

OLIGÓMEROS DE OMISIÓN DE EXON PARA DISTROFIA MUSCULAR**SOLICITUDES RELACIONADAS**

Esta solicitud de patente reivindica el beneficio
5 de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos
Serie No. 62/356,923, presentada el 30 de junio de 2016, y la
Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Serie No.
62/357,072, presentada el 30 de junio de 2016. El contenido
completo de las solicitudes de patente provisionales
10 mencionadas anteriormente se incorpora en la presente como
referencia.

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un Listado de
15 Secuencias que se ha enviado electrónicamente en formato
ASCII y se incorpora en la presente como referencia en su
totalidad. La copia ASCII, creada el 27 de junio de 2017, se
llama AVN-025PC_SL.txt y es de 2,597 bytes de tamaño.

CAMPO DE LA INVENCION

20 La presente descripción se refiere a nuevos
oligómeros antisentido adecuados para la omisión del exón 45
en el gen de distrofina humana y composiciones farmacéuticas
de los mismos. La descripción también proporciona métodos
25 para inducir la omisión del exón 45 usando nuevos oligómeros

antisentido, métodos para producir distrofina en un sujeto que tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible a la omisión del exón 45 y métodos para tratar un sujeto que tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible a la omisión del exón 45.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se están desarrollando tecnologías antisentido usando un rango de productos químicos para afectar la expresión génica en una variedad de niveles diferentes (transcripción, empalme, estabilidad, traducción). Gran parte de esa investigación se ha centrado en el uso de compuestos antisentido para corregir o compensar los genes anormales o asociados a enfermedades en un amplio rango de indicaciones. Las moléculas antisentido son capaces de inhibir la expresión génica con especificidad, y debido a esto, muchos esfuerzos de investigación con respecto a los oligómeros como moduladores de la expresión génica se han centrado en la inhibición de la expresión de genes objetivo o la función de los elementos de acción cis. Los oligómeros antisentido se dirigen típicamente contra el ARN, ya sea la cadena con sentido (por ejemplo, ARNm) o cadena negativa en el caso de algunas objetivos de ARN viral. Para lograr un efecto deseado de bajorregulación de gen específica, los oligómeros generalmente ya sea promueven la descomposición del ARNm de

objetivo, bloquean la traducción del ARNm o bloquean la función de los elementos de ARN de acción *cis*, evitando así efectivamente ya sea la síntesis *de novo* de la proteína objetivo o la replicación del ARN viral.

5 Sin embargo, tales técnicas no son útiles cuando el objetivo es sobrerregular la producción de la proteína nativa o compensar las mutaciones que inducen una terminación prematura de la traducción, tales como las mutaciones sin sentido o de cambio de marco. En estos casos, el transcrito
10 de gen defectuoso no se debe someter a una degradación dirigida o inhibición estérica, de modo que la química del oligómero antisentido no debe promover la descomposición del ARNm o bloquear la traducción.

En una variedad de enfermedades genéticas, los
15 efectos de las mutaciones en la expresión final de un gen se pueden modular a través de un proceso de omisión de exón dirigida durante el proceso de empalme. El proceso de empalme está dirigido por una compleja maquinaria de múltiples componentes que lleva las uniones de exón-intrón adyacentes
20 en el pre-ARNm a una estrecha proximidad y realiza la escisión de los enlaces de fosfodiéster en los extremos de los intrones con su posterior reformación entre los exones que se empalman juntos. Este proceso complejo y altamente preciso está mediado por motivos de secuencia en el pre-ARNm
25 que son segmentos de ARN semiconservados relativamente cortos

a los que se unen diversos factores de empalme nuclear que luego están involucrados en las reacciones de empalme. Al cambiar la forma en que la maquinaria de empalme lee o reconoce los motivos involucrados en el procesamiento de pre-
5 ARNm, es posible crear moléculas de ARNm empalmadas diferencialmente. Ahora se ha reconocido que la mayoría de los genes humanos se empalman alternativamente durante la expresión génica normal, aunque los mecanismos involucrados no han sido identificados. Bennett *et al.* (Patente de Estados
10 Unidos No. 6,210,892) describen la modulación antisentido del procesamiento de ARNm celular tipo salvaje usando análogos de oligómeros antisentido que no inducen la escisión mediada por ARNasa H del ARN objetivo. Esto encuentra utilidad al ser capaz de generar ARNm empalmados alternativamente que carecen
15 de exones específicos (por ejemplo, como se describe (Sazani, Kole, *et al.* 2007) para la generación de receptores de la superfamilia de TNF solubles que carecen de exones que codifican dominios que abarcan la membrana.

En los casos donde una proteína normalmente
20 funcional se termina prematuramente debido a las mutaciones en esta, se ha mostrado que un medio para restaurar algo de la producción de proteína funcional mediante tecnología antisentido es posible mediante la intervención durante los procesos de empalme, y eso si los exones asociados con
25 mutaciones causantes de enfermedades se pueden eliminar

específicamente de algunos genes, a veces se puede producir un producto proteico acortado que tiene propiedades biológicas similares de la proteína nativa o tiene una actividad biológica suficiente para aliviar la enfermedad causada por mutaciones asociadas con el exón (ver, por ejemplo, Sierakowska, Sambade et al. 1996; Wilton, Lloyd et al. 1999; van Deutekom, Bremmer-Bout et al. 2001; Lu, Mann et al. 2003; Aartsma-Rus, Janson et al. 2004). Koleet al. (Patentes de Estados Unidos Nos. 5,627,274; 5,916,808; 5,976,879; y 5,665,593) describen métodos para combatir el empalme aberrante usando análogos de oligómeros antisentido modificados que no promueven la descomposición del pre-ARNm objetivo. Bennett et al. (Patente de Estados Unidos No. 6,210,892) describen la modulación antisentido del procesamiento de ARNm celular tipo salvaje también usando análogos de oligómeros antisentido que no inducen la escisión mediada por ARNasa H del ARN objetivo.

Es probable que el proceso de omisión de exón dirigida sea particularmente útil en genes largos donde hay muchos exones e intrones, donde hay redundancia en la constitución genética de los exones o donde una proteína puede funcionar sin uno o más exones particulares. Los esfuerzos para redirigir el procesamiento de genes para el tratamiento de enfermedades genéticas asociadas con truncamientos causados por mutaciones en diversos genes se

han centrado en el uso de oligómeros antisentido que: (1) se superponen completa o parcialmente con los elementos involucrados en el proceso de empalme; o (2) se unen al pre-ARNm en una posición suficientemente cercana al elemento para interrumpir la unión y función de los factores de empalme que normalmente mediarían una reacción de empalme particular que ocurre en ese elemento.

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es causada por un defecto en la expresión de la proteína distrofina. El gen que codifica la proteína contiene 79 exones distribuidos en más de 2 millones de nucleótidos de ADN. Cualquier mutación exónica que cambia el marco de lectura del exón, o introduce un codón de parada, o se caracteriza por la remoción de un exón o exones fuera del marco completo, o duplicaciones de uno o más exones, tiene el potencial de interrumpir la producción de distrofina funcional, resultando en DMD.

Una forma menos severa de distrofia muscular, distrofia muscular de Becker (DMO), se ha encontrado que surge cuando una mutación, por lo general una delección de uno o más exones, resulta en un marco de lectura correcto a lo largo del transcrito de distrofina completo, de manera que la traducción del ARNm en la proteína no se termina prematuramente. Si la unión de los exones cadena arriba y cadena abajo en el procesamiento de un pre-ARNm de distrofina

mutada mantiene el marco de lectura correcto del gen, el resultado es un ARNm que codifica una proteína con una delección interna corta que retiene cierta actividad, lo que resulta en un fenotipo de Becker.

5 Durante muchos años se ha sabido que las delecciones de un exón o exones que no alteran el marco de lectura de una proteína distrofina darían lugar a un fenotipo de BMD, mientras que una delección de un exón que causa un cambio de marco daría lugar a DMD (Monaco, Bertelson et al. 1988). En
10 general, las mutaciones de distrofina, incluyendo las mutaciones puntuales y las delecciones de exones que cambian el marco de lectura y, por lo tanto, interrumpen la traducción adecuada de proteínas, dan como resultado DMD. También se debe tener en cuenta que algunos pacientes con BMD
15 y DMD tienen delecciones de exón que cubren múltiples exones.

 La modulación del empalme de pre-ARNm de distrofina mutante con oligorribonucleótidos antisentido se ha reportado tanto *in vitro* como *in vivo* (ver, por ejemplo, Matsuo, Masumura et al., 1991; Takeshima, Nishio et al., 1995;
20 Pramono, Takeshima et al., 1996; Dunckley, Eperon et al., 1997; Dunckley, Manoharan et al., 1998; Wilton, Lloyd et al., 1999; Mann, Honeyman et al., 2002; Errington, Mann et al., 2003).

 Los oligómeros antisentido se han diseñado
25 específicamente para dirigirse a regiones específicas del

pre-ARNm, típicamente exones para inducir la omisión de una mutación del gen de DMD, restaurando así estas mutaciones fuera de marco en el marco para permitir la producción de la proteína distrofina internamente acortada aún funcional. Se ha sabido que tales oligómeros antisentido se dirigen completamente al exón (las llamadas secuencias internas del exón) o en una unión de donador de empalme o aceptor de empalme que cruza desde el exón a una porción del intrón.

El descubrimiento y desarrollo de tales oligómeros antisentido para DMD ha sido un área de investigación previa. Estos desarrollos incluyen aquellos de: (1) la Universidad de Australia Occidental y Sarepta Therapeutics (cesionario de esta solicitud): WO 2006/000057; WO 2010/048586; WO 2011/057350; WO 2014/100714; WO 2014/153240; WO 2014/153220; (2) Academisch Ziekenhuis Leiden/Prosensa Technologies (ahora BioMarin Pharmaceutical): WO 02/24906; WO 2004/083432; WO 2004/083446; WO 2006/112705; WO 2007/133105; WO 2009/139630; WO 2009/054725; WO 2010/050801; WO 2010/050802; WO 2010/123369; WO 2013/112053; WO 2014/007620; (3) Centro Médico de las Carolinas: WO 2012/109296; (4) Royal Holloway: patentes y solicitudes que reclaman el beneficio de, e incluyendo, US Series Nos. 61/096,073 y 61/164,978; (4) JCR Pharmaceuticals and Matsuo: US 6,653,466; patentes y solicitudes que reivindican el beneficio de, e incluyendo, JP 2000-125448, tal como US 6,653,467; patentes y solicitudes

que reivindican el beneficio de, e incluyendo, JP 2000-256547, tal como US 6,727,355; WO 2004/048570; (5) Nippon Shinyaku: WO 2012/029986; WO 2013/100190; WO 2015/137409; WO 2015/194520; y (6) Asociación Instituto de
5 Miología/Universidad Pierre et Marie Curie/Universidad Bern/Centro Nacional de la Investigación Científica/Synthelabo AG: WO 2010/115993; WO 2013/053928.

A pesar de estos éxitos, sigue existiendo la necesidad de oligómeros antisentido mejorados que tengan como
10 objetivo el exón 45 y las correspondientes composiciones farmacéuticas que sean potencialmente útiles para los métodos terapéuticos para producir distrofina y tratar la DMD.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

15 En un aspecto, la descripción proporciona oligómeros antisentido de 22-30 subunidades de longitud capaces de unirse a un objetivo seleccionado para inducir la omisión de exones en el gen de distrofina humana, en donde el oligómero antisentido comprende una secuencia de bases que es
20 complementaria a una región objetivo del exón 45 seleccionada del grupo que consiste en H45A(-06+20), H45A(-03+19), H45A(-09+16), H45A(-09+19) y H45A(-12+16), en donde las bases del oligómero se enlazan a estructuras de anillo de morfolino, y en donde las estructuras de anillo de morfolino se unen por
25 enlaces de intersubunidades que contienen fósforo que unen un

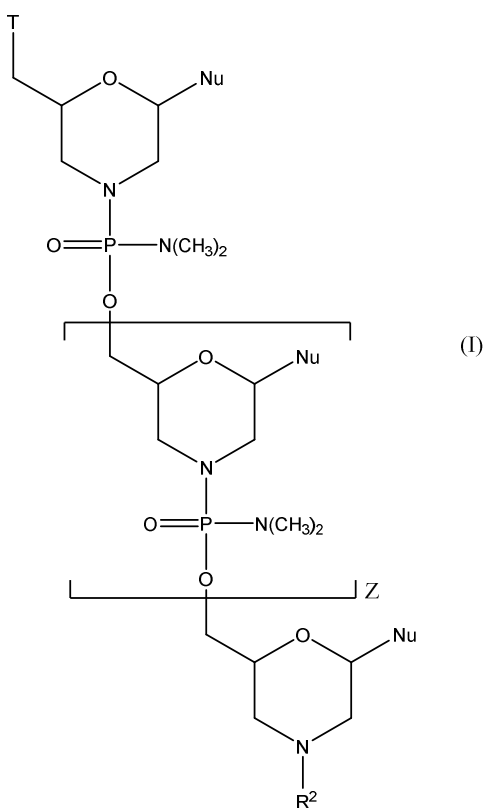
nitrógeno de morfolino de una estructura de anillo a un
 carbono exocíclico 5' de una estructura de anillo adyacente.
 En una modalidad, el oligómero antisentido comprende una
 secuencia de bases designada como SEQ ID NOs: 1-5. En otra
 5 modalidad, el oligómero antisentido es de aproximadamente 22
 a 28 subunidades de longitud o aproximadamente 22 a 24
 subunidades de longitud.

En otro aspecto, la descripción proporciona
 oligómeros antisentido de Fórmula (I):

10

15

20



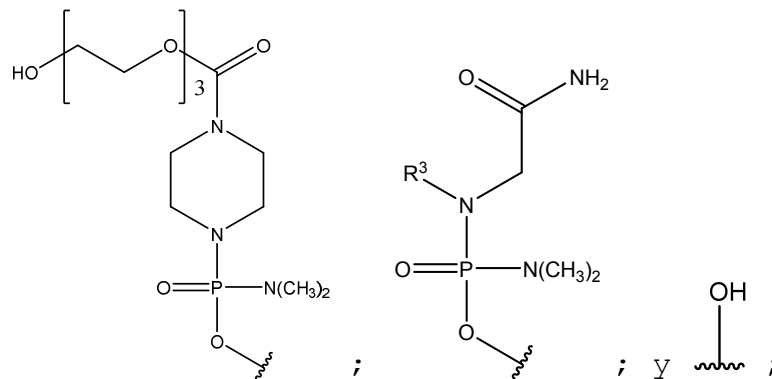
o una sal farmacéuticamente aceptable de los
 mismos, donde:

cada Nu es una nucleobase que tomadas juntas forman
 25 una secuencia de objetivo;

Z es un número entero desde 20 a 26;

T es una porción seleccionada de:

5



donde R^3 es alquilo de C_1-C_6 ; y

10

R^2 se selecciona de H, acetilo, tritilo y 4-metoxitritilo,

15

en donde la secuencia de objetivo es complementaria a una región objetivo del exón 45 seleccionada del grupo que consiste en H45A(-06+20), H45A(-03+19), H45A(-09+16), H45A(-09+19), y H45A(-12+16).

20

En algunas modalidades, que incluyen, por ejemplo, modalidades de oligómeros antisentido de Fórmula (I), los oligómeros antisentido ejemplares dirigidos al exón 45 incluyen aquellos que tienen una secuencia de objetivo identificada a continuación:

a) H45A(-06+20) SEQ ID NO: 1 (5'-CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA-3') en donde Z es 24;

b) H45A(-03+19) SEQ ID NO: 2 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3') en donde Z es 20;

25

c) H45A(-09+16) SEQ ID NO: 3 (5'-

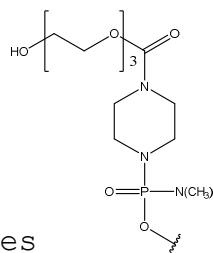
TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3') en donde Z es 23;

d) H45A(-09+19) SEQ ID NO: 4 (5'-
CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3') en donde Z es 26; y

e) H45A(-12+16) SEQ ID NO: 5 (5'-
5 TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATACC-3') en donde Z es 26.

En ciertas modalidades, las bases de uracilo se
pueden sustituir por bases de timina.

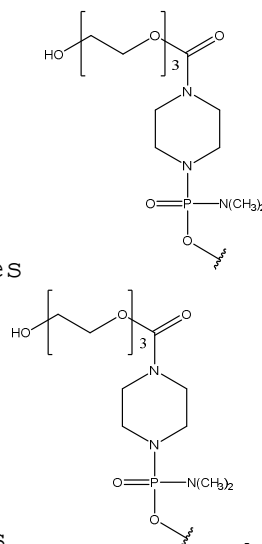
10



En ciertas modalidades, T es . En
algunas modalidades, R² es H. En algunas modalidades, Z es 24,
15 en algunas modalidades, Z es 20. En algunas modalidades, Z es
de 23. En algunas modalidades, Z es 26.

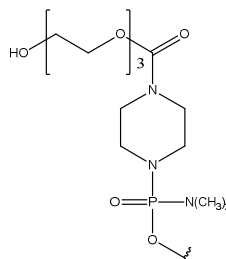
20

En modalidades adicionales, T es , R² es



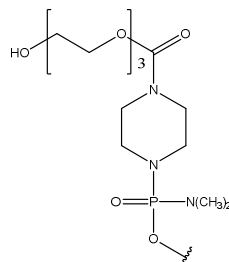
H y Z es 24. En algunas modalidades, T es , R² es H

25



y Z es 20. En otras modalidades, T es , R^2 es H y Z

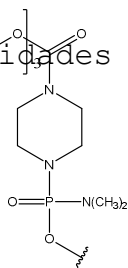
5



es 23 En algunas modalidades, T es , R^2 es H y Z
es 26.

En algunas modalidades, incluyendo, por ejemplo,
modalidades de oligómeros antisentido de Fórmula (I), T es

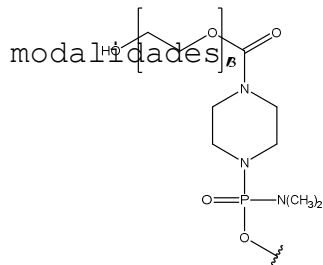
10



, la secuencia de objetivo es la SEQ ID NO: 1

(5'-CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA-3') y Z es 24. En otras

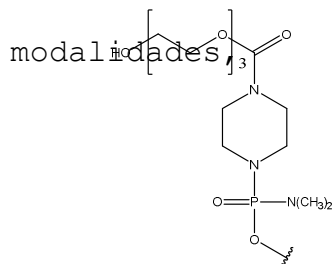
15



T es , la secuencia de objetivo es la SEQ ID NO:

20

2 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3') y Z es 20. En otras



25

T es , la secuencia de objetivo es la SEQ ID NO:

3 (5'-TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3') y Z es 23. En algunas

5

modalidades, T es , la secuencia de objetivo es la
SEQ ID NO: 4 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3') y Z es 26.

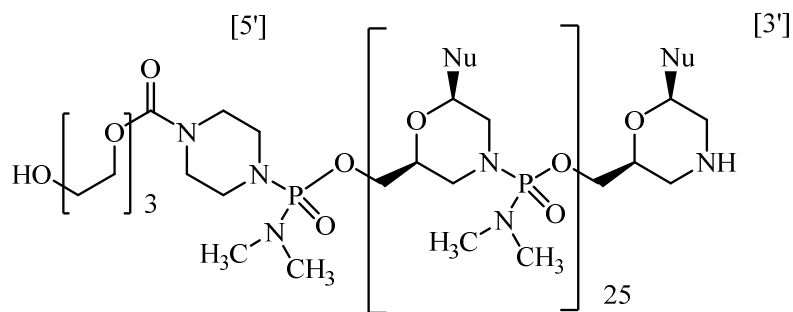
10

En otras modalidades, T es , la secuencia de
objetivo es la SEQ ID ID: 5 (5'-TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATACC-
3') y Z es 26.

15

En otro aspecto, la descripción proporciona un
oligómero antisentido, o una sal farmacéuticamente aceptable
del mismo, seleccionado del grupo que consiste en:

20



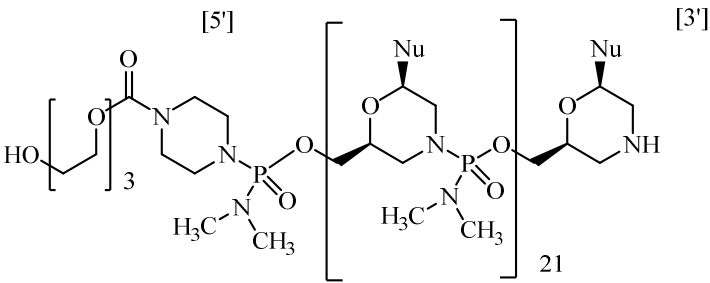
Compuesto 1

en donde cada Nu desde 1 a 26 y 5' a 3' es:

25

Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu
1	C	6	G	11	C	16	A	21	C	26	A
2	C	7	C	12	C	17	G	22	T		
3	A	8	C	13	T	18	T	23	G		
4	A	9	A	14	G	19	T	24	T		
5	T	10	T	15	G	20	C	25	A		

y

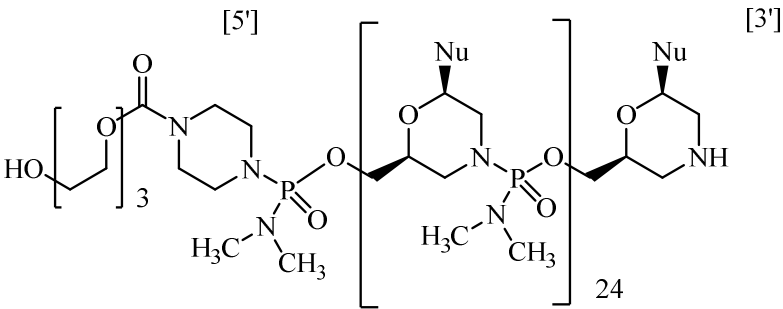


Compuesto 2

en donde cada Nu desde 1 a 22 y 5' a 3' es:

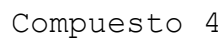
Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu
1	C	6	C	11	C	16	G	21	T
2	A	7	C	12	T	17	T	22	G
3	A	8	A	13	G	18	T		
4	T	9	T	14	G	19	C		
5	G	10	C	15	A	20	C		

y



en donde cada Nu de 1 a 25 y 5' a 3' es:

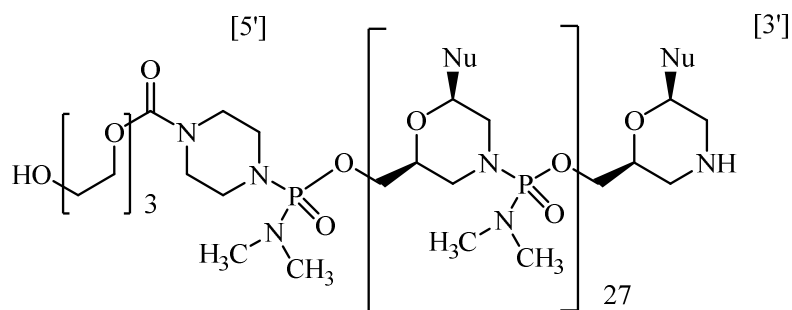
10



15

20

25



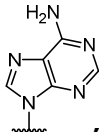
Compuesto 5

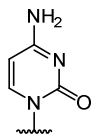
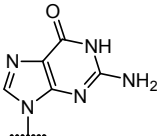
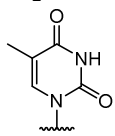
en donde cada Nu desde 1 a 28 y 5' a 3' es:

5

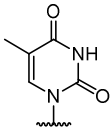
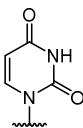
Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu
1	T	6	T	11	G	16	C	21	A	26	A
2	G	7	C	12	A	17	C	22	A	27	C
3	C	8	C	13	G	18	T	23	G	28	C
4	C	9	T	14	T	19	G	24	A		
5	A	10	G	15	T	20	T	25	T		

10

en donde para cada uno de los Compuestos 1 a 5, A es  , C

es  , G es  , y T es .

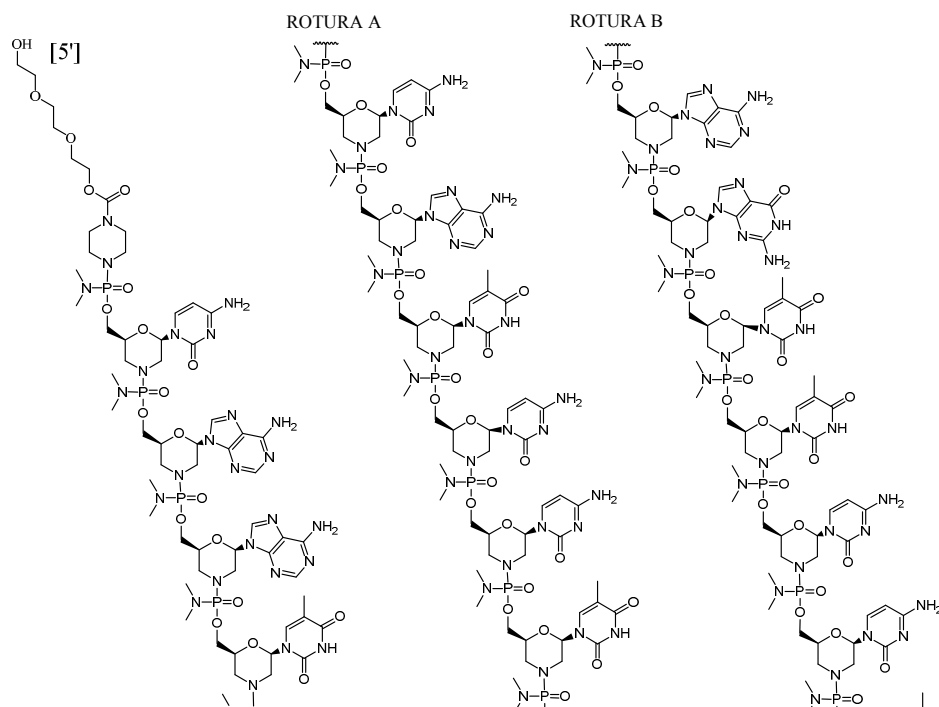
15

En algunas modalidades, T es  o .

En una modalidad, la descripción proporciona un oligómero antisentido SRP-4045 (casimersen) de estructura:

20

25



5

ROTURA A

ROTURA B

Para mayor claridad, las estructuras de la descripción que incluyen, por ejemplo, la estructura anterior de casimersen, son continuas desde 5' a 3', y, para la conveniencia de representar la estructura completa en una forma compacta, se han incluido varias roturas de ilustración marcadas como "ROTURA A" y "ROTURA B". Como entenderán los expertos en la técnica, por ejemplo, cada indicación de "ROTURA A" muestra una continuación de la ilustración de la estructura en estos puntos. El experto en la técnica entiende que lo mismo es cierto para cada caso de "ROTURA B" en las estructuras anteriores. Sin embargo, ninguna de las roturas de ilustración tiene la intención de indicar, ni los expertos en la técnica entenderían que significan, una interrupción real de la estructura anterior.

En otra modalidad, la descripción se refiere a un oligómero antisentido de 22 a 30 subunidades de longitud, que incluye al menos 10, 11, 12, 15, 17, 20, 22, 25, 26, 28 o 30 bases consecutivas complementarias a una región objetivo del

exón 45 del gen de distrofina designada como un sitio de apareamiento seleccionado del grupo que consiste en: H45A(-06+20), H45A(-03+19), H45A(-09+16), H45A(-09+19) y H45A(-12+16), en donde el oligómero antisentido es complementario al sitio de apareamiento que induce la omisión del exón 45.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un oligómero antisentido de 22 a 30 subunidades de longitud, que incluye al menos 10, 11, 12, 15, 17, 20, 22, 25, 26, 28 o 30 bases consecutivas de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NOs: 1-5, en donde el oligómero antisentido es complementario a una región objetivo del exón 45 del gen de distrofina e induce la omisión del exón 45. En una modalidad, las bases de timina en las SEQ ID NOs: 1-5 son opcionalmente uracilo.

La presente descripción incluye oligómeros antisentido ejemplares dirigidos al exón 45, tales como los que tienen una secuencia de objetivo identificada a continuación.

a) H45A(-06+20) SEQ ID NO: 1 (5'-CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA-3');

b) H45A(-03+19) SEQ ID NO: 2 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3');

c) H45A(-09+16) SEQ ID NO: 3 (5'-TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3');

d) H45A(-09+19) SEQ ID NO: 4 (5'-

CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3');;

e) H45A(-12+16) SEQ ID NO: 5 (5'-TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATACC-3').

En una modalidad, el oligómero antisentido es
 5 complementario al sitio de apareamiento H45A(-06+20), tal
 como la SEQ ID NO: 1. En todavía otra modalidad, el oligómero
 antisentido es complementario al sitio de apareamiento H45A(-
 03+19), tal como la SEQ ID NO: 2. En todavía otra modalidad,
 el oligómero antisentido es complementario al sitio de
 10 apareamiento H45A(-09+16), tal como la SEQ ID NO: 3. En
 todavía otra modalidad, el oligómero antisentido es
 complementario al sitio de apareamiento H45A(-09+19), tal
 como la SEQ ID NO: 4. En todavía otra modalidad, el oligómero
 antisentido es complementario al sitio de apareamiento H45A(-
 15 12+16), tal como la SEQ ID NO: 5.

En otro aspecto, la descripción proporciona
 composiciones farmacéuticas que incluyen los oligómeros
 antisentido descritos anteriormente, y un portador
 farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la
 20 descripción proporciona composiciones farmacéuticas que
 incluyen los oligómeros antisentido descritos anteriormente,
 y una solución salina que incluye un amortiguador de fosfato.

En otro aspecto, la descripción proporciona un
 método para tratar un paciente que padece de una enfermedad
 25 genética donde hay una mutación en un gen que codifica una

proteína particular y el efecto de la mutación se puede abrogar por la omisión de exones, que comprende las etapas de: (a) seleccionar una molécula antisentido de acuerdo con los métodos descritos en la presente; y (b) administrar la
5 molécula a un paciente en necesidad de tal tratamiento. La descripción también aborda el uso de oligómeros purificados y antisentido de la descripción, para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad genética.

En otro aspecto, la descripción proporciona un
10 método para tratar una afección caracterizada por distrofia muscular, tal como distrofia muscular de Duchenne (DMD) o distrofia muscular de Becker, que incluye administrar a un paciente una cantidad efectiva de un oligómero antisentido apropiadamente diseñado de la descripción, relevante para la
15 lesión genética particular en ese paciente. Además, la descripción proporciona un método para tratar profilácticamente un paciente para prevenir o minimizar la distrofia muscular, tal como distrofia muscular de Duchene o distrofia muscular de Becker, administrando al paciente una
20 cantidad efectiva de un oligómero antisentido o una composición farmacéutica que comprende una o más de estas moléculas biológicas.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un método para tratar la distrofia muscular de Duchenne (DMD)
25 en un sujeto en necesidad del mismo, en donde el sujeto tiene

una mutación del gen de distrofina que es susceptible a la omisión del exón 45, el método comprende administrar al sujeto un oligómero antisentido de la descripción.

En otro aspecto, la descripción proporciona un
5 método para producir distrofina en un sujeto que tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible a la omisión del exón 45, el método comprende administrar al sujeto un oligómero antisentido de la descripción.

En otro aspecto, la descripción también proporciona
10 kits para tratar una enfermedad genética, los kits comprenden al menos un oligómero antisentido de la presente descripción, envasados en un recipiente adecuado e instrucciones para su uso.

Estos y otros objetos y características se
15 entenderán mejor cuando la siguiente descripción detallada de la descripción se lea junto con las figuras.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** representa una sección de pre-ARNm de
20 distrofina normal.

La **Figura 2** representa una sección de pre-ARNm de distrofina anormal (ejemplo de DMD).

La **Figura 3** representa el eteplirsén, diseñado para omitir el exón 51, restauración de la lectura "En marco" del
25 pre-ARNm.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Las modalidades de la presente descripción se refieren en general a compuestos antisentido mejorados y métodos de uso de los mismos, que se diseñan específicamente para inducir la omisión de exones en el gen de distrofina humana. La distrofina desempeña un papel vital en la función muscular, y varias enfermedades relacionadas con los músculos se caracterizan por formas mutadas de este gen. Por lo tanto, en ciertas modalidades, los compuestos antisentido mejorados descritos en la presente inducen la omisión de exones en formas mutadas del gen de distrofina humana, tales como los genes de distrofina mutados encontrados en la distrofia muscular de Duchenne (DMD) y distrofia muscular de Becker (BMD).

Debido a los eventos de empalme de ARNm aberrantes causados por mutaciones, estos genes de distrofina humana mutados expresan la proteína distrofina defectuosa o no expresan en modo alguno la distrofina mensurable, una afección que conduce a varias formas de distrofia muscular. Para remediar esta afección, los compuestos antisentido de la presente descripción se hibridan a las regiones seleccionadas de un ARN preprocesado de un gen de distrofina humana mutado, inducen la omisión de exón y empalme diferencial en ese ARNm de distrofina de otra manera aberrantemente empalmado y, por

lo tanto, permiten que las células musculares produzcan un transcrito de ARNm que codifica una proteína distrofina funcional. En ciertas modalidades, la proteína distrofina resultante no es necesariamente la forma "tipo salvaje" de la distrofina, sino que es más bien una forma de distrofina truncada, aún funcional o semi-funcional.

Al aumentar los niveles de proteína distrofina funcional en las células musculares, estas y otras modalidades relacionadas son útiles en la profilaxis y tratamiento de la distrofia muscular, especialmente las formas de distrofia muscular, tales como DMD y BMD, que se caracterizan por la expresión de proteínas distrofina defectuosas debido al empalme de ARNm aberrante. Los oligómeros específicos descritos en la presente proporcionan además un objetivo específico de exón de distrofina mejorado sobre otros oligómeros en uso, y por lo tanto ofrecen ventajas significativas y prácticas sobre métodos alternativos para tratar formas relevantes de distrofia muscular.

Por lo tanto, la descripción se refiere a un oligómero antisentido de 22 a 30 subunidades de longitud capaz de unirse a un objetivo seleccionado para inducir la omisión de exones en el gen de distrofina humana, en donde el oligómero antisentido comprende una secuencia de bases que es complementaria a una región objetivo del exón 45 seleccionada

del grupo que consiste en H45A(-06+20), H45A(-03+19), H45A(-09+16), H45A(-09+19) y H45A(-12+16), en donde las bases del oligómero se enlazan a estructuras de anillo de morfolino, y en donde las estructuras de anillo de morfolino se unen por
 5 enlaces de intersubunidad que contienen fósforo que unen un nitrógeno de morfolino de una estructura de anillo a un carbono exocíclico 5' de una estructura de anillo adyacente. En una modalidad, el oligómero antisentido comprende una secuencia de bases designadas como la SEQ ID NO: 1-5.

10 La descripción también se refiere a oligómeros antisentido de 22 a 30 subunidades de longitud y que incluyen al menos 10, 12, 15, 17, 20 o más, bases consecutivas complementarias a una región objetivo del exón 45 del gen de distrofina designada como un sitio de apareamiento
 15 seleccionado el grupo que consiste en: H45A(-06+20), H45A(-03+19), H45A(-09+16), H45A(-09+19) y H45A(-12+16).

Otros oligómeros antisentido de la descripción son de 22 a 30 subunidades de longitud e incluyen al menos 10, 12, 15, 17, 20 o más, bases consecutivas de las SEQ ID NOs:
 20 1-5. En algunas modalidades, las bases de timina en las SEQ ID NOs: 1-5 son opcionalmente uracilo.

Los oligómeros antisentido ejemplares de la descripción se describen a continuación:

a) H45A(-06+20) SEQ ID NO: 1 (5'-
 25 CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA-3');;

b) H45A(-03+19) SEQ ID NO: 2 (5'-
CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3');

c) H45A(-09+16) SEQ ID NO: 3 (5'-
TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3');

5 d) H45A(-09+19) SEQ ID NO: 4 (5'-
CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3');

e) H45A(-12+16) SEQ ID NO: 5 (5'-
TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATACC-3').

A menos que se defina lo contrario, todos los
10 términos técnicos y científicos usados en la presente tienen
el mismo significado que los entendidos comúnmente por los
expertos en la técnica a los que pertenece la descripción.
Aunque cualquier método y materiales similares o equivalentes
a los descritos en la presente se pueden usar en la práctica
15 o prueba de la presente descripción, se describen métodos y
materiales preferidos. Para los propósitos de la presente
descripción, los siguientes términos se definen a
continuación.

20 **I. Definiciones**

Por "aproximadamente" se entiende una cantidad,
nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión,
tamaño, cantidad, peso o longitud que varía tanto como 30,
25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1% a una cantidad,
25 nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión,

tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia.

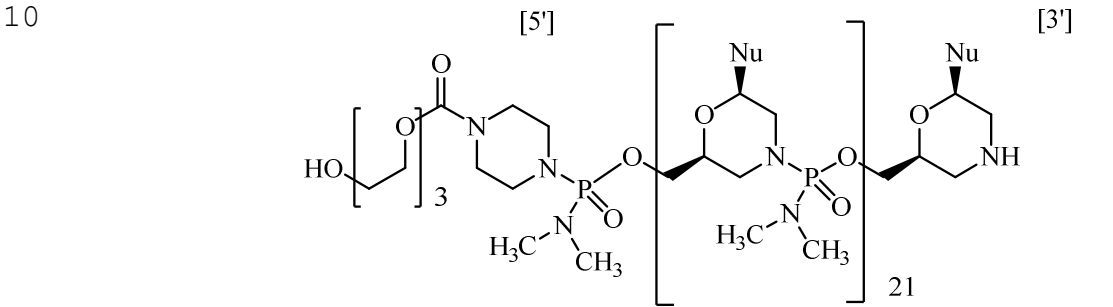
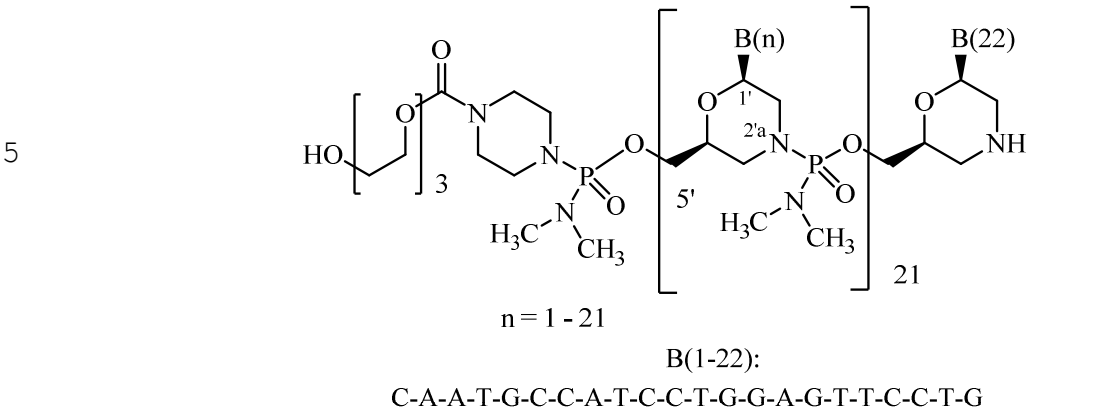
"Susceptible a la omisión del exón 45" como se usa en la presente con respecto a un sujeto o paciente se propone que incluya sujetos y pacientes que tienen una o más mutaciones en el gen de distrofina que, sin la omisión del exón 45 del gen de distrofina, hace que el marco de lectura esté fuera de marco, interrumpiendo así la traducción del pre-ARNm, lo que conduce a una incapacidad del sujeto o paciente para producir distrofina. Los ejemplos no limitantes de mutaciones en los siguientes exones del gen de distrofina son susceptibles a la omisión del exón 45 que incluyen, por ejemplo, la delección de: exones 7-44, exones 12-44, exones 18-44, exón 44, exón 46, exones 46 -47, exones 46-48, exones 46-49, exones 46-51, exones 46-53, exones 46-55, exones 46-57, exones 46-59, exones 46-60, exones 46-67, exones 46 -69, exones 46-75, o exones 46-78. La determinación si un paciente tiene una mutación en el gen de distrofina que es susceptible a la omisión de exones está dentro de la competencia de un experto en la técnica (ver, por ejemplo, Aartsma-Rus et al. (2009) Hum Mutat. 30:293-299, Gurvich et al., Hum Mutat. 2009; 30(4) 633-640, and Fletcher et al. (2010) Molecular Therapy 18(6) 1218-1223.).

Los términos "oligómero antisentido" y "oligómero" se usan indistintamente y se refieren a una secuencia de subunidades cíclicas conectadas por enlaces de

intersubunidad, con cada subunidad cíclica que consiste en:
 (i) un azúcar ribosa o un derivado de la misma; y (ii) una
 porción de emparejamiento de bases unida a esta, de manera
 que el orden de las porciones de emparejamiento de bases
 5 forma una secuencia de bases que es complementaria a una
 secuencia objetivo en un ácido nucleico (típicamente un ARN)
 por emparejamiento de bases de Watson-Crick, para formar un
 heterodúplex de ácido nucleico:oligómero dentro de la
 secuencia objetivo. En ciertas modalidades, el oligómero es
 10 un PMO. En otras modalidades, el oligómero antisentido es un
 2'-O-metil fosforotioato. En otras modalidades, el oligómero
 antisentido de la descripción es un ácido nucleico peptídico
 (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA) o un ácido nucleico
 puenteado (BNA) tal como ácido nucleico puenteado con 2'-
 15 O,4'-C-etileno (ENA). Las modalidades ejemplares adicionales
 se describen a continuación.

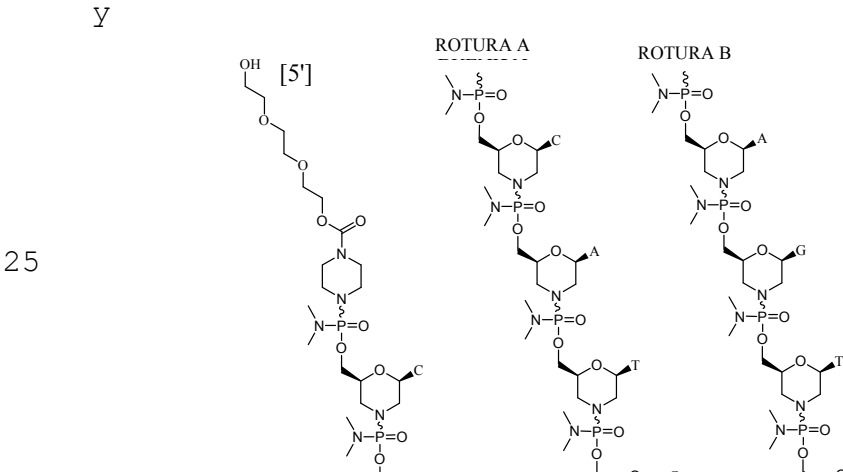
"Casimersen" anteriormente conocido por su nombre en
 código "SPR-4045" es un PMO que tiene la secuencia de base 5'-
 CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3' (SEQ ID NO: 2). Casimersen está
 20 registrado bajo el Número de Registro CAS 1422959-91-8. Los
 nombres químicos incluyen: all-P-ambo-[P,2',3'-tridesoxi-P-
 (dimetilamino)-2',3'-imino-2',3'-seco] (2'a→5') (C-A-A-T-G-C-C-
 A-T-C-C-T-G-G-A-G-T-T-C-C-T-G) 5'-[4-({2-[2-(2-
 hidroxietoxi)etoxi]etoxi}carbonil)-N,N-dimetilpiperazin-1-
 25 fosfonamidato]

Casimersen tiene las siguientes estructuras químicas:



15 en donde cada Nu desde 1 a 22 y 5' a 3' es:

Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu
1	C	6	C	11	C	16	G	21	T
2	A	7	C	12	T	17	T	22	G
3	A	8	A	13	G	18	T		
4	T	9	T	14	G	19	C		
5	G	10	C	15	A	20	C		



5

10

ROTURA A

ROTURA B

La secuencia de bases desde el extremo 5' al extremo 3' es

15

La secuencia 5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3' se describe como la SEQ ID NO: 2.

Los términos "complementario" y "complementariedad" se refieren a dos o más polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) que se relacionan entre sí por las reglas de emparejamiento de bases de Watson-Crick. Por ejemplo, la secuencia "T-G-A (5' → 3')", es complementaria a la secuencia "A-C-T (3' → 5'). La complementariedad puede ser "parcial", en la que menos de todas las bases de ácido nucleico de un polinucleótido de objetivo dado coinciden con

un polinucleótido objetivo de acuerdo con las reglas de emparejamiento de bases. O, puede haber una complementariedad "completa" o "perfecta" (100%) entre el polinucleótido de objetivo dado y el polinucleótido objetivo para continuar el ejemplo. El grado de complementariedad entre las cadenas de ácido nucleico tiene efectos significativos sobre la eficiencia y fuerza de hibridación entre las cadenas de ácido nucleico.

Una "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de compuesto terapéutico, tal como un oligómero antisentido, administrada a un sujeto mamífero, ya sea como una dosis única o como parte de una serie de dosis, que es efectiva para producir un efecto terapéutico deseado. Para un oligómero antisentido, este efecto se produce típicamente inhibiendo la traducción o procesamiento de empalme natural de una secuencia objetivo seleccionada.

Para un oligómero antisentido, este efecto se produce generalmente inhibiendo la traducción o procesamiento de empalme natural de una secuencia objetivo seleccionada, o produciendo una cantidad clínicamente significativa de distrofina (significancia estadística). En algunas modalidades, una cantidad efectiva es al menos 20 mg/kg de una composición que incluye un oligómero antisentido durante un período de tiempo para tratar al sujeto. En algunas

modalidades, una cantidad efectiva es al menos 20 mg/kg de una composición que incluye un oligómero antisentido durante un periodo de tiempo para tratar el sujeto que incluye un oligómero antisentido para aumentar el número de fibras

5 positivas para distrofina en un sujeto con al menos 20% de lo normal. En ciertas modalidades, una cantidad efectiva es al menos 20 mg/kg de una composición que incluye un oligómero antisentido para estabilizar, mantener o mejorar la distancia de caminata desde un déficit de 20%, por ejemplo en una 6MWT,

10 en un paciente, en relación con un compañero sano. En diversas modalidades, una cantidad efectiva es al menos 20 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, o aproximadamente 30 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. En algunas modalidades, una

15 cantidad efectiva es aproximadamente 30 mg/kg o aproximadamente 50 mg/kg. En otro aspecto, una cantidad efectiva es al menos 20 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, o aproximadamente 30 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, durante al menos 24 semanas, al

20 menos 36 semanas o al menos 48 semanas, para aumentar así el número de fibras positivas para distrofina en un sujeto a al menos 20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%,

25 aproximadamente 95% de lo normal, y estabiliza o mejora la

distancia de caminata desde un déficit de 20%, por ejemplo, en un MWT de 6, en el paciente en relación con un compañero sano. En algunas modalidades, el tratamiento aumenta el número de fibras positivas para distrofina a 20-60%, o 30-50%
5 de lo normal en el paciente.

Por "mejora" o "mejorando", o "aumento" o "aumentando", o "estimula" o "estimulando", se refieren en general a la capacidad de uno o compuestos antisentido o composiciones farmacéuticas para producir o causar una mayor
10 respuesta fisiológica (es decir, efectos cadena abajo) en una célula o un sujeto, en comparación con la respuesta causada por un compuesto no antisentido o un compuesto de control. Una respuesta fisiológica medible puede incluir un aumento de la expresión de una forma funcional de una proteína
15 distrofina, o un aumento de la actividad biológica relacionada con la distrofina en el tejido muscular, entre otras respuestas evidentes a partir del entendimiento en la técnica y la descripción en la presente. También se puede medir el aumento de la función muscular, incluyendo aumentos
20 o mejoras en la función muscular por aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100%. El porcentaje de fibras musculares que expresan una distrofina funcional
25 también se puede medir, incluido el aumento de la expresión

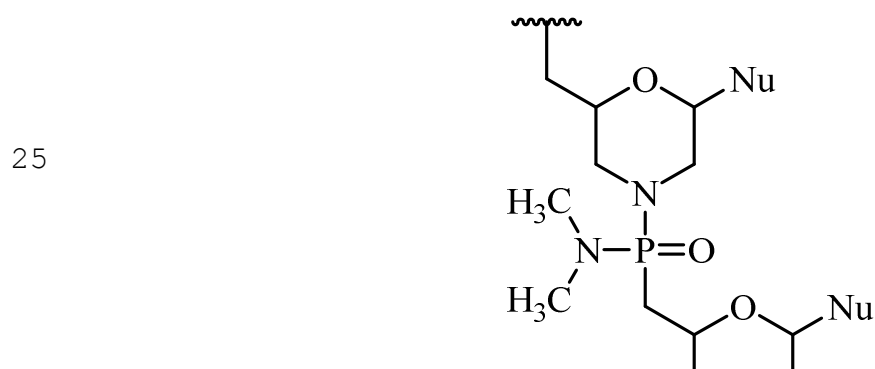
de distrofina por aproximadamente 1%, 2%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de las fibras musculares. Por ejemplo, se ha mostrado que alrededor de 40% de la mejora
5 de la función muscular puede ocurrir si el 25-30% de las fibras expresan distrofina (ver, por ejemplo, DelloRusso et al, Proc Natl Acad Sci USA 99: 12979-12984, 2002). Una cantidad "aumentada" o "mejorada" es típicamente una cantidad "estadísticamente significativa", y puede incluir un aumento
10 que es 1.1, 1.2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 30, 40, 50 o más veces (por ejemplo, 500, 1000 veces) (incluyendo todos los números enteros y puntos decimales intermedios y por encima de 1), por ejemplo 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, etc.) la cantidad producida por el compuesto no antisentido (la
15 ausencia de un agente) o un compuesto de control.

Como se usa en la presente, los términos "función" y "funcional" y similares se refieren a una función biológica, enzimática o terapéutica.

Una proteína distrofina "funcional" se refiere
20 generalmente a una proteína distrofina que tiene suficiente actividad biológica para reducir la degradación progresiva del tejido muscular que, de otro modo, es característica de la distrofia muscular, típicamente en comparación con la forma alterada o
25 "defectuosa" de la proteína distrofina que está presente

en ciertos sujetos con DMD o BMD. En ciertas modalidades, una proteína distrofina funcional puede tener aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% (incluyendo todos los números enteros intermedios) de la actividad biológica in vitro o in vivo de distrofina tipo salvaje, como se mide de acuerdo con las técnicas de rutina en la técnica. Como ejemplo, la actividad relacionada con la distrofina en cultivos musculares in vitro se puede medir de acuerdo con el tamaño de miotubo, organización (o desorganización) de miofibrillas, actividad contráctil y agrupamiento espontáneo de receptores de acetilcolina (ver, por ejemplo, Brown et al., Journal of Cell Science. 112: 209-216, 1999). Los modelos animales también son recursos valiosos para estudiar la patogénesis de la enfermedad y proporcionan un medio para probar la actividad relacionada con la distrofina. Dos de los modelos animales muy ampliamente usados para la investigación de DMD son el ratón mdx y el perro con distrofia muscular golden retriever (GRMD), ambos de los cuales son negativos a distrofina (ver, por ejemplo, Collins & Morgan, Int J Exp Pathol 84: 165-172, 2003). Estos y otros modelos animales se pueden usar para medir la actividad funcional de varias proteínas distrofina. Se incluyen formas truncadas de distrofina, tales como

20 Los términos "morfolino", "oligómero de morfolino" o
"PMO" se refieren a un oligómero de morfolino fosforodiamidato
de la siguiente estructura general:



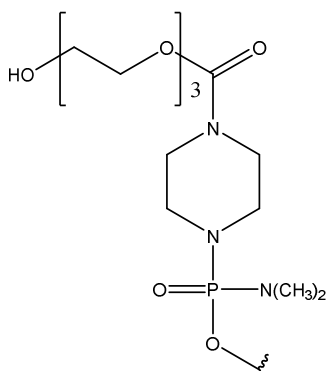
5

y como se describe en la Figura 2 de Summerton, J., et al.,
Antisense & Nucleic Acid Drug Development, 7: 187-195 (1997).
 Los morfolinos como se describen en la presente pretenden
 cubrir todos los estereoisómeros y configuraciones de la
 10 estructura general anterior. La síntesis, estructuras y
 características de unión de los oligómeros de morfolino se
 detallan en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,698,685,
 5,217,866, 5,142,047, 5,034,506, 5,166,315, 5,521,063,
 5,506,337, 8,076,476 y 8,299,206, todas las cuales se
 15 incorporan en la presente como referencia.

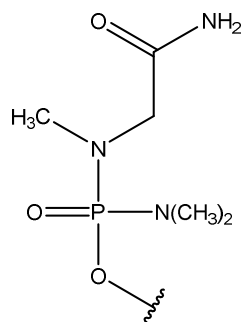
En ciertas modalidades, un morfolino se conjuga al
 extremo 5' o 3' del oligómero con una porción de "cola" para
 aumentar su estabilidad y/o solubilidad. Las colas ejemplares
 incluyen:

20

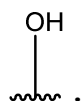
25



;



; y



La frase "farmacéuticamente aceptable" significa que la sustancia o composición debe ser compatible, química y/o toxicológicamente, con los otros ingredientes que comprenden una formulación y/o el sujeto que es tratado con esta.

La frase "portador farmacéuticamente aceptable" como se usa en la presente significa un diluyente sólido, semi-sólido o líquido inerte, no tóxico, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables son azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y

acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, 5 aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soya; glicoles; tal como propilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes amortiguadores tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; 10 solución de Ringer; alcohol etílico y soluciones amortiguadoras de fosfato, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de revestimiento, edulcorantes, 15 agentes aromatizantes y perfumantes, conservadores y antioxidantes también pueden estar presentes en la composición, de acuerdo con el criterio del formulador.

El término "restauración" de la síntesis o producción de distrofina se refiere generalmente a la 20 producción de una proteína distrofina que incluye formas truncadas de distrofina en un paciente con distrofia muscular después del tratamiento con un oligómero antisentido como se describe en la presente. En algunas modalidades, el tratamiento resulta en un aumento en la producción de 25 distrofina nueva en un paciente por 1%, 5%, 10%, 20%, 30%,

40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% (incluyendo todos los números enteros intermedios). En algunas modalidades, el tratamiento aumenta el número de fibras positivas para distrofina a al menos 20%, aproximadamente 30%,
5 aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90% o aproximadamente 95% a 100% de lo normal en el sujeto. En otras modalidades, el tratamiento aumenta el número de fibras positivas para distrofina a aproximadamente
10 20% a aproximadamente 60%, o aproximadamente 30% a aproximadamente 50% de lo normal en el sujeto. El porcentaje de fibras positivas para distrofina en un paciente después del tratamiento se puede determinar por una biopsia muscular usando técnicas conocidas. Por ejemplo, se puede tomar una
15 biopsia muscular de un músculo adecuado, tal como el músculo bíceps braquial en un paciente.

El análisis del porcentaje de fibras de distrofina positivas se puede realizar antes del tratamiento y/o después del tratamiento o en puntos de tiempo durante todo el curso
20 del tratamiento. En algunas modalidades, se toma una biopsia posterior al tratamiento del músculo contralateral de la biopsia previa al tratamiento. Se pueden realizar estudios de expresión de distrofina antes y después del tratamiento usando cualquier ensayo adecuado para distrofina. En algunas
25 modalidades, la detección inmunohistoquímica se realiza en

secciones de tejido de la biopsia muscular usando un anticuerpo que es un marcador de distrofina, tal como un anticuerpo monoclonal o policlonal. Por ejemplo, se puede usar el anticuerpo MANDYS106 el cual es un marcador altamente sensible para la distrofina. Se puede usar cualquier anticuerpo secundario adecuado.

En algunas modalidades, el porcentaje de fibras positivas a distrofina se calcula dividiendo el número de fibras positivas por las fibras totales contadas. Las muestras musculares normales tienen 100% de fibras positivas para distrofina. Por lo tanto, el porcentaje de fibras positivas para distrofina se puede expresar como un porcentaje de lo normal. Para controlar la presencia de niveles de traza de distrofina en el músculo de pretratamiento, así como las fibras revertidas, se puede establecer un valor basal usando secciones de músculos de pretratamiento de cada paciente al contar las fibras positivas para distrofina en los músculos de postratamiento. Esto se puede usar como un umbral para contar las fibras positivas para distrofina en secciones de músculo postratamiento en ese paciente. En otras modalidades, las secciones de tejido teñidas con anticuerpo también se pueden usar para la cuantificación de distrofina usando el software de análisis de imagen Bioquant (Bioquant Image Analysis Corporation, Nashville, TN). La intensidad de la señal de

fluorescencia de distrofina total se puede reportar como un porcentaje de lo normal. Además, el análisis de transferencia Western con anticuerpos anti-distrofina monoclonales o policlonales se puede usar para determinar el porcentaje de
5 fibras positivas para distrofina. Por ejemplo, se puede usar el anticuerpo anti-distrofina NCL-Dys1 de Novacastra. El porcentaje de fibras positivas para distrofina también se puede analizar determinando la expresión de los componentes del complejo sarcoglicano (β , γ) y/o NOS neuronal.

10 En algunas modalidades, el tratamiento con un oligómero antisentido de la descripción ralentiza o reduce la disfunción progresiva del músculo respiratorio y/o el fallo en pacientes con DMD que se esperaría sin tratamiento. En algunas modalidades, el tratamiento con un oligómero
15 antisentido de la descripción puede reducir o eliminar la necesidad de asistencia de ventilación que se esperaría sin tratamiento. En algunas modalidades, las mediciones de la función respiratoria para rastrear el curso de la enfermedad, así como la evaluación de posibles intervenciones
20 terapéuticas incluyen la presión inspiratoria máxima (MIP), presión espiratoria máxima (MEP) y capacidad vital forzada (FVC). La MIP y MEP miden el nivel de presión que una persona puede generar durante la inhalación y exhalación, respectivamente, y son medidas sensibles de la fuerza
25 muscular respiratoria. La MIP es una medida de la debilidad

del músculo del diagrama.

En algunas modalidades, la MEP puede disminuir antes de los cambios en otras pruebas de función pulmonar, incluyendo MIP y FVC. En ciertas modalidades, la MEP puede
5 ser un indicador temprano de la disfunción respiratoria. En ciertas modalidades, la FVC se puede usar para medir el volumen total de aire expulsado durante la exhalación forzada después de la inspiración máxima. En los pacientes con DMD, la FVC aumenta concomitantemente con el crecimiento físico
10 hasta la adolescencia temprana. Sin embargo, a medida que el crecimiento se ralentiza o se atrofia con la progresión de la enfermedad, y la debilidad muscular progresa, la capacidad vital entra en una fase descendente y disminuye a una tasa promedio de aproximadamente 8 a 8.5 por ciento por año
15 después de 10 a 12 años de edad. En ciertas modalidades, el porcentaje predicho de MIP (MIP ajustada por peso), el porcentaje predicho de MEP (MEP ajustada por edad) y el porcentaje predicho de FVC (FVC ajustada por edad y altura) son análisis de apoyo.

20 Un "sujeto", como se usa en la presente, incluye cualquier animal que exhibe un síntoma, o que está en riesgo de exhibir un síntoma, que se puede tratar con un compuesto antisentido de la descripción, tal como un sujeto que tiene o está en riesgo de tener DMD o BMD, o cualquiera de los
25 síntomas asociados con estas afecciones (por ejemplo, pérdida

de fibra muscular). Los sujetos adecuados (pacientes) incluyen animales de laboratorio (tales como ratón, rata, conejo o cobayo), animales de granja y animales domésticos o mascotas (tal como un gato o perro). Se incluyen primates no
5 humanos y, preferiblemente, pacientes humanos. También se incluyen métodos para producir distrofina en un sujeto que tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible a la omisión del exón 45.

El "tratamiento" de un sujeto (por ejemplo, un
10 mamífero, tal como un humano) o una célula es cualquier tipo de intervención usada en un intento de alterar el curso natural del sujeto o célula. El tratamiento incluye, pero no se limita a, la administración de un oligómero o una composición farmacéutica del mismo, y se puede realizar de
15 forma profiláctica o posterior al inicio de un evento patológico o al contacto con un agente etiológico. El tratamiento incluye cualquier efecto deseable sobre los síntomas o la patología de una enfermedad o afección asociada con la proteína distrofina, como en ciertas formas de
20 distrofia muscular, y puede incluir, por ejemplo, cambios o mejoras mínimas en uno o más marcadores medibles de la enfermedad o afección que se trata. También se incluyen tratamientos "profilácticos", que se pueden dirigir para reducir la tasa de progresión de la enfermedad o afección que
25 se trata, retrasar la aparición de esa enfermedad o afección,

o reducir la gravedad de su aparición. "Tratamiento" o "profilaxis" no necesariamente indica la erradicación, cura o prevención completa de la enfermedad o afección, o síntomas asociados de la misma.

5 En algunas modalidades, el tratamiento con un oligómero antisentido de la descripción aumenta la producción de distrofina nueva, retrasa la progresión de la enfermedad, disminuye o reduce la pérdida de la deambulación, reduce la inflamación muscular, reduce el daño muscular, mejora la
10 función muscular, reduce la pérdida de la función pulmonar y/o mejora la regeneración muscular que se esperaría sin tratamiento o que se esperaría sin tratamiento. En algunas modalidades, el tratamiento mantiene, retrasa o ralentiza la progresión de la enfermedad. En algunas modalidades, el
15 tratamiento mantiene la deambulación o reduce la pérdida de deambulación. En algunas modalidades, el tratamiento mantiene la función pulmonar o reduce la pérdida de la función pulmonar. En algunas modalidades, el tratamiento mantiene o aumenta una distancia de caminata estable en un paciente,
20 como se mide, por ejemplo, por la prueba de caminata de 6 minutos (6MWT). En algunas modalidades, el tratamiento mantiene o reduce el tiempo para caminar/correr 10 metros (es decir, la prueba de caminar/correr de 10 metros). En algunas modalidades, el tratamiento mantiene o reduce el tiempo de
25 reposo en posición supina (es decir, tiempo de prueba de

reposo). En algunas modalidades, el tratamiento mantiene o reduce el tiempo para subir cuatro escaleras estándar (es decir, la prueba de ascenso de cuatro escaleras). En algunas modalidades, el tratamiento mantiene o reduce la inflamación muscular en el paciente, como se mide, por ejemplo, por MRI (por ejemplo, MRI de los músculos de las piernas). En algunas modalidades, la MRI mide T2 y/o la fracción de grasa para identificar la degeneración muscular. La MRI puede identificar cambios en la estructura y composición muscular causados por inflamación, edema, daño muscular e infiltración de grasa.

En algunas modalidades, el tratamiento con un oligómero antisentido de la descripción aumenta la producción de distrofina nueva y ralentiza o reduce la pérdida de deambulación que se esperaría sin tratamiento. Por ejemplo, el tratamiento puede estabilizar, mantener, mejorar o aumentar la capacidad de caminar (por ejemplo, estabilización de la deambulación) en el sujeto. En algunas modalidades, el tratamiento mantiene o aumenta una distancia de caminata estable en un paciente, como se mide, por ejemplo, por la prueba de caminata de 6 minutos (6MWT), descrita por McDonald, et al. (Muscle Nerve, 2010; 42: 966-74, incorporado en la presente como referencia). Un cambio en la Distancia de Caminata de 6 Minutos (6MWD) se puede expresar como un valor absoluto, un cambio porcentual o un cambio en el % de valor predicho. En algunas modalidades, el tratamiento mantiene o

mejora una distancia de caminata estable en una 6MWT de un déficit de 20% en el sujeto en relación con un compañero sano. El rendimiento de un paciente con DMD en la 6MWT en relación con el rendimiento típico de un compañero sano se puede determinar calculando un % de valor predicho. Por ejemplo, el % predicho de 6MWD se puede calcular usando la siguiente ecuación para los hombres: $196.72 + (39.81 \times \text{edad}) - (1.36 \times \text{edad}^2) + (132.28 \times \text{altura en metros})$. Para las mujeres, el % predicho de 6MWD se puede calcular usando la siguiente ecuación: $188.61 + (51.50 \times \text{edad}) - (1.86 \times \text{edad}^2) + (86.10 \times \text{altura en metros})$ (Henricson et al. PLoS Curr., 2012, versión 2, incorporado en la presente como referencia). En algunas modalidades, el tratamiento con un oligómero antisentido aumenta la distancia de caminata estable en el paciente desde el valor basal a más de 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30 o 50 metros (incluyendo todos los números enteros intermedios).

La pérdida de la función muscular en pacientes con DMD puede ocurrir contra el antecedente del crecimiento y desarrollo normal de la infancia. De hecho, los niños más pequeños con DMD pueden mostrar un aumento en la distancia caminada durante 6MWT en el transcurso de aproximadamente 1 año a pesar del deterioro muscular progresivo. En algunas modalidades, la 6MWD de pacientes con DMD se compara con sujetos de control que se desarrollan típicamente y con datos

normativos existentes de sujetos emparejados por edad y sexo. En algunas modalidades, el crecimiento y desarrollo normales pueden explicarse usando una ecuación basada en la edad y altura ajustada a los datos normativos. Tal ecuación se puede
 5 usar para convertir 6MWD a un valor de porcentaje predicho (% predicho) en sujetos con DMD. En ciertas modalidades, el análisis de % predicho de datos de 6MWD representa un método para explicar el crecimiento y desarrollo normales, y puede mostrar que las ganancias en función de las edades tempranas
 10 (por ejemplo, menos que o igual a 7 años de edad) representan capacidades estables mayores que la mejora en pacientes con DMD (Henricson et al. PLoS Curr., 2012, versión 2, incorporado en la presente como referencia).

Se propuso y publicó un sistema de nomenclatura de
 15 moléculas antisentido para distinguir entre las diferentes moléculas antisentido (ver Mann et al., (2002) J Gen Med 4, 644-654). Esta nomenclatura se volvió especialmente relevante cuando se probaron varias moléculas antisentido ligeramente diferentes, todas dirigidas a la misma región objetivo, como
 20 se muestra a continuación:

H#A/D(x:y).

La primera letra designa la especie (por ejemplo, H: humano, M: murino, C: canino). “#” designa el número de exón de distrofina objetivo. “A/D” indica el sitio de empalme
 25 de aceptador o donante al principio y final del exón,

respectivamente. (x y) representa las coordenadas de apareamiento donde "-" o "+" indican secuencias intrónicas o exónicas respectivamente. Por ejemplo, A(-6+18) indicaría las últimas 6 bases del intrón que preceden el exón objetivo y las primeras 18 bases del exón objetivo. El sitio de empalme más cercano sería el aceptador, por lo que estas coordenadas irían precedidas de una "A". La descripción de las coordenadas de apareamiento en el sitio de empalme de donante podría ser D(+ 2-18) donde las últimas 2 bases exónicas y las primeras 18 bases intrónicas corresponden al sitio de apareamiento de la molécula antisentido. Las coordenadas a apareamiento completamente exónico que serían representadas por A(+65+85), que es el sitio entre el nucleótido 65 y 85 desde el inicio de ese exón.

15

II. Oligómeros Antisentido

A. Oligómeros Antisentido Diseñados para Inducir la Omisión del Exón 45

En ciertas modalidades, los oligómeros antisentido de la descripción son complementarios a una región objetivo del exón 45 del gen de distrofina e inducen la omisión del exón 45. En particular, la descripción se refiere a oligómeros antisentido de 22 a 30 subunidades de longitud, que incluyen al menos 10, 12, 15, 17, 20, 25 o más, nucleótidos consecutivos complementarios a una región

25

objetivo del exón 45 del gen de distrofina designada como un sitio de apareamiento seleccionado de los siguientes: H45A(-06+20), H45A(-03+19), H45A(-09+16), H45A(-09+19) y H45A(-12+16). Los oligómeros antisentido son complementarios al
5 sitio de apareamiento, que induce la omisión del exón 45.

Los oligómeros antisentido de la descripción se dirigen al pre-ARNm de distrofina e inducen la omisión del exón 45, por lo que se excluyen u omiten del transcrito de ARNm maduro empalmado. Al omitir el exón 45, el marco de
10 lectura interrumpido se restaura a una mutación en marco. Aunque la DMD está comprendida de varios subtipos genéticos, los oligómeros antisentido de la descripción se diseñaron específicamente para omitir el exón 45 del pre-ARNm de distrofina. Las mutaciones de DMD susceptibles a la omisión
15 del exón 45 incluyen delecciones de exones contiguos al exón 45 (es decir, que incluyen la delección del exón 44 o exón 46), y comprenden un subgrupo de pacientes con DMD (8%).

La secuencia de un PMO que induce la omisión del exón 45 se diseña para ser complementaria a una secuencia
20 objetivo específica dentro del exón 45 del pre-ARNm de distrofina. Cada anillo morfolino en el PMO se enlaza a una nucleobase que incluye, por ejemplo, las nucleobases encontradas en el ADN (adenina, citosina, guanina y timina).

Los oligómeros antisentido de la descripción pueden emplear una variedad de químicas antisentido. Los ejemplos de compuestos químicos de oligómeros incluyen, sin limitación, oligómeros de morfolino, oligómeros modificados con fosforotioato, oligómeros modificados con 2' O-metilo, ácido nucleico peptídico (PNA), ácido nucleico bloqueado (LNA), oligómeros de fosforotioato, oligómeros modificados con 2' O-MOE, oligómero modificado con 2'-fluoro, ácidos nucleicos puenteados con 2'O 4'C-etileno (ENA), triciclo-ADN, nucleótidos de fosforotioato de triciclo-ADN, oligómeros modificados con 2'-O-[2-(N-metilcarbamoil)etilo], incluyendo combinaciones de cualquiera de los anteriores. Las químicas modificadas con fosforotioato y 2'-O-Me se pueden combinar para generar un esqueleto de 2'O-Me-fosforotioato. Ver, por ejemplo, Publicaciones PCT Nos. WO/2013/112053 y WO/2009/008725, que se incorporan en la presente como referencia en su totalidad. Las modalidades ejemplares de las químicas de oligómeros de la descripción se describen adicionalmente a continuación.

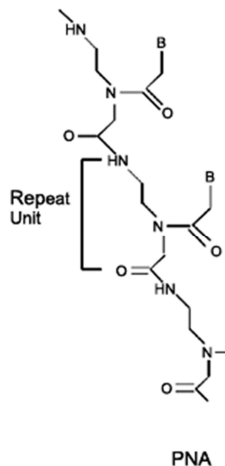
20

1. Ácidos Nucleicos Peptídicos (PNA)

Los ácidos nucleicos peptídicos (PNA) son análogos de ADN en los que el esqueleto es estructuralmente homomorfo con un esqueleto de desoxirribosa, que consiste en unidades de N- (2-aminoetil) glicina a las que se unen las bases de

25

pirimidina o purina. Los PNA que contienen bases de
 pirimidina y purina naturales se hibridan con oligómeros
 complementarios que obedecen las reglas de emparejamiento de
 bases de Watson-Crick e imitan al ADN en términos de
 5 reconocimiento de pares de bases (Egholm, Buchardt et al.
 1993). El esqueleto de los PNA se forma por enlaces
 peptídicos en lugar de los fosfodiéster, lo que los
 hace muy adecuados para aplicaciones antisentido (ver
 estructura a continuación). El esqueleto no está cargado, lo
 10 que resulta en dúplex PNA/ARN que exhiben una
 estabilidad térmica normal. Los PNA no son
 reconocidos por las nucleasas. Un ejemplo no
 limitante de un PNA se muestra a continuación:



15

Unidad de
Repetición

20

A pesar de un cambio estructural radical en la
 estructura natural, los PNA son capaces de unirse a una
 secuencia específica en forma de hélice a ADN o ARN. Las
 características de los PNA incluyen una alta afinidad de
 25 unión al ADN o ARN complementario, un efecto

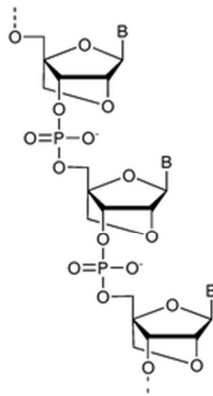
desestabilizantes causado por el mal apareamiento de una base única, la resistencia a las nucleasas y proteasas, la hibridación con el ADN o ARN independientemente de la concentración de sal y la formación de triplex con el ADN de homopurina. PANAGENE™ ha desarrollado sus propios monómeros de Bts PNA (Bts; grupo benzotiazol-2-sulfonilo) y su proceso de oligomerización patentado. La oligomerización de PNA usando monómeros de Bts PNA se compone de ciclos repetitivos de desprotección, acoplamiento y taponado. Los PNA se pueden producir sintéticamente usando cualquier técnica conocida en la técnica. Ver, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos Nos. 6,969,766, 7,211,668, 7,022,851, 7,125,994, 7,145,006 y 7,179,896. Ver también las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,539,082; 5,714,331; y 5,719,262 para la preparación de PNA. Se puede encontrar información adicional sobre los compuestos de PNA en Nielsen et al., Science, 254: 1497-1500, 1991. Cada uno de los anteriores se incorpora como referencia en su totalidad.

2. Ácidos Nucleicos Bloqueados (LNA)

Los compuestos oligoméricos antisentido también pueden contener subunidades de "ácido nucleico bloqueado" (LNA). Los "LNA" son miembros de una clase de modificaciones llamadas ácido nucleico puenteado (BNA). El BNA se caracteriza por un enlace covalente que bloquea la

conformación del anillo de ribosa en un frunce de azúcar endo C30 (análisis northern). Para LNA, el puente se compone de un metileno entre las posiciones 2'-O y 4'-C. El LNA mejora la preorganización del esqueleto y el apilamiento de base para
 5 aumentar la hibridación y estabilidad térmica.

Las estructuras de los LNA se pueden encontrar, por ejemplo, en Wengel, et al., Chemical Communications (1998) 455; Tetrahedron (1998) 54: 3607, y Accounts of Chem. Research (1999) 32: 301); Obika, et al., Tetrahedron Letters
 10 (1997) 38:8735; (1998) 39:5401, y Bioorganic Medicinal Chemistry (2008) 16:923. Se incorporan en la presente continuación se representa como referencia en su totalidad un ejemplo no limitante



LNA

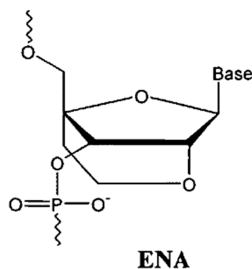
20

Los compuestos de la descripción pueden incorporar uno o más LNA; en algunos casos, los compuestos pueden estar completamente compuestos de LNA. Los métodos para la síntesis de subunidades de nucleósidos de LNA individuales y su
 25 incorporación en oligómeros se describen, por ejemplo, en las

Patentes de Estados Unidos Nos. 7,572,582, 7,569,575, 7,084,125, 7,060,809, 7,053,207, 7,034,133, 6,794,499 y 6,670,461, cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad. Los enlazadores de intersubunidad
 5 típicos incluyen porciones de fosfodiéster y fosforotioato; alternativamente, se pueden emplear enlazadores que no contienen fósforo. Modalidades adicionales incluyen un compuesto que contiene LNA donde cada subunidad de LNA se separa por una subunidad de ADN. Ciertos compuestos se
 10 componen de subunidades de LNA y ADN alternas donde el enlazador de intersubunidad es fosforotioato.

Los ácidos nucleicos con puentes de 2'O,4'C-etileno (ENA) son otro miembro de la clase de BNA. A continuación se muestra un ejemplo no limitante:

15



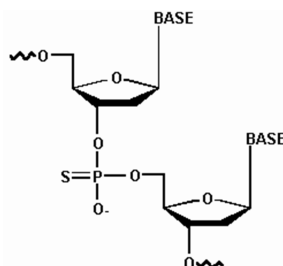
Los oligómeros de ENA y su preparación se describen
 20 en Obika et al., *Tetrahedron Lett* 38 (50): 8735, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. Los compuestos de la descripción pueden incorporar una o más subunidades de ENA.

25

3. Fosforotioatos

Los "fosforotioatos" (o S-oligos) son una variante del ADN normal en el que uno de los oxígenos no puenteados se reemplaza por un azufre. A continuación se muestra un ejemplo no limitante de un fosforotioato:

5



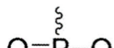
La sulfuración del enlace internucleótido reduce la acción de las endo y exonucleasas, incluyendo la exonucleasa POL 1 de ADN de 5' a 3' y 3' a 5', nucleasas S1 y P1, RNasas, nucleasas séricas y fosfodiesterasa de veneno de serpiente. Los fosforotioatos se hacen por dos vías principales: por la acción de una solución de azufre elemental en disulfuro de carbono en un fosfonato de hidrógeno, o por el método de sulfuración de triésteres de fosfito con disulfuro de tetraetiltiliuram (TETD) o 3H-1, 1,1-dióxido de 2-bensoditiol-3-ona (BDTD) (ver, por ejemplo, Iyer et al., J. Org. Chem. 55, 4693-4699, 1990, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad). Los últimos métodos evitan el problema de la insolubilidad del azufre elemental en la mayoría de los solventes orgánicos y la toxicidad del disulfuro de carbono. Los métodos de TETD y BDTD también producen fosforotioatos de mayor pureza.

25

4. Nucleótidos de Tricliclo-ADN y Triciclo-Fosforotioato

Los triciclo-ADN (tc-ADN) son una clase de análogos de ADN restringidos en los que cada nucleótido se modifica por la introducción de un anillo de ciclopropano para restringir la flexibilidad conformacional del esqueleto y para optimizar la geometría del esqueleto del ángulo de torsión γ . Los tc-ADN homobásicos que contienen adenina y timina forman pares de bases A-T extraordinariamente estables con ARN complementarios. Los triciclo-ADN y su síntesis se describen en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional No. WO 2010/115993, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. Los compuestos de la descripción pueden incorporar uno o más nucleótidos de triciclo-ADN; en algunos casos, los compuestos pueden estar completamente compuestos de nucleótidos de triciclo-ADN.

Los nucleótidos de triciclo-fosforotioato son nucleótidos de triciclo-ADN con enlaces de intersubunidad de fosforotioato. Los nucleótidos de triciclo-fosforotioato y su síntesis se describen en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional No. WO 2013/053928, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. Los compuestos de la descripción pueden incorporar uno o más nucleótidos de triciclo-ADN; en algunos casos, los compuestos pueden estar completamente compuestos de nucleótidos de triciclo-ADN. A



continuación se muestra un ejemplo no limitante de un nucleótido de triciclo-ADN/triciclo-fosforotioato:

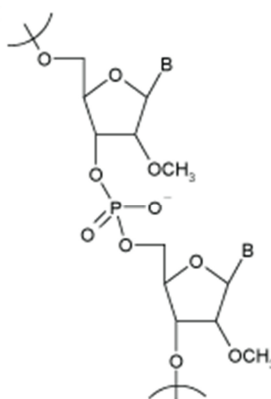
5

triciclo-ADN

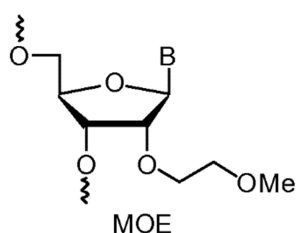
5. Oligómeros de 2'-O-Metilo, 2'-O-MOE y 2'-F

Las moléculas de "oligómero 2'-O-Me" portan un grupo metilo en el residuo 2'-OH de la molécula de ribosa. Los 2'-O-Me-ARN muestran el mismo comportamiento (o similar) que el ADN, pero están protegidos contra la degradación de las nucleasas. Los 2'-O-Me-ARN también se pueden combinar con oligómeros de fosforotioato (PTO) para estabilización adicional. Los oligómeros de 2'-O-Me (fosfodiéster o fosfotioato) se pueden sintetizar de acuerdo con técnicas de rutina en la técnica (ver, por ejemplo, Yoo et al., Nucleic Acids Res. 32:2008-16, 2004, que se incorpora como referencia en su totalidad). A continuación se muestra un ejemplo no limitante de un oligóme

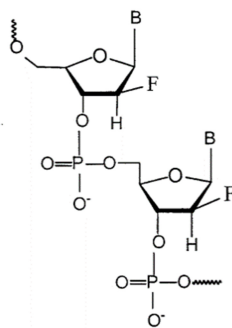
25



Los oligómeros de 2'-O-metoxietilo (2'-O MOE), como los oligómeros de 2'-O-Me, portan un grupo metoxietilo en el residuo 2'-OH de la molécula de ribosa y se describen en Martin et al., *Helv. Chim Acta*, 78, 486-504, 1995, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. A continuación se representa un ejemplo no limitante de un nucleótido de 2'-O-MOE:



En contraste con los derivados de 2'-OH ribosa alquilados anteriores, los oligómeros de 2'-fluoro tienen un radical fluoro en la posición 2' en lugar del 2'-OH. A continuación se muestra un ejemplo no limitante de un oligómero de 2'-F:

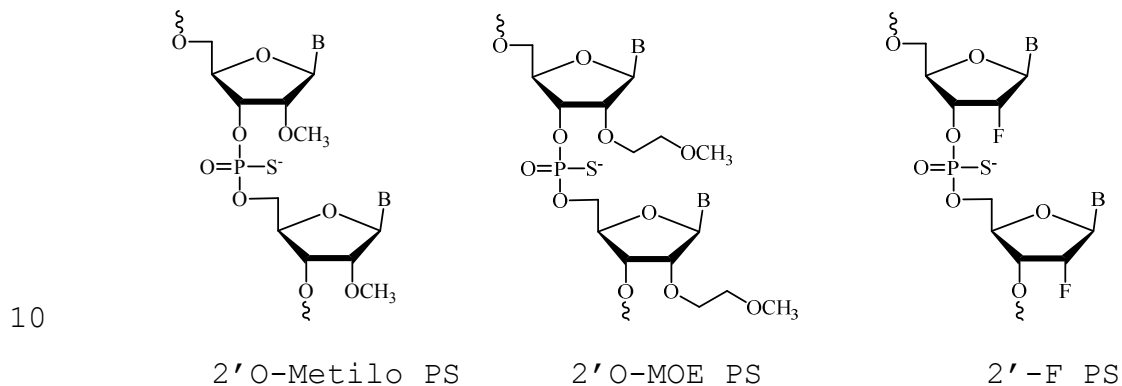


Los oligómeros de 2'-fluoro se describen

adicionalmente en WO 2004/043977, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

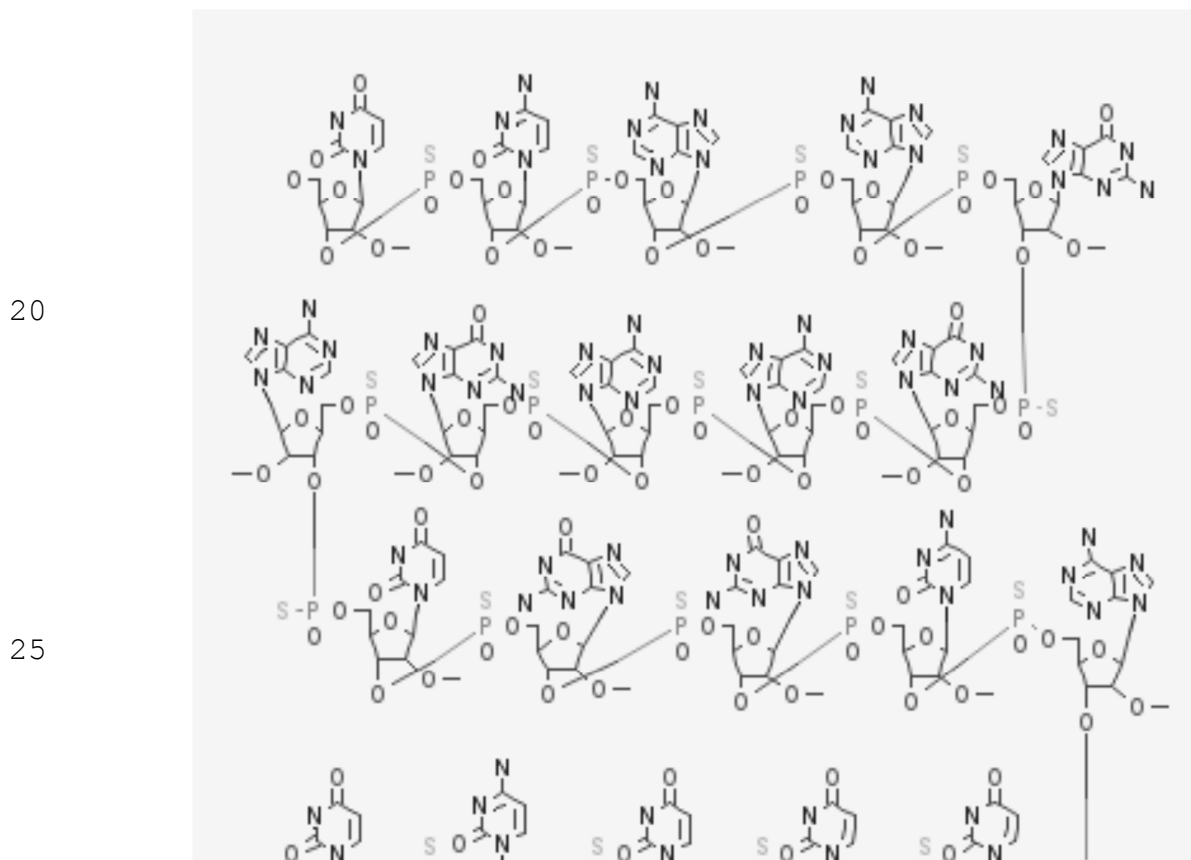
Los oligómeros 2'-O-Metilo, 2'-O-MOE y 2'-F también pueden comprender uno o más enlaces de fosforotioato (PS)

5 como se representa a continuación:



Además, los oligómeros de 2'-O-metilo, 2'-O-MOE, y 2'-F pueden comprender enlaces de intersubunidad de PS en todo el oligómero, por ejemplo, como en el oligómero de 2'-O-

15 metilo PS drisapersen representado a continuación:

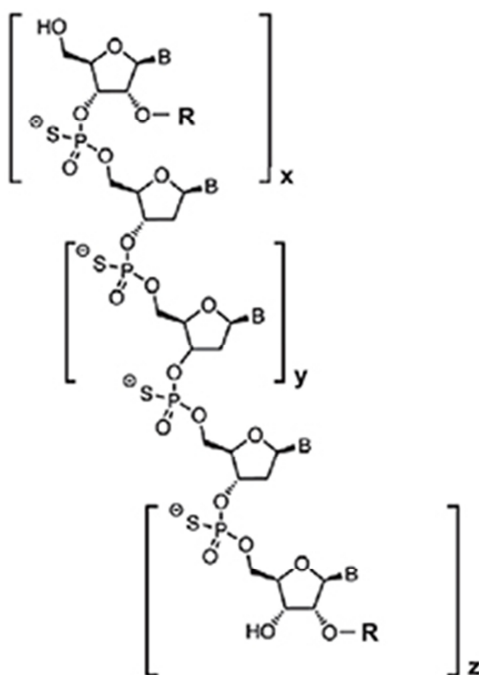


5

Alternativamente, los oligómeros que comprenden oligómeros de 2'-O-Metilo, 2'-O-MOE y/o 2'-F pueden comprender enlaces PS en los extremos del oligómero como se representa a
 10 continuación:

15

20



R = CH₂CH₂OCH₃, metoxietilo (MOE)

donde x, y, z denotan el número de nucleótidos contenidos dentro de cada una de las regiones 5'-ala, abertura central y 3'-ala designadas, respectivamente

25

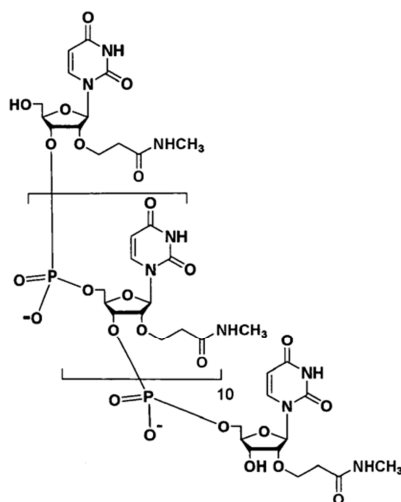
Los oligómeros antisentido de la descripción pueden

incorporar una o más subunidades de 2'O-metilo, 2'O-MOE y 2'-F y pueden usar cualquiera de los enlaces de intersubunidad descritos en la presente. En algunos casos, un compuesto de la descripción podría estar compuesto completamente por subunidades de 2'O-metilo, 2'O-MOE o 2'-F. Una modalidad de un compuesto de la descripción está compuesta completamente por subunidades de 2'O-metilo.

6. Oligómeros de 2'-O-[2-(N-metilcarbamoil)etil]

10 (MCE)

Los MCE son otro ejemplo de ribonucleósidos modificados con 2'O útiles en los compuestos de la descripción. Aquí, el 2'OH se deriva a una porción 2-(N-metilcarbamoil) etilo para aumentar la resistencia a la nucleasa. Un ejemplo no limitante de un oligómero de MCE se representa a continuación:



Los MCE y su síntesis se describen en Yamada et

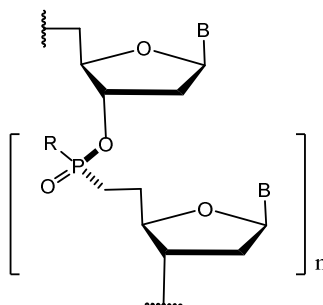
al., *J. Org. Chem.*, 76 (9): 3042-53, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. Los compuestos de la descripción pueden incorporar una o más subunidades de MCE.

5

7. Oligómeros Estereo Específicos

Los oligómeros estereo específicos son aquellos en los que la química estereoscópica de cada enlace que contiene fósforo se fija por el método de síntesis, de manera que se produce un oligómero único sustancialmente puro. A
10 continuación se muestra un ejemplo no limitante de un oligómero estereo específico:

15

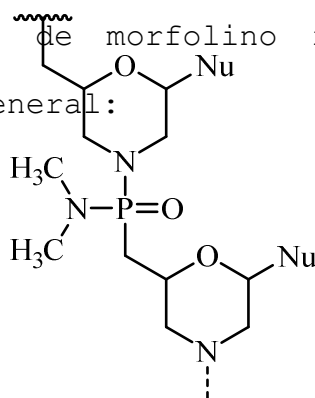


En el ejemplo anterior, cada fósforo del oligómero tiene la misma estereoquímica. Los ejemplos adicionales incluyen los oligómeros descritos anteriormente. Por ejemplo,
20 LNA, ENA, Triciclo-ADN, MCE, 2'O-metilo, 2'O-MOE, 2'-F y oligómeros basados en morfolino se pueden preparar con enlaces de internucleósidos que contienen fósforo estereo-específicos, tales como por ejemplo, fosforotioato, fosfodiéster, fosforamidato, fosforodiamidato u otros enlaces
25 de internucleósidos que contienen fósforo. Los oligómeros

estéreo específicos, métodos de preparación, síntesis controlada por quirol, diseño quiral, y auxiliares quirales para uso en la preparación de tales oligómeros se detallan, por ejemplo, en WO2015107425, WO2015108048, WO2015108046, WO2015108047, WO2012039448, WO2010064146, WO2011034072, WO2014010250, WO2014012081, WO20130127858, y WO2011005761, cada uno de los cuales se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

8. Oligómeros de Morfolino

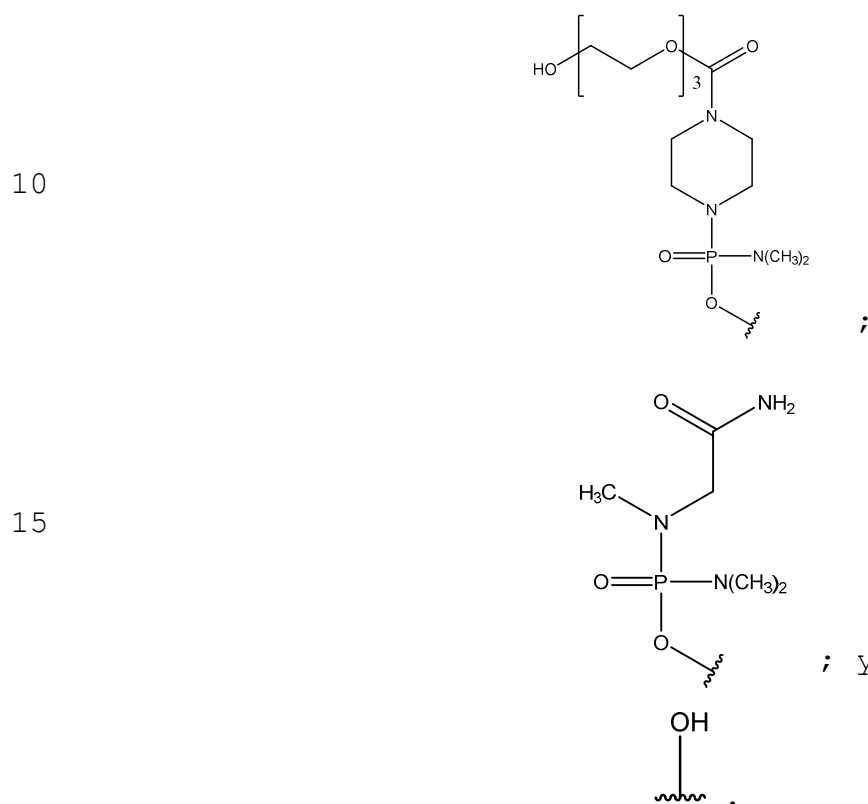
Las modalidades ejemplares de la descripción se refieren a oligómeros de morfolino fosforodiamidato de la siguiente estructura general:



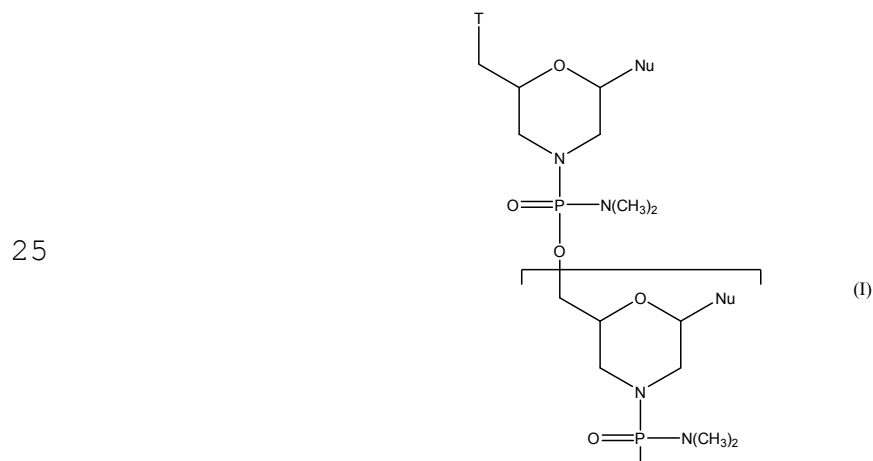
y como se describe en la Figura 2 de Summerton, J., et al., *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 7: 187-195 (1997). Los morfolinos como se describen en la presente pretenden cubrir todos los estereoisómeros y configuraciones de la estructura general anterior. La síntesis, estructuras y características de unión de los oligómeros de morfolino se

detallan en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,698,685, 5,217,866, 5,142,047, 5,034,506, 5,166,315, 5,521,063, 5,506,337, 8,076,476 y 8,299,206, todas las cuales se incorporan en la presente como referencia.

5 En ciertas modalidades, un morfolino se conjuga en el extremo 5' o 3' del oligómero con una porción de "cola" para aumentar su estabilidad y/o solubilidad. Las colas ejemplares incluyen:



20 En diversas modalidades, un oligómero antisentido de la descripción puede ser de Fórmula (I):



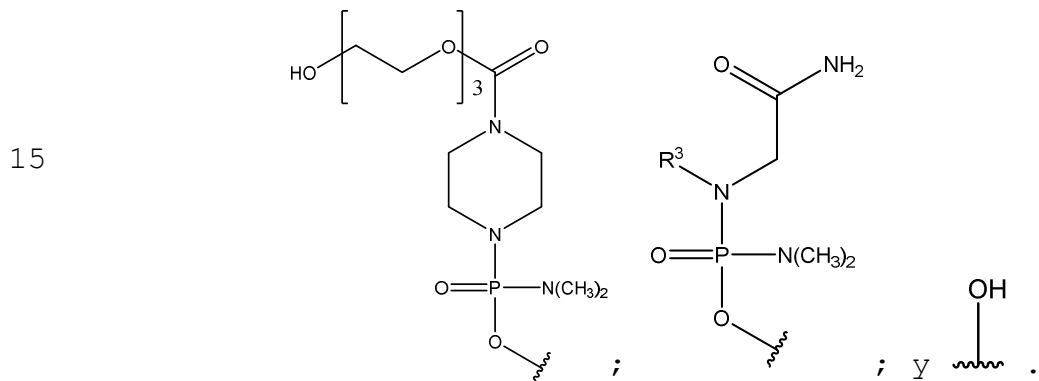
5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en
donde:

10 cada Nu es una nucleobase que tomadas juntas forman
una secuencia de objetivo;

Z es un número entero desde 20 a 26;

T es una porción seleccionada de:



donde R³ es alquilo de C₁-C₆; y

20 R² se selecciona de H, acetilo, tritilo y 4-
metoxitritilo,

en donde la secuencia de objetivo es complementaria
a una región objetivo del exón 45 seleccionada del grupo que
consiste en H45A(-06+20), H45A(-03+19), H45A(-09+16), H45A(-
25 09+19), y H45A(-12+16).

En algunas modalidades, la secuencia de objetivo se selecciona de:

a) SEQ ID NO: 1 (5'-CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA-3')

en donde Z es 24;

5 b) SEQ ID NO: 2 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3') en donde Z es 20;

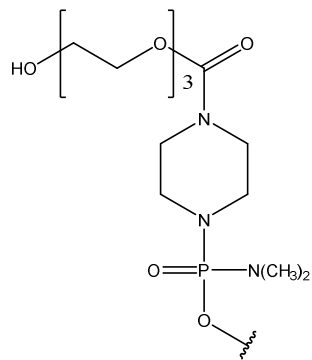
c) SEQ ID NO: 3 (5'-TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3')

en donde Z es 23;

d) SEQ ID NO: 4 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3') en donde Z es 26; y

e) SEQ ID NO: 5 (5'-TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATAACC-3') en donde Z es 26.

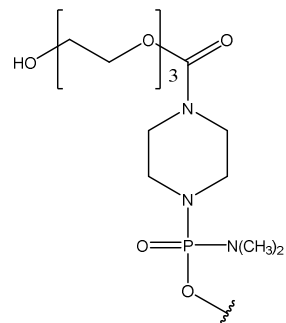
15



En diversas modalidades, T es

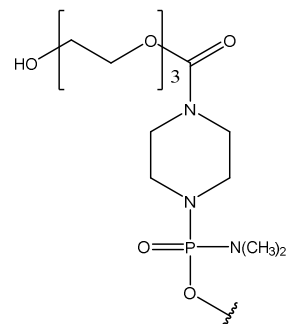
En algunas modalidades, R^2 es H. En ciertas modalidades, Z es 24. En algunas modalidades, Z es 20. En algunas modalidades, Z es 23. En algunas modalidades, Z es 26.

25



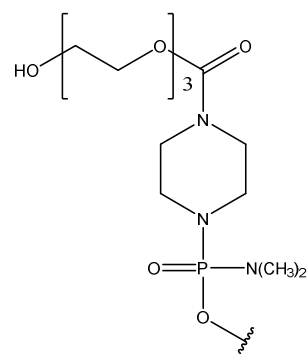
En algunas modalidades, T es R^2 es

5



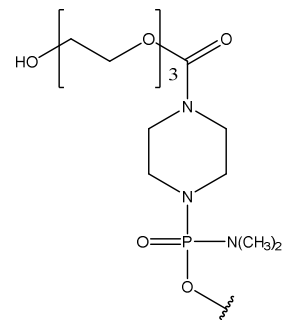
H y Z es 24. En algunas modalidades, T es R^2

10



es H y Z es 20. En algunas modalidades, T es

15

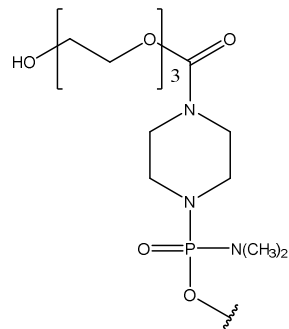


R^2 es H y Z es 23. En algunas modalidades, T es

20 R^2 es H y Z es 26.

25

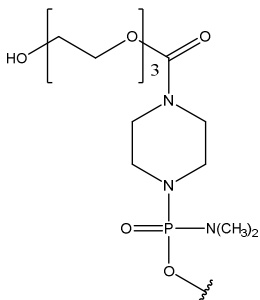
En algunas modalidades, T es



la

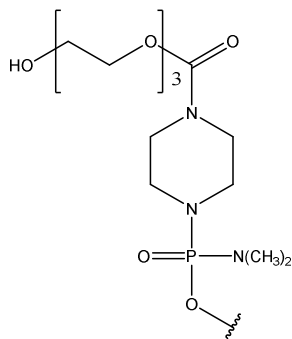
secuencia de objetivo es la SEQ ID NO: 1 (5'-CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA-3') y Z es 24. En algunas

5



modalidades, T es , la secuencia de objetivo es la SEQ ID NO: 2 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3' y Z es 20. En

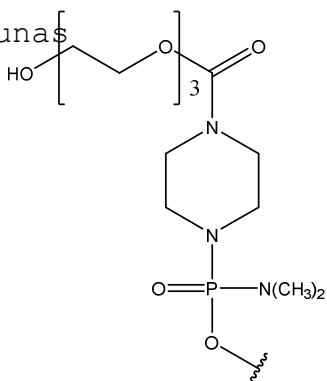
10



algunas modalidades, T es , la secuencia de objetivo es la SEQ ID NO: 3 (5'-TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3')

15

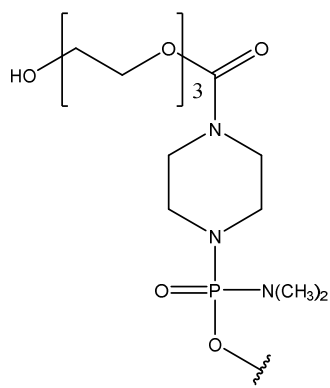
y Z es 23. En algunas



20

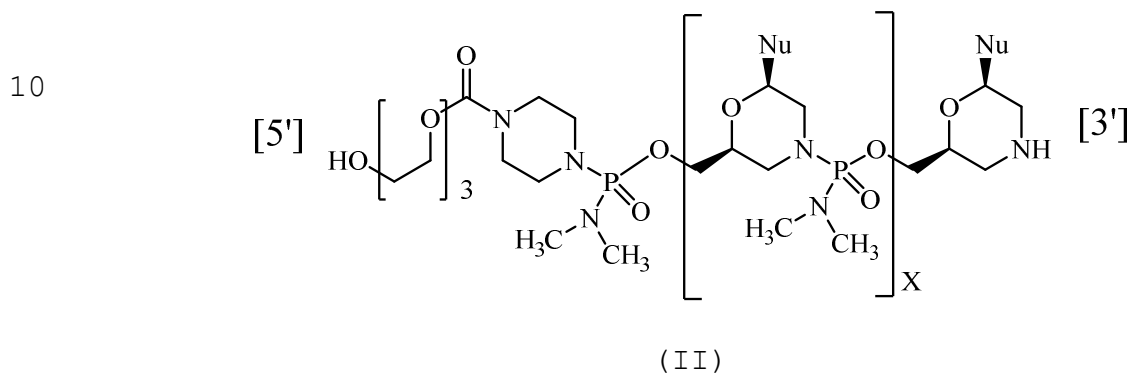
modalidades, T es , la secuencia de objetivo es la SEQ ID NO: 4 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3') y Z es

25



26. En algunas modalidades, T es , la
 5 secuencia de objetivo es la SEQ ID NO: 5 (5'-TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATACC-3') y Z es 26.

En algunas modalidades, un oligómero antisentido de la descripción es de Fórmula (II):



15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

cada Nu es una nucleobase que tomadas juntas forman una secuencia de objetivo; y

X es un número entero de 21 a 29,

20 en donde la secuencia de objetivo se selecciona de:

a) SEQ ID NO: 1 (5'-CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA-3')

en donde X es 25;

b) SEQ ID NO: 2 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3') en

donde X es 21;

25 c) SEQ ID NO: 3 (5'-TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3')

en donde X es 24;

d) SEQ ID NO: 4 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3') en donde X es 27; y

e) SEQ ID NO: 5 (5'-TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATAACC-3') en donde X es 27.

En algunas modalidades que incluyen, por ejemplo, modalidades de oligómeros antisentido de Fórmula (II), la secuencia de objetivo es la SEQ ID NO: 1 (5'-CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA-3) y X es 25. En algunas modalidades que incluyen, por ejemplo, modalidades de oligómeros antisentido de Fórmula (II), la secuencia de objetivo es la SEQ ID NO: 2 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3) y X es 21. En algunas modalidades que incluyen, por ejemplo, modalidades de oligómeros antisentido de Fórmula (II), la secuencia de objetivo es la SEQ ID NO: 3 (5'-TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3) y X es 24. En algunas modalidades que incluyen, por ejemplo, modalidades de oligómeros antisentido de Fórmula (II), la secuencia de objetivo es la SEQ ID NO: 4 (5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3) y X es 27. En algunas modalidades que incluyen, por ejemplo, modalidades de oligómeros antisentido de Fórmula (II), la secuencia de objetivo es la SEQ ID NO: 5 (5'-TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATAACC-3) y X es 27.

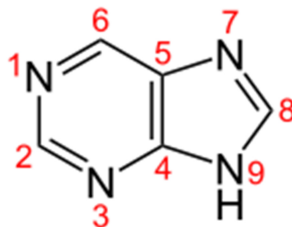
En una modalidad de la descripción, el oligómero antisentido es casimersen.

9. Modificaciones y Sustituciones de Nucleobases

En ciertas modalidades, los oligómeros antisentido de la descripción están compuestos por nucleobases de ARN y nucleobases de ADN (a menudo referidas en la técnica simplemente como "base"). Las bases de ARN se conocen comúnmente como adenina (A), uracilo (U), citosina (C) y guanina (G). Las bases de ADN se conocen comúnmente como adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G).

En ciertas modalidades, una o más bases de ARN o bases de ADN en un oligómero se pueden modificar o sustituir con una base distinta de una base de ARN o base de ADN. Los oligómeros que contienen una base modificada o sustituida incluyen oligómeros en los que una o más bases de purina o pirimidina que se encuentran más comúnmente en los ácidos nucleicos se reemplazan por bases menos comunes o no naturales.

Las bases de purina comprenden un anillo de pirimidina fusionado con un anillo de imidazol, como se describe en la fórmula general:

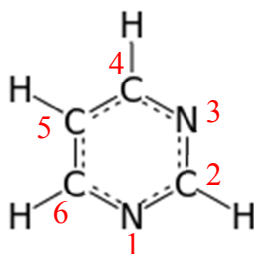


Purina

La adenina y guanina son las dos nucleobases de purina que se encuentran más comúnmente en los ácidos nucleicos. Estas se pueden sustituir con otras purinas de origen natural, incluyendo pero no limitado a N⁶-metiladenina, N²-metilguanina, hipoxantina, y 7-metilguanina.

Las bases de pirimidina comprenden un anillo de pirimidina de seis miembros como se describe en la fórmula general:

10



Pirimidina

La citosina, uracilo y timina son las bases de pirimidina que se encuentran más comúnmente en los ácidos nucleicos. Estas se pueden sustituir por otras pirimidinas de origen natural incluyendo, pero no limitado a, 5-metilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, pseudouracilo y 4-tiouracilo. En una modalidad, los oligómeros descritos en la presente contienen bases de timina en lugar de uracilo.

Otras bases modificadas o sustituidas incluyen, pero no se limitan a, 2,6-diaminopurina, ácido orótico, agmatidina, lisidina, 2-tiopirimidina (por ejemplo, 2-tiouracilo, 2-tiotimina), G-clamp y sus derivados, pirimidina 5-sustituida (por ejemplo, 5-halouracilo, 5-propiniluracilo,

5-propinilcitosina, 5-aminometiluracilo, 5-hidroximetiluracilo, 5-aminometilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, Super T), 7-desazaguanina, 7-desazaadenina, 7-aza-2,6-diaminopurina, 8-aza-7-deazaguanina, 8-aza-7-deszaadenina, 8-aza-7-desaza-2,6-diaminopurina, Super G, Super A y N4-etilcitosina, o derivados de los mismos; N²-ciclopentilguanina (cPent-G), N²-ciclopentil-2-aminopurina (cPent-AP) y N²-propil-2-aminopurina (Pr-AP), pseudouracilo o derivados del mismo; y bases degeneradas o universales, como el 2,6-difluorotolueno o bases ausentes como sitios abásicos (por ejemplo, 1-desoxirribosa, 1,2-didesoxirribosa, 1-desoxi-2-O-metilribosa o derivados de pirrolidina en los cuales el anillo de oxígeno se ha remplazado con nitrógeno (azaribosa)). Los ejemplos de derivados de Super A, Super G y Super T se pueden encontrar en la Patente de Estados Unidos 6,683,173 (Epoch Biosciences), que se incorpora en la presente completamente como referencia. Se mostró que cPent-G, cPent-AP y Pr-AP reducen los efectos inmunoestimulantes cuando se incorporan en ARNsi (Peacock H. et al., J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 9200). El pseudouracilo es una versión isomerizada de uracilo de origen natural, con un C-glucósido en lugar del N-glucósido regular como en la uridina. El ARNm sintético que contiene pseudouridina puede tener un perfil de seguridad mejorado en comparación con el mPvNA que contiene uridina (WO 2009127230, incorporado en la presente en su

totalidad como referencia).

Ciertas nucleobases modificadas o sustituidas son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los oligómeros antisentido de la descripción. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha mostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico por 0.6-1.2°C y son sustituciones de bases actualmente preferidas, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcar 2'-O-metoxietilo.

10. Isótopos de Hidrógeno

En los compuestos de la presente invención, cualquiera de los isótopos naturales para un átomo puede estar presente por su abundancia natural o puede estar enriquecido para un isótopo en una o más posiciones. Por ejemplo, dentro de la presente invención, los compuestos identificados que tienen un átomo de hidrógeno en una posición pueden tener 1H- (protio), 2H- (deuterio o D) y 3H- (tritio o T) en esa posición, o un átomo de carbono en una posición puede ser un carbono 12C, 13C o 14C.

El enriquecimiento de una o más posiciones para uno o más isótopos puede ayudar a la actividad de la composición

debido al cambio en la masa del compuesto con el isótopo y/o la radioactividad de la composición para isótopos inestables que permitirían la presencia de la composición o un metabolito para ser detectado más fácilmente.

5 El isótopo más abundante de hidrógeno es 1H y tiene una abundancia natural de más de 99.98%. El deuterio naturalmente comprende aproximadamente 1 de cada 6,000 hidrógenos o 0.015% de abundancia. En algunos compuestos de la presente invención, la cantidad de deuterio en una
10 posición se puede enriquecer hasta 6,000 veces de la abundancia natural de deuterio, lo que significaría que aproximadamente 100% de los átomos de hidrógeno en esa posición son deuterio. En algunas modalidades de la presente invención, el enriquecimiento de deuterio puede ser 1,000
15 veces, 2,000 veces, 3,000 veces (aproximadamente 50% de deuterio) o mayor en la composición. Alternativamente, el enriquecimiento de deuterio puede dar como resultado composiciones con más de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% en una o más posiciones.

20

11. Sales Farmacéuticamente Aceptables de Oligómeros

Ciertas modalidades de los oligómeros descritos en la presente pueden contener un grupo funcional básico, tal
25 como amino o alquilamino, y son, por lo tanto, capaces de

formar sales farmacéuticamente aceptables con ácidos farmacéuticamente aceptables. El término "sales farmacéuticamente aceptables" a este respecto, se refiere a las sales de adición de ácidos inorgánicos y orgánicos, relativamente no tóxicas, de los compuestos de la presente descripción. Estas sales pueden prepararse in situ en el vehículo de administración o en el proceso de manufactura de la forma de dosificación, o haciendo reaccionar por separado un compuesto purificado de la descripción en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado, y aislando la sal así formada durante la purificación posterior. Las sales representativas incluyen las sales de bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato y laurilsulfonato y similares. (Ver, por ejemplo, Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66: 1-19).

Las sales farmacéuticamente aceptables de los oligómeros en cuestión incluyen las sales no tóxicas convencionales o sales de amonio cuaternario de los compuestos, por ejemplo, de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos. Por ejemplo, tales sales no tóxicas convencionales incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos tales como

clorhidrato, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, 5 ascórbico, palmítico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicíclico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluensulfónico, metanosulfónico, etano disulfónico, oxálico, isotiónico y similares.

En ciertas modalidades, los oligómeros de la presente descripción pueden contener uno o más grupos 10 funcionales ácidos y, por lo tanto, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. El término "sales farmacéuticamente aceptables" en estos casos se refiere a las 15 sales de adición de bases inorgánicas y orgánicas, relativamente no tóxicas, de los compuestos de la presente descripción. Estas sales también pueden prepararse in situ en el vehículo de administración o el proceso de manufactura de la forma de dosificación, o haciendo reaccionar por separado 20 el compuesto purificado en su forma de ácido libre con una base adecuada, tal como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable, con amoníaco, o con una amina orgánica primario, secundaria o terciaria farmacéuticamente aceptable. Las sales 25 representativas de álcali o alcalinotérreas incluyen las

sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio y similares. Las aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de bases incluyen etilamina, dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, 5 piperazina y similares. (Ver, por ejemplo, Berge et al., *supra*).

III. Formulaciones y Modos de Administración

En ciertas modalidades, la presente descripción
10 proporciona formulaciones o composiciones farmacéuticas adecuadas para el suministro terapéutico de oligómeros antisentido, como se describe en la presente. Por lo tanto, en ciertas modalidades, la presente descripción proporciona composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden una
15 cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más de los oligómeros descritos en la presente, formulados junto con uno o más portadores (aditivos) y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Si bien es posible que un oligómero de la presente descripción se administre solo, se prefiere
20 administrar el compuesto como una formulación farmacéutica (composición).

Los métodos para el suministro de moléculas de ácido nucleico se describen, por ejemplo, en Akhtar et al., 1992, Trends Cell Bio., 2:139; y Delivery Strategies for
25 Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar; Sullivan et

al., PCT WO 94/02595. Estos y otros protocolos se pueden usar para el suministro de prácticamente cualquier molécula de ácido nucleico, incluidos los oligómeros de la presente descripción.

5 Como se detalla a continuación, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden formularse especialmente para la administración en forma sólida o líquida, incluidas las adaptadas para lo siguiente: (1) administración oral, por ejemplo, pociones (soluciones o
10 suspensiones acuosas o no acuosas), tabletas, por ejemplo, los destinados a la absorción bucal, sublingual y sistémica, bolos, polvos, gránulos, pastas para aplicación en la lengua; (2) administración parenteral, por ejemplo, por inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural como, por
15 ejemplo, una solución o suspensión estéril, o una formulación de liberación sostenida; (3) aplicación tópica, por ejemplo, como una crema, ungüento o un parche o aerosol de liberación controlada aplicado a la piel; (4) por vía intravaginal o intrarrectal, por ejemplo, como pesario, crema o espuma; (5)
20 sublingualmente; (6) ocularmente; (7) transdérmicamente; o (8) nasalmente.

 Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y
25 sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón

de papa; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y
5 ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y
10 polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes amortiguadores, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19)
15 alcohol etílico; (20) soluciones amortiguadas de pH; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; y (22) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

Los ejemplos no limitantes adicionales de agentes
20 adecuados para la formulación con los oligómeros antisentido de la presente descripción incluyen: ácidos nucleicos conjugados con PEG, ácidos nucleicos conjugados con fosfolípidos, ácidos nucleicos que contienen porciones lipófilas, fosforotioatos, inhibidores de la glicoproteína P
25 (tales como Pluronic P85) que pueden mejorar la entrada de

fármacos en diversos tejidos; polímeros biodegradables, tales como microesferas de poli (DL-lactida-glicolida) para el suministro de liberación sostenida después de la implantación (Emerich, DF et al., 1999, Cell Transplant, 8, 47-58) Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.; y nanopartículas cargadas, como las hechas de polibutilcianoacrilato, que pueden administrar fármacos a través de la barrera hematoencefálica y pueden alterar los mecanismos de captación neuronal (Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999).

La descripción también presenta el uso de la composición que comprende liposomas modificados en la superficie que contienen lípidos de poli (etilenglicol) (modificados con PEG, ramificados y no ramificados o combinaciones de los mismos, o liposomas de circulación prolongada o liposomas sigilosos). Los oligómeros de la descripción también pueden comprender moléculas de PEG unidas covalentemente de diversos pesos moleculares. Estas formulaciones ofrecen un método para aumentar la acumulación de fármacos en los tejidos objetivo. Esta clase de portadores de fármacos resiste la opsonización y eliminación por el sistema fagocítico mononuclear (MPS o RES), lo que permite tiempos de circulación sanguínea más prolongados y una mayor exposición al tejido para el fármaco encapsulado (Lasic et al. Chem. Rev. 1995, 95, 2601-2627). Ishiwata et al., Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 1005-1011). Se ha demostrado que tales

liposomas se acumulan selectivamente en tumores, presumiblemente por extravasación y captura en los tejidos objetivo neovascularizados (Lasic et al., Science 1995, 267, 1275-1276; Oku et al., 1995, Biochim Biophys. Acta, 1238, 86-
5 90). Los liposomas de circulación prolongada mejoran la farmacocinética y la farmacodinámica del ADN y ARN, particularmente en comparación con los liposomas catiónicos convencionales que se sabe que se acumulan en los tejidos de la MPS (Liu et al., J. Biol. Chem. 1995, 42, 24864-24870;
10 Choi et al., Publicación Internacional de PCT No. WO 96/10391; Ansell et al., Publicación internacional de PCT No. WO 96/10390; Holland et al., Publicación internacional de PCT No. WO 96/10392). Los liposomas de circulación prolongada también pueden proteger a los fármacos de la degradación de
15 las nucleasas en mayor medida en comparación con los liposomas catiónicos, en función de su capacidad para evitar la acumulación en tejidos de MPS metabólicamente agresivos, como el hígado y el bazo.

En una modalidad adicional, la presente descripción
20 incluye composiciones farmacéuticas de oligómeros preparadas para el suministro tal como se describe en las Patentes de Estados Unidos Nos. 6,692,911, 7,163,695 y 7,070,807. A este respecto, en una modalidad, la presente descripción proporciona un oligómero de la presente descripción en una
25 composición que comprende copolímeros de lisina e histidina

(HK) (como se describe en las Patentes de Estados Unidos, Nos. 7,163,695, 7,070,807 y 6,692,911) ya sea sola o en combinación con PEG (por ejemplo, PEG ramificado o no ramificado o una mezcla de ambos), en combinación con PEG y
5 una porción de objetivo o cualquiera de los anteriores en combinación con un agente de reticulación. En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona oligómeros antisentido en composiciones farmacéuticas que comprenden polihistidina modificada con ácido glucónico o polihistidina
10 gluconilada/transferrina-polilisina. Un experto en la técnica también reconocerá que los aminoácidos con propiedades similares a His y Lys se pueden sustituir dentro de la composición.

Los agentes humectantes, emulsionantes y
15 lubricantes, tales como lauril sulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de revestimiento, agentes edulcorantes, saborizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes también pueden estar presentes en las composiciones.

20 Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como
25 palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA),

hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamintetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, 5 ácido fosfórico y similares.

Las formulaciones de la presente descripción incluyen aquellas adecuadas para administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse 10 convenientemente en una forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquier método bien conocido en la técnica de la farmacia. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del huésped 15 que se esté tratando, el modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación única será generalmente la cantidad del compuesto que produce un efecto terapéutico. En general, fuera del cien por ciento, 20 esta cantidad oscilará entre aproximadamente 0.1 por ciento a aproximadamente el noventa y nueve por ciento del ingrediente activo, preferiblemente entre aproximadamente 5 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, más preferiblemente entre aproximadamente 10 por ciento a aproximadamente 30 por 25 ciento.

En ciertas modalidades, una formulación de la presente descripción comprende un excipiente seleccionado de ciclodextrinas, celulosas, liposomas, agentes formadores de micelas, por ejemplo, ácidos biliares y portadores polímeros, por ejemplo, poliésteres y polianhídridos; y un oligómero de la presente descripción. En ciertas modalidades, una formulación mencionada anteriormente hace biodisponible por vía oral un oligómero de la presente descripción.

Los métodos para preparar estas formulaciones o composiciones farmacéuticas incluyen la etapa de asociar un oligómero de la presente descripción con el portador y, opcionalmente, uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima un compuesto de la presente descripción con portadores líquidos, o portadores sólidos finamente divididos, o ambos, y luego, si es necesario, dando forma al producto.

Las formulaciones de la descripción adecuadas para administración oral pueden estar en forma de cápsulas, obleas, píldoras, comprimidos, pastillas (usando una base saborizada, usualmente sacarosa y goma arábica o tragacanto), polvos, gránulos, o como una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia) y/o como enjuagues bucales y

similares, cada uno de los cuales contiene una cantidad predeterminada de un compuesto de la presente descripción como ingrediente activo. Un oligómero de la presente descripción también se puede administrar como un bolo,
5 electuario o pasta.

En las formas de dosificación sólidas de la descripción para administración oral (cápsulas, tabletas, píldoras, grageas, polvos, gránulos, trociscos y similares), el ingrediente activo se puede mezclar con uno o más
10 portadores farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o cualquiera de los siguientes: (1) rellenos o diluyentes, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglomerantes, tales como, por ejemplo,
15 carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o acacia; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes dispersantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de papa o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio; (5)
20 agentes retardantes de solución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario y tensioactivos, tales como poloxámero y laurilsulfato de sodio; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerol y
25 tensioactivos no iónicos; (8) absorbentes, tales como caolín

y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio, estearato de zinc, estearato de sodio, ácido esteárico y mezclas de los mismos; (10) agentes colorantes; y (11) agentes de liberación controlada, tales como crospovidona o etilcelulosa. En el caso de cápsulas, tabletas y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes amortiguadores. Las composiciones farmacéuticas sólidas de un tipo similar también pueden emplearse como rellenos en cápsulas de gelatina de cubierta blanda y dura usando excipientes tales como lactosa o azúcares lácteos, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Una tableta se puede hacer por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Las tabletas comprimidas pueden prepararse usando aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservador, desintegrante (por ejemplo, glicolato de almidón sódico o carboximetilcelulosa sódica reticulada), agente tensioactivo o dispersante. Las tabletas moldeadas pueden fabricarse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

Las tabletas, y otras formas de dosificación sólidas de las composiciones farmacéuticas de la presente

descripción, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, pueden marcarse o prepararse opcionalmente con revestimientos y envolturas, tales como revestimientos entéricos y otros revestimientos bien conocidos en la industria de formulación farmacéutica. También pueden formularse para proporcionar una liberación lenta o controlada del ingrediente activo en el mismo usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices de polímeros, liposomas y/o microesferas. Los mismos pueden formularse para una rápida liberación, por ejemplo, liofilizados. Pueden esterilizarse, por ejemplo, por filtración a través de un filtro que retiene las bacterias, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones farmacéuticas sólidas estériles que pueden disolverse en agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril inmediatamente antes de su uso. Estas composiciones farmacéuticas también pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y pueden ser de una composición que liberen los ingredientes activos solos, o preferentemente, en una cierta porción de tracto gastrointestinal, opcionalmente, de manera diferida. Los ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. El ingrediente activo también puede estar en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes descritos

anteriormente.

Las formas de dosificación líquidas para la administración oral de los compuestos de la descripción incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semillas de algodón, cacahuete, maíz, germen, aceite de oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos.

Además de los diluyentes inertes, las composiciones farmacéuticas orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes de suspensión, edulcorantes, saborizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilen sorbitol

y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

Las formulaciones para administración rectal o vaginal pueden presentarse como un supositorio, que puede prepararse mezclando uno o más compuestos de la descripción con uno o más excipientes o portadores no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera de supositorio o un salicilato, que es sólido a temperatura ambiente, pero líquido a temperatura corporal y, por lo tanto, se fundirá en el recto o cavidad vaginal y liberará el compuesto activo.

Las formulaciones o formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de un oligómero como se proporciona en la presente incluyen polvos, pulverizadores, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. Los oligómeros activos se pueden mezclar en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable y con cualquier conservador, amortiguador o propelente que pueda ser necesario. Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden contener, además de un compuesto activo de esta descripción, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o mezclas

de los mismos.

Los polvos y aerosoles pueden contener, además de un oligómero de la presente descripción, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y poliamida en polvo, o mezclas de estas
5 sustancias. Además, los aerosoles pueden contener propulsores habituales, como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, tales como butano y propano.

Los parches transdérmicos tienen la ventaja
10 adicional de proporcionar un suministro controlado de un oligómero de la presente descripción al cuerpo. Estas formas de dosificación se pueden hacer disolviendo o dispersando el oligómero en el medio apropiado. Los mejoradores de la absorción también se pueden usar para aumentar el flujo del
15 agente a través de la piel. La velocidad del flujo puede controlarse proporcionando una membrana de control de velocidad o dispersando el agente en un gel o matriz polimérica, entre otros métodos conocidos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para
20 administración parenteral pueden comprender uno o más oligómeros de la descripción en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones isotónicas, estériles, acuosas o no acuosas, farmacéuticamente aceptables, que pueden reconstituirse en
25 soluciones o dispersiones inyectables estériles previo a su

uso, que pueden contener azúcares, alcoholes, antioxidantes, amortiguadores, bacteriostáticos, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado o agentes de suspensión o espesantes. Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la descripción incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, por el uso de materiales de revestimiento, como la lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y por el uso de tensioactivos.

Estas composiciones farmacéuticas también pueden contener adyuvantes tales como conservadores, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de los microorganismos sobre los oligómeros en cuestión puede garantizarse por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma

farmacéutica inyectable se puede lograr por la inclusión de agentes que retrasan la absorción, como monoestearato de aluminio y gelatina.

En algunos casos, para prolongar el efecto de un fármaco, es deseable disminuir la absorción del fármaco de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede lograr por el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo que tiene poca solubilidad en agua, entre otros métodos conocidos en la técnica. La velocidad de absorción del fármaco depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma de fármaco administrada por vía parenteral se logra disolviendo o suspendiendo el fármaco en un portador oleoso.

Las formas de depósito inyectables pueden prepararse formando matrices de microencapsulación de los oligómeros en cuestión en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la relación de oligómero a polímero, y de la naturaleza del polímero particular empleado, la velocidad de liberación de oligómero puede controlarse. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli (ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también se pueden preparar atrapando el medicamento en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los

tejidos corporales.

Cuando los oligómeros de la presente descripción se administran como productos farmacéuticos, a seres humanos y animales, pueden administrarse per se o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, 0.1 a 99% (más preferiblemente, 10 a 30%) de ingrediente activo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

Como se indicó anteriormente, las formulaciones o preparaciones de la presente descripción pueden administrarse por vía oral, parenteral, tópica o rectal. Normalmente se dan en formas adecuadas para cada vía de administración. Por ejemplo, se administran en forma de tabletas o cápsulas, por inyección, inhalación, loción para los ojos, ungüento, supositorio, etc., administración por inyección, infusión o inhalación; tópico por loción o ungüento; y rectal por supositorios.

Las frases "administración parenteral" y "administrada parenteralmente" como se usan en la presente significan modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, generalmente por inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal.

Las frases "administración sistémica", "administrada sistémicamente", "administración periférica" y "administrada periféricamente" como se usa en la presente significan la administración de un compuesto, fármaco u otro
5 material que no sea directamente en el sistema nervioso central, de manera que ingrese el sistema del paciente y, por lo tanto, está sujeto a metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo, administración subcutánea.

Independientemente de la vía de administración
10 seleccionada, los oligómeros de la presente descripción, que se pueden usar en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente descripción, se pueden formular en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales conocidos por aquellos
15 expertos en la técnica. Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de esta descripción pueden variarse para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea efectivo para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular,
20 composición y modo de administración, sin ser inaceptablemente tóxico para el paciente.

El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del oligómero particular de la presente descripción empleada, o
25 éster, sal o amida de los mismos, la vía de administración,

el tiempo de administración, la velocidad de excreción o el metabolismo del oligómero particular que se está empleando, la velocidad y el grado de absorción, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados
5 en combinación con el oligómero particular empleado, edad, sexo, peso, condición, salud general e historia médica anterior del paciente que está siendo tratado, y factores bien conocidos en las artes médicas.

Un médico o veterinario que tenga experiencia
10 ordinaria en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad efectiva de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar las dosis de los compuestos de la descripción empleados en la composición farmacéutica a niveles más bajos
15 que los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta lograr el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de un compuesto de la descripción será la cantidad del compuesto que sea la dosis más baja efectiva para producir un efecto
20 terapéutico. Tal dosis efectiva dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente. En general, las dosis orales, intravenosas, intracerebroventriculares y subcutáneas de los compuestos de esta descripción para un paciente, cuando se usan para los efectos indicados, variarán desde
25 aproximadamente 0.0001 a aproximadamente 100 mg por kilogramo

de peso corporal por día.

En algunas modalidades, los oligómeros de la presente descripción se administran en dosis generalmente desde aproximadamente 20-100 mg/kg. En algunos casos, pueden
5 ser necesarias dosis de más de 100 mg/kg. En algunas modalidades, las dosis para administración i.v. son desde aproximadamente 0.5 mg a 100 mg/kg. En algunas modalidades, los oligómeros se administran a dosis de aproximadamente 20 mg/kg, 21 mg/kg, 25 mg/kg, 26 mg/kg, 27 mg/kg, 28 mg/kg, 29
10 mg/kg, 30 mg/kg, 31 mg/kg, 32 mg/kg, 33 mg/kg, 34 mg/kg, 35 mg/kg, 36 mg/kg, 37 mg/kg, 38 mg/kg, 39 mg/kg, 40 mg/kg, 41 mg/kg, 42 mg/kg, 43 mg/kg, 44 mg/kg, 45 mg/kg, 46 mg/kg, 47 mg/kg, 48 mg/kg, 49 mg/kg 50 mg/kg, 51 mg/kg, 52 mg/kg, 53 mg/kg, 54 mg/kg, 55 mg/kg, 56 mg/kg, 57 mg/kg, 58 mg/kg, 59
15 mg/kg, 60 mg/kg, 65 mg/kg, 70 mg/kg, 75 mg/kg, 80 mg/kg, 85 mg/kg, 90 mg/kg, 95 mg/kg, 100 mg/kg, incluyendo todos los enteros intermedios. En algunas modalidades, el oligómero se administra a 30 mg/kg. En algunas modalidades, el oligómero se administra a 50 mg/kg.

20 Si se desea, la dosis diaria efectiva del compuesto activo se puede administrar como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas de dosificación unitaria. En ciertas situaciones, la
25 dosificación es una administración por día. En ciertas

modalidades, la dosificación es una o más administraciones por cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 días o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 semanas, o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses, como sea necesario, para mantener la expresión deseada de una proteína distrofina funcional.

Las moléculas de ácido nucleico se pueden administrar a las células por una variedad de métodos conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen, entre otros, la encapsulación en liposomas, por iontoforesis o por incorporación a otros vehículos, tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas, como se describe en la presente y se conoce en la técnica. En ciertas modalidades, la tecnología de microemulsión se puede usar para mejorar la biodisponibilidad de agentes farmacéuticos lipofílicos (insolubles en agua). Los ejemplos incluyen Trimetrina (Dordunoo, S.K., et al., Drug Development and Industrial Pharmacy, 17(12), 1685-1713, 1991 y REV 5901 (Sheen, P.C., et al., J Pharm Sci 80(7), 712-714, 1991). Entre otros beneficios, la microemulsión proporciona una biodisponibilidad mejoradas dirigiendo preferentemente la absorción al sistema linfático en lugar del sistema circulatori, por lo cual pasa el hígado y previene la destrucción de los compuestos en la circulación hepatobiliar.

En un aspecto de la descripción, las formulaciones contienen micelas formadas a partir de un oligómero como se proporciona en la presente y al menos un portador anfifílico, en el que las micelas tienen un diámetro promedio de menos de
5 aproximadamente 100 nm. Las modalidades más preferidas proporcionan micelas que tienen un diámetro promedio menor de aproximadamente 50 nm, e incluso modalidades más preferidas proporcionan micelas que tienen un diámetro promedio menor de aproximadamente 30 nm, o incluso menor de aproximadamente 20
10 nm.

Si bien se contemplan todos los portadores anfifílicos adecuados, los portadores actualmente preferidos son generalmente aquellos que tienen un estado Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS), y que pueden tanto solubilizar
15 el compuesto de la presente descripción como microemulsionarlo en una etapa posterior cuando la solución entra en contacto con una fase acuosa compleja (tal como la que se encuentra en el tracto gastrointestinal humano). Por lo general, los ingredientes anfifílicos que satisfacen estos
20 requisitos tienen valores de HLB (equilibrio hidrofílico a lipofílico) de 2-20, y sus estructuras contienen radicales alifáticos de cadena recta en el rango de C-6 a C-20. Los ejemplos son glicéridos grasos polietilenglicolizados y polietilenglicoles.

25 Los ejemplos de portadores anfifílicos incluyen

glicéridos de ácidos grasos polietilenglicolizados saturados y monoinsaturados, tales como los obtenidos a partir de diversos aceites vegetales completa o parcialmente hidrogenados. Tales aceites pueden consistir ventajosamente
5 en glicéridos de ácido tri-, di- y mono-graso y ésteres de di- y mono-polietilenglicol de los ácidos grasos correspondientes, con una composición de ácido graso particularmente preferida que incluye ácido cáprico 4-10, ácido cáprico 3- 9, ácido láurico 40-50, ácido mirístico 14-
10 24, ácido palmítico 4-14 y ácido esteárico 5-15%. Otra clase útil de portadores anfifílicos incluye sorbitán y/o sorbitol parcialmente esterificados, con ácidos grasos saturados o monoinsaturados (serie SPAN) o análogos etoxilados correspondientes (serie TWEEN).

15 Los portadores anfifílicos comercialmente disponibles pueden ser particularmente útiles, incluyendo la serie Gelucire, Labrafil, Labrasol o Lauroglicol (todos manufacturados y distribuidos por Gattefosse Corporation, Saint Priest, Francia), PEG-mono-oleato, PEG-di-oleato, PEG-
20 mono-laurato y di-laurato, Lecitina, Polisorbato 80, etc. (producido y distribuido por varias empresas en Estados Unidos y en todo el mundo).

En ciertas modalidades, el suministro puede producirse por el uso de liposomas, nanocápsulas,
25 micropartículas, microesferas, partículas lipídicas,

vesículas y similares, para la introducción de las composiciones farmacéuticas de la presente descripción en células huésped adecuadas. En particular, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se pueden formular para el suministro ya sea encapsulado en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera, una nanopartícula o similares. La formulación y uso de tales vehículos de suministro se pueden realizar usando técnicas conocidas y convencionales.

Los polímeros hidrofílicos adecuados para uso en la presente descripción son aquellos que son fácilmente solubles en agua, se pueden unir covalentemente a un lípido formador de vesículas y son tolerados in vivo sin efectos tóxicos (es decir, son biocompatibles). Los polímeros adecuados incluyen polietilenglicol (PEG), poliláctico (también llamado polilactida), ácido poliglicólico (también llamado poliglicólido), un copolímero de ácido poliláctico-poliglicólico y alcohol polivinílico. En ciertas modalidades, los polímeros tienen un peso molecular desde aproximadamente 100 o 120 daltons hasta aproximadamente 5,000 o 10,000 daltons, o desde aproximadamente 300 daltons a aproximadamente 5,000 daltons. En otras modalidades, el polímero es polietilenglicol que tiene un peso molecular desde aproximadamente 100 a aproximadamente 5,000 daltons, o tiene un peso molecular desde aproximadamente 300 a

aproximadamente 5,000 daltons. En ciertas modalidades, el polímero es polietilenglicol de 750 daltons (PEG (750)). Los polímeros también se pueden definir por el número de monómeros en los mismos; una modalidad preferida de la presente descripción usa polímeros de al menos aproximadamente tres monómeros, tales polímeros de PEG consisten en tres monómeros (aproximadamente 150 daltons).

Otros polímeros hidrofílicos que pueden ser adecuados para su uso en la presente descripción incluyen polivinilpirrolidona, polimetoxazolina, polietiloxazolina, polihidroxipropilmetacrilamida, polimetacrilamida, polidimetilacrilamida y celulosas derivadas tales como hidroximetilcelulosa o hidroxietilcelulosa.

En ciertas modalidades, una formulación de la presente descripción comprende un polímero biocompatible seleccionado del grupo que consiste en poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos, polímeros de polivinilo, poliglicólidos, polisiloxanos, poliuretanos y copolímeros de los mismos, celulosas, polipropileno, polietilenos, poliestireno, polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, polianhídridos, poli(orto) ésteres, poli(ácido bórico), poli(ácido valérico), poli(lactida-co-caprolactona), polisacáridos, proteínas, ácidos polihialurónicos, policianoacrilatos, y combinaciones, mezclas, o copolímeros

de los mismos.

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos, que consisten en 6, 7 u 8 unidades de glucosa, designadas por la letra griega α , β o γ , respectivamente. Las unidades de glucosa se unen por enlaces α -1,4-glucosídicos. Como consecuencia de la conformación de silla de las unidades de azúcar, todos los grupos hidroxilo secundarios (en C-2, C-3) se ubican en un lado del anillo, mientras que todos los grupos hidroxilo primarios en C-6 se sitúan en el otro lado. Como resultado, las caras externas son hidrofílicas, lo que hace que las ciclodextrinas sean solubles en agua. En contraste, las cavidades de las ciclodextrinas son hidrofóbicas, ya que están revestidas por el hidrógeno de los átomos C-3 y C-5, y por oxígenos de tipo éter. Estas matrices permiten la complejación con una variedad de compuestos relativamente hidrofóbicos, que incluyen, por ejemplo, compuestos esteroideos tal como 17α -estradiol (ver, por ejemplo, van Uden et al. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 38: 1-3-113 (1994)). La complejación tiene lugar por las interacciones de Van der Waals y por la formación de enlaces de hidrógeno. Para una revisión general de la química de las ciclodextrinas, ver, Wenz, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 33: 803-822 (1994).

Las propiedades fisicoquímicas de los derivados de ciclodextrina dependen en gran medida del tipo y grado de

sustitución. Por ejemplo, su solubilidad en agua varía desde insoluble (por ejemplo, triacetil-beta-ciclodextrina) a 147% soluble (p/v) (G-2-beta-ciclodextrina). Además, son solubles en muchos solventes orgánicos. Las propiedades de las
5 ciclodextrinas permiten el control sobre la solubilidad de varios componentes de la formulación al aumentar o disminuir su solubilidad.

Se han descrito numerosas ciclodextrinas y métodos para su preparación. Por ejemplo, Parmeter (I), et al.
10 (Patente de Estados Unidos No. 3,453,259) y Gramera, et al. (Patente de Estados Unidos No. 3,459,731) describieron ciclodextrinas electroneutrales. Otros derivados incluyen ciclodextrinas con propiedades catiónicas [Parmeter (II), Patente de Estados Unidos No. 3,453,257], ciclodextrinas
15 reticuladas insolubles (Solms, Patente de Estados Unidos No. 3,420,788) y ciclodextrinas con propiedades aniónicas [Parmeter (III), Patente de Estados Unidos No. 3,426,011]. Entre los derivados de ciclodextrina con propiedades aniónicas, se han anexado ácidos carboxílicos, ácidos
20 fosforosos, ácidos fosfinosos, ácidos fosfónicos, ácidos fosfóricos, ácidos tiofosfónicos, ácidos tiosulfínicos y ácidos sulfónicos a la ciclodextrina de origen [ver, Parmeter (III), supra]. Además, los derivados de sulfoalquiléter ciclodextrina se han descrito por Stella, et al. (Patente de
25 Estados Unidos No. 5,134,127).

Los liposomas consisten en al menos una membrana de bicapa lipídica que encierra un compartimiento interno acuoso. Los liposomas se pueden caracterizar por tipo de membrana y por tamaño. Las vesículas unilamelares pequeñas (SUV) tienen una membrana única y típicamente varían entre 0.02 y 0.05 μm de diámetro; las vesículas unilamelares grandes (LUVS) suelen ser mayores de 0.05 μm . Las vesículas oligolamelares grandes y las vesículas multilamelares tienen capas de membrana múltiples, generalmente concéntricas, y suelen ser mayores de 0.1 μm . Los liposomas con varias membranas no concéntricas, es decir, varias vesículas más pequeñas contenidas dentro de una vesícula más grande, se denominan vesículas multivesiculares.

Un aspecto de la presente descripción se refiere a formulaciones que comprenden liposomas que contienen un oligómero de la presente descripción, donde la membrana del liposoma se formula para proporcionar un liposoma con capacidad de carga aumentada. Alternativamente o además, el compuesto de la presente descripción puede estar contenido dentro de, o adsorbido en, la bicapa de liposomas del liposoma. Un oligómero de la presente descripción se puede agregar con un tensoactivo lipídico y transportarse dentro del espacio interno del liposoma; en estos casos, la membrana del liposoma se formula para resistir los efectos perturbadores del agregado de agente activo-tensioactivo.

De acuerdo con una modalidad de la presente descripción, la bicapa lipídica de un liposoma contiene lípidos derivados con polietilenglicol (PEG), de modo que las cadenas de PEG se extienden desde la superficie interna de la bicapa lipídica hacia el espacio interior encapsulado por el liposoma, y se extienden desde el exterior de la bicapa lipídica al entorno circundante.

Los agentes activos contenidos en los liposomas de la presente descripción están en forma solubilizada. Los agregados de tensioactivo y agente activo (tales como emulsiones o micelas que contienen el agente activo de interés) pueden quedar atrapados dentro del espacio interior de los liposomas de acuerdo con la presente descripción. Un tensioactivo actúa para dispersar y solubilizar el agente activo, y se puede seleccionar de cualquier tensioactivo alifático, cicloalifático o aromático adecuado, que incluye, pero no se limita a, lisofosfatidilcolinas biocompatibles (LPG) de longitudes de cadena variables (por ejemplo, desde aproximadamente C14 a aproximadamente C20). Los lípidos derivados de polímeros, tales como PEG-lípidos, también se pueden usar para la formación de micelas, ya que actuarán para inhibir la fusión de micelas/membranas, y a medida que la adición de un polímero a las moléculas de tensioactivo disminuye, la CMC del tensioactivo ayuda en la formación de micelas. Se prefieren los tensioactivos con CMO en el rango

micromolar; se pueden usar tensioactivos CMC superiores para preparar micelas atrapadas dentro de los liposomas de la presente descripción.

Los liposomas de acuerdo con la presente
5 descripción se pueden preparar por cualquiera de una variedad de técnicas que se conocen en el arte. Ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 4,235,871; Solicitudes de PCT Publicadas WO 96/14057; New RRC, Liposomes: A practical approach, IRL Press, Oxford (1990), pages 33-104; Lasic DD,
10 Liposomes from physics to applications, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1993. Por ejemplo, los liposomas de la presente descripción se pueden preparar difundiendo un lípido derivado con un polímero hidrofílico en liposomas preformados, tal como exponiendo liposomas preformados a
15 micelas compuestas de polímeros injertados en lípidos, en concentraciones de lípidos correspondientes al porcentaje molar final de lípido derivado que se desea en el liposoma. Liposomas que contienen un polímero hidrofílico también se pueden formar por técnicas de homogeneización, hidratación de
20 campo lipídico o extrusión, como se conoce en la técnica.

En otro procedimiento de formulación ejemplar, el agente activo primero se dispersa por sonicación en una lisofosfatidilcolina u otro tensioactivo de bajo CMC (incluyendo los lípidos injertados con polímeros) que
25 solubiliza fácilmente las moléculas hidrofóbicas. La

suspensión micelar resultante del agente activo se usa luego para rehidratar una muestra de lípidos secos que contiene un porcentaje molar adecuado de lípidos injertados con polímeros, o colesterol. La suspensión de lípidos y agentes
5 activos se forma luego en liposomas usando técnicas de extrusión como se conocen en la técnica, y los liposomas resultantes se separan de la solución no encapsulada por separación de columna estándar.

En un aspecto de la presente descripción, los
10 liposomas se preparan para tener tamaños sustancialmente homogéneos en un rango de tamaño seleccionado. Un método de tamaño efectivo consiste en extruir una suspensión acuosa de los liposomas a través de una serie de membranas de policarbonato que tienen un tamaño de poro uniforme
15 seleccionado; el tamaño de poro de la membrana corresponderá aproximadamente con los tamaños más grandes de liposomas producidos por extrusión a través de esa membrana. Ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos No. 4,737,323 (12 de abril de 1988). En ciertas modalidades, los reactivos tales como
20 DharmaFECT® y Lipofectamine® se pueden usar para introducir polinucleótidos o proteínas en las células.

Las características de liberación de una formulación de la presente descripción dependen del material de encapsulación, la concentración de fármaco encapsulado y
25 la presencia de modificadores de liberación. Por ejemplo, la

liberación se puede manipular para depender del pH, por ejemplo, usando un revestimiento sensible al pH que se libera solo a un pH bajo, tal como en el estómago, o un pH más alto, tal como en el intestino. Se puede usar un revestimiento entérico para evitar la liberación hasta después del paso a través del estómago. Se pueden usar múltiples revestimientos o mezclas de cianamida encapsulada en diferentes materiales para obtener una liberación inicial en el estómago, seguida de una liberación posterior en el intestino. La liberación también se puede manipular por la inclusión de sales o agentes formadores de poros, que pueden aumentar la captación de agua o la liberación del fármaco por difusión desde la cápsula. Los excipientes que modifican la solubilidad del fármaco también se pueden usar para controlar la velocidad de liberación. También se pueden incorporar agentes que mejoran la degradación de la matriz o la liberación de la matriz. Se pueden añadir al fármaco, añadir como una fase separada (es decir, como partículas) o se pueden disolver en la fase del polímero dependiendo del compuesto. En la mayoría de los casos, la cantidad debe estar entre 0.1 y treinta por ciento (p/p de polímero). Los tipos de mejoradores de degradación incluyen sales inorgánicas tales como sulfato de amonio y cloruro de amonio, ácidos orgánicos tales como ácido cítrico, ácido benzoico y ácido ascórbico, bases inorgánicas tales como carbonato de sodio, carbonato de potasio, carbonato de

calcio, carbonato de zinc e hidróxido de zinc, y bases orgánicas tales como sulfato de protamina, espermina, colina, etanolamina, dietanolamina y trietanolamina y tensioactivos tales como Tween® y Pluronic®. Los agentes formadores de
5 poros que agregan microestructura a las matrices (es decir, compuestos solubles en agua tales como sales inorgánicas y azúcares) se agregan como partículas. El rango es típicamente entre uno y treinta por ciento (p/p de polímero).

La absorción también se puede manipular alterando
10 el tiempo de residencia de las partículas en el intestino. Esto se puede lograr, por ejemplo, revistiendo la partícula con, o seleccionando como material de encapsulación, un polímero adhesivo para la mucosa. Los ejemplos incluyen la mayoría de los polímeros con grupos carboxilo libres, tales
15 como quitosán, celulosas y especialmente poliacrilatos (como se usa en la presente, poliacrilatos se refiere a polímeros que incluyen grupos acrilato y grupos acrilato modificados tales como cianoacrilatos y metacrilatos).

Un oligómero se puede formular para ser contenido
20 dentro de, o adaptado para ser liberado por un dispositivo quirúrgico o médico o implante. En ciertos aspectos, un implante se puede revestir o tratar de otro modo con un oligómero. Por ejemplo, se pueden usar hidrogeles u otros polímeros, tales como polímeros biocompatibles y/o
25 biodegradables, para revestir un implante con las

composiciones farmacéuticas de la presente descripción (es decir, la composición se puede adaptar para usar con un dispositivo médico usando un hidrogel u otro polímero). Los polímeros y copolímeros para revestir dispositivos médicos con un agente son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de implantes incluyen, pero no se limitan a, endoprótesis vasculares, endoprótesis vasculares liberadoras de fármacos, suturas, prótesis, catéteres vasculares, catéteres de diálisis, injertos vasculares, válvulas cardíacas protésicas, marcapasos cardíacos, desfibriladores cardioversores implantables, agujas IV, dispositivos para ajuste y formación de huesos, tales como pernos, tornillos, placas y otros dispositivos, y matrices de tejidos artificiales para curación de heridas.

Además de los métodos proporcionados en la presente, los oligómeros para uso de acuerdo con la descripción se pueden formular para administración en cualquier forma conveniente para uso en medicina humana o veterinaria, por analogía con otros productos farmacéuticos. Los oligómeros antisentido y sus formulaciones correspondientes se pueden administrar solos o en combinación con otras estrategias terapéuticas en el tratamiento de la distrofia muscular, tal como trasplante de mioblastos, terapias con células madre, administración de antibióticos aminoglucósidos, inhibidores del proteasoma y terapias de

sobrerregulación (por ejemplo, sobrerregulación de la utrofina, un parálogo autosómico de distrofina).

En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional se puede administrar antes, simultánea o
5 posteriormente a la administración del oligómero de la presente descripción. Por ejemplo, los oligómeros se pueden administrar en combinación con un esteroide y/o antibiótico. En ciertas modalidades, los oligómeros se administran a un paciente que está en terapia con esteroides antecedente (por
10 ejemplo, terapia con esteroides antecedente intermitente o crónica/continua. Por ejemplo, en algunas modalidades, el paciente se ha tratado con un corticosteroide antes de la administración de un oligómero antisentido y continúa recibiendo la terapia con esteroides. En algunas modalidades,
15 el esteroide es glucocorticoide o prednisona.

Las rutas de administración descritas están destinadas solo como una guía, ya que un profesional experto podrá determinar fácilmente la vía óptima de administración y cualquier dosis para cualquier animal y afección en
20 particular. Se han intentado múltiples procedimientos para introducir nuevo material genético funcional en las células, tanto in vitro como in vivo (Friedmann (1989) Science, 244: 1275-1280). Estos procedimientos incluyen la integración del gen que se expresa en los retrovirus modificados (Friedmann
25 (1989) supra; Rosenberg (1991) Cancer Research 51 (18),

supl.: 5074S-5079S); integración en vectores no retrovirus (por ejemplo, vectores virales adenoasociados) (Rosenfeld, et al. (1992) *Cell*, 68: 143-155; Rosenfeld, et al. (1991) *Science*, 252: 431-434); o suministro de un transgén enlazado a un elemento mejorador de promotor heterólogo a través de liposomas (Friedmann (1989), *supra*; Brigham, et al. (1989) *Am. J. Med. Sci.*, 298: 278-281; Nabel, et al. (1990) *Science*, 249: 1285-1288; Hazinski, et al. (1991) *Am. J. Resp. Cell Molec. Biol.*, 4:206-209; y Wang and Huang (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 84: 7851-7855); acoplados a sistemas de transporte basados en cationes específicos de ligandos (Wu and Wu (1988) *J. Biol. Chem.*, 263: 14621-14624) o el uso de ADN desnudo, vectores de expresión (Nabel et al. (1990), *supra*); Wolff et al. (1990) *Science*, 247: 1465-1468). La inyección directa de transgenes en el tejido produce solo expresión localizada (Rosenfeld (1992) *supra*); Rosenfeld et al. (1991) *supra*; Brigham et al. (1989) *supra*; Nabel (1990) *supra*; y Hazinski et al. (1991) *supra*). El grupo de Brigham et al. (*Am. J. Med. Sci.* (1989) 298: 278-281 y *Clinical Research* (1991) 39 (resumen)) han reportado la transfección in vivo solo de pulmones de ratones después de la administración ya sea intravenosa o intratraqueal de un complejo de liposomas de ADN. Un ejemplo de un artículo de revisión de procedimientos de terapia génica humana es: Anderson, *Science* (1992) 256: 808-813.

IV. Métodos de Uso

Restauración del Marco de Lectura de Distrofina usando Omisión de Exones

Un posible procedimiento terapéutico para el
5 tratamiento de DMD causada por mutaciones fuera de marco en
el gen de distrofina es sugerido por la forma más leve de
distrofinopatía conocida como DMO, que es causada por
mutaciones en el marco. La capacidad de convertir una
mutación fuera de marco en una mutación en el marco
10 preservaría hipotéticamente el marco de lectura del ARNm y
produciría una proteína distrofina internamente acortada pero
aún funcional. Los oligómeros antisentido de la descripción
se diseñaron para lograr esto.

La hibridación del PMO con la secuencia de pre-ARNm
15 dirigida interfiere con la formación del complejo de empalme
de pre-ARNm y suprime el exón 45 del ARNm maduro. La
estructura y conformación de los oligómeros antisentido de la
descripción permiten el emparejamiento de bases específicas
de la secuencia con la secuencia complementaria. Por un
20 mecanismo similar, eteplirsén, por ejemplo, que es un PMO que
fue diseñado para omitir el exón 51 del pre-ARNm de
distrofina permite el emparejamiento de bases específicas de
la secuencia con la secuencia complementaria contenida en el
exón 51 del pre-ARNm de distrofina.

25 El ARNm de distrofina normal que contiene todos los

79 exones producirá la proteína distrofina normal. La gráfica en la Fig. 1 muestra una pequeña sección del pre-ARNm de distrofina y el ARNm maduro, desde el exón 47 hasta el exón 53. La forma de cada exón describe cómo se dividen los codones entre los exones; es de destacar que un codón consiste de tres nucleótidos. Los exones de forma rectangular comienzan y terminan con codones completos. Los exones en forma de flecha comienzan con un codón completo pero terminan con un codón dividido, que contiene solo el nucleótido # 1 del codón. Los nucleótidos # 2 y # 3 de este codón están contenidos en el exón posterior que comenzará con una forma de cheurón.

El ARNm de distrofina que le faltan exones completos del gen de distrofina generalmente da como resultado la DMD. La gráfica en la Fig. 2 ilustra un tipo de mutación genética (delección del exón 50) que se sabe que resulta en DMD. Dado que el exón 49 termina en un codón completo y el exón 51 comienza con el segundo nucleótido de un codón, el marco de lectura después del exón 49 se desplaza, dando como resultado un marco de lectura de ARNm fuera de marco e incorporación de aminoácidos incorrectos cadena abajo de la mutación. La ausencia subsiguiente de un dominio de unión a distroglicano C-terminal funcional da como resultado la producción de una proteína distrofina inestable.

Eteplirsén omite el exón 51 para restaurar el marco

de lectura del ARNm. Dado que el exón 49 termina en un codón completo y el exón 52 comienza con el primer nucleótido de un codón, la delección del exón 51 restaura el marco de lectura, lo que resulta en la producción de una proteína distrofina
5 acortada internamente con un sitio de unión al distroglicano intacto, similar a una mutación de BMD "en marco" (Fig. 3).

La viabilidad de mejorar el fenotipo de DMD usando la omisión de exón para restaurar el marco de lectura abierto del ARNm de distrofina se soporta por una investigación no
10 clínica. Numerosos estudios en modelos animales con distrofia de DMD han mostrado que la restauración de la distrofina por omisión de exones conduce a mejoras confiables en la fuerza y función muscular (Sharp 2011; Yokota 2009; Wu 2008; Wu 2011; Barton-Davis 1999; Goyenvalle 2004; Gregorevic 2006; Yue
15 2006; Welch 2007; Kawano 2008; Reay 2008; van Putten 2012). Un ejemplo convincente de esto proviene de un estudio en donde se compararon los niveles de distrofina después de la terapia de omisión de exones (usando un PMO) con la función muscular en el mismo tejido. En ratones *mdx* distróficos, los
20 músculos tibiales anteriores (TA) tratados con un PMO específico para ratón mantuvieron ~75% de su capacidad de fuerza máxima después de las contracciones que inducen estrés, mientras que los músculos TA contralaterales no tratados mantuvieron solo ~25% de su capacidad de fuerza
25 máxima ($p < 0.05$) (Sharp 2011). En otro estudio, 3 perros

CXMD distróficos recibieron, a 2-5 meses de edad, una terapia de omisión de exones usando un PMO específico para su mutación genética una vez a la semana durante 5 a 7 semanas o cada dos semanas durante 22 semanas. Después de la terapia de omisión de exones, todos los 3 perros demostraron una amplia expresión de distrofina de cuerpo completo en el músculo esquelético, así como también mantuvieron o mejoraron la deambulación (prueba de carrera de 15 m) en relación con el valor basal. Por el contrario, los perros CXMD con edad coincidente no tratados mostraron una marcada disminución en la deambulación durante el curso del estudio (Yokota 2009).

Se mostró que los PMO tienen más actividad de omisión de exones en concentraciones equimolares que los fosforotioatos en ambos modelos de ratones mdx y ratón con DMD humanizada (hDMD), que expresa el transcrito completo de DMD humana (Heemskirk 2009). Los experimentos *in vitro* usando reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) y transferencia Western (WB) en células musculares esqueléticas humanas normales o en células musculares de pacientes con DMD con diferentes mutaciones susceptibles de omisión del exón 51 identificado eteplirsén (un PMO) como un potente inductor de la omisión del exón 51. La omisión del exón 51 inducida por eteplirsén se ha confirmado *in vivo* en el modelo de ratón con hDMD (Arechavala-Gomez 2007).

Los resultados clínicos para analizar el efecto de

un oligómero antisentido que es complementario a una región objetivo del exón 45 del pre-ARNm de distrofina humana e induce la omisión del exón 45 incluyen el porcentaje de fibras positivas para distrofina (PDPF), prueba de caminata de seis minutos (6MWT), pérdida de la ambulación (LOA), Evaluación Ambulatoria de North Star (NSAA), pruebas de función pulmonar (PFT), capacidad de levantarse (desde una posición supina) sin soporte externo, producción de distrofina *de novo* y otras medidas funcionales.

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona métodos para producir distrofina en un sujeto que tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible a la omisión del exón 45, el método comprende administrar al sujeto un oligómero antisentido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se describe en la presente. En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona métodos para restaurar un marco de lectura de ARNm para inducir la producción de proteína distrofina en un sujeto con distrofia muscular de Duchenne (DMD) que tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible a la omisión del exón 45. La producción de proteína se puede medir por la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), análisis de transferencia western o inmunohistoquímica (IHC).

En algunas modalidades, la presente descripción

proporciona métodos para tratar la DMD en un sujeto en necesidad del mismo, en donde el sujeto tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible a la omisión del exón 45, el método comprende administrar al sujeto un oligómero antisentido, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se describe en la presente. En diversas modalidades, el tratamiento del sujeto se mide por el retraso de la progresión de la enfermedad. En algunas modalidades, el tratamiento del sujeto se mide por el mantenimiento de la deambulación en el sujeto o la reducción de la pérdida de la deambulación en el sujeto. En algunas modalidades, la ambulación se mide usando la prueba de caminata de 6 minutos (6MWT). En ciertas modalidades, la ambulación se mide usando la Evaluación Ambulatoria de North Start (NSAA).

En diversas modalidades, la presente descripción proporciona métodos para mantener la función pulmonar o reducir la pérdida de la función pulmonar en un sujeto con DMD, en donde el sujeto tiene una mutación del gen de la DMD que es susceptible a la omisión del exón 45, el método comprende administrar al sujeto un oligómero antisentido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se describe en la presente. En algunas modalidades, la función pulmonar se mide como Presión Espiratoria Máxima (MEP). En ciertas modalidades, la función pulmonar se mide como Presión Inspiratoria Máxima (MIP). En algunas modalidades, la función

pulmonar se mide como Capacidad Vital Forzada (FVC).

Estudio 4045-301 (ESENCIA):

El estudio 4045-301 es un estudio de SRP-4045
5 (casimersen) y SRP-4053 (golodirsén) en pacientes con DMD.
Este estudio es un estudio doble ciego, controlado con
placebo, multicéntrico, de 48 semanas para evaluar la
eficacia y seguridad de SRP-4045 y SRP-4053. Los pacientes
elegibles con deleciones fuera de marco que se pueden
10 corregir omitiendo el exón 45 o 53 serán aleatorizados para
recibir infusiones intravenosas (IV) una vez a la semana de
30 mg/kg de SRP-4045 o 30 mg/kg de SRP-4053 respectivamente
(grupo activo combinado, 66 pacientes) o placebo (33
pacientes) durante 48 semanas. La eficacia clínica se
15 evaluará en las visitas de estudio programadas regularmente,
incluyendo las pruebas funcionales tales como la prueba de
caminata de seis minutos. Todos los pacientes se someterán a
una biopsia muscular al inicio y una segunda biopsia muscular
durante el transcurso del estudio. La seguridad se evaluará
20 por la recolección de eventos adversos (AE), pruebas de
laboratorio, electrocardiogramas (ECG), ecocardiogramas
(ECHO), signos vitales y exámenes físicos durante todo el
estudio. Se tomarán muestras de sangre periódicamente a lo
largo del estudio para evaluar la farmacocinética de ambos
25 fármacos. Las medidas de resultado primarias incluyen el

cambio en la prueba de caminata de 6 minutos (6MWT) desde el valor basal [Cuadro Temporal: valor basal hasta la semana 48] y las medidas de resultado secundarias incluyen el porcentaje de fibras positivas para distrofina [Cuadro Temporal: valor basal hasta la semana 24 y 48] y el cambio del % predicho de presión inspiratoria máxima (MIP), % predicho de presión espiratoria máxima (MEP)% desde el valor basal [Cuadro Temporal: valor basal hasta la semana 48]. Más detalles de este estudio se encuentran en www.clinicaltrials.org (NCT02500381).

V. Kits

La descripción también proporciona kits para el tratamiento de un paciente con una enfermedad genética, que comprende al menos una molécula antisentido (por ejemplo, un oligómero antisentido descrito en las SEQ ID NOs: 1-5), envasado en un recipiente adecuado, junto con instrucciones para su uso. Los kits también pueden contener reactivos periféricos tales como amortiguadores, estabilizadores, etc. Los expertos en la materia deberían apreciar que las aplicaciones del método anterior tienen una amplia aplicación para identificar moléculas antisentido adecuadas para el tratamiento de muchas otras enfermedades.

Aunque la descripción anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y para propósitos de claridad de comprensión, será fácilmente evidente para un experto en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta descripción que ciertos cambios y modificaciones se pueden hacer al respecto sin apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones adjuntas. Los siguientes ejemplos se proporcionan solo a modo de ilustración y no a modo de limitación. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse para producir resultados esencialmente similares.

Materiales y métodos

Células y Condiciones de Tratamiento de Cultivo de Tejido

Se sembraron células de rabdomiosarcoma humano (ATCC, CCL-136; células RD) en matraces T75 tratados con cultivo de tejido (Nunc) a 1.5×10^6 células/matraz en 24 ml de DMEM calentado con L-glutamina (HyClone), 10% suero bovino fetal y 1% solución antibiótica de penicilina-estreptomicina (CelGro); después de 24 horas, los medios se aspiraron, las células se lavaron una vez en PBS calentado y se añadieron medios nuevos. Las células se cultivaron hasta un 80% de confluencia en un incubador a 37°C a 5.0% CO₂ y se recolectaron usando tripsina. Los oligómeros de morfolino

fosforodiamidato liofilizados (PMO) se resuspendieron a aproximadamente 0.5 a 2.0 mM en agua libre de nucleasa; para verificar la molaridad, las soluciones de PMO se midieron usando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Los PMO se suministraron a las células RD usando nucleofección de acuerdo con las instrucciones del fabricante y el kit SG (Lonza). Los PMO se analizaron a diversas concentraciones como se indica (por ejemplo, 2.5, 5, 10, 12.5, 20 y 25 micromolar). Las células se incubaron durante 24 horas posterior a la nucleofección a aproximadamente $2 - 3 \times 10^5$ células por cavidad de una placa de 12 o 24 cavidades (n = 2 o 3) y luego se sometieron a extracción de ARN como se describe a continuación.

15 *Extracción de ARN y Amplificación por PCR*

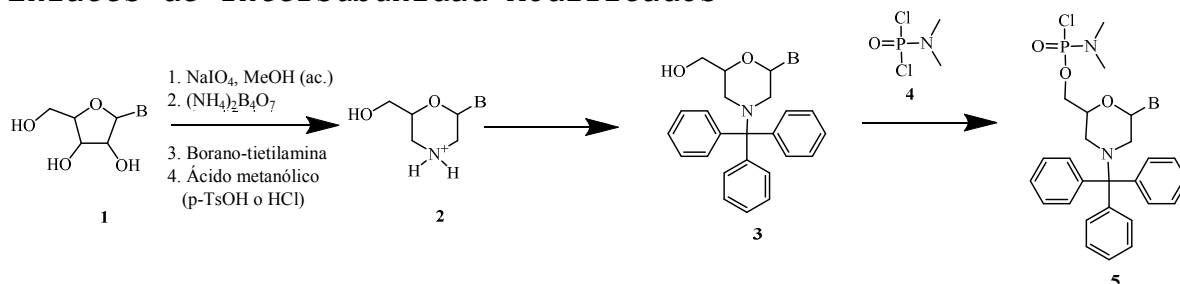
El ARN se extrajo de células tratadas con PMO (células RD o mioblastos humanos primarios) usando el kit de aislamiento de ARN de 96 cavidades RNeasy de GE Healthcare y se sometió a RT-PCR anidada usando técnicas estándar y los siguientes pares de cebadores. Cebadores externos: delantero 5'-CAATGCTCCTGACCTCTGTGC-3' (SEQ ID NO: 6), inverso 5'-GCTCTTTTCCAGGTTCAAGTGG -3' (SEQ ID NO: 7); cebadores internos: delantero 5'-GTCTACAACAAAGCTCAGGTCG-3' (SEQ ID NO: 8), inverso 5'-GCAATGTTATCTGCTTCCTCCAACC-3' (SEQ ID NO: 9). La omisión de exones se midió por densitometría de

electroforesis en gel de acrilamida marcada con Cy5. El porcentaje de omisión de exones (es decir, la intensidad de la banda del producto con omisión de exones en relación con el producto de PCR de longitud completa) se calculó cuantificando las intensidades de las bandas omitidas y no omitidas después de la corrección de la intensidad de la señal sin procesar para la longitud y contenido de GC esperado en cada banda. Los productos de PCR esperados se muestran en la siguiente tabla:

	pb	% de GC
No omitido	571	40.8
Omitido	395	38.5

La actividad de omisión de exones se calculó como un porcentaje de la intensidad total de los productos esperados omitidos y no omitidos.

Preparación de Subunidades de Morfolino, PMO y PMO con Enlaces de Intersubunidad Modificados



Esquema de reacción 1: Ruta de síntesis general para las Subunidades de PMO

Con referencia al Esquema de reacción 1, en donde B representa una porción de apareamiento de bases, las subunidades se morfolinas se pueden preparar a partir del ribinucleósido correspondiente (1) como se muestra. La subunidad de morfolina (2) se puede proteger opcionalmente por reacción con un precursor de grupo protector adecuado, por ejemplo cloruro de tritilo. El grupo protector 3' se remueve generalmente durante la síntesis de oligómeros en estado sólido como se describe con más detalle a continuación. La porción de apareamiento de bases se puede proteger adecuadamente para la síntesis de oligómeros en fase sólida. Los grupos protectores adecuados incluyen benzoilo para adenina y citosina, fenilacetilo para guanina y pivaloiloloximetilo para hipoxantina (I). El grupo pivaloiloloximetilo se puede introducir en la posición N1 de la base heterocíclica de hipoxantina. Aunque se puede emplear una subunidad de hipoxantina no protegida, los rendimientos en las reacciones de activación son muy superiores cuando la base está protegida. Otros grupos protectores adecuados incluyen los descritos en la Patente de Estados Unidos No. 8,076,476, la cual se incorpora por este medio como referencia en su totalidad.

La reacción de 3 con el compuesto de fósforo activado 4 da como resultado subunidades de morfolino que tienen la porción de enlace deseada 5.

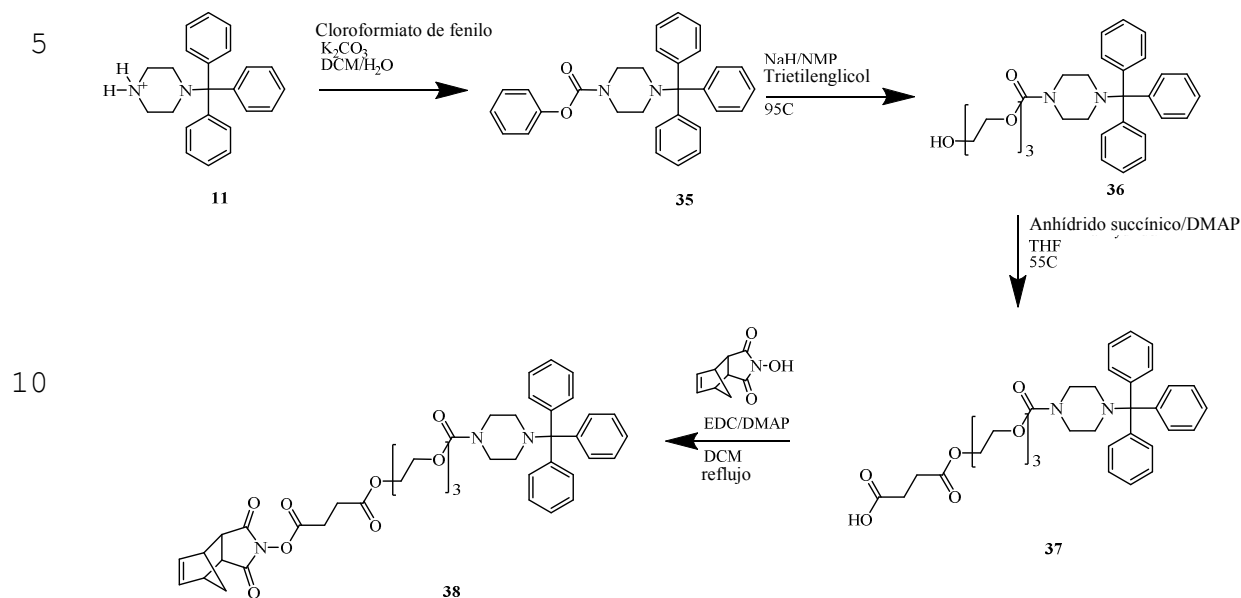
Los compuestos de estructura **4** se pueden preparar usando cualquier número de métodos conocidos por los expertos en la técnica. El acoplamiento con la porción de morfolino entonces procede como se describe anteriormente.

5 Los compuestos de estructura **5** se pueden usar en la síntesis de oligómeros en fase sólida para la preparación de oligómeros que comprenden los enlaces de intersubunidad. Tales métodos son bien conocidos en la técnica. Brevemente, un compuesto de estructura **5** se puede modificar en el extremo
10 5' para contener un enlazador a un soporte sólido. Una vez soportado, el grupo protector de **5** (por ejemplo, tritilo en el extremo 3') se remueve y la amina libre reacciona con una porción de fósforo activado de un segundo compuesto de estructura **5**. Esta secuencia se repite hasta obtener la
15 longitud deseada de oligo. El grupo protector en el extremo 3' terminal se puede remover o dejar activo si se desea una modificación en 3'. El oligo se puede remover del soporte sólido usando cualquier número de métodos, o un ejemplo de
20 tratamiento con una base para escindir el enlace con el soporte sólido.

La preparación de oligómeros de morfolino en general y oligómeros de morfolino específicos de la descripción se describen con más detalle en los Ejemplos.

Preparación de Oligómeros de Morfolino

La preparación de los compuestos de la descripción se realiza usando el siguiente protocolo de acuerdo con el Esquema de reacción 2:



Esquema de reacción 2: Preparación de Ácido de Cola Activado

Preparación de tritil piperazin fenil carbamato 35:

A una suspensión enfriada del compuesto 11 en diclorometano (6 ml/g DE 11) se añadió una solución de carbonato de potasio (3.2 eq) en agua (4 ml/g de carbonato de potasio). A esta mezcla de dos fases se añadió lentamente una solución de cloroformiato de fenilo (1.03 eq) en diclorometano (2 g/g de cloroformiato de fenilo). La mezcla de reacción se calentó a 20°C. Una vez completada la reacción (1-2 h), las capas se separaron. La capa orgánica se lavó con agua y se secó sobre carbonato de potasio anhidro. El producto 35 se aisló por cristalización a partir de acetonitrilo.

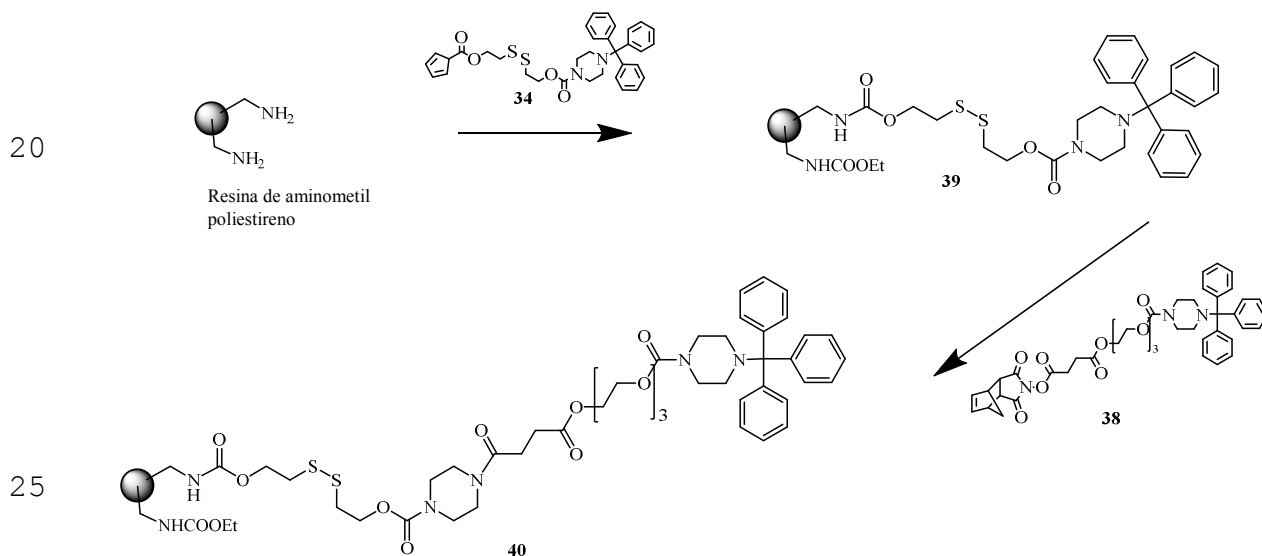
Preparación del alcohol de carbamato 36: Se suspendió hidruro de sodio (1.2 eq) en 1-metil-2-pirrolidinona (32 ml/g de hidruro de sodio). A esta suspensión se añadió trietilenglicol (10.0 eq) y compuesto 35
5 (1.0 eq). La pasta aguada resultante se calentó a 95°C. Una vez completada la reacción (1-2 h), la mezcla se enfrió a 20°C. A esta mezcla se añadió 30% diclorometano/metil terc-butil éter (v:v) y agua. La capa orgánica que contiene producto se lavó sucesivamente con NaOH acuoso, ácido
10 succínico acuoso y cloruro de sodio acuoso saturado. El producto 36 se aisló por cristalización a partir de diclorometano/metil terc-butil éter/heptano.

Preparación del Ácido de cola 37: A una solución del compuesto 36 en tetrahidrofurano (7 ml/g de 36) se añadió
15 anhídrido succínico (2.0 eq) y DMAP (0.5 eq). La mezcla se calentó a 50°C. Una vez completada la reacción (5 h), la mezcla se enfrió a 20°C y se ajustó a pH 8.5 con NaHCO₃ acuoso. Se añadió metil terc-butil éter, y el producto se extrajo en la capa acuosa. Se añadió diclorometano y la
20 mezcla se ajustó a pH 3 con ácido cítrico acuoso. La capa orgánica que contiene producto se lavó con una mezcla de amortiguador de citrato pH = 3 y cloruro de sodio acuoso saturado. Esta solución de diclorometano de 37 se utilizó sin aislamiento en la preparación del compuesto 38.

25 Preparación de 38: A la solución del compuesto 37

se añadió imida del ácido N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboxílico (HONB) (1.02 eq), 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (0.34 eq), y luego clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) (1.1 eq). La mezcla se calentó a 55°C. Una vez completada la reacción (4-5 h), la mezcla se enfrió a 20°C y se lavó sucesivamente con 1:1 de ácido cítrico 0.2 M/salmuera y salmuera. La solución de diclorometano se sometió a intercambio de solvente a acetona y luego a N,N-dimetilformamida, y el producto se aisló por precipitación a partir de acetona/N,N-dimetilformamida en cloruro de sodio acuoso saturado. El producto crudo se formó en lechada varias veces en agua para remover la N, N-dimetilformamida residual y sales.

La introducción de la "Cola" activada en la resina cargada de anclaje se realizó en dimetilimidazolidinona (DMI) por el procedimiento usado para la incorporación de las subunidades durante la síntesis en fase sólida.



Esquema de reacción 3: Preparación del Soporte Sólido para la Síntesis de Oligómeros de Morfolino

Este procedimiento se realizó en un recipiente para péptidos encamisado y silanizada (ChemGlass, NJ, EUA) con una frita de vidrio de porosidad gruesa (40-60 μm), agitador superior y llave de paso de teflón de 3 vías para permitir que el N_2 burbujee a través de la frita o una extracción al vacío.

Las etapas de tratamiento/lavado de resina en el siguiente procedimiento consisten en dos operaciones básicas: fluidización de la resina o reactor de lecho agitado y extracción con solvente/solución. Para la fluidización de la resina, la llave de paso se colocó para permitir que el N_2 fluyera hacia arriba a través de la frita y el tratamiento/lavado de resina especificado se añadió al reactor y se dejó que permeara y humedeciera completamente la resina. Luego el mezclado se inició y la lechada de resina se mezcló durante el tiempo especificado. Para la extracción de solvente/solución, se detuvieron el mezclado y flujo de N_2 y la bomba de vacío se inició y luego se colocó la llave de paso para permitir la evacuación del tratamiento/lavado de resina a los residuos. Todos los volúmenes de tratamiento/lavado de resina fueron 15 ml/g de resina, a menos que se indique lo contrario.

A la resina de aminometilpoliestireno (100-200 mesh; ~1.0 mmol/g de carga basada en la sustitución de nitrógeno; 75 g, 1 eq, Polymer Labs, RU, pieza # 1464-X799) en un recipiente para péptidos encamisado silanizado se
5 añadió 2-pirrolidinona (NMP; 20 ml/g de resina) y la resina se dejó hinchar con mezclado durante 1-2 horas. Después de la evacuación del solvente hinchado, la resina se lavó con diclorometano (2 x 1-2 min), 5% diisopropiletilamina en 25% isopropanol/diclorometano (2 x 3-4 min) y diclorometano (2 x
10 1-2 min). Después de la evacuación del lavado final, la resina se trató con una solución de anclaje de disulfuro 34 en 1-metil-2-pirrolidinona (0.17 M; 15 ml/g de resina, ~2.5 eq) y la mezcla de resina/reactivo se calentó a 45°C durante 60 h. Al finalizar la reacción, el calentamiento se
15 interrumpió y la solución de anclaje se evacuó y la resina se lavó con 1-metil-2-pirrolidinona (4 x 3-4 min) y diclorometano (6 x 1-2 min). La resina se trató con una solución de 10% (v/v) dicarbonato de dietilo en diclorometano (16 ml/g; 2 x 5-6 min) y luego se lavó con diclorometano (6 x
20 1-2 min). La resina 39 se secó bajo una corriente de N₂ durante 1-3 horas y luego bajo vacío hasta peso constante ($\pm$ 2%). Rendimiento: 110-150% del peso de resina original.

Determinación de la Carga de Resina de Disulfuro de Aminometilpoliestireno: La carga de la resina (número de
25 sitios reactivos potencialmente disponibles) se determinó por

un ensayo espectrométrico para el número de grupos trifenilmetilo (tritrilo) por gramo de resina.

Un peso conocido de resina seca (25 ± 3 mg) se transfirió a un matraz volumétrico de 25 ml silanizado y se
5 añadieron ~5 ml de ácido trifluoroacético al 2% (v/v) en diclorometano. Los contenidos se mezclaron por agitación suave y luego se dejaron reposar durante 30 min. El volumen se llevó hasta 25 ml con 2% (v/v) ácido trifluoroacético adicional en diclorometano y el contenido se mezcló
10 completamente. Usando una pipeta de desplazamiento positivo, se transfirió una alícuota de la solución que contiene tritrilo (500 μ l) a un matraz volumétrico de 10 ml y el volumen se llevó hasta 10 ml con ácido metanosulfónico.

El contenido de catión de tritrilo en la solución
15 final se midió por absorbancia UV a 431.7 nm y la carga de resina se calculó en grupos tritrilo por gramo de resina (μ mol/g) usando los volúmenes, diluciones, coeficiente de extinción (ϵ : 41 μ mol-1cm-1) y peso de resina apropiados. El ensayo se realizó por triplicado y se calculó una carga
20 promedio.

El procedimiento de carga de resina en este ejemplo proporcionará resina con una carga de aproximadamente 500 μ mol/g. Se obtuvo una carga de 300-400 en μ mol/g si la etapa de incorporación del anclaje disulfuro se realizó durante 24
25 horas a temperatura ambiente.

Carga de cola: Usando la misma configuración y volúmenes que para la preparación de la resina de disulfuro de aminometilpoliestireno, la cola se puede introducir en el soporte sólido. La resina cargada con anclaje se desprotegió
5 primero en condiciones ácidas y el material resultante se neutralizó antes del acoplamiento. Para la etapa de acoplamiento, se utilizó una solución de 38 (0.2 M) en DMI que contenía 4-etilmorfolina (NEM, 0.4 M) en lugar de la solución de anclaje de disulfuro. Después de 2 horas a 45°C,
10 la resina 39 se lavó dos veces con 5% diisopropiletilamina en 25% isopropanol/diclorometano y una vez con DCM. A la resina se añadió una solución de anhídrido benzoico (0.4 M) y NEM (0.4 M). Después de 25 minutos, la camisa del reactor se enfrió a temperatura ambiente y la resina se lavó dos veces
15 con 5% diisopropiletilamina en 25% isopropanol/diclorometano y ocho veces con DCM. La resina 40 se filtró y se secó a alto vacío. La carga para la resina 40 se definió como la carga de la resina de disulfuro de aminometilpoliestireno original 39 usada en la carga de cola.

20 Síntesis en Fase Sólida: Se prepararon oligómeros de morfolino en un sintetizador de péptidos automatizado Gilson AMS-422 en columnas de reacción de polipropileno Gilson de 2 ml (Pieza # 3980270). Un bloque de aluminio con canales para flujo de agua se colocó alrededor de las
25 columnas cuando se sentaron en el sintetizador. El AMS-422

alternativamente añadirá soluciones de reactivo/lavado, se mantendrá durante un tiempo específico y evacuará las columnas usando vacío.

Para oligómeros en el rango de hasta
5 aproximadamente 25 subunidades de longitud, se prefirió la resina de disulfuro de aminometilpoliestireno con una carga cerca de 500 $\mu\text{mol/g}$ de resina. Para oligómeros más grandes, se prefirió la resina de disulfuro de aminometilpoliestireno con una carga de 300-400 $\mu\text{mol/g}$ de resina. Si se desea una
10 molécula con cola 5', la resina que se ha cargado con cola se elige con las mismas directrices de carga.

Se prepararon las siguientes soluciones reactivas:

- Solución de Destritilación: 10% Ácido Cianoacético (p/v) en 4:1 diclorometano/acetonitrilo;
- 15 • Solución de Neutralización: 5% Diisopropiletilamina en 3:1 diclorometano/isopropanol;
- Solución de Acoplamiento: Subunidad de morfolino activada 0.18 M (o 0.24 M para oligómeros que han crecido más de 20 subunidades) del tipo de base y enlace
20 deseado y N-etilmorfolina 0.4 M en 1,3-dimetilimidazolidinona.

Se utilizó diclorometano (DCM) como un lavado de transición que separa los diferentes lavados de solución reactiva.

25 En el sintetizador, con el bloque establecido a

42°C, a cada columna que contenía 30 mg de resina de disulfuro de aminometilpoliestireno (o resina de cola) se añadieron 2 ml de 1-metil-2-pirrolidinona y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 min. Después del lavado con 2
 5 veces 2 ml de diclorometano, se empleó el siguiente ciclo de síntesis:

	<u>Etapas</u>	<u>Volumen</u>	<u>Suministro</u>	<u>Tiempo de Espera</u>
	Destitilación	1.5 mL	Colector	15 segundos
10	Destitilación	1.5 mL	Colector	15 segundos
	Destitilación	1.5 mL	Colector	15 segundos
	Destitilación	1.5 mL	Colector	15 segundos
	Destitilación	1.5 mL	Colector	15 segundos
	Destitilación	1.5 mL	Colector	15 segundos
15	Destitilación	1.5 mL	Colector	15 segundos
	DCM	1.5 mL	Colector	30 segundos
	Neutralización	1.5 mL	Colector	30 segundos
	Neutralización	1.5 mL	Colector	30 segundos
	Neutralización	1.5 mL	Colector	30 segundos
20	Neutralización	1.5 mL	Colector	30 segundos
	Neutralización	1.5 mL	Colector	30 segundos
	Neutralización	1.5 mL	Colector	30 segundos
	DCM	1.5 mL	Colector	30 segundos
	Acoplamiento	350-500uL	Jeringa	40 minutos
25	DCM	1.5 mL	Colector	30 segundos

	Neutralización	1.5 mL	Colector	30 segundos
	Neutralización	1.5 mL	Colector	30 segundos
	DCM	1.5 mL	Colector	30 segundos
	DCM	1.5 mL	Colector	30 segundos
5	DCM	1.5 mL	Colector	30 segundos

Las secuencias de los oligómeros individuales se programaron en el sintetizador de modo que cada columna reciba la solución de acoplamiento adecuada (A, C, G, T, I) en la secuencia apropiada. Cuando el oligómero en una columna completó la incorporación de su subunidad final, la columna se removi6 del bloque y se realizó un ciclo final manualmente con una solución de acoplamiento comprendida de cloruro de 4-metoxifenilmetilo (0.32 M en DMI) que contenía 4-etilmorfolina 0.89 M.

Escisión de la resina y remoción de bases y grupos protectores del esqueleto: Después de la metoxitritilación, la resina se lavó 8 veces con 2 ml de 1-metil-2-pirrolidinona. Se a6adió un ml de una solución de escisión que consistía en 1,4-ditiotreitol (DTT) 0.1 M y trietilamina 0.73 M en 1-metil-2-pirrolidinona, la columna se tapó y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 min. Después de ese tiempo, la solución se drenó en un vial Wheaton de 12 ml. La resina muy encogida se lavó dos veces con 300 µl de solución de escisión. A la solución se a6adieron 4.0 mL de

amoníaco acuoso conc. (almacenado a -20°C), el vial tapado herméticamente (con tapón de rosca revestido de Teflón) y la mezcla se agitó para mezclar la solución. El vial se colocó en un horno a 45°C durante 16-24 h para efectuar la escisión de la basa y grupos protectores del esqueleto.

Purificación del producto crudo: La solución de amonolisis en vial se removió del horno y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La solución se diluyó con 20 ml de 0.28% amoníaco acuoso y se pasó a través de una columna de 2.5 x 10 cm que contenía resina Macroprep HQ (BioRad). Se utilizó un gradiente de sal (A: 0.28% amoníaco con B: cloruro de sodio 1 M en 0.28% amoníaco; 0-100% B en 60 minutos) para eluir el pico que contenía metoxitritilo. Las fracciones combinadas se agruparon y se procesaron adicionalmente dependiendo del producto deseado.

Desmetoxitritilación de Oligómeros de Morfolino: Las fracciones agrupadas de la purificación de Macroprep se trataron con H_3PO_4 1 M para reducir el pH a 2.5. Después del mezclado inicial, las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 4 minutos, momento en el cual se neutralizaron a pH 10-11 con 2.8% amoníaco/agua. Los productos se purificaron por extracción en fase sólida (SPE).

Empacado y acondicionamiento de la columna de SPE: Amberchrome CG-300M (Rohm and Haas; Philadelphia, PA) (3 ml) se empacó en columnas con fritas de 20 ml (Columnas de

Cromatografía BioRad Econo-Pac (732-1011)) y la resina se enjuagó con 3 ml de los siguientes: 0.28% NH₄OH/80% acetonitrilo; NaOH 0.5 M/20% etanol; agua; H₃PO₄ 50 mM/80% acetonitrilo; agua; NaOH 0.5 M/20% etanol; agua; 0.28% NH₄OH.

5 Purificación de SPE: La solución de la desmetoxitritilación se cargó en la columna y la resina se enjuagó tres veces con 3-6 ml de 0.28% amoníaco acuoso. Se colocó un vial Wheaton (12 ml) debajo de la columna y el producto se eluyó con dos lavados con 2 ml de 45%
10 acetonitrilo en 0.28% amoniacos acuoso.

 Aislamiento del producto: las soluciones se congelaron en hielo seco y los viales se colocaron en un secador por congelación para producir un polvo blanco esponjoso. Las muestras se disolvieron en agua, se filtraron
15 a través de un filtro de 0.22 micras (filtro de jeringa de 25 mm Pall Life Sciences, Acrodisc, con una membrana de 0.2 micras HT Tuffryn) usando una jeringa y la densidad óptica (OD) se midió en un espectrofotómetro UV para determinar las unidades de OD del oligómero presente, así como la muestra de
20 dispensación para el análisis. Las soluciones se colocaron de nuevo en viales Wheaton para la liofilización.

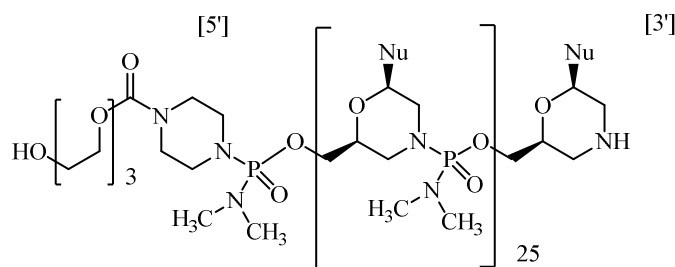
 Análisis de Oligómeros de Morfolino por MALDI: Se utilizó espectrometría de masas MALDI-TOF para determinar la composición de las fracciones en las purificaciones, así como
25 para proporcionar evidencia de la identidad (peso molecular)

de los oligómeros. Las muestras se corrieron después de la dilución con una solución de ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ácido sinapínico), 3,4,5-trihidroxiacetofenona (THAP) o ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) como matrices.

Ejemplo 2

Usando el protocolo descrito en el Ejemplo 1, el siguiente PMO se sintetizó y se utilizó en los Ejemplos.

10



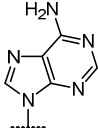
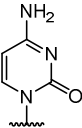
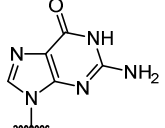
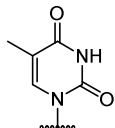
Compuesto 1

15

donde cada Nu desde 1 a 26 y 5' a 3' es:

20

Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu
1	C	6	G	11	C	16	A	21	C	26	A
2	C	7	C	12	C	17	G	22	T		
3	A	8	C	13	T	18	T	23	G		
4	A	9	A	14	G	19	T	24	T		
5	T	10	T	15	G	20	C	25	A		

donde A es , C es , G es , y T es .

25

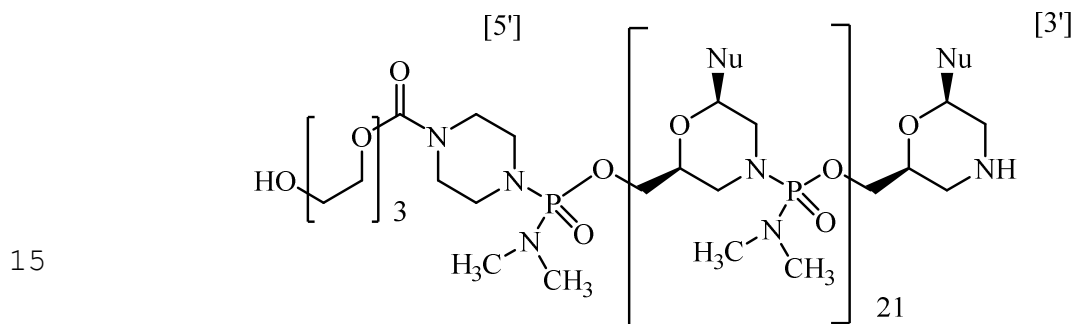
HPLC: 78.60%; Condiciones: Dionex DNAPac (DNX # 97)

Gradiente: 75% A + 20% B + 5% C a 0 min; 50% A a 20 min; 25% A + 75% C a 21 min; Fase móvil A: NaOH 10 mM/NaCl 20 mM; C: NaOH 10 mM/NaCl 0.5 M. Temperatura de Columna: 45C; Velocidad de flujo de 1.0 ml/min.

5 Masa confirmada de espectrometría de masas MALDI:
8908.2

Ejemplo 3

Usando el protocolo descrito en el Ejemplo 1, el
10 siguiente PMO se sintetizó y se utilizó en los Ejemplos.



Compuesto 2

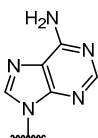
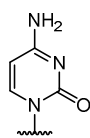
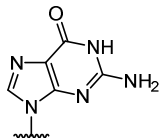
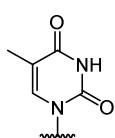
donde cada Nu desde 1 a 22 y 5' a 3' es:

20

Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu
1	C	6	C	11	C	16	G	21	T
2	A	7	C	12	T	17	T	22	G
3	A	8	A	13	G	18	T		
4	T	9	T	14	G	19	C		

25

5	G	10	C	15	A	20	C		
---	---	----	---	----	---	----	---	--	--

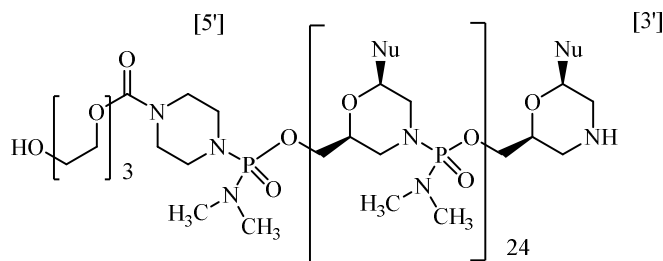
donde A es , C es , G es , y T es .

5 HPLC: 71.85%; Condiciones: Dionex DNAPac (DNX # 97)
 Gradiente: 75% A + 20% B + 5% C a 0 min; 50% A a 20 min; 25%
 A + 75% C a 21 min; Fase móvil A: NaOH 10 mM/NaCl 20 mM; C:
 NaOH 10 mM/NaCl 0.5 M. Temperatura de Columna: 45C; Velocidad
 de flujo de 1.0 ml/min.

10 Masa confirmada de espectrometría de masas MALDI:
 7588.39.

Ejemplo 4

Usando el protocolo descrito en el Ejemplo 1, el
 siguiente PMO se sintetizó y se utilizó en los Ejemplos.



Compuesto 3

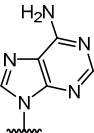
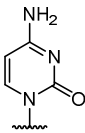
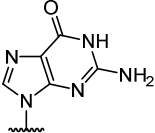
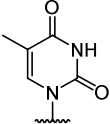
20 donde cada Nu desde 1 a 25 y 5' a 3' es:

Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu
1	T	6	T	11	G	16	C	21	A
2	G	7	C	12	A	17	C	22	A
3	C	8	C	13	G	18	T	23	G

25

4	C	9	T	14	T	19	G	24	A
5	A	10	G	15	T	20	T	25	T

5

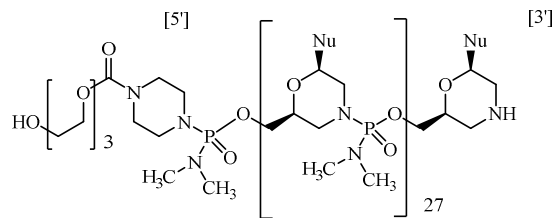
donde A es , C es , G es , y T es .

10 HPLC: 78.00%; Condiciones: Dionex DNAPac (DNX # 97)
 Gradiente: 75% A + 20% B + 5% C a 0 min; 50% A a 20 min; 25%
 A + 75% C a 21 min; Fase móvil A: NaOH 10 mM/NaCl 20 mM; C:
 NaOH 10 mM/NaCl 0.5 M. Temperatura de Columna: 45C; Velocidad
 de flujo de 1.0 ml/min.

15 Masa confirmada de espectrometría de masas MALDI:
 8623.84

Ejemplo 5

Usando el protocolo descrito en el Ejemplo 1, el
 20 siguiente PMO se sintetizó y se utilizó en los Ejemplos.

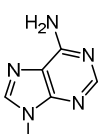
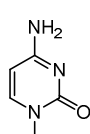
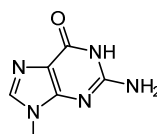
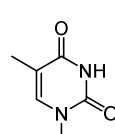


Compuesto 4

25 donde cada Nu desde 1 a 28 y 5' a 3' es:

5

Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu
1	C	6	C	11	C	16	G	21	T	26	G
2	A	7	C	12	T	17	T	22	G	27	A
3	A	8	A	13	G	18	T	23	T	28	T
4	T	9	T	14	G	19	C	24	A		
5	G	10	C	15	A	20	C	25	A		

donde A es , C es , G es , y T es .

10

HPLC: 71.84%; Condiciones: Dionex DNAPac (DNX # 97)

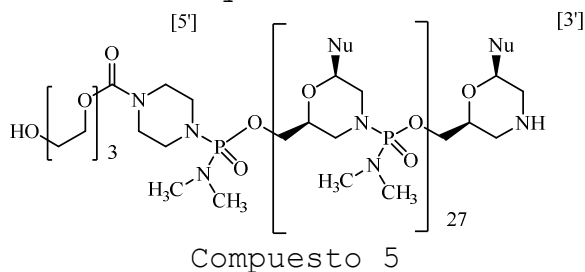
Gradiente: 75% A + 20% B + 5% C a 0 min; 50% A a 20 min; 25% A + 75% C a 21 min; Fase móvil A: NaOH 10 mM/NaCl 20 mM; C: NaOH 10 mM/NaCl 0.5 M. Temperatura de Columna: 45C; Velocidad de flujo de 1.0 ml/min.

15

Masa confirmada de espectrometría de masas MALDI: 9616.50.

Ejemplo 6

Usando el protocolo descrito en el Ejemplo 1, el siguiente PMO se sintetizó y se utilizó en los Ejemplos.

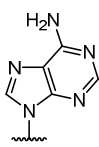
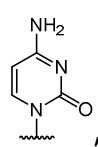
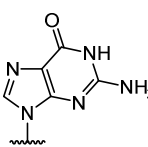
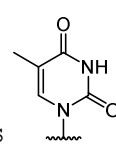


25

donde cada Nu desde 1 a 28 y 5' a 3' es:

5

Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu
1	T	6	T	11	G	16	C	21	A	26	A
2	G	7	C	12	A	17	C	22	A	27	C
3	C	8	C	13	G	18	T	23	G	28	C
4	C	9	T	14	T	19	G	24	A		
5	A	10	G	15	T	20	T	25	T		

donde A es , C es , G es , y T es .

HPLC: 75.15%; Condiciones: Dionex DNAPac (DNX # 97)

10

Gradiente: 75% A + 20% B + 5% C a 0 min; 50% A a 20 min; 25% A + 75% C a 21 min; Fase móvil A: NaOH 10 mM/NaCl 20 mM; C: NaOH 10 mM/NaCl 0.5 M. Temperatura de Columna: 45C; Velocidad de flujo de 1.0 ml/min.

Masa confirmada de espectrometría de masas MALDI:

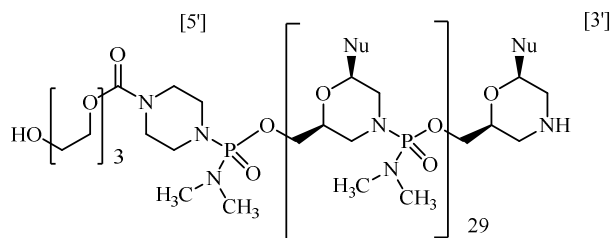
15

9593.64.

Ejemplo 7

Usando el protocolo descrito en el Ejemplo 1, el siguiente PMO se sintetizó y se utilizó en los Ejemplos.

20



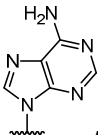
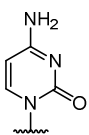
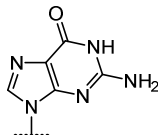
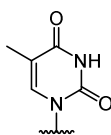
Compuesto 6

25

donde cada Nu desde 1 a 30 y 5' a 3' es:

5

Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu	Posición No. 5' a 3'	Nu
1	A	6	C	11	T	16	T	21	G	26	A
2	A	7	A	12	G	17	T	22	T	27	T
3	T	8	T	13	G	18	C	23	A	28	A
4	G	9	C	14	A	19	C	24	A	29	C
5	C	10	C	15	G	20	T	25	G	30	C

donde A es , C es , G es , y T es .

10

HPLC: 75.15%; Condiciones: Dionex DNAPac (DNX # 97)

Gradiente: 75% A + 20% B + 5% C a 0 min; 50% A a 20 min; 25% A + 75% C a 21 min; Fase móvil A: NaOH 10 mM/NaCl 20 mM; C: NaOH 10 mM/NaCl 0.5 M. Temperatura de Columna: 45C; Velocidad de flujo de 1.0 ml/min.

15

Masa confirmada de espectrometría de masas MALDI:

10271.39

Ejemplo 8

Omisión del Exón 45

20

Se preparó una serie de oligómeros antisentido descritos en los Ejemplos 2-6 que se dirigen al exón 45 de distrofina humana como se describe en la tabla a continuación y se evaluó su capacidad para inducir la omisión del exón 45.

25

	<u>Nombre compuesto</u>	<u>Región Objetivo de Exón 45</u>	<u>Secuencia Base</u>	<u>SEQ ID NO</u>
	Compuesto 1	H45A(-06+20)	CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA	1
	Compuesto 2	H45A(-03+19)	CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG	2
	Compuesto 3	H45A(-09+16)	TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT	3
	Compuesto 4	H45A(-09+19)	CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT	4
5	Compuesto 5	H45A(-12+16)	TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATACC	5
	Compuesto 6	hE45CMC (-12+18)	AATGCCATCCTGGAG TTCCTGTAAGATACC	10

Específicamente, se usaron células de rabdomiosarcoma humano para determinar la capacidad de los compuestos 1-5 para inducir la omisión del exón 45 a diferentes concentraciones (es decir, 12.5 μM , 2.5 μM , 0.5 μM y 0.25 μM). Veinticuatro horas después de la nucleofección, el ARN se recolectó y se sometió a RT-PCR anidada. Las muestras se analizaron usando electroforesis en gel de acrilamida marcada con Cy5 y se calculó el porcentaje de omisión de exón. Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

	Oligómero Antisentido	Porcentaje de Omisión de Exones	
		Dosis 12.5 μM	Dosis de 2.5 μM
	Compuesto 2	80	31
20	Compuesto 1	74	26
	Compuesto 4	71	18
	Compuesto 3	68	17
	Compuesto 5	63	18
	Compuesto 6	44	19

Los resultados indicaron una respuesta a la dosis

en los niveles de omisión del exón 45 en todos los PMO analizados. Sorprendentemente, el Compuesto 2 indujo el mayor porcentaje de omisión del exón 45 a concentraciones de 12.5 μm y 2.5 μm en relación con los otros PMO analizados. En particular, el Compuesto 2 indujo 82% más de omisión del exón 45 que el Compuesto 6 a una concentración de 12.5 μm .

Todas las publicaciones y solicitudes de patente citadas en esta especificación se incorporan en la presente como referencia, como si cada publicación individual o solicitud de patente estuviera indicada específica e individualmente para ser incorporada como referencia.

REFERENCIAS

Aartsma-Rus, A., A. A. Janson, et al. (2004).
15 "Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense." Am J Hum Genet **74**(1): 83-92.

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

Dunckley, M. G., I. C. Eperon, et al. (1997).
"Modulation of splicing in the DMD gene by antisense oligoribonucleotides." Nucleosides & Nucleotides **16**(7-9):
25 1665-1668.

- Dunckley, M. G., M. Manoharan, et al. (1998). "Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured Mdx muscle cells by antisense oligoribonucleotides." Hum Mol Genet **7**(7): 1083-90.
- 5 Errington, S. J., C. J. Mann, et al. (2003). "Target selection for antisense oligonucleotide induced exon skipping in the dystrophin gene." J Gene Med **5**(6): 518-27.
- Goemans, N. M., M. Tulinus, et al. (2011). "Systemic Administration of PRO051 in Duchenne's Muscular
- 10 Dystrophy." N Engl J Med.
- Jearawiriyapaisarn, N., H. M. Moulton, et al. (2008). "Sustained Dystrophin Expression Induced by Peptide-conjugated Morpholino Oligomers in the Muscles of mdx Mice." Mol Ther.
- 15 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.
- 20 Lu, Q. L., C. J. Mann, et al. (2003). "Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse." Nat Med **9**(8): 1009-14.
- Mann, C. J., K. Honeyman, et al. (2002). "Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx
- 25 mouse model of muscular dystrophy." J Gene Med **4**(6): 644-54.

Marshall, N. B., S. K. Oda, et al. (2007).
"Arginine-rich cell-penetrating peptides facilitate delivery
of antisense oligomers into murine leukocytes and alter pre-
mRNA splicing." Journal of Immunological Methods **325**(1-2):
5 114-126.

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

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

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

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

Sierakowska, H., M. J. Sambade, et al. (1996).
"Repair of thalassemic human beta-globin mRNA in mammalian
25 cells by antisense oligonucleotides." Proc Natl Acad Sci U S

A **93**(23): 12840-4.

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

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

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

 van Deutekom, J. C., A. A. Janson, et al. (2007).
15 "Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide
PRO051." N Engl J Med **357**(26): 2677-86.

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

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

 Wu, B., H. M. Moulton, et al. (2008). "Effective
25 rescue of dystrophin improves cardiac function in dystrophin-

deficient mice by a modified morpholino oligomer." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(39): 14814-9.

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

LISTADO DE SECUENCIAS

	<u>Descripción</u>	<u>Secuencia</u>	<u>SEQ ID NO</u>
10	H45A(-06+20)	CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA	1
	H45A(-03+19)	CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG	2
	H45A(-09+16)	TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT	3
	H45A(-09+19)	CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT	4
	H45A(-12+16)	TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATACC	5
	Cebador delantero externo	CAATGCTCCTGACCTCTGTGC	6
15	Cebador inverso externo	GCTCTTTTCCAGGTTCAAGTGG	7
	Cebador delantero interno	GTCTACAACAAAGCTCAGGTCG	8
	Cebador inverso interno	GCAATGTTATCTGCTTCCTCCAACC	9
	hE45CMC (-12+18)	AATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATACC	10

20

25