantı içerebilir. Örneğin, her bir bağlantı içinde X,  $-N(CH_3)_2$  olabilir. Alternatif olarak, oligomerler yalnızca (B) bağlantısı içerebilir. Belirli uygulamalarda, oligomerler, (A) ve (B) bağlantılarının bir karışımını, örneğin, 1 ila 4 aralığında (B) tipi bağlantının ve bağlantıların kalanının (A) tipi olduğu bir karışımı, içerir. Bu bağlamda bağlantılar, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, burada X'in (B) tipi için aminopiperidinil ve (A) tipi için dimetil amino olduğu
- 15 bağlantıları, içerir.

- Bazı uygulamalarda,  $R^{17}$ , yoktur. Bazı uygulamalarda,  $R^{17}$ , hidrojenidir. Bazı uygulamalarda,  $R^{17}$ ,  $C_1$ - $C_6$  alkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{17}$ , metildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{17}$ , etildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{17}$ ,  $C_3$  alkildir. Bazı başka
- 20 uygulamalarda,  $R^{17}$ , izopropildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{17}$ ,  $C_4$  alkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{17}$ ,  $C_5$  alkildir. Bazı başka uygulamalarda,  $R^{17}$ ,  $C_6$  alkildir.

- Diğer uygulamalarda,  $R^{18}$ , yoktur. Bazı uygulamalarda,  $R^{18}$ , hidrojenidir. Bazı uygulamalarda,  $R^{18}$ , aşağıda daha detaylı bir şekilde tarif edildiği üzere bir hücreye-nüfuz etme peptididir. Bazı uygulamalarda,  $R^{18}$ , bir doğal veya doğal-olmayan amino asittir, örneğin, trimetilglisindir. Bazı uygulamalarda,  $R^{18}$ ,  $R^{20}$ 'dir.
- 25

- Diğer uygulamalarda,  $R^{19}$ , yoktur. Bazı uygulamalarda,  $R^{19}$ , hidrojenidir. Bazı uygulamalarda,  $R^{19}$ , aşağıda daha detaylı bir şekilde tarif edildiği üzere bir hücreye-nüfuz etme peptididir. Bazı uygulamalarda,  $R^{19}$ , bir doğal veya doğal-olmayan amino asittir, örneğin, trimetilglisindir. Bazı uygulamalarda,  $R^{19}$ ,  $-C(=O)OR^{17}$ 'dir, örneğin,  $R^{19}$ , aşağıdaki yapıya sahip olabilir:
- 30





Diğer uygulamalarda,  $R^{18}$  veya  $R^{19}$ ,  $C_2-C_{30}$  alkilkarbonildir, örneğin,  $-C(=O)(CH_2)_nCO_2H$ 'dir, burada n, 1 ila 6 aralığındadır, örneğin, 2'dir. Diğer örneklerde,  $R^{18}$  veya  $R^{19}$ , asetildir.

- 5 Bazı uygulamalarda,  $R^{20}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde guanidinildir, heterosiklidir,  $C_1-C_{30}$  alkildir,  $C_3-C_8$  sikloalkildir;  $C_6-C_{30}$  arildir,  $C_7-C_{30}$  aralkildir,  $C_3-C_{30}$  alkilkarbonildir,  $C_3-C_8$  sikloalkilalkilkarbonildir,  $C_3-C_8$  sikloalkilalkilalkilkarbonildir,  $C_6-C_{30}$  arilkarbonildir,  $C_7-C_{30}$  aralkilkarbonildir,  $C_2-C_{30}$  alkiloksikarbonildir,  $C_3-C_8$  sikloalkiloksikarbonildir,  $C_7-C_{30}$  ariloksikarbonildir,  $C_8-C_{30}$  aralkiloksikarbonildir, -
- 10  $C(=O)OR^{21}$ 'dir veya  $-P(=O)(R^{22})_2$ 'dir, burada  $R^{21}$ , bir veya birden fazla aoksijen veya hidroksil kısmı veya bunların kombinasyonlarını içeren  $C_1-C_{30}$  alkildir ve her bir  $R^{22}$ ,  $C^6-C^{12}$  ariloksidir.

- Belirli diğer uygulamalarda,  $R^{19}$ ,  $-C(=O)OR^{21}$ 'dir ve  $R^{18}$ , hidrojenidir, guanidinildir, heterosiklidir,  $C_1-C_{30}$  alkildir,  $C_3-C_8$  sikloalkildir;  $C_6-C_{30}$  arildir,  $C_3-C_{30}$  alkilkarbonildir,  $C_3-C_8$  sikloalkilalkilalkilkarbonildir,  $C_3-C_8$  sikloalkilalkilalkilalkilkarbonildir,  $C_7-C_{30}$  arilkarbonildir,  $C_7-C_{30}$  aralkilkarbonildir,  $C_2-C_{30}$  alkiloksikarbonildir,  $C_3-C_8$  sikloalkiloksikarbonildir,  $C_7-C_{30}$  ariloksikarbonildir,  $C_8-C_{30}$  aralkiloksikarbonildir veya  $-P(=O)(R^{22})_2$ 'dir, burada her bir  $R^{22}$ ,  $C^6-C^{12}$  ariloksidir.

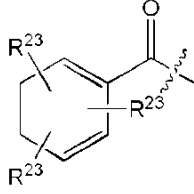
20

- Diğer uygulamalarda,  $R^{20}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde guanidinildir, heterosiklidir  $C_1-C_{30}$  alkildir,  $C_3-C_8$  sikloalkildir,  $C_6-C_{30}$  arildir,  $C_3-C_{30}$  alkilkarbonildir,  $C_3-C_8$  sikloalkilalkilalkilalkilkarbonildir,  $C_3-C_8$  sikloalkilalkilalkilalkilalkilkarbonildir,  $C_7-C_{30}$  arilkarbonildir,  $C_7-C_{30}$  aralkilkarbonildir,  $C_2-C_{30}$  alkiloksikarbonildir,  $C_3-C_8$  sikloalkiloksikarbonildir,  $C_7-C_{30}$  ariloksikarbonildir,  $C_8-C_{30}$  aralkiloksikarbonildir veya  $-P(=O)(R^{22})_2$ 'dir. Böyleyken diğer örneklerde,  $R^{20}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde guanidinildir, heterosiklidir,  $C_1-C_{30}$  alkildir,  $C_3-C_8$  sikloalkildir,  $C_6-C_{30}$  arildir,  $C_7-C_{30}$  aralkildir,  $C_3-C_8$  sikloalkilalkilalkilalkilalkilkarbonildir,  $C_3-C_8$  sikloalkilalkilalkilalkilalkilalkilkarbonildir,  $C_7-C_{30}$  arilkarbonildir,  $C_7-C_{30}$  aralkilkarbonildir,  $C_2-C_{30}$  alkiloksikarbonildir,  $C_3-C_8$  sikloalkiloksikarbonildir,  $C_7-C_{30}$  ariloksikarbonildir,  $C_8-C_{30}$  aralkiloksikarbonildir veya  $-P(=O)(R^{22})_2$ 'dir.
- 25
- 30

Bazı uygulamalarda,  $R^{20}$ , guanidinildir, örneğin, mono metilguanidinildir veya dimetilguanidinildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{20}$ , heterosiklidir. Örneğin, bazı uygulamalarda,  $R^{20}$ , piperidin-4-ildir. Bazı uygulamalarda, piperidin-4-il, tritil veya Boc

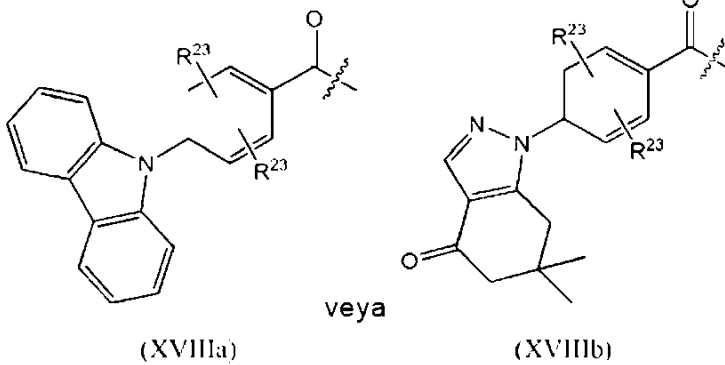
grupları ile sübstüte edilir. Diğer uygulamalarda,  $R^{20}$ ,  $C_3-C_8$  sikloalkildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{20}$ ,  $C_6-C_{30}$  arildir.

Bazı uygulamalarda,  $R^{20}$ ,  $C_7-C_{30}$  arilkarbonildir. Örneğin, bazı uygulamalarda,  $R^{20}$ ,  
5 aşağıdaki yapıya (XVIII) sahiptir:



(XVIII)

burada  $R^{23}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir, halodur,  $C_1-C_{30}$   
10 alkildir,  $C_1-C_{30}$  alkoksidir,  $C_1-C_{30}$  alkiloksikarbonildir,  $C_7-C_{30}$  aralkildir, arildir, heteroarildir, heterosiklildir veya heterosiklalkildir ve burada bir  $R^{23}$ , bir heterosiklil halkası oluşturmak için bir başka  $R^{23}$  ile birleşebilir. Bazı uygulamalarda, en az bir  $R^{23}$ , hidrojenidir, örneğin, bazı uygulamalarda, her bir  $R^{23}$ , hidrojenidir. Diğer uygulamalarda, en az bir  $R^{23}$ ,  $C_1-C_{30}$  alkoksidir, örneğin, bazı uygulamalarda, her bir  $R^{23}$ , metoksidir.  
15 Diğer uygulamalarda, en az bir  $R^{23}$ , heteroarildir, örneğin, bazı uygulamalarda, en az bir  $R^{23}$ , aşağıdaki yapıların (XVIIIa) veya (XVIIIb) birine sahiptir:

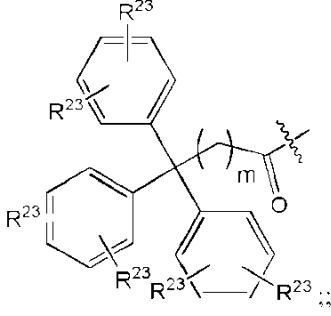


(XVIIIa)

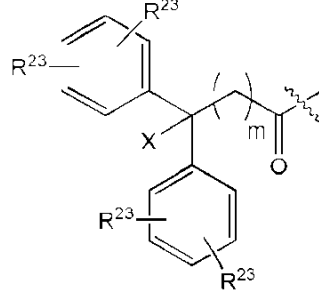
(XVIIIb)

20 Daha başka uygulamalarda, bir  $R^{23}$ , bir heterosiklil halkası oluşturmak için bir başka  $R^{23}$  ile birleşebilir. Örneğin, bir uygulamada,  $R^{20}$ , 5-karboksifloreseindir.

Diğer uygulamalarda,  $R^{20}$ ,  $C_7-C_{30}$  aralkilkarbonildir. Örneğin, çeşitli uygulamalarda,  $R^{20}$ , aşağıdaki yapıların (XIX), (XX) veya (XXI) birine sahiptir:

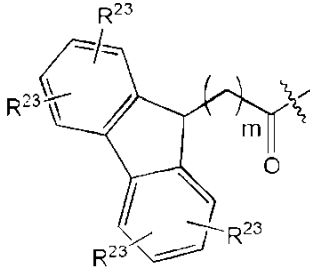


(XIX)



(XX)

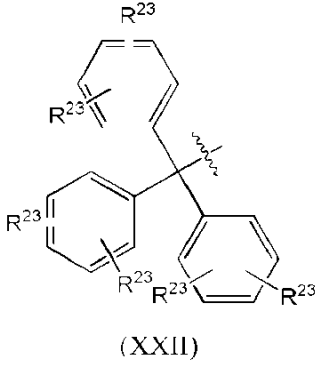
veya



(XXI)

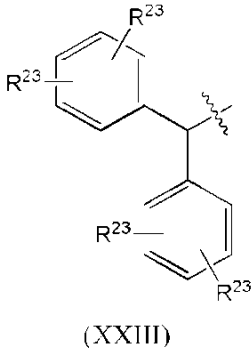
burada  $R^{23}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir, halodur,  $C_1-C_{30}$  alkildir,  $C_1-C_{30}$  alkoksidir,  $C_1-C_{30}$  alkiloksikarbonildir,  $C_7-C_{30}$  aralkildir, arildir, heteroarildir, heterosiklildir veya heterosiklalkildir, burada bir  $R^{23}$ , bir heterosiklil halkası oluşturmak için bir başka  $R^{23}$  ile birleşebilir, X, -OH'dır veya halodur ve m, 0 ila 6 aralığındaki bir tam sayıdır. Bazı spesifik uygulamalarda, m, 0'dır. Diğer uygulamalarda, m, 1 iken, diğer uygulamalarda, m, 2'dir. Diğer uygulamalarda, en az bir  $R^{23}$ , hidrojenidir, örneğin, bazı uygulamalarda, her bir  $R^{23}$ , hidrojenidir. Bazı uygulamalarda, X, hidrojenidir. Diğer uygulamalarda, X, -OH'dır. Diğer uygulamalarda, X, Cl'dir. Diğer uygulamalarda, en az bir  $R^{23}$ ,  $C_1-C_{30}$  alkoksidir, örneğin, metoksidir.

Daha başka uygulamalarda,  $R^{20}$ ,  $C_7-C_{30}$  aralkildir, örneğin, tritildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{20}$ , metoksi tritildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{20}$ , aşağıdaki yapıya (XXII) sahiptir:



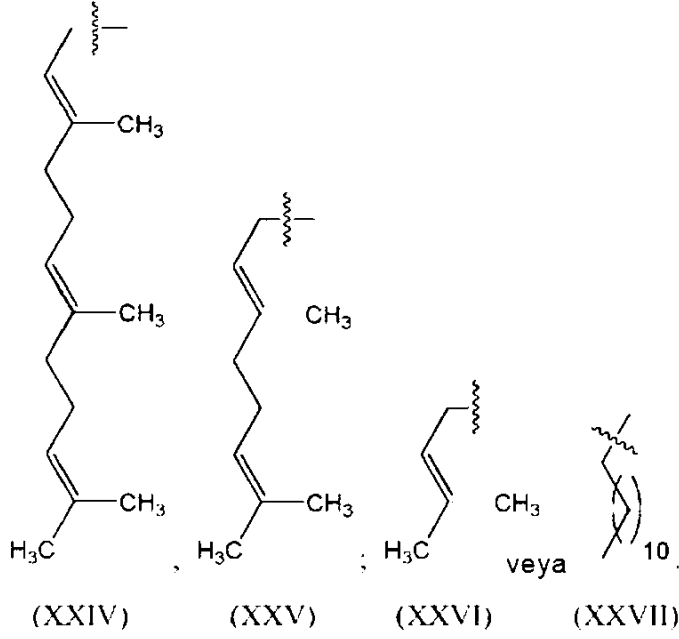
burada  $R^{23}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir, halodur,  $C_1-C_{30}$  alkildir,  $C_1-C_{30}$  alkoksidir,  $C_1-C_{30}$  alkiloksikarbonildir,  $C_7-C_{30}$  aralkildir, arildir, heteroarildir, heterosiklildir veya heterosiklalkildir ve burada bir  $R^{23}$ , bir heterosiklil halkası oluşturmak için bir başka  $R^{23}$  ile birleşebilir. Örneğin, bazı uygulamalarda, her bir  $R^{23}$ , hidrojenidir. Diğer uygulamalarda, en az bir  $R^{23}$ ,  $C_1-C_{30}$  alkoksidir, örneğin, metoksidir.

10 Daha başka uygulamalarda,  $R^{20}$ ,  $C_7-C_{30}$  aralkildir ve  $R^{20}$ , aşağıdaki yapıya (XXIII) sahiptir:



15 Bazı uygulamalarda, en az bir  $R^{23}$ , halodur, örneğin, klorodur. Bazı başka uygulamalarda, bir  $R^{23}$ , para pozisyonunda klorodur.

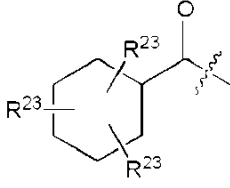
Diğer uygulamalarda,  $R^{20}$ ,  $C_1-C_{30}$  alkildir. Örneğin, bazı uygulamalarda,  $R^{20}$ , bir  $C_4-C_{20}$  alkildir ve opsiyonel olarak bir veya birden fazla ikili bağ içerir. Örneğin, bazı uygulamalarda,  $R^{20}$ , bir üçlü bağ, örneğin, bir uç üçlü bağ, içeren bir  $C_4-10$  alkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{20}$ , heksin-6-ildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{20}$ , aşağıdaki yapıların (XXIV), (XXV), (XXVI) veya (XXVII) birine sahiptir:



Daha başka uygulamalarda,  $R^{20}$ , bir  $C_3-C_{30}$  alkilkarbonildir, örneğin, bir  $C_3-C_{10}$  alkil karbonildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{20}$ ,  $-C(=O)(CH_2)_pSH$ 'dir veya  $-C(=O)(CH_2)_pSSHet$ 'tir, burada p, 1 ila 6 aralığındaki bir tam sayıdır ve Het, bir heteroarıldır. Örneğin, p, 1 olabilir veya p, 2 olabilir. Bir başka örnekte, Het, piridinildir, örneğin, piridin-2-ildir. Diğer uygulamalarda,  $C_3-C_{30}$  alkilkarbonil bir ilave oligomer ile sübstüte edilir, örneğin, bazı uygulamalarda, oligomer 3' pozisyonunda oligomeri bir başka oligomerin 3' pozisyonuna bağlayan bir  $C_3-C_{30}$  alkil karbonil içerir. Bu tarz uç modifikasyonları mevcut açıklamanın kapsamına dahil edilir.

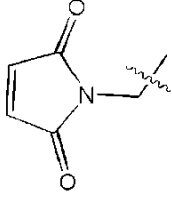
Diğer uygulamalarda,  $R^{20}$ , bir arilfosforil kısmı, örneğin, trifenil fosforil, ile ilaveten sübstüte edilen bir  $C_3-C_{30}$  alkil karbonildir. Bu tarz  $R^{20}$  gruplarının örnekleri Tablo 2'deki yapı 33'ü içerir.

Diğer örneklerde,  $R_{20}$ ,  $C_3-C_8$  sikloalkilkarbonildir, örneğin,  $C_5-C_7$  alkil karbonildir. Bu uygulamalarda,  $R_{20}$ , aşağıdaki yapıya (XXVIII) sahiptir:



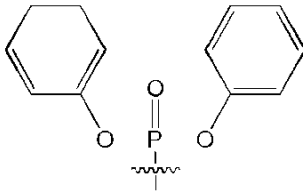
(XXVIII)

- burada  $R^{23}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir, halodur,  $C_1-C_{30}$  alkildir,  $C_1-C_{30}$  alkoksidir,  $C_1-C_{30}$  alkiloksikarbonildir,  $C_7-C_{30}$  aralkildir, arildir, heteroarildir, heterosiklildir veya heterosiklalkildir ve burada bir  $R^{23}$ , bir heterosiklil halkası oluşturmak için bir başka  $R^{23}$  ile birleşebilir. Bazı uygulamalarda,  $R^{23}$ , heterosiklilalkildir, örneğin, bazı uygulamalarda,  $R^{23}$ , aşağıdaki yapıya sahiptir:



10

- Bazı başka uygulamalarda,  $R^{20}$ ,  $C_3-C_8$  sikloalkilalkilkarbonildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{20}$ ,  $C_2-C_{30}$  alkiloksikarbonildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{20}$ ,  $C_3-C_8$  sikloalkiloksikarbonildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{20}$ ,  $C_7-C_{30}$  ariloksikarbonildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{20}$ ,  $C_8-C_{30}$  aralkiloksikarbonildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{20}$ , -
- 15  $P(=O)(R^{22})_2$ 'dir, burada her bir  $R^{22}$ ,  $C^6-C^{12}$  ariloksidir, örneğin, bazı uygulamalarda  $R^{20}$ , aşağıdaki yapıya (C24) sahiptir:



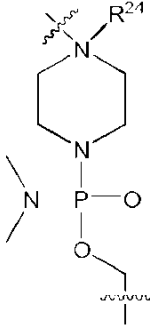
(C24)

- 20 Diğer uygulamalarda,  $R^{20}$ , bir veya birden fazla halo atomu içerir. Örneğin, bazı uygulamalarda,  $R^{20}$ , yukarıdaki  $R^{20}$  kısımlarının herhangi birinin bir perfloro analogunu içerir. Diğer uygulamalarda,  $R^{20}$ , p-trifluorometilfenildir, triflorometiltritildir, perfloropentildir veya pentaflorofenildir.

Bazı uygulamalarda, 3' ucu, bir modifikasyon içerir ve diğer uygulamalarda, 5' ucu, bir modifikasyon içerir. Diğer uygulamalarda, hem 3' hem de 5' uçları modifikasyonlar içerir. Bu doğrultuda, bazı uygulamalarda,  $R^{18}$ , yoktur ve  $R^{19}$ ,  $R^{20}$ 'dir. Diğer uygulamalarda,  $R^{19}$ , yoktur ve  $R^{18}$ ,  $R^{20}$ 'dir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{18}$ 'in ve  $R^{19}$ 'un her biri  $R^{20}$ 'dir.

Bazı uygulamalarda, oligomer, bir 3' veya 5' modifikasyonuna ek olarak bir hücreye-nüfuz etme peptidi içerir. Bu doğrultuda, bazı uygulamalarda,  $R^{19}$ , bir hücreye-nüfuz etme peptididir ve  $R^{18}$ ,  $R^{20}$ 'dir. Diğer uygulamalarda,  $R^{18}$ , bir hücreye-nüfuz etme peptididir ve  $R^{19}$ ,  $R^{20}$ 'dir. Yukarıdakilerin ilave uygulamalarında, hücreye-nüfuz etme peptidi, bir arjinin açısından zengin peptittir.

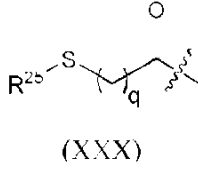
Bazı uygulamalarda, 5' ucu grubunu (yani,  $R^{19}$ ) oligomere bağlayan bağlayıcı  $L^1$ , mevcut olabilir veya olmayabilir. Bağlayıcının bunun 5' ucu grubunu oligomere bağlama yetisini muhafaza etmesi kaydıyla ve bağlayıcının oligomerin bir dizi spesifik şekilde bir hedef diziyi bağlama yetisine müdahale etmemesi kaydıyla, bağlayıcı çok sayıda fonksiyonel grup ve uzunluk içerir. Bir uygulamada, L, fosfordiamidat ve piperazin bağları içerir. Örneğin, bazı uygulamalarda, L, aşağıdaki yapıya (XXIX) sahiptir:



20 (XXIX)

burada  $R^{24}$ , yoktur, hidrojendir veya  $C_1$ - $C_6$  alkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{24}$ , yoktur. Bazı uygulamalarda,  $R^{24}$ , hidrojendir. Bazı uygulamalarda,  $R^{24}$ ,  $C_1$ - $C_6$  alkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{24}$ , metildir. Diğer uygulamalarda,  $R^{24}$ , etildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{24}$ ,  $C_3$  alkildir. Bazı başka uygulamalarda,  $R^{24}$ , izopropildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{24}$ ,  $C_4$  alkildir. Bazı uygulamalarda,  $R^{24}$ ,  $C_5$  alkildir. Daha başka uygulamalarda,  $R^{24}$ ,  $C_6$  alkildir.

Daha başka uygulamalarda,  $R^{20}$ ,  $C_3$ - $C_{30}$  alkilkarbonildir ve  $R^{20}$ , aşağıdaki yapıya (XXX) sahiptir:



5

burada  $R^{25}$ , hidrojenidir veya  $-SR^{26}$ 'dır, burada  $R^{26}$ , hidrojenidir,  $C_1$ - $C_{30}$  alkildir, heterosiklildir, arildir veya heteroarildir ve q, 0 ila 6 aralığındaki bir tam sayıdır.

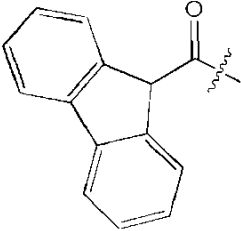
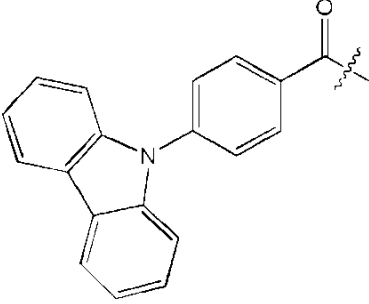
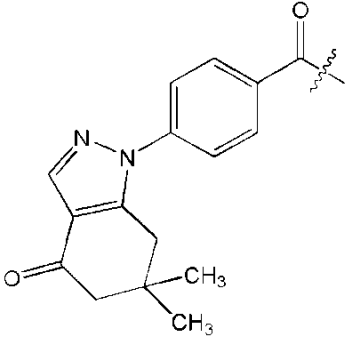
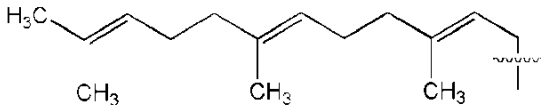
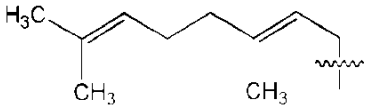
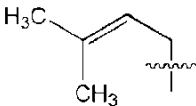
Yukarıdakilerin herhangi birinin ilave uygulamalarında,  $R^{23}$ , her bir bulunuşunda, bağımsız bir şekilde hidrojenidir, halodur,  $C_1$ - $C_{30}$  alkildir,  $C_1$ - $C_{30}$  alkoksidir, arildir, heteroarildir, heterosiklildir veya heterosiklalkildir.

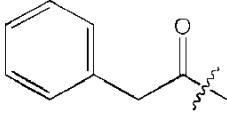
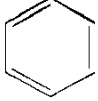
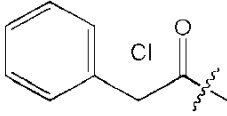
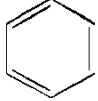
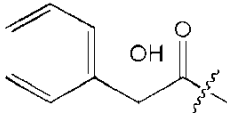
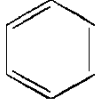
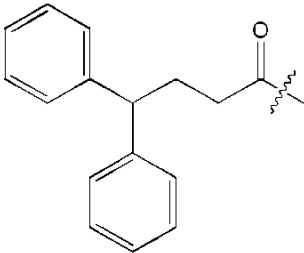
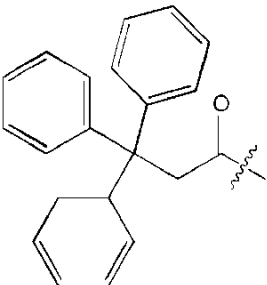
Bazı başka uygulamalarda, oligomerin yalnızca 3' ucu, yukarıda bildirilen grupların birine konjuge edilir. Bazı başka uygulamalarda, oligomerin yalnızca 5' ucu, yukarıda bildirilen grupların birine konjuge edilir. Diğer uygulamalarda, hem 3' hem de 5' uçları yukarıda bildirilen grupların birini içerir. Uç grup, yukarıda bildirilen grupların herhangi birinden veya Tablo 4'te gösterilen spesifik grupların herhangi birinden seçilebilir.

**Tablo 4. Temsili Uç Gruplar**

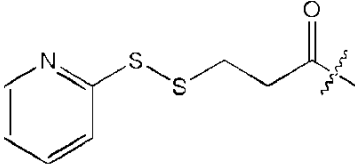
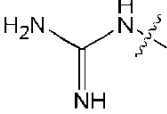
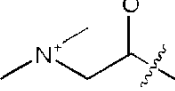
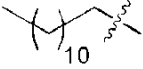
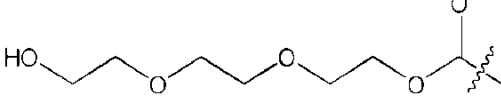
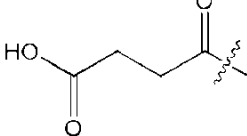
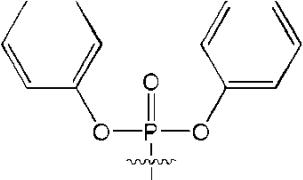
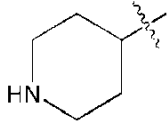
No.	Adı	Yapısı
C1	Trimetoksibenzoil	
C2	9-floren-karboksil	

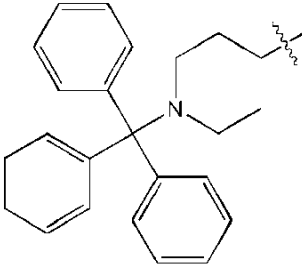
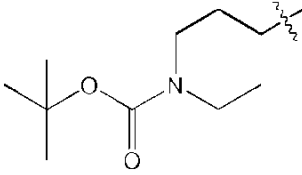
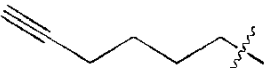
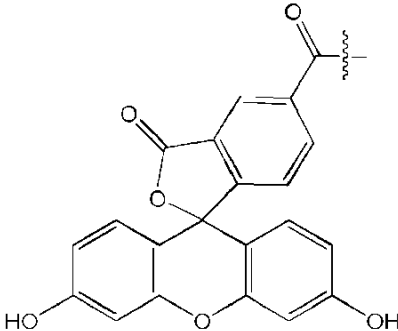
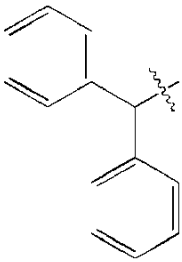


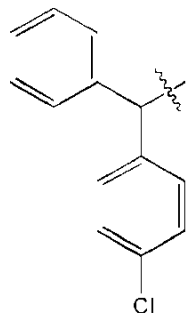
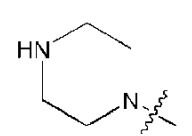
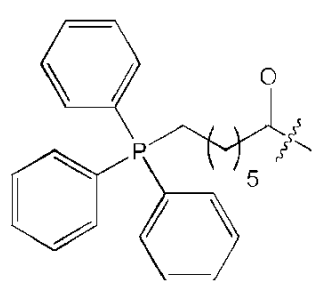
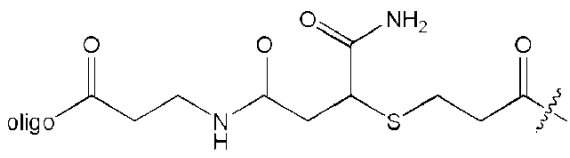
No.	Adı	Yapısı
		
C3	4-karbazolilbenzoil	
C4	4-indazolilolnbenzoil	
C5	Farnesil	
C6	Geranil	
C7	Prenil	
C8	Difenilasetil	

No.	Adı	Yapısı
		 
C9	Klorodifenilasetil	 
C10	Hidroksidifenilasetil	 
C11	Trifenilpropiyonil	
C12	Trifenilpropil	

No.	Adı	Yapısı
C13	Trifenilasetil	
C14	Tritil (Tr)	
C15	Metoksitritil (MeOTr)	
C16	Metilsüksinimidilsikloheksoil	
C17	Tiyoasetil	
C18	COCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SSPy	

No.	Adı	Yapısı
		
C19	Guanidiniil	
C20	Trimetilglisin	
C21	Lauroil	
C22	Trietilenglikolil (EG3)	
C23	Süksinikasetil	
C24	Difenilfosforil	
C25	Piperidin-4-il	
C26	Tritilpiperidin-4-il	

No.	Adı	Yapısı
		
C27	Boc-Piperidin-4-il	
C28	Hekzin-6-il	
C29	5-karboksifloresein	
C30	Benzhidril	
C31	p-Klorobenzhidril	

No.	Adı	Yapısı
		
C32	Piperazinil (pip)	
C33	Trifenilfos	
C34	Dimerize edilmiş	

Oligo = bir ilave oligomer

### Peptit Taşıyıcılar

- Buluşa göre, söz konusu oligomer, oligomerin hücrelere taşınmasını arttırmak için etkili olan bir hücreye-nüfuz etme peptidi taşıma kısmına konjuge edilir. Örneğin, bazı uygulamalarda, peptit taşıyıcı kısım, bir arjinin açısından zengin peptittir. İlave uygulamalarda, taşıma kısmı, oligomerin 5' veya 3' ucuna tutturulur. Bu tarz peptit uçların birine konjuge edildiğinde, akabinde karşı uç burada tarif edildiği üzere bir modifiye edilmiş uç gruba ilave konjugasyon için müsaittir.

Yukarıdaki için bazı uygulamalarda, peptit taşıma kısmı, X' alt-birimleri, Y' alt-birimleri ve Z' alt-birimleri arasından seçilen 6 ila 16 alt-birim içerir, burada

- 5 (a) her bir X' alt-birimi, bağımsız bir şekilde lizini, arjinini veya bir arjinin analogunu temsil eder, söz konusu analog,  $R^{33}N=C(NH_2)R^{34}$  yapısının bir yan zincirini içeren bir katyonik  $\alpha$ -amino asittir, burada  $R^{33}$ , H'dir veya R'dir;  $R^{34}$ ,  $R^{35}$ 'tir,  $NH_2$ 'dir,  $NHR$ 'dir veya  $NR_{34}$ 'tür, burada  $R^{35}$ , düşük alkildir veya düşük alkenildir ve ilaveten oksijen veya nitrojen içerebilir;  $R^{33}$  ve  $R^{34}$  birlikte bir halka oluşturabilir; ve yan zincir söz konusu amino aside  $R^{33}$  veya  $R^{34}$  vasıtasıyla bağlanır;

- 10 (b) her bir Y' alt-birimi, bağımsız bir şekilde bir nötral amino asidi  $-C(O)-(CHR)_n-NH-$  temsil eder, burada n, 2 ila 7 aralığındadır ve her bir R, bağımsız bir şekilde H'dir veya metildir; ve

15

- (c) her bir Z' alt-birimi, bağımsız bir şekilde bir nötral aralkil yan zincirine sahip olan bir  $\alpha$ -amino asidi temsil eder;

- 20 burada peptit,  $(X'Y'X')_p$ ,  $(X'Y')_m$  ve  $(X'Z'Z')_p$ 'nin biri ile temsil edilen bir diziyi içerir, burada p, 2 ila 5 aralığındadır ve m, 2 ila 8 aralığındadır.

- 25 Seçilmiş uygulamalarda, her bir X' için, yan zincir kısmı, amino asit alt-birimi arjininde (Arg) olduğu gibi, guanidildir. İlave uygulamalarda, her bir Y',  $-CO-(CH_2)_n-CHR-NH-$ 'dir, burada n, 2 ila 7 aralığındadır ve R, H'dir. Örneğin, n, 5 olduğunda ve R, H olduğunda, Y', burada Ahx olarak kısaltılan, bir 6-aminohekzanoik asit alt-birimidir; n, 2 olduğunda ve R, H olduğunda, Y', bir  $\beta$ -alanin alt-birimidir.

- 30 Belirli uygulamalarda, bu tipin peptitleri, tek Y' alt-birimleri ile dönüşümlü olarak bulunan arjinin dimerleri içerenleri içerir, burada Y', Ahx'tir. Örnekler,  $(RY'R)_p$  formülüne veya  $(RRY')_p$  formülüne sahip olan peptitleri içerir, burada Y', Ahx'tir. Bir uygulamada, Y', bir 6-aminohekzanoik asit alt-birimidir, R, arjinindir ve p, 4'tür.

İlave bir uygulamada, her bir Z', fenilalanindir ve m, 3'tür veya 4'tür.

Bazı uygulamalarda, konjuge edilmiş peptit, oligomerin bir ucuna bir bağlayıcı Ahx-B vasıtasıyla bağlanır, burada Ahx, bir 6-aminohekzanoik asit alt-birimidir ve B, bir  $\beta$ -alanin alt-birimidir.

5 Seçilmiş uygulamalarda, her bir X' için, yan zincir kısmı bağımsız bir şekilde, guanidilden (HN=C(NH<sub>2</sub>)NH-), amidinilden (HN=C(NH<sub>2</sub>)C-), 2-aminodihidropirimidilden, 2-aminotetrahidropirimidilden, 2-aminopiridinilden ve 2-aminopirimidonilden oluşan gruptan seçilir ve bu tercihen, guanidilden ve amidinilden seçilir. Bir uygulamada, yan zincir kısmı, amino asit alt-birimi arjininde (Arg) olduğu gibi, guanidildir.

10

Bazı uygulamalarda, Y' alt-birimleri, süreklidir, yani, Y' alt-birimleri arasına X' alt-birimleri girmez veya X' alt-birimleri arasına tek bir şekilde aralıklı konumlandırılmaz. Bununla birlikte, bazı uygulamalarda, bağlama alt-birimi, Y' alt-birimleri arasında olabilir. Bir uygulamada, Y' alt-birimleri peptit taşıyıcının bir ucundadır; diğer

15

uygulamalarda bunların iki yanında X' alt-birimleri yer alır. İlave uygulamalarda, her bir Y', -CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CHR-NH-'dir, burada n, 2 ila 7 aralığındadır ve R, H'dir. Örneğin, n, 5 olduğunda ve R, H olduğunda, Y', burada Ahx olarak kısaltılan bir 6-aminohekzanoik asit alt-birimidir. Bu grubun seçilmiş uygulamalarında, her bir X', bir arjinin alt-biriminde olduğu gibi, bir guanidil yan zincir kısmı içerir. Bu tipin emsal peptitleri, tek Y' alt-

20

birimleri ile dönüşümlü olarak bulunan arjinin dimerleri içerenleri içerir, burada Y', tercihen Ahx'tir. Örnekler, (RY'R)<sub>4</sub> formülüne veya (RRY')<sub>4</sub> formülüne sahip olan peptitleri içerir, burada Y', tercihen Ahx'tir. Bazı uygulamalarda, nükleik asit analogu, bir uç Y' alt-birimine, tercihen C-ucundan, bağlanır. Diğer uygulamalarda, bağlayıcı, AhxB yapısıdır, burada Ahx, bir 6-aminohekzanoik asit alt-birimidir ve B, bir  $\beta$ -alanin alt-

25

Yukarıda tarif edildiği üzere peptit taşıma kısımlarının, tutturulmuş taşıma kısmı yokluğunda oligomerin alımına kıyasla ve Y' hidrofobik alt-birimlerinden yoksun olan bir tutturulmuş taşıma kısmı ile alıma kıyasla tutturulmuş oligomerin hücreye girişini büyük ölçüde arttırdığını gösterilmiştir. Bu tarz artırılmış alım, Y' hidrofobik alt-birimlerinden yoksun olan bir tutturulmuş taşıma kısmı ile ajanın alımına kıyasla, bileşiğin memeli hücrelerine alımında en az bir iki-katlık artış veya diğer uygulamalarda, bir dört-katlık artış ile kanıtlanabilir. Bazı uygulamalarda, alım, konjuge edilmiş bileşiğe kıyasla, en az yirmi kat veya en az kırk kat arttırılır.

35



Peptit taşıma kısmının bir ilave yararı, bunun bir antisens oligomer ve bunun hedef nükleik asit dizisi arasındaki bir dubleksi stabilize etmesine yönelik beklenen yetisidir. Teoriye bağlı kalmadan, bunun bir dubleksi stabilize etme yetisi, pozitif yüklü taşıma kısmı ve negatif yüklü nükleik asit arasındaki elektrostatik etkileşimden kaynaklanabilir.

5 Bazı uygulamalarda, taşıyıcı içindeki yüklü alt-birimlerin sayısı, yüklü alt-birimlerin çok daha yüksek bir sayısı dizi özdeşliğinde bir düşüşe yol açabileceğinden, yukarıda bildirildiği üzere, 14'ten daha azdır veya diğer uygulamalarda, 8 ila 11 aralığındadır.

Mevcut açıklama ayrıca, peptit taşıma kısımlarının ve nükleik asit analoglarının konjugatlarını da katar. Yukarıda bildirildiği üzere, peptit taşıma kısımları genel olarak, nükleik asit analoglarının hücre nüfuzunu arttırmak için etkilidir. Başvuru sahipleri ayrıca, nükleik asit analogu ve peptit taşıma kısmının geri kalanı arasında (örneğin, taşıyıcı peptidin karboksi veya amino ucunda) bir glisin (G) veya prolin (P) amino asit alt-birimi içermenin, etkinlik aynı kalırken veya peptit taşıma kısmı ve nükleik asit analogu arasında farklı bağlantıları olan konjugatlara kıyasla iyileştirilirken, konjugatın toksisitesini azalttığını da keşfetmiştir. Böylelikle, mevcut şekilde açıklanan konjugatlar diğer peptit-oligomer konjugatlarına kıyasla bir daha iyi terapötik pencereye sahiptir ve daha çok umut vadeden ilaç adaylarıdır.

20 Azaltılmış toksisiteye ek olarak, nükleik asit analogu ve taşıyıcı peptit arasında bir glisin veya prolin amino asit alt-biriminin varlığının ilave avantajlar sağladığına inanılır. Örneğin, glisin ucuzdur ve herhangi bir rasemizasyon olasılığı olmadan nükleik asit analoguna (veya opsiyonel bağlayıcıya) kolaylıkla kuple edilir. Benzer şekilde, prolin rasemizasyon olmadan kolaylıkla kuple edilebilir ve ayrıca heliks oluşturucuları olmayan taşıyıcı peptitler de sağlar. Prolinin hidrofobitesisi ayrıca, taşıyıcın peptidin hücrelerin lipid ikili-tabakası ile etkileşimi açısından da belirli avantajlar sağlanabilir ve çok sayıda prolin içeren taşıyıcı peptitler (örneğin, bazı uygulamalarda) G-tetrapleks oluşuma direnebilir. Son olarak, belirli uygulamalarda, prolin kısmı bir arjinin amino asit alt-birimine bitişik olduğunda, arjinin-prolin amid bağı yaygın endopeptidazlar tarafından yarılamadığından, prolin kısmı konjugatlara metabolik kararlılık sağlar.

Bazı uygulamalarda, peptitlerin antisens oligonükleotidlere konjugasyonu, WO2012/1150960 PCT Yayını'nda tarif edildiği şekildedir. Özel bir uygulamada, örneğin, bir peptit konjuge edilmiş oligonükleotid, CPP ve antisens oligonükleotid arasında bağlayıcı olarak glisinden yararlanır. Örneğin, buluşun antisens

oligonükleotidleri, bir arjinin açısından zengin peptide, örneğin, (Arg)<sub>6</sub>Gly'ye, kuple edilebilir (bir oligonükleotide bağlanmış 6 arjinin ve 1 glisin).. Bir örnek olarak, bu peptit bir PMO'ya konjuge edilebilir ve "R<sub>6</sub>-G-PMO" olarak bilinir.

- 5 Çeşitli bağlayıcılar (C, G, P, Ahx, B) içeren ilave emsal arjinin açısından zengin hücreye-nüfuz etme peptidi taşıyıcıları aşağıda Tablo 5'te verilir. Yukarıda Tablo 2'de açıklandığı üzere, bir tercih edilen hücreye-nüfuz etme peptidi taşıyıcısı, bir glisin bağlayıcı (R<sub>6</sub>G) vasıtasıyla 3' ucundan bir PMO'ya konjuge edilmiş SEQ ID NO: 45'tir. R<sub>6</sub>G'nin 5' ucuna bağlantısı da tercih edilen bir uygulamadır.

10

**Tablo 5. Arjinin Açısından Zengin Hücreye-Nüfuz Etme Peptidi Taşıyıcıları**

ADI (GÖSTERİMİ)	DİZİSİ	SEQ ID NO. <sup>A</sup>
rTAT	RRRQRRKKR	39
Tat	RKKRRQRRR	40
R <sub>9</sub> F <sub>2</sub>	RRRRRRRRRFF	41
R <sub>5</sub> F <sub>2</sub> R <sub>4</sub>	RRRRFFRRRR	42
R <sub>4</sub>	RRRR	43
R <sub>5</sub>	RRRRR	44
R <sub>6</sub>	RRRRRR	45
R <sub>7</sub>	RRRRRRR	46
R <sub>8</sub>	RRRRRRRR	47
R <sub>9</sub>	RRRRRRRRR	48
(RX) <sub>8</sub>	RXRXRXRXRXRXR	49
(RAhxR) <sub>4</sub> ; (P007)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	50
(RAhxR) <sub>5</sub> ; (CP04057)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	51
(RAhxRRBR) <sub>2</sub> ; (CP06062)	RAhxRRBRRAhxRRBR	52
(RAR) <sub>4</sub> F <sub>2</sub>	RARRARRARRARFFC	53

ADI (GÖSTERİMİ)	DİZİSİ	SEQ ID NO. <sup>A</sup>
(RGR) <sub>4</sub> F <sub>2</sub>	RGRRGRRGRRGRFFC	54

<sup>A</sup>SEQ ID NO.'larına tayin edilen diziler, bağlantı kısmı (*örneğin*, C, G, P, Ahx, B, AhxB, burada Ahx ve B sırasıyla, 6-aminohekzanoik asidi ve beta-alanini ifade eder) içermez.

### İn Vitro Kullanım Yöntemleri

5 Bir başka yönünde, bir veya birden fazla mRNA izorformunun ve/veya mutant proteinin ekspresyonunu yararlı bir şekilde azaltmak için bir hücreyi veya dokuyu in vitro tedavi etmek için burada tarif edilen LMNA ve/veya HGPS-hedefli antisens oligonükleotidlerin kullanımının yöntemleri mevcut buluşun bağlamında açıklanır. Mevcut buluşun antisens oligonükleotidleri tarafından modüle edilebilen hücreler veya doku tercihen memeli hücreleridir veya daha tercihen insan hücreleridir. Bu tarz hücreler, *örneğin*, 10 progerin eksprese eden hücreler, bir sağlıklı halde veya bir hastalıklı halde olabilir. Belirli yönlerinde, hücre, bir progeroid laminopati ile sonuçlanan, progerin eksprese eden bir hücredir.

15 Bundan dolayı genel olarak, anormal bir şekilde uçları-birleştirilmiş LMNA mRNA'sının in vitro ekspresyonunu azaltmak için, bir hücreyi burada tarif edilen bir veya birden fazla antisens oligonükleotidi veya bunları içeren bir bileşim ile temas ettirmeyi, böylece progerinin ekspresyonunu azaltmayı, içeren yöntemler mevcut buluşun bağlamında açıklanır. Bu ve ilgili yöntemler, burada tarif edilen ve teknikte bilinen mutant LMNA mRNA'sı izoformlarının herhangi birinin veya birden fazlasının ekspresyonunu 20 azaltmak için kullanılabilir.

İn vitro yöntemler, farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcılar ile kombinasyon halinde, oligonükleotidleri içeren bileşimleri kullanabilir. "Farmasötik olarak kabul edilebilir" ifadesi, sağlam tıbbi muhakeme kapsamında, bir akla uygun yarar/risk oranı ile orantılı olarak, aşırı toksisite, iritasyon, alerjik yanıt veya başka problem veya komplikasyon 25 olmadan hücreler ve/veya dokular ile temas halinde kullanım için uygun olan bileşikler, materyalleri, bileşimleri ve/veya dozaj formlarını ifade etmek için burada kullanılır.

Burada kullanıldığı şekliyle, "farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı" ifadesi, bir farmasötik olarak-kabul edilebilir materyal, bileşim veya vehikül, örneğin, bir sıvı veya katı dolgu, diluent, ekspiyan, üretim yardımcısı (örneğin, yağlayıcı, talk magnezyum, kalsiyum veya çinko stearat veya sterik asit) veya çözücü enkapsüle etme materyali, anlamına gelir. Her bir taşıyıcı, formülasyonun diğer içerik maddeleri ile uyumlu olma ve temas edilmekte olan hücreye veya dokuya zararlı olmama anlamında "kabul edilebilir" olmak zorundadır.

Farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcılar görevi görebilen materyallerin bazı örnekleri, sınırlandırma olmaksızın, aşağıdakileri içerir: (1) şeker, örneğin, laktoz, glikoz ve sükroz; (2) nişastalar, örneğin, mısır nişastası ve patates nişastası; (3) selüloz ve bunun türevleri, örneğin, sodyum karboksimetil selüloz, etil selüloz ve selüloz asetat; (4) toz haline getirilmiş kitre; (5) malt; (6) jelatin; (7) talk; (8) ekspiyanlar, örneğin, kakao yağı ve süpozituar mumlar; (9) sıvı yağlar, örneğin, yer fıstığı yağı, pamuk tohumu yağı, aspir yağı, susam yağı, zeytinyağı, mısır yağı ve soya fasulyesi yağı; (10) glikoller, örneğin, propilen glikol; (11) polioller, örneğin, gliserin, sorbitol, mannitol ve polietilen glikol; (12) esterler, örneğin, etil oleat ve etil laurat; (13) agar; (14) tamponlama ajanları, örneğin, magnezyum hidroksit ve alüminyum hidroksit; (15) aljinik asit; (16) pirojensiz su; (17) izotonik salin; (18) Ringer çözeltisi; (19) etil alkol; (20) pH tamponlu çözeltiler; (21) poliesterler, polikarbonatlar ve/veya polianhidritler; ve (22) farmasötik formülasyonlarda kullanılan diğer toksik-olmayan uyumlu maddeler.

Yukarıdaki buluşun, anlaşılmanın berraklığı amaçları için açıklama ve örnek yoluyla bazı detaylar ile tarif edilmiş olmasına rağmen, bu buluşun öğretileri ışığında, ekli istemlerin kapsamı içinde buna belirli değişimlerin ve modifikasyonların yapılabileceği teknikte normal uzmanlığı olan bir kişi tarafından kolaylıkla görülecektir. Aşağıdaki örnekler yalnızca örnek olarak gösterilir ve sınırlandırma olarak gösterilmez. Teknikte uzmanlığı olan kişiler, esas olarak benzer sonuçları üretmek için değiştirilebilir veya modifiye edilebilir çeşitli kritik-olmayan parametreleri kolaylıkla fark edecektir.

30

### DİZİ LİSTESİ TABLOSU

ADI	DİZİ	SEQ ID NO:
LMNA ekzon 11		1

ADI	Dizi	SEQ ID NO:
	<p>GGCTCCCACTGCAGCAGCTGGGGGACCCCGCTGAGTA  CAACCTGGGCTCGCGCACCGTGTGTGCGGGACCTGGG  GGCAGCC TGCAGACAAGGCATCTGCCAGGGCTCAGGA  GCCAGGTGGGCGGACCCATCTCCTCTGGGTCTTCTGC  CTCCAGTGTACCGTCACTCGCAGCTACCGCAGTGTGG  GGGGCAGTGGGGGTGGCAGCTTCGGGGACAATCTGGTC  ATCCGCTCCTACCTCCTGGGCAACTCCAGCCCCGAAAC  CCAG</p>	
HGPS ekzon 11	<p>GGCTCCCACTGCAGCAGCTGGGGGACCCCGCTGAGTA  CAACCTGGGCTCGCGCACCGTGTGTGCGGGACCTGGG  GGCAGCC TGCAGACAAGGCATCTGCCAGGGCTCAGGA  GCCAGGTGGG<b>T</b>GGACCCATCTCCTCTGGGTCTTCTGC  CTCCAGTGTACCGTCACTCGCAGCTACCGCAGTGTGG  GGGGCAGTGGGGGTGGCAGCTTCGGGGACAATCTGGTC  ATCCGCTCCTACCTCCTGGGCAACTCCAGCCCCGAAAC  CCAG</p>	2
Exo11.25.133	CCGCTGGCAGATGCCTTGTGCGGCAG	3
Exo11.25.138	CTGAGCCGCTGGCAGATGCCTTGTG	4*
Exo11.25.142	GCTCCTGAGCCGCTGGCAGATGCCT	5*
Exo11.25.145	TGGGCTCCTGAGCCGCTGGCAGATG	6
Exo11.25.149	CACCTGGGCTCCTGAGCCGCTGGCA	7
Exo11.25.154	CCACCCACCTGGGCTCCTGAGCCGC	8
Exo11.25.158	GGGTCCACCCACCTGGGCTCCTGAG	9
Exo11.25.162	AGATGGGTCCACCCACCTGGGCTCC	10*
Exo11.25.166	GAGGAGATGGGTCCACCCACCTGGG	11*
Exo11.25.170	GCCAGAGGAGATGGGTCCACCCACC	12
Exo11.25.174	AAGAGCCAGAGGAGATGGGTCCACC	13*
Exo11.25.177	CAGAAGAGCCAGAGGAGATGGGTCC	14*
Exo11.25.181	GAGGCAGAAGAGCCAGAGGAGATGG	15
Exo11.25.185	ACTGGAGGCAGAAGAGCCAGAGGAG	16*
Exo10SD.25.69	ACGTGGTGGTGGTGGAGCAGGTCAT	17

ADI	Dizí	SEQ ID NO:
Exo10SD.25.73	ACTCACGTGGTGGTGGTGGAGCAGG	18
Exo10SD.25.79	GCTACCACTCACGTGGTGGTGGTGG	19
Exo10SD.25.84	CGGCGGCTACCACTCACGTGGTGGT	20
Exo10SD.25.87	CAGCGGCGGCTACCACTCACGTGGT	21
Exo10SD.25.90	CCTCAGCGGCGGCTACCACTCACGT	22
Exo10SD.25.92	GGCCTCAGCGGCGGCTACCACTCAC	23
Exo10SD.25.96	GCTCGGCCTCAGCGGCGGCTACCAC	24
Exo11SA.25.779	CGAGTCTGGGACTGACCACTCAGGC	25
Exo11SA.25.796	AGGCTCAGGCGGGACGGCGAGTCTG	26
Exo11SA.25.801	AGACAAGGCTCAGGCGGGACGGCGA	27
Exo11SA.25.805	AGGGAGACAAGGCTCAGGCGGGACG	28
Exo11SA.25.809	GGGAAGGGAGACAAGGCTCAGGCGG	29
Exo11SA.25.814	GCCCTGGGAAGGGAGACAAGGCTCA	30
Exo11SA.25.820	GTGGGAGCCCTGGGAAGGGAGACAA	31
Exo11SA.25.828	CTGCTGCAGTGGGAGCCCTGGGAAG	32
Exo11SA.25.830	AGCTGCTGCAGTGGGAGCCCTGGGA	33
Exo11SA.25.836	CCCCGAGCTGCTGCAGTGGGAGCC	34
HsEx10	GCTACCACTCACGTGGTGGTGGTGG-AcR <sub>6</sub> G	35
HsEx11	GGGTCCACCCACCTGGGCTCCTGAG-AcR <sub>6</sub> G	36
HsEx10-apn	GC <sup>apn</sup> TACCAC <sup>apn</sup> TCACG <sup>apn</sup> TGGTGG <sup>apn</sup> TGATGG	37
HsEx11-apn	GGG <sup>apn</sup> TCCACCCACC <sup>apn</sup> TGGGC <sup>apn</sup> TCC <sup>apn</sup> TGAG	38
rTAT	RRRQRRKKR	39*
Tat	RKKRRQRRR	40*

ADI	DİZİ	SEQ ID NO:
R <sub>9</sub> F <sub>2</sub>	RRRRRRRRRFF	41*
R <sub>5</sub> F <sub>2</sub> R <sub>4</sub>	RRRRRFFRRRR	42*
R <sub>4</sub>	RRRR	43*
R <sub>5</sub>	RRRRR	44*
R <sub>6</sub>	RRRRRR	45*
R <sub>7</sub>	RRRRRRR	46*
R <sub>8</sub>	RRRRRRRR	47*
R <sub>9</sub>	RRRRRRRRR	48*
(RX) <sub>8</sub>	RXRXRXRXRXRXRXR	49*
(RAhxR) <sub>4</sub> ; (P007)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	50*
(RAhxR) <sub>5</sub> ; (CP04057)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	51*
(RAhxRRBR) <sub>2</sub> ; (CP06062)	RAhxRRBRRAhxRRBR	52*
(RAR) <sub>4</sub> F <sub>2</sub>	RARRARRARRARFFC	53*
(RGR) <sub>4</sub> F <sub>2</sub>	RGRRGRRGRRGRFFC	54*

\* istemler tarafından kapsanır

## ÖRNEKLER

### ÖRNEK 1

5

#### ***HGPS HÜCRELERİNİN LMNA'YI HEDEF ALAN ANTİSENS OLİGONÜKLEOTİDLER KULLANILAN MUAMELESİ***

İki primer fibroblast, HGPS fibroblastları (HGADFN167) ve kontrol fibroblastları (HGDFN168), kullanılmıştır. HGPS ve kontrol hücreleri, yaklaşık 10.000 hücre/göz olan yoğunlukta bir 24-gözlü tabağa ekilmiştir. Lamin-A pre-mRNA'sının ekzonları 11'e ve/veya 10'a hedeflenmiş morfolino oligonükleotidleri, kültürlenmiş HGPS hücrelerine

10

serbest alım ile veya nükleofeksiyon (Amaya, örneğin) ile münferit olarak uygulanmıştır. Serbest alım için, hücreler 25 µM veya 50 µM veya 80 µM PMO oligonükleotid içeren bir vasat içinde 1-2 hafta boyunca kültürlenmiştir. Bu hücreler akabinde anti-progerin veya anti-lamin A/C antikoru ile immünoflüoresans ile taranmıştır. Progerin boyamanın flüoresans yoğunlukları, Zeiss flüoresans mikroskobu ve bir SPOT programı kullanılarak kantifiye edilmiştir. Deneyler, üç kopya halinde gerçekleştirilmiştir ve progerini aşağı yönde regüle etmede etkiler gösteren PMO'lar ilave analiz için seçilmiştir. Analiz progerin-spesifik primer ile kantitatif RT-PCR'yi ve anti-progerin antikoru ile Western blotlama analizini içermiştir.

10

## ÖRNEK 2

### ***LMNA'YI HEDEF ALAN ANTİSENS OLİGONÜKLEOTİDLER İLE MUAMELEYİ TAKİBEN HGPS HÜCRELERİNİN İMMÜNOFLÜORESANS BOYAMASI***

15

*İmmünoflüoresans Boyama:* İmmünoflüoresans için, hücreler 4-göz bölmeli lamlara tohumlanmıştır. %4 paraformaldehit/PBS içinde oda sıcaklığında 15 dakika boyunca fiksasyondan sonra, hücreler oda sıcaklığında 5 dakika boyunca %0,5 Triton X-100/PBS ile geçirgen hale getirilmiştir, bunu bloke etme çözeltisi içinde 4°C'de gece boyu inkübasyon izlemiştir (Bloke etme çözeltisi: %4 BSA/TBS). Hücreler, sonraki gün oda sıcaklığında 3 saat boyunca fare monoklonal anti-lamin A/C (MAB3211, Chemicon) ve tavşan poliklonal anti-progerin (alışıl gelmiş peptit antikoru, Yenzm) ile boyanmıştır. Primer antikorlar, Alexa Fluor-etiketli sekonder antikorlar (Invitrogen) ile saptanmıştır. DAPI içeren Vectashield gömme vasatı ile gömülmüş lamlar, bir Zeiss flüoresans mikroskobu ile gözlenmiştir. Maruziyet süreleri ve edinim ayarları deneylerin her bir setinin başlangıcında belirlenmiştir ve tüm muameleler için sabit tutulmuştur. Deneylerin sonuçları Şekil 2'de izah edilir. Oligonükleotidlerin bir kaçı progerini anlamlı bir şekilde aşağı-yönde regüle etmiştir.

20

## ÖRNEK 3

### ***LMNA'YI HEDEF ALAN ANTİSENS OLİGONÜKLEOTİDLER İLE MUAMELEYİ TAKİBEN HGPS HÜCRELERİNİN SDS-PAGE VE WESTERN BLOTLAMA ANALİZİ***

25

30



*SDS-PAGE ve Western Blotlama analizi:* Muamele edilmiş hücreler toplanmıştır, PBS ile iki kere durulanmıştır ve akabinde Laemmli SDS-PAGE yükleme tamponu içinde lize edilmiştir. Numuneler, 95°C'de 15 dakika boyunca ısıtılmıştır ve akabinde %10'luk SDS-PAGE jellerine yüklenmiştir. Western blot analizi için olduğu gibi, proteinler nitroselüloz membranlara transfer edilmiştir. Membranlar, 4°C'de gece boyu %5 süt/TBST ile bloke edilmiştir ve %4 BSA/TBST içinde seyreltilmiş primer antikolar ile oda sıcaklığında 1-3 saat boyunca inkübe edilmiştir. TBST ile yıkamalardan sonra, membranlar %1 süt/TBST içinde 1:5000 seyreltilmiş sekonder antikolar içinde oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Kemilüminesans bir ECL western blotlama saptama kiti (Pierce) ile saptanmıştır. Kullanılan primer antikolar, fare monoklonal anti-lamin A/C'yi (MAB3211, Chemicon), tavşan poliklonal anti-progerini (alışıl gelmiş peptit antikor, Yenzm) ve tavşan poliklonal anti-aktini (Pan-aktin, Cell Signaling) içerir. Deneyle sonuçları Şekil 3'te izah edilir. 699'a (SEQ ID NO: 4) karşılık gelen oligonükleotid, bunun LMNA'nın ekzon 11 kriptik uç-birleştirme yerinden uzaklaştırılmış olmasına veya bununla kesişmemesine rağmen, deneyde progerinin anlamlı aşağı-yönde regülasyonunu göstermiştir.

#### ÖRNEK 4

#### 20 **LMNA'YI HEDEF ALAN ANTİSENS OLİGONÜKLEOTİDLER İLE MUAMELEYİ TAKİBEN HGPS HÜCRELERİNİN KANTİTATİF RT-PCR ANALİZİ**

*Kantitatif RT-PCR:* Kantitatif RT-PCR (qRT-PCR) deneyleri, oligonükleotid 699 (SEQ ID NO: 4) ve 706 (SEQ ID NO: 11) ile muameleyi takiben 164 fibroblastta (p13, klasik HGPS) progerinin, lamin A'nın ve  $\beta$ -aktinin ekspresyon düzeylerini ölçmek için gerçekleştirilmiştir. Tüm reaksiyonlar üreticinin talimatlarına göre SYBR Green mix (Qiagen) kullanılarak bir Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System üzerinde üç kopya halinde yürütülmüştür. Reaksiyon koşulları aşağıdaki şekildedir: 50°C'de 2 dakikalık 1 siklus; 95°C'de 15 dakikalık 1 siklus; ve 95°C'de 15 saniyelik, 57°C'de 1 dakikalık; ve 72°C'de 45 saniyelik 40 siklus.  $\beta$ -aktin ileri primeri için dizi, TCTTTGCAGCCACATTCCCG'dir ve geri primer, GGCTTGCGGGTGTAAAGC'dir. Progerin/lamin A'yı çoğaltmak için ileri primerin dizisi, GCAACAAGTCCAATGAGGACCA'dır. Progerin- ve lamin A-spesifik geri primerler, amplifikasyon-refrakter mutasyon sistemi stratejine göre, özgüllüğü arttırmak için sondaki bir önceki baza bir mutasyon uygulama ile, tasarlanmıştır. Progerin-spesifik

primer dizisi, CATGATGCTGCAGTTCTGGGGGCTCTGGAC'dir ve lamin A için bu, CATGATGCTGCAGTTCTGGGGGCTCTGGAT'dir. Deneylein sonuçları Şekil 4'te izah edilir.

## 5 ÖRNEK 5

### ***LMNA'YI HEDEF ALAN ANTİSENS OLİGONÜKLEOTİDLER İLE MUAMELEYİ TAKİBEN HGPS HÜCRELERİNİN SDS-PAGE VE WESTERN BLOTLAMA ANALİZİ***

10 *SDS-PAGE ve Western Blotlama analizi:* Muamele edilmiş hücreler toplanmıştır, PBS ile iki kere durulanmıştır ve akabinde Laemmli SDS-PAGE yükleme tamponu içinde lize edilmiştir. Örnekler, 95°C'de 15 dakika boyunca ısıtılmıştır ve akabinde %10'luk SDS-PAGE jellerine yüklenmiştir. Western blot analizi için olduğu gibi, proteinler nitroselüloz membranlara transfer edilmiştir. Membranlar, 4°C'de gece boyu %5 süt/TBST ile bloke edilmiştir ve %4 BSA/TBST içinde seyreltilmiş primer antikolar ile oda sıcaklığında 1-3  
15 saat boyunca inkübe edilmiştir. TBST ile yıkamalardan sonra, membranlar %1 süt/TBST içinde 1:5000 seyreltilmiş sekonder antikolar içinde oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Kemilüminesans bir ECL western blotlama saptama kiti (Pierce) ile saptanmıştır. Kullanılan primer antikolar, fare monoklonal anti-lamin A/C'yi  
20 (MAB3211, Chemicon), tavşan poliklonal anti-progerini (alışlagelmiş peptit antikor, Yenzm) ve yaban turpu peroksidazı (HRP)-konjuge edilmiş anti-aktini (Sigma) içerir. Deneylein sonuçları Şekil 5'te izah edilir. Oligonükleotid 699 (SEQ ID NO: 4), bunun LMNA'nın ekzon 11 kriptik uç-birleştirme yerinden uzaklaştırılmış olmasına ve bununla kesişmemesine rağmen, progerinin bir aşağı-yönde regülasyonuna ve lamin A'nın bir  
25 yukarı-yönde regülasyonuna sebebiyet vermiştir.

## **REFERANSLAR**

30 Cao, K., C. D. Blair, et al. (2011). "Progerin and telomere dysfunction collaborate to trigger cellular senescence in normal human fibroblasts." J Clin Invest.

Egholm, M., O. Buchardt, et al. (1993). "PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules." Nature **365**(6446): 566-8.

Kinali, M., V. Arechavala-Gomez, et al. (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.

Osorio, F. G., C. L. Navarro, et al. (2011). "Splicing-directed therapy in a new mouse model of human accelerated aging." Sci Transl Med **3**(106): 106ra107.

10 Scaffidi, P. and T. Misteli (2005). "Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome." Nat Med **11**(4): 440-5.

Svasti, S., T. Suwanmanee, et al. (2009). "RNA repair restores hemoglobin expression in IVS2-654 thalassemic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(4): 1205-10.

15

## **DİZİ LİSTESİ**

<110> Sarepta Therapeutics, Inc.

20 <120> İNSAN LMNA'SINI HEDEF ALAN OLİGONÜKLEOTİD ANALOGLARI

<130> 120178.494WO

<150> US 61/568,590

25 < 151> 2011-12-08

<160> 54

<170> PatentIn versiyonu 3.5

30

<210> 1

< 211> 270

< 212> DNA

< 213> Yapay

35

<220>

< 223> Örnek LMNA Hedef Dizisi

<400> 1

```

ggctcccact gcagcagctc gggggacccc gctgagtaca acctgcgctc gcgcaccgtg      60
ctgtgcggga cctgcgggca gcctgccgac aagccatctg ccagcggctc aggagcccag      120
gtgggcggac ccattctctc tggctcttct gccctcagtg tcacggtcac tcgcagctac      180
cgcagtgtgg ggggcagtg ggggtggcagc ttcggggaca atctggtcac ccgctcctac      240
5 ctctgggca actccagccc ccgaaccag      270

```

<210> 2

< 211> 270

< 212> DNA

10 < 213> Yapay

<220>

< 223> Örnek LMNA Hedef Dizisi

15 <400> 2

```

ggctcccact gcagcagctc gggggacccc gctgagtaca acctgcgctc gcgcaccgtg      60
ctgtgcggga cctgcgggca gcctgccgac aagccatctg ccagcggctc aggagcccag      120
gtgggtggac ccattctctc tggctcttct gccctcagtg tcacggtcac tcgcagctac      180
cgcagtgtgg ggggcagtg ggggtggcagc ttcggggaca atctggtcac ccgctcctac      240
ctctgggca actccagccc ccgaaccag      270

```

<210> 3

< 211> 25

20 < 212> DNA

< 213> Yapay

<220>

< 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

25

<400> 3

ccgctggcag atgcctgtc ggcag 25

<210> 4

< 211> 25

< 212> DNA

< 213> Yapay

5

<220>

< 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

<400> 4

10 ctgagccgct ggcagatgcc ttgtc 25

<210> 5

< 211> 25

< 212> DNA

15 < 213> Yapay

<220>

< 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

20 <400> 5

gctcctgagc cgctggcaga tgcct 25

<210> 6

< 211> 25

25 < 212> DNA

< 213> Yapay

<220>

< 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

30

<400> 6

tgggctcctg agccgctggc agatg 25

<210> 7

35 < 211> 25

< 212> DNA

< 213> Yapay

<220>

5 < 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

<400> 7

cacctgggct cctgagccgc tggca 25

10 <210> 8

< 211> 25

< 212> DNA

< 213> Yapay

15 <220>

< 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

<400> 8

ccaccacct gggctcctga gccgc 25

20

<210> 9

< 211> 25

< 212> DNA

< 213> Yapay

25

<220>

< 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

<400> 9

30 ggggccacc accctgggctc ctgag 25

<210> 10

< 211> 25

< 212> DNA

35 < 213> Yapay

<220>

< 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

5 <400> 10  
agatgggtcc acccacctgg gctcc 25

<210> 11

< 211> 25

10 < 212> DNA  
< 213> Yapay

<220>

< 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

15  
<400> 11  
gaggagatgg gtccaccac ctggg 25

<210> 12

20 < 211> 25  
< 212> DNA  
< 213> Yapay

<220>

25 < 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

<400> 12  
gccagaggag atgggtccac ccacc 25

30 <210> 13  
< 211> 25  
< 212> DNA  
< 213> Yapay

<220>

< 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

<400> 13

5 aagagccaga ggagatgggt ccacc 25

<210> 14

< 211> 25

< 212> DNA

10 < 213> Yapay

<220>

< 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

15 <400> 14

cagaagagcc agaggagatg ggtcc 25

<210> 15

< 211> 25

20 < 212> DNA

< 213> Yapay

<220>

< 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

25

<400> 15

gaggcagaag agccagagga gatgg 25

<210> 16

30 < 211> 25

< 212> DNA

< 213> Yapay

<220>

35 < 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi



<400> 16

actggaggca gaagagccag aggag 25

5 <210> 17

< 211> 25

< 212> DNA

< 213> Yapay

10 <220>

< 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

<400> 17

acgtggtggt gatggagcag gtcac 25

15

<210> 18

< 211> 25

< 212> DNA

< 213> Yapay

20

<220>

< 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

<400> 18

25 actcacgtgg tggatgga gcagg 25

<210> 19

< 211> 25

< 212> DNA

30 < 213> Yapay

<220>

< 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

<400> 19  
 gctaccactc acgtggtggt gatgg 25

<210> 20  
 5 < 211> 25  
 < 212> DNA  
 < 213> Yapay

<220>  
 10 < 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

<400> 20  
 cggcggctac cactcacgtg gtggt 25

15 <210> 21  
 < 211> 25  
 < 212> DNA  
 < 213> Yapay

20 <220>  
 < 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

<400> 21  
 cagcggcggc taccactcac gtggt 25

25  
 <210> 22  
 < 211> 25  
 < 212> DNA  
 < 213> Yapay

30  
 <220>  
 < 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

<400> 22  
 35 cctcagcggc ggctaccact cacgt 25

<210> 23

< 211> 25

< 212> DNA

5 < 213> Yapay

<220>

< 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

10 <400> 23

ggcctcagcg gcggtacca ctcac 25

<210> 24

< 211> 25

15 < 212> DNA

< 213> Yapay

<220>

< 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

20

<400> 24

gctcggcctc agcggcggct accac 25

<210> 25

25 < 211> 25

< 212> DNA

< 213> Yapay

<220>

30 < 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

<400> 25

cgagtctggg actgaccact caggc 25

<210> 26

< 211> 25

< 212> DNA

< 213> Yapay

5

<220>

< 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

<400> 26

10 aggctcaggc gggacggcga gtctg 25

<210> 27

< 211> 25

< 212> DNA

15 < 213> Yapay

<220>

< 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

20 <400> 27

agacaaggct caggcgggac ggcga 25

<210> 28

< 211> 25

25 < 212> DNA

< 213> Yapay

<220>

< 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

30

<400> 28

agggagacaa ggctcaggcg ggacg 25

<210> 29

35 < 211> 25

< 212> DNA

< 213> Yapay

<220>

5 < 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

<400> 29

gggaagggag acaaggctca ggcgg 25

10 <210> 30

< 211> 25

< 212> DNA

< 213> Yapay

15 <220>

< 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

<400> 30

gccctgggaa gggagacaag gctca 25

20

<210> 31

< 211> 25

< 212> DNA

< 213> Yapay

25

<220>

< 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

<400> 31

30 gtgggagccc tgggaagga gacaa 25

<210> 32

< 211> 25

< 212> DNA

35 < 213> Yapay

<220>

< 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

5 <400> 32  
ctgctgcagt gggagccctg ggaag 25

<210> 33

< 211> 25

10 < 212> DNA  
< 213> Yapay

<220>

< 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

15  
<400> 33  
agctgctgca gtgggagccc tggga 25

<210> 34

20 < 211> 25  
< 212> DNA  
< 213> Yapay

<220>

25 < 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

<400> 34  
cccccgagct gctgcagtgg gagcc 25

30 <210> 35  
< 211> 26  
< 212> DNA  
< 213> Yapay

<220>

< 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

<220>

5 < 221> çeşitli\_özellik

< 222> (26)..(26)

< 223> n = tercih edilen bir hücreye nüfuz eden peptit transportörü

<400> 35

10 gctaccactc acgtggtggt gatggn 26

<210> 36

< 211> 26

< 212> DNA

15 < 213> Yapay

<220>

< 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

20 <220>

< 221> çeşitli\_özellik

< 222> (26)..(26)

< 223> n = tercih edilen bir hücreye nüfuz eden peptit transportörü

25 <400> 36

gggtccaccc acctgggctc ctgagn 26

<210> 37

< 211> 25

30 < 212> DNA

< 213> Yapay

<220>

< 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi

35

- <220>  
 < 221> çeşitli\_özellik  
 < 222> (3)..(3)  
 < 223> n = bir apn alt birimler arası bağı
- 5
- <220>  
 < 221> çeşitli\_özellik  
 < 222> (9)..(9)  
 < 223> n = bir apn alt birimler arası bağı
- 10
- <220>  
 < 221> çeşitli\_özellik  
 < 222> (14)..(14)  
 < 223> n = bir apn alt birimler arası bağı
- 15
- <220>  
 < 221> çeşitli\_özellik  
 < 222> (20)..(20)  
 < 223> n = bir apn alt birimler arası bağı
- 20
- <400> 37  
 gcnaccacnc acgnggtggn gatgg 25
- <210> 38
- 25 < 211> 25  
 < 212> DNA  
 < 213> Yapay
- <220>
- 30 < 223> Örnek HPGS Hedef Dizisi
- <220>  
 < 221> çeşitli\_özellik  
 < 222> (4)..(4)
- 35 < 223> n = bir apn alt birimler arası bağı



<220>

< 221> çeşitli\_özellik

< 222> (14)..(14)

5 < 223> n = bir apn alt birimler arası bağı

<220>

< 221> çeşitli\_özellik

< 222> (19)..(19)

10 < 223> n = bir apn alt birimler arası bağı

<220>

< 221> çeşitli\_özellik

< 222> (22)..(22)

15 < 223> n = bir apn alt birimler arası bağı

<400> 38

gggnccaccc accngggcnc cngag 25

20 <210> 39

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Yapay

25 <220>

< 223> Arjininden Zengin Hücreye Nüfuz Eden Peptit Transportörü

<400> 39

Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg  
1 5

30

<210> 40

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Yapay

35

&lt;220&gt;

&lt; 223&gt; Arjininden Zengin Hücreye Nüfuz Eden Peptit Transportörü

&lt;400&gt; 40

5 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
1 5

&lt;210&gt; 41

&lt; 211&gt; 11

&lt; 212&gt; PRT

10 &lt; 213&gt; Yapay

&lt;220&gt;

&lt; 223&gt; Arjininden Zengin Hücreye Nüfuz Eden Peptit Transportörü

15 &lt;400&gt; 41

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe  
1 5 10

&lt;210&gt; 42

&lt; 211&gt; 11

20 &lt; 212&gt; PRT

&lt; 213&gt; Yapay

&lt;220&gt;

&lt; 223&gt; Arjininden Zengin Hücreye Nüfuz Eden Peptit Transportörü

25

&lt;400&gt; 42

Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Arg Arg Arg Arg  
1 5 10

&lt;210&gt; 43

30 &lt; 211&gt; 4

&lt; 212&gt; PRT

&lt; 213&gt; Yapay

<220>

< 223> Arjininden Zengin Hücreye Nüfuz Eden Peptit Transportörü

<400> 43

5 Arg Arg Arg Arg  
1

<210> 44

< 211> 5

< 212> PRT

10 < 213> Yapay

<220>

< 223> Arjininden Zengin Hücreye Nüfuz Eden Peptit Transportörü

15 <400> 44

Arg Arg Arg Arg Arg  
1 5

<210> 45

< 211> 6

20 < 212> PRT

< 213> Yapay

<220>

< 223> Arjininden Zengin Hücreye Nüfuz Eden Peptit Transportörü

25

<400> 45

Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
1 5

<210> 46

30 < 211> 7

< 212> PRT

< 213> Yapay

<220>

< 223> Arjininden Zengin Hücreye Nüfuz Eden Peptit Transportörü

<400> 46

5 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
1 5

<210> 47

< 211> 8

< 212> PRT

10 < 213> Yapay

<220>

< 223> Arjininden Zengin Hücreye Nüfuz Eden Peptit Transportörü

15 <400> 47

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
1 5

<210> 48

< 211> 9

20 < 212> PRT

< 213> Yapay

<220>

< 223> Arjininden Zengin Hücreye Nüfuz Eden Peptit Transportörü

25

<400> 48

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
1 5

<210> 49

30 < 211> 16

< 212> PRT

< 213> Yapay

<220>

< 223> Arjininden Zengin Hücreye Nüfuz Eden Peptit Transportörü

<220>

5 < 221> MOD\_RES

< 222> (2)..(2)

< 223> Xaa = Acp

<220>

10 < 221> MOD\_RES

< 222> (4)..(4)

< 223> Xaa = Acp

<220>

15 < 221> MOD\_RES

< 222> (6)..(6)

< 223> Xaa = Acp

<220>

20 < 221> MOD\_RES

< 222> (8)..(8)

< 223> Xaa = Acp

<220>

25 < 221> MOD\_RES

< 222> (10)..(10)

< 223> Xaa = Acp

<220>

30 < 221> MOD\_RES

< 222> (12)..(12)

< 223> Xaa - Acp

<220>

35 < 221> MOD\_RES

< 222> (14)..(14)  
 < 223> Xaa = Acp

<220>

5 < 221> MOD\_RES  
 < 222> (16)..(16)  
 < 223> Xaa = Acp

<400> 49

10 **Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa**  
 1 5 10 15

<210> 50

< 211> 12

< 212> PRT

15 < 213> Yapay

<220>

< 223> Arjininden Zengin Hücreye Nüfuz Eden Peptit Transportörü

20 <220>

< 221> MOD\_RES

< 222> (2)..(2)

< 223> Xaa - 6-aminohekzanoik asit

25 <220>

< 221> MOD\_RES

< 222> (5)..(5)

< 223> Xaa = 6-aminohekzanoik asit

30 <220>

< 221> MOD\_RES

< 222> (8)..(8)

< 223> Xaa = 6-aminohekzanoik asit

<220>

< 221> MOD\_RES

< 222> (11)..(11)

< 223> Xaa = 6-aminohekzanoik asit

5

<400> 50

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg  
1 5 10

<210> 51

10 < 211> 15

< 212> PRT

< 213> Yapay

<220>

15 < 223> Arjininden Zengin Hücreye Nüfuz Eden Peptit Transportörü

<220>

< 221> MOD\_RES

< 222> (2)..(2)

20 < 223> Xaa = 6-aminohekzanoik asit

<220>

< 221> MOD\_RES

< 222> (5)..(5)

25 < 223> Xaa = 6-aminohekzanoik asit

<220>

< 221> MOD\_RES

< 222> (8)..(8)

30 < 223> Xaa = 6-aminohekzanoik asit

<220>

< 221> MOD\_RES

< 222> (11)..(11)

35 < 223> Xaa = 6-aminohekzanoik asit

<220>

< 221> MOD\_RES

< 222> (14)..(14)

5 < 223> Xaa = 6-aminoheksanoik asit

<400> 51

Arg	Xaa	Arg	Arg	Xaa	Arg	Arg	Xaa	Arg	Arg	Xaa	Arg	Arg	Xaa	Arg
1				5				10					15	

10 <210> 52

< 211> 12

< 212> PRT

< 213> Yapay

15 <220>

< 223> Arjininden Zengin Hücreye Nüfuz Eden Peptit Transportörü

<220>

< 221> MOD\_RES

20 < 222> (2)..(2)

< 223> Xaa = 6-aminoheksanoik asit

<220>

< 221> MOD\_RES

25 < 222> (5)..(5)

< 223> Xaa = beta-alanin

<220>

< 221> MOD\_RES

30 < 222> (8)..(8)

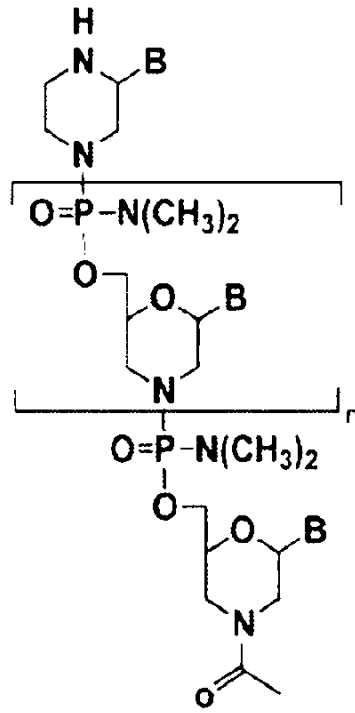
< 223> Xaa = 6-aminoheksanoik asit

<220>

< 221> MOD\_RES



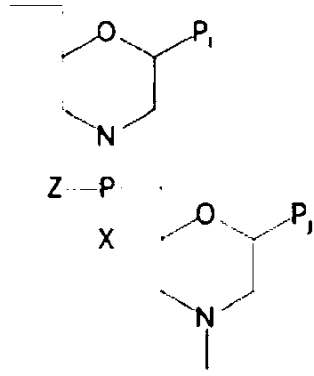




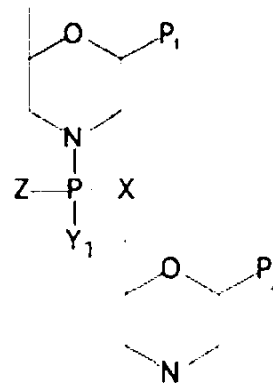
ŞEKİL 1A



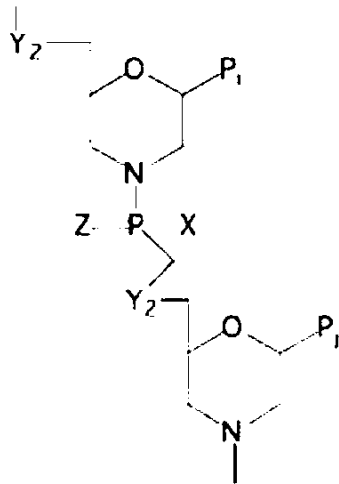




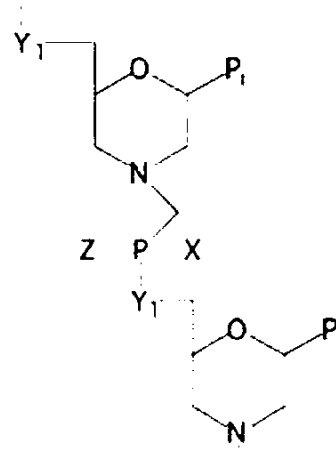
ŞEKİL 1D



ŞEKİL 1E



ŞEKİL 1F

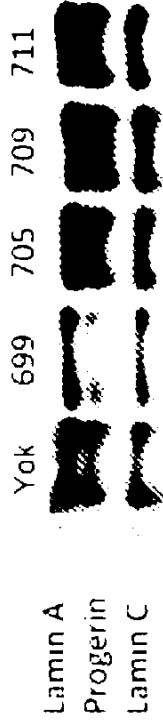


ŞEKİL 1G

	Lamin A/C (%)	Prisipier (%)
Yok	100.000	100.000
705/70	*62.786	*59.663
705/74	108.825	*64.186
705/78	*128.207	*67.607
706/74	*87.105	*75.803
706/78	*115.919	*79.194
708/74	85.408	*82.588
700/75	91.136	*82.817
708/78	*77.241	84.471
707/72	*90.455	92.44
702/77	*111.877	95.114
703/78	*116.475	104.998
701/76	98.477	106.347
704/79	*136.971	111.343
710/75	94.673	*123.477

\* anamli deg % (p < 0.05)

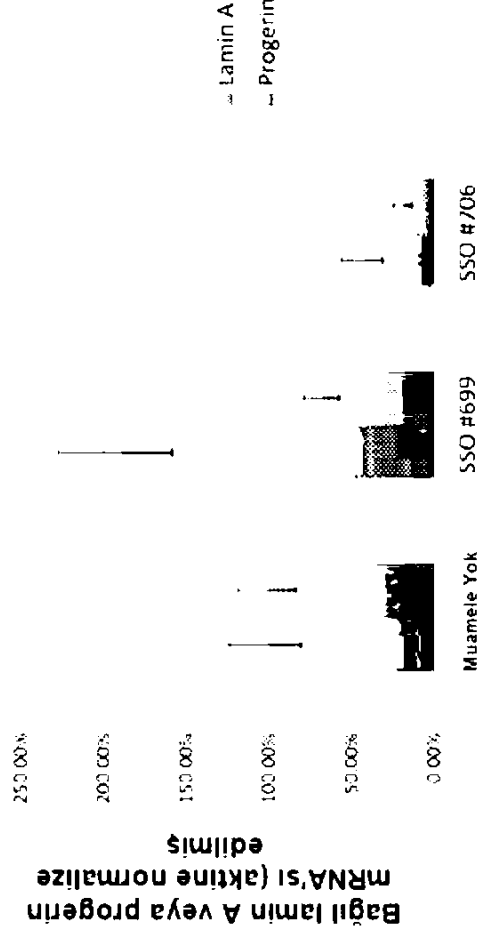
## ŞEKİL 2



$\beta$ -aktin

Yok	699	705	709	711
Lamin A/C (%)	100.000	100.000	100.000	100.000
Progerin (%)	100.000	59.663	74.139	168.78
Lamin A (%)	100.000	64.186	40.411	61.869
Lamin C (%)	100.000	67.607	49.431	61.706
$\beta$ -aktin (%)	100.000	75.803	58.654	52.151

ŞEKİL 3



	Muamele Yok	SSO #699/4	SSO #706/11
Lamin A (%)	100.00 (80.58 – 124.11)	190.05 (158.53 – 227.82)	42.00 (31.28 – 56.39)
Progerin (%)	100.00 (84.03 – 119.01)	67.62 (57.71 – 79.23)	18.52 (13.75 – 24.93)

ŞEKİL 4





	Lamin A		Progerin		Lamin C	
	Oran	T-testi	Oran	T-testi	Oran	T-testi
Kontrol	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
699/4	0.8037	0.2999	0.9405*	0.0021*	1.0585	0.6707
706/11	0.3503*	0.0150*	0.0094*	0.0001*	0.7309*	0.0017*

\*Anlamli aşağı-yönde regülasyon

**ŞEKİL 5**